

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5284084号
(P5284084)

(45) 発行日 平成25年9月11日(2013.9.11)

(24) 登録日 平成25年6月7日(2013.6.7)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 15/00 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A Z

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 A

C O 7 H 21/00 (2006.01)

C O 7 H 21/00

A 6 1 K 31/7088 (2006.01)

A 6 1 K 31/7088

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 K 48/00

請求項の数 19 (全 40 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2008-512688 (P2008-512688)
 (86) (22) 出願日 平成18年5月24日 (2006.5.24)
 (65) 公表番号 特表2008-541708 (P2008-541708A)
 (43) 公表日 平成20年11月27日 (2008.11.27)
 (86) 国際出願番号 PCT/DK2006/050022
 (87) 国際公開番号 W02006/125447
 (87) 国際公開日 平成18年11月30日 (2006.11.30)
 審査請求日 平成21年5月22日 (2009.5.22)
 (31) 優先権主張番号 PA200500762
 (32) 優先日 平成17年5月25日 (2005.5.25)
 (33) 優先権主張国 デンマーク (DK)

(73) 特許権者 507389576
 ティナ・ホールディング・アーベーエス
 デンマーク国 8200 オーフス エヌ,
 オボガーデ 15, セー/オウ・ウスティ
 ースク・イノベーション・アクティーゼ
 ルスカブ
 (74) 代理人 100140109
 弁理士 小野 新次郎
 (74) 代理人 100075270
 弁理士 小林 泰
 (74) 代理人 100080137
 弁理士 千葉 昭男
 (74) 代理人 100096013
 弁理士 富田 博行

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ねじれたインターカレーティング核酸 (T I N A) を用いた、フーグスティーン型の三重鎖および二重鎖の安定でそして選択的な形成、ならびに T I N A の調製法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

一般構造

 $X-L-I_1-C-I_2$

式中、

X は、オリゴヌクレオチド、あるいは P N A の主鎖単量体単位であり、X は、アルキレンジオールを含み、

L は、アルキル鎖、オキサアルキル鎖、アザアルキル鎖、チアアルキル鎖、カルボキサミド基、チオカルボキサミド基、スルホンアミド基またはそれらの組み合わせを含み、0 ~ 60 原子を含む、リンカーであり、

I_1 は、ベンゼン、ナフタレン、アズレン、および二環式芳香族複素環からなる群より選択される、単環式または多環式芳香族環の第一のインターカレーターであり、

C は、1 ~ 12 炭素のアルキル、2 ~ 12 炭素のアルケニル、2 ~ 25 炭素のアルキニル、またはジアゾ、あるいは 25 炭素または／および窒素原子より長くない長さを持つそれらの組み合わせからなる群より選択される共役剤であり、

I_2 は、三環式芳香族環、四環式芳香族環、五環式芳香族環ならびにそれらの複素環式芳香族環の群より選択される第二のインターカレーターである、
 を持つ、柔軟な塩基スタッキング単量体。

【請求項 2】

X のアルキレンジオールが、エチレングリコールまたは 1-オ-メチレングリセロール

である、請求項 1 に記載の柔軟な塩基スタッキング単量体。

【請求項 3】

X のアルキレンジオールがエチレングリコールである、請求項 1 または請求項 2 に記載の柔軟な塩基スタッキング単量体。

【請求項 4】

C のアルキニルがアセチレンまたは反復アセチレンである、請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載の柔軟な塩基スタッキング単量体。

【請求項 5】

C が直鎖または分枝鎖または単環式芳香族環からなる群より選択される、請求項 1 に記載の柔軟な塩基スタッキング単量体。

【請求項 6】

L の長さが少なくとも 2 原子である、請求項 1 ～ 5 のいずれかに記載の柔軟な塩基スタッキング単量体。

【請求項 7】

I₁ がベンゼンである、請求項 1 ～ 6 のいずれかに記載の柔軟な塩基スタッキング単量体。

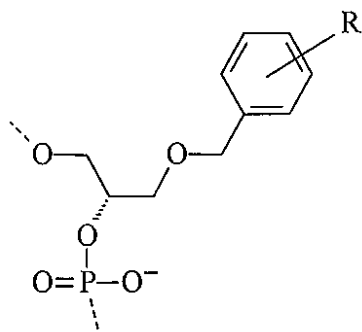
【請求項 8】

I₂ がピレンである、請求項 1 ～ 7 のいずれかに記載の柔軟な塩基スタッキング単量体。

【請求項 9】

式：

【化 1】



{式中、R はアリールエチニルであり、一般構造 X-L-I₁-C-I₂ において、オリゴヌクレオチドが X に対応し、-CH₂OCH₂- が L に対応し、ベンゼンが I₁ に対応し、エチニルが C に対応し、アリールが I₂ に対応する}、請求項 1 ～ 8 のいずれかに記載の柔軟な塩基スタッキング単量体。

【請求項 10】

オリゴヌクレオチド内への取り込みに適応した、請求項 1 ～ 9 のいずれかに記載の柔軟な塩基スタッキング単量体であって、該単量体が、ホスホロアミダイト、ホスホロジアミダイト、ホスホジエステル、ホスホトリエステル、ホスホネート、H-ホスホネート、ホスファイト、クロロホスファイト、クロロホスホロアミダイト、ホスホンアミダイト、ホスホンクロリダイト、トリホスフェート、ジホスフェートの群より選択される、前記柔軟な塩基スタッキング単量体。

【請求項 11】

請求項 1 ～ 10 のいずれかの柔軟な塩基スタッキング単量体を含むオリゴヌクレオチド。

【請求項 12】

a. 柔軟な塩基スタッキング単量体の前駆体を提供する工程

{ここで前記前駆体は、ハロゲンで置換されたかまたは C で置換されたかまたはアジドで置換された I₁ を含む柔軟な塩基スタッキング単量体である}、

b. 工程 a の前駆体のハロゲンまたは C 置換基またはアジド置換基を C-I₂ で置換す

る工程、

c. 柔軟な塩基スタッキング単量体のC-I₂置換した前駆体を、オリゴヌクレオチド内への取り込みに適応可能にする工程

を含む、請求項1～10のいずれかに記載の柔軟な塩基スタッキング単量体の調製法。

【請求項13】

a. オリゴヌクレオチド内への取り込みに適応した柔軟な塩基スタッキング単量体を提供する工程、

b. オリゴヌクレオチド合成用の標準的試薬を提供する工程、

c. オリゴヌクレオチド合成中に、1以上の柔軟な塩基スタッキング単量体をオリゴヌクレオチド内に取り込む工程、

d. 柔軟な主鎖単量体を含むオリゴヌクレオチドを生じる工程を含む、請求項11に記載のオリゴヌクレオチドの調製法。

【請求項14】

a. オリゴヌクレオチド内への取り込みに適応した柔軟な単量体の前駆体を提供する工程

{ここで前記前駆体は、ハロゲンで置換されたかまたはCで置換されたかまたはアジドで置換されたI₁を含む柔軟な塩基スタッキング単量体である}、

b. オリゴヌクレオチド合成用の標準的試薬を提供する工程、

c. オリゴヌクレオチド合成中に、柔軟な塩基スタッキング単量体の1以上の前駆体をオリゴヌクレオチド内に取り込む工程、

d. オリゴヌクレオチドの合成後、I₁上のハロゲン置換基またはC置換基またはアジド置換基をC-I₂で置換する工程、

e. 柔軟な塩基スタッキング単量体を含むオリゴヌクレオチドを生じる工程を含む、請求項11に記載のオリゴヌクレオチドの調製法。

【請求項15】

二本鎖核酸構造または三重鎖核酸構造の形成のための、請求項11記載のオリゴヌクレオチドの使用。

【請求項16】

a. 請求項11記載のオリゴヌクレオチドを提供する工程、

b. 一本鎖または二本鎖ターゲット核酸を提供する工程、

c. 工程aのオリゴヌクレオチドと、工程bの一本鎖または二本鎖ターゲット核酸を、二重鎖または三重鎖形成の条件下でインキュベーションする工程、

d. 二本鎖核酸または三重鎖核酸構造を形成する工程を含む、二本鎖核酸および三重鎖核酸を形成する方法。

【請求項17】

二重鎖または三重鎖核酸構造の形成が、ターゲット核酸の活性の配列特異的調節に用いられる、請求項16記載の方法。

【請求項18】

二重鎖または三重鎖核酸構造の形成が、ターゲット核酸の配列特異的検出に用いられる、請求項16記載の方法。

【請求項19】

ターゲット核酸が、染色体遺伝子、mRNA、rRNA、tRNAおよびマイクロRNAの群より選択される、請求項17と請求項18のいずれかに記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の概要

本発明は、例えば三重鎖を形成する能力、ならびに検出、診断および／または治療に関する適切さ等の、改善された特性を持つオリゴヌクレオチドおよび修飾オリゴヌクレオチドの分野に関する。

10

20

30

40

50

【0002】

特に、本発明は、新規の柔軟な塩基スタッキング単量体であって、オリゴヌクレオチド内に取り込まれて、ターゲット二本鎖または一本鎖核酸と配列特異的に結合し、熱安定性が非常に高い三重らせんを形成することが可能な、三重鎖形成オリゴヌクレオチド (triplex forming oligonucleotides: TFOs) を提供しうる、前記単量体を提供する。他の側面は、TFO(s)を合成するための方法、ならびに検出、診断および治療におけるそれらの使用である。

【背景技術】

【0003】

WO2005083084は、オリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド類似体の主鎖内に取り込まれることが可能な、インターカレーター・シュードヌクレオチドを記載した。インターカレーター・シュードヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドは、三重鎖形成能が減少していたが、DNAとRNAを区別する能力を有した、すなわち、これらは、RNAとよりもDNAと、より安定な複合体を形成する。

【0004】

Malakhovら、2004 (Eur. J. Org. Chem. 2004, 1298-1307) は、オリゴヌクレオチド内に取り込むための単量体またはオリゴヌクレオチドを開示した。当該研究の目的は、天然存在塩基のいずれとも対照的に、天然塩基、すなわちワトソン・クリックらせんに適合しうる、どの塩基とも結合可能な (promiscuous) 塩基を提供することであった。三重鎖形成に関する研究は、まったく報告されなかった。

【0005】

二本鎖DNA (dsDNA) の配列特異的認識は、分子生物学、療法学およびバイオテクノロジーにおいて、オリゴヌクレオチドに基づくツールの開発で、かなり関心が持たれるトピックである。三重らせんは、一本鎖の三重鎖形成オリゴヌクレオチド (TFO) が、特異的主溝相互作用を通じて、dsDNAに結合する際に形成され、そしてこれは、遺伝子ターゲティングのための集中的な研究主題であった。このアプローチは、転写調節、遺伝子ノックアウト、および突然変異または組換え遺伝子を狙う、ゲノムDNAの配列特異的処理を可能にする。

【0006】

ターゲットに対するTFOの第三鎖親和性は、dsDNAのホモプリン配列に対する認識が必要であり、そして平行 (ピリミジン) 結合モチーフにおいて、生理学的条件で、pH感受性 $C^+ \cdot G-C$ フーグスティーン塩基トリプルが好ましくなく形成されるため、一般的に問題である。過去10年の間、dsDNA配列の制限を軽減しうる三重鎖核酸塩基の設計とともに、TFOを修飾して、ターゲットに対する結合親和性を改善するための、多くの努力がなされてきた。結合親和性増加を誘導する、ペプチド核酸 (PNA)、ロック核酸 (LNA)、2'-アミノエチル-オリゴリボヌクレオチド (2'-AE-RNA) およびN3'→P5'ホスホロアミダイトなどの修飾核酸を所持するオリゴヌクレオチドが、最も成功する化学的修飾TFOの中にある。3つのオリゴヌクレオチド配列すべてを含有する水溶液への、正に荷電した側鎖を時に所持する、複素環式化合物 (インターカレーター) の添加に際してもまた、三重鎖構造の安定化が観察されてきた。TFOの3'端または5'端に共有結合したインターカレーターが、リンカーの長さおよびインターカレーターの種類に応じて、+3.0~+16.1℃の範囲内で、平行三重鎖の熱安定化を導くこともまた示されている。しかし、TFO中央の膨らみ (bulge) として挿入された、共有結合したインターカレーターには、限られた注意しか払われてこなかった。

【0007】

この設計は、いくつかの利点を有しうる。第一に、糖修飾された核酸に関して必要とされる、少なくとも4つのヌクレオチド単量体の合成に比較して、インターカレーティング・シュードヌクレオチドの1つのホスホロアミダイトの合成しか必要とされない。第二に、配列内へのインターカレーター単量体のいくつかの膨らんだ挿入は、単一の挿入に比較

して、二重鎖および三重鎖の安定性をかなり増加させうる。さらに、DNAおよびRNA中の2'-OHの非存在または存在を伴う、ワトソン・クリックおよびフーグスティーン結合様式の間の構造相違は、多様な種類のらせんに関して、異なる特性を生じる。したがって、リンカーの膨らんだ挿入およびインターカレーターによるらせんの破壊は、適切に選択されたらせんに対する、ユニークな特性を生じると予期される。これは、異なる種類の一本鎖核酸間を区別しうる、化学的に修飾されたオリゴヌクレオチドにつながった。

【発明の開示】

【0008】

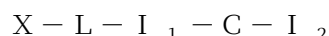
発明の詳細な説明

合成後の菌頭 (Sonogashira) カップリング反応を介して得られる、(R)-1-O-[4-(1-ピレニルエチニル)フェニルメチル]グリセロールのホモピリミジン・オリゴデオキシヌクレオチドの中央への膨らんだ (bulge) 挿入 (ねじれたインターカレーティング核酸、TINA) は、フーグスティーン型三重鎖および二重鎖の非常に高い熱安定性をもたらす一方、同じヌクレオチド内容のワトソン・クリック型二重鎖は不安定化される。

10

【0009】

第一の側面において、本発明は、一般構造：



を持つ、柔軟な塩基スタッキング単量体を提供し、式中、Xは、オリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド類似体、あるいはPNA、またはPNA類似体の主鎖内に取り込まれうる主鎖単量体単位であり、Lはリンカーであり、 I_1 は本質的に平面の少なくとも1つの共役系を含む第一のインターカレーターであり、DNA、RNAまたはそれらの類似体の核酸塩基と同時にスタッキング可能であり、Cは共役剤であり、そして I_2 は本質的に平面の少なくとも1つの共役系を含む第二のインターカレーターであり、DNA、RNAまたはそれらの類似体の核酸塩基と同時にスタッキング可能である。

20

【0010】

柔軟な塩基スタッキング単量体は、少なくとも2つのインターカレーティング系、 I_1 および I_2 からなり、これらは、必要な構造的剛性およびねじれ柔軟性を提供する、共役剤Cによって連結される。後者は、インターカレーターがそれ自体を核酸らせん内の適切な位置に調整するのに補助するのに重要であると考えられる。

30

【0011】

好ましい態様において、主鎖Xは、DNA、RNA、HNA、MNA、ANA、LNA、CAN、INA、CeNA、TNA、(2'-NH)-TNA、(3'-NH)-TNA、 α -L-リボ-LNA、 α -L-キシロ-LNA、 β -D-リボ-LNA、 β -D-キシロ-LNA、[3.2.1]-LNA、ビシクロ-DNA、6-アミノ-ビシクロ-DNA、5-エピ-ビシクロ-DNA、 α -ビシクロ-DNA、トリシクロ-DNA、ビシクロ[4.3.0]-DNA、ビシクロ[3.2.1]-DNA、ビシクロ[4.3.0]アミド-DNA、 β -D-リボピラノシル-NA、 α -L-リキソピラノシル-NA、2'-R-RNA、2'-OR-RNA、2'-AE-RNA、 α -L-RNA、 β -D-RNA、ならびにそれらの組み合わせおよびそれらの修飾のオリゴヌクレオチド内に

40

【0012】

核酸およびそれらの類似体は、ワトソン・クリックまたはフーグスティーンまたは逆フーグスティーン塩基対形成を介して相補的核酸に結合可能なオリゴヌクレオチドを提供している。Xは、3'端および/または5'端および/または配列中央に取り込まれてもよい。修飾核酸塩基、炭水化物、ペプチド鎖、磁気ビーズ、アガロースビーズ、セファロースビーズ、ガラス、プラスチック表面、重金属およびチップ表面が、核酸のさらなる修飾として用いられると考えられる。

【0013】

別の態様において、主鎖単量体単位Xは、場合によって、グリコンなどの環系内に部分

50

的に含まれるアルキレンジオールを有する、エチレングリコールまたは1-オ-メチレングリセロールなどのアルキレンジオールを含む。例えば、主鎖単量体Xは、四員、五員、または六員環の一部であってもよく、これは最終的に、窒素、イオウ、リン、および酸素から選択されるヘテロ原子を有する。

【0014】

1つの態様において、柔軟な塩基スタッキング単量体のリンカーLは、0～60原子を含む。

別の態様において、Lは、鎖または環あるいはそれらの組み合わせおよび／またはそれらの置換を含む。

【0015】

さらに別の態様において、Lは、アルキル鎖またはオキサアルキル鎖またはアザアルキル鎖またはチアアルキル鎖またはカルボキサミド基またはチオカルボキサミド基またはスルホンアミド基あるいはそれらの組み合わせを含む。

