

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2009-190983

(P2009-190983A)

(43) 公開日 平成21年8月27日(2009.8.27)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07H 21/04 (2006.01)	C07H 21/04 B	4B024
C07H 19/10 (2006.01)	C07H 19/10 CSP	4B029
C07H 19/20 (2006.01)	C07H 19/20 ZNA	4B063
C07H 21/02 (2006.01)	C07H 21/02	4C057
A61K 31/7088 (2006.01)	A61K 31/7088	4C084

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 35 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2008-30372 (P2008-30372)
 (22) 出願日 平成20年2月12日 (2008.2.12)

(71) 出願人 304021417
 国立大学法人東京工業大学
 東京都目黒区大岡山2丁目12番1号
 (74) 代理人 100104684
 弁理士 関根 武
 (74) 代理人 100100413
 弁理士 渡部 温
 (72) 発明者 清尾 康志
 神奈川県横浜市緑区長津田町4259 国立大学法人東京工業大学内
 (72) 発明者 関根 光雄
 神奈川県横浜市緑区長津田町4259 国立大学法人東京工業大学内

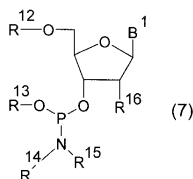
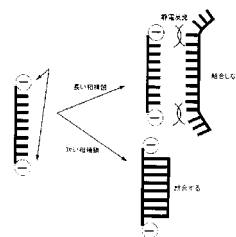
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 オリゴヌクレオチド誘導体

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 オリゴヌクレオチド誘導体合成に有用である新規なヌクレオチド誘導体、及び該誘導体を用いて得られ、短い相補鎖と結合し長い相補鎖RNAや相補DNAとは結合しないオリゴヌクレオチドの提供。

【解決手段】 下記式で表されるホスホロアミダイト化合物、および該化合物を用いて得られるオリゴヌクレオチド誘導体。



該誘導体は、オリゴヌクレオチドアレイや医薬組成物として有用である。

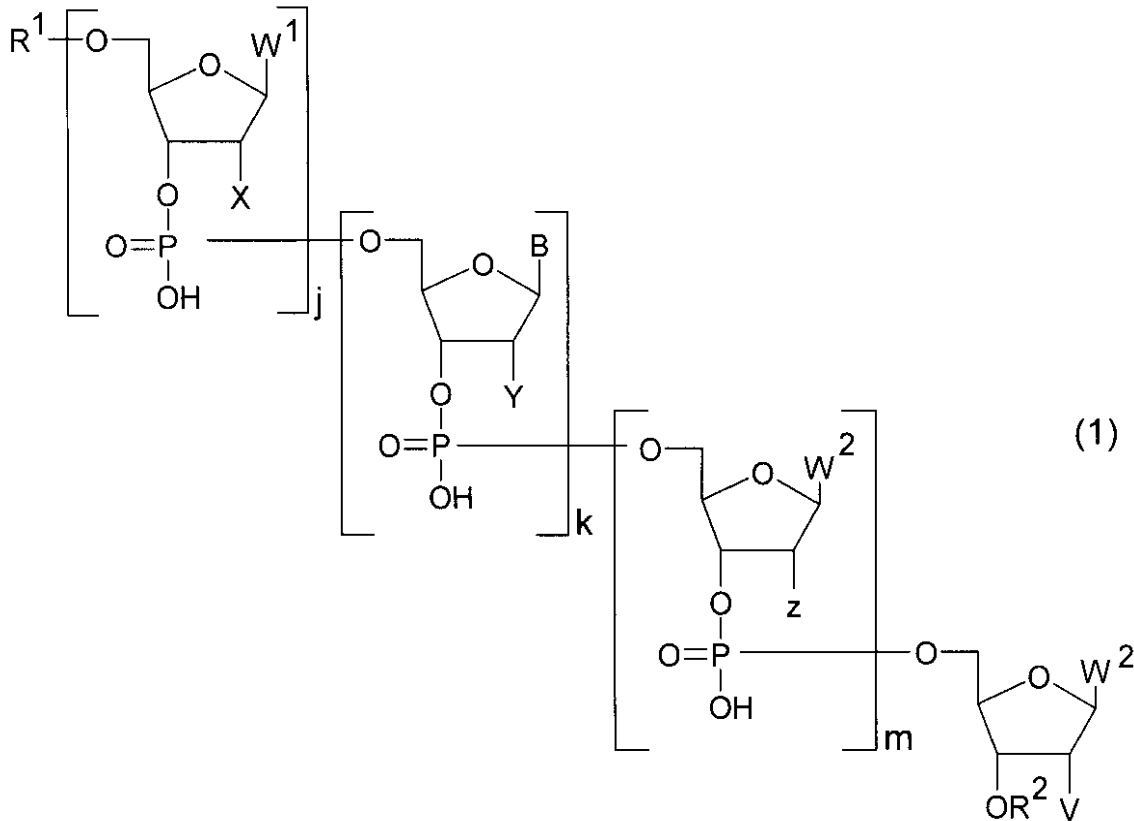
【選択図】 図1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

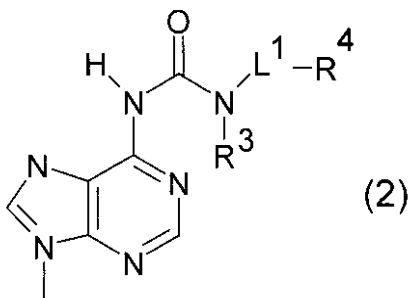
一般式(1)で表わされるオリゴヌクレオチド誘導体及びそれらの塩。

【化 1】



(式中、 R^1 及び R^2 は同一であっても異なってもよく、水素原子又は炭素数 1 ~ 6 個のアルキル基を表わし、 j 及び m は同一であっても異なってもよく、1 ~ 10 の整数を表わし、 k は 1 ~ 50 の整数を表わし、 X 、 Y 及び Z は同一であっても異なってもよく、水酸基、水素原子、又は置換基を有してもよいアルコキシ基を表わす。 V は水素原子、水酸基、又は置換基を有してもよいアルコキシ基を表わし、 B は、互いに異なってもよい、天然もしくは非天然型の核酸塩基を表わし、 W^1 は、互いに異なってもよい、天然型もしくは非天然型の核酸塩基又は下記一般式(2)、一般式(4)一般式(5)又は一般式(6)のいずれかで表わされる基を表わし、 W^2 は、互いに異なってもよい、天然型もしくは非天然型の核酸塩基又は下記一般式(2)、一般式(4)、一般式(5)又は一般式(6)のいずれかで表わされる基を表わす(但し、 W^1 及び W^2 のうち少なくとも 1 個は一般式(2)、一般式(4)、一般式(5)又は一般式(6)のいずれかで表わされる基である。)

【化 2】



(式中、 R^3 は水素原子又は炭素数 1 ~ 6 個のアルキル基を表わし、 L^1 は炭素数 2 ~ 6

10

20

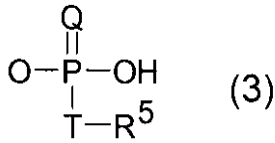
30

40

50

個のアルカン - ジイル基、炭素数 4 ~ 8 個のシクロアルカン - ジイル基、フェニレン基、又はナフチリデン基を表わし、 R^4 はカルボキシル基、末端にカルボキシル基を有する炭素数 1 ~ 6 個のアルキル基、一般式 (3) で表わされる基、又は末端に一般式 (3) で表わされる基を有する炭素数 1 ~ 6 個のアルキル基を表わす。)

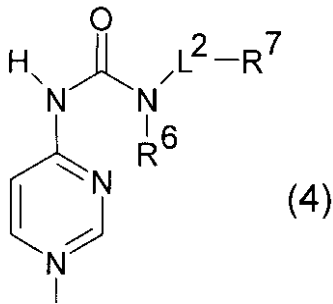
【化 3】



10

(式中、Q 及び T は、互いに同一であっても異なってもよく、酸素原子又は硫黄原子を表わし、 R^5 は水素原子、又は置換基を有してもよい炭素数 1 ~ 6 個のアルキル基を表わす。)

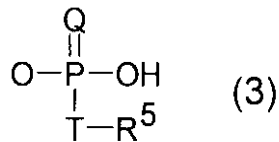
【化 4】



20

(式中、 R^6 は水素又は炭素数 1 ~ 6 個のアルキル基を表わし、 L^2 は炭素数 2 ~ 6 個のアルカン - ジイル基、炭素数 4 ~ 8 個のシクロアルカン - ジイル基、フェニレン基、又はナフチリデン基を表わし、 R^7 はカルボキシル基、末端にカルボキシル基を有する炭素数 1 ~ 6 個のアルキル基、一般式 (3) で表わされる基、又は末端に一般式 (3) で表わされる基を有する炭素数 1 ~ 6 個のアルキル基を表わす。)

【化 5】

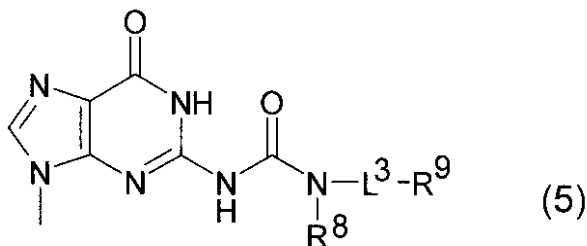


30

(式中、Q 及び T は、互いに同一であっても異なってもよく、酸素原子又は硫黄原子を表わし、 R^5 は水素原子、又は置換基を有してもよい炭素数 1 ~ 6 個のアルキル基を表わす。)

40

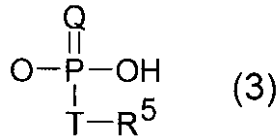
【化 6】



50

(式中、 R^8 は水素又は炭素数 1 ~ 6 個のアルキル基を表わし、 L^3 は炭素数 2 ~ 6 個のアルカン - ジイル基、炭素数 4 ~ 8 個のシクロアルカン - ジイル基、フェニレン基、又はナフチリデン基を表わし、 R^9 はカルボキシル基、末端にカルボキシル基を有する炭素数 1 ~ 6 個のアルキル基、一般式 (3) で表わされる基、又は末端に一般式 (3) で表わされる基を有する炭素数 1 ~ 6 個のアルキル基を表わす。)

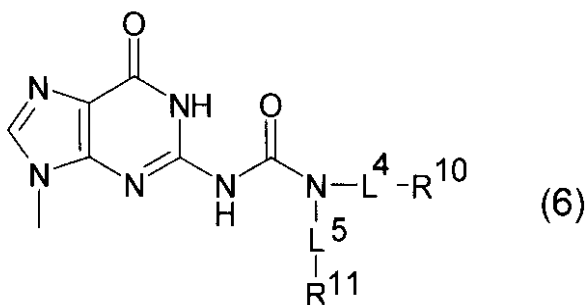
【化 7】



10

(式中、Q 及び T は、互いに同一であっても異なってもよく、酸素原子又は硫黄原子を表わし、 R^5 は水素原子、又は置換基を有してもよい炭素数 1 ~ 6 個のアルキル基を表わす。)

【化 8】

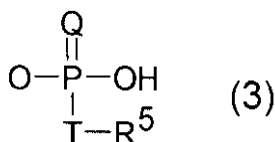


20

(式中、 L^4 、 L^5 は互いに同一であっても異なってもよく炭素数 2 ~ 6 個のアルカン - ジイル基、炭素数 4 ~ 8 個のシクロアルカン - ジイル基、フェニレン基、又はナフチリデン基を表わし、 R^{10} 、 R^{11} は互いに同一であっても異なってもよくカルボキシル基、末端にカルボキシル基を有する炭素数 1 ~ 6 個のアルキル基、一般式 (3) で表わされる基、又は末端に一般式 (3) で表わされる基を有する炭素数 1 ~ 6 個のアルキル基を表わす。)

30

【化 9】



(式中、Q 及び T は、互いに同一であっても異なってもよく、酸素原子又は硫黄原子を表わし、 R^5 は水素原子、又は置換基を有してもよい炭素数 1 ~ 6 個のアルキル基を表わす。)

40

【請求項 2】

核酸検出用プローブとして用いられる、請求項 1 記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

【請求項 3】

請求項 1 又は 2 に記載のオリゴヌクレオチド誘導体を固体担体上に固定化してなるオリゴヌクレオチドアレイ。

【請求項 4】

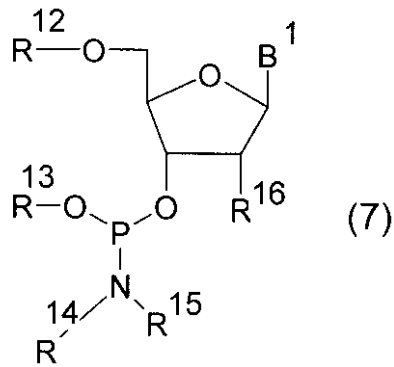
請求項 1 又は 2 記載のオリゴヌクレオチド誘導体を含む医薬組成物。

【請求項 5】

一般式 (7) で表わされるホスホロアミダイト化合物。

50

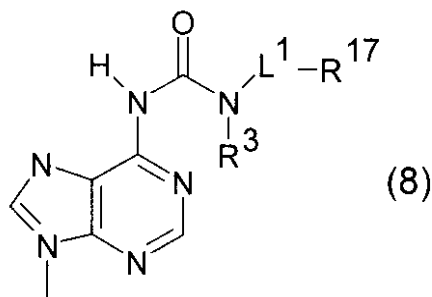
【化 1 0】



10

(式中、 R^{12} は、5' 水酸基の保護基を表わし、 R^{13} はリン酸基の保護基を表わし、 R^{14} 及び R^{15} は、同一であっても異なってもよく、炭素数 1 ~ 6 個のアルキル基を表わし、 R^{14} 及び R^{15} が互いに結合して窒素原子とともに、環員数 3 ~ 13 個の環を形成してもよく、 R^{16} は水素原子、置換基を有してもよいアルコキシ基、RNA 2' 水酸基の保護基で保護された水酸基を表わし、 B^1 は一般式 (8)、(9) (10) 又は (11) のいずれかで表わされる基を表わす。)

