

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4882074号  
(P4882074)

(45) 発行日 平成24年2月22日(2012.2.22)

(24) 登録日 平成23年12月16日(2011.12.16)

(51) Int.Cl.

F I

<b>CO7H 21/04</b>	<b>(2006.01)</b>	CO7H 21/04	CSPB
<b>CO7H 19/20</b>	<b>(2006.01)</b>	CO7H 19/20	ZNA
<b>CO7H 19/23</b>	<b>(2006.01)</b>	CO7H 19/23	
<b>GO1N 37/00</b>	<b>(2006.01)</b>	GO1N 37/00	IO2
<b>GO1N 33/53</b>	<b>(2006.01)</b>	GO1N 33/53	M

請求項の数 9 (全 66 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2007-505962 (P2007-505962)  
 (86) (22) 出願日 平成18年2月28日(2006.2.28)  
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2006/303772  
 (87) 国際公開番号 W02006/093157  
 (87) 国際公開日 平成18年9月8日(2006.9.8)  
 審査請求日 平成19年10月31日(2007.10.31)  
 (31) 優先権主張番号 特願2005-53417 (P2005-53417)  
 (32) 優先日 平成17年2月28日(2005.2.28)  
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

(73) 特許権者 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 関根 光雄  
 神奈川県横浜市緑区長津田町4259番地  
 国立大学法人 東京工業大学内  
 (72) 発明者 清尾 康志  
 神奈川県横浜市緑区長津田町4259番地  
 国立大学法人 東京工業大学内

最終頁に続く

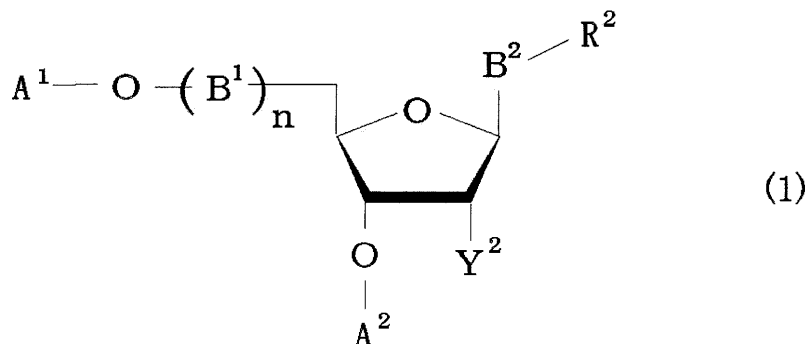
(54) 【発明の名称】 オリゴヌクレオチド誘導体、遺伝子検出用プローブ及びDNAチップ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記一般式(1)で表わされるオリゴヌクレオチド誘導体。

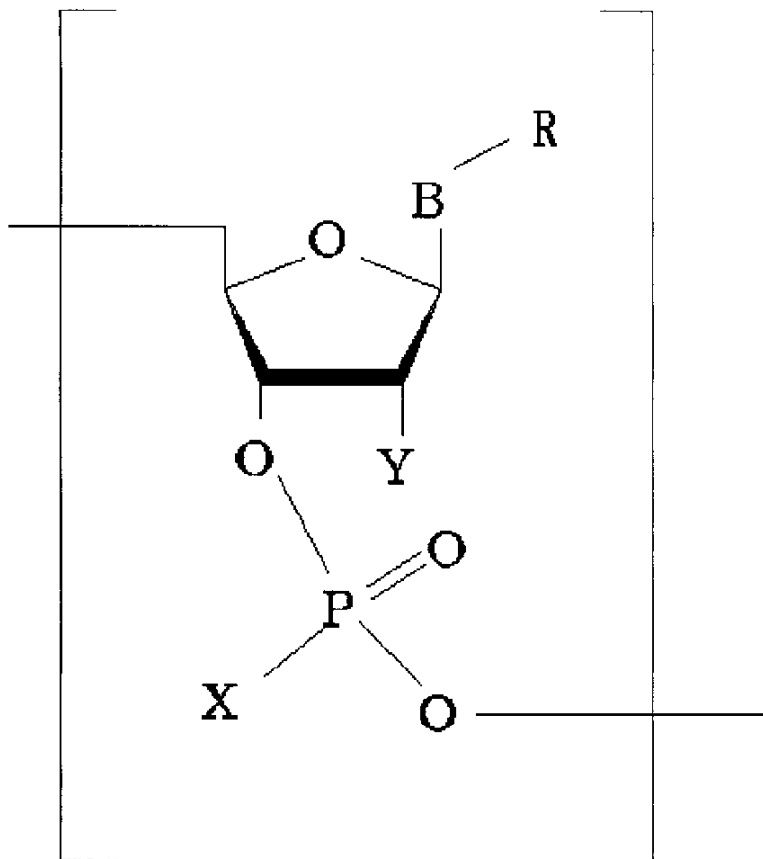
【化1】



(上記式中、A<sup>1</sup>及びA<sup>2</sup>は同一であっても異なってもよく、それぞれ水素、アルキル基、リン酸基又は置換基を結合しているもよいトリチル基であり、nは10~50の整数であり、Y<sup>2</sup>は水素、水酸基、アルコキシ基又は2-シアノエトキシ基であるか、又は

Y<sup>2</sup> とリボース4'位炭素とが結合し、環を形成していてもよく、B<sup>2</sup> は、7 - デアザアデニン、7 - デアザ - 8 - アザアデニン、3 - デアザアデニン、6 - チオグアニン、7 位に種々の置換基（アルキル、アルケニル、アルキニル、ハロゲン、ニトロ基、アシル基、水酸基）が導入された7 - デアザアデニン、8 位に種々の置換基（アルキル、アルケニル、アルキニル、ハロゲン、ニトロ基、アシル基、水酸基）が導入されたアデニン、8 位に種々の置換基（アルキル、ハロゲン、ニトロ基、アシル基、水酸基）が導入された7 - デアザアデニン、7 位及び8 位に種々の置換基（アルキル、アルケニル、アルキニル、ハロゲン、ニトロ基、アシル基、水酸基）が導入された7 - デアザグアニン、7 - デアザグアニン、7 - デアザ - 8 - アザグアニン、3 - デアザグアニン、7 位に種々の置換基（アルキル、アルケニル、アルキニル、ハロゲン、ニトロ基、アシル基、水酸基）が導入された7 - デアザグアニン、8 位に種々の置換基（アルキル、アルケニル、アルキニル、ハロゲン、ニトロ基、アシル基、水酸基）を導入したグアニン、8 位に種々の置換基（アルキル、アルケニル、アルキニル、ハロゲン、ニトロ基、アシル基、水酸基）が導入された7 - デアザグアニン、7 位と8 位に種々の置換基（アルキル、アルケニル、アルキニル、ハロゲン、ニトロ基、アシル基、水酸基）が導入された7 - デアザグアニンであり、R<sup>2</sup> は、核酸塩基のアミノ基に結合した置換基であり、水素、アシル基、チオアシル基、アルコキシカルボニル基、アルコキシチオカルボニル基、アルキル基で置換されていてもよいカルバモイル基、又はアルキル基で置換されていてもよいチオカルバモイル基であり、B<sup>1</sup> は下記一般式（2）で表わされる置換基を表す。）

【化2】



（上記式中、B は、7 - デアザアデニン、7 - デアザ - 8 - アザアデニン、3 - デアザアデニン、6 - チオグアニン、7 位に種々の置換基（アルキル、アルケニル、アルキニル、ハロゲン、ニトロ基、アシル基、水酸基）が導入された7 - デアザアデニン、8 位に種々の置換基（アルキル、アルケニル、アルキニル、ハロゲン、ニトロ基、アシル基、水酸基）

)が導入されたアデニン、8位に種々の置換基(アルキル、ハロゲン、ニトロ基、アシル基、水酸基)が導入された7-デアザアデニン、7位及び8位に種々の置換基(アルキル、アルケニル、アルキニル、ハロゲン、ニトロ基、アシル基、水酸基)が導入された7-デアザアデニン、7-デアザグアニン、7-デアザ-8-アザグアニン、3-デアザグアニン、7位に種々の置換基(アルキル、アルケニル、アルキニル、ハロゲン、ニトロ基、アシル基、水酸基)が導入された7-デアザグアニン、8位に種々の置換基(アルキル、アルケニル、アルキニル、ハロゲン、ニトロ基、アシル基、水酸基)を導入したグアニン、8位に種々の置換基(アルキル、アルケニル、アルキニル、ハロゲン、ニトロ基、アシル基、水酸基)が導入された7-デアザグアニン、7位と8位に種々の置換基(アルキル、アルケニル、アルキニル、ハロゲン、ニトロ基、アシル基、水酸基)が導入された7-デアザグアニンであり、Rは、核酸塩基のアミノ基に結合した置換基であり、水素、アシル基、チオアシル基、アルコキシカルボニル基、アルコキシチオカルボニル基、アルキル基で置換されていてもよいカルバモイル基、又はアルキル基で置換されていてもよいチオカルバモイル基であり、Xは酸素原子<sup>-</sup>、硫黄原子<sup>-</sup>、BH<sub>3</sub>、OCH<sub>3</sub>、又はCH<sub>3</sub>であり、Yは水素、水酸基、アルコキシ基又は2-シアノエトキシ基であるか、又はYとリボースの4'位炭素とが結合し、環を形成していてもよい。また、R及びR<sup>2</sup>は、少なくとも1個が水素でない。)

10

【請求項2】

プローブとして用いるための請求項1に記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

【請求項3】

請求項1に記載のオリゴヌクレオチド誘導体の少なくとも1つ以上を担体に固定化させてなる、遺伝子検出用マイクロアレイ。

20

【請求項4】

請求項1に記載のオリゴヌクレオチド誘導体の少なくとも1つ以上を担体に固定化させてなる、DNAチップ。

【請求項5】

担体が、微小多孔質ガラスである、請求項4に記載のDNAチップ。

【請求項6】

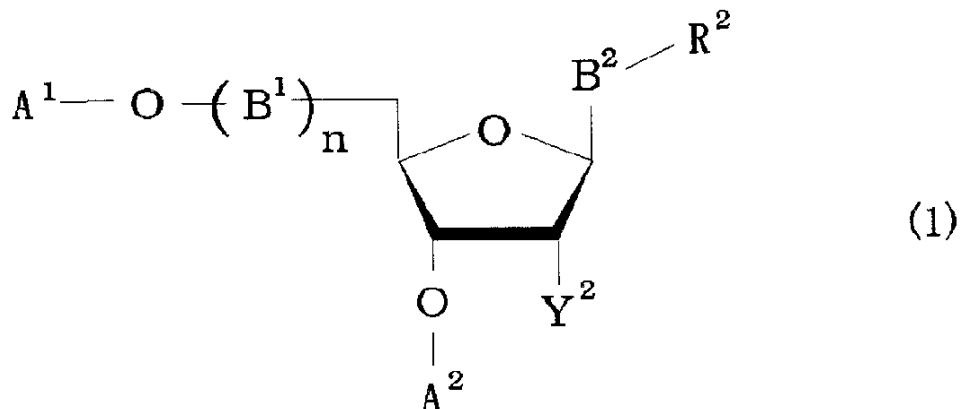
下記一般式(1)で表わされるオリゴヌクレオチド誘導体を、試料中の標的核酸とハイブリダイズさせる工程：及び

30

ハイブリダイズ産物を検出する工程を有する、

標的核酸中のヌクレオチドの同定方法。

【化3】



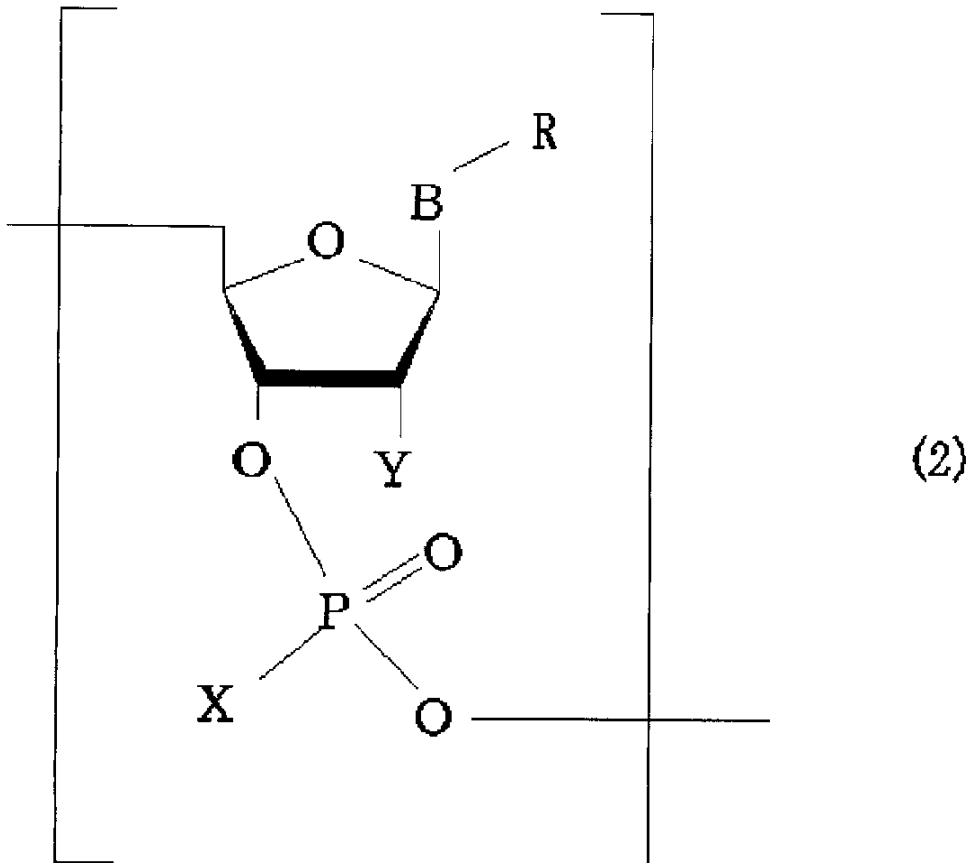
40

(上記式中、A<sup>1</sup>及びA<sup>2</sup>は同一であっても異なってもよく、それぞれ水素、アルキ

50

ル基、リン酸基又は置換基を結合しているもよいトリチル基であり、 $n$ は10～50の整数であり、 $Y^2$ は水素、水酸基、アルコキシ基又は2-シアノエトキシ基であるか、又は $Y^2$ とリボース4'位炭素とが結合し、環を形成していてもよく、 $B^2$ は、7-デアザアデニン、7-デアザ-8-アザアデニン、3-デアザアデニン、6-チオグアニン、7位に種々の置換基（アルキル、アルケニル、アルキニル、ハロゲン、ニトロ基、アシル基、水酸基）が導入された7-デアザアデニン、8位に種々の置換基（アルキル、アルケニル、アルキニル、ハロゲン、ニトロ基、アシル基、水酸基）が導入されたアデニン、8位に種々の置換基（アルキル、ハロゲン、ニトロ基、アシル基、水酸基）が導入された7-デアザアデニン、7位及び8位に種々の置換基（アルキル、アルケニル、アルキニル、ハロゲン、ニトロ基、アシル基、水酸基）が導入された7-デアザアデニン、7-デアザグアニン、7-デアザ-8-アザグアニン、3-デアザグアニン、7位に種々の置換基（アルキル、アルケニル、アルキニル、ハロゲン、ニトロ基、アシル基、水酸基）が導入された7-デアザグアニン、8位に種々の置換基（アルキル、アルケニル、アルキニル、ハロゲン、ニトロ基、アシル基、水酸基）を導入したグアニン、8位に種々の置換基（アルキル、アルケニル、アルキニル、ハロゲン、ニトロ基、アシル基、水酸基）が導入された7-デアザグアニン、7位と8位に種々の置換基（アルキル、アルケニル、アルキニル、ハロゲン、ニトロ基、アシル基、水酸基）が導入された7-デアザグアニンであり、 $R^2$ は、核酸塩基のアミノ基に結合した置換基であり、水素、アシル基、チオアシル基、アルコシカルボニル基、アルコキシチオカルボニル基、アルキル基で置換されていてもよいカルバモイル基、又はアルキル基で置換されていてもよいチオカルバモイル基であり、 $B^1$ は下記一般式(2)で表わされる置換基を表す。)

【化4】



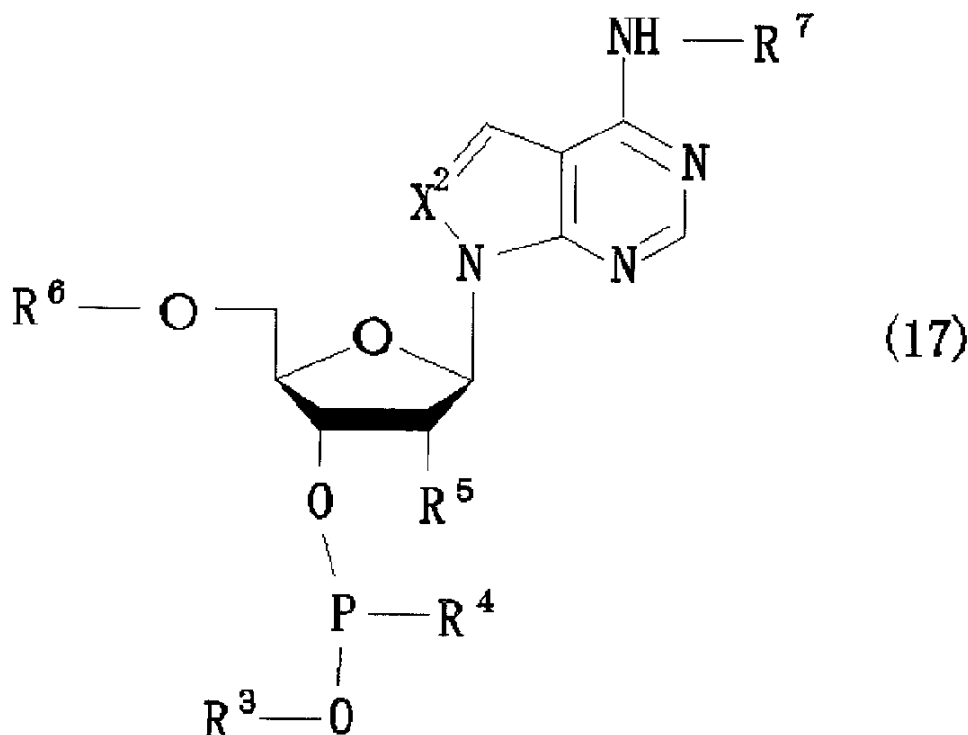
(上記式中、 $B$ は、7-デアザアデニン、7-デアザ-8-アザアデニン、3-デアザアデニン、6-チオグアニン、7位に種々の置換基（アルキル、アルケニル、アルキニル、