【0016】

XおよびLの組み合わせは、核酸塩基とスタッキングする能力を持つ、核酸らせんのコアに I_1-C-I_2 のインターカレーティング系を配置する系を提供する。

本発明の柔軟な塩基スタッキング単量体の I_1 は、DNA、RNAまたはそれらの類似体の核酸塩基と同時にスタッキング可能な、本質的に平面の少なくとも1つの共役系を含む第一のインターカレーターである。

【0017】

好ましい態様において、 I_1 は、場合によってベンゼン、ナフタレン、アズレン、二環式芳香族複素環系およびそれらの置換の群より選択される、単環式または多環式芳香族環系である。

【0018】

本発明の柔軟な塩基スタッキング単量体のCは共役剤である。好ましい態様において、Cは、1～12炭素のアルキル、2～12炭素のアルケニル、2～25炭素のアルキニル、またはジアゾ、あるいは25炭素または／および窒素原子より長くない長さを持つそれらの組み合わせの群より選択される。

【0019】

別の態様において、Cは直鎖または分枝鎖または単環式芳香族環およびそれらの置換からなる群より選択され、最終的に、窒素、イオウ、リン、および酸素から選択されるヘテロ原子を有する。さらに別の態様において、Cのアルケニルはアセチレンまたは反復アセチレンである。好ましい態様において、リン原子を含む主鎖単量体単位Xの単位の長さは6原子未満であり、主鎖単位の長さは、1つの単量体から次への最短距離である。

【0020】

好ましい態様において、連結部分Lは、少なくとも2原子の長さを有し、そして最終的に、窒素、イオウ、リン、および酸素から選択されるヘテロ原子を所持する。

柔軟な塩基スタッキング単量体の I_2 は、DNA、RNAまたはそれらの類似体の核酸塩基と同時にスタッキング可能な、本質的に平面の少なくとも1つの共役系を含む第二のインターカレーターである。

【0021】

好ましい態様において、 I_2 は、二環式芳香族環系、三環式芳香族環系、四環式芳香族環系、五環式芳香族環系ならびにそれらの複素環式芳香族類似体およびそれらの置換の群より選択される。

【0022】

好ましい態様において、柔軟な塩基スタッキング単量体は、オリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド類似体の一部である。

別の好ましい態様において、柔軟な塩基スタッキング単量体は、オリゴヌクレオチド内への取り込みに適応している。

【0023】

10

20

30

40

50

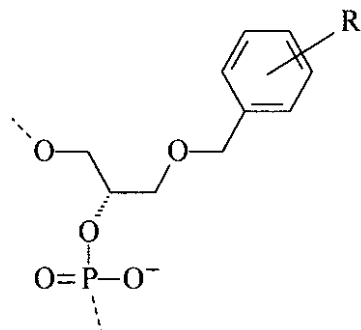
好ましい態様において、オリゴヌクレオチド内への取り込みに適応している柔軟な塩基スタッキング単量体は、ホスホロアミダイト、ホスホロジアミダイト、ホスホジエステル、ホスホトリエステル、ホスホネート、H-ホスホネート、ホスファイト、クロロホスファイト、クロロホスホロアミダイト、ホスホンアミダイト、ホスホンクロリダイト、トリホスフェート、ジホスフェートの群より選択される。

【0024】

さらに別の態様において、本発明の柔軟な塩基スタッキング単量体は、式：

【0025】

【化1】



10

【0026】

式中、Rはアリールエチニルの群より選択される
によって記載可能である。

20

本発明の別の側面は、本発明の柔軟な塩基スタッキング単量体を含むオリゴヌクレオチドである。オリゴヌクレオチドは、ワトソン-クリック塩基対形成およびフーグスティーン塩基対形成および逆フーグスティーン塩基対形成が可能なオリゴヌクレオチドであってもよい。本発明のオリゴヌクレオチドに重要な点は、これらが、ワトソン-クリック塩基対形成およびフーグスティーン塩基対形成および逆フーグスティーン塩基対形成することが可能である点である。したがって、本発明の柔軟な塩基スタッキング単量体をオリゴヌクレオチド内に取り込むと、オリゴヌクレオチドは、三重鎖形成することが可能になる。

【0027】

30

本発明の別の側面は、柔軟な塩基スタッキング単量体の調製法であり、該方法は、柔軟な塩基スタッキング単量体の前駆体を提供する工程 {ここで前記前駆体は、ハロゲンで置換されたかまたはCで置換されたかまたはアジドで置換された I_1 を含む柔軟な塩基スタッキング単量体である} ；

工程aの前駆体のハロゲンまたはC置換基またはアジド置換基をC- I_2 で置換する工程 ；

柔軟な塩基スタッキング単量体のC- I_2 置換した前駆体を、オリゴヌクレオチド内への取り込みに適応可能にする工程、を含む。

【0028】

本発明のさらに別の側面は、柔軟な塩基スタッキング単量体を含むオリゴヌクレオチドの調製法であり、該方法は：

40

オリゴヌクレオチド内への取り込みに適応した柔軟な塩基スタッキング単量体を提供する工程 ；

オリゴヌクレオチド合成用の標準的試薬を提供する工程 ；

オリゴヌクレオチド合成中に、1以上の柔軟な塩基スタッキング単量体をオリゴヌクレオチド内に取り込む工程 ；

それによって、柔軟な主鎖単量体を含むオリゴヌクレオチドを生じる工程、を含む。

【0029】

さらに別の側面は柔軟な塩基スタッキング単量体を含むオリゴヌクレオチドの調製法であり、該方法は：

50

オリゴヌクレオチド内への取り込みに適応した柔軟な単量体の前駆体を提供する工程 {ここで前記前駆体は、ハロゲンで置換されたかまたはCで置換されたかまたはアジドで置換された I_1 を含む柔軟な塩基スタッキング単量体である} ;

オリゴヌクレオチド合成用の標準的試薬を提供する工程 ;

オリゴヌクレオチド合成中に、柔軟な塩基スタッキング単量体の1以上の前駆体をオリゴヌクレオチド内に取り込む工程 ;

オリゴヌクレオチドの合成後、 I_1 上のハロゲン置換基またはC置換基またはアジド置換基をC- I_2 で置換する工程 ;

それによって、柔軟な塩基スタッキング単量体を含むオリゴヌクレオチドを生じる工程、を含む。

10

【0030】

本発明のさらなる側面は、三重鎖核酸構造の形成のための、柔軟な塩基スタッキング単量体を含むオリゴヌクレオチドの使用である。ハイブリダイゼーションによる伝統的な検出に比較して、TFOでの検出は、変性工程を必要としない。

【0031】

したがって、本発明のさらなる側面は、二重鎖または三重鎖核酸を形成する方法であり、該方法は :

請求項16記載のオリゴヌクレオチドを提供する工程 ;

一本鎖または二本鎖ターゲット核酸を提供する工程 ;

工程aのオリゴヌクレオチドと、工程bの一本鎖または二本鎖ターゲット核酸を、二重鎖または三重鎖形成の条件下でインキュベーションする工程 ;

20

それによって、二本鎖核酸または三重鎖核酸構造を形成する工程、を含む。

【0032】

重要なことに、本発明のTFOは、実施例セクションから明らかであるように、およそ7のpHで三重鎖形成が可能である。この特徴は、多様な適用に、例えば薬剤としての使用に、非常に重要である。

【0033】

好ましい態様において、三重鎖核酸の形成を、ターゲット核酸の活性の配列特異的調節に用いる。

好ましい態様において、ターゲット核酸は、染色体遺伝子、mRNA、rRNA、tRNAおよびマイクロRNAまたはそれらの前駆体いずれかの群より選択される。したがって、三重鎖核酸構造は、mRNAの翻訳、rRNAまたはtRNAの機能、あるいはプレmiRNAから成熟マイクロRNAへのプロセッシングを阻害しうる。

30

【0034】

他の好ましい態様において、三重鎖核酸構造の形成を、ターゲット核酸の配列特異的検出に用いる。

したがって、これは、特定の前駆体マイクロRNAの検出または特定の遺伝子アレルの検出であってもよい。こうした検出法は、例えば、診断目的のために関心が持たれる。

【0035】

別の態様において、柔軟な塩基スタッキング単量体を含むオリゴヌクレオチドを薬剤として用いる。こうした薬剤の作用機構は、特定の遺伝子の発現阻害、すなわち抗遺伝子性 (antigenic) 機構によってもよい。これはまた、mRNAまたはマイクロRNAレベルの阻害であってもよい。

40

【0036】

したがって、本発明のオリゴヌクレオチドを、薬剤調製に用いてもよい。

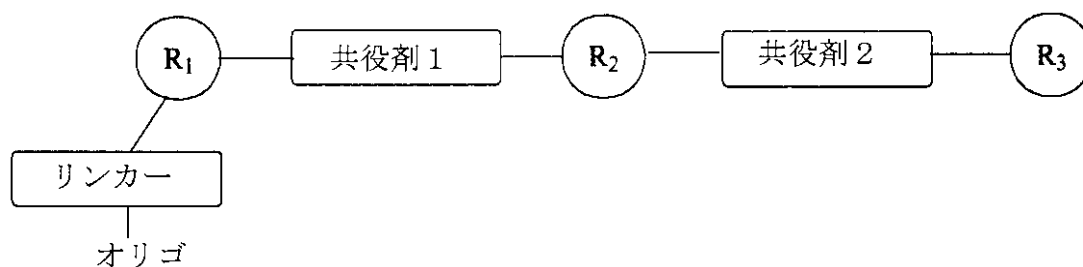
項目 :

1. 式1からの一般構造を有する、天然または修飾DNAおよびRNA三重鎖、二重鎖およびそれらのハイブリッドを安定化させるためのインターカレーティング・オリゴヌクレオチド。

【0037】

50

【化 2】



式 1

10

【0038】

式中

R_1 、 R_2 および R_3 は、互いに独立に、単環式または多環式芳香族環系であり、

R_1 、 R_2 および R_3 は、互いに独立に、置換されていてもよく

オリゴは、DNA、RNA、PNA、HNA、MNA、ANA、LNA、CAN、INA、CeNA、TNA、(2'-NH)-TNA、(3'-NH)-TNA、 α -L-リボ-LNA、 α -L-キシロ-LNA、 β -D-リボ-LNA、 β -D-キシロ-LNA、[3.2.1]-LNA、ビシクロ-DNA、6-アミノ-ビシクロ-DNA、5-エピー-ビシクロ-DNA、 α -ビシクロ-DNA、トリシクロ-DNA、ビシクロ[4.3.0]-DNA、ビシクロ[3.2.1]-DNA、ビシクロ[4.3.0]アミド-DNA、 β -D-リボピラノシル-NA、 α -L-リキソピラノシル-NA、2'-R-RNA、2'-OR-RNA、2'-AE-RNA、 α -L-RNA、 β -D-RNA、およびそれらの修飾のサブユニットからなるオリゴヌクレオチドである。サブユニットは、修飾核酸塩基、炭水化物、ペプチド鎖を含有してもよい。オリゴヌクレオチド主鎖は修飾されていてもよい。

20

【0039】

リンカーは、1~60の原子を含み、そして非芳香族環領域を含有してもよく、ここでオリゴは、連結リンカーを介して、芳香族環系 R_1 に連結され、この R_1 が次に、単環式および/または多環式芳香族環系および/またはアルキル、アルケニルおよび/またはアルキニルを含む共役系を定義する共役剤1を介して、芳香族環系 R_2 に連結され、この R_2 が次に、単環式および/または多環式芳香族環系および/またはアルキル、アルケニルおよび/またはアルキニルを含む共役系を定義する共役剤2によって、芳香族環系 R_3 に連結され、ここでリンカーは、リン酸部分、または糖部分、または核酸塩基、または修飾オリゴ主鎖を介して、核酸または核酸類似体の主鎖内に挿入されることが可能な、主鎖単量体単位である。

30

【0040】

R_1 、共役剤1、 R_2 、共役剤2および R_3 を含む共役系は、非平面系を採用することも可能である。

共役剤1および共役剤2が互いに独立である、請求項1記載のインターカレーティング・オリゴヌクレオチド。共役剤1は、xの単結合、nの二重結合および/またはmの三重結合を介して R_1 に連結され、そしてyの単結合、kの二重結合および/またはlの三重結合を介して R_2 に連結される、アリール、 R_4 からなり、ここで、k、l、m、n、xおよびyは、互いに独立に、0~5の整数である。共役剤2は、zの単結合、pの二重結合および/またはrの三重結合を介して R_2 に連結され、そしてvの単結合、sの二重結合および/またはtの三重結合を介して R_3 に連結される、アリール、 R_5 からなり、ここで、p、r、s、t、vおよびzは、互いに独立に、0~5の整数である。こうして形成された共役系は、非平面系を形成することも可能である。

40

【0041】

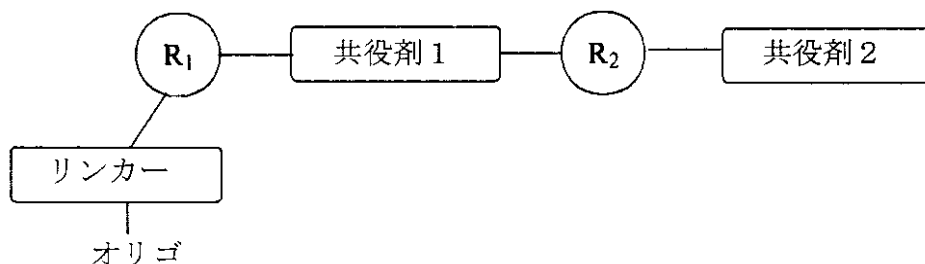
アリールがヘテロ原子を含有する、項目2記載のインターカレーティング・オリゴヌクレオチド。

50

R_3 が、式 2 に記載するように、単一原子で置換されている、項目 2 および 3 のいずれかに記載のインターカレーティング・オリゴヌクレオチド。 R_1 、共役剤 1、 R_2 および共役剤 2 を含む共役系は、非平面系を採用することも可能である。

【0042】

【化 3】



10

式 2

【0043】

共役剤 1 および／または共役剤 2 が、独立に、1～12 炭素のアルキル、2～12 炭素のアルケニル、2～25 炭素のアルキニルおよびそれらの組み合わせからなる群より選択される、項目 2～4 のいずれかに記載のインターカレーティング・オリゴヌクレオチド。

【0044】

アルキニル基が反復アセチレンである、項目 2～5 のいずれかに記載のインターカレーティング・オリゴヌクレオチド。

20

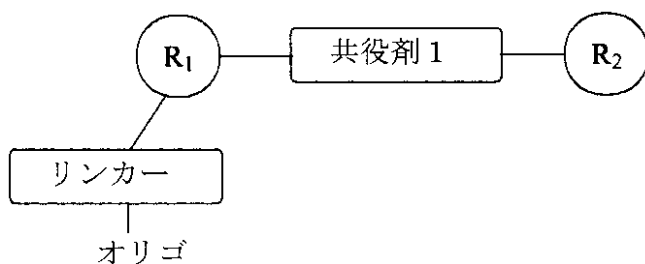
アルキニル基がアセチレンである、項目 2～5 のいずれかに記載のインターカレーティング・オリゴヌクレオチド。