【化 1 1】

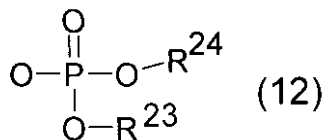


20

(式中、 R^3 は水素又は炭素数 1 ~ 6 個のアルキル基を表わし、 L^1 は炭素数 2 ~ 6 個のアルカン - ジル基、炭素数 4 ~ 8 個のシクロアルカン - ジル基、フェニレン基、又はナフチリデン基を表わし、 R^{17} は、一般式 (12) で表わされる置換基、保護された水酸基、保護されたカルボキシル基、末端に保護されたカルボキシル基を有する炭素数 1 ~ 6 個のアルキル基、末端に一般式 (12) で表わされる置換基を有する炭素数 1 ~ 6 個のアルキル基、末端に保護された水酸基を有する炭素数 1 ~ 6 個のアルキル基を表わす。)

30

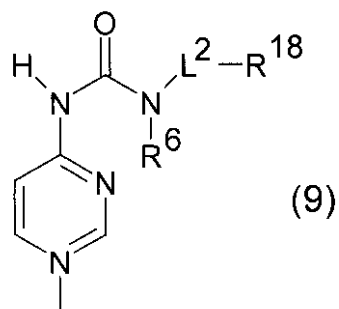
【化 1 2】



40

(式中、 R^{23} 及び R^{24} は、同一であっても異なってもよく、それぞれ、リン酸基の保護基を表わす。)

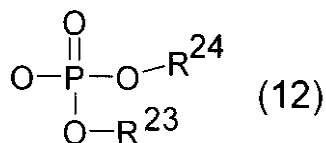
【化 1 3】



10

(式中 R⁶ は水素又は炭素数 1 ~ 6 個のアルキル基を表わし、L² は炭素数 2 ~ 6 個のアルカン - ジイル基、炭素数 4 ~ 8 個のシクロアルカン - ジイル基、フェニレン基、又はナフチリデン基を表わし、R¹⁸ は、一般式 (1 2) で表わされる置換基、保護された水酸基、保護されたカルボキシル基、末端に保護されたカルボキシル基を有する炭素数 1 ~ 6 個のアルキル基、末端に一般式 (1 2) で表わされる置換基を有する炭素数 1 ~ 6 個のアルキル基、末端に保護された水酸基を有する炭素数 1 ~ 6 個のアルキル基を表わす。)

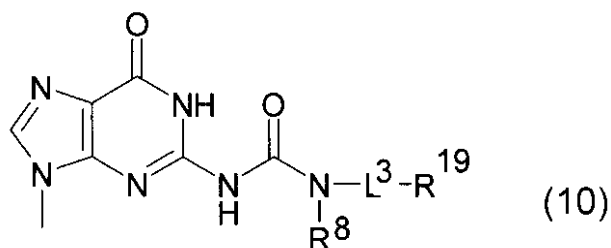
【化 1 4】



20

(式中、R²³ 及び R²⁴ は、同一であっても異なってもよく、それぞれ、リン酸基の保護基を表わす。)

【化 1 5】

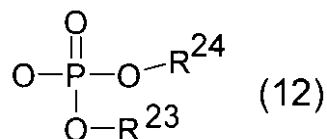


30

(式中、R⁸ は水素又は炭素数 1 ~ 6 個のアルキル基を表わし、L³ は炭素数 2 ~ 6 個のアルカン - ジイル基、炭素数 4 ~ 8 個のシクロアルカン - ジイル基、フェニレン基、又はナフチリデン基を表わし、R¹⁹ は、一般式 (1 2) で表わされる置換基、保護された水酸基、保護されたカルボキシル基、末端に保護されたカルボキシル基を有する炭素数 1 ~ 6 個のアルキル基、末端に一般式 (1 2) で表わされる置換基を有する炭素数 1 ~ 6 個のアルキル基、末端に保護された水酸基を有する炭素数 1 ~ 6 個のアルキル基を表わす。)

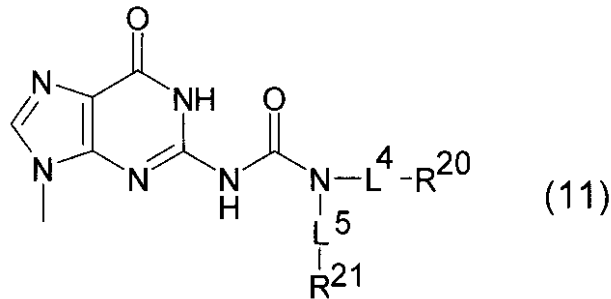
40

【化 1 6】



(式中、R²³ 及び R²⁴ は、同一であっても異なってもよく、それぞれ、リン酸基の保護基を表わす。)

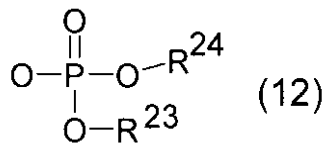
【化 17】



10

(式中、 L^4 、 L^5 は互いに同一であっても異なってもよく炭素数 2 ~ 6 個のアルカン - ジイル基、炭素数 4 ~ 8 個のシクロアルカン - ジイル基、フェニレン基、又はナフチリデン基を表わし、 R^{20} 、 R^{21} は互いに同一であっても異なってもよく、一般式 (12) で表わされる置換基、保護された水酸基、保護されたカルボキシル基、末端に保護されたカルボキシル基を有する炭素数 1 ~ 6 個のアルキル基、末端に一般式 (12) で表わされる置換基を有する炭素数 1 ~ 6 個のアルキル基、末端に保護された水酸基を有する炭素数 1 ~ 6 個のアルキル基を表わす。)

【化 18】



20

(式中、 R^{23} 及び R^{24} は、同一であっても異なってもよく、それぞれ、リン酸基の保護基を表わす。)

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、マイクロRNA (miRNA) を検出するために用いられるハイブリダイゼーションプローブに関する。特に、鎖長 15 ~ 30 ヌクレオチド程度の成熟miRNAを pre-miRNA 及び pri-miRNA 及び pre-miRNA から区別して検出するのに用いることのできるハイブリダイゼーションプローブに関する。

30

【背景技術】

【0002】

マイクロRNA (miRNA) は生物のゲノムから転写された、タンパク質をコードしない通常 19 ~ 23 塩基程度、場合によっては 15 ~ 30 塩基程度の鎖長のRNAである。最近の研究により、miRNA が細胞の発生、分化、癌化などの過程やウイルスの感染プロセスなどに重要な役割を果たしていることが示唆されている。活性な成熟miRNAの生成機構は以下のとおりである。

40

【0003】

まず、ゲノムより転写された 1000 塩基程度の pri-miRNA が切断され 70 - 100 塩基の pre-miRNA が生成する。この pre-miRNA が更に切断され、19 ~ 23 塩基程度の活性な成熟miRNA が生成する。この成熟miRNA は標的のメッセンジャーRNA に結合しその翻訳を制御することで、そのメッセンジャーRNA の情報をもとに合成されるタンパク質の発現量の調節を行っている。これらのmiRNA の機能を解明し、それらの情報を疾患の診断や治療に応用するためには細胞内に存在する多数のRNAの中から成熟miRNAを迅速かつ網羅的に検出する技術の開発が必要である。

【0004】

50

現在使用されている手法としては、生体内の全RNAをカラムクロマトグラフィーやゲル電気泳動で鎖長にしたがって分離し、短鎖RNAのみを含む画分を溶出した後、ハイブリダイゼーション技術により、短鎖RNAのみを検出する方法が知られている（非特許文献1）。この方法によれば、サンプル中に長鎖核酸が含まれていないため、短鎖核酸のみを分析することができるが、カラムクロマトグラフィーや電気泳動を行うのに時間やコストがかかること、操作が煩雑なため熟練した技術社でなければ実施が困難であるなどの問題点がある。

【0005】

また、短鎖RNAの分子工程を省略するためにDNAポリメラーゼを用いて短鎖RNAをプライマーとした場合のみ鎖伸長が可能な酵素反応を用いた核酸の蛍光ラベルを用いる方法が報告されている（非特許文献2）。しかし、この方法は、複数の酵素反応を用いる方法であるため、操作が煩雑になるという問題がある。

10

【0006】

また、非特許文献3には、短いRNAのみに結合するヘアピンプライマーを用いた成熟miRNA選択的RT-PCR法が開示されている。しかし、ヘアピンプライマーはそのヘアピン構造の熱力学的安定性を精密にデザインする必要があり、かならずしも汎用的かつ容易に用いることができるものではない。またRT-PCRでは細胞内に多数存在するmiRNAを網羅的に検出することが困難であるためスループットの点では最適な方法ではない。

【0007】

20

上記問題の根本原因は、これまでに存在する天然型および非天然型のオリゴヌクレオチドは核酸分子の配列を選択的に認識することはできるが、そのサイズを認識することができない点にある。すなわち、ある配列に相補的なオリゴヌクレオチドはそのターゲットとする配列の一部として含む長い核酸分子にも結合してしまうため、pre-miRNAのように成熟miRNAの配列をその一部に含むRNAと成熟miRNAとをハイブリダイゼーションにより区別することが困難である。これらの問題点に関する解決法がいくつか提唱されている。

【0008】

例えば、マイクロアレイ上にヘアピン型のプローブを固定化した成熟RNA選択的マイクロアレイが報告されている（非特許文献4）。該文献には、このヘアピンプローブにより短くプロセッシングされた成熟miRNAのみを認識できると記載されているが、プローブにヘアピン構造を形成するためには、プローブの鎖長を必要以上に長くしなければならないため、プローブの合成コストを考えた場合最適な手法ではない。また、ヘアピンプライマーが実際にどのくらい成熟miRNAに選択的に結合するのかといった定量的評価も充分ではない。

30

また、オリゴヌクレオチドプローブの両末端に立体的に嵩高い置換基を導入して短鎖RNAのみを検出する方法も報告されている（特許文献1）が、短鎖RNAに対する結合の選択性が低く実用的な方法ではない。

【0009】

【非特許文献1】S. Baskerville, D. P. Bartel, RNA, Vol 11, 241-247, 2005年

40

【非特許文献2】P. T. Nelson, D. A. Baldwin, L. M. Scearce, J. C. Oberholtzer, J. W. Tobias, Z. Mourelatos, Nature Methods, Vol 1, p155-161, 2004年

【非特許文献3】C. Chen, D. A. Ridzon, A. J. Broomer, Z. Zhou, D. H. Lee, J. T. Nguyen, M. Barbis, N. L. Xu, V. R. Mahuvakar, M. R. Andersen, K. Q. Lao, K. J. Livak, K. J. Guegler, Nucleic Acids Research, Vol 33, e179.

【非特許文献4】H. Wang, R. A. Ach, B. Curry, RNA, Vol 1

50

3, p 1 - 9, 2007.

【特許文献1】特開2007-238550号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

従って、より効果的な分子デザインにより、簡素な化学修飾のみで優れた短鎖RNA選択性を示すことのできる、生産コスト的にも優れた人工オリゴヌクレオチドプローブの開発と、それらを用いた信頼性の高いRNA検出デバイスの開発が望まれる。

本発明の目的はこれらの課題を解決するオリゴヌクレオチド誘導体とそれらを製造するための化合物を提供することにある。

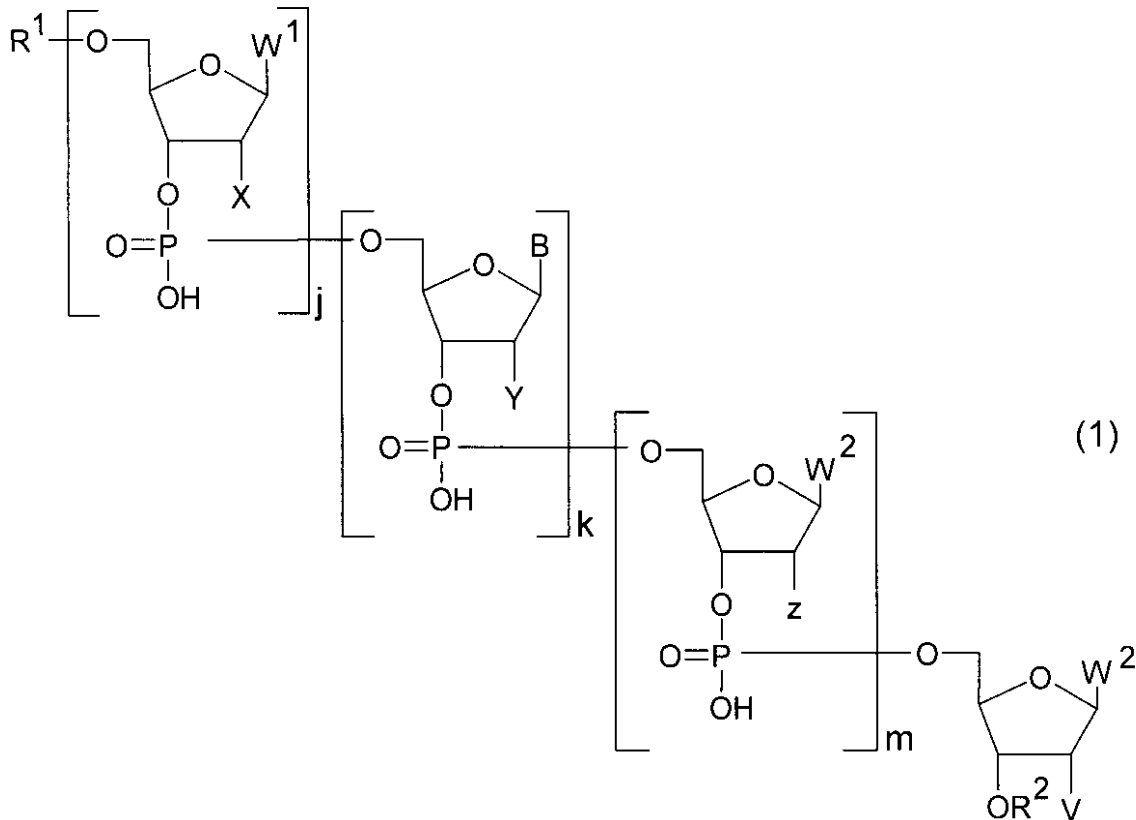
【課題を解決するための手段】

【0011】

上記目的を達成するため、本発明者らは鋭意検討した結果、オリゴヌクレオチドの末端にアニオンに解離することが可能な置換基を有するオリゴヌクレオチド誘導体を用いることにより、上記課題を解決し得るという知見を得た。