ハロゲン、ニトロ基、アシル基、水酸基)が導入された7-デアザアデニン、8位に種々の置換基(アルキル、アルケニル、アルキニル、ハロゲン、ニトロ基、アシル基、水酸基)が導入されたアデニン、8位に種々の置換基(アルキル、ハロゲン、ニトロ基、アシル基、水酸基)が導入された7-デアザアデニン、7位及び8位に種々の置換基(アルキル、アルケニル、アルキニル、ハロゲン、ニトロ基、アシル基、水酸基)が導入された7-デアザアデニン、7-デアザグアニン、7-デアザ-8-アザグアニン、3-デアザグアニン、7位に種々の置換基(アルキル、アルケニル、アルキニル、ハロゲン、ニトロ基、アシル基、水酸基)が導入された7-デアザグアニン、8位に種々の置換基(アルキル、アルケニル、アルキニル、ハロゲン、ニトロ基、アシル基、水酸基)を導入したグアニン、8位に種々の置換基(アルキル、アルケニル、アルキニル、ハロゲン、ニトロ基、アシル基、水酸基)が導入された7-デアザグアニン、7位と8位に種々の置換基(アルキル、アルケニル、アルキニル、ハロゲン、ニトロ基、アシル基、水酸基)が導入された7-デアザグアニンであり、水素、アシル基、チオアシル基、アルコキシカルボニル基、アルコキシチオカルボニル基、アルキル基で置換されていてもよいカルバモイル基、又はアルキル基で置換されていてもよいチオカルバモイル基であり、Xは酸素原子<sup>-</sup>、硫黄原子<sup>-</sup>、BH<sub>3</sub>、OCH<sub>3</sub>、又はCH<sub>3</sub>であり、Yは水素、水酸基、アルコキシ基又は2-シアノエトキシ基であるか、又はYとリボースの4'位炭素とが結合し、環を形成していてもよい。また、R及びR<sup>2</sup>は、少なくとも1個が水素でない。) 10

【請求項7】

一般式(17)で表わされるヌクレオチド誘導体。 20

【化5】



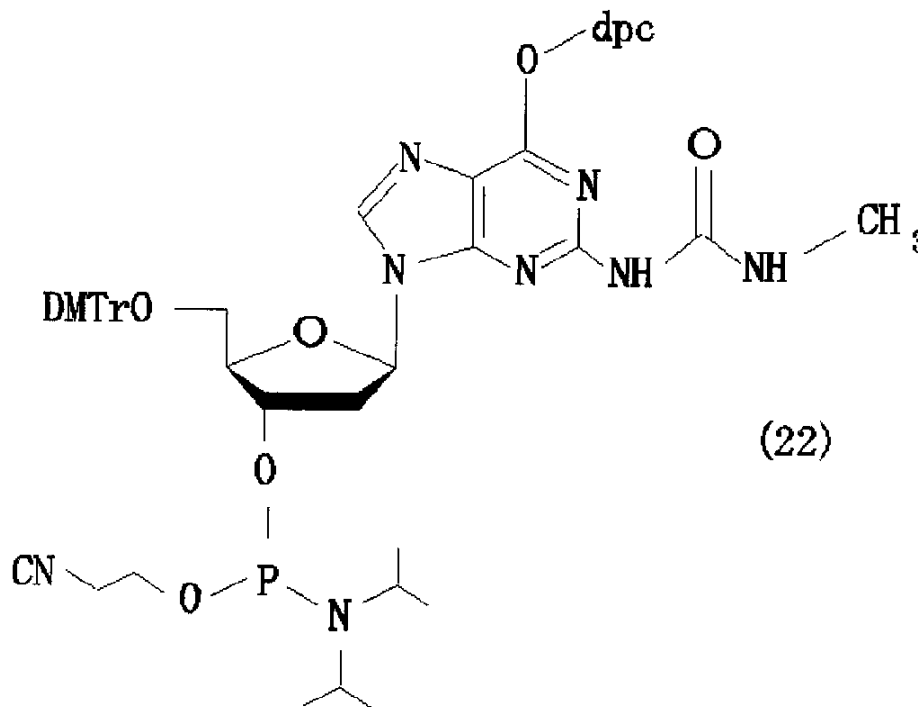
(上記式中、R<sup>3</sup>はリン酸保護基を表し、R<sup>4</sup>は窒素原子上に炭素数1~6個の同一又は異なるアルキル基が2個結合したジアルキルアミノ基を表し、R<sup>5</sup>は、水素、アルコキシ基または炭素数1から10の同一または異なるアルキル基を有するトリアルキルシリルオキシ基、トリアルキルシリルオキシメトキシ基もしくはシアノエチル基であるか、又はリボースの4'位炭素と結合して環を形成しており、R<sup>5</sup>は、水素、アルコキシ基または炭素数1から10の同一または異なるアルキル基を有するトリアルキルシリルオキシ基、ト 50

リアルキシルリルオキシメトキシ基もしくはシアノエチル基であるか、又はリボースの 4' 位炭素と結合して環を形成していてもよく、 $R^6$  は水酸基の保護基を表し、 $R^7$  は、アシル基（ただし、ベンゾイル基を除く）、チオアシル基、アルコキシカルボニル基、アルコキシチオカルボニル基、アルキル基で置換されていてもよいカルバモイル基、又はアルキル基で置換されていてもよいチオカルバモイル基であり、 $X^2$  は窒素原子もしくは置換基を有してもよい炭素原子を表わす。）

【請求項 8】

式 (22) で表わされる 5' - O - (4, 4' - ジメトキシトリチル) - 6 - O - ジフェニルカルバモイル - 2 N - メチルカルバモイルデオキシグアノシン - 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ド、式 (23) で表わされる 2 - N - カルバモイル - 5' - O - (4, 4' - ジメトキシトリチル) - 6 - O - ジフェニルカルバモイルデオキシグアノシン - 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ド、又は式 (24) で表わされる 5' - O - (4, 4' - ジメトキシトリチル) - 6 - O - ジフェニルカルバモイル - 2 N - メチルチオカルバモイルデオキシグアノシン - 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ド。

【化 6】

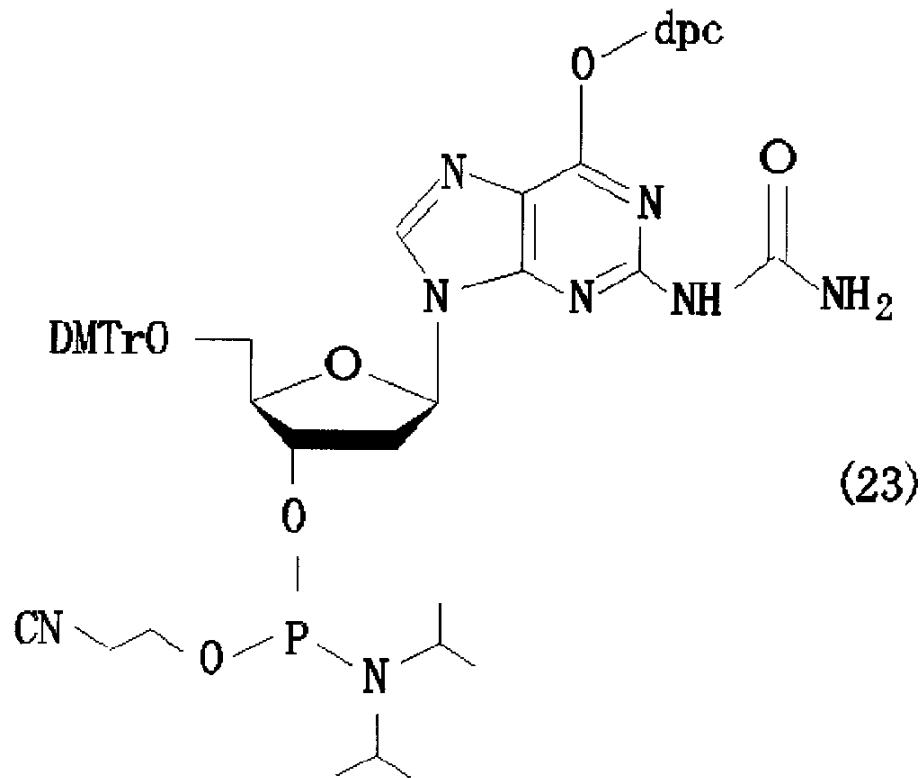


10

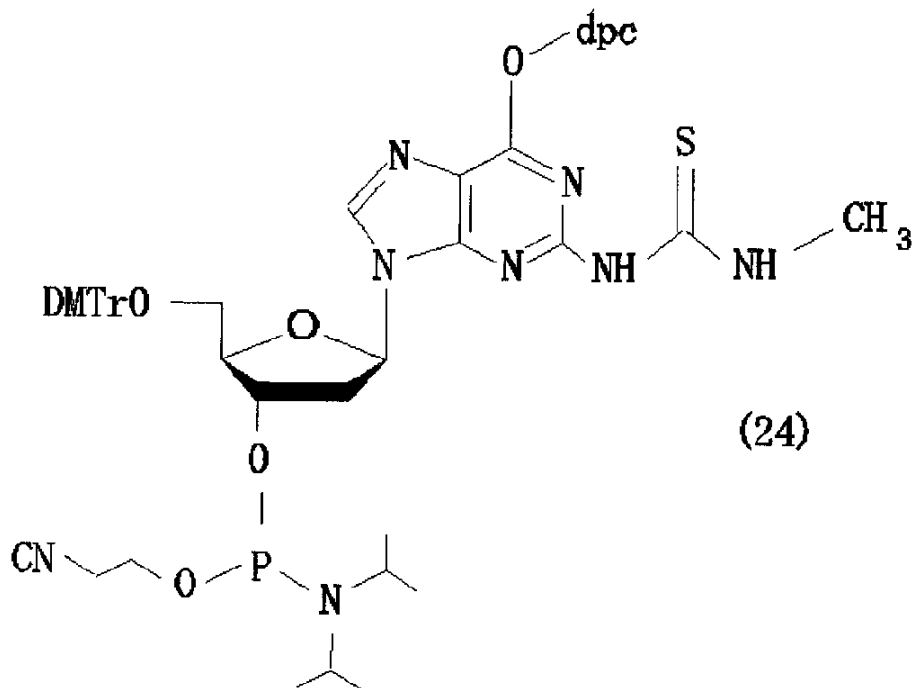
20

30

【化7】



【化8】



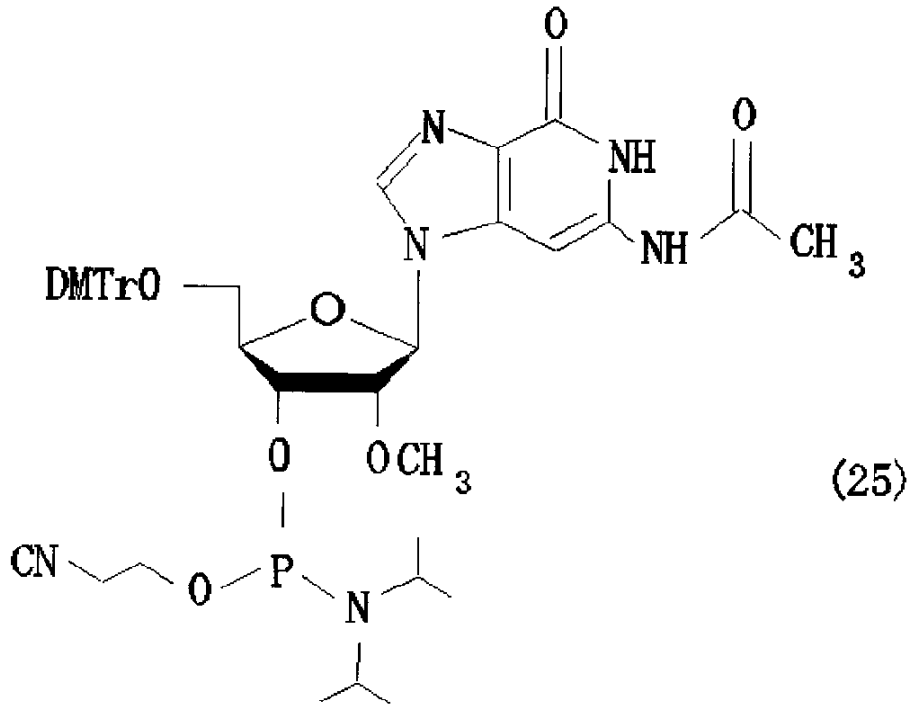
【請求項9】

一般式(25)で表わされる2-N-アセチル-5'-O-(4,4'-ジメトキシトリ

50

チル) - 2' - O - メチル - 3 - デアザグアノシン - 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ド。

【化 9】



【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、オリゴヌクレオチド誘導体、遺伝子検出用プローブ等に関する。更に詳細には、プローブが脱落する等問題が発生することなく用いることのできる、オリゴヌクレオチド誘導体、遺伝子検出用プローブ等に関する。

【背景技術】

【0002】

一塩基遺伝子多型 (SNPs) を含む遺伝子型解析は、いわゆる「テーラーメイド医療」の根拠を提供する拠点ともいえ、その必要性が急速に高まってきている。医薬品の副作用を低減させるという観点から、米国医薬品局は新薬の申請の際に薬剤の効果に関する SNPs の情報の添付を義務付ける方向に推移しており、我が国においても SNPs の解析の必要性が高まりつつある。

【0003】

現在汎用されている SNPs 解析用 DNA チップは、検出プローブとして合成 DNA オリゴヌクレオチドを用いており、その DNA チップの製造方法としては、大きく分けて 2 種類の方法が知られている。第一に、既に合成された DNA オリゴヌクレオチドをスライドガラス等の基板表面に固定化する方法 (coupling 合成法、非特許文献 1 参照) である。第二に、オリゴヌクレオチドをスライドガラス等の基板上で合成する方法 (in situ 合成法、非特許文献 2 参照) である。

【0004】

Coupling 合成法においては、まず反応性の高い官能基を DNA オリゴヌクレオチドに付加して DNA プローブを得る。次いで、得られた DNA プローブをスライドガラス等の基板表面にスポットすることで、DNA プローブと基板表面に存在する官能基とを化学反応

させ、共有結合を介してプローブ分子を基板に固定化する。この方法は、DNAプローブのスポットティング技術の煩雑さのために、基板表面への固定化効率を制御することが非常に困難であり、品質管理にも影響を及ぼすこととなる。

【0005】

一方、in situ合成法においては、光リソグラフィーやバブルジェット技術を利用して、スライドガラス等の基板表面でプローブを合成していく。この方法は、特定の位置でDNA合成を行う技術であるため、DNAプローブの基板表面への固定化反応を省略することができ、DNAチップ合成のハイスループット化が可能になる。しかし、このin situ合成法は基板表面におけるDNA鎖の伸長反応効率が低く、DNAプローブ純度が悪くなり、そのために正確性が低いという欠点がある。たとえば、光リソグラフィーを用いた合成においては、鎖伸長反応の効率が最高でも95%程度であり、例えば20塩基長のプローブを合成した場合の有効プローブは40%以下となる。すなわち、不正確な配列を有するプローブが60%以上存在することとなる。

10

【0006】

【非特許文献1】Ange wandte Chemie international edition, 2002, 41, 1276-1289

【非特許文献2】Biopolymer, 2004, 73, 579-596

【0007】

不正確な配列を有するプローブが多く存在することは、正確性が求められるSNP解析等においては結果の正確性を欠く原因となるという問題がある。

従来は、プローブを作成する際に、核酸塩基部に保護基を結合し、最終的に、この保護基をアンモニア処理により除去する必要があったが、アンモニア処理を行うことにより、アンカー部分のSi-O結合が切断され、90%程度のDNAプローブが担体上から脱落するという問題があった。

20

従って、本発明の目的は、SNP等に用いる場合に、上記問題が発生することなく用いることができるオリゴヌクレオチド誘導体を提供することにある。

また、本発明は上記オリゴヌクレオチド誘導体を用いた遺伝子検出法における利用法を提供することにある。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0008】

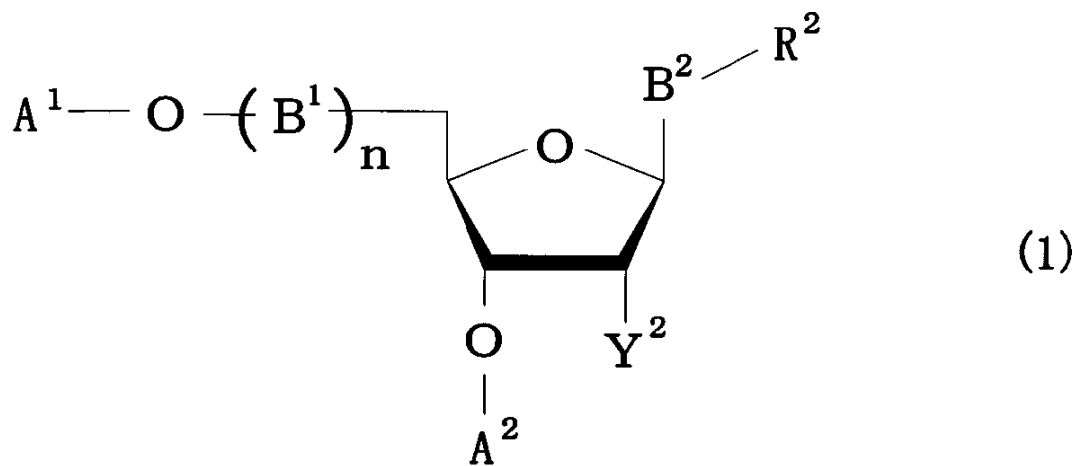
上記目的を達成するため、本発明者らは鋭意検討した結果、特定のオリゴヌクレオチドを用いることにより、上記目的を達成し得るという知見を得た。