【0045】

式 3 記載の、 R_3 および共役剤 2 を含有しない、項目 2～7 のいずれかに記載のインターカレーティング・オリゴヌクレオチド。

【0046】

【化 4】



30

式 3

【0047】

リンカーが、直鎖または分枝鎖または環状基からなる群より選択される、先行する項目のいずれか 1 項記載のインターカレーティング・オリゴヌクレオチド。

直鎖または分枝鎖または環状基が、窒素、イオウ、リン、および酸素から選択されるヘテロ原子を有する、項目 9 記載のインターカレーティング・オリゴヌクレオチド。

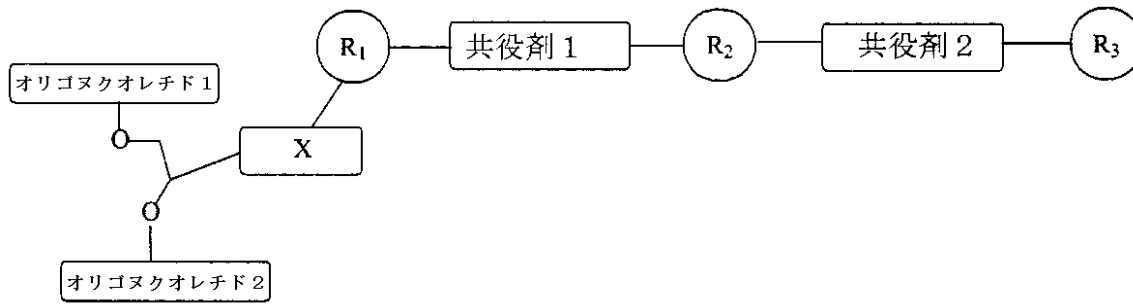
40

【0048】

主鎖単量体が、エチレングリコールを含む、先行する項目のいずれか 1 項に記載のインターカレーティング・オリゴヌクレオチド（式 4）：

【0049】

【化 5】



10

式 4

【0050】

式中、Xは直鎖または分枝鎖または環状基からなり、そしてオリゴヌクレオチド1およびオリゴヌクレオチド2は、互いに独立に、項目1のオリゴのように定義される。

直鎖または分枝鎖または環状基が、窒素、イオウ、リン、および酸素から選択されるヘテロ原子を有する、項目11記載のインターカレーティング・オリゴヌクレオチド。

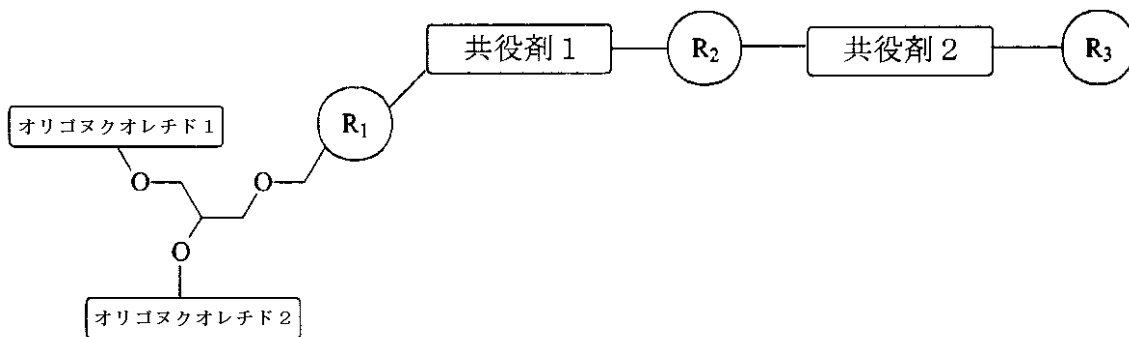
【0051】

主鎖単量体が、1-0-メチレングリセロールを含む、先行する項目のいずれか1項記載のインターカレーティング・オリゴヌクレオチド（式5）：

【0052】

20

【化 6】



30

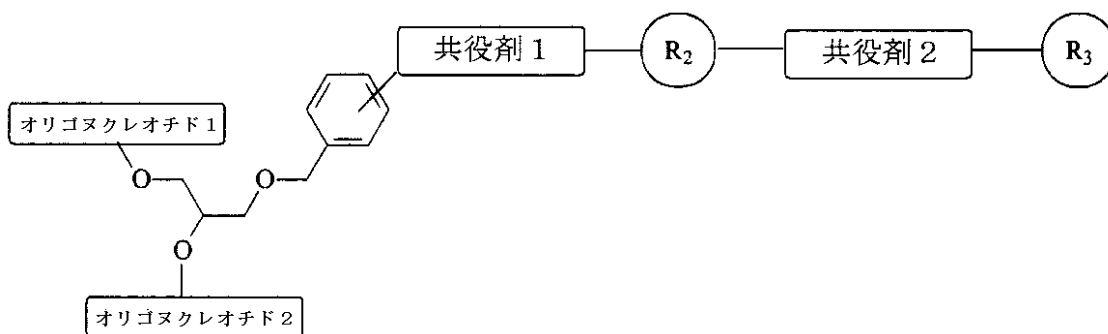
式 5

【0053】

R_1 が、メタ、オルト、またはパラ置換フェニル環からなる、項目13記載のインターカレーティング・オリゴヌクレオチド（式6）：

【0054】

【化 7】



40

式 6

【0055】

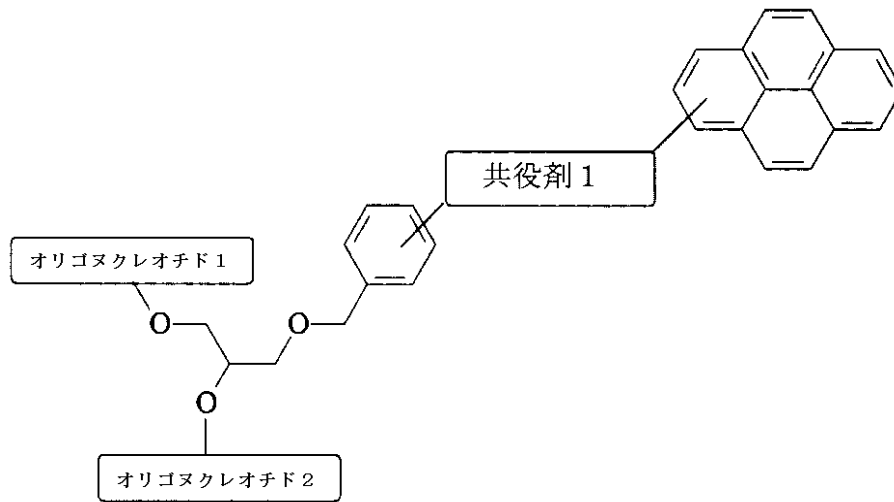
R_2 が、 R_3 および共役剤2を含有しない、式7記載のピレンである、項目14記載の

50

インターカレーティング・オリゴヌクレオチド。

【0056】

【化8】



10

式7

【0057】

共役剤1が、反復アセチレンまたはアセチレンまたはアリールからなる、項目15記載のインターカレーティング・オリゴヌクレオチド。

20

アリールがヘテロ原子を含有する、項目16記載のインターカレーティング・オリゴヌクレオチド。

【0058】

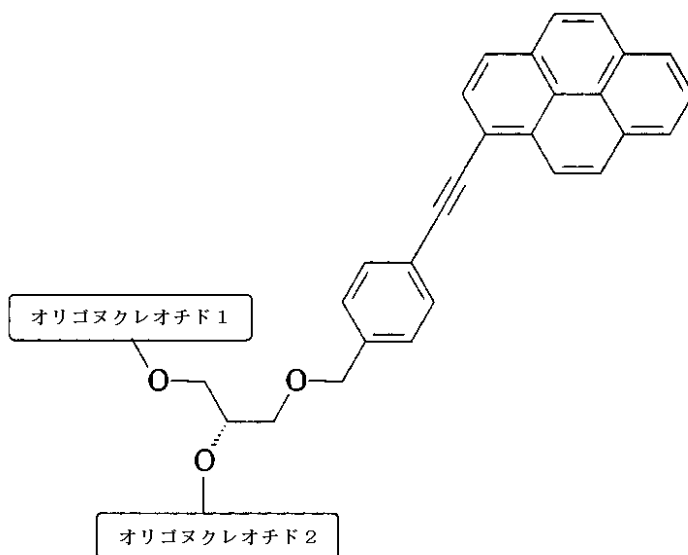
置換エチレングリセロールが純粋な立体異性体（R）または（S）である、項目11～17のいずれかに記載のインターカレーティング・オリゴヌクレオチド。

オリゴヌクレオチド1およびオリゴヌクレオチド2が、互いに独立に、項目1のオリゴのように定義される、式8に定義するようなインターカレーティング・オリゴヌクレオチド。

【0059】

30

【化9】



40

式8

【0060】

オリゴヌクレオチド1およびオリゴヌクレオチド2が、一本鎖ピリミジン・リッチ・オリゴデオキシヌクレオチドまたはオリゴリボヌクレオチドである、項目1～19記載のイ

50

ンターカレーティング・オリゴヌクレオチド。

【0061】

項目1～20記載のインターカレーティング・オリゴヌクレオチド中の共役剤1および／または共役剤2は、最終共役系の一部のみを所持するオリゴヌクレオチド（前駆体インターカレーティング・オリゴヌクレオチド）の合成後合成によって、例えば菌頭カップリング反応（Pd触媒および／またはCuIの存在下での、末端アセチレンを有するアリールおよびハロゲンアリール間の反応）によって、またはグレーザー反応（銅イオンの存在下での、末端アセチレンを所持するアリール間の反応）によって、またはクリック化学（銅イオンの存在下での、有機アジドおよび末端アセチレンを所持する有機分子間の反応）によって、組み立てられる。

10

【0062】

酸および／または塩基不安定性（labial）保護基を所持する前駆体インターカレーティング・オリゴヌクレオチドに対して、項目21記載の合成を行う。

非保護前駆体インターカレーティング・オリゴヌクレオチドに対して、項目21記載の合成を行ってもよい。

【0063】

項目22および23に記載の前駆体インターカレーティング・オリゴヌクレオチドを固体支持体に付着させる。

固体支持体が活性化表面である、項目24記載の方法。

【0064】

20

固体支持体が、磁気ビーズ、アガロースビーズ、セファロースビーズ、ガラス、プラスチック表面、重金属およびチップ表面からなる群より選択される、項目24記載の方法。

最終共役系に、または最終共役系の一部に連結されたリンカーの単量体を用いて、項目1～20のインターカレーティング・オリゴヌクレオチドを、段階的オリゴヌクレオチド合成によって得る。リンカーは、少なくとも2つの反応基を所持し、前記反応基は、場合によって、オリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド類似体の成長しつつある鎖と反応してもよい。前記単量体は、支持体に結合したヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ヌクレオチド類似体またはオリゴヌクレオチド類似体の成長しつつある鎖と反応可能であり、そして場合によって、1以上のヌクレオチド、ヌクレオチド類似体を、所望の配列で、オリゴヌクレオチド類似体に付加することによって、前記オリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド類似体をさらに伸長させ；そして前記固体支持体から前記オリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド類似体を切断し；そして塩基／酸不安定性保護基を切断して、それによってインターカレーティング・オリゴヌクレオチドを得る。

30

【0065】

項目1～20のインターカレーティング・オリゴヌクレオチドは、DNA二重鎖、RNA二重鎖またはそれらのハイブリッドである二重鎖の1つと、フーグスティーン三重鎖または逆フーグスティーン三重鎖を形成可能である。項目1～20のインターカレーティング・オリゴヌクレオチドのオリゴ部分は、DNA、RNAまたはそれらのハイブリッドである一本鎖の1つと、フーグスティーン二重鎖、または逆フーグスティーン二重鎖またはワトソン-クリック二重鎖を形成可能である。

40

【0066】

フーグスティーン三重鎖およびフーグスティーン二重鎖は、項目1～20記載のR₁、共役剤1、およびR₂、ならびに最終的に共役剤2およびR₃を含む単量体が、膨らみを形成すると、熱安定性増加を示す。

【0067】

項目1～20のインターカレーティング・オリゴヌクレオチドを、DNA反応剤に共役させる。DNA反応剤は、突然変異誘発を導くことが可能な突然変異誘発剤であるか、または光誘導可能架橋剤であるか、または放射性剤であるか、またはアルキル化基であるか、またはDNA損傷性細胞酵素を補充可能な分子である。

【0068】

50

インターカレーティング・オリゴヌクレオチドとして項目1～20を含有する、アンチセンス療法および抗遺伝子（antigene）療法で用いるのに適した薬剤組成物。

治療が必要な被験体に、項目1～20のオリゴヌクレオチドまたはその薬剤組成物の有効量を投与することを含む、望ましくない二重鎖オリゴヌクレオチドの存在によって仲介される疾患または状態を治療する方法。

【0069】

DNA、RNAまたはそれらのハイブリッドを含むテンプレート上のDNA反応基に共役された項目1～20のインターカレーティング・オリゴヌクレオチドを用いて、化学選択連結を行う方法。DNA反応基は、適切な条件下で、他の化学基と反応することが可能な化学基である。

10

【0070】

化学選択連結が生体オルソゴナル（bioorthogonal）である、項目33記載の方法。

DNA反応基の1つがアジドまたは末端アセチレンまたはホスファンである、項目34記載の方法。

【0071】

項目1～20のインターカレーティング・オリゴヌクレオチドを、DNAプラスミド（二本鎖DNA）の精製に用いてもよい。

項目1～20のインターカレーティング・オリゴヌクレオチドは転写を阻害可能である。

20

【0072】

項目1～20のインターカレーティング・オリゴヌクレオチドを蛍光in situハイブリダイゼーション（FISH）およびこの方法の類似法、例えば多重（多色）蛍光in situハイブリダイゼーション（M-FISH）、慣用的FISH、COMBO-FISH等に用いてもよい。

【0073】

項目1～20のインターカレーティング・オリゴヌクレオチドを遺伝子修復に用いてもよい。

項目1～20のインターカレーティング・オリゴヌクレオチドを、二重鎖－三重鎖遷移に基づく核酸ナノマシンに用いてもよく、ここで核酸は項目1のオリゴのように定義される。

30

【0074】

項目1～20のインターカレーティング・オリゴヌクレオチドを、平行二重鎖－逆平行二重鎖遷移に基づく核酸ナノマシンに用いてもよく、ここで核酸は項目1のオリゴのように定義される。

【0075】

対応するDNA、RNAおよびそれらの類似体へのハイブリダイゼーションに際して、蛍光特性が改変される、項目1～20のインターカレーティング・オリゴヌクレオチド。

項目1～20のインターカレーティング・オリゴヌクレオチドが、固体支持体に付着した系。

40

【0076】

固体支持体が活性化表面である、項目43記載の系。

固体支持体が、磁気ビーズ、アガロースビーズ、セファロースビーズ、ガラス、プラスチック表面、重金属およびチップ表面からなる群より選択される、項目43記載の系。

【発明を実施するための最良の形態】

【0077】

【実施例1】

【0078】

近年、本発明者らは、ワトソン－クリック型二重鎖用に設計した、いくつかのインターカレーティング核酸の合成および特性を報告した（スキーム1）^{〔9〕}。オリゴデオキシ

50

ヌクレオチドの中央の (R) - 1 - O - (1 - ピレニルメチル) グリセロールの膨らんだ挿入 (INA (登録商標)) は、相補的 ssDNA に対する親和性の有意な増加を生じ、一方、INA/RNA 二重鎖およびフーグスティーン型三重鎖および二重鎖は不安定化された^[9a, e]。オリゴデオキシヌクレオチド内へのインターカレーターの膨らんだ挿入に際して、二重鎖形成に関するミスマッチ感度が維持されたことにもまた言及しなければならない^[9b]。リン酸主鎖を歪める柔軟で短いグリセロールリンカー、および脱溶媒和によって、そして核酸塩基とのスタッキングによって、INA/DNA 二重鎖を安定化させる適切なインターカレーターのユニークな組み合わせは、核酸化学生物学において、現在用いられる、価値ある分子につながった。

【0079】

本発明者らは、TFO の設計のため、この種のインターカレーターを調べることに決めた。短くそして柔軟なリンカーを用いて、TFO の安定性を増進するため、インターカレーターの芳香族構造は、三重らせんの dsDNA 部分内にインターカレーターを配置するのに十分に長くなければならない。したがって、(R) - 1 - O - (4 - ポリアリールフェニル) メチルグリセロールは、フェニルがまた、三重らせんの TFO 部分において、核酸塩基を模倣可能でもあるため、優れた選択肢でありうる。必要な構造剛性およびねじれ柔軟性を提供し、そしてなお芳香族構造を一体化させるアセチレン架橋を介して、ポリアリール・インターカレーターもまたこのフェニルに付着させてもよい。アセチレン結合はそれ自体、インターカレーティング特性を改善すると考えられる。MacroModel 8.0 による (R) - 1 - O - [4 - (1 - ピレニルエチニル) - フェニルメチル] グリセロールの分子モデリングによれば、ねじれ角 15.3° で、三重結合の周りに 1 - ピレニルおよびフェニル残基のねじれがある。このねじれ能は、インターカレーターが、それ自体を dsDNA 内部の適切な位置に調整するのを助けることも可能であると考えられる。したがって、本発明者らは、この種の核酸を、ねじれたインターカレーティング核酸 (TINA、スキーム 1) と呼ぶ。ここで、本発明者らは、異なる TINA につながる、オリゴデオキシヌクレオチドの合成後菌頭型オンカラム誘導体化を報告し、これらの TINA は、フーグスティーン型二重鎖および三重鎖において、非常に高い親和性を有することが見出された。ワトソン・クリックまたはフーグスティーン結合様式のいずれかにしたがって形成された、膨らみとしての TINA の挿入を含む核酸らせんの熱安定性および蛍光研究もまた提示する。