本発明は、上記知見に基づいてなされたものであり、一般式(1)で表わされるオリゴヌクレオチド誘導体及びそれらの塩を提供するものである。

【化1】



(式中、 R^1 及び R^2 は同一であっても異なってもよく、水素原子又は炭素数1~6個のアルキル基を表わし、 j 及び m は同一であっても異なってもよく、1~10の整数を表わし、 k は1~50の整数を表わし、 X 、 Y 及び Z は同一であっても異なってもよく、水酸基、水素原子、又は置換基を有してもよいアルコキシ基を表わす。 V は水素原子、水酸基、又は置換基を有してもよいアルコキシ基を表わし、 B は、互いに異なってもよい、天然もしくは非天然型の核酸塩基を表わし、 W^1 は、互いに異なってもよい、天然型もしくは非天然型の核酸塩基又は下記一般式(2)、一般式(4)、一般式(5)又は一般式(6)のいずれかで表わされる基を表わし、 W^2 は、互いに異なってもよい、天然型もしくは非天然型の核酸塩基又は下記一般式(2)、一般式(4)、一般

10

20

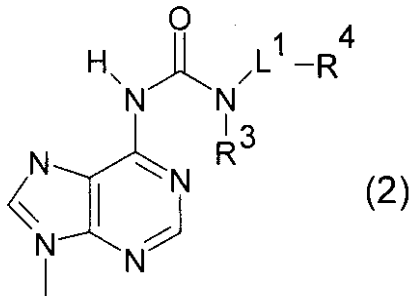
30

40

50

式(5)又は一般式(6)のいずれかで表わされる基を表わす(但し、 W^1 及び W^2 のうち少なくとも1個は一般式(2)、一般式(4)、一般式(5)又は一般式(6)のいずれかで表わされる基である。)

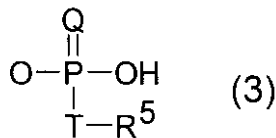
【化2】



10

(式中、 R^3 は水素又は炭素数1~6個のアルキル基を表わし、 L^1 は炭素数2~6個のアルカン-ジイル基、炭素数4~8個のシクロアルカン-ジイル基、フェニレン基、又はナフチリデン基を表わし、 R^4 はカルボキシル基、末端にカルボキシル基を有する炭素数1~6個のアルキル基、一般式(3)で表わされる基、又は末端に一般式(3)で表わされる基を有する炭素数1~6個のアルキル基を表わす。)

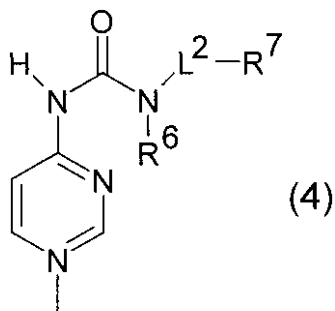
【化3】



20

(中Q及びTは、互いに同一であっても異なってもよく、酸素原子又は硫黄原子を表わし、 R^5 は水素原子、又は置換基を有してもよい炭素数1~6個のアルキル基を表わす。)

【化4】

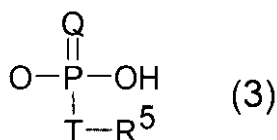


30

(式中 R^6 は水素又は炭素数1~6個のアルキル基を表わし、 L^2 は炭素数2~6個のアルカン-ジイル基、炭素数4~8個のシクロアルカン-ジイル基、フェニレン基、又はナフチリデン基を表わし、 R^7 はカルボキシル基、末端にカルボキシル基を有する炭素数1~6個のアルキル基、一般式(3)で表わされる基、又は末端に一般式(3)で表わされる基を有する炭素数1~6個のアルキル基を表わす。)

40

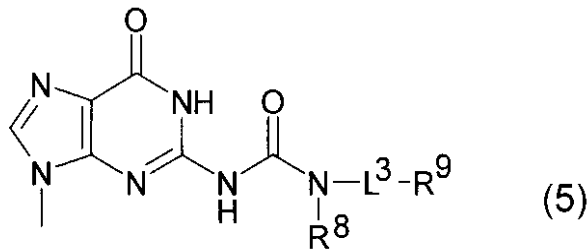
【化5】



50

(中Q及びTは、互いに同一であっても異なってもよく、酸素原子又は硫黄原子を表わし、R⁵は水素原子、又は置換基を有してもよい炭素数1～6個のアルキル基を表わす。)

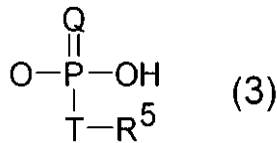
【化6】



10

(式中、R⁸は水素又は炭素数1～6個のアルキル基を表わし、L³は炭素数2～6個のアルカン-ジイル基、炭素数4～8個のシクロアルカン-ジイル基、フェニレン基、又はナフチリデン基を表わし、R⁹はカルボキシル基、末端にカルボキシル基を有する炭素数1～6個のアルキル基、一般式(3)で表わされる基、又は末端に一般式(3)で表わされる基を有する炭素数1～6個のアルキル基を表わす。)

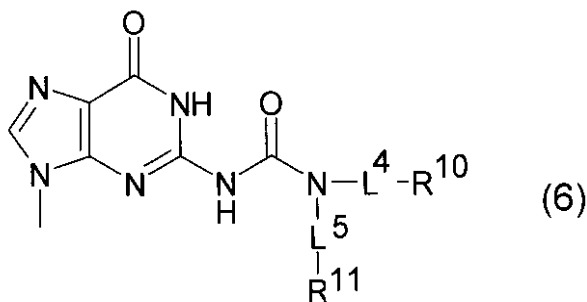
【化7】



20

(中Q及びTは、互いに同一であっても異なってもよく、酸素原子又は硫黄原子を表わし、R⁵は水素原子、又は置換基を有してもよい炭素数1～6個のアルキル基を表わす。)

【化8】

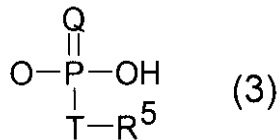


30

(式中、L⁴、L⁵は互いに同一であっても異なってもよく炭素数2～6個のアルカン-ジイル基、炭素数4～8個のシクロアルカン-ジイル基、フェニレン基、又はナフチリデン基を表わし、R¹⁰、R¹¹は互いに同一であっても異なってもよくカルボキシル基、末端にカルボキシル基を有する炭素数1～6個のアルキル基、一般式(3)で表わされる基、又は末端に一般式(3)で表わされる基を有する炭素数1～6個のアルキル基を表わす。)

40

【化 9】



(式中、Q及びTは、互いに同一であっても異なっていてもよく、酸素原子又は硫黄原子を表わし、R⁵は水素原子、又は置換基を有してもよい炭素数1～6個のアルキル基を表わす。)

10

【0012】

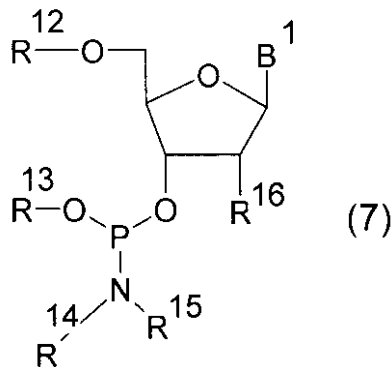
本発明のオリゴヌクレオチド誘導体は、好ましくは核酸検出用プローブとして用いられる。

また、本発明は、上記オリゴヌクレオチド誘導体を固体担体上に固定化してなるオリゴヌクレオチドアレイを提供する。

また、本発明は、上記オリゴヌクレオチド誘導体を含む医薬組成物を提供する。

また、本発明は、一般式(7)で表わされるホスホロアミダイト化合物を提供する。

【化 10】

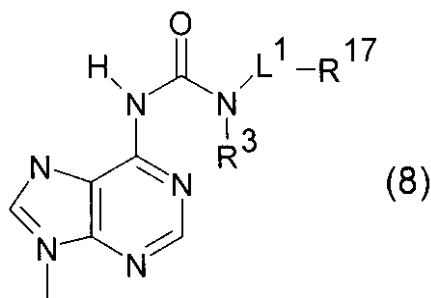


20

(式中、R¹²は、5'水酸基の保護基を表わし、R¹³はリン酸基の保護基を表わし、R¹⁴及びR¹⁵は、同一であっても異なっていてもよく、炭素数1～6個のアルキル基を表わし、R¹⁴及びR¹⁵が互いに結合して窒素原子とともに、環員数3～13個の環を形成してもよく、R¹⁶は水素原子、置換基を有してもよいアルコキシ基、RNA 2'水酸基の保護基で保護された水酸基を表わし、B¹は一般式(8)、(9)(10)又は(11)のいずれかで表わされる基を表わす。)

30

【化 11】



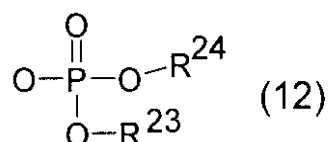
40

(式中、R³は水素又は炭素数1～6個のアルキル基を表わし、L¹は炭素数2～6個のアルカン-ジイル基、炭素数4～8個のシクロアルカン-ジイル基、フェニレン基、又はナフチリデン基を表わし、R¹⁷は、一般式(12)で表わされる置換基、保護された水酸基、保護されたカルボキシル基、末端に保護されたカルボキシル基を有する炭素数1～

50

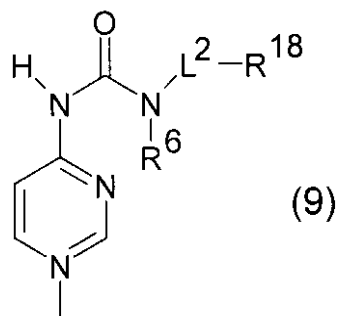
6個のアルキル基、末端に一般式(12)で表わされる置換基を有する炭素数1~6個のアルキル基、末端に保護された水酸基を有する炭素数1~6個のアルキル基を表わす。)

【化12】



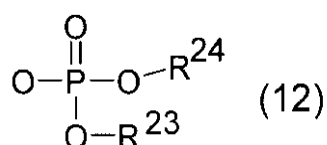
(式中、 R^{23} 及び R^{24} は、同一であっても異なってもよく、それぞれ、リン酸基の保護基を表わす。)

【化13】



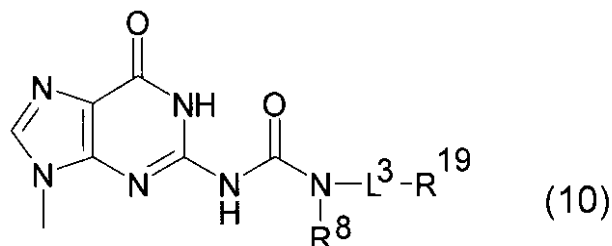
(式中 R^6 は水素又は炭素数1~6個のアルキル基を表わし、 L^2 は炭素数2~6個のアルカン-ジイル基、炭素数4~8個のシクロアルカン-ジイル基、フェニレン基、又はナフチリデン基を表わし、 R^{18} は、一般式(12)で表わされる置換基、保護された水酸基、保護されたカルボキシル基、末端に保護されたカルボキシル基を有する炭素数1~6個のアルキル基、末端に一般式(12)で表わされる置換基を有する炭素数1~6個のアルキル基、末端に保護された水酸基を有する炭素数1~6個のアルキル基を表わす。)

【化14】



(式中、 R^{23} 及び R^{24} は、同一であっても異なってもよく、それぞれ、リン酸基の保護基を表わす。)

【化15】



(式中、 R^8 は水素又は炭素数1~6個のアルキル基を表わし、 L^3 は炭素数2~6個のアルカン-ジイル基、炭素数4~8個のシクロアルカン-ジイル基、フェニレン基、又はナフチリデン基を表わし、 R^{19} は、一般式(12)で表わされる置換基、保護された水酸基、保護されたカルボキシル基、末端に保護されたカルボキシル基を有する炭素数1~6個のアルキル基、末端に一般式(12)で表わされる置換基を有する炭素数1~6個の

10

20

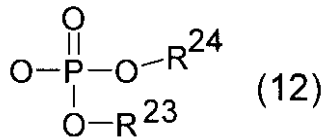
30

40

50

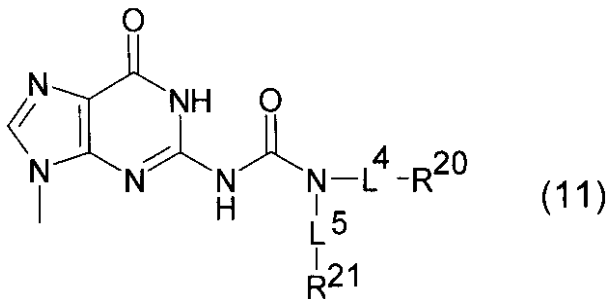
アルキル基、末端に保護された水酸基を有する炭素数1～6個のアルキル基を表わす。)

【化16】



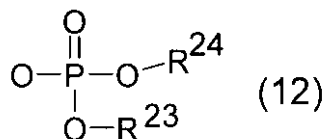
(式中、 R^{23} 及び R^{24} は、同一であっても異なってもよく、それぞれ、リン酸基の保護基を表わす。)

【化17】



(式中、 L^4 、 L^5 は互いに同一であっても異なってもよく炭素数2～6個のアルカン-ジイル基、炭素数4～8個のシクロアルカン-ジイル基、フェニレン基、又はナフチリデン基を表わし、 R^{20} 、 R^{21} は互いに同一であっても異なってもよく、一般式(12)で表わされる置換基、保護された水酸基、保護されたカルボキシル基、末端に保護されたカルボキシル基を有する炭素数1～6個のアルキル基、末端に一般式(12)で表わされる置換基を有する炭素数1～6個のアルキル基、末端に保護された水酸基を有する炭素数1～6個のアルキル基を表わす。)

【化18】



(式中、 R^{23} 及び R^{24} は、同一であっても異なってもよく、それぞれ、リン酸基の保護基を表わす。)

【発明の効果】

【0013】

本発明のオリゴヌクレオチド誘導体は、その末端部にアニオンに解離することが可能な置換基を有しているため、適当な反応条件を設定することにより、短い相補鎖とのみ結合し、長い相補鎖RNAや相補DNAとは結合しないオリゴヌクレオチド誘導体である。その結果、本発明のオリゴヌクレオチド誘導体と細胞から抽出した様々な鎖長及び配列を有する核酸を反応させることにより、加えたオリゴヌクレオチドに相補的な配列を有し、かつ加えたオリゴヌクレオチドよりも鎖長の短い核酸とのみ結合させ、鎖長の短い核酸の単離、検出、機能制御に用いることができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0014】