本発明は、上記知見に基づいてなされたものであり、下記一般式(1)で表わされるオリゴヌクレオチド誘導体を提供するものである。

30

【0009】

【化1】



10

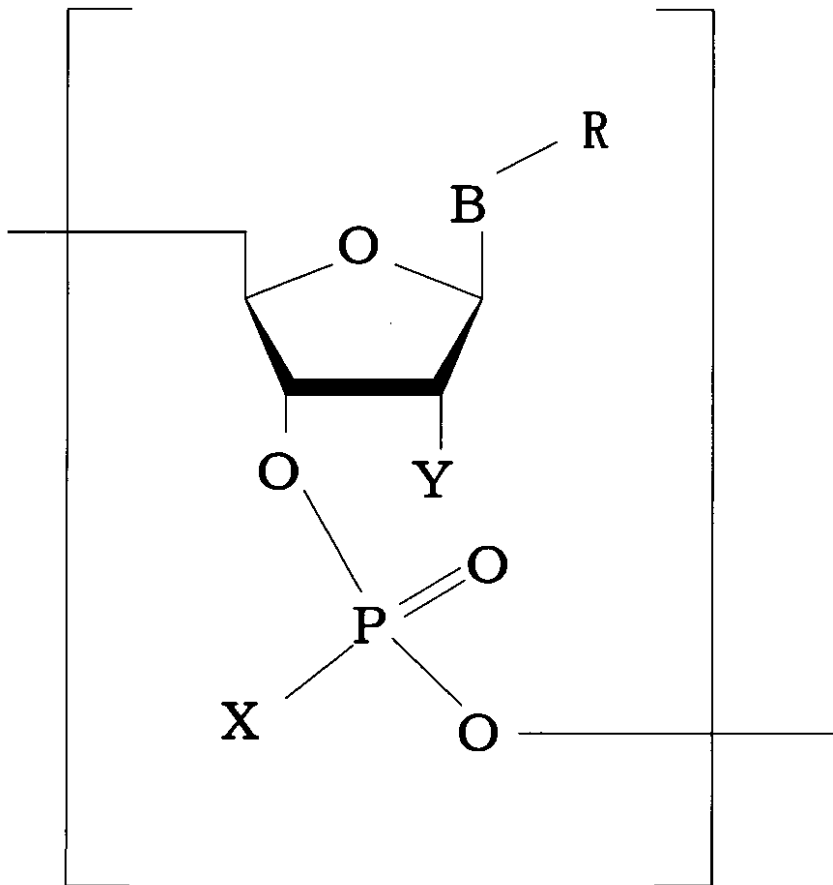
【0010】

(上記式中、 $A^1$  及び  $A^2$  は同一であっても異なってもよく、それぞれ水素、水酸基、アルキル基、リン酸基又は置換基を結合していてもよいトリチル基であり、 $n$  は 10 ~ 50 の整数であり、 $Y^2$  は水素、水酸基、アルコキシ基又は 2 - シアノエトキシ基であるか、又は  $Y^2$  とリボース 4' 位炭素とが結合し、環を形成していてもよく、 $B^2$  は天然又は非天然の核酸塩基であり、 $R^2$  は、核酸塩基のアミノ基に結合した置換基であり、水素、アシル基、チオアシル基、アルコキシカルボニル基、アルコキシチオカルボニル基、アルキル基で置換されていてもよいカルバモイル基、アルキル基で置換されていてもよいチオカルバモイル基、又はアルキル基 (アルキル基、アルケニル基、アルキニル基又はフェニル基と結合したものを含む) であり、 $B^1$  は下記一般式 (2) で表わされる置換基を表す。)

20

【0011】

## 【化 2】



10

20

## 【 0 0 1 2 】

(上記式中、Bは天然又は非天然の核酸塩基であり、Rは、核酸塩基のアミノ基に結合した置換基であり、水素、アシル基、チオアシル基、アルコキシカルボニル基、アルコキシチオカルボニル基、アルキル基で置換されていてもよいカルバモイル基、アルキル基で置換されていてもよいチオカルバモイル基、又はアルキル基(アルキル基、アルケニル基、アルキニル基又はフェニル基と結合したものを含む)であり、Xは酸素原子<sup>-</sup>、硫黄原子<sup>-</sup>、 $BH_3$ 、 $OCH_3$ 、又は $CH_3$ であり、Yは水素、水酸基、アルコキシ基又は2-シアノエトキシ基であるか、又はYとリボースの4'位炭素とが結合し、環を形成していてもよい。また、R及び $R^2$ は、少なくとも1個が水素でない。)

30

## 【 0 0 1 3 】

また、本発明は、上記オリゴヌクレオチド誘導体の少なくとも1つ以上を担体に固定化させてなる、遺伝子検出用マイクロアレイを提供する。

また、本発明は、上記オリゴヌクレオチド誘導体の少なくとも1つ以上を担体に固定化させてなる、DNAチップを提供する。

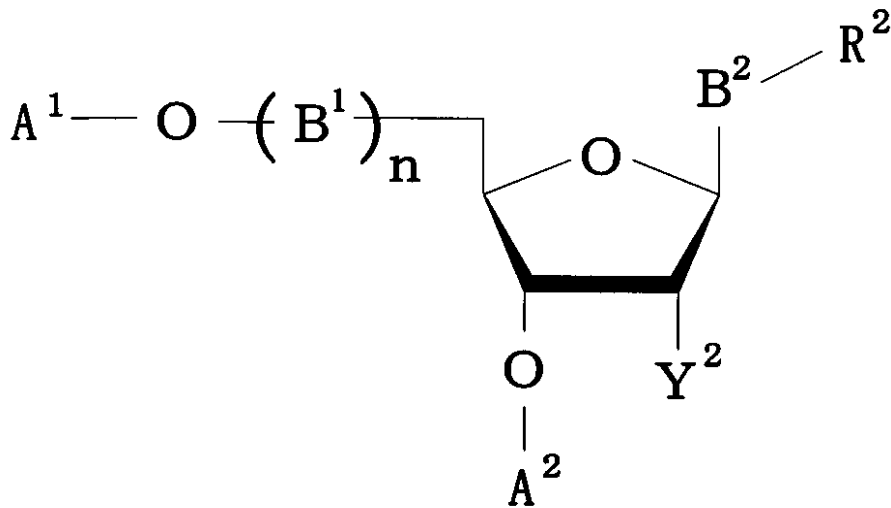
40

## 【 0 0 1 4 】

また、本発明は、下記一般式(1)で表わされるオリゴヌクレオチド誘導体を、試料中の標的核酸とハイブリダイズさせる工程：及びハイブリダイズ産物を検出する工程を有する、標的核酸中のヌクレオチドの同定方法を提供する。

## 【 0 0 1 5 】

【化3】



(1)

10

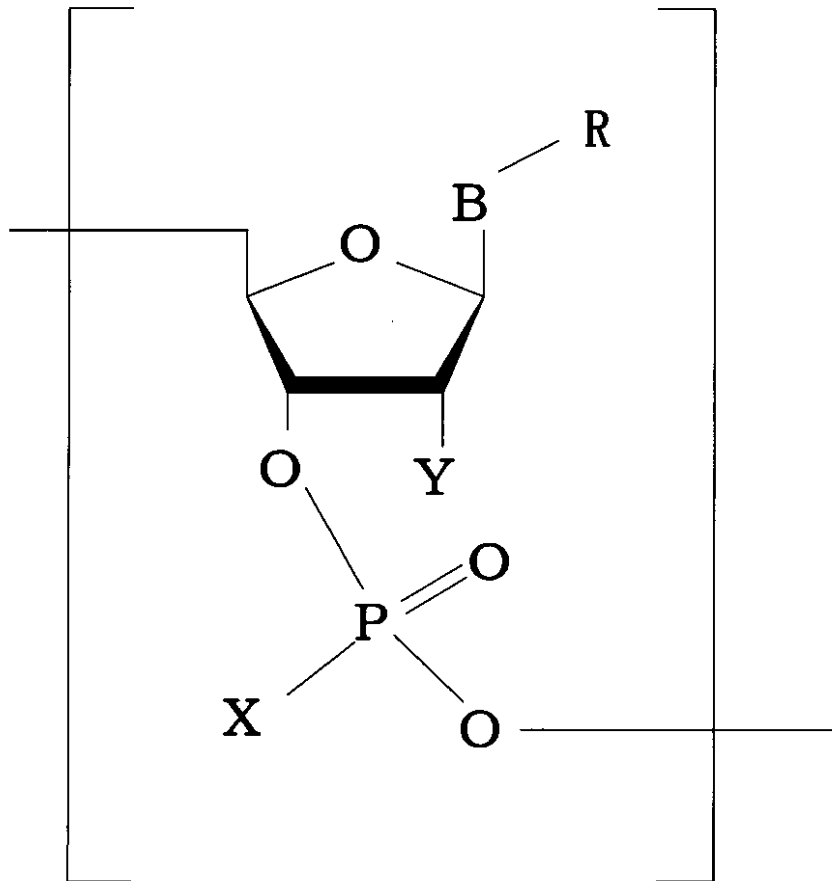
【0016】

(上記式中、 $A^1$  及び  $A^2$  は同一であっても異なってもよく、それぞれ水素、水酸基、アルキル基、リン酸基又は置換基を結合しているもよいトリチル基であり、 $n$  は 10 ~ 50 の整数であり、 $Y^2$  は水素、水酸基、アルコキシ基又は 2 - シアノエトキシ基であるか、又は  $Y^2$  とリボース 4' 位炭素とが結合し、環を形成しているもよく、 $B^2$  は天然又は非天然の核酸塩基であり、 $R^2$  は、核酸塩基のアミノ基に結合した置換基であり、水素、アシル基、チオアシル基、アルコキシカルボニル基、アルコキシチオカルボニル基、アルキル基で置換されていてもよいカルバモイル基、アルキル基で置換されていてもよいチオカルバモイル基、又はアルキル基(アルキル基、アルケニル基、アルキニル基又はフェニル基と結合したものを含む)であり、 $B^1$  は下記一般式(2)で表わされる置換基を表す。)

20

【0017】

## 【化4】



10

20

## 【0018】

(上記式中、Bは天然又は非天然の核酸塩基であり、Rは、核酸塩基のアミノ基に結合した置換基であり、水素、アシル基、チオアシル基、アルコキシカルボニル基、アルコキシチオカルボニル基、アルキル基で置換されていてもよいカルバモイル基、アルキル基で置換されていてもよいチオカルバモイル基、又はアルキル基(アルキル基、アルケニル基、アルキニル基又はフェニル基と結合したものを含む)であり、Xは酸素原子<sup>-</sup>、硫黄原子<sup>-</sup>、 $BH_3$ 、 $OCH_3$ 、又は $CH_3$ であり、Yは水素、水酸基、アルコキシ基又は2-シアノエトキシ基であるか、又はYとリボースの4'位炭素とが結合し、環を形成していてもよい。また、R及び $R^2$ は、少なくとも1個が水素でない。)

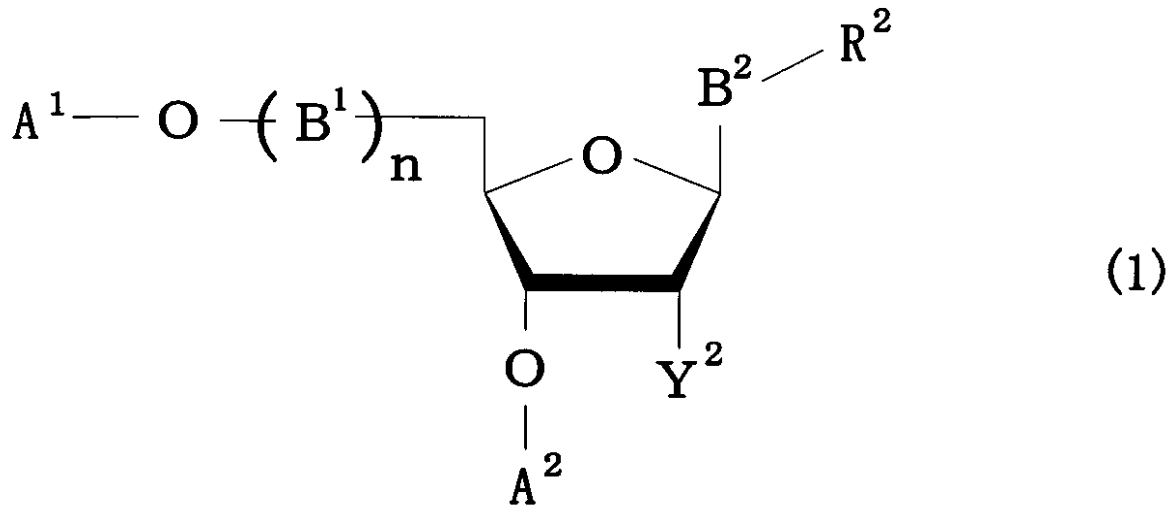
30

## 【0019】

また、本発明は、下記一般式(1)で表わされるオリゴヌクレオチド誘導体を用いて、遺伝子の発現を抑制する、遺伝子発現制御方法を提供する。

## 【0020】

【化5】



10

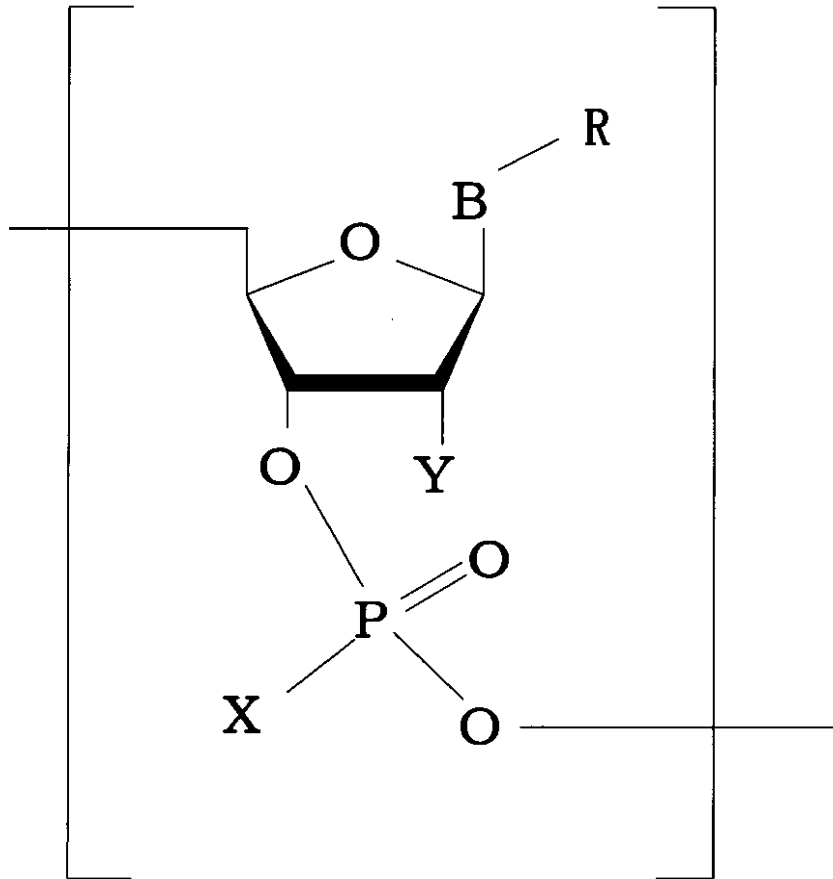
【0021】

(上記式中、 $A^1$  及び  $A^2$  は同一であっても異なってもよく、それぞれ水素、水酸基、アルキル基、リン酸基又は置換基を結合していてもよいトリチル基であり、 $n$  は 10 ~ 50 の整数であり、 $Y^2$  は水素、水酸基、アルコキシ基又は 2 - シアノエトキシ基であるか、又は  $Y^2$  とリボース 4' 位炭素とが結合し、環を形成していてもよく、 $B^2$  は天然又は非天然の核酸塩基であり、 $R^2$  は、核酸塩基のアミノ基に結合した置換基であり、水素、アシル基、チオアシル基、アルコキシカルボニル基、アルコキシチオカルボニル基、アルキル基で置換されていてもよいカルバモイル基、アルキル基で置換されていてもよいチオカルバモイル基、又はアルキル基 (アルキル基、アルケニル基、アルキニル基又はフェニル基と結合したものを含む) であり、 $B^1$  は下記一般式 (2) で表わされる置換基を表す。)

20

【0022】

【化6】



10

(2)

20

【0023】

(上記式中、Bは天然又は非天然の核酸塩基であり、Rは、核酸塩基のアミノ基に結合した置換基であり、水素、アシル基、チオアシル基、アルコキシカルボニル基、アルコキシチオカルボニル基、アルキル基で置換されていてもよいカルバモイル基、アルキル基で置換されていてもよいチオカルバモイル基、又はアルキル基(アルキル基、アルケニル基、アルキニル基又はフェニル基と結合したものを含む)であり、Xは酸素原子<sup>-</sup>、硫黄原子<sup>-</sup>、BH<sub>3</sub>、OCH<sub>3</sub>、又はCH<sub>3</sub>であり、Yは水素、水酸基、アルコキシ基又は2-シアノエトキシ基であるか、又はYとリボースの4'位炭素とが結合し、環を形成していてもよい。また、R及びR<sup>2</sup>は、少なくとも1個が水素でない。)

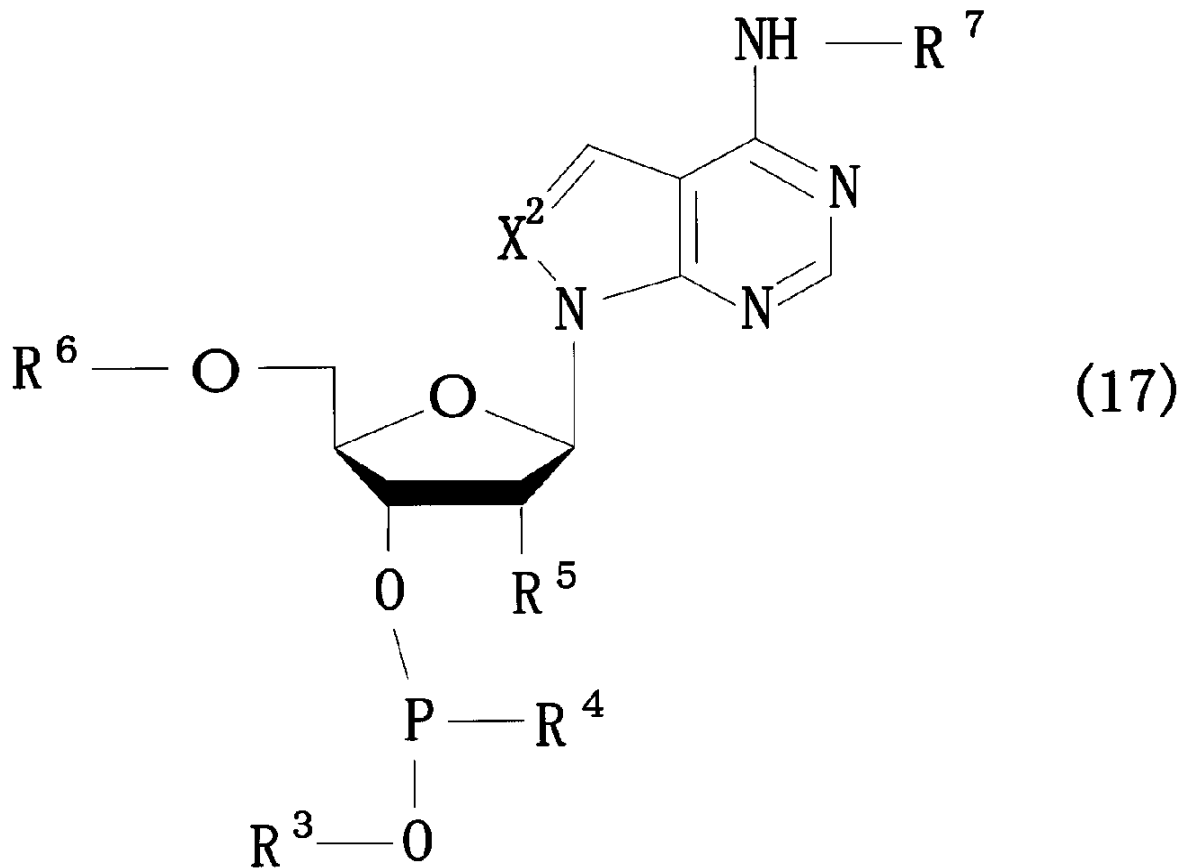
30

【0024】

また、本発明は、一般式(17)で表わされるヌクレオチド誘導体を提供する。

【0025】

【化7】



10

20

【0026】

(上記式中、 $R^3$  はリン酸保護基を表し、 $R^4$  は窒素原子上に炭素数 1 ~ 6 個の同一又は異なるアルキル基が 2 個結合したジアルキルアミノ基を表し、 $R^5$  は、水素、アルコキシ基または炭素数 1 から 10 の同一または異なるアルキル基を有するトリアルキルシリルオキシ基、トリアルキルシリルオキシメトキシ基もしくはシアノエチル基であるか、又はリ