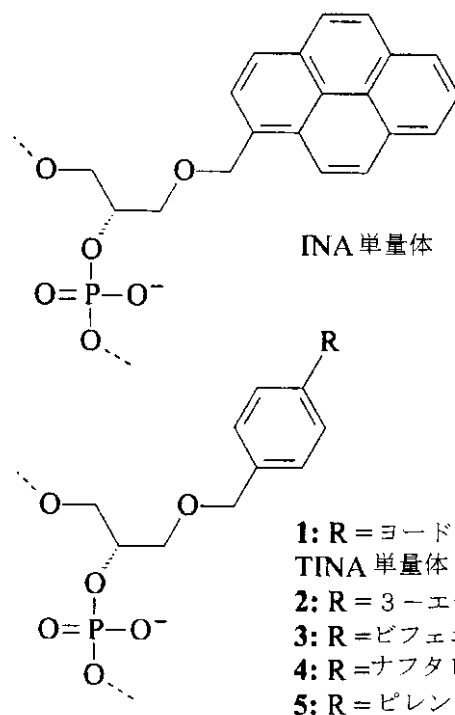
【0080】

10

20

30

【化 10】



10

20

**スキーム1 インターカレーティング核酸（INA）およびねじれたインターカレー
 ティング核酸（TINA）の単量体の化学構造**
 【0081】

合成後オリゴヌクレオチド修飾は、TINAのための正しい候補を選択するのに必要な、いくつかのシュードーヌクレオシド・ホスホロアミダイトの、ルーチンでそして時間がかかる調製より優れた代替法である。固相合成中のオリゴヌクレオチドのパラジウム（0）触媒修飾に取り組んだ、いくつかの報告がある。菌頭カップリング条件は、DNA合成に適合することが見出され、そして保護基を所持する核酸塩基に関して、副反応はまったく観察されなかった。既知のプロトコルにしたがって、配列の5'端に5'-O-DMT-2'-デオキシ-5-ヨードウリジンを取り込んだ後、DNA合成を停止し、その後、菌頭条件下で、オリゴヌクレオチド支持体を処理する。その後、オリゴ合成を最後まで続ける。しかし、続けたオリゴヌクレオチド合成中、すべての官能基が、挿入後に存続可能であるわけではない。標準的ホスホロアミダイトのカップリング効率が、オンカラム誘導体化後、低下するリスクがあり、本発明者らもまた、以下に記載する実験において、これを観察した。いくつかの有機金属カップリングが合成後オリゴヌクレオチド修飾に適用されたという事実にも関わらず、配列中央に位置する、変換可能なヌクレオシド2'-デオキシ-5-ヨードウリジンに対する合成後菌頭型反応は、成功しないと報告された。その代わりに、本発明者らは、菌頭型反応において、オリゴ中央に取り込まれた後の（R）-1-O-（4-ヨードベンジル）グリセロールを用いてみた。これに関連して、末端三重結合（2-5）を伴ういくつかの芳香族構造を用いた（スキーム1）。

30

40

【0082】

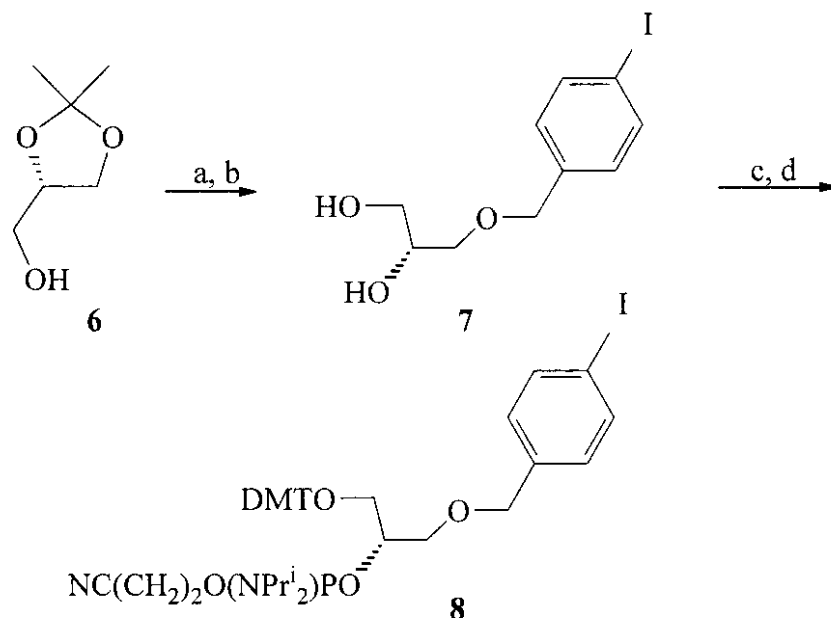
4-ヨードベンジルブロミドおよび（S）-（+）-2,2-ジメチル-1,3-ジオキソラン-4-メタノールから、4工程で、必要なホスホロアミダイト8を、全収率47%で合成した（スキーム2、実験詳細に関しては、補助情報を参照されたい）。標準的ヌクレオチドカップリング条件（2分間カップリング、活性化剤として4,5-ジシアノイミダゾール）および増加した脱保護時間（100秒間）を用いて、0.2 μmolスケールでのDNA合成中、化合物8のカップリング効率は、99%を超えると概算された。DNA合成後、4-ヨードフェニル部分を所持するDMTオン・オリゴヌクレオチドを伴う

50

C P G支持体を、1 m l シリンジ中、乾燥条件下、室温で、乾燥DMF／E t ₃ N（3．5／1．5、5 0 0 μ l）中、P d（P P h ₃）₄またはP d（P P h ₃）₂ C l ₂（7．5 m M）、末端アセチレンを所持する芳香族構造（2 2．5 m M）、およびC u I（7．5 m M）を含有する菌頭カップリング試薬混合物で処理した。グレーザー酸化二量体化を回避するため、カップリング反応前に、窒素の代わりにアルゴンで支持体およびシリンジをフラッシュすることが重要であった。菌頭反応混合物が、いくつかのカップリング反応の大部分として調製されるのではなく、各個々のオリゴに関して、プラスチックシリンジ内に直接調製された場合に、変換がより優れていることが見出された。カップリング反応（3～4時間）後、C P GをDMF（2 x 0．5 m l）およびC H ₃ C N（2 x 1 m l）でフラッシュし、そして乾燥させた。次いで、3 2 % N H ₄ O H（2時間）でC P G支持体からオリゴヌクレオチドを切断し、そして5 5 ° Cで脱保護した（一晚）。異なる親油性能により、C _{1 8} カラム上、半調製H P L Cによって、未反応オリゴマーおよびターゲットT I N Aを分離した。ピークが重複した場合（構造2）、より長いH P L Cプログラムを適用した（補助情報を参照されたい）。第一の分離後、D M Tオン・オリゴヌクレオチドを1 0 % A c O Hで処理し、H P L C上で再び精製し、そしてエタノールから沈殿させた。最終T F Oの純度は、イオン交換H P L Cによって判断した際、純粋なピリジン含有オリゴデオキシヌクレオチドに関しては9 0 %を超え、そしてプリンを持つオリゴデオキシヌクレオチドに関しては8 5～8 8 %であることが見出された。M A L D I－T O Fによって組成物を検証した。

【0083】

【化11】



スキーム2。ホスホロアミダイト8の合成。試薬および条件：

(a) 4-ヨードベンジルブロミド、KOH、トルエン；

(b) 8 0 % C F ₃ C O O H 水溶液、室温、2 工程に渡って1 0 0 %；

(c) D M T C I、ピリジン、室温、7 0 %；

(d) N C（C H ₂）₂ O P（N P r ⁱ）₂、ジイソプロピルアンモニウム・テトラゾリド、C H ₂ C l ₂、0 ° C～室温、一晚、6 7 %。

【0084】

菌頭カップリング中の変換は、アセチレンの反応性およびオリゴ配列に依存した。1－

10

20

30

40

50

エチニルピレンを用いたいくつかの実験から判断可能であるように、新鮮な反応混合物でもう一度処理するほうが、反応時間を長くする（4～16時間）より効率的であった。1-エチニルピレンの場合、触媒として、 $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ よりも $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ を用いる方が、難溶性グレーザー副産物がより少ない量で形成され、そしてより優れたオリゴ誘導体化が観察された。配列中にプリンが存在すると、単一の処理後のホモピリミジン配列（80～85%）に比較して、1-エチニルピレンを含有する菌頭カップリング反応混合物による、オリゴヌクレオチドを含む支持体の二重処理後であってさえ、ターゲットTINAへのより低い変換を生じた（50～60%）。試験したアセチレンの中で、最も反応性でない化合物であることが見出された4-エチニルビフェニルを用いると、プリン含有配列では、ターゲット・オリゴヌクレオチドがまったく得られなかったため、これはまた、他の芳香族アセチレンに関しても当てはまるようである。ON14の合成において、本発明者らは、1-エチニルピレンを含む菌頭反応混合物で完全オリゴヌクレオチドを処理すると、8の第二の挿入後にDNA合成を中断し、その後、菌頭反応を行い、そしてDNA合成を続けるよりも、より多くの純粋なオリゴマーが生じることを経験した。後者の場合、イオン交換HPLCによって判断すると、ピレンを所有する短いオリゴマーが最終TINAに混入した。

10

【0085】

ごく最近、ピロリジンの存在下、水中で PdCl_2 を用いた、銅不含菌頭カップリング反応が報告された。水との適合性、有酸素条件およびホモカップリング産物が微量であることがこの方法の非常に大きな利点である。本発明者らは、完全に脱保護されたON2に対して、類似の条件を適用した。しかし、ON2を、水／ピロリジン（1：1）中、1-エチニルナフタレンおよび PdCl_2 で、50℃または20℃で一晩処理した後、HPLC精製後、所望の核酸の痕跡はまったく観察されなかった。

20

【0086】

合成オリゴヌクレオチドを伴う三重鎖、DNA／DNAおよびDNA／RNA二重鎖の熱安定性を、熱変性実験によって評価した。融解曲線の一次導関数として決定した融点（ T_m 、℃）を表1～4に列挙する。二重鎖D1に対する平行三重鎖およびON15に対する平行dsDNAの両方における、pH依存性フーグスティーン型塩基対形成で、異なるTINAを所持する配列を研究した（表1）。ON16に対するワトソン・クリックDNA／DNA逆平行二重鎖に、同じ配列（ON1～14）を用いた。二重鎖の latter の種類に関して、TINAに関して先に記載したものと類似の混合ピリミジン／プリン配列もまた、ssDNAおよびssRNAとのハイブリダイゼーション用のTINAオリゴヌクレオチドに用いた（表4）。

30

【0087】

表1の T_m データからわかるように、pH6.0で、野生型複合体に比較して、配列中央に膨らみとして（R）-1-O-（4-ヨードフェニルメチル）グリセロールを持つON2で、フーグスティーン型三重鎖および二重鎖のかなりの不安定化が観察された（D1およびON15に対するON1）。アリール置換基でのヨウ素の置換は、より安定な三重鎖を生じた（D1に対するON3～ON6、pH6.0）。1-ピレニルエチニル置換基に関して、最高の T_m 値46.0℃が観察され、これは、野生型三重鎖に比較した際、 $\Delta T_m = 19.0$ ℃に対応する。pH7.2であっても、5の単一の取り込みは、高いシトシン含量（36%）にもかかわらず、三重鎖（ON6／D1）のかなりの安定化につながった。このpHでは、野生型三重鎖に関して、ハイブリダイゼーションは検出不能であった（図1）。pH6.0での平行二重鎖に関して、1-ナフタレニルエチニル（ON5）および1-ピレニルエチニル（ON6）で、それぞれ、修飾あたり、3.0℃および14.5℃の安定化が検出された。予期されるように、より低いpH（pH=5.0）では、平行二重鎖は、シトシンのプロトン付加のため、より安定であることが見出された。（R）-1-O-（フェニルメチル）グリセロール中のフェニル環の4位での、芳香族構造の付着は、フーグスティーン型らせんにおいてハイブリダイゼーション親和性増加を生じると結論付け可能であった。興味深いことに、ナフタレンおよびピレン環は、4-ビフェニ

40

50

ルおよびベンゼンよりもかなりより優れた安定化を生じた。これは、フーグスティーン型らせんにおいて優れた結合を達成するためには、小さい芳香族構造よりも、ピレンなど、広い表面を持つ芳香族構造が、(R)-1-O-(4-置換フェニルメチル)グリセロールへの付着に好ましいという考えを支持する。

【0088】

野生型 dsDNA (ON1/ON16、表1)と比較した際、研究した修飾オリゴデオキシヌクレオチドすべてに関して、インターカレーター5を5'端に配置した場合(ON10/ON16)を除いて、逆平行dsDNAの不安定化が観察された。後者の場合の安定化効果は、隣接する核酸塩基上の芳香族多環系のスタッキングに帰することが可能であり(ふたとしての効果)、一方、非環リンカーの効果は最低限であった。ハイブリダイゼーション親和性はまた、TINAの構造にも依存した。最も不安定化されていない二重鎖が、4および5で形成され、一方、dsDNAの不安定化は、配列中央の膨らみとして取り込まれた構造1~3でより大きかった。この段階ですでに、らせん内へ膨らみとして取り込まれたTINAは、フーグスティーン型らせんの安定性を改善し、そしてワトソン-クリック型二重鎖の安定性を改善しなかった。したがって、pH6.0で、より安定でない平行三重鎖(ON6/D1)中に膨らみとして(R)-1-O-[4-(1-ピレニルエチニル)フェニルメチル]グリセロールを単一挿入すると、三重鎖が、同じヌクレオチド内容のワトソン-クリック二重鎖(ON6/ON16)のレベルまで安定化された。異なるTINAの熱安定性から、本発明者らは、1-ピレニルエチニル含有TINAの特性をより詳しく調べることにした。

【0089】

TFOの異なる位に1-ピレニルエチニルを配置すると、フーグスティーンの三重鎖および二重鎖の熱安定性のある程度の変動が見られた。シトシンが、5'または3'側のいずれかに隣接している場合(ON7~ON9)、平行三重鎖および平行二重鎖はどちらも、pH6.0で、5が2つのチミジンの間に配置されている場合(ON6)より、より不安定化された。これは、 $C^+ \cdot G$ の陽性荷電対と芳香族構造の相互作用の結果でありうる。興味深いことに、pH7.2で、シトシンがプロトン付加されていない場合、1-ピレニルエチニルの単一の挿入を持つ試験したTFO(ON6~ON10)の中では、5'懸垂端で5を持つTFO(ON10)で、最低の三重鎖ハイブリダイゼーション親和性が検出された。ここではふた効果が存在しない点は驚くべきことであった。これは、生理学的条件下で、ターゲットdsDNAを伴うTFOのCリッチ領域が、一般的により低い安定性である結果でありうる。しかし、中性媒体中、Cリッチ領域の中央に5を配置する(ON9)ことによって、効率的なハイブリダイゼーション親和性が達成可能であることは、重要な観察である。インターカレーターが、陽性荷電トリプルの2つを分離しているため、生理学的pHで、インターカレーションが、三重鎖構造において、プロトン付加の可能性をより高くするであろうことが推測される。

【0090】

ON11~ON14を用いて、熱安定性に対するピレン・インターカレーター5の多数の膨らんだ挿入間の距離の依存性を調べた(表1)。重複三重鎖および二重鎖遷移の場合、373nmで、融解実験を行った。しかし、時には、373nmでは、それほどよく明示された遷移は観察されなかった。これらの場合、二重鎖のものに近い温度での、三重鎖のpH6.0での融解に関する仮定は、260nmで測定したpH7.2での融解との比較に基づいた。インターカレーター5を次に最も近い隣として挿入した場合(ON12)、フーグスティーン三重鎖および二重鎖は、pH6.0で、非修飾ON1に比較して安定化された。しかし、どちらの場合の安定性も、5の単一の挿入(ON6)より低く、そしてpH7.2では三重鎖形成はまったく観察されなかった。これは、互いに非常に近くに配置された、2つの膨らんだ(R)-1-O-メチルグリセロール・リンカーによって、二重らせんおよび三重らせんが大きく中断されたことによる可能性もある。5の2つの挿入が、2つまたは3つの核酸塩基によって離れている場合(それぞれ、ON13およびON14)、D1およびON15との複合体は、単一の挿入を持つものより安定であった。

pH 7.2では、三重鎖の T_m は、生理学的温度37℃よりさらに高かった（図1のON14/D1を参照されたい）。中央の5の二重挿入同様、挿入間に6塩基対を持ち、5'端での1つの挿入を持つ二重挿入（ON11）は、pH 6.0で、フーグスティーン型二重鎖および三重鎖をかなり安定化させた。フーグスティーンらせんと対照的に、5の二重挿入を持つ逆平行二重鎖（ON12～14/ON16）は、特に2つの挿入間に1つまたは3つの核酸塩基があった場合、野生型二重鎖ON1/ON16に比較して、減少した安定性を示した。pH 5.0で、5の二重挿入と平行および逆平行二重鎖の熱安定性を比較すると、フーグスティーン二重鎖ON11/ON15およびON14/ON15は、対応するワトソン・クリック二重鎖（ON11/ON16およびON14/ON16）よりさらになお安定であった。インターカレーターの付加に際しての平行三重鎖および平行二重鎖の安定化は、ベンゾピリドインドール（BPI）誘導体に関して、最初に報告された。不完全にマッチしたワトソン・クリックDNA二重鎖の、完全にマッチしたフーグスティーン対DNA二重鎖への再編成が、BPIをオリゴデオキシヌクレオチドの水溶液に添加した際に検出されている。5をオリゴデオキシヌクレオチド内に挿入した際、完全マッチ二重鎖を支持する、類似の効果が预期される。