以下、まず本発明のオリゴヌクレオチド誘導体について説明する。

本発明のオリゴヌクレオチド誘導体は、下記一般式(1)で表わされる。

10

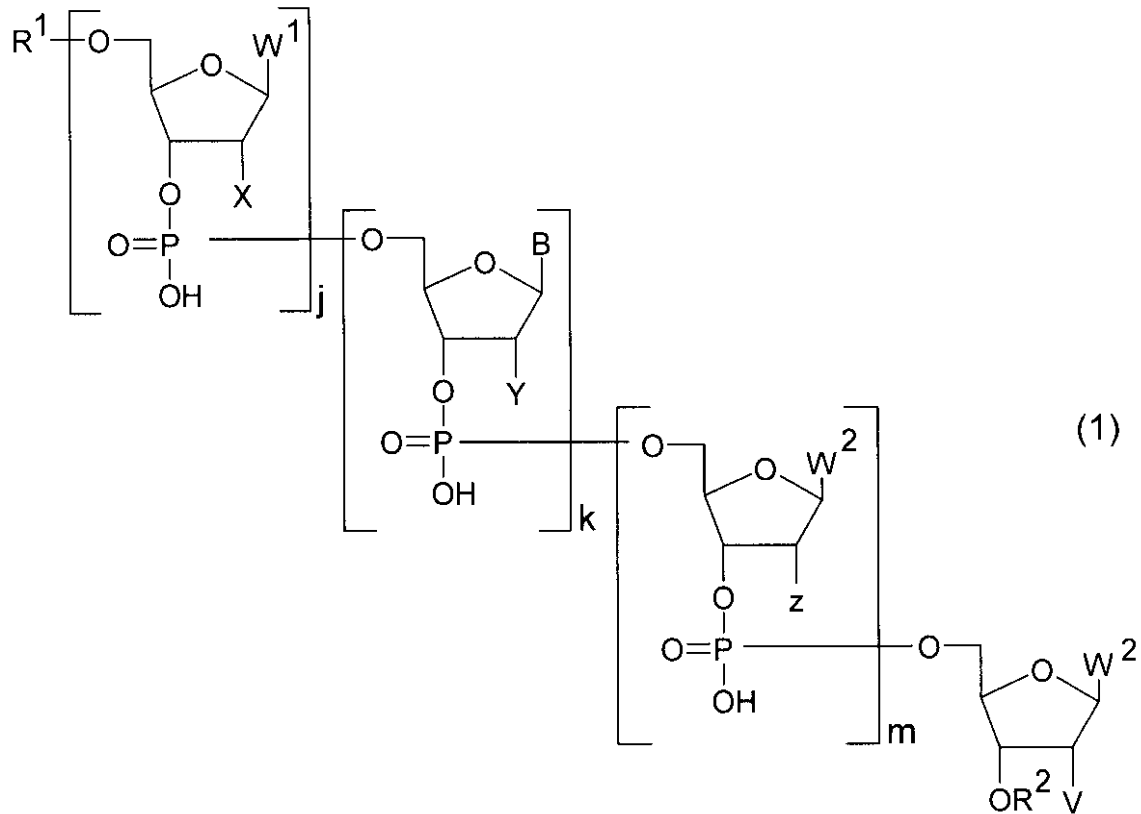
20

30

40

50

【化 19】



10

20

【0015】

上記一般式(1)において、 R^1 及び R^2 は同一であっても異なってもよく、水素原子又は炭素数1~6個のアルキル基を表わす。アルキル基としては、例えば、メチル、エチル、 n -プロピル、イソプロピル、 n -ブチル、イソブチル、ブタン-2-イル、 n -ペンチル、 n -ヘキシルが挙げられるが、これらに限定されない。

j 及び m は、同一であっても異なってもよく、それぞれ1~10の整数であり、好ましくは1~5である。 j 及び m が10を超えても、10以下の場合に比べて効果に差異はないため、上記範囲が適当である。

30

【0016】

k は1~50の整数であり、好ましくは5~30である。 k は、検出しようとするDNA又はRNA(miRNA等)の鎖長によって変えることができる。すなわち、本発明のオリゴヌクレオチド誘導体は、その末端部にアニオンに解離することが可能な置換基を有しており、この置換基がアニオンに解離することにより相補鎖RNA又は相補鎖DNAと静電反発が起こり、長い鎖長のものは結合できなくなり、末端部のアニオンとアニオンの長さのものよりも短いDNA鎖及びRNA鎖のみが、本発明のオリゴヌクレオチド誘導体と結合することができるようになる。従って、検出しようとするmiRNA等の長さによって、 k の範囲を変動させることが可能である。

40

【0017】

X 、 Y 及び Z は、同一であっても、異なってもよく、それぞれ水素原子、水酸基、又は置換基を有していてもよいアルコキシ基である。アルコキシ基としては、炭素数が1~6個のアルコキシ基が好ましく、このようなアルコキシ基としては、例えば、メトキシ基、エトキシ基、プロポキシ基、プロパン-1-イルオキシ基、ブタン-1-イルオキシ基、1-ブチルオキシ基、1-ペンチルオキシ基、1-ヘキシルオキシ基等が挙げられ、また、2-プロピルオキシ基、イソブチルオキシ基等のように分枝したアルコキシ基、シクロプロピルオキシ基、シクロブチルオキシ基、シクロペンチルオキシ基、シクロヘキシルオキシ基、シクロプロピルメチルオキシ基等の、側鎖の一部もしくは全部が環化したア

50

ルコキシ基も含む。また、上記置換基としては、例えば、プロモ、クロロ、ヨード、ヒドロキシル、シアノ、アルコキシ、アミノ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アリール、ヘテロアリール等が挙げられる。

Vは水素原子、水酸基、又は置換基を有していてもよいアルコキシ基である。アルコキシ基、置換基については、上記X、Y及びZについて説明したのと同様である。

【0018】

Bは、互いに異なってもよい、天然もしくは非天然型の核酸塩基を表す。天然型の核酸塩基としては、例えば、チミン-1-イル、シトシン-1-イル、5-メチル-シトシン-1-イル、ウラシル-1-イル、ウラシル-5-イル、アデニン-9-イル、グアニン-9-イルなどが挙げられる。また、非天然型の核酸塩基とは、天然型の核酸塩基の環外酸素原子や環外窒素原子や環内窒素原子や環内炭素原子に置換基を有するなどの化学修飾、または環外酸素原子や環内窒素原子や環内炭素原子が他の原子に置換されるなどの化学修飾、もしくはこれらの化学修飾をとも有する核酸塩基の誘導体を表わし特に限定はされないが、好ましくは2-チオチミン-1-イル、2-チオウラシル-1-イル、N2-アシル-3-デアザグアニン-9-イル、N2-カルバモイルグアニン-9-イル、N4-アシルシトシン-1-イル、N6-アシル-7-デアザアデニン-9-イル、N6-アシル-7-デアザ-8-アザアデニン-9-イルなどがあげられ、特に好ましくは2-チオチミン-1-イル、2-チオウラシル-1-イル、N2-アセチル-3-デアザグアニン-9-イル、N2-カルバモイルグアニン-9-イル、N4-アセチルシトシン-1-イル、N6-アセチル-7-デアザアデニン-9-イル、N6-アセチル-7-デアザ-8-アザアデニン-9-イルなどがあげられる。また、これらの互変異性体であってもよい。

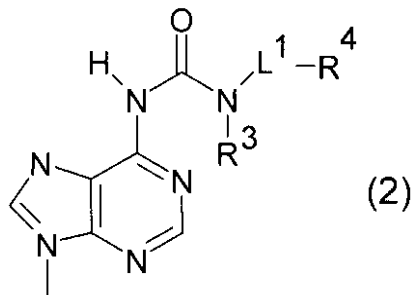
10

20

【0019】

W¹は、互いに異なってもよい、天然型もしくは非天然型の核酸塩基、又は一般式(2)、一般式(4)一般式(5)又は一般式(6)のいずれかで表わされる置換基を表す。天然型もしくは非天然型の核酸塩基とは、上記Bについて説明したのと同様である。

【化20】



30

上記一般式(2)において、R³は水素原子又は炭素数1~6個のアルキル基を表わす。アルキル基としては、例えば、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、イソブチル、ブタン-2-イル、n-ペンチル、n-ヘキシルが挙げられるが、これらに限定されない。

40

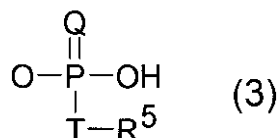
L¹は炭素数2~6個のアルカン-ジイル基、炭素数4~8個のシクロアルカン-ジイル基、フェニレン基、又はナフチリデン基を表わす。アルカン-ジイル基としては、例えば、炭素数2~6個のアルカンジイル基を表わし、エチレン、プロパン-1,3-ジイル、ブタン-1,4-ジイル、ペンタン-1,5-ジイル、ヘキサン-1,6-ジイル等が挙げられる。また、ブタン-1,3-ジイルなどの分岐した基も含まれる。シクロアルカン-ジイル基とは、例えば、炭素数4~8個のシクロアルカンから導かれる二価の基を意味し、シクロブタン-1,3-ジイル、シクロブタン-1,2-ジイル、シクロペンタン-1,3-ジイル、シクロペンタン-1,2-ジイル、シクロヘキサン-1,2-ジイル、シクロヘキサン-1,3-ジイル、シクロヘキサン-1,4-ジイル等が含まれ、シス

50

、トランスの区別が可能な基についてはその双方が含まれる。フェニレン基はベンゼンから導かれる二価の基を意味し、1, 2 - フェニレン、1, 3 - フェニレン、1, 4 - フェニレン等が含まれる。ナフチリデン基とはナフタレンから導かれる二価の基を意味し、1, 2 - ナフチリデン、1, 3 - ナフチリデン、1, 4 - ナフチリデン、1, 5 - ナフチリデン、1, 6 - ナフチリデン、1, 7 - ナフチリデン、1, 8 - ナフチリデン、2, 3 - ナフチリデン、2, 6 - ナフチリデン、2, 7 - ナフチリデン等が挙げられる。

R⁴ はカルボキシル基、末端にカルボキシル基を有する炭素数 1 ~ 6 個のアルキル基、一般式 (3) で表わされる基、又は末端に一般式 (3) で表わされる基を有する炭素数 1 ~ 6 個のアルキル基を表わす。ここで、アルキル基とは、上述したものが挙げられる。

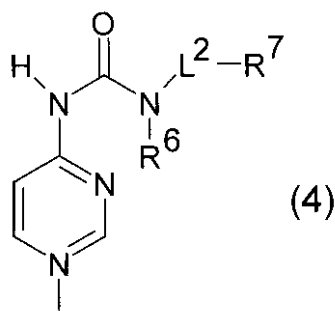
【化 2 1】



上記一般式 (3) において、Q 及び T は、互いに同一であっても異なっていてもよく、酸素原子又は硫黄原子を表わし、R⁵ は水素原子、又は置換基を有してもよい炭素数 1 ~ 6 個のアルキル基を表わす。ここで、アルキル基としては、例えば、メチル、エチル、n - プロピル、イソプロピル、n - ブチル、イソブチル、ブタン - 2 - イル、n - ペンチル、n - ヘキシルが挙げられるが、これらに限定されない。また、置換基としては、例えば、ブromo、クロロ、ヨード、ヒドロキシル、シアノ、アルコキシ、アミノ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アリール、ヘテロアリール等が挙げられる。

【0 0 2 0】

【化 2 2】



上記一般式 (4) において、R⁶ は水素又は炭素数 1 ~ 6 個のアルキル基を表わす。アルキル基としては、例えば、メチル、エチル、n - プロピル、イソプロピル、n - ブチル、イソブチル、ブタン - 2 - イル、n - ペンチル、n - ヘキシルが挙げられるが、これらに限定されない。L² は、炭素数 2 ~ 6 個のアルカン - ジイル基、炭素数 4 ~ 8 個のシクロアルカン - ジイル基、フェニレン基、又はナフチリデン基を表わす。アルカン - ジイル基としては、例えば、炭素数 2 ~ 6 個のアルカンジイル基を表わし、エチレン、プロパン - 1, 3 - ジイル、ブタン - 1, 4 - ジイル、ペンタン - 1, 5 - ジイル、ヘキサン - 1, 6 - ジイル等が挙げられる。また、ブタン - 1, 3 - ジイルなどの分岐した基も含まれる。シクロアルカン - ジイル基とは、例えば、炭素数 4 ~ 8 個のシクロアルカンから導かれる二価の基を意味し、シクロブタン - 1, 3 - ジイル、シクロブタン - 1, 2 - ジイル、シクロペンタン - 1, 3 - ジイル、シクロペンタン - 1, 2 - ジイル、シクロヘキサン - 1, 2 - ジイル、シクロヘキサン - 1, 3 - ジイル、シクロヘキサン - 1, 4 - ジイル等が含まれ、シス、トランスの区別が可能な基についてはその双方が含まれる。フェニレン基はベンゼンから導かれる二価の基を意味し、1, 2 - フェニレン、1, 3 - フェニレン、1, 4 - フェニレン等が含まれる。ナフチリデン基とはナフタレンから導かれる二価

10

20

30

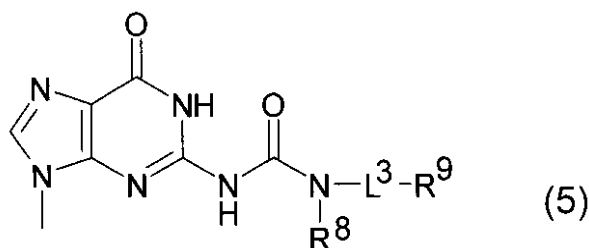
40

50

の基を意味し、1, 2 - ナフチリデン、1, 3 - ナフチリデン、1, 4 - ナフチリデン、1, 5 - ナフチリデン、1, 6 - ナフチリデン、1, 7 - ナフチリデン、1, 8 - ナフチリデン、2, 3 - ナフチリデン、2, 6 - ナフチリデン、2, 7 - ナフチリデン等が挙げられる。R⁷はカルボキシル基、末端にカルボキシル基を有する炭素数1~6個のアルキル基、一般式(3)で表わされる基、又は末端に一般式(3)で表わされる基を有する炭素数1~6個のアルキル基を表わす。ここで、アルキル基とは、上述したものが挙げられる。