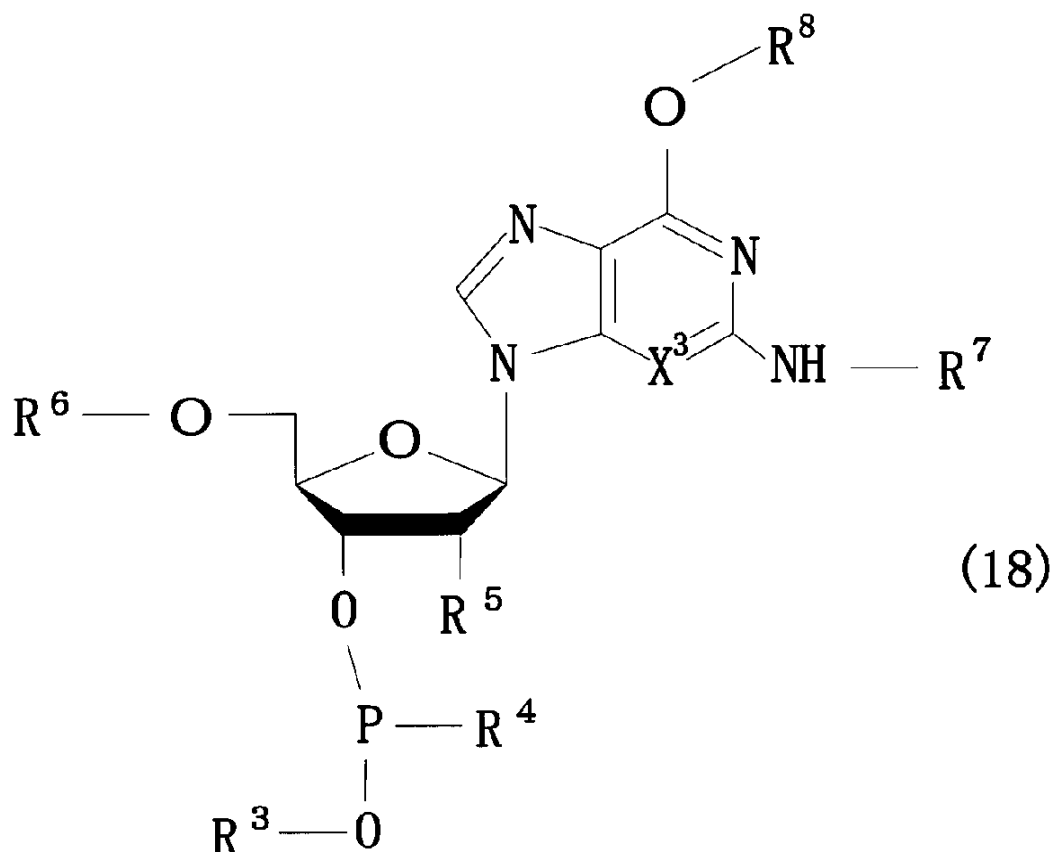
30

【0027】

また、本発明は、一般式(18)で表わされるヌクレオチド誘導体を提供する。

【0028】

【化 8】



10

20

【 0 0 2 9 】

(上記式中、 $R^3$  はリン酸保護基を表し、 $R^4$  は窒素原子上に炭素数 1 ~ 6 個の同一又は異なるアルキル基が 2 個結合したジアルキルアミノ基を表し、 $R^5$  は、水素、アルコキシ基または炭素数 1 から 10 の同一または異なるアルキル基を有するトリアルキルシリルオキシ基、トリアルキルシリルオキシメトキシ基もしくはシアノエチル基であるか、又はリボースの 4' 位炭素と結合して環を形成しており、 $R^6$  は水酸基の保護基を表し、 $R^7$  は、アシル基、チオアシル基、アルコキシカルボニル基、アルコキシチオカルボニル基、アルキル基で置換されていてもよいカルバモイル基、アルキル基で置換されていてもよいチオカルバモイル基、又はアルキル基(アルキル基、アルケニル基、アルキニル基又はフェニル基と結合したものを含む)であり、 $R^8$  は、ジフェニルカルバモイル基もしくは、ケイ素上に同一又は異なるアリール基もしくはアルキル基を合計 3 つ有するシリル基であり、 $X^3$  は窒素原子又はメチンを表す。)

30

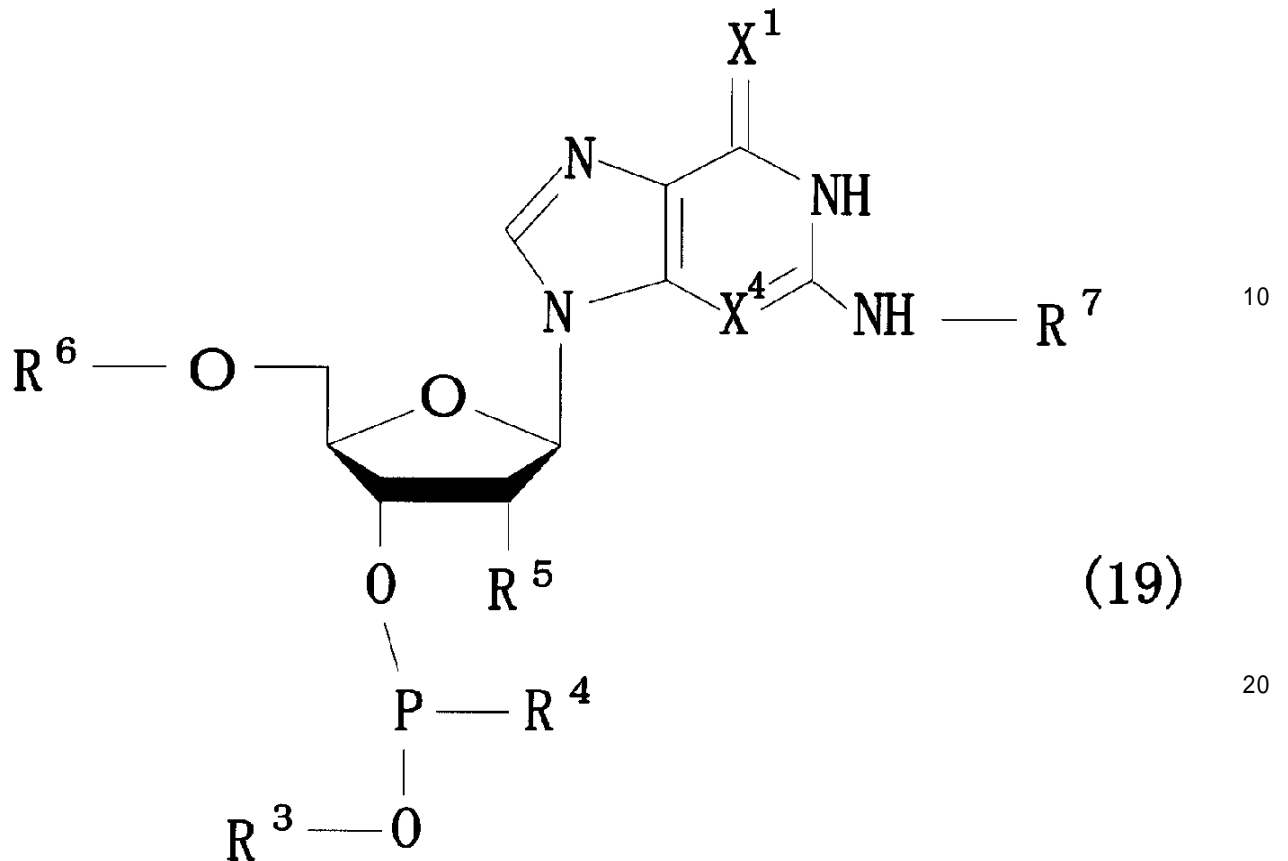
【 0 0 3 0 】

また、本発明は、一般式(19)で表わされるヌクレオチド誘導体を提供する。

【 0 0 3 1 】

40

【化 9】



【0032】

(上記式中、 $R^3$  はリン酸保護基を表し、 $R^4$  は窒素原子上に炭素数 1 ~ 6 個の同一又は異なるアルキル基が 2 個結合したジアルキルアミノ基を表し、 $R^5$  は、水素、アルコキシ基または炭素数 1 から 10 の同一または異なるアルキル基を有するトリアルキルシリルオキシ基、トリアルキルシリルオキシメトキシ基もしくはシアノエチル基であるか、又はリボースの 4' 位炭素と結合して環を形成しており、 $R^6$  は水酸基の保護基を表し、 $R^7$  は、アシル基、チオアシル基、アルコキシカルボニル基、アルコキシチオカルボニル基、アルキル基で置換されていてもよいカルバモイル基、アルキル基で置換されていてもよいチオカルバモイル基、又はアルキル基(アルキル基、アルケニル基、アルキニル基又はフェニル基と結合したものを含む)であり、 $X^4$  は窒素原子もしくはメチンであり、 $X^1$  は酸素原子又は硫黄原子である。)

【発明の効果】

【0033】

本発明のオリゴヌクレオチド誘導体は、保護基を残したまま塩基の識別を行うことができるものである。

本発明のプロブ、マイクロアレイ、DNAチップは、本発明のオリゴヌクレオチド誘導体を用いているので、感度よく、遺伝子の検出を行うことができる。

本発明のヌクレオチド誘導体は、本発明のオリゴヌクレオチド誘導体を製造するための原料として用いられる。

【発明を実施するための最良の形態】

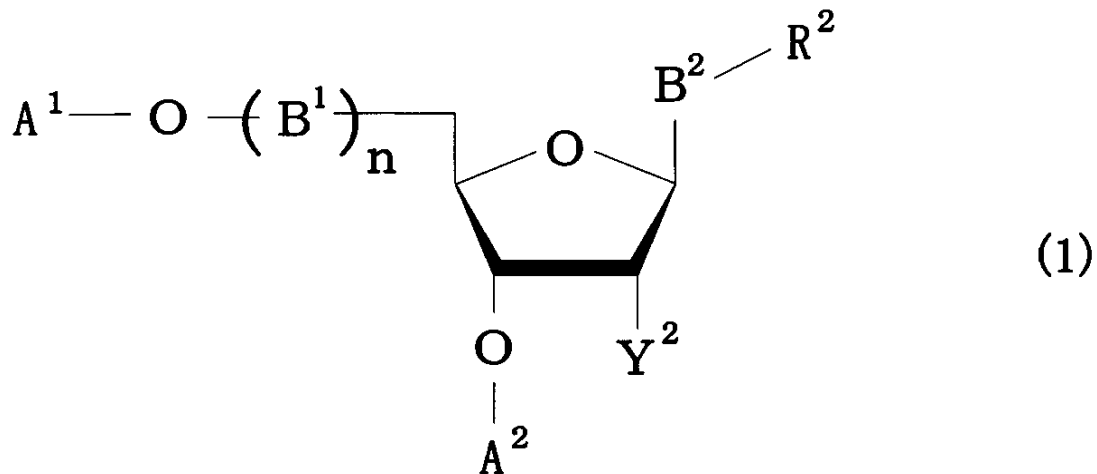
【0034】

以下、先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。

【0035】

【化10】



10

【0036】

上記一般式(1)において、 $A^1$ 及び $A^2$ は同一であっても異なってもよく、それぞれ水素、水酸基、アルキル基、リン酸基又は置換基を結合していてもよいトリチル基である。アルキル基としては、炭素数が1~20個であるアルキル基が好ましい。炭素数が20個を超えると、二重鎖形成能及び塩基識別能が低下する場合がある。また、トリチル基に結合するアルキル基としては、炭素数が1~20個のアルキル基等が挙げられる。 $n$ は10~50である。 $n$ が10未満であると二重鎖形成能が低下し、一方、 $n$ が50を超えると塩基識別能が低下する。

20

$Y^2$ は水素、水酸基、アルコキシ基又は2-シアノエトキシ基エチル基であるか、又は $Y^2$ とリボース4'位炭素とが結合し、環を形成していてもよい。アルコキシ基としては、炭素数が1~20個のアルコキシ基が好ましい。

【0037】

$B^2$ は天然又は非天然の核酸塩基である。具体的には、天然のアデニン、シトシン、グアニン、チミン、ウラシルのほかに人工塩基である7-デアザアデニン、7-デアザ-8-アザアデニン、3-デアザアデニン、6-チオグアニン、2-チオウラシル、2-チオチミン、7位に種々の置換基(アルキル、アルケニル、アルキニル、ハロゲン、ニトロ基、アシル基、水酸基等)が導入された7-デアザアデニン、8位に種々の置換基(アルキル、アルケニル、アルキニル、ハロゲン、ニトロ基、アシル基、水酸基等)が導入されたアデニン、8位に種々の置換基(アルキル、ハロゲン、ニトロ基、アシル基、水酸基等)が導入された7-デアザアデニン、7位及び8位に種々の置換基(アルキル、アルケニル、アルキニル、ハロゲン、ニトロ基、アシル基、水酸基等)が導入された7-デアザアデニン、7-デアザグアニン、7-デアザ-8-アザグアニン、3-デアザグアニン、7位に種々の置換基(アルキル、アルケニル、アルキニル、ハロゲン、ニトロ基、アシル基、水酸基等)が導入された7-デアザグアニン、8位に種々の置換基(アルキル、アルケニル、アルキニル、ハロゲン、ニトロ基、アシル基、水酸基等)を導入したグアニン、8位に種々の置換基(アルキル、アルケニル、アルキニル、ハロゲン、ニトロ基、アシル基、水酸基等)が導入された7-デアザグアニン、7位と8位に種々の置換基(アルキル、アルケニル、アルキニル、ハロゲン、ニトロ基、アシル基、水酸基等)が導入された7-デアザグアニン、5位に種々の官能基(アルキル、アルケニル、アルキニル、ハロゲン、ニトロ基、アシル基、水酸基等)が導入されたシトシン、シュードイソシトシン、1位に種々の官能基(アルキル、アルケニル、アルキニル、アシル基、水酸基等)が導入されたシュードイソシトシン、5位に種々の官能基(アルキル、アルケニル、アルキニル、ハロゲン、ニトロ基、アシル基、水酸基等)が導入されたウラシル、シュードウラシル、1位に種々の官能基(アルキル、アルケニル、アルキニル、アシル基、水酸基等)が導入されたシ

30

40

50

ユードウラシル等が挙げられる。

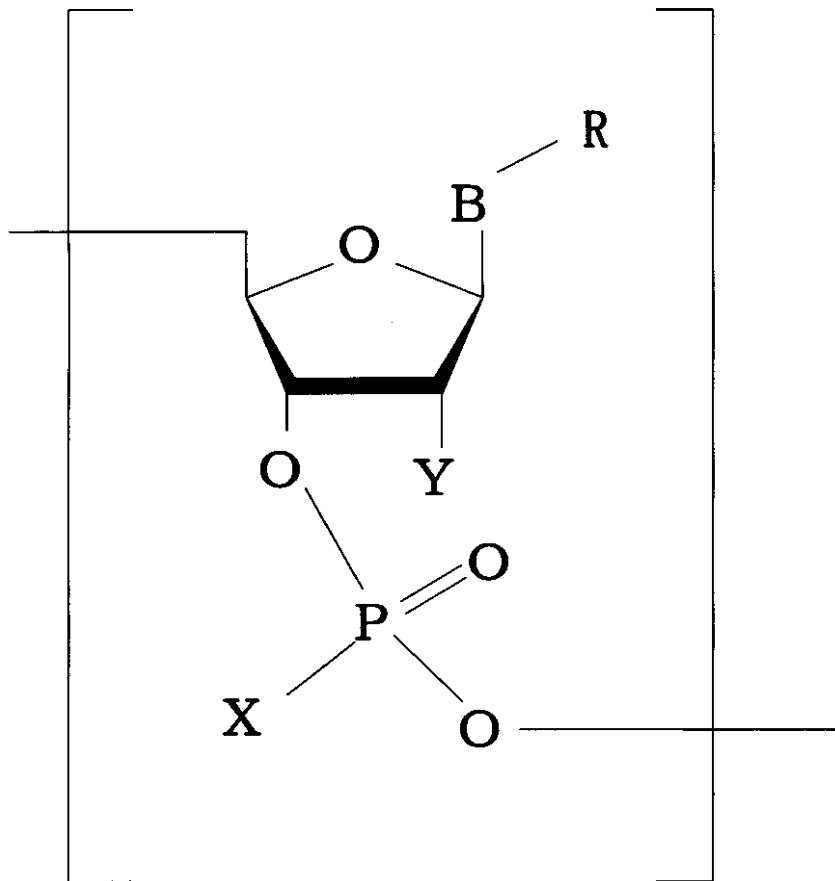
【0038】

$R^2$  は、核酸塩基のアミノ基に結合した置換基である。従って、 $B^2$  がアミノ基を有しない核酸塩基である場合には  $R^2$  は存在しない。具体的には、 $R^2$  は、水素、アシル基、チオアシル基、アルコキシカルボニル基、アルコキシチオカルボニル基、アルキル基で置換されていてもよいカルバモイル基、アルキル基で置換されていてもよいチオカルバモイル基、又はアルキル基（アルキル基、アルケニル基、アルキニル基又はフェニル基と結合したものを含む）である。アルキル基としては、炭素数が1～30個のアルキル基が好ましい。また、このアルキル基と結合するアルキル基、アルケニル基、アルキニル基としては、炭素数が1～30個のものが好ましい。

$B^1$  は下記一般式(2)で表わされる置換基を表す。

【0039】

【化11】



(2)