【0091】

pH 5.0で、平行三重鎖の並外れた安定化が観察された。TFO中の高い含量のシトシンは、非修飾三重鎖の融解（ $T_m = 55.0^\circ\text{C}$ ）を二重鎖の融解近くにシフトさせた。しかし、この値は、pH 5.0での二重鎖融解よりなお低かった（ $T_m(\text{D1}) = 56.5^\circ\text{C}$ ）。TFO中の1-ナフタレニルエチニル誘導体4の単一の膨らんだ挿入は、三重鎖安定性をわずかに増加させた（ $\Delta T_m(\text{ON5/D1} - \text{ON1/D1}) = 2.0^\circ\text{C}$ ）。しかし、すべての場合で、5の膨らんだ挿入は、dsDNA（D1）の T_m よりも高い温度で、全複合体の解離につながった。260nmと同じ温度の373nmで、ON11の明らかな遷移状態が観察され、これは、三重鎖および二重鎖と一緒に融解することを裏付けた。TFO中の5の二重挿入に関する熱安定性の、pH 6.0と同じ依存性が、pH 5.0で観察された。したがって、次に最も近い隣としての5の二重挿入（ON12）ならびに中央および5端での5の挿入（ON11）は、それぞれ、最も安定化されない、および最も安定化された三重鎖であった。pH 5.0で、三重鎖ON14/D1は、それぞれ、対応する平行および逆平行二重鎖より、16.5℃および20.5℃、より安定であった。重要なことに、pH 7.2であっても、オリゴヌクレオチドON14は、対応するワトソン・クリックdsDNA（ $T_m = 38.0^\circ\text{C}$ 、ON14/ON16）よりも、より安定なフーグスティーン型三重鎖を形成する（ $T_m = 43.0^\circ\text{C}$ 、ON14/D1）。pH 7.2で、平行二重鎖（ON14/ON15）の融点は、この二重鎖がpH感受性であるため、pH 6.0で観察された38.0℃より低いと推定される。このデータは、3塩基離れて、配列中央に5の多数の挿入を持つオリゴヌクレオチドが、dsDNAおよびssDNAの間をよく区別する能力を明らかに立証する。

【0092】

配列の中央および5'端に、5の膨らんだ挿入を伴う、平行三重鎖および二重鎖に関して、ミスマッチに対する感受性を研究した（表2）。三重鎖の場合、ミスマッチに対する感受性は、インターカレーターの挿入部位に依存した。インターカレーターの3'部位で、プリン鎖中のアデニンをグアニンによって置換した場合、マッチおよびミスマッチ三重鎖の間の $\Delta T_m = 11.5^\circ\text{C}$ の最小の値が検出された（ON6/D3およびON11/D3、表2）。すべての他の場合で、 T_m の低下は、14.0～22.0℃の範囲内であった。5の単一挿入を持つミスマッチ平行二重鎖は、8.0～13.0℃の範囲内で不安定化され、これはミスマッチ野生型平行二重鎖と同じ範囲内であった。比較のため、最も感受性でないミスマッチ非修飾二重鎖は、pH 6.0で、9℃の ΔT_m を示した（ $T_m(\text{ON1/ON15}) - T_m(\text{ON1/ON18})$ ）。

【0093】

本発明者らは、三重鎖を形成し、そして二重鎖に対するミスマッチを区別するのに最も有効なTINAである、(R)-1-O-[4-(1-ピレニルエチニル)フェニルメチ

10

20

30

40

50

ル] グリセロール (5) を所持する T F O の発光特性を研究した。オリゴヌクレオチド内に 5 を導入すると、特徴的な単量体蛍光スペクトルが生じ、373 nm での励起に際して、400 および 421 nm で最大であり (図 2、黒い曲線)、これは、DNA 内に挿入された 4-[4-(1-ピレニルエチニル)フェニル]-1,3-ブタンジオールに関して先に公表されたデータと同様であった^[18]。すべての場合で、三重鎖または二重鎖の形成に際して、単量体蛍光の 4 nm のシフトが検出された。完全マッチ三重鎖の形成は、一本鎖 ON 6 に比較して、およそ 1.5 倍増加した単量体蛍光につながった (図 2、ON 6/D 1)。不完全マッチ三重鎖に関しては、蛍光強度は、dsDNA の配列に依存した。したがって、ON 6 に比較して、TA 反転部位 (ON 6/D 2) に関して、ほぼ 2 倍の増加が検出された。対照的に、dsDNA において、シトシンまたはグアニン塩基が、T F O に対して、5 の挿入近くでミスマッチである場合 (D 3 および D 4)、完全にマッチした三重鎖と比較して、単量体蛍光の減少が見られた (図 2)。特に、グアニンが大きな影響を生じ、ミスマッチ三重鎖 ON 6/D 3 に関しては、2 倍低い蛍光強度であった。

【0094】

興味深いことに、逆平行二重鎖 (ON 6/ON 16、図 4) の形成に際して、単量体蛍光におけるかなりの増加が検出され、一方、平行二重鎖 (ON 6/ON 15) の形成は、一本鎖蛍光と比較した際、わずかに増加した蛍光を生じたのみであった (図 4)。第二の 4-(1-ピレニルエチニル)フェニル残基が、ON 12 において、次に最も近い隣として現れた場合、一本鎖の単量体蛍光は、およそ 3 倍減少し (図 4、ON 6 および ON 12 の比較)、そして 500 nm で最大であり、そして単量体強度のものの半分の強度である、エキシマー蛍光が観察可能であった (図 3)。マッチした三重鎖中の同じオリゴに関して、単量体蛍光のかなりの減少およびエキシマーバンドの消失が観察された (図 3、ON 12/D 1)。これは、ピレン部分が、三重らせんの環境において、dsDNA に結合した際、互いに連絡不能であることを意味する。同様に、ON 12 が、ON 15 とフーグスティーン対形成 dsDNA を形成した際、エキシマーバンドが消失した (図 3)。対照的に、一本鎖 ON 12 の蛍光強度と比較した際、逆平行二重鎖 (ON 12/ON 16) に関して、非常に高い単量体蛍光強度およびエキシマー蛍光増加が観察された (図 4)。これは、同じ鎖中の 2 つのピレニルが、ワトソン・クリック dsDNA の形成後、なお互いに緊密に接触したままであることを示すが、これはフーグスティーン型 dsDNA には当てはまらないようである。この方式で、ワトソン・クリックおよびフーグスティーン型らせんに対する TINA の異なる特性は、ハイブリダイゼーションおよび蛍光特性の両方によって、反映された。さらに、ピリミジン・リッチ鎖中の、次に最も近い膨らんだ隣としての、(R)-1-O-[4-(1-ピレニルエチニル)フェニルメチル]グリセロール (5) の蛍光データを以下のように要約してもよい：一本鎖 ON 12：400 および 421 nm で中程度の単量体蛍光ならびに 500 nm でのエキシマーバンド；平行三重鎖 ON 12/D 1：低い単量体蛍光およびエキシマーバンドなし；平行二重鎖 ON 12/ON 15：中程度の単量体蛍光およびエキシマーバンドなし；逆平行二重鎖 ON 12/ON 16：高い単量体蛍光およびエキシマーバンド。

【0095】

構造 5 が、三重鎖のワトソン・クリック二重鎖部分内への取り込みに際して、平行三重らせんの安定性に影響を及ぼす能力を表 3 に示す。三重鎖は、非修飾三重鎖 (ON 1/D 1) に比較した際、5 が二重鎖のピリミジン鎖中の膨らみとして挿入されたすべての場合 (D 5 に対する ON 1、ON 6 および ON 9) で安定化された。373 nm [5 の λ_{max}] での熱変性実験において、三重鎖 ON 1/D 1 に関して、2 つの遷移状態 ($T_m = 36.5^\circ\text{C}$ および 55.5°C) が検出され、これはそれぞれ、三重鎖および二重鎖融解に対応した。373 nm 吸光度による融解の検出は、インターカレーターが、二重鎖および三重鎖形成の両方に関与することを示した。互いに反対のワトソン・クリックおよびフーグスティーン・ピリミジン鎖の両方の中の膨らみとして 5 を挿入しても (ON 6/D 5)、三重鎖の二重鎖部分のみにインターカレーターを持つ三重鎖 (ON 1/D 5) と比較した際、三重鎖の融解を変化させなかった。2 つのピレン部分 5 を、ピリミジン鎖の各々に 1

10

20

30

40

50

つずつ、3塩基対離れた膨らみとして配置した場合（ON 9 / D 5）、三重鎖融解は、二重鎖遷移状態に非常に近く、これはまた、T F O内への5の二重取り込みに関しても、上で観察された。非修飾複合体に比較して、減少した三重鎖および平行二重鎖安定性が、膨らみとして、プリン鎖に化合物5を挿入した際に観察された（D 6に対するおよびON 2 1に対するON 1）。

【0096】

本発明者らはまた、I N Aに関して記載したのと同じ配列および条件を用いて、ワトソン・クリック型二重鎖中のs s DNAおよびs s RNAの混合プリン／ピリミジン配列に対する、5を所持するT I N Aのハイブリダイゼーション親和性も研究した（表4）。野生型二重鎖に比較した際、配列中央の膨らみとしての5に関して、T I N A / DNA（ $-8.0^{\circ}\text{C} \sim -15.5^{\circ}\text{C}$ の範囲内の ΔT_m ）およびT I N A / RNA（ $T_m = -10.0^{\circ}\text{C}$ ）のかなりの不安定化が観察された。次に最も近い隣として第二のインターカレーター5をDNA内に挿入すると（ON 2 4）、二重鎖のさらなる不安定化につながった（ON 2 4 / ON 2 5およびON 2 4 / ON 2 7）。複合体ON 2 3 / ON 2 6として、2つの相補的混合プリン・ピリミジン鎖内に、互いに反対に5を取り込むと、 36.0°C の T_m 値を生じ、これはT I N A / DNA二重鎖（ON 2 3 / ON 2 5およびON 2 2 / ON 2 6）と同じ度合いのレベルであった。しかし、I N AをI N A / I N A二重鎖の同じ位置に挿入すると、これらは、I N A / DNA（ $T_m = 51.5^{\circ}\text{C}$ ）より不安定であった（ $T_m = 43.6^{\circ}\text{C}$ ）。

【0097】

二重鎖単独としてそして三重鎖の一部としてのワトソン・クリックdsDNA中の4-（1-ピレニルエチニル）フェニル部分を持つ複合体の蛍光特性を図4～6に示す。単量体蛍光は、ピリミジン鎖内への挿入（s s ON 6、図5）に比較して、プリン鎖内に5を挿入した場合（s s ON 2 1）に、かなり増加した。非修飾DNAおよびs s ON 2 1を用いて三重鎖および二重鎖を組み立てた際、わずかに減少した蛍光強度が見られた（データ未提示）。逆平行二重鎖の形成に際しての、ホモピリミジン配列中の4-（1-ピレニルエチニル）フェニル部分の単量体蛍光の強い感度が、混合配列（ON 2 3 / ON 2 5、ON 2 3 / ON 2 7、図6）で完全に消失することは驚くべき発見であった。これはまた、同じ配列を用いた、（R）-1-O-（1-ピレニルメチル）グリセロールの膨らんだ挿入に関して報告された先の結果とも異なる。

【0098】

2つのプレニル・インターカレーター5が1塩基対離れている場合、s s ON 2 4に関して観察されるエキシマーバンド（図6）は、逆平行二重鎖（ON 2 4 / ON 2 5およびON 2 4 / ON 2 7、図6）の形成に際して消失しなかった。この観察は、T I N Aを含む平行三重鎖および平行二重鎖での上記観察とは対照的であり、そしてまた、I N Aに関して先に得られた結果とも反対であった^[9b]。次に最も近い隣としての膨らんだ5を含む、ホモピリミジンおよび混合ピリミジン／プリン鎖両方における逆平行二重鎖（それぞれ、ON 1 2 / ON 1 6およびON 2 4 / ON 2 5）の形成に際してのエキシマーバンドの存在は、2つのピレニル残基が、非常に近くに配置され、そして互いに連絡して、そして隣のワトソン・クリック塩基対とのスタッキング相互作用内に完全には包埋されなかったことを示す。これはまた、膨らみとしての5の取り込みに際しての、逆平行二重鎖安定性の減少も説明しうる。

【0099】

次いで、本発明者らは、それらの相補鎖各々において、2つまたは3つの色素が、互いに反対に配置された場合、二重鎖および三重鎖に関して、エキシマー結合が形成可能であるかどうかを検査した。平行二重鎖ON 2 1 / ON 6（図5）または逆平行二重鎖ON 2 0 / ON 2 1（図5）およびON 2 3 / ON 2 6（図6）いずれでも、エキシマーバンドはまったく観察されなかった。この結果は、4-〔4-（1-ピレニルエチニル）フェニル〕-1, 3-ブタンジオールを、混合配列を持つ逆平行dsDNAの相補鎖中に、互いに反対に配置した場合に示された研究と関連した。3つの4-（1-ピレニルエチニル）

フェニル部分を3つの鎖すべてにおいて、互いに反対に配置した場合にのみ、500nmで弱いエキシマーバンドが検出された(ON6/D7、図5)。結論は、平行および逆平行二重鎖および平行三重鎖の異なる鎖中に配置された4-(1-ピレニルエチニル)フェニル部分の連絡が妨げられ、これが、INAで見られるものとは対照的に、エキシマー形成を伴うインターカレーターのジッピングの可能性を低くするというものである。したがって、二重鎖の互いに反対に位置するINAの2つのピレン部分のジッピングが、NMR構造で観察されており、そしてこの二重鎖構造は、343nmでの励起に際して、定常状態蛍光スペクトル中の480nmでのエキシマーバンドの形成につながった(未公表データ)。

【0100】

ワトソン・クリック型二重鎖中の2つの異なるピレン・インターカレーティング核酸INAおよびTINAの蛍光スペクトルおよびハイブリダイゼーション特性の相違は、(R)-1-O-(1-ピレニルメチル)グリセロール(INA)の芳香族部分に、過剰な1-フェニルエチニル部分を付加した結果を明らかに例示する。フーグスティーン型三重鎖中にピレンを適切に配置することに成功したため、この研究によって、本発明者らはまた、三重鎖へのピレンの弱い親和性に共通する意味が、一般的な特徴でないことも示した。インターカレーターが平行三重鎖構造を安定化させる能力があるが、dsDNAの安定性にはわずかにしか影響がないことが知られる。したがって、2-(2-ナフチル)キノリン-4-アミンおよびその類似体の付加は、三重鎖DNAのかなりの安定化につながり[2-(2-ナフチル)キノリン-4-アミンでは、 $\Delta T_m = 35.6^\circ\text{C}$]、二重鎖DNAのハイブリダイゼーション親和性はわずかにしか増加させない($\Delta T_m = 5.5^\circ\text{C}$)。同様の研究によって、2'-デオキシリボース残基のアノマー位に、直接またはプロピルリンカーを介してのいずれかでカップリングしたペリレンを含むオリゴデオキシヌクレオチドの合成およびハイブリダイゼーション特性が報告された。単量体性三重鎖特異的インターカレーターに勝る、多環部分を含むTINAの1つの利点は、溶液中の過剰なインターカレーターを用いるのではなく、配列の所望の位置に、TINAを数回挿入可能であることである。さらに、TINAに関して本明細書に記載するように、逆平行二重鎖の不安定化を伴う、平行三重鎖および二重鎖の高い安定化は、オリゴデオキシヌクレオチドに共有結合した、他のインターカレーティング系では、これまでに観察されてこなかった。これに関連して、オリゴデオキシヌクレオチド内に、多数の膨らみ挿入として取り込まれたTINAは、ssDNAとdsDNAを区別する能力を持つユニークな分子である。この特徴は、pH6.0およびpH5.0で三重鎖および逆平行二重鎖安定性を比較した際に、ON13およびON14で、明らかに見られる(表1)。これは、平行三重鎖形成を検出しようとする際、二重鎖形成から生じる偽陽性の数を減少させる可能性を広げる。これは、例えば、非変性条件下のゲノムに対する蛍光in situハイブリダイゼーション(FISH)に、そしてpH6.0またはpH5.0で実行可能な三重らせんアフィニティークロマトグラフィーまたは三重らせんアフィニティー沈降を用いたプラスミドDNAの精製に、当てはまりうる。二重鎖形成と平行三重鎖形成のこの種の区別は、逆平行二重鎖を安定化させることがやはり知られるPNA、LNAまたはN3'->P5'ホスホロアミダイトのような三重鎖形成オリゴでは達成不能である。

【0101】

(R)-1-O-(4-ヨードフェニル)メチルグリセロールを所持するオリゴヌクレオチドの菌頭型合成後修飾を用いて、本発明者らは、フーグスティーン対形成二重鎖および三重鎖の熱安定性を増加させる能力に関して、いくつかのねじれたインターカレーティング核酸(TINA)をスクリーニングした。オリゴデオキシヌクレオチド中の膨らみとしての(R)-1-O-[4-(1-ピレニルエチニル)フェニルメチル]グリセロール(5)の挿入は、マッチおよびミスマッチ配列間を区別する優れた特性を持つ、最も有効なTINAであることが見出された。ワトソン・クリック型DNA/DNAおよびDNA/RNA二重鎖は、天然二重鎖に比較して、配列中央のTINAの挿入に際して不安定化された。本発明者らは、TINAが、フーグスティーン型塩基対形成に対する親和性増加