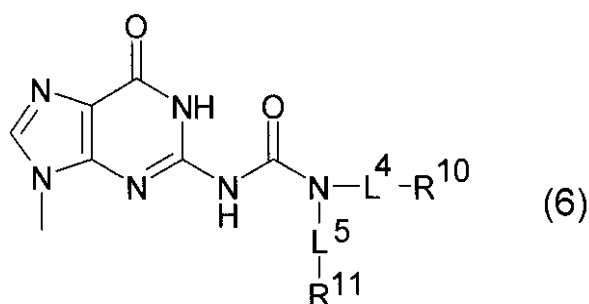
【0021】

【化23】



上記一般式(5)において、R⁸は水素又は炭素数1~6個のアルキル基を表わす。アルキル基としては、例えば、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、イソブチル、ブタン-2-イル、n-ペンチル、n-ヘキシルが挙げられるが、これらに限定されない。L³は炭素数2~6個のアルカン-ジイル基、炭素数4~8個のシクロアルカン-ジイル基、フェニレン基、又はナフチリデン基を表わす。アルカン-ジイル基としては、例えば、炭素数2~6個のアルカンジイル基を表わし、エチレン、プロパン-1, 3-ジイル、ブタン-1, 4-ジイル、ペンタン-1, 5-ジイル、ヘキサン-1, 6-ジイル等が挙げられる。また、ブタン-1, 3-ジイルなどの分岐した基も含まれる。シクロアルカン-ジイル基とは、例えば、炭素数4~8個のシクロアルカンから導かれる二価の基を意味し、シクロブタン-1, 3-ジイル、シクロブタン-1, 2-ジイル、シクロペンタン-1, 3-ジイル、シクロペンタン-1, 2-ジイル、シクロヘキサン-1, 2-ジイル、シクロヘキサン-1, 3-ジイル、シクロヘキサン-1, 4-ジイル等が含まれ、シス、トランスの区別が可能な基についてはその双方が含まれる。フェニレン基はベンゼンから導かれる二価の基を意味し、1, 2-フェニレン、1, 3-フェニレン、1, 4-フェニレン等が含まれる。ナフチリデン基とはナフタレンから導かれる二価の基を意味し、1, 2-ナフチリデン、1, 3-ナフチリデン、1, 4-ナフチリデン、1, 5-ナフチリデン、1, 6-ナフチリデン、1, 7-ナフチリデン、1, 8-ナフチリデン、2, 3-ナフチリデン、2, 6-ナフチリデン、2, 7-ナフチリデン等が挙げられる。R⁹はカルボキシル基、末端にカルボキシル基を有する炭素数1~6個のアルキル基、一般式(3)で表わされる基、又は末端に一般式(3)で表わされる基を有する炭素数1~6個のアルキル基を表わす。ここで、アルキル基とは、上述したものが挙げられる。

【化24】



10

20

30

40

50

上記一般式(6)において、 L^4 、 L^5 は同一であっても異なってもよく炭素数2~6個のアルカン-ジイル基、炭素数4~8個のシクロアルカン-ジイル基、フェニレン基、又はナフチリデン基を表わす。アルカン-ジイル基としては、例えば、炭素数2~6個のアルカンジイル基を表わし、エチレン、プロパン-1,3-ジイル、ブタン-1,4-ジイル、ペンタン-1,5-ジイル、ヘキサン-1,6-ジイル等が挙げられる。また、ブタン-1,3-ジイルなどの分岐した基も含まれる。シクロアルカン-ジイル基とは、例えば、炭素数4~8個のシクロアルカンから導かれる二価の基を意味し、シクロブタン-1,3-ジイル、シクロブタン-1,2-ジイル、シクロペンタン-1,3-ジイル、シクロペンタン-1,2-ジイル、シクロヘキサン-1,2-ジイル、シクロヘキサン-1,3-ジイル、シクロヘキサン-1,4-ジイル等が含まれ、シス、トランスの区別が可能な基についてはその双方が含まれる。フェニレン基はベンゼンから導かれる二価の基を意味し、1,2-フェニレン、1,3-フェニレン、1,4-フェニレン等が含まれる。ナフチリデン基とはナフタレンから導かれる二価の基を意味し、1,2-ナフチリデン、1,3-ナフチリデン、1,4-ナフチリデン、1,5-ナフチリデン、1,6-ナフチリデン、1,7-ナフチリデン、1,8-ナフチリデン、2,3-ナフチリデン、2,6-ナフチリデン、2,7-ナフチリデン等が挙げられる。 R^9 はカルボキシル基、末端にカルボキシル基を有する炭素数1~6個のアルキル基、一般式(3)で表わされる基、又は末端に一般式(3)で表わされる基を有する炭素数1~6個のアルキル基を表わす。ここで、アルキル基とは、上述したものが挙げられる。

【0022】

W^2 は、 W^1 と同様、互いに異なってもよい、天然型もしくは非天然型の核酸塩基又は一般式(2)、一般式(4)、一般式(5)、又は一般式(6)のいずれかで表わされる基を表す。天然型もしくは非天然型の核酸塩基、一般式(2)、一般式(4)、一般式(5)、又は一般式(6)については、 W^1 において説明したものと同様である。本発明のオリゴヌクレオチド誘導体においては、 W^1 及び W^2 のうち少なくとも1個が、一般式(2)、一般式(4)、一般式(5)、又は一般式(6)のいずれかで表わされる基である。すなわち、本発明のオリゴヌクレオチド誘導体は、少なくとも一方の末端に、一般式(2)、一般式(4)、一般式(5)、又は一般式(6)のいずれかで表わされる基を有している。すなわち、本発明のオリゴヌクレオチド誘導体は、少なくとも一方の末端に、カルボン酸アニオン、リン酸アニオン等のアニオンに解離することが可能な置換基が存在する。本発明のオリゴヌクレオチド誘導体においては、少なくとも一方の末端に、少なくとも1個の、アニオンに解離することが可能な置換基があればよく、両方の末端にあってもよい。また、アニオンに解離することが可能な置換基は1個のみでなく、複数個存在してもよい。

なお、一般式(1)におけるBは、検出しようとする核酸に相補的な配列となるなど、適当な結合力を有する配列を選択することができる。

【0023】

本発明のオリゴヌクレオチド誘導体は、その塩の形態であってもよい。本明細書で用いられる塩とは、本発明のヌクレオチド誘導体中に含まれる一部もしくは全てのリン酸基及びカルボキシル基のプロトンが陽イオンに置き換わった化合物を意味する。陽イオンとしては、例えば、アンモニウム、モノアルキルアンモニウム、ジアルキルアンモニウム、トリアルキルアンモニウム、テトラアルキルアンモニウムなどのアンモニウムイオン類および、ナトリウムイオン、カリウムイオン、リチウムイオン、カルシウムイオン、マグネシウムイオン、マンガンイオン、鉄イオン、銅イオンなどの金属イオン類が挙げられる。

【0024】

本発明のオリゴヌクレオチド誘導体は、その末端部にアニオンに解離することが可能な置換基を有しているので、適当な反応条件を設定することにより、末端部にアニオンが生成する。本発明のオリゴヌクレオチド誘導体を用いて、短い相補鎖のみを検出する方法について図面を参照しつつ説明する。図1は、本発明のオリゴヌクレオチド誘導体を用いて、短い相補鎖のみを検出する方法を模式的に示した図である。

【0025】

図1に示すように、本発明のオリゴヌクレオチド誘導体は、適当な反応条件下では、その末端部にアニオンが生成する。ここに、長い相補鎖と短い相補鎖を混合すると、短い相補鎖（ここで、短いとは、本発明のオリゴヌクレオチド誘導体の末端のアニオンから他方の末端のアニオンの間の距離よりも短いことを意味する。）は、本発明のオリゴヌクレオチド誘導体と結合する。一方、長い相補鎖においては、本発明のオリゴヌクレオチド誘導体と結合と相補的な部分を有しているにもかかわらず、本発明のオリゴヌクレオチド誘導体の末端部にアニオンが存在するため、この部分で静電反発が起こり、長い相補鎖は本発明のオリゴヌクレオチド誘導体と結合することができない。

【0026】

このような性質を利用することにより、本発明のオリゴヌクレオチド誘導体と細胞から抽出した様々な鎖長及び配列を有する核酸とを反応させることにより、本発明のオリゴヌクレオチドに相補的な配列を有し、かつ鎖長の短い核酸のみと結合させ、鎖長の短い核酸を単離、検出、機能制御することが可能となる。例えば、細胞内に存在する成熟miRNAをPre-mRNAと区別して検出することが可能となる。すなわち、本発明のオリゴヌクレオチド誘導体は、核酸検出プローブとして用いることができる。

なお、適当な反応条件とは、当該技術分野において公知であり、プローブとオリゴヌクレオチドとをハイブリダイズするための条件を意味する。

【0027】

なお、上記適当な条件とは、検出しようとするオリゴヌクレオチド、また、本発明のヌクレオチドの塩基配列や塩基組成等により異なるため、一概には規定できないが、一般的な条件としては下記の通りである。

ハイブリダイゼーションは、96穴又は384穴のプラスチックプレート中で実施してもよい。このようなプレートの穴に、本発明のオリゴヌクレオチドを点着させ、次いで、試料を添加してハイブリダイゼーションを行う。又は、後述する、本発明のオリゴヌクレオチドアレイを用いてもよい。ハイブリダイゼーションは、室温～70程度の温度範囲で、6～20時間の範囲で実施することが好ましい。ハイブリダイゼーション終了後、界面活性剤と緩衝液との混合溶液を用いて洗浄を行い、未反応のオリゴヌクレオチドを除去する。界面活性剤としては、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）等が挙げられる。ハイブリダイゼーションを実施する緩衝液としては、例えば、クエン酸緩衝液、リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、トリス緩衝液、グッド緩衝液等が挙げられる。

本発明のオリゴヌクレオチド誘導体は、当業者に公知の方法、例えばホスホロアミダイト法を用いて製造することができる。ホスホロアミダイト法を実施する際には、後述する、本発明の化合物を用いることにより、本発明のオリゴヌクレオチド誘導体を製造することができる。

【0028】

次に、本発明のオリゴヌクレオチドアレイについて説明する。

本発明のオリゴヌクレオチドアレイは、本発明のオリゴヌクレオチド誘導体を固相担体上に固定化してなる。本発明のオリゴヌクレオチドアレイは、特定の塩基配列を有する、短い鎖長（通常、50塩基以下）のオリゴヌクレオチドを検出するために用いられる。従って、固相担体に固定するオリゴヌクレオチド誘導体の塩基配列は、検出しようとする配列の相補的な配列を有するものなど、適当な結合力を有する配列となる。一般に、固相担体に固定化されているオリゴヌクレオチド誘導体は、検出しようとするオリゴヌクレオチドとハイブリダイゼーションにより特異的結合により結合する。

【0029】

なお、本明細書において、オリゴヌクレオチドアレイを製造する方法としては、固相担体表面で直接オリゴヌクレオチドを合成する方法（オン・チップ法）と、予め調製したオリゴヌクレオチドを、当該技術分野において公知の適切なリンカーを介して固相担体表面に固定する方法とが知られている。本発明におけるオリゴヌクレオチドアレイは、このいずれの方法でも製造することができる。オン・チップ法としては、例えば光照射で選択

10

20

30

40

50

的に除去される保護基の使用と、半導体製造に利用されるフォトリソグラフィ技術および固相合成技術とを組み合わせ、微少なマトリックスの所定の領域での選択的合成を行う方法（マスクング技術：例えば、Fodor, S. P. A. Science 251: 767, 1991）等によって行うことができるが、この方法に限定されるものではない。一方、予め調製したオリゴヌクレオチドを固相担体表面に固定する場合には、官能基を導入したオリゴヌクレオチドを合成し、表面処理した固相担体表面にオリゴヌクレオチドを点着し、共有結合させる（例えば、Lamtire, J. B. et al. Nucl. Acids Res. 22: 2121-2125, 1994; Guo, Z. et al. Nucl. Acids Res. 22: 5456-5465, 1994）。オリゴヌクレオチドは、一般的には、表面処理した固相担体にスパーサーやクロスリンカーを介して共有結合させる。ガラス表面にポリアクリルアミドゲルの微小片を整列させ、そこに合成オリゴヌクレオチドを共有結合させる方法も知られている（Yershov, G. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 4913, 1996）。

また、ポラスガラス、ポリスチレンなどの固相担体にあらかじめオリゴヌクレオチドを固相合成法で合成しておき、その固相担体を接着剤などの適当な方法や物理的手法によりガラス基板上に固定化する方法も含まれる。

【0030】

用いられる固相担体としては、従来よりDNAチップ及び遺伝子検出用マイクロアレイを製造するために用いられているものを特に制限なく用いることができる。用いられる固相担体としては、例えば、シリコン；微小多孔質ガラス、ポラスガラス等のガラス；金属；フェライトを芯にグリシンメタクリレートで表面を覆った磁性ビーズ；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、アクリロニトリルブタジエンスチレン樹脂、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）等が挙げられる。担体の形状としては、板状（基板状）、ビーズ状、糸状、球状、多角形状、粉末状等、どのような形状のものであってもよい。

【0031】

上記固相担体は、ダイヤモンドライクカーボンによる表面処理層を形成したものであってもよい。ダイヤモンドライクカーボン（DLC、Diamond Like Carbon）とは、ダイヤモンドとカーボンとの混合体である不完全ダイヤモンド構造体の総称であり、その混合割合は特に限定されない。ダイヤモンドライクカーボンによる表面処理層を形成する場合、その層の厚みは好ましくは1nm～10μmである。

【0032】

また、本発明のオリゴヌクレオチドを固相担体に共有結合させるためには、固相担体表面にアミノ基が結合しているものを用いてもよい。従って、担体としては、表面にアミノ基が結合しているか、又はアミノ基を結合することのできるものを用いることが好ましい。