【0040】

上記一般式(2)において、 $B$  は天然又は非天然の核酸塩基である。具体的には、天然のアデニン、シトシン、グアニン、チミン、ウラシルのほかに人工塩基である7-デアザアデニン、7-デアザ-8-アザアデニン、3-デアザアデニン、6-チオグアニン、2-チオウラシル、2-チオチミン、7位に種々の置換基（アルキル、アルケニル、アルキニル、ハロゲン、ニトロ基、アシル基、水酸基等）が導入された7-デアザアデニン、8位に種々の置換基（アルキル、アルケニル、アルキニル、ハロゲン、ニトロ基、アシル基、水酸基等）が導入されたアデニン、8位に種々の置換基（アルキル、ハロゲン、ニトロ基、アシル基、水酸基等）が導入された7-デアザアデニン、7位及び8位に種々の置換基（アルキル、アルケニル、アルキニル、ハロゲン、ニトロ基、アシル基、水酸基等）が導入された7-デアザアデニン、7-デアザグアニン、7-デアザ-8-アザグアニン、

3 - デアザグアニン、7 位に種々の置換基（アルキル、アルケニル、アルキニル、ハロゲン、ニトロ基、アシル基、水酸基等）が導入された 7 - デアザグアニン、8 位に種々の置換基（アルキル、アルケニル、アルキニル、ハロゲン、ニトロ基、アシル基、水酸基）を導入したグアニン、8 位に種々の置換基（アルキル、アルケニル、アルキニル、ハロゲン、ニトロ基、アシル基、水酸基等）が導入された 7 - デアザグアニン、7 位と 8 位に種々の置換基（アルキル、アルケニル、アルキニル、ハロゲン、ニトロ基、アシル基、水酸基等）が導入された 7 - デアザグアニン、5 位に種々の官能基（アルキル、アルケニル、アルキニル、ハロゲン、ニトロ基、アシル基、水酸基等）が導入されたシトシン、シュードイソシトシン、1 位に種々の官能基（アルキル、アルケニル、アルキニル、アシル基、水酸基等）が導入されたシュードイソシトシン、5 位に種々の官能基（アルキル、アルケニル、アルキニル、ハロゲン、ニトロ基、アシル基、水酸基等）が導入されたウラシル、シュードウラシル、1 位に種々の官能基（アルキル、アルケニル、アルキニル、アシル基、水酸基等）が導入されたシュードウラシル等が挙げられる。

10

## 【0041】

R は、核酸塩基のアミノ基に結合した置換基である。従って、B がアミノ基を有しない核酸塩基である場合には R<sup>2</sup> は存在しない。具体的には、R は、水素、アシル基、チオアシル基、アルコキシカルボニル基、アルコキシチオカルボニル基、アルキル基で置換されていてもよいカルバモイル基、アルキル基で置換されていてもよいチオカルバモイル基、又はアルキル基（アルキル基、アルケニル基、アルキニル基又はフェニル基と結合したものを含む）である。アルキル基としては、炭素数が 1 ~ 30 個のアルキル基が好ましい。また、このアルキル基と結合するアルキル基、アルケニル基、アルキニル基としては、炭素数が 1 ~ 30 個のものが好ましい。カルバモイル基、チオカルバモイル基に結合するアルキル基としては、炭素数が 1 ~ 10 個程度のものが好ましい。

20

## 【0042】

X は酸素原子<sup>-</sup>、硫黄原子<sup>-</sup>、BH<sub>3</sub>、OCH<sub>3</sub>、又は CH<sub>3</sub> である。Y は水素、水酸基、アルコキシ基又は 2 - シアノエトキシ基エチル基であるか、又は Y とリボース 4' 位炭素とが結合し、環を形成していてもよい。

また、上記一般式 (1) 及び (2) において、B 及び B<sub>2</sub> は、少なくとも 1 個は、アミノ基を有する核酸塩基であり、R 及び R<sub>2</sub> は、少なくとも 1 個が水素でない。

30

## 【0043】

本発明のオリゴヌクレオチド誘導体は、プローブとして用いることができる。プローブとして使用することにより、試料中に含まれる標的核酸の特定位置の特定位置の塩基の種類を決定する等に用いることができる。

## 【0044】

本発明のオリゴヌクレオチド誘導体は、従来公知の方法を組み合わせることで製造することができる。本発明のオリゴヌクレオチド誘導体を製造するには、まず、オリゴヌクレオチド誘導体を構成するユニット（ホスホロアミダイト）毎の製造を行い、その後、連結することにより実施することができる。具体的には、後述する実施例に記載の方法によって製造することができる。

オリゴヌクレオチド誘導体を構成するユニットの製造は、従来公知の方法を組み合わせることで行うことができる。また、オリゴヌクレオチド誘導体を構成するユニット（ホスホロアミダイト）としては、市販されているものを用いてもよい。

40

## 【0045】

次に、本発明の DNA チップについて説明する。

本発明の DNA チップ（又はマイクロアレイ）は、上述した本発明のオリゴヌクレオチド誘導体の少なくとも 1 つ以上を固定化させてなる。固定化とは、吸着も含む概念であり、また共有結合等による結合も含まれる。

## 【0046】

DNA チップ（又はマイクロアレイ）を作成する際の基板表面への DNA のスポット径に特に制限はないが、通常は 50 ~ 200 μm 程度である。また、スポットピッチに特に

50

制限はなく、通常は100～500 μm程度である。

【0047】

本発明のDNAチップ(又はマイクロアレイ)は、一般式(1)で表わされるオリゴヌクレオチド誘導体のA<sub>1</sub>又はA<sub>2</sub>が担体と結合してなる。用いられる担体としては、例えば、微小多孔質ガラス、ポラスガラス等のガラス、ポリスチレン、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等が挙げられる。また、担体の形状は、板状(基板状)、ビーズ状等、どのような形状のものであってもよい。

【0048】

DNAチップは、プローブオンキャリア法を用いたものであってもよい。プローブオンキャリア法とは、DNA合成に最も適した素材とされる微小多孔質ガラス(CPG)上でDNAプローブを合成した後、プローブ分子をCPG担体から切り離すことなく、CPGに結合したDNAプローブを用いてSNPs検出に用いる手法のことを意味する。用いられるCPGのサイズは、好ましくは粒径が500から5,000である。このプローブオンキャリア法を用いることにより、DNAプローブの基板への固定化操作を省略することができるため、DNAチップ合成のハイスループット化が可能になる。また、DNA鎖伸長反応効率が99.8%以上と非常に高いため、DNAプローブの純度を高くすることができ、DNAチップの正確性が大幅に向上するという利点を有する。また、必要なDNAプローブを有するCPGは、大量生産が可能であり、コストの低減や、より質の高い品質管理が可能となる。更に、従来のDNAチップは、ほとんどがスライドガラス平面上で二次元的に検出を行っていたのに対し、プローブオンキャリア法では、CPGを用いているため、三次元的な検出が可能となり、DNAプローブの高密度な配置が可能となり、高い感度の検出が可能である。

【0049】

上述した、プローブオンキャリア法に、既存のDNA合成システムを適用した場合、核酸塩基部の保護基を除去する過程(アンモニア処理)で、リンカー部分のSi-O結合が切断されてしまい、約90%のDNAプローブが担体表面から脱離してしまうという現象が見られる。本発明のオリゴヌクレオチド誘導体をプローブオンキャリア法に適用した場合、保護基を除去する必要がないので、上記問題が解消される。

【0050】

担体表面に、本発明のオリゴヌクレオチド誘導体を固定化する場合には、一般式(1)で表わされるオリゴヌクレオチド誘導体のA<sub>1</sub>又はA<sub>2</sub>を、適当なリンカーを介して、例えば金属-硫黄結合等の方法によって結合させる方法が挙げられる。また、担体表面に固定化させるオリゴヌクレオチド誘導体は1種類のみならず、2種類以上であってもよい。なお、A<sub>1</sub>又はA<sub>2</sub>の中で、担体と結合していない方の置換基は、DNAチップ等として用いた際の検出に用いるために、蛍光分子、消光分子等を結合させてもよい。

【0051】

本発明のDNAチップ(又はマイクロアレイ)は、試料中の核酸の同定方法等に用いることができる。

方法としては、まず、試料と、本発明のDNAチップ(又はマイクロアレイ)とをハイブリダイズさせる。ハイブリダイズに際しては、DNAチップ(又はマイクロアレイ)に固定されたオリゴヌクレオチド誘導体に対し、試料を例えば0.1 μM～100 μM程度添加することができる。また、ハイブリダイズの条件は、ポリヌクレオチド誘導体の種類によって異なるが、例えば0～60の温度で、例えば1～30時間程度である。

【0052】

ハイブリダイズ終了後は、チップの種類に適した洗浄液で2～5回洗浄を行う。このように、本発明のオリゴヌクレオチド誘導体は、核酸の同定方法や遺伝子検出に用いることができる。遺伝子検出の手法としては、上述した、DNAチップ、マイクロアレイに加え、リアルタイムPCRが挙げられ、本発明のオリゴヌクレオチド誘導体は、上述した手法に用いることができる。

【0053】

次に、本発明の標的核酸中のヌクレオチドの同定方法について説明する。

本発明の標的核酸中のヌクレオチドの同定方法は、上記一般式(1)で表わされるオリゴヌクレオチド誘導体を、試料中の標的核酸とハイブリダイズさせる工程：及びハイブリダイズ産物を検出する工程を有する。

本発明の標的核酸中のヌクレオチドの同定方法においては、先ず、上記一般式(1)で表わされるオリゴヌクレオチド誘導体を、試料中の標的核酸とハイブリダイズさせる。用いられる試料としては、特に制限はなく、核酸を含むものであればよく、例えば、細胞抽出液、血液等の体液、PCR産物、オリゴヌクレオチド等が挙げられる。ハイブリダイズの条件は上述した通りである。

【0054】

本発明のオリゴヌクレオチド誘導体は、遺伝子の発現を抑制する、遺伝子発現制御方法に用いることができる。本発明の遺伝子発現制御方法は、発現を制御しようとする遺伝子の目的部位と結合するように設計し、細胞に投与することによって実施する。投与は、オリゴヌクレオチド誘導体を単独で投与してもよく、担体に結合させた状態で投与してもよい。投与方法は、経口的又は非経口的な方法、いずれであってもよく、非経口的投与としては、例えば局所に静脈内、筋肉内、皮下、経皮的に投与することができる。また、所望の組織を標的としてアンチセンスオリゴヌクレオチドを輸送するための手段や、標的細胞への導入を容易にするための手段、例えば薬理学的に許容されるカチオン性脂質等によるリポソームの利用等も可能である。投与されたオリゴヌクレオチドは、発現を制御しようとする遺伝子の目的部位と結合し、その遺伝子の発現が制御される。

【0055】

次に、本発明のヌクレオチド誘導体について説明する。

まず、本発明の第1の実施の形態にかかるヌクレオチド誘導体について説明する。

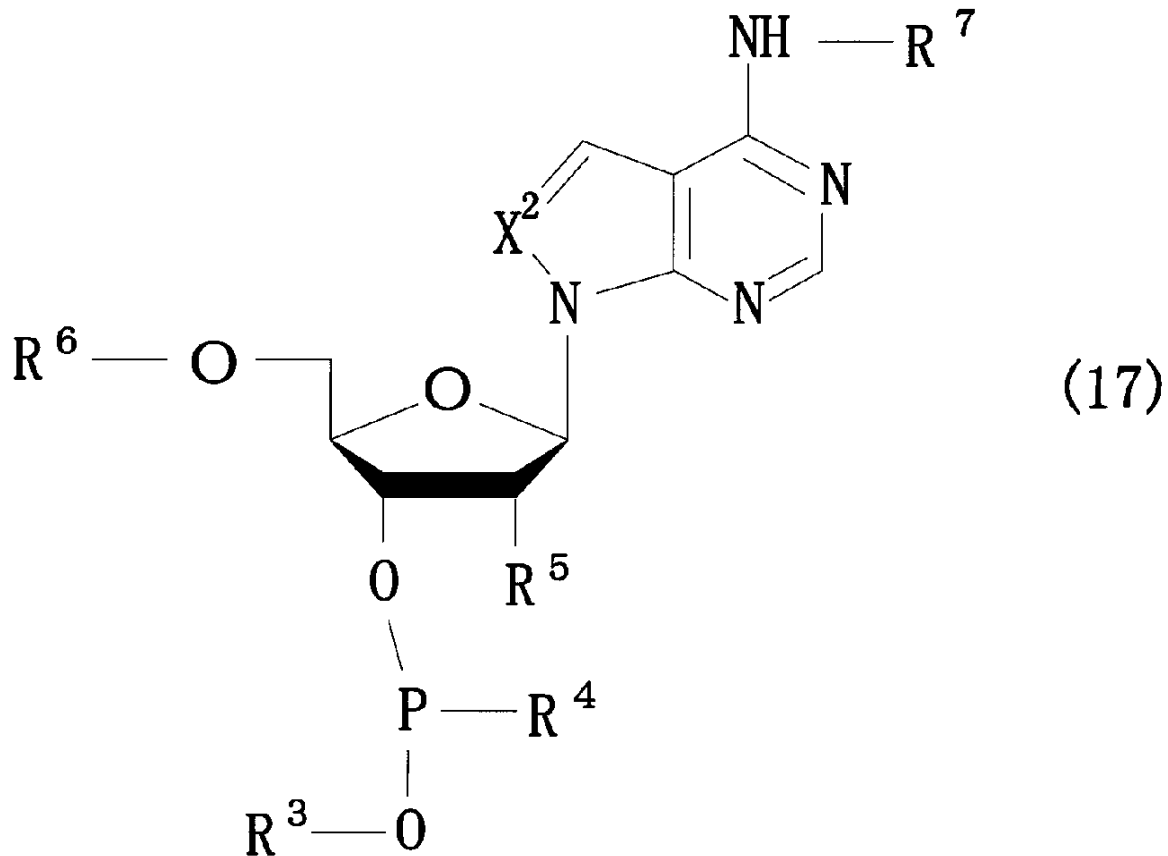
本発明の第1の実施の形態にかかるヌクレオチド誘導体は下記一般式(17)で表わされる。

【0056】

10

20

【化 1 2】



10

20

【0057】

上記一般式(17)において、 $R^3$ はリン酸保護基を表す。リン酸保護基としては、ホスホロアミダイト法に用いられるものであれば、特に制限なく用いることができ、例えば、メチル基、2-シアノエチル基、2-トリメチルシリルエチル基等が挙げられる。

30

【0058】

$R^4$ は窒素原子上に炭素数1~6個の同一又は異なるアルキル基が2個結合したジアルキルアミノ基を表す。なお、2個のアルキル基が互いに結合して環を形成していてもよい。このようなジアルキルアミノ基としては、例えば、ジエチルアミノ基、ジイソプロピルアミノ基、ジメチルアミノ基等が挙げられる。

【0059】

$R^5$ は、水素、アルコキシ基または炭素数1から10の同一または異なるアルキル基を有するトリアルキルシリルオキシ基、トリアルキルシリルオキシメトキシ基もしくはシアノエチル基であるか、又はリボースの4'位炭素と結合して環を形成していてもよい。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、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ルコキシ基も含む。

40

【0060】

また、 $R^6$ は水酸基の保護基を表す。水酸基の保護基としては、ホスホロアミダイト法で用いられるものであれば特に制限はなく、例えば、ジメトキシトリチル基、モノメトキシトリチル基等が挙げられる。

【0061】

50

R<sup>7</sup> は、アシル基、チオアシル基、アルコキシカルボニル基、アルコキシチオカルボニル基、アルキル基で置換されていてもよいカルバモイル基、アルキル基で置換されていてもよいチオカルバモイル基、又はアルキル基（アルキル基、アルケニル基、アルキニル基又はフェニル基と結合したものを含む）である。アルキル基としては、炭素数が1～30個のアルキル基が好ましい。また、このアルキル基と結合するアルキル基、アルケニル基、アルキニル基としては、炭素数が1～30個のものが好ましい。

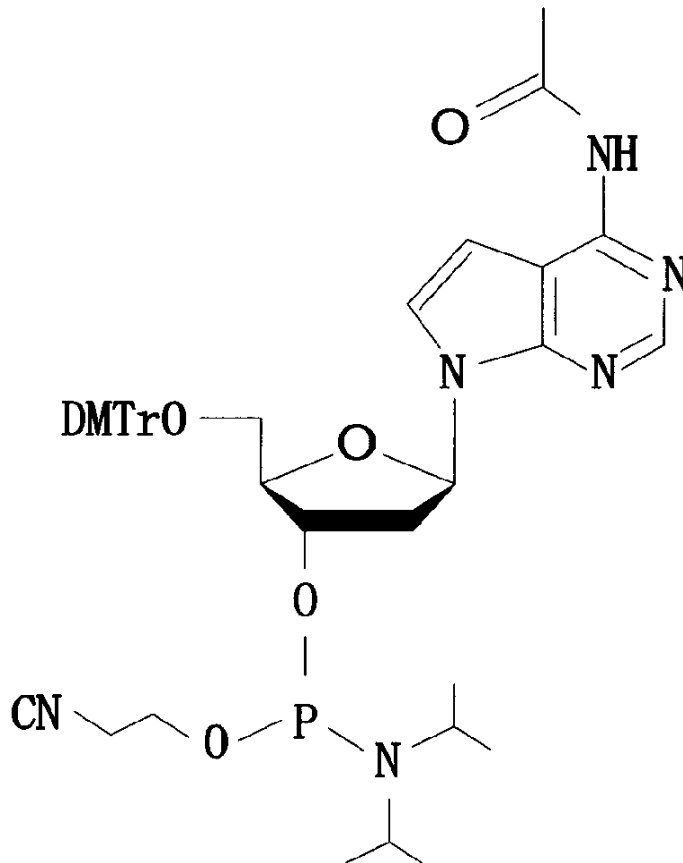
また、X<sup>2</sup>としては、窒素原子又は置換基を有してもいい炭素原子を表わす。

【0062】

一般式(17)で表わされる、本発明のヌクレオチド誘導体の具体例としては、下記式(20)で表わされる化合物(5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2'-デオキシ-6N-アセチル-7-デアザアデノシン-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ド)及び下記式(21)で表わされる化合物(5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2'-デオキシ-6N-アセチル-8-アザ-7-デアザアデノシン-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ド)等が挙げられる。