10

20

30

40

50

およびワトソン-クリック型らせんに対する親和性減少を示す、オリゴデオキシヌクレオチドに共有結合した膨らみとしての、最初のインターカレーティング系であると考えている。ホスホロアミダイト 8 への短い合成経路およびオリゴヌクレオチドの合成後菌頭修飾は、他の三重鎖安定化核酸に勝る、T I N A の優位な利点である。1 つの鎖における T I N A (5) の二重挿入の研究から、2 つの膨らんだ (R) - 1 - O - [4 - (1 - ピレニルエチニル) フェニルメチル] グリセロール間の 3 つの核酸塩基の配置は、フーグスティーヌ DNA らせんの高い熱安定性に関して、最適でありうると結論付け可能である。一方、ピリミジン DNA 配列中の次に最も近い膨らんだ隣としての 5 の挿入に際しての異なる発光特性 (エキシマーバンド形成) を、平行三重鎖、平行 d s DNA および逆平行 d s DNA の形成の検出に用いてもよい。5 の単一の膨らんだ挿入を持つ T I N A に関して、12 ~ 19 °C の範囲内での熱安定性増加を適用して、T F O の必要な長さを減少させてもよい。さらに、配列中にいくつかのシトシンが存在している場合であっても (本研究では最高 36 %)、p H 7 . 0 で、フーグスティーヌ型二重鎖および三重鎖の優れた熱安定性を得ることも可能である。5 の多数の挿入を用いて、より安定でないフーグスティーヌ二重鎖の融点を、適切な条件下 (配列、p H、塩濃度等) で、同じ長さのワトソン-クリック二重鎖のレベルまで増加させてもよい。別の鎖形成の三重鎖とともに、d s DNA 中の C - G および T - A 反転部位に関して高い親和性を持つ修飾核酸塩基の開発を考慮して、本発明者らは、三重鎖形成のこうした改善が、T I N A の適用可能性を拡大すると考えている。環状オリゴデオキシヌクレオチドのピリミジン鎖内への 5 の挿入に際して、三重鎖を安定化させる能力、またはターゲット s s DNA および s s RNA に対するクランプもまた、明らかな可能性である。次の段階として、古典的ワトソン-クリックおよびフーグスティーヌ複合体と異なる核酸らせんの安定性に対する T I N A および I N A の挿入の影響の研究に取り組んだ。このように、逆フーグスティーヌ塩基対形成、i モチーフ (C - C⁺ 塩基対) または四重鎖 (G リッチ配列) を安定化可能な核酸類似体は、なお限られた入手可能性でしかない。本発明者らは、ワトソン-クリック型核酸らせんとフーグスティーヌとの区別とともに、T I N A が平行三重鎖および二重鎖を安定化させる能力は、特異的認識、高い熱安定性および自己編成または再編成が不可欠である、バイオテクノロジーおよびナノテクノロジーにおける、DNA に基づくツールの設計において、T I N A を非常に有用なものとしうると考えている。

【 0 1 0 2 】

10

20

30

【表 1】

表 1 : UV 融解曲線 ($\lambda = 260 \text{ nm}$) から得た、三重鎖および二重鎖融解に関する T_m [$^{\circ}\text{C}$] データ

番号	三重鎖 ^a			平行二重鎖 ^b			逆平行二重鎖 ^c		
	3'-CTGCCCCCTTTCCTTTT	5'-GACGGGGGAAAGAAAAA (D1)	3'-CTGCCCCCTTTCCTTTT	5'-GACGGGGGAAAGAAAAA (ON15)	3'-GACGGGGGAAAGAAAAA (ON16)	5'-GACGGGGGAAAGAAAAA (ON15)	3'-GACGGGGGAAAGAAAAA (ON16)	5'-GACGGGGGAAAGAAAAA (ON15)	3'-GACGGGGGAAAGAAAAA (ON16)
	pH 5.0	pH 6.0	pH 7.2	pH 5.0	pH 6.0	pH 5.0	pH 6.0	pH 5.0	pH 6.0
ON1	55.0 ^e	27.0	<5.0	29.5	19	47.0	48.0	47.0	47.0
ON2	-/	15.0	<5.0	-/	<5.0	-/	40.5	-/	-/
ON3 ^f	-/	26.0	<5.0	-/	<5.0	-/	42.0	-/	-/
ON4 ^g	-/	26.0	<5.0	-/	17.0	-/	40.0	-/	-/
ON5 ^f	57.0	35.0	13.5	33.5	22.0	44.5	45.0	46.0	46.0
ON6 ^{f,g}	59.0 ^e	46.0	28.0	42.0	33.5	44.0	46.5	45.5	45.5
ON7 ^f	-/	39.5	21.5	-/	30.0	-/	44.5	-/	-/
ON8 ^f	-/	42.5	26.0	-/	28.0	-/	45.0	-/	-/
ON9 ^g	-/	41.0	24.0	-/	31.5	-/	45.5	-/	-/
ON10 ^f	61.0	44.5	20.5	46.0	36.0	49.5	53.0	52.0	52.0
ON11 ^g	65.5 ^e	57.0 ^d	35.5	53.5	45.5	46.5	47.0	46.5	46.5
ON12 ^k	55.5 ^e	40.0	<5.0	37.0	26.5	37.5	41.0	41.0	41.0
ON13 ^k	59.5 ^e	56.5 ^e	40.0	41.0	38.0	44.5	45.0	42.0	42.0
ON14 ^k	63.0 ^e	56.5 ^e	43.0	45.5	38.0	42.5	41.0	38.0	38.0

[a] $c = 20 \text{ mM}$ カコジル酸ナトリウム、 100 mM NaCl 、 10 mM MgCl_2 、 $\text{pH} 6.0$ および 7.2 中の $1.5 \mu\text{M}$ の ON1~14 および各鎖 $1.0 \mu\text{M}$ の dsDNA (D1)；二重鎖 $T_m = 56.5$ ($\text{pH} 5.0$)、 58.5°C ($\text{pH} 6.0$) および 57.0°C ($\text{pH} 7.2$)；[b] $c = 20 \text{ mM}$ カコジル酸ナトリウム、 100 mM NaCl 、 10 mM MgCl_2 、 $\text{pH} 6.0$ または $\text{pH} 5.0$ 中の各鎖 $1.0 \mu\text{M}$ ；[c] $c = 20 \text{ mM}$ カコジル酸ナトリウム、 100 mM NaCl 、 10 mM MgCl_2 、 $\text{pH} 6.0$ または $\text{pH} 5.0$ 中の各鎖 $1.0 \mu\text{M}$ ；[d] 第三の鎖および二重鎖融解重ね合わせ。 373 nm で $T_m = 54.5^\circ\text{C}$ の遷移状態を決定した；[e] 第三の鎖および二重鎖融解重ね合わせ；[f] 菌頭反応混合物によって調製： $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ (7.5 mM)、対応するアセチレン (22.5 mM)、 CuI (7.5 mM)、乾燥 $\text{DMF}/\text{Et}_3\text{N}$ ($3.5/1.5$ 、 $500 \mu\text{l}$)、3 時間；[g] 菌頭反応混合物によって調製： $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (7.5 mM)、対応するアセチレン (22.5 mM)、 CuI (7.5 mM)、乾燥 $\text{DMF}/\text{Et}_3\text{N}$ ($3.5/1.5$ 、 $500 \mu\text{l}$) 3 時間；[k] 菌頭反応混合物での二重処理によって調製： $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (7.5 mM)、1-エチニルピレン (22.5 mM)、 CuI (7.5 mM)、乾燥 $\text{DMF}/\text{Et}_3\text{N}$ ($3.5/1.5$ 、 $500 \mu\text{l}$)、3 時間；[l] 未測定。

【0104】

表2：UV融解曲線（λ＝260nm）、pH6.0から得た、ミスマッチ平行三重鎖^[a]および平行二重鎖^[b]融解に関するT_m [°C] データ。

配列		D1:	D2:	D3:	D4:
3'-CTGCCCCCTTTCCTTTTT					
5'-GACGGGGAAYGAAAAA		X·Y= T·A	X·Y= A·T	C·G	G·C
ON1	5'-CCCCCTTTCCTTTTT	27.0	<5.0	<5.0	<5.0
ON6	5'-CCCCCTT5TCCTTTTT	46.0	27.0	34.5	28.5
ON8	5'-CCCCCTT5CTTTTT	42.5	28.5	26.5	26.5
ON10	5'-5CCCCCTTTCCTTTTT	44.5	22.5	27.0	28.0
ON11	5'-5CCCCCTT5TCCTTTTT	57.0	40.5	45.5	42.0
5'-GACGGGGAAYGAAAAA		ON15	ON17	ON18	ON19
		Y=A	T	G	C
ON1	5'-CCCCCTTTCCTTTTT	19.0	<5.0	10.0	<5.0
ON6	5'-CCCCCTT5TCCTTTTT	33.5	21.5	20.5	20.5
ON8	5'-CCCCCTT5CTTTTT	28.0	20.0	18.5	20.0

[a] c＝20mMカコジル酸ナトリウム、100mM NaCl、10mM MgCl₂、pH6.0中の1.5μMのON1～14および各鎖1.0μMのdsDNA；
[b] c＝1.0μMのON1～14および1.0μMのプリン鎖。

表 3：UV融解曲線（λ＝260nm）、pH6.0から得た、ワトソン・クリック二重鎖の配列中の5の挿入に関する、平行三重融解^{〔a〕}に関するT_m〔℃〕データ。プリン・ストレッチ中の5の挿入を含む平行二重鎖^{〔b〕}に関するもまた、融解を提供する。

【表 3】

配列	三重鎖			平行二重鎖		
	D1	D5:	D6:	D7:	ON15	ON21
ON1	5'-CCCCCTTCTTTTT	3'-CTGCCCCCTT5TCTTTTT (ON20) ^{〔c〕}	3'-CTGCCCCCTTCTTTTT 5'-GACGGGGAA5AGAAAAA (ON21) ^{〔d〕}	ON20/ON 21		
ON6	5'-CCCCCTT5TCTTTTT	38.0	24.0	27.0	19.0	14.0
ON9	5'-CCC5CTTCTTTTT	46.0	27.5	31.5	33.5	26.5
		41.0	52.5 ^{〔d〕}	43.5	31.5	29.0

〔a〕 c＝20mMカコジル酸ナトリウム、100mM NaCl、10mM MgCl₂、pH6.0中の1.5μMのON1、ON6、ON9および各鎖1.0μMのdsDNA、二重鎖T_m＝55.0℃(D5)、56.0℃(D6)、57.0℃(D7)；〔b〕 c＝20mMカコジル酸ナトリウム、100mM NaCl、10mM MgCl₂、pH6.0中の1.0μMのON1、ON6、ON9、ON15およびON21；〔c〕 菌頭反応混合物によって調製：Pd(PPh₃)₄(7.5mM)、1-エチルピレン(22.5mM)、CuI(7.5mM)、乾燥DMF/Et₃N(3.5/1.5、500μl)、3時間；〔d〕 菌頭反応混合物での二重処理によって調製：Pd(PPh₃)₄(7.5mM)、1-エチルピレン(22.5mM)、CuI(7.5mM)、乾燥DMF/Et₃N(3.5/1.5、500μl)、3時間；〔d〕 第三の鎖および二重鎖融解重ね合わせ。

【表 4】

表 4：UV融解曲線（λ＝260 nm）から得た、逆平行二重鎖^[a]融解に関するT_m [°C] データ。

番号	ON25	ON26 ^[b]	ON27
	DNA	DNA	RNA
	5'-AGCTTGCTTGAG	5'-AGCTTG5CTTGAG	5'-AGCUUGCUUGAG
ON22	3'-TCGAACGAACTC	32.0	40.5
ON23 ^[b]	3'-TCGAAC5GAACTC	36.0	30.5
ON24 ^[c]	3'-TCGAAC5G5AACTC	22.5	25.0

[a] c＝140mM NaCl、10mMリン酸ナトリウム緩衝液、1mM EDTA、pH7.0中の1.0μMの各オリゴヌクレオチド；[b] 菌頭反応混合物：Pd（PPH₃）₄（7.5mM）、1-エチニルピレン（22.5mM）、CuI（7.5mM）、乾燥DMF/Et₃N（3.5/1.5、500μl）、3時間；[c] 菌頭反応混合物での二重処理：Pd（PPH₃）₄（7.5mM）、1-エチニルピレン（22.5mM）、CuI（7.5mM）、乾燥DMF/Et₃N（3.5/1.5、500μl）、3時間。

【0107】

¹Hの300MHzおよび¹³Cの75MHzで、Varian Gemini 20 50

00分光計上でNMRスペクトルを記録した。 ^1H NMRスペクトルで用いた内部標準は、 CDCl_3 でTMS (δ : 0.00); ^{13}C NMRは CDCl_3 (δ : 77.0)であった。4.7テスラUltimaフーリエ変換(FT)質量分析計(Ion Spec、カリフォルニア州アービン)を用いて、正確なイオン質量測定を行った。2, 5-ジヒドロキシ安息香酸マトリックスから得たイオンを用いて、 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ イオンピークをマッチさせた。Merckから購入したTLCプレート60F₂₅₄を用いて、薄層クロマトグラフィー(TLC)分析を行い、そしてUV光(254nm)中で視覚化した。カラムクロマトグラフィーで用いたシリカゲル(0.040~0.063mm)は、Merckから購入した。カラムクロマトグラフィーで用いる溶媒を使用前に蒸留し、一方、試薬は購入したまま用いた。

10

【実施例2】

【0108】

(S)-1-(4,4'-ジメトキシトリフェニルメチルオキシ)-3-(4-ヨードベンジルオキシ)プロパン-2-オール

(S)-(+)-2,2-ジメチル-1,3-ジオキソラン-4-メタノール(6.17g、8.9mmol)および4-ヨードベンジルブロミド(2.5g、8.4mmol)をKOH(8.8g、154.0mmol)の存在下、トルエン(80ml)中で、ディーン-スターク条件下で12時間還流した。反応混合物を冷却させ、そして H_2O (30ml)を添加した。相分離後、水層をトルエン(2x15ml)で洗浄した。合わせた有機層を H_2O (30ml)で洗浄し、そして真空中で濃縮した。残渣を80%水性AcOH(25ml)で、室温で48時間処理した。溶媒を真空中で除去し、そして残渣をトルエン/EtOH(30ml、5:1、v/v)で2回、共蒸発させた。残渣を減圧下で乾燥させて、黄色の油として(R)-3-(4-ヨードベンジルオキシ)プロパン-1,2-ジオール(7.100%、2.3g)を得て、これをさらに精製せずに次の工程に用いた。

20

【0109】

この油(2.3g、8.4mmol)を無水ピリジン(25ml)中で溶解し、そして4,4'-ジメトキシトリチルクロリド(3.5g、10.4mmol)を窒素下で添加した。24時間後、MeOH(2ml)を、その後、EtOAc(150ml)を添加して、そして混合物を標準水溶液 NaHCO_3 (40ml x 2)で抽出した。水相をEtOAc(20ml x 2)で抽出した。合わせた有機層を乾燥させ(Na_2SO_4)、ろ過し、そして減圧下で蒸発させた。残渣をトルエン/EtOH(25ml、1:1、v/v)で2回、共蒸発させた。残渣をEtOAc(30ml)からシリカゲル(1.5g)上に吸着させ、そして石油エーテル中のEtOAc(0~30%、v/v)とともに乾燥カラム真空クロマトグラフィーを用いて精製して、黄色の泡としての化合物(S)-1-(4,4'-ジメトキシトリフェニルメチルオキシ)-3-(4-ヨードベンジルオキシ)プロパン-2-オール(70%、3.6g)を得た。 ^1H NMR(CDCl_3) δ 2.42 (br. s., 1H, OH), 3.20 (m, 2H, $\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OCH}_2$), 3.56 (m, 2H, CH_2ODMT), 3.78 (s, 6H, 2xOCH₃), 3.97 (m, 1H, CHOH), 4.43 (s, 2H, CH_2Ar), 6.78 (d, 4H, $J=8.5\text{Hz}$, DMT), 7.00 (d, 2H, $J=8.0\text{Hz}$, ヨードフェニル), 7.30-7.45 (m, 9H, DMT), 7.63 (d, 2H, $J=8.0\text{Hz}$, ヨードフェニル); ^{13}C NMR(CDCl_3) 55.2 (OCH₃), 62.2 (CH_2ODMT), 69.9 ($\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OCH}_2$), 71.6 (CHOH), 72.6 (H_2 -ヨードフェニル), 86.1 [$\text{C}(\text{Ar})_3$], 93.1, 129.4, 137.4, 137.7 (ヨードフェニル), 113.1, 126.7, 127.8, 128.1, 130.0, 135.9, 144.7, 158.5 (DMT)。HR-MALDI-MS、 $\text{C}_{31}\text{H}_{31}\text{IO}_5\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 、計算値m/z 633.1108、測定値m/z 633.1116。

30

40

50

【実施例 3】

【0110】

(S)-2-O-[2-シアノエトキシ(ジイソプロピルアミノ)ホスフィノ]-1-O-(4,4'-ジメトキシトリフェニルメチル)-3-O-(4-ヨードベンジル)グリセロール(スキーム2の化合物8)の調製。

【0111】

(S)-1-(4,4'-ジメトキシトリフェニルメチルオキシ)-3-(4-ヨードベンジルオキシ)プロパン-2-オール(2.0g、3.3mmol)を、窒素下で、無水CH₂Cl₂(50ml)に溶解した。氷水槽で外部から冷却しながら、N,N-ジイソプロピルアンモニウムテトラゾリド(0.850g、5.0mmol)を添加し、その後、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(1.1g、3.7mmol)を1滴ずつ添加した。16時間後、分析TLCは、もはや出発物質を示さず、そして反応をH₂O(30ml)で停止した。層を分離し、そして有機相をH₂O(30ml)で洗浄した。合わせた水層をCH₂Cl₂(25ml)で洗浄した。有機相を乾燥させ(Na₂SO₄)、ろ過し、シリカゲル(1.5g)およびピリジン(0.5ml)を添加し、そして減圧下で溶媒を除去した。NEt₃(0.5%、v/v)/EtOAc(0~25%)/石油エーテルとともにシリカゲル乾燥カラム真空クロマトグラフィーを用いて、残渣を精製した。合わせたUV活性分画を真空中で蒸発させて、泡としての最終化合物8(1.8g、67%)を得て、これをODN合成に用いた。³²P NMR(CDCl₃) δ 149.8, 149.9, 1:1の比。HR-ESI-MS、C₄₀H₄₆IO₆N₂PLi[M+Li]⁺、計算値m/z 817.2449、測定値m/z 817.2447。