【0033】

次に、本発明の医薬組成物について説明する。本発明の医薬組成物は、上述した本発明のオリゴヌクレオチド誘導体を含む。

本発明のオリゴヌクレオチド誘導体は、上述したように、短い鎖長の相補鎖とのみ結合し、このような短鎖長の相補鎖の機能を制御するために用いることができ、例えば、細胞内に存在する成熟miRNAの制御が可能となり、がん、腫瘍、白血病、悪性リンパ腫、ウイルス感染症、細菌感染症、ヘルペス感染症、メタボリックシンドローム、糖尿病、高脂血症、高血圧、アレルギー性疾患、パーキンソン病、筋ジストロフィー、神経変性疾患、自己免疫疾患、炎症、ダウン症、アルツハイマー病、筋萎縮症、ALS、頸髄損傷、脊髄損傷、ギランバレー症、ベーチェット病、膠原病、リウマチなどの治療薬に用いることができる。従って、本発明は、上述した、本発明のオリゴヌクレオチド誘導体を含む医薬組成物を提供する。

【0034】

本発明の医薬組成物は、医薬として許容できる担体の混合などの公知の方法によって製造することができる。本発明の医薬組成物は、それ自体又は適宜の薬理的に許容される、賦形剤、希釈剤等と混合し、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤若しくはシロップ剤等として、又は注射剤、坐剤、貼付剤、若しくは外用剤等として製造することが出来る。

上記医薬組成物は、賦形剤（例えば、乳糖、白糖、葡萄糖、マンニトール、ソルビトール等の糖誘導体；トウモロコシデンプン、バレイショデンプン、デンプン、デキストリン等のデンプン類；結晶セルロース；アラビアゴム；デキストラン；プルラン；軽質無水ケイ酸、合成ケイ酸アルミニウム、ケイ酸カルシウム、メタケイ酸アルミン酸マグネシウムの等のケイ酸塩誘導体；燐酸水素カルシウム；炭酸カルシウム；硫酸カルシウム、滑沢剤（例えば、ステアリン酸、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、タルク、コロイドシリカ、ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリル硫酸マグネシウム）、結合剤（例えば、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、マクロゴール）、崩壊剤（例えば、低置換度ヒドロキシプロピルセルロース、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースカルシウム、内部架橋カルボキシメチルセルロースナトリウム、カルボキシメチルスターチ、カルボキシメチルスターチナトリウム、架橋ポリビニルピロリドン）、乳化剤（例えば、ベントナイト、ビーガム、水酸化マグネシウム、水酸化アルミニウム、ラウリル硫酸ナトリウム、ステアリン酸カルシウム、塩化ベンザルコニウム等の陽イオン界面活性剤、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ショ糖脂肪酸エステル等の非イオン界面活性剤）、安定剤（メチルパラベン、プロピルパラベン、クロロブタノール、ベンジルアルコール、フェニルエチルアルコール、塩化ベンザルコニウム、フェノール、クレゾール、チメロサル、デヒドロ酢酸、ソルビン酸）、矯味矯臭剤（甘味料、酸味料、香料等）、希釈剤等の添加剤を用いて周知の方法により製造することができる。

10

20

30

40

【0035】

本発明の医薬組成物を被験者に導入する方法については、コロイド分散系を用いてもよい。コロイド分散系は化合物の生体内の安定性を高める効果や、特定の臓器、組織又は細胞へ化合物を効率的に輸送する効果を奏する。コロイド分散系は、通常用いられるものであれば特に制限はなく、高分子複合体、ナノカプセル、マイクロスフェア、ビーズ、及び水中油系の乳化剤、ミセル、混合ミセル及びリポソームを包含する脂質をベースとする分散系が挙げられる。また、 $0.2 \sim 0.4 \mu\text{m}$ のサイズの単膜リポソームは、巨大分子を含有する水性緩衝液のかなりの割合を被包化することができ、オリゴヌクレオチド誘導体がこの水性内膜に被胞化され、生物学的に活性な形態で脳細胞へ輸送される。リポソームの組成は、通常、脂質、特にリン脂質（相転移温度の高いリン脂質が好ましい）を、ステロイド、特にコレステロールと通常複合したものである。リポソームの製造に有用な脂質の具体れとしては、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、スフィンゴ脂質、ホスファチジルエタノールアミン、セレブロシド及びガングリオシド等のホスファチジル化合物が挙げられる。

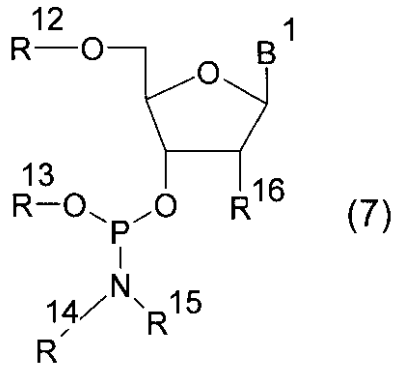
【0036】

本発明のオリゴヌクレオチド誘導体を含む医薬組成物の投与量は症状や年齢等により異なるが、経口投与の場合には、1回当たり下限1mg（好適には、30mg）、上限2000mg（好適には、1500mg）を、注射の場合には、1回当たり下限0.1mg（好適には、5mg）、上限1000mg（好適には、500mg）を皮下注射、筋肉注射または静脈注射によって投与することができる。

【0037】

次に、本発明のホスホロアミダイト化合物について説明する。本発明のホスホロアミダイト化合物は、一般式（7）で表わされる。

【化 2 5】



10

上記一般式(7)において、 R^{12} は、5'水酸基の保護基を表わし、具体的には、4-メトキシトリチル基、4,4'-ジメトキシトリチル基等が挙げられる。 R^{13} はリン酸基の保護基を表わし、具体的には、2-シアノエチル基、メチル基、2-(4-ニトロフェニル)エチル基、アルキルスルホニルエチル基、アリールスルホニルエチル基等が挙げられる。 R^{14} 及び R^{15} は、同一であっても異なってもよく、炭素数1~6個のアルキル基を表わす。アルキル基としては、例えば、メチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピル、*n*-ブチル、イソブチル、ブタン-2-イル、*n*-ペンチル、*n*-ヘキシルが挙げられるが、これらに限定されない。好ましくは R^{14} 及び R^{15} はイソプロピル基である。また、 R^{14} 及び R^{15} が互いに結合して窒素原子とともに、環員数3~13個の環を形成してもよい。 R^{16} は水素原子、置換基を有してもよいアルコキシ基、RNA 2'水酸基の保護基で保護された水酸基を表わす。置換基を有してもよいアルコキシ基としては、メトキシ基、エトキシ基、2-シアノエチル基、2-メトキシエチル基等が挙げられる。RNA 2'水酸基の保護基としては、例えば、炭素数1~6個の同一又は異なるアルキル基が結合したトリアルキルシリル基、炭素数1~6個の同一又は異なるアルキル基が結合したトリアルキルシリルオキシメチル基、2-シアノエチル基、2-シアノエトキシメチル基等が挙げられる。好ましくは、*t*-ブチルジメチルシリル基、トリイソプロピルシリルオキシメチル基、2-シアノエチル基、2-シアノエトキシメチル基等である。

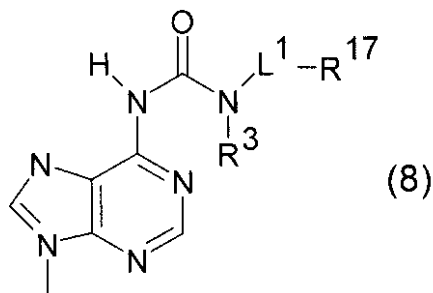
20

30

【0038】

上記一般式(7)において、 B^1 は一般式(8)、(9)、(10)、又は(11)のいずれかで表わされる基を表わす。

【化 2 6】



40

上記一般式(8)において、 R^3 は水素又は炭素数1~6個のアルキル基を表わし、 L^1 は炭素数2~6個のアルカン-ジイル基、炭素数4~8個のシクロアルカン-ジイル基、フェニレン基、又はナフチリデン基を表わす。 R^3 及び L^1 については、上述した一般式(2)において説明したものと同様である。 R^{17} は、一般式(12)で表わされる置換基、保護された水酸基、保護されたカルボキシル基、末端に保護されたカルボキシル基

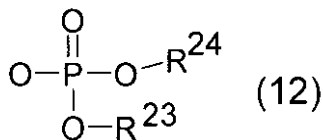
50

を有する炭素数 1 ~ 6 個のアルキル基、末端に一般式 (1 2) で表わされる置換基を有する炭素数 1 ~ 6 個のアルキル基、末端に保護された水酸基を有する炭素数 1 ~ 6 個のアルキル基を表わす。保護された水酸基、保護されたカルボキシル基とは、水酸基、カルボキシル基が当業者に公知の保護基で保護された基を指す。保護基の具体例を以下に例示するが、本発明に含まれる保護基はこれらに含まれるものではない。水酸基の保護基としては、具体的には、アセチル基、プロピオニル基、ブチリル基、イソブチリル基、レプリニル基などのアシル基、フルオレニルメトキシカルボニル基、*t*-ブチルオキシカルボニル基、2,2,2-トリクロロ-*t*-ブチルオキシカルボニル基などのアルコキシカルボニル基、*t*-ブチルジメチルシリル基、トリイソプロピルシリル基などのトリアルキル基などが挙げることができる。カルボキシル基の保護基としては、メチル基、エチル基、*t*-ブチル基、2-シアノエチル基などを挙げることができる。

10

【 0 0 3 9 】

【 化 2 7 】



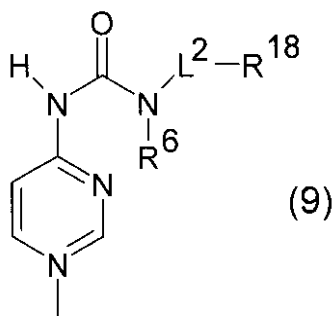
(式中、 R^{23} 及び R^{24} は、同一であっても異なってもよく、それぞれ、リン酸基の保護基を表わす。)

20

R^{23} 及び R^{24} としては 2-シアノエチル基、メチル基、2-(4-ニトロフェニル)エチル基、アルキルスルホニルエチル基、アリールスルホニルエチル基などがあげられる。

【 0 0 4 0 】

【 化 2 8 】



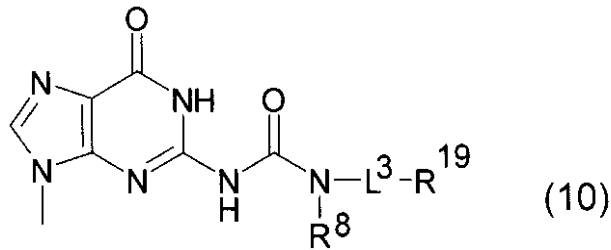
30

一般式 (9) において、 R^6 は水素又は炭素数 1 ~ 6 個のアルキル基を表わし、 L^2 は炭素数 2 ~ 6 個のアルカン-ジイル基、炭素数 4 ~ 8 個のシクロアルカン-ジイル基、フェニレン基、又はナフチリデン基を表わす。 R^6 及び L^2 については、上述した一般式 (4) において説明したものと同様である。 R^{18} は、一般式 (1 2) で表わされる置換基、保護された水酸基、保護されたカルボキシル基、末端に保護されたカルボキシル基を有する炭素数 1 ~ 6 個のアルキル基、末端に一般式 (1 2) で表わされる置換基を有する炭素数 1 ~ 6 個のアルキル基、末端に保護された水酸基を有する炭素数 1 ~ 6 個のアルキル基を表わし、上記一般式 (8) において説明したのと同様である。

40

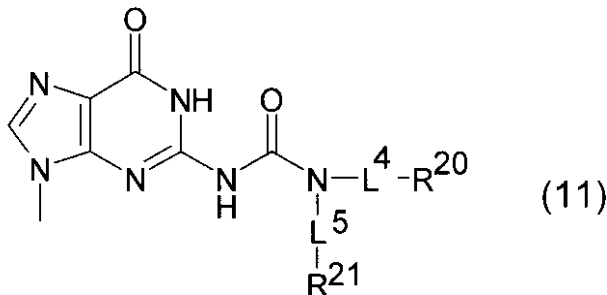
【 0 0 4 1 】

【化 2 9】



一般式(10)において、 R^8 は水素又は炭素数1~6個のアルキル基を表わし、 L^3 は炭素数2~6個のアルカン-ジイル基、炭素数4~8個のシクロアルカン-ジイル基、フェニレン基、又はナフチリデン基を表わす。 R^8 及び L^3 については、上述した一般式(5)において説明したものと同様である。 R^{19} は、一般式(12)で表わされる置換基、保護された水酸基、保護されたカルボキシル基、末端に保護されたカルボキシル基を有する炭素数1~6個のアルキル基、末端に一般式(12)で表わされる置換基を有する炭素数1~6個のアルキル基、末端に保護された水酸基を有する炭素数1~6個のアルキル基を表わし、上記一般式(8)において説明したのと同様である。

【化 3 0】



(式中、 L^4 、 L^5 は互いに同一であっても異なってもよく炭素数2~6個のアルカン-ジイル基、炭素数4~8個のシクロアルカン-ジイル基、フェニレン基、又はナフチリデン基を表わし、 R^{20} 、 R^{21} は互いに同一であっても異なってもよく、一般式(12)で表わされる置換基、保護された水酸基、保護されたカルボキシル基、末端に保護されたカルボキシル基を有する炭素数1~6個のアルキル基、末端に一般式(12)で表わされる置換基を有する炭素数1~6個のアルキル基、末端に保護された水酸基を有する炭素数1~6個のアルキル基を表わし、上記一般式(8)において説明したのと同様である。

【0042】

本発明の、一般式(7)で表わされるホスホロアミダイト化合物は、本発明のオリゴヌクレオチド誘導体を製造する際に、3'末端および5'末端のヌクレオチドとして用いられる。一般式(7)で表わされる化合物は、本明細書、特に後述する実施例の記載等を参照することによって、当業者であれば容易に合成することができる。また、本明細書に記載されていない諸条件は当業者が適宜選択することができる。