【0063】

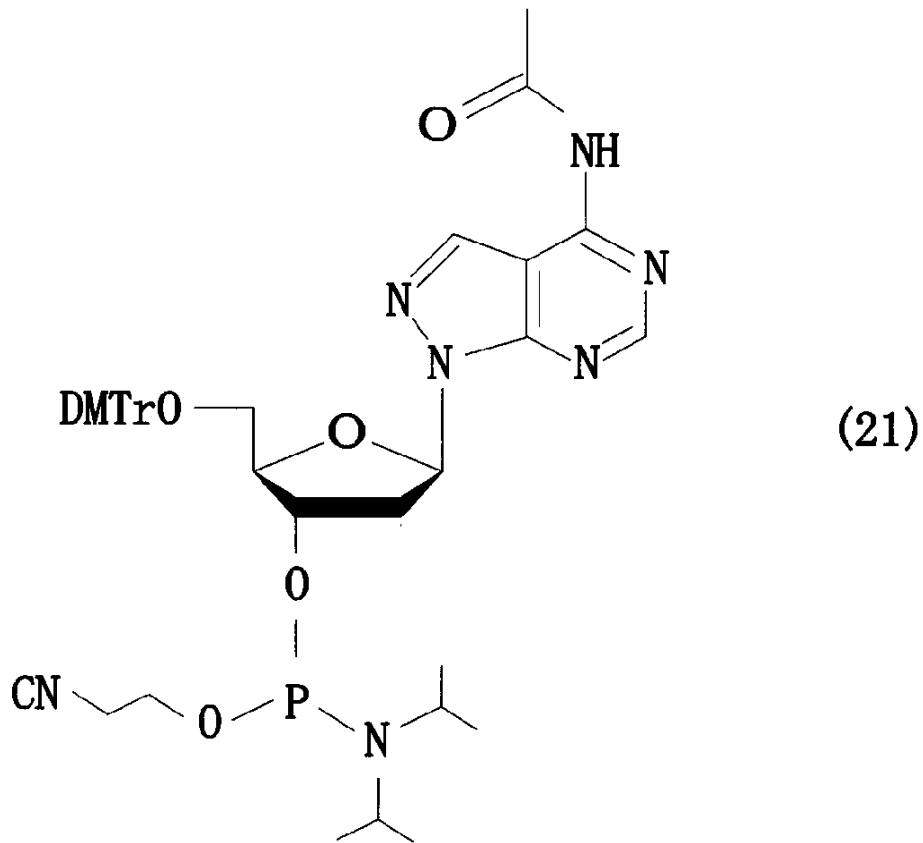
【化13】



(20)

【0064】

【化 1 4】



10

20

【 0 0 6 5 】

式(20)及び(21)において、DMTrはジメチルトリチル基を表す(以下、本明細書において同様である)。

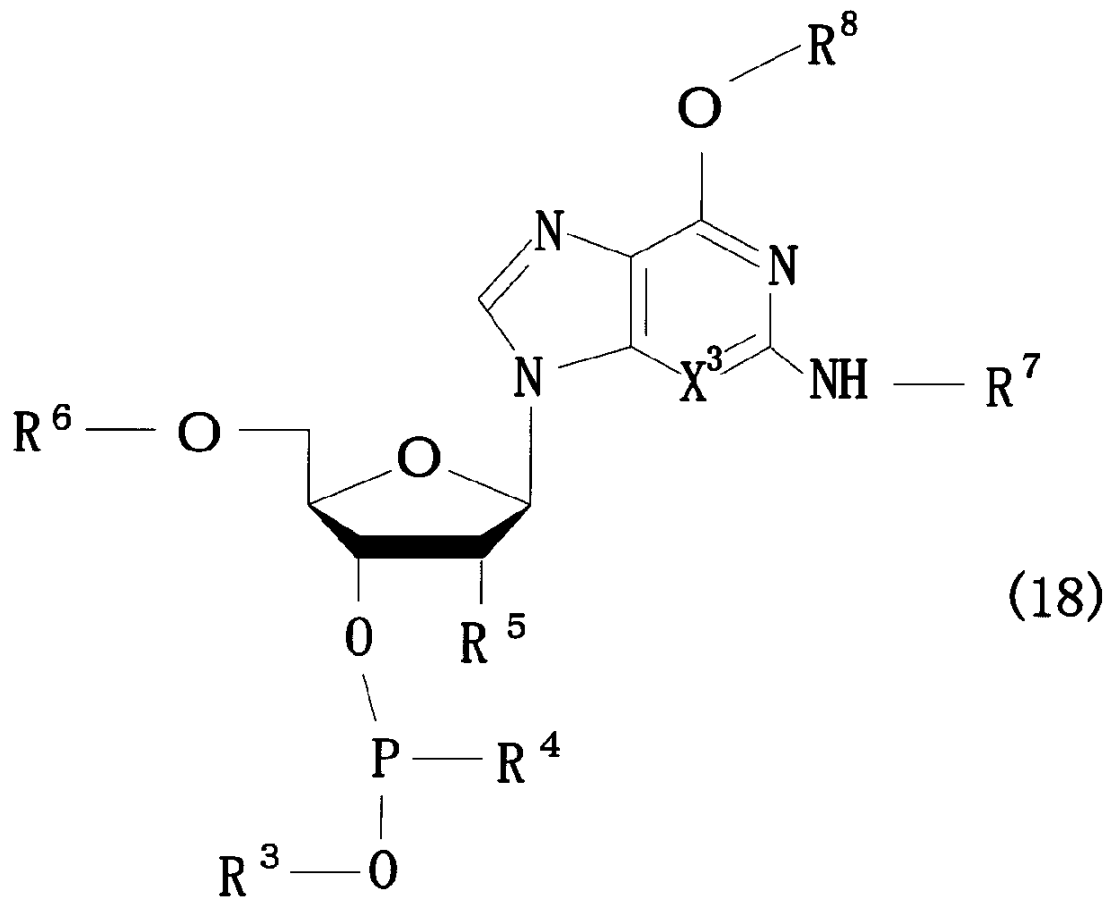
30

次に、本発明の第2の実施の形態にかかるヌクレオチド誘導体について説明する。

本発明の第2の実施の形態にかかるヌクレオチド誘導体は下記一般式(18)で表わされる。

【 0 0 6 6 】

【化 15】

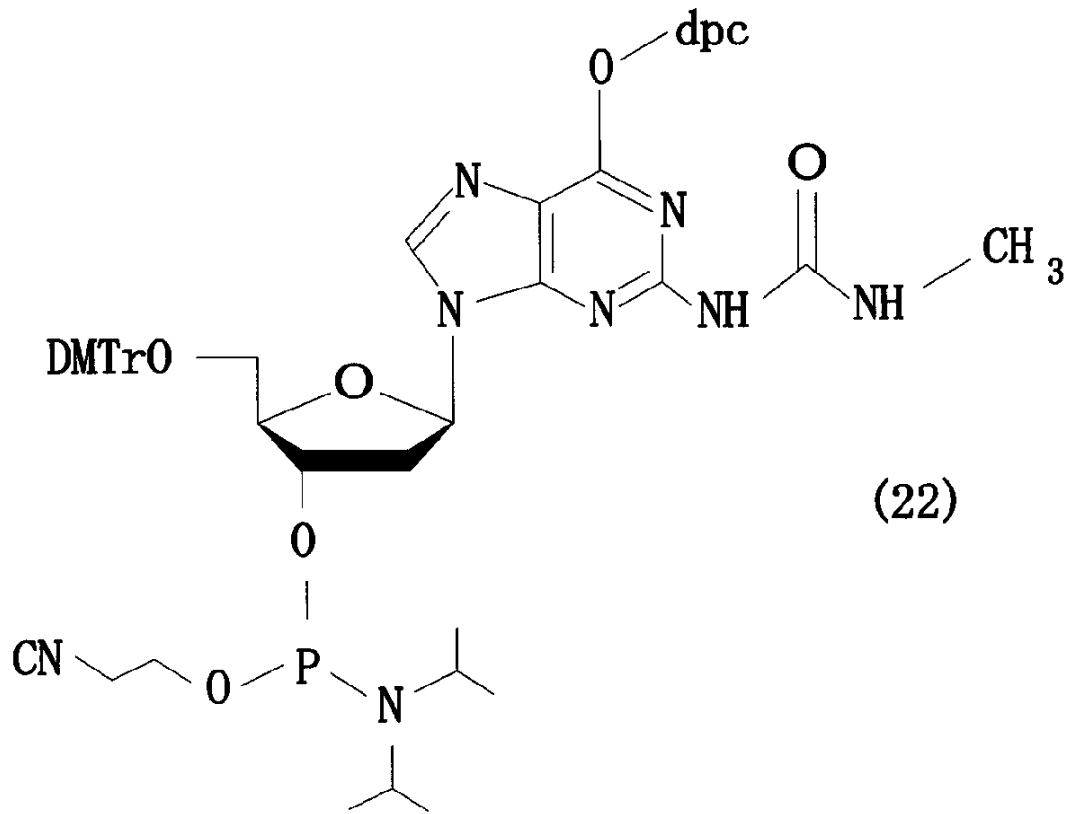


【0067】

上記一般式(18)において、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 及び $R^7$ は、上記式(17)において説明したのと同様である。 $X^3$ は、窒素原子又はメチンを表す。また、一般式(18)で表わされるヌクレオチド誘導体は、1以上のジフェニルカルバモイル基が結合していてもよい。また、 $R^8$ は、ジフェニルカルバモイル基もしくは、ケイ素上に同一又は異なるアリール基もしくはアルキル基を合計3つ有するシリル基である。 $R^8$ の具体例としては、例えば、*t*-ブチルジフェニルシリル基等が挙げられる。上記一般式(18)で表わされる、本発明のヌクレオチド誘導体の具体例としては、下記式(22)で表わされる化合物(5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-6-O-ジフェニルカルバモイル-2N-メチルカルバモイルデオキシグアノシン-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ド)、下記式(23)で表わされる化合物(2-N-カルバモイル-5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル))-6-O-ジフェニルカルバモイルデオキシグアノシン-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ド)、及び下記式(24)で表わされる化合物(5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-6-O-ジフェニルカルバモイル-2N-メチルチオカルバモイルデオキシグアノシン-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ド)等が挙げられる。

【0068】

【化 1 6】

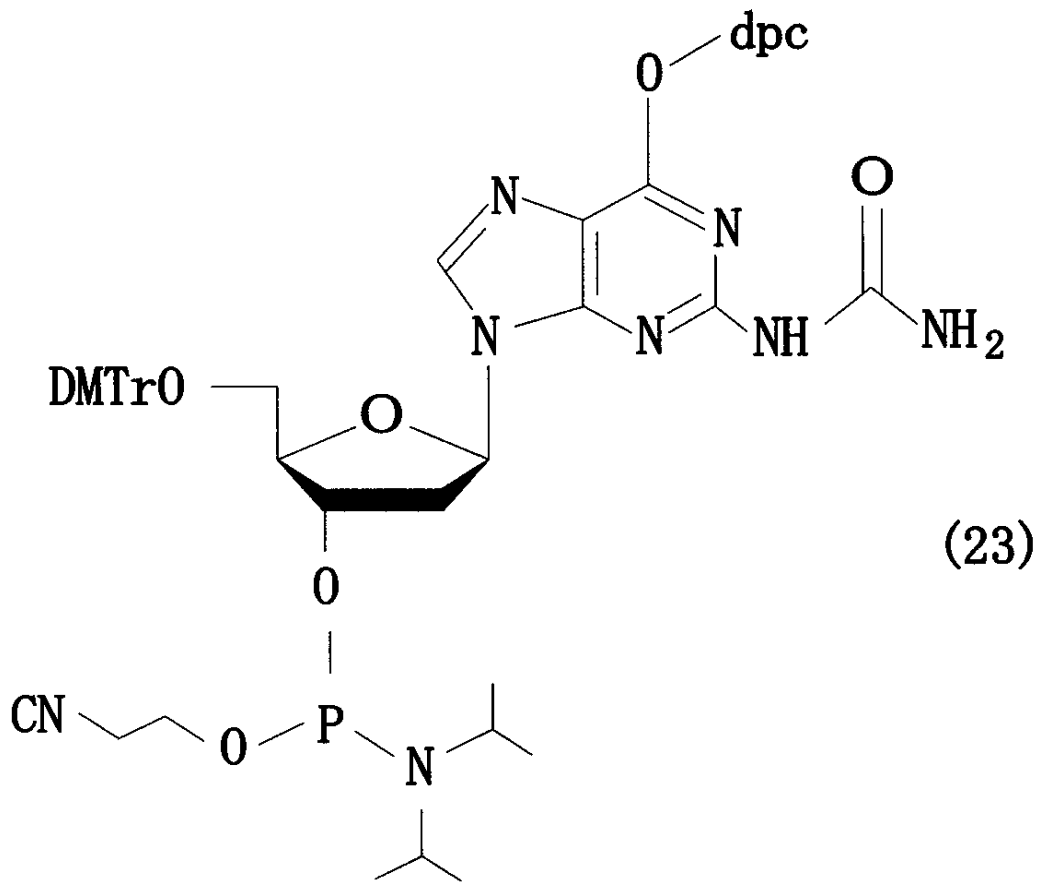


10

20

【 0 0 6 9 】

【化 17】

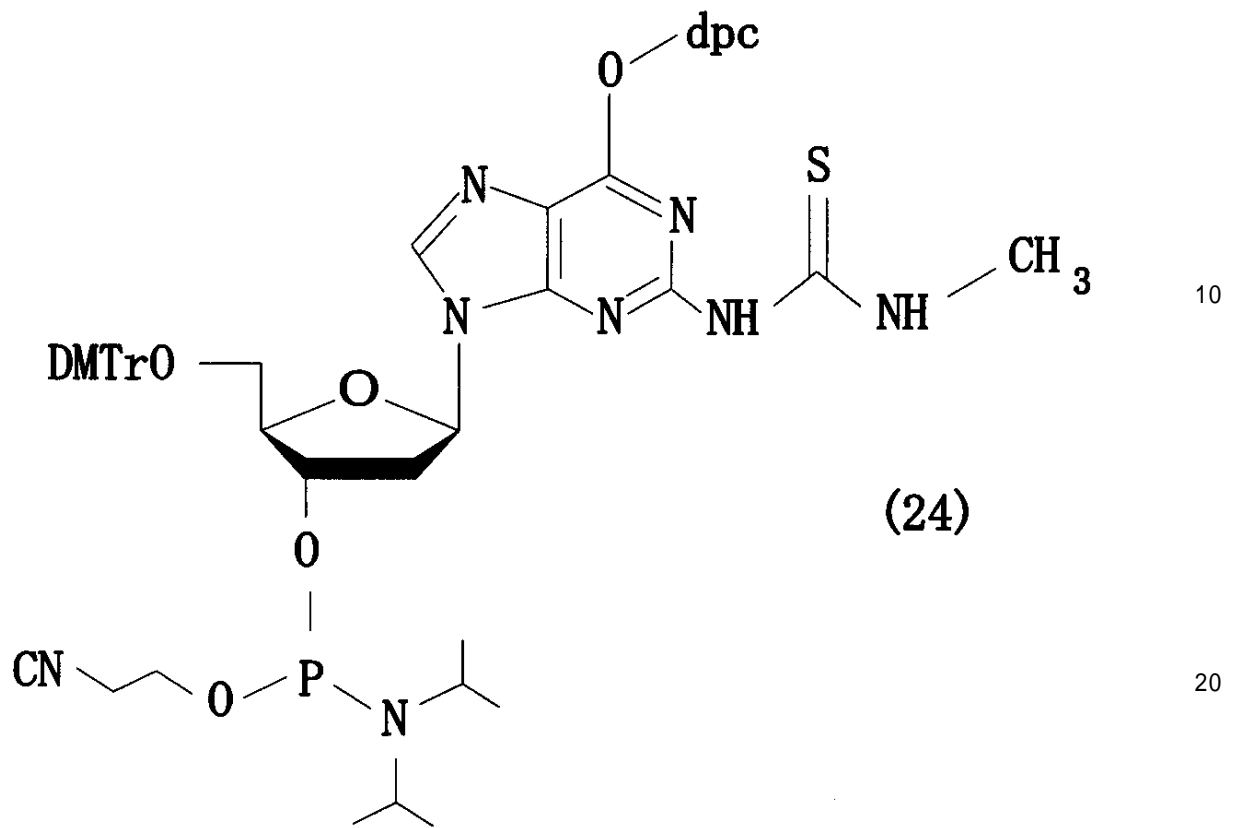


10

20

【0070】

【化 1 8】

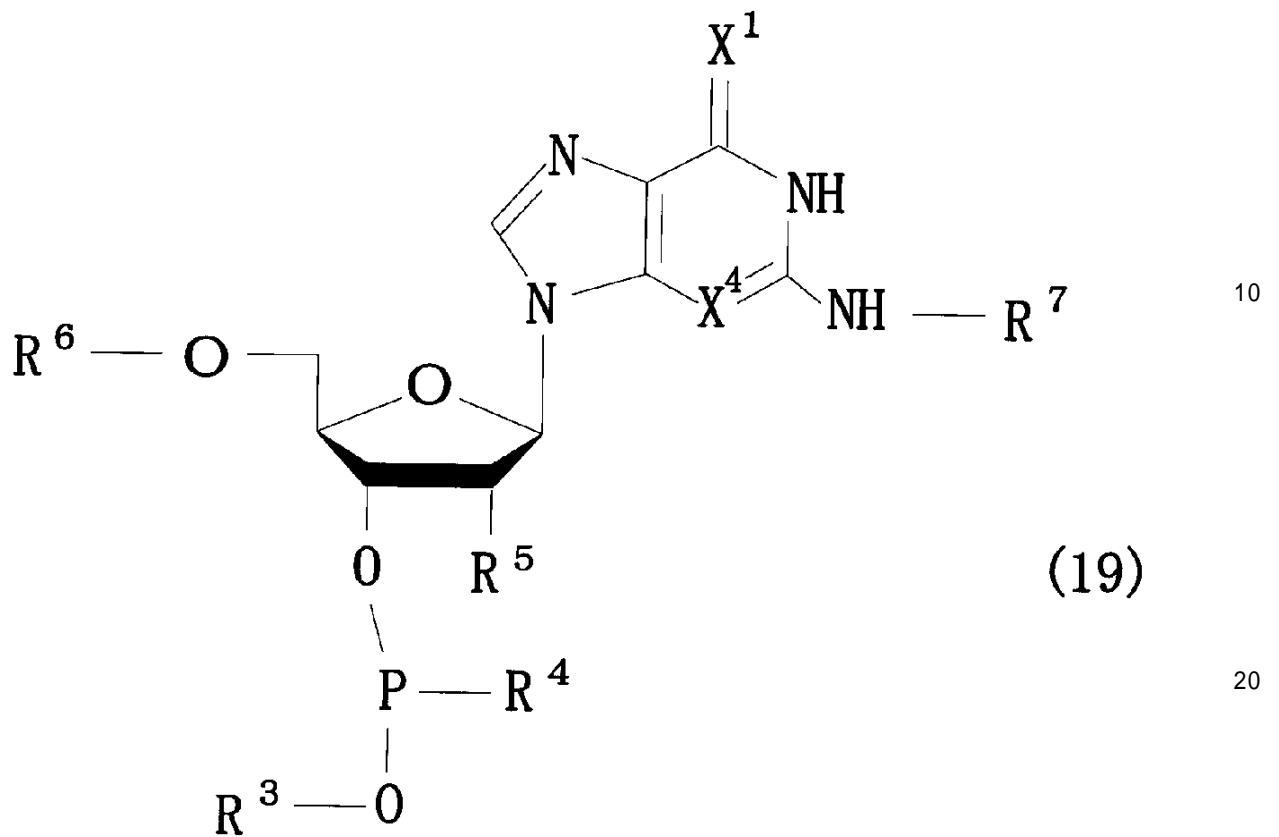


次に、本発明の第3の実施の形態にかかるヌクレオチド誘導体について説明する。  
 本発明の第3の実施の形態にかかるヌクレオチド誘導体は下記一般式(19)で表わされる。