【実施例 4】

【0112】

(R)-1-O-(4,4'-ジメトキシトリフェニルメチル)-3-O-[4-(1-ピレニルエチニル)フェニルメチル]グリセロールの調製。

DMF(40ml)中の(R)-3-(4-ヨードベンジルオキシ)プロパン-1,2-ジオール(4.2mmol)の溶液に、Et₃N(5.8ml)を添加して、そしてArを溶液中に30分間バブリングした。その後、Ar下で、1-エチニルピレン(1.05g、4.65mmol)を溶解し、そしてCuI(56mg、0.3mmol)およびPd(PPh₃)₄(125mg、0.11mmol)を溶液に添加した。反応混合物を、Ar下、室温で一晩攪拌し、その後、CH₂Cl₂(150ml)を添加し、そしてEDTAのアンモニウム塩の0.3M水溶液(2x75ml)で抽出した。有機層をH₂O(3x75ml)で洗浄し、乾燥させ(Na₂SO₄)、ろ過し、そして真空中で乾燥するまで蒸発させた。残渣をトルエン/EtOH(30ml、1:1、v/v)で2回、共蒸発させ、油として1-O-[4-(1-ピレニルエチニル)フェニルメチル]グリセロール(3.1g)を得た。該油をピリジン(20ml)で共蒸発させ、そして次いで、無水ピリジン(50ml)に溶解し、氷水槽によって冷却し、そして4,4'-ジメトキシトリチルクロリド(1.45g、4.41mmol)をAr下で添加した。反応混合物を室温で16時間攪拌し、そして次いで、過剰な部分の4,4'-ジメトキシトリチルクロリド(0.5g、1.5mmol)を添加した。24時間後、TLCは、もはや出発物質を示さず、そしてMeOH(2ml)によって反応混合物を停止し、そしてEtOAc(150ml)によって希釈し、そして標準水溶液NaHCO₃(100ml x 2)で抽出した。水相をEtOAc(50ml x 2)で抽出した。合わせた有機層を乾燥させ(Na₂SO₄)、ろ過し、そして減圧下で蒸発させた。残渣をトルエン/EtOH(25ml、1:1、v/v)で2回、共蒸発させた。残渣をEtOAc(50ml)からシリカゲル(2.0g)上に吸着させ、そしてシクロヘキサン中のEtOAc(0~100%、v/v)での乾燥カラム真空クロマトグラフィーを用いて精製して、黄色の泡としての(S)-1-O-(4,4'-ジメトキシトリフェニルメチル)-3-O-[4-(1-ピレニルエチニル)フェニルメチル]グリセロール(60%、1.75g)を得た。¹H N

MR (CDCl₃) δ 2.48 (d, 1H, J=5.0 Hz, OH), 3.24 (m, 2H, CH(OH)CH₂OCH₂), 3.31 (m, 2H, CH₂ODMT), 3.78 (s, 6H, 2×OCH₃), 4.00 (m, 1H, CHOH), 4.58 (s, 2H, CH₂Ar), 6.80 (d, 4H, J=8.5 Hz, DMT), 7.10–7.45 (m, 11H, DMT), 7.72 (d, 2H, J=8.0 Hz, フェニル), 8.00–8.30 (m, 9H, ピレン-1-イル); ¹³C NMR (CDCl₃) 55.2 (OCH₃), 64.3 (CH₂ODMT), 70.0 (CH(OH)CH₂OCH₂), 71.7 (CHOH), 72.9 (CH₂-フェニル), 86.1 [C(Ar)₃], 88.7, 94.9 (C≡C), 117.7, 127.7, 138.5, 139.4 (フェニル), 113.1, 124.5–131.8, 136.0, 144.8, 158.5 (DMT, ピレン1-イル)。HR-MALDI-MS: C₄₉H₄₀Na⁺O₅ [M+Na]⁺, m/z 計算値 731.2768、測定値 731.2739。

10

【実施例5】

【0113】

(R)-2-O-[2-シアノエトキシ(ジイソプロピルアミノ)ホスフィノ]-1-O-(4,4'-ジメトキシトリフェニルメチル)-3-O-[4-(1-ピレニルエチニル)フェニルメチル]グリセロールの調製。

【0114】

20

(R)-1-O-(4,4'-ジメトキシトリフェニルメチル)-3-O-[4-(1-ピレニルエチニル)フェニルメチル]グリセロール(1.7g、2.4mmol)、N,N-ジイソプロピルアンモニウムテトラゾリド(0.620g、3.6mmol)、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(1.150g、3.8mmol)、無水CH₂Cl₂(50ml)を24時間用いて、化合物8と同じ方法を用い、該化合物を調製した。泡として最終化合物を得て(1.8g、83%)、これをODN合成に用いた。³²P NMR (CDCl₃) δ 150.3, 150.5, 3:2の比。HR-MALDI-MS: C₅₈H₅₇N₂Na⁺O₆P [M+Na]⁺, m/z 計算値 931.3846、測定値 931.3814。

【実施例6】

30

【0115】

合成後アプローチを用いたTINAの合成および精製

乾燥MeCN/CH₂Cl₂の1:1混合物中、ホスホロアミダイト8の0.075M溶液に関して、活性化剤としての4,5-ジシアノイミダゾール、ならびに増加した保護時間(100秒間)およびカップリング時間(2分間)を用い、Applied BiosystemsのExpediteTM核酸合成システム、モデル8909上で、ODNを合成した。DNA合成後、CPG支持体を含むカラム、および4-ヨードフェニル部分を所持するDMTオン・オリゴヌクレオチドを、カップリング反応前に、アルゴンでフラッシュした(2分間)。乾燥条件下、室温で、1mlプラスチックシリンジ中、乾燥DMF/Et₃N(3.5/1.5、500μl)中で、Pd(PPh₃)₄またはPd(PPh₃)₂Cl₂(7.5mM)、末端アセチレンを所持する芳香族構造(22.5mM)、およびCuI(7.5mM)を含有する菌頭カップリング試薬混合物を調製した。使用前に、シリンジにもまた、アルゴンをフラッシュした。菌頭カップリング試薬混合物を含むシリンジを、CPGを含むカラムにつなぎ、そして別の空のシリンジをカラムの別の側に連結した。修飾オリゴヌクレオチドを含むCPG支持体を、シリンジによって、反応混合物で数回洗浄した。45分後ごとに最後の操作を反復した。3~4時間後、支持体から反応混合物を除去し、そしてDMF(2x0.5ml)およびCH₃CN(2x1ml)でカラムを洗浄し、そして乾燥させた。ON12~ON14、ON21およびON24の場合、CPG支持体を、新鮮に調製した菌頭カップリング反応混合物でもう一度処理した。その後、5'-DMTオン・オリゴヌクレオチドを固体支持体から切断し(室温、2

40

50

時間)、そして32%水性アンモニアを用いて脱保護した(55℃、一晚)。Waters XterraTM MS C₁₈カラム上で、逆相半調製HPLCを用いて、5'-O-DMTオンTINAの精製を達成した。100μlの10%水性酢酸中、ODNをDMT脱保護し(30分間)、32%水性アンモニア(1ml)で希釈し、そしてHPLC上で再び精製した。ODNを含む、対応する分画を蒸発させ、1M水性NaOAc(150μl)で希釈し、そしてエタノール(550μl)からODNを沈殿させた。PerSeptive BiosystemsのVoyager Elite Biospectrometry Research Station上でMALDI-TOF分析によって、修飾ODNを確認した。GenPak-Faxカラム(Waters)上で、Merck HitachiのLaChromシステムを用いて、イオン交換クロマトグラフィーによって、最終TFOの純度を確認した。

10

【実施例7】

【0116】

(R)-2-O-[2-シアノエトキシ(ジイソプロピルアミノ)ホスフィノ]-1-O-(4,4'-ジメトキシトリフェニルメチル)-3-O-[4-(1-プレニルエチニル)フェニルメチル]グリセロールの合成および精製。

【0117】

乾燥MeCN/CH₂Cl₂の1:1混合物中、前記ホスホロアミダイトの0.075M溶液に関して、活性化因子としての4,5-ジシアノイミダゾール、ならびに増加した脱保護時間(100秒間)およびカップリング時間(2.5分間)を用いて、Applied BiosystemsのExpediteTM核酸合成システム、モデル8909上で、ODNを合成した。DNA合成完了後、5'-DMTオン・オリゴヌクレオチドを固体支持体から切断し(室温、2時間)、そして32%水性アンモニアを用いて脱保護した(55℃、一晚)。Waters XterraTM MS C₁₈カラム上で、逆相半調製HPLCを用いて、5'-O-DMTオンTINAの精製を達成した。100μlの80%水性酢酸中、ODNをDMT脱保護し(30分間)、1M水性NaOAc(150μl)で希釈し、そしてエタノール(550μl)からODNを沈殿させた。PerSeptive BiosystemsのVoyager Elite Biospectrometry Research Station上でMALDI-TOF分析によって、修飾ODNを確認した。GenPak-Faxカラム(Waters)上で、Merck HitachiのLaChromシステムを用いて、イオン交換クロマトグラフィーによって、最終TFOの純度を確認した。

20

30

【実施例8】

【0118】

融点測定

PTP-6温度プログラマーを取り付けたPerkin-Elmer UV/VIS分光計Lambda 35上で、融点測定を行った。まず、対応する緩衝剤溶液中、各々1.0μMの濃度のワトソン-クリック二重鎖の2つの鎖を混合することによって、三重鎖を形成した。溶液を80℃で5分間加熱し、室温に冷却して、そして第三の(TFO)鎖を添加し、そして次いで、15℃で30分間維持した。対応する緩衝剤溶液中、各々1.0μMの濃度で、2つの鎖を混合し、その後、70℃で5分間加熱して、そして次いで室温に冷却することによって、二重鎖を形成した。増加する温度(1分間あたり1.0℃)に対して、260nmの吸光度を測定することによって得た融解曲線の一次導関数プロットの最大値として、融点(T_m、℃)を決定した。温度増加速度をより遅くしても(1分間あたり0.5℃)、同じ曲線を生じた。373nmでもまた実験を行った。反復実験によって決定した際、すべての融点は、±1.0℃の誤差範囲内である。

40

【実施例9】

【0119】

蛍光測定

Julabo F25温度コントローラーを取り付けたPerkin-Elmer 発光

50

分光計LS-55上で、蛍光測定を行った。1. 0 μ MのTFOのみを用いたことを除いて、すべての場合で、 T_m 測定と同じ方式で、三重鎖および二重鎖を形成した。20 mM カコジル酸ナトリウム、100 mM NaCl、10 mM $MgCl_2$ 、pH 6.0の緩衝液中、10 $^{\circ}C$ でスペクトルを記録した。

【実施例10】

【0120】

合成したオリゴヌクレオチドのMALDI-TOF MS、逆相(DMT-オン)およびイオン交換(DMT-オフ)HPLC分析

【0121】

【表5】

オリゴ ヌクレオチド	m/z $[M+H]^+$, 計算値(Da)	m/z $[M+H]^+$, 測定値(Da)	RP-HPLC, R_t (分) ^[a]	IE-HPLC, 純度 ^[d]
ON2	4490.8	4489.2	15.1	90%
ON3	4489.1	4488.9	15.2 / 38.1 ^[b]	90%
ON4	4541.1	4541.6	16.2	95%
ON5	4516.0	4518.2	15.8	95%
ON6	4589.2	4589.2	16.0	96%
ON7	4589.2	4593.0	16.1	93%
ON8	4589.2	4588.2	16.1	95%
ON9	4589.2	4588.2	16.3	97%
ON10	4589.2	4589.2	18.7	91%
ON11	5054.6	5058.9	18.6	94%
ON12	5054.6	5060.1	17.4 / 32.9 ^[c]	93%
ON13	5054.6	5058.0	17.1	97%
ON14	5054.6	5058.2	17.0	93%
ON20	5510.8	5513.1	16.2	95%
ON21	5802.4	5799.7	27.2 ^[c]	86%
ON23	4081.8	4083.1	16.2	88%
ON24	4549.3	4551.2	17.4	91%
ON26	4143.8	4143.9	15.8	85%

【0122】

[a] Waters Delta Prep 4000調製クロマトグラフィースystem。緩衝液A [950 mlの0.1 M NH_4HCO_3 および50 mlの CH_3CN (pH=9.0)] および緩衝液B [250 mlの0.1 NH_4HCO_3 および750 ml

10

20

30

40

50

の CH_3CN ($\text{pH}=9.0$)]。流速 2.5 ml/分 。勾配：4分間の 100% A、
11分間の直線勾配で 100% B、5分間の 100% B、次いで、2分間の直線勾配
で 100% A、そして3分間の 100% A；[b] Waters Delta Prep 4000調製クロマトグラフィースystem、^[a]におけるのと同じ緩衝液。流速
 1.0 ml/分 。勾配：5分間の 100% A、30分間の直線勾配で 70% B、2分
間の 70% B、8分間の直線勾配で 100% B、そして次いで、15分間の 100%
A；[c] Waters Delta Prep 700半調製クロマトグラフィースystem、緩衝液A [H_2O 中の 0.05 M トリエチルアンモニウムアセテート ($\text{pH}=7$
 $.0$)] および緩衝液B (H_2O 中、 75% CH_3CN)。流速 2.5 ml/分 。勾配
：2分間の 100% A、38分間の直線勾配で 70% B、7分間の直線勾配で 100
 $\%$ B、3分間の 100% B、そして次いで10分間の 100% A；[d] GenP
ak-Faxカラム (Waters) 上のMerck HitachiのLaChrom
system。緩衝液A [H_2O 中の 25 mM Tris $\cdot\text{HCl}$ 、 10 mM EDTA ($\text{pH}=8.0$)] および緩衝液B (H_2O 中の 1 M NaCl)。流速 0.75 ml/分 。
勾配：5分間の 97% Aおよび 3% B、41分間の直線勾配で 35% B、3分間の
直線勾配で、 75% B、そして次いで、10分間の 97% Aおよび 3% B。

【図面の簡単な説明】

【0123】

【図1】 20 mM カコジル酸ナトリウム、 100 mM NaCl、 10 mM MgCl_2
、 $\text{pH}7.2$ 中、増加する温度 (1°C/分) に対する、 260 nm で記録する三重鎖融解
の一次導関数プロット。

【図2】一本鎖逆平行および平行二重鎖、ならびに平行三重鎖の蛍光スペクトル。測定条
件： 10°C で緩衝液 (20 mM カコジル酸ナトリウム、 100 mM NaCl、 10 mM
 MgCl_2 、 $\text{pH}6.0$) 中の各鎖 $1\text{ }\mu\text{M}$ 、励起： 373 nm (励起スリット 4.0 nm
 m)、発光： $380\sim600\text{ nm}$ (A、B、Eに関しては、発光スリット 2.5 nm 、な
らびにCおよびDに関しては 0.0 nm)。異なる条件下で記録したスペクトルにおいて
、参照として、ON6およびON12を用いた。

【図3】一本鎖逆平行および平行二重鎖、ならびに平行三重鎖の蛍光スペクトル。測定条
件： 10°C で緩衝液 (20 mM カコジル酸ナトリウム、 100 mM NaCl、 10 mM
 MgCl_2 、 $\text{pH}6.0$) 中の各鎖 $1\text{ }\mu\text{M}$ 、励起： 373 nm (励起スリット 4.0 nm
 m)、発光： $380\sim600\text{ nm}$ (A、B、Eに関しては、発光スリット 2.5 nm 、な
らびにCおよびDに関しては 0.0 nm)。異なる条件下で記録したスペクトルにおいて
、参照として、ON6およびON12を用いた。

【図4】一本鎖逆平行および平行二重鎖、ならびに平行三重鎖の蛍光スペクトル。測定条
件： 10°C で緩衝液 (20 mM カコジル酸ナトリウム、 100 mM NaCl、 10 mM
 MgCl_2 、 $\text{pH}6.0$) 中の各鎖 $1\text{ }\mu\text{M}$ 、励起： 373 nm (励起スリット 4.0 nm
 m)、発光： $380\sim600\text{ nm}$ (A、B、Eに関しては、発光スリット 2.5 nm 、な
らびにCおよびDに関しては 0.0 nm)。異なる条件下で記録したスペクトルにおいて
、参照として、ON6およびON12を用いた。

【図5】一本鎖逆平行および平行二重鎖、ならびに平行三重鎖の蛍光スペクトル。測定条
件： 10°C で緩衝液 (20 mM カコジル酸ナトリウム、 100 mM NaCl、 10 mM
 MgCl_2 、 $\text{pH}6.0$) 中の各鎖 $1\text{ }\mu\text{M}$ 、励起： 373 nm (励起スリット 4.0 nm
 m)、発光： $380\sim600\text{ nm}$ (A、B、Eに関しては、発光スリット 2.5 nm 、な
らびにCおよびDに関しては 0.0 nm)。異なる条件下で記録したスペクトルにおいて
、参照として、ON6およびON12を用いた。