【実施例】

【0043】

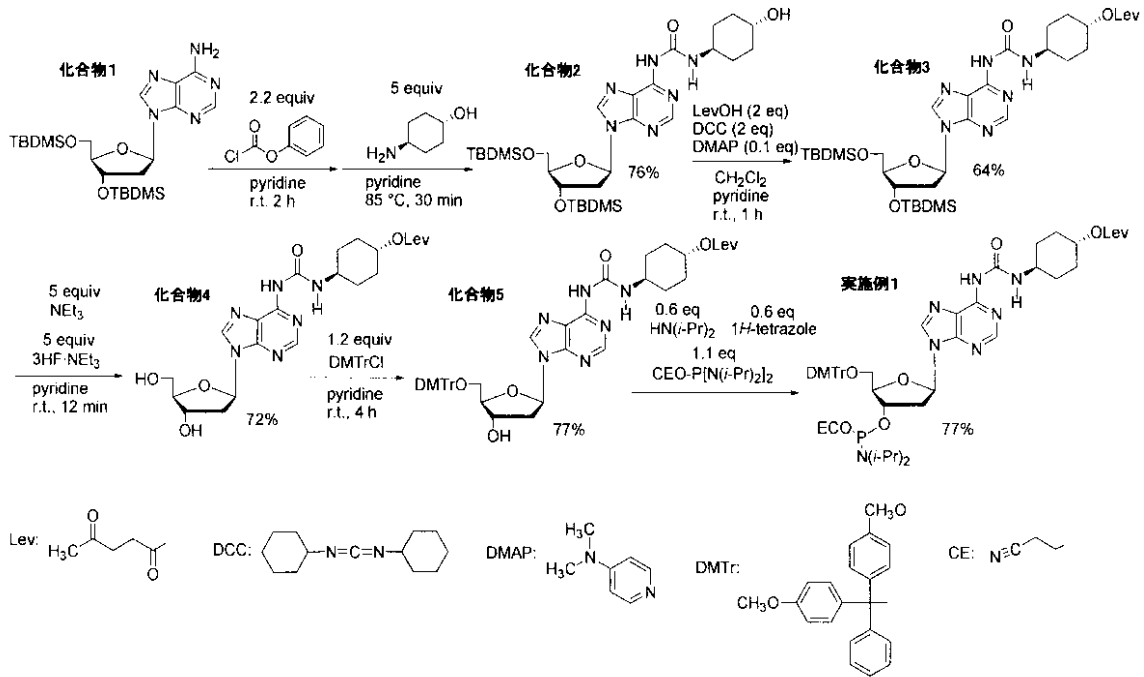
以下、本発明を実施例により更に詳細に説明する。なお、本発明の範囲は、かかる実施例に限定されないことはいうまでもない。

実施例 1

ホスホロアミダイト化合物の合成

ホスホロアミダイト化合物は、下記合成方法により合成した。

【化31】



10

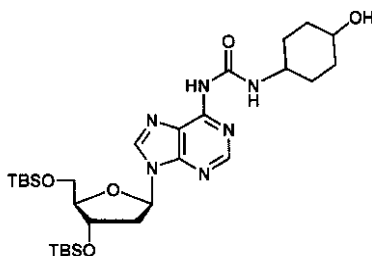
20

【0044】

化合物2 (3'-5'-O-ビス-(t-ブチルジメチルシリル)-N6-[N-(トランス-4-ヒドロキシシクロヘキシル)カルバモイル]デオキシアデノシン) の合成
 3'-5'-O-ビス-(t-ブチルジメチルシリル)デオキシアデノシン (化合物1、3.0g, 6.25ミリモル) をピリジン63mlに溶解させた後、クロロ炭酸フェニル(1.72ml, 13.8ミリモル)を加え、室温で2時間反応させた。次いで、抽出操作を行わずにトランス-4-アミノシクロヘキサノール(3.6g, 31.3ミリモル)を加え、85で30分間反応させた。反応終了後、溶媒を減圧下留去してクロロホルムに溶解させた後、飽和炭酸水素ナトリウムで抽出操作を行った。有機層を集め、硫酸ナトリウムを加え乾燥させた後、濾過し溶媒を減圧下留去した。得られた残渣を、展開溶媒としてヘキサン/クロロホルムを用いてNHシリカゲルクロマトグラフィーにより精製し、目的物(以下の化学式を有する化合物2、2.95g, 76%)を得た。

30

【化32】



40

【0045】

$^1\text{H NMR}$ (DMSO, 500 MHz) 0.08 - 0.11 (12H, m), 0.79 - 0.93 (18H, m), 1.26 - 1.34 (4H, m), 1.82 - 1.84 (2H, br), 1.94 - 1.96 (2H, br), 2.33 - 2.38 (1H, m), 2.91 - 2.96 (1H, m), 3.46 - 3.48 (1H, m), 3.55 - 3.57 (1H, m), 3.65 (1H, dd, $J = 4.4\text{ Hz}$, $J = 11.0\text{ Hz}$),

50

3.79 (1H, dd, J = 5.9 Hz, J = 11.0 Hz),
 3.85 - 3.88 (1H, m), 4.57 (1H, dd, J = 4.
 4 Hz), 4.63 - 4.66 (1H, m), 6.40 (1H, t, J
 = 6.6 Hz); 8.52 (1H, s), 8.57 (1H, s),
 9.35 (1H, d, J = 7.6 Hz), 9.54 (1H, s);
¹³C NMR (DMSO) - 5.5, - 5.0, - 4.8, 17.7,
 17.9, 25.7, 30.4, 33.5, 38.5, 48.0, 62.
 4, 67.8, 71.8, 83.5, 87.1, 120.3, 142.1,
 150.0, 150.3, 150.7, 152.6。

【0046】

10

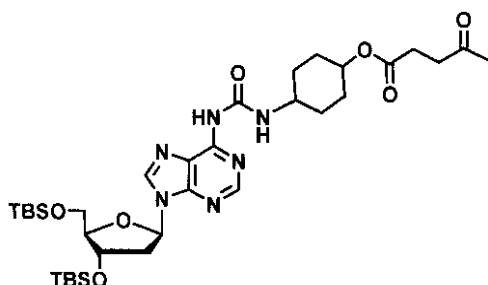
化合物3 (3'-5'-O-ビス-(t-ブチルジメチルシリル)-N6-[N-(トランス-4-(4-オキソペンタノイルオキシ)シクロヘキシル)カルバモイル]デオキシアデノシン)の合成

化合物2 (2.2 g, 3.55ミリモル)にピリジン(脱水)を加えて共沸した後、ジクロロメタン(脱水)36 mlに溶解させた。ここに、レプリン酸(729 μg, 7.09ミリモル)、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(1.46 g, 7.09ミリモル)、4-ジメチルアミノピリジン(43 mg, 0.34ミリモル)を加え、室温で1時間反応させた。反応終了後、吸引濾過により析出物を除去して、ジクロロメタンで洗いこみを行った。ろ液を飽和炭酸水素ナトリウムで抽出操作を行い、有機層を集め硫酸ナトリウムを加え乾燥させた後、濾過し溶媒を減圧下留去した。得られた残渣を、展開溶媒としてヘキサン/クロロホルムを用いてNHシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し、目的物(以下の化学式を有する化合物3、1.62 g, 64%)を得た。

20

【0047】

【化33】



30

【0048】

¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) 0.05 - 0.09 (12
 H, m), 0.84 - 0.90 (18H, m), 1.46 - 1.57 (4H
 , m), 1.99 - 2.01 (2H, br), 2.13 - 2.15 (2H,
 br), 2.18 (3H, m), 2.42 - 2.46 (1H, m), 2.
 54 - 2.56 (2H, m), 2.61 - 2.66 (1H, m), 2.7
 2 - 2.75 (2H, m), 3.73 - 3.76 (1H, m), 3.83 -
 3.86 (2H, m), 4.00 - 4.01 (1H, m), 4.61 (1
 H, m), 4.75 - 4.79 (1H, m), 6.44 - 6.47 (1H,
 m), 8.33 (1H, s), 8.49 (1H, s), 9.45 - 9.
 46 (1H, m)。

40

【0049】

化合物4 (N6-[N-(トランス-4-(4-オキソペンタノイルオキシ)シクロヘキシル)カルバモイル]デオキシアデノシン)の合成

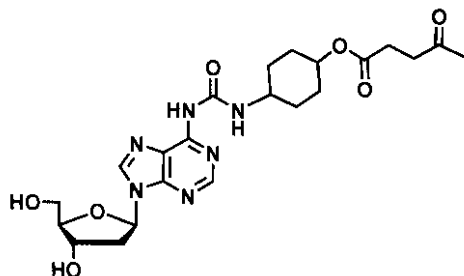
化合物3 (1.5 g, 2.08ミリモル)にピリジン(脱水)を加えて共沸した後、ピリジン(脱水)21 mlに溶解させた。ここにトリエチルアミノトリヒドロフルオリド(1.70 ml, 10.4ミリモル)及びトリエチルアミン(1.44 ml, 10

50

．4ミリモル)を加え、室温で12時間反応させた。水でクエンチした後、溶媒を減圧下留去してクロロホルムに溶解させ、飽和炭酸水素ナトリウムで抽出操作を行った。有機層を集め硫酸ナトリウムを加え乾燥させた後、濾過し溶媒を減圧下留去した。得られた残渣を展開溶媒としてクロロホルム/メタノールを用いてNHシリカゲルカラムクロマトグラフィにより精製し、目的物(以下の化学式を有する化合物4、730mg, 72%)を得た。

【0050】

【化34】



10

【0051】

¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) 1.45 - 1.59 (4H, m), 2.01 - 2.02 (2H, m), 2.14 - 2.16 (2H, m), 2.19 (3H, s), 2.39 - 2.43 (1H, m), 2.55 - 2.57 (2H, m), 2.74 - 2.76 (2H, m), 2.96 - 3.00 (2H, m), 3.80 - 3.84 (2H, m), 3.96 - 3.99 (1H, m), 4.23 (1H, s), 4.76 - 4.80 (2H, m), 5.74 - 5.76 (1H, m), 6.43 - 6.45 (1H, m), 7.26 (1H, s), 8.26 (1H, m), 8.48 (1H, s), 8.75 (1H, s), 9.44 - 9.48 (1H, m); ¹³C NMR (CDCl₃) 28.4, 29.8, 30.0, 30.4, 38.1, 41.1, 48.3, 63.3, 72.1, 73.1, 87.5, 89.5, 121.9, 142.8, 149.4, 150.7, 151.0, 153.5, 172.4, 207.0。

20

30

【0052】

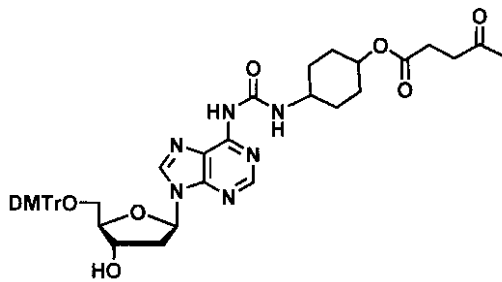
化合物5 (5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-N6-[N-(トランス-4-(4-オキソペンタノイルオキシ)シクロヘキシル)カルバモイル]デオキシアデノシン)の合成

化合物4 (600mg, 1.22ミリモル)にピリジン(脱水)を加えて共沸した後、ピリジン(脱水)12 mlに溶解させた。ここに4,4'-ジメトキシトリチルクロリド(497mg, 1.47ミリモル)を加え、室温で4時間反応させた。メタノールでクエンチした後、クロロホルムで反応溶媒を希釈し、飽和炭酸水素ナトリウムで抽出操作を行った。有機層を集め硫酸ナトリウムを加え乾燥させた後、濾過し溶媒を減圧下留去した。得られた残渣を、展開溶媒としてヘキサン/クロロホルムを用いてNHシリカゲルカラムクロマトグラフィにより精製し、目的物(以下の化学式を有する化合物5、741mg, 77%)を得た。

40

【0053】

【化 3 5】



10

【 0 0 5 4】

^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) 1.45 - 1.60 (4 H, m), 2.01 - 2.03 (2 H, br), 2.14 - 2.18 (2 H, br), 2.20 (3 H, s), 2.54 - 2.58 (3 H, m), 2.75 (2 H, t, $J = 6.5$ Hz), 2.82 - 2.87 (1 H, m), 3.36 - 3.43 (2 H, m), 3.76 (6 H, s), 3.84 - 3.86 (1 H, m), 4.15 - 4.18 (1 H, dd, $J = 4.4$ Hz, $J = 8.3$ Hz), 4.68 - 4.71 (1 H, m), 4.77 - 4.81 (1 H, m), 6.47 (1 H, t, $J = 6.3$ Hz), 6.78 (4 H, d, $J = 8.5$ Hz), 7.19 - 7.39 (9 H, m), 8.09 (1 H, s), 8.13 (1 H, br), 8.43 (1 H, s), 9.38 (1 H, d, $J = 7.6$ Hz); ^{13}C NMR (CDCl_3) 28.5, 29.8, 30.0, 30.4, 38.1, 40.3, 48.2, 55.3, 63.8, 72.2, 72.5, 84.6, 86.3, 86.7, 113.3, 120.9, 127.1, 128.0, 128.2, 130.1, 135.7, 141.1, 144.6, 150.0, 150.4, 151.1, 153.3, 158.7, 172.4, 206.9。

20

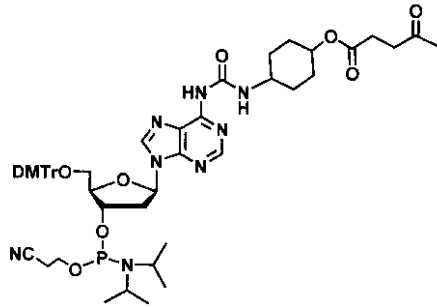
【 0 0 5 5】

ホスホロアミダイト化合物 (5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-N6-[N-(トランス-4-(4-オキソペンタノイルオキシ)シクロヘキシル)カルバモイル]デオキシアデノシン3'-(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)の合成