【0071】

30

【化 19】

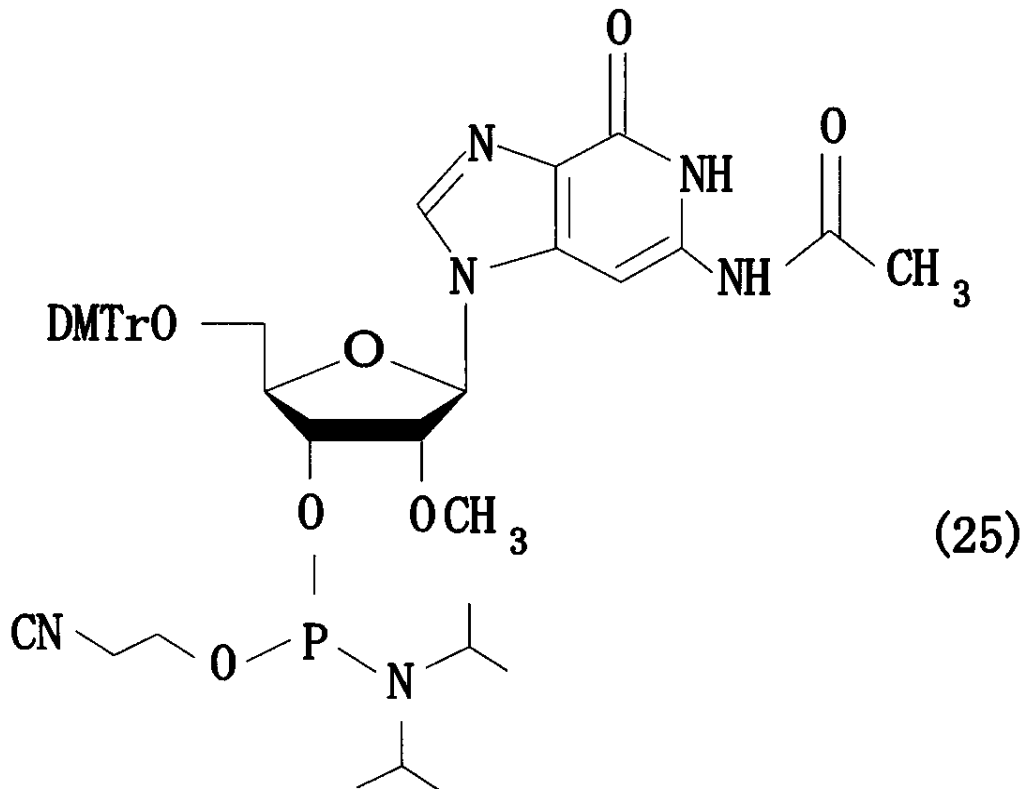


上記一般式(19)において、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 及び $R^7$ は、上記式(17)において説明したのと同様である。また、一般式(19)において、 $X$ は窒素原子もしくはメチンであり、 $X^1$ は酸素原子又は硫黄原子であり、 $X^4$ は窒素原子又はメチンであり、また、一般式(19)で表わされるヌクレオチド誘導体は、1以上のジフェニルカルバモイル基が結合していてもよい。一般式(19)で表わされる、本発明のヌクレオチド誘導体の具体例としては、下記式(25)で表わされる化合物(2-N-アセチル-5'-O-

30

【0072】

【化 20】



10

20

【0073】

本発明のヌクレオチド誘導体は、上述した、本発明のオリゴヌクレオチド誘導体を製造するための原料として用いることができる。

【実施例】

【0074】

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。

30

実施例 1

デオキシグアノシン(1.33g 5mmol)をピリジン共沸で脱水し、30mlの無水メタノールに溶解した後、ジメトキシジメチルアミノメタン(1.81ml、1.78g 15mmol)を加え、55℃で15時間、撹拌を行った。撹拌終了後、室温まで反応溶液を冷却し、沈殿物をろ過して回収し、白色粉末の生成物を得た。次に、得られた白色粉末をピリジン共沸で脱水し、50mlの無水ピリジンに溶解した。得られた溶液にジメトキシトリチルクロライド(1.86g 5.5mmol)を加え、室温で12時間撹拌した後、反応溶液に10mlのメタノールを加え、さらに5分間撹拌した。次いで、この反応溶液を200mlのクロロホルムで希釈し、5質量%炭酸水素ナトリウム水溶液200mlで3回抽出操作を行った。有機層を回収し、無水硫酸ナトリウムで乾燥してろ過し、溶媒を減圧留去させた。得られた粗生成物をジイソプロピルエーテルを用いて結晶化させ、ろ過し、白色粉末の生成物を回収した。

40

【0075】

次いで、得られた白色粉末の生成物に、100mlのピリジン-アンモニア水溶液(1:1 v/v)に加え、室温で15時間、撹拌を行った。撹拌終了後、アンモニアを減圧留去し、200mlのクロロホルムで希釈し、5質量%炭酸水素ナトリウム水溶液200mlで3回抽出操作を行った。次いで、有機層を回収し無水硫酸ナトリウムで乾燥してろ過し、溶媒を減圧留去させた。得られた粗生成物を、ジイソプロピルエーテルを用いて結晶化させる過し、白色粉末の5'-0-(ジメトキシ)トリチル-2'-デオキシグアノシンを回収した(1.65g、収率：58%)。

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 2.22 - 2.31 (m, 1H), 2.57 - 2.67 (m, 1H), 3.09 - 3.15 (m, 2H)

50

, 3.71( s, 6H ), 3.81 - 3.91( m, 1H ), 4.32 - 4.35( m, 1H ), 5.28( d, 1H, J = 4.4 Hz ), 6.12( dd, 1H, J = 6.3, 6.8 Hz ), 6.42(br s, 2H), 6.81(dd, 4H, J = 6.8, 8.8 Hz ), 7.17-7.34( m, 9H ), 7.76( s, 1H ), 10.58( br s, 1H )

【 0 0 7 6 】

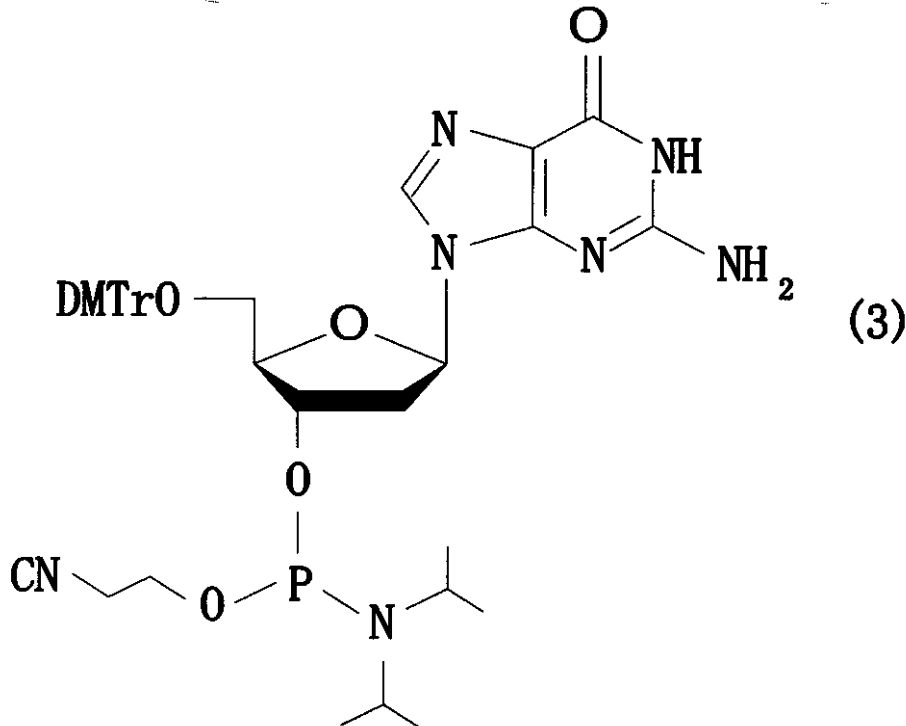
上述のようにして得られた5'-O-(ジメトキシ)トリチル-2'-デオキシグアノシン(2.85 g 5mmol)をピリジン、トルエン、ジクロロメタンの順で共沸して脱水後、10mlの無水テトラヒドロフラン(THF)に溶解させた後、ジイソプロピルエチルアミン(1.23ml 7.5 mmol)を加えた。この溶液を-78℃まで冷却し、(2-シアノエトキシエチル)(N,N-ジイソプロピルアミノ)クロロホスフィン(1.23ml 5.5mmol)を加えてから、徐々に室温まで戻した。1時間攪拌した後、反応溶液を20mlの水に注ぎ、200mlのクロロホルムで希釈し、5質量%炭酸水素ナトリウム水溶液200mlで3回抽出操作を行った。有機層を回収し無水硫酸ナトリウムで乾燥してろ過し、溶媒を減圧留去させた。得られた粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー(1% トリエチルアミン)により精製し、ヘキサン-クロロホルム(クロロホルムを50~100%に変化させる)、次いで、クロロホルム-メタノール(メタノールを0~3%に変化させる)を用いて溶出し、溶媒を留去し、白色固体の5'-O-(ジメトキシ)トリチル-2'-デオキシグアノシン 3'-O-(2-シアノエトキシエチル N,N-ジイソプロピルホスホロアミダイト)(下記式(3))で表わされる化合物を得た。3.35g、収率：92%)。

$^{31}\text{P}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 149.4 149.2

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 1.01 - 1.25(m, 12H ), 2.41( t, 1H, J = 10.5 Hz ), 2.43 - 2.77( m, 3H ), 3.31 - 3.80( m, 12H), 4.11 - 4.18( m, 1H ), 4.55 - 4.61( m, 1H ), 6.43 - 6.49( m 1H ), 6.74 - 6.80( m, 4H ), 7.10 - 7.36( m, 11H ), 760 - 7.69( m, 1H )

【 0 0 7 7 】

【化 2 1】



【 0 0 7 8 】

#### 実施例 2

2'-デオキシアデノシン-水和物(4g, 15mmol)を酢酸ナトリウム緩衝液(pH 4.3)75

10

20

30

40

50

mlに懸濁させた。この溶液に、臭素(0.92ml, 18mmol)を溶解させた酢酸ナトリウム緩衝液(pH 4.3)75mlを滴下し、室温で2時間攪拌した。次いで、5%チオ硫酸ナトリウム水溶液を50ml加え、次いで、2M水酸化ナトリウム水溶液を50ml加えた。得られた沈殿物をろ過することにより回収し、水、エタノールで十分に洗浄し、8-プロモ-2'-デオキシアデノシンを得た(4.2g, 収率:83%)。

<sup>1</sup>H NMR (DMSO): 2.08 - 2.16(m, 1H), 3.05 - 3.15(m, 1H), 3.41 - 3.48(m, 1H), 3.54 - 3.61(m, 1H), 3.78 - 3.83(m, 1H), 4.40 - 4.41(m, 1H), 4.91(s, 1H), 5.29(s, 1H), 5.43(brs, 2H), 6.13(t, 1H, J = 7.25 Hz), 8.12(s, 1H)

【0079】

上述のようにして得られた8-プロモ-2'-デオキシアデノシン(4.2g, 12.5mmol)を80%酢酸-無水酢酸(1:1, v/v, 250ml)に溶解し、この溶液に酢酸ナトリウム(18.5g, 225mmol)を加えた。次いで、120℃で3時間攪拌した後、酢酸エチル-水(500ml/500ml)で抽出操作をおこない、有機層を回収し溶媒を減圧下留去した。得られた組成物を28%アンモニア水-ピリジン(1:1, v/v, 250ml)に溶解し、室温で5時間攪拌した。次いで、この反応溶媒を減圧下留去し、得られた固体をエタノールで十分に洗浄・ろ過し、2'-デオキシ-7,8-ジヒドロ-6-N-アセチル アデノシン-8-オンを得た(1.9g, 収率:55%)。

<sup>1</sup>H NMR (DMSO): 2.05 - 2.12(m, 1H), 2.21(s, 3H), 3.03 - 3.16(m, 1H), 3.45 - 3.48(m, 1H), 3.55 - 3.60(m, 1H), 3.78 - 3.80(m, 1H), 4.38 (brs, 1H), 4.81(brs, 1H), 5.22(s, 1H), 6.15(t, 1H, J = 7.25 Hz), 8.12(s, 1H), 10.20(brs, 1H), 10.83(brs, 1H).

【0080】

上述のようにして得られた2'-デオキシ-7,8-ジヒドロ-6-N-アセチル アデノシン-8-オン(1.5g, 5mmol)をピリジン共沸で脱水し、50mlの無水ピリジンに溶解した後、この溶液にジメトキシトリチルクロライド(1.86g 5.5mmol)を加えた。次いで、この溶液を室温で4時間攪拌した後、反応溶液に10mlのメタノールを加え、さらに5分間攪拌した。次いで、この反応溶液を200mlのクロロホルムで希釈し、5質量%炭酸水素ナトリウム水溶液200mlで3回抽出操作を行った。有機層を回収し無水硫酸ナトリウムで乾燥してろ過し、溶媒を減圧留去させた。得られた粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィーにより精製し、クロロホルム(0.5%ピリジン)に0~3%メタノールのグラジエントをかけて溶出し、溶媒を留去し、白色固体の2'-デオキシ-5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-7,8-ジヒドロ-6-N-アセチル アデノシン-8-オンを得た(2.45g, 収率:80%)。

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 2.11 - 2.15(m, 1H), 2.21(s, 3H), 3.04 - 3.15(m, 1H), 3.70(s, 6H), 3.81 - 3.91(m, 1H), 4.32 - 4.35(m, 1H), 6.13(dd, 1H, J = 6.2, 6.7 Hz), 6.81(dd, 4H, J = 6.8, 8.8 Hz), 7.10 - 7.28(m, 9H), 8.20(s, 1H), 10.20(brs, 1H), 10.82(brs, 1H).

【0081】

上述のようにして得られた2'-デオキシ-5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-7,8-ジヒドロ-6-N-アセチル アデノシン-8-オン(3.06g 5mmol)をピリジン、トルエン、ジクロロメタンの順で共沸して脱水後、10mlの無水THFに溶解させた後、ジイソプロピルエチルアミン(1.23ml 7.5mmol)を加えた。この溶液を-78℃まで冷却し、(2-シアノエトキシ基エチル)(N,N-ジイソプロピルアミノ)クロロホスフィン(1.23ml 5.5mmol)を加えてから、徐々に室温まで戻した。1時間攪拌した後、反応溶液を20mlの水に注ぎ、200mlのクロロホルムで希釈し、5質量%炭酸水素ナトリウム水溶液200mlで3回抽出操作を行った。有機層を回収し無水硫酸ナトリウムで乾燥してろ過し、溶媒を減圧留去させた。この粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー(1%トリエチルアミン)により精製し、ヘキサン-クロロホルム(クロロホルムを50~100%に変化させる)、クロロホルム-メタノール(メタノールを0~3%に変化させる)グラジエントをかけて溶出し、溶媒を留去し、2'-デオキシ-5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-7,8-ジヒドロ-6-N-アセチル アデノシン-8-オン3'-O-(2-シアノエトキシ基エチル N,N-ジイソプロピルホスホロアミダイト(下記式(4)で表わされる化合物)白色固体を得た(3.57g, 収率:88%)。

10

20

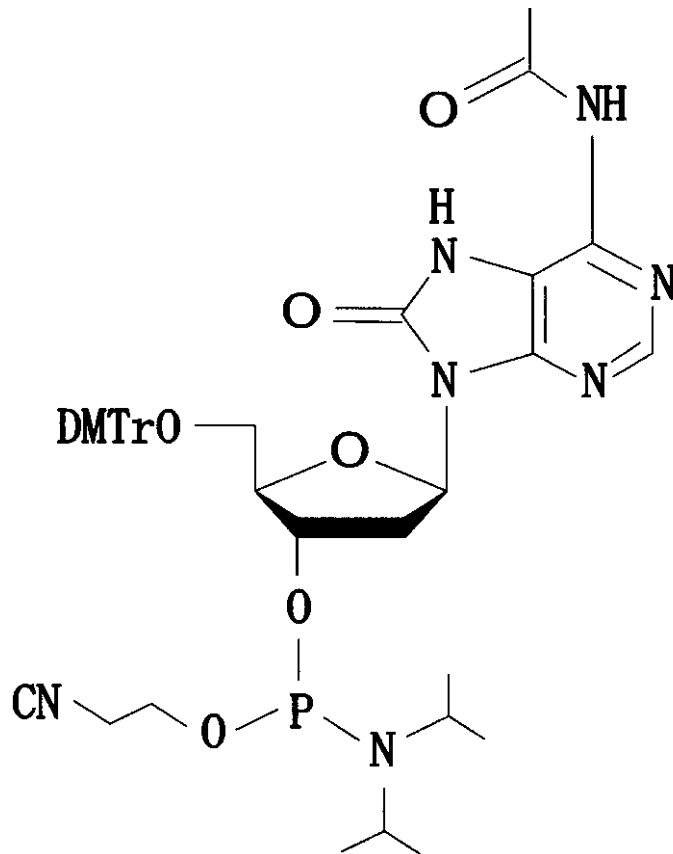
30

40

50

【 0 0 8 2 】

【 化 2 2 】



10

20

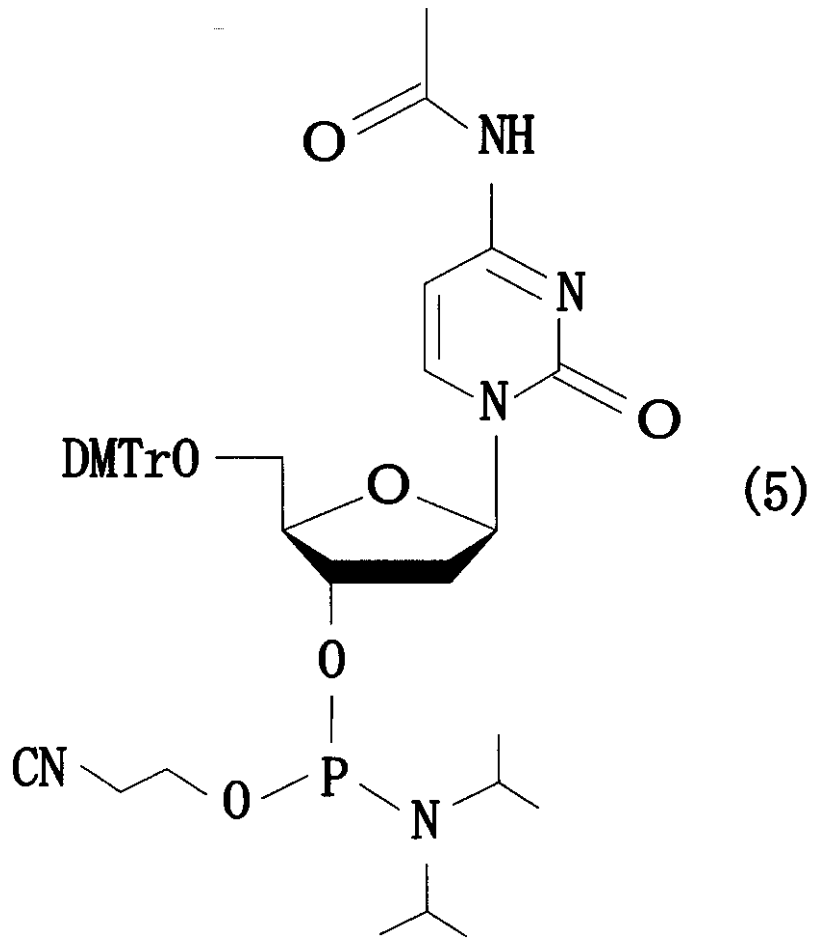
【 0 0 8 3 】

上記式(3)で表わされる化合物(ホスホロアミダイト)、上記式(4)で表わされる化合物(ホスホロアミダイト)、下記式(5)で表わされる化合物、及び下記式(6)で表わされる化合物を用いてプローブの作成を行った。なお、下記式(5)で表わされる化合物及び下記式(6)で表わされる化合物は市販のものを用いた。下記式(5)で表わされる化合物としては、GLEN RESERCH社製、商品名「P/N 10-1015-02 Ac-dC-CE Phosphoramidite」を、下記式(6)で表わされる化合物としては、GLEN RESERCH社製、商品名「P/N 10-1030-02 dT-CE Phosphoramidite」を用いた。