【図6】一本鎖逆平行および平行二重鎖、ならびに平行三重鎖の蛍光スペクトル。測定条
件： 10°C で緩衝液 (20 mM カコジル酸ナトリウム、 100 mM NaCl、 10 mM
 MgCl_2 、 $\text{pH}6.0$) 中の各鎖 $1\text{ }\mu\text{M}$ 、励起： 373 nm (励起スリット 4.0 nm
 m)、発光： $380\sim600\text{ nm}$ (A、B、Eに関しては、発光スリット 2.5 nm 、な
らびにCおよびDに関しては 0.0 nm)。異なる条件下で記録したスペクトルにおいて

、参照として、ON 6 および ON 1 2 を用いた。

【図 1】

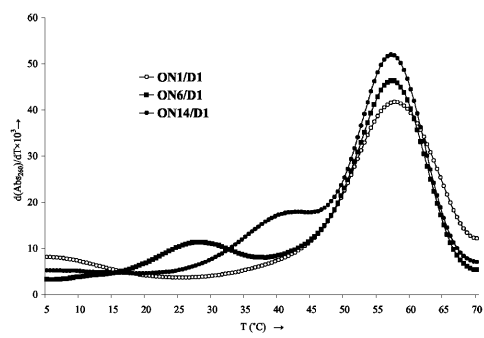
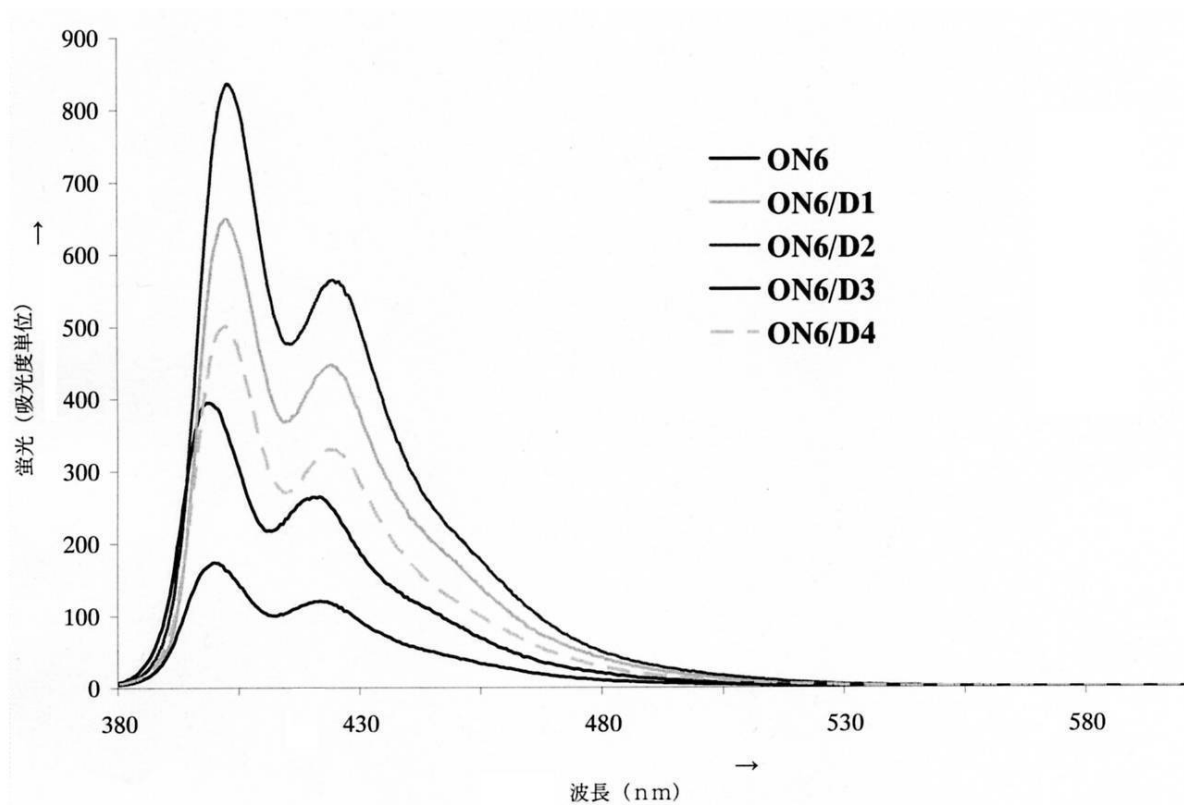
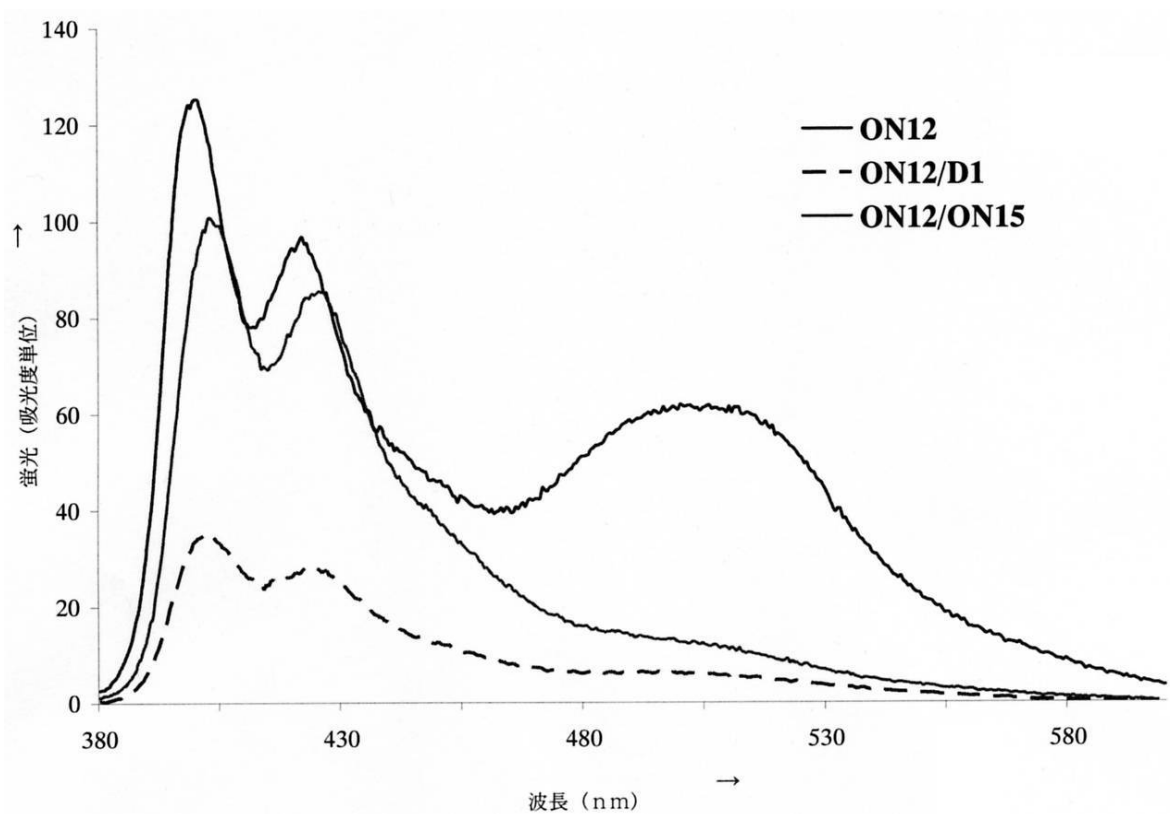


Fig. 1

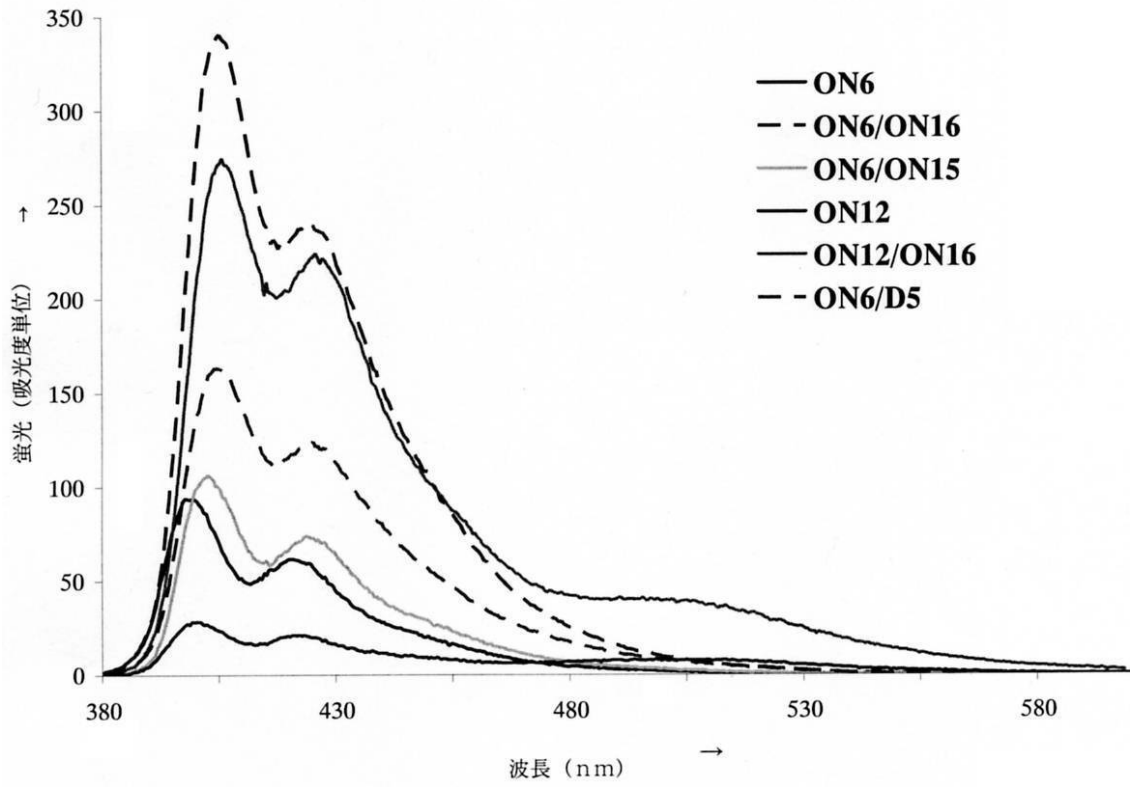
【図 2】



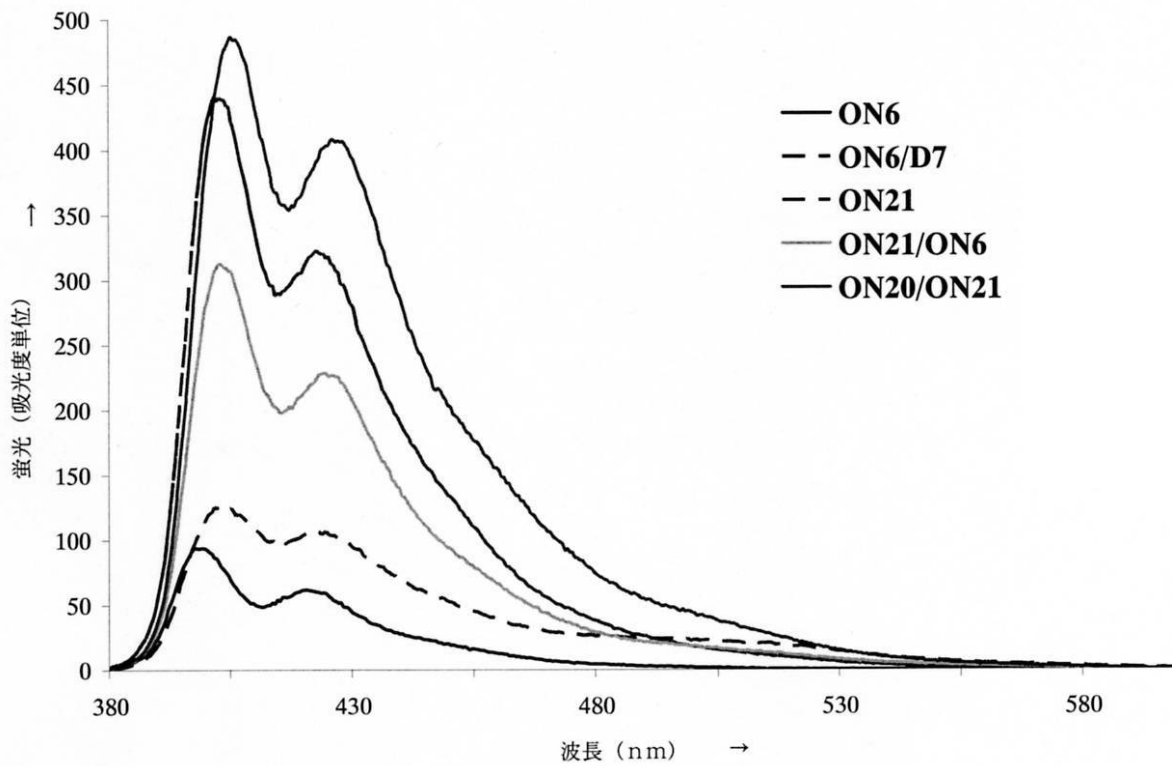
【図 3】



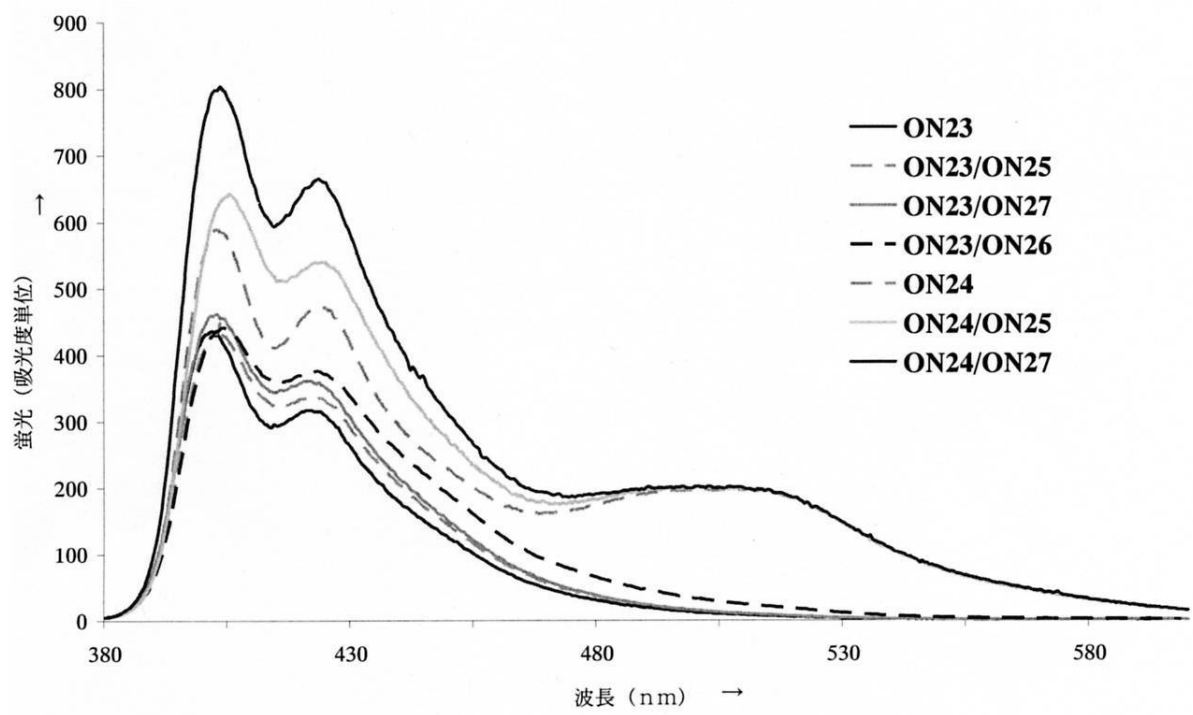
【図 4】



【図 5】



【図 6】



【配列表】

0005284084000001.xml

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 P 43/00 (2006.01) A 6 1 P 43/00 1 1 1

(74)代理人 100135415

弁理士 中濱 明子

(72)発明者 フィリシェフ, ヴァイアチエルサヴ・ヴェー
デンマーク国デーコー 5 0 0 0 オーデンセ・セー, ダムフスヴィグ 7 8

(72)発明者 ペデルセン, エリック・ビアルレガールド
デンマーク国デーコー 5 2 5 0 オーデンセ・エスヴェー, リザス・アレ 2 2

審査官 清水 晋治

(56)参考文献 国際公開第 0 3 / 0 5 1 9 0 1 (WO, A 2)
Nucleic acids research. 2002, Vol.30, No.22, p.4918-4925
Methods in enzymology. 2001, Vol.340, p.290-326

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
P u b M e d
J S T P l u s / J M E D P l u s (J D r e a m I I I)