化合物5 (350 mg, 0.441ミリモル)をピリジン(脱水)、トルエン(脱水)、ジクロロメタン(脱水)の順で各々3回ずつ共沸した後、ジクロロメタン(脱水)4.4 mlに溶解させた。これにテトラゾール(19 mg, 0.264ミリモル)、ジイソプロピルアミン(37 μl , 0.264ミリモル)及び2-シアノエチル-ビス(N,N-ジイソプロピル)-ホスホロアミダイト(154 μl , 0.486ミリモル)を加え、室温で4時間反応させた。水でクエンチした後、溶媒を減圧下留去した後、酢酸エチル-ジエチルエーテルの混合溶媒に溶解させ、0.2 M水酸化ナトリウム水溶液で3回抽出操作を行い、有機層を集め溶媒を減圧下留去した。得られた残渣を、展開溶媒としてクロロホルムを用いてリサイクルHPLCで精製し、目的物(下記式で表されるホスホロアミダイト化合物、303 mg, 77%)を得た。

40

【化 3 6】



10

【 0 0 5 6】

^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) 1.12 - 1.21 (12 H, m), 1.48 - 1.60 (4 H, m), 2.02 - 2.04 (2 H, br), 2.15 - 2.17 (2 H, br), 2.20 (3 H, s), 2.46 - 2.48 (1 H, m), 2.56 - 2.63 (3 H, m), 2.74 - 2.77 (2 H, m), 2.93 - 2.98 (1 H, m), 3.35 - 3.43 (2 H, m), 3.60 - 3.75 (4 H, m), 3.77 (6 H, s), 3.80 - 3.86 (1 H, m), 4.29 - 4.32 (1 H, m), 4.78 - 4.81 (2 H, m), 6.43 - 6.46 (1 H, m), 6.76 - 6.79 (4 H, m), 7.18 - 7.40 (9 H, m), 8.21 - 8.24 (1 H, m), 8.34 - 8.36 (1 H, br), 8.43 (1 H, s), 9.48 (1 H, d, $J = 7.6$ Hz); ^{13}C NMR (CDCl_3) 20.2, 20.3, 20.4, 20.5, 24.5, 24.6, 24.7, 28.4, 29.7, 29.9, 30.3, 38.0, 39.3, 43.3, 43.4, 48.0, 48.2, 55.2, 55.3, 58.2, 58.3, 58.5, 63.3, 63.5, 72.1, 73.3, 73.4, 74.0, 84.8, 86.0, 86.5, 113.1, 117.5, 117.6, 121.0, 126.9, 127.9, 128.1, 128.2, 130.1, 135.7, 141.6, 144.6, 150.0, 150.4, 151.0, 153.3, 158.6, 172.3, 206.7; $^3\text{1P}$ NMR (CDCl_3) 149.7, 149.8。

20

30

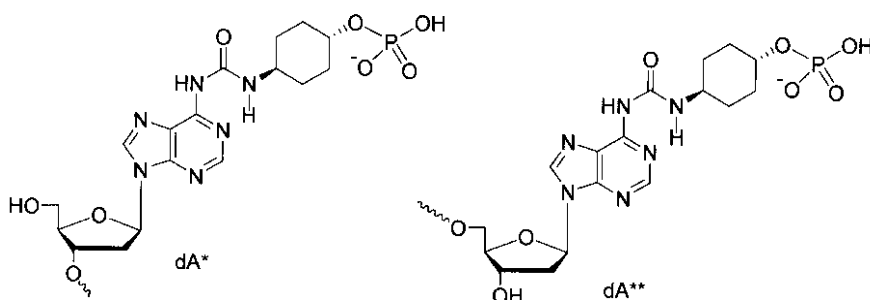
【 0 0 5 7】

実施例 2

オリゴヌクレオチド 5' - (dA*) CAACCUACU (dA**) - 3' (配列番号: 1) の合成

ここで下線部のヌクレオチド残基は 2' - O - メチル - リボヌクレオチド残基を表わす。dA*、dA** はそれぞれ下図で示すヌクレオチド残基を表わす。

【化 3 7】



40

50

【0058】

グレンリサーチ社より購入したユニバーサルサポートII (1 μmol) を固相担体として用い、実施例1のホスホロアミダイト化合物、およびグレンリサーチ社より購入した2'-O-メチルRNAホスホロアミダイト試薬を用い、ABI-392 DNA/RNA合成機の標準的な1.0 μmolスケールRNA合成プロトコールにて合成を行った。5'末端のヌクレオチド残基を結合後、オリゴヌクレオチドに対して、50当量のヒドラジン(ピリジン-酢酸、3:2, V/V 溶液)を加え、室温で15分間放置することにより、Lev基を除去した。

【0059】

次いで、グレンリサーチ社より購入したホスファリンク試薬(50当量)を1H-テトラゾール(50当量)の存在下反応させ、次いで、常法によりヨウ素酸化と2Mアンモニア/メタノールによる切り出しついで、濃アンモニア水で室温18時間攪拌した。このアンモニア溶液をC18カートリッジカラムに担持し、副生物を洗浄した後、2%トリフルオロ酢酸水溶液で処理した後、目的物を溶出した。得られた目的物の粗精製物を陰イオン交換HPLCで精製して目的物を得た。目的物の構造はMALDI-TOF質量分析により確認した。

10

【0060】

実施例3

オリゴヌクレオチド5'-(dA*)CAACCUACU-3'(配列番号:2)の合成

20

実施例2と同様の方法により目的物を合成した。目的物の構造はMALDI-TOF質量分析により確認した。

【0061】

実施例4

オリゴヌクレオチド5'-CAACCUACU(dA**) - 3'(配列番号:3)の合成

実施例2と同様の方法により目的物を合成した。目的物の構造はMALDI-TOF質量分析により確認した。

なお、実施例2で得られたオリゴヌクレオチドは、両末端にアニオンに解離することが可能な置換基を有しており、実施例3及び実施例4で得られたオリゴヌクレオチドは、それぞれ、5'末端、3'末端にアニオンに解離することが可能な置換基を有している。

30

【0062】

実施例5

T_m測定による鎖長依存的ハイブリダイゼーションの解析

実施例2、実施例3又は実施例4で得られたオリゴヌクレオチドを10 mMリン酸緩衝液(pH 7.0)、0.1 M NaCl中に、濃度が1.0 μMになるように調整した。この溶液に、下記長鎖RNA(配列番号:4)又は短鎖RNA(配列番号:5)を同じく濃度1.0 μMになるように溶解し、260 nmでの吸光度の温度依存性を5 から90 まで測定した。得られたUV融解曲線を微分し、その一次微分係数が極大となる温度をT_mとした。比較として、下記天然型プローブ、および非アニオン性プローブのT_mも測定した。結果を表1に示す。

40

【0063】

長鎖RNA(配列番号:4): 3'-AUUAUAUGUUGGAUGAUGGUUA-5'

短鎖RNA(配列番号:5): 3'-GUUCCAUGA-5'

天然型プローブ(配列番号:6): 5'-(dC)CAACCUACU(dC)-3'

非アニオン性プローブ(配列番号:7): 5'-(dA#)CAACCUACU(dA##)-3'

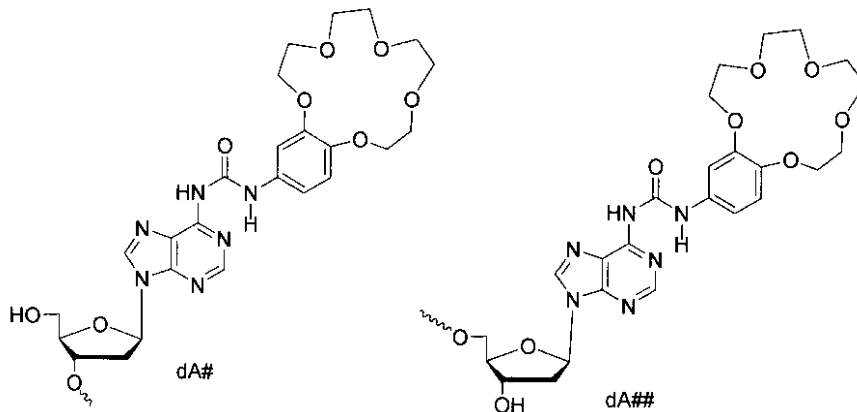
ここで、A、U、G、Cはリボヌクレオチド残基である。下線部のヌクレオチド残基は2'-O-メチル-リボヌクレオチド残基である。dA#、dA##はそれぞれ下図に示す

50

ヌクレオチド残基を表わす。

【 0 0 6 4 】

【 化 3 8 】



10

【 0 0 6 5 】

【 表 1 】

	長鎖RNA	短鎖RNA	ΔT_m
実施例 2	43	52	+9
実施例 3	40	47	+7
実施例 4	42	45	+3
天然型プローブ	53	49	-4
非アニオン性プローブ	49	53	+4

20

$$\Delta T_m = T_m (\text{短鎖RNA}) - T_m (\text{長鎖RNA})$$

【 0 0 6 6 】

表 1 より、以下のことが明らかになった。

プローブの両末端、又は 5' 末端に、アニオンに解離することが可能な置換基を導入した実施例 2、実施例 3、実施例 4 のオリゴヌクレオチドは、長鎖 RNA よりも短鎖 RNA に強く結合した。

30

天然型プローブは、逆に短鎖 RNA よりも長鎖 RNA に強く結合した。

末端にアニオンに解離することが可能な置換基を有しない、非アニオン性プローブは長鎖 RNA よりも短鎖 RNA より強く結合したが、その選択性の指標である $T_m = +4$ は、アニオン性置換基を有する実施例 2 の $T_m = 9$ および実施例 3 のプローブの $T_m = +7$ よりも小さかった。

以上の結果より、自身よりも鎖長の短い RNA と選択的に結合する核酸プローブとしては本発明の実施例に示したオリゴヌクレオチドの方が、天然型プローブよりも優れていた。また、アニオンを有しないオリゴヌクレオチドと本発明の実施例に示したアニオンを有するオリゴヌクレオチドでは、本発明の実施例に示したオリゴヌクレオチドがも優れていることがわかった。

40

【 0 0 6 7 】

実施例 6

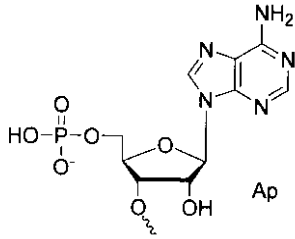
5' 末端にリン酸基を有する短鎖 RNA に対する結合能評価

実施例 5 に示した実験と同様の方法により、実施例 2 に示すオリゴヌクレオチドが下記の長鎖 RNA、及び短鎖 5' リン酸化 RNA に結合する強度を T_m 測定により調べた。なお、短鎖 RNA としては、5' 末端がリン酸化されているものを用いた。結果を表 2 に示す。

すなわち、短鎖 RNA の 5' 末端は下記構造を有する。

50

【化 3 9】



10

【 0 0 6 8】

【表 2】

	長鎖RNA	短鎖5'リン酸化RNA	ΔT_m
実施例 2	42	51	+9

$$\Delta T_m = T_m (\text{短鎖RNA}) - T_m (\text{長鎖RNA})$$

【 0 0 6 9】

20

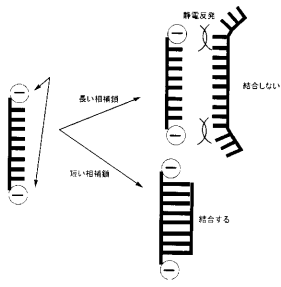
表 2 から、実施例 2 で得られたオリゴヌクレオチドは、5'リン酸化された短鎖 RNA に対しても、5'リン酸を有しない短鎖 RNA と同様に、長鎖 RNA と比較して高い親和性を示すことがわかった。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 7 0】

【図 1】本発明のオリゴヌクレオチド誘導体を用いて、短い相補鎖のみを検出する方法を模式的に示した図である。

【 図 1 】



【 配列表 】

2009190983000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00	4 C 0 8 6
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	35/02 (2006.01)	A 6 1 P	35/02	
A 6 1 P	31/12 (2006.01)	A 6 1 P	31/12	
A 6 1 P	31/04 (2006.01)	A 6 1 P	31/04	
A 6 1 P	31/22 (2006.01)	A 6 1 P	31/22	
A 6 1 P	3/10 (2006.01)	A 6 1 P	3/10	
A 6 1 P	3/06 (2006.01)	A 6 1 P	3/06	
A 6 1 P	9/10 (2006.01)	A 6 1 P	9/10	
A 6 1 P	37/08 (2006.01)	A 6 1 P	37/08	
A 6 1 P	25/16 (2006.01)	A 6 1 P	25/16	
A 6 1 P	21/00 (2006.01)	A 6 1 P	21/00	
A 6 1 P	25/28 (2006.01)	A 6 1 P	25/28	
A 6 1 P	37/06 (2006.01)	A 6 1 P	37/06	
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 P	21/04 (2006.01)	A 6 1 P	21/04	
A 6 1 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P	19/04 (2006.01)	A 6 1 P	19/04	
A 6 1 P	19/02 (2006.01)	A 6 1 P	29/00	1 0 1
A 6 1 P	17/00 (2006.01)	A 6 1 P	19/02	
C 1 2 Q	1/68 (2006.01)	A 6 1 P	17/00	
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 Q	1/68	A
C 1 2 M	1/00 (2006.01)	C 1 2 N	15/00	F
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	C 1 2 M	1/00	A
G 0 1 N	37/00 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	M
		G 0 1 N	37/00	1 0 2

(72)発明者 高久 悠介

神奈川県横浜市緑区長津田町4 2 5 9 国立大学法人東京工業大学内

(72)発明者 宮崎 一也

神奈川県横浜市緑区長津田町4 2 5 9 国立大学法人東京工業大学内

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 CA09 CA11 HA12
 4B029 AA07 AA21 AA23 BB20 CC03
 4B063 QA01 QA18 QQ42 QQ52 QR56 QR62 QR82 QS34 QX01
 4C057 BB02 BB04 BB05 LL09 LL21 LL29 LL40 LL44 MM01 MM02
 MM04 MM07 MM09
 4C084 AA13 MA16 MA31 MA32 MA35 MA36 MA37 MA41 MA43 MA52
 MA55 MA60 MA66 NA14 ZA012 ZA022 ZA152 ZA162 ZA422 ZA892
 ZA942 ZA962 ZB082 ZB112 ZB132 ZB152 ZB262 ZB272 ZB332 ZB352
 ZC332 ZC352
 4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA01 ZA02 ZA15
 ZA16 ZA42 ZA89 ZA94 ZA96 ZB08 ZB11 ZB13 ZB15 ZB26
 ZB27 ZB33 ZB35 ZC33 ZC35