30

【 0 0 8 4 】

【化 2 3】



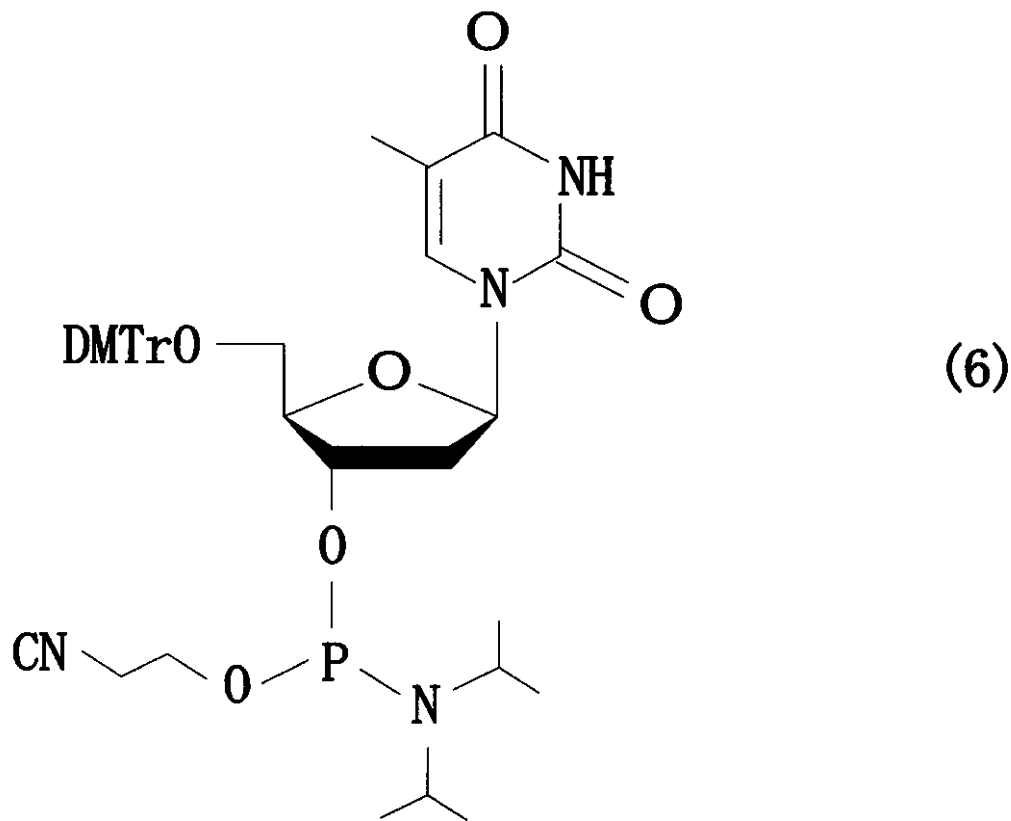
10

20

【 0 0 8 5】

30

【化24】



10

20

【0086】

プローブの合成は、Applied Biosynthesis Incの自動合成機、商品名「DNA/RNA Synthesizer 392」を用いて行い、配列GCCTCCGGTTCAT（配列番号：1）で表わされるプローブを作成した。プローブの自動合成機による合成は、末端に16-ヒドロキシヘキサデカン酸を導入した微小多孔質ガラス（CPG）固相担体（10mg、10 $\mu$ mol/g）を用いて行った。合成各鎖伸長サイクルは、以下の表1に示す通りであり、縮合反応では、ベンゾイミダゾリウムトリフラート（BIT）を用いた。

30

【0087】

【表1】

工程	操作	試薬	時間
1	洗浄	CH <sub>3</sub> CN	0.2
2	脱トリチル化	3% Cl <sub>3</sub> CCOOH/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1.5
3	洗浄	CH <sub>3</sub> CN	0.4
4	結合	0.1M amidide + 0.2M BIT in CH <sub>3</sub> CN	1.0
5	洗浄	CH <sub>3</sub> CN	0.2
6	酸化	0.2M I <sub>2</sub> in Py-H <sub>2</sub> O-THF (20:2:78, v/v/v)	0.5
7	洗浄	CH <sub>3</sub> CN	0.4

40

【0088】

次いで、鎖伸長後に、5'末端の4,4'-ジメトキシトリチル基を残したままで、1分間の1,8-ジアザビシクロ〔5,4,0〕ウンデセン（DBU）-アセトニトリル（1:9, v/v）処理により、リン酸部のシアノエチル基を除去した。次いで、4,4'-ジ

50

メトキシトリチル基を1分間の3%濃度のトリクロロ酢酸の塩化メチレン溶液(2ml)で除去し、塩化メチレン(1ml×3回)、アセトニトリル(1ml×3回)及び0.1M酢酸アンモニウム水溶液の淳で固相担体の洗浄を行い、プローブが結合したCPGを得た。

#### 【0089】

上述のようにして得られたプローブが結合したCPGを十分に乾燥させた後、ATGAACCGAGGC(配列番号:2)、ATGAACCAGAGGC(配列番号:3)及びATGAACTGGAGGC(配列番号:4)の配列を有する3種類の蛍光オリゴヌクレオチドを準備した。なお、それぞれのオリゴヌクレオチドは、3'末端がフルオレセインで標識されたものである。このオリゴヌクレオチド溶液(250nMオリゴヌクレオチド、100mMリン酸バッファー、1M NaCl、pH7.0)0.25mlに、上記プローブが結合したCPGを浸漬させた。50の温度で10時間攪拌した後、オリゴヌクレオチド溶液を除去し、リン酸バッファー(100mMリン酸バッファー、1M NaCl、pH7.0)0.25mlを加え、50の温度で1時間攪拌した後、リン酸バッファーを除去し、CPGの蛍光測定を行った。

10

#### 【0090】

蛍光測定は、OLYMPUS社製、落射蛍光システムを用いて、470~490nmの光を照射し、510nm以上の光を、浜松ホトニクス社製 デジタルCCDカメラ(ORCA-ER)を用いて撮影し、蛍光輝度を測定した。結果は、配列番号:2のオリゴヌクレオチドを用いた場合のみが高い蛍光輝度を示した。すなわち、露光時間300μsで測定した場合、平均の蛍光輝度は、配列番号:2のオリゴヌクレオチドを用いた場合が2375、配列番号:3のオリゴヌクレオチドを用いた場合が337、配列番号:4のオリゴヌクレオチドを用いた場合が714であり、配列番号:2で表わされるオリゴヌクレオチドの特異性が示された。

20

#### 【0091】

上記の結果から、上記プローブが結合したCPGは、遺伝子の検出に用いることが明らかである。特に、1塩基のみが異なっているオリゴヌクレオチドを区別することができることがわかり、SNPsの解析にも使用し得るものであることがわかった。

#### 【0092】

##### 実施例3

790mgの3-デアザグアノシン(下記式(7)で表わされる化合物)を1mlの無水DMFで供沸し、次いで、20mlの無水N,N-ジメチルホルムアミド(DMF)に溶解し、室温にした後、1.87mlのN,Nジメチルホルムアミドジメチルアセタールを加え、5時間攪拌した。溶媒を減圧下留去した後、メタノールを加え、沈殿を生じさせた。この沈殿を濾過により精製し、よく乾燥させ、2-N-((ジメチルアミノ)メチレン)-3-デアザグアノシン(下記一般式(8)で表わされる化合物)を得た(789mg、収率:83%)。

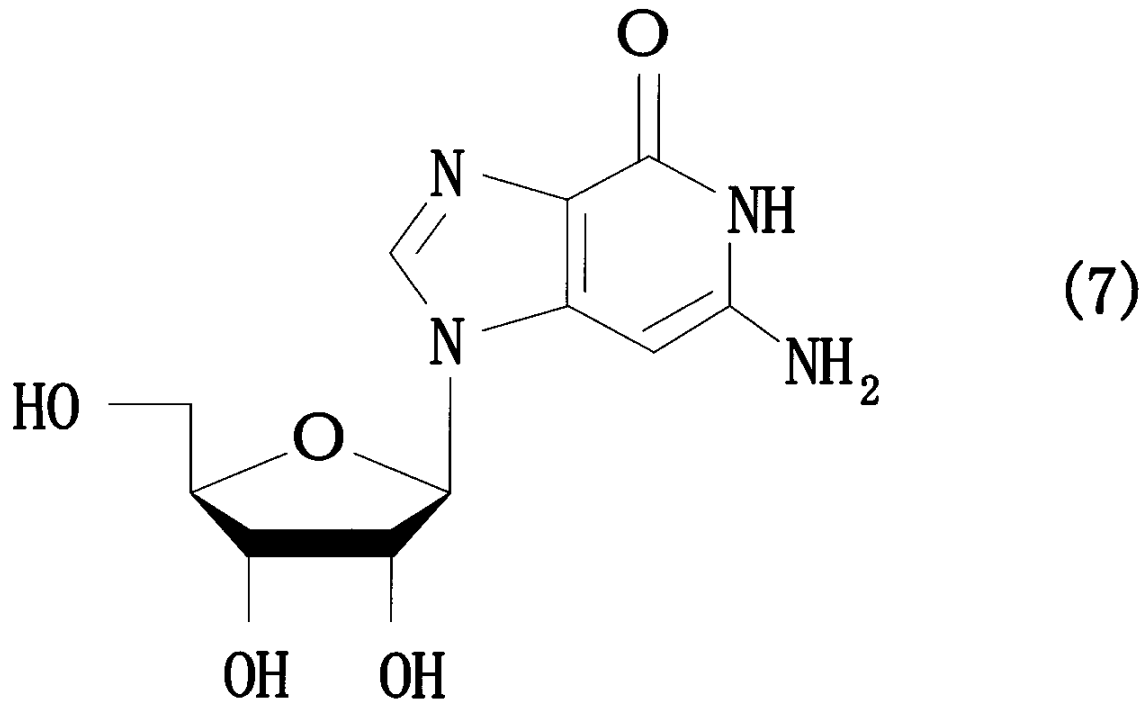
30

$^1\text{H NMR}$  (DMSO-d<sub>6</sub>) 2.9-3.1(6H, NCH<sub>3</sub>), 3.5-4.4(5H, 2'H, 3'H, 4'H, 5'H), 5.0-6.1(5H, 1'H, 2'OH, 3'OH, 5'OH, 3H), 7.9-8.0(2H, 8H, NCHN), 10.6-10.7(1H, 1H)

#### 【0093】

40

【化25】

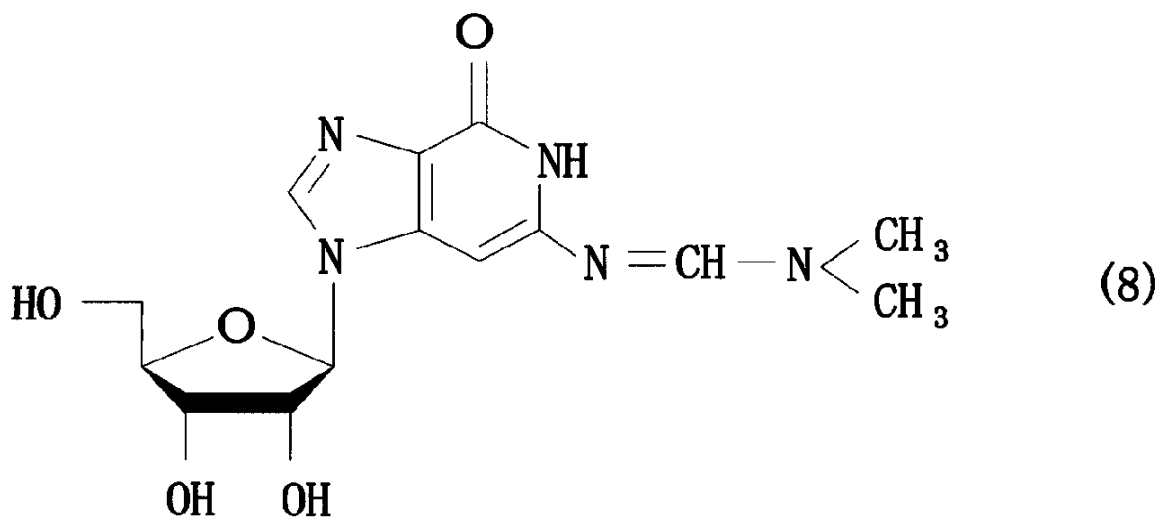


10

20

【0094】

【化26】



30

40

【0095】

次いで、得られた2-N-((ジメチルアミノ)メチレン)-3-デアザグアノシン(337 mg)を、1 mlの無水ピリジンで共沸(x3)し、次いで、6 mlの無水ピリジンに溶解し、0 で342 μlの1,1,3,3テトライソプロピルジシロキサジクロライド1,3-ジイルを加え、4時間撹拌した。4時間撹拌した後、1 mlの水及び1 mlのメタノールを加え反応を停止させた。反応溶液を50 mlの酢酸エチル/食塩水(1/1)で3回抽出した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を減圧下留去した後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(N60球状中性シリカゲル)を用いてメタノール/クロロホルム(メタノール濃度を2% 4%に変化させる)で精製し、3',5'-O-(1,1,3

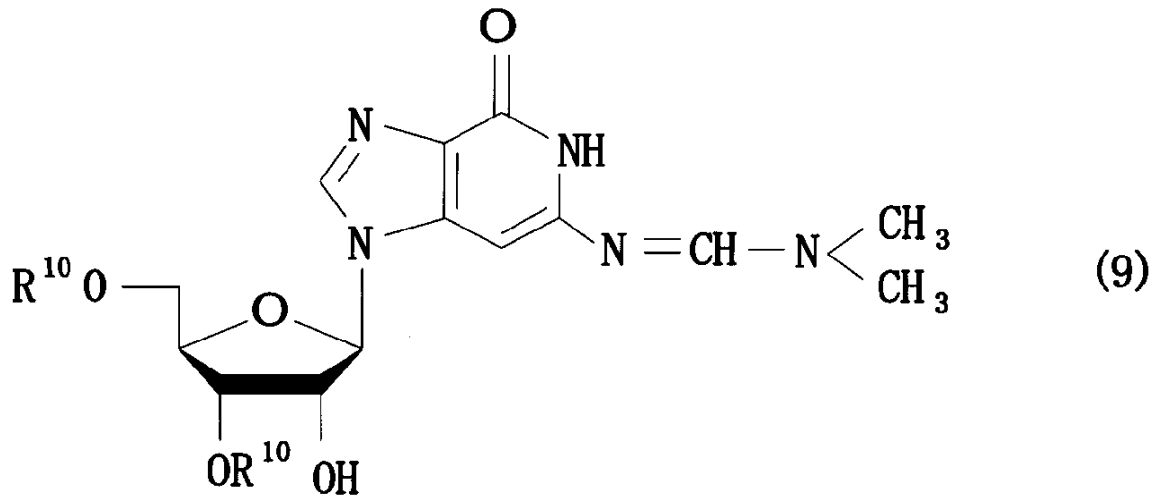
50

,3テトライソプロピルジシロキサン-1,3-ジイル)-2-N-((ジメチルアミノ)メチレン)-3-デアザグアノシン(下記式(9)で示される化合物)を得た(382g、収率:66%)

$^1\text{H NMR}$  (DMSO- $d_6$ ) 0.6, 1.3 (28H,  $\text{CCH}_3$ ,  $\text{SiCHC}_2$ ), 2.9-3.1 (6H,  $\text{NCH}_3$ ), 3.9-4.4 (5H, 2'H, 3'H, 4'H, 5'H), 5.6-6.0 (3H, 1'H, 2'OH, 3H), 7.9-8.0 (2H, 8H,  $\text{NCHN}$ ), 10.6-10.7 (1H, 1H)

【0096】

【化27】



10

20

【0097】

上記式(9)において、 $\text{R}^{10}$ はテトライソプロピルジシロキサンである。

次いで、上述のようにして得られた、3',5'-O-(1,1,3,3テトライソプロピルジシロキサン-1,3-ジイル)-2-N-((ジメチルアミノ)メチレン)-3-デアザグアノシン(100mg)を、1mlの無水ピリジンで共沸( $\times 3$ )し、3mlの無水ピリジンに溶解し、31 $\mu\text{l}$ のイソプロピルエチルアミン、及び48mgのジフェニルカルバモイルクロライドを加え、室温で4.5時間攪拌した。4.5時間の攪拌後、20mlの重曹水を加え反応を停止させた。反応溶液を20mlの酢酸エチル/重曹水(1/1)で1回抽出した後、20mlの酢酸エチル/食塩水(1/1)で2回抽出した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を減圧下留去した後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(N60球状中性シリカゲル)を用いてヘキサン/酢酸エチル(ヘキサン濃度を50% 80%に変化させる)で精製し、3',5'-O-(1,1,3,3テトライソプロピルジシロキサン-1,3-ジイル)-6-O-ジフェニルカルバモイル-2-N-((ジメチルアミノ)メチレン)-3-デアザグアノシン(下記式(10)で表わされる化合物)を得た(105mg、収率:79%)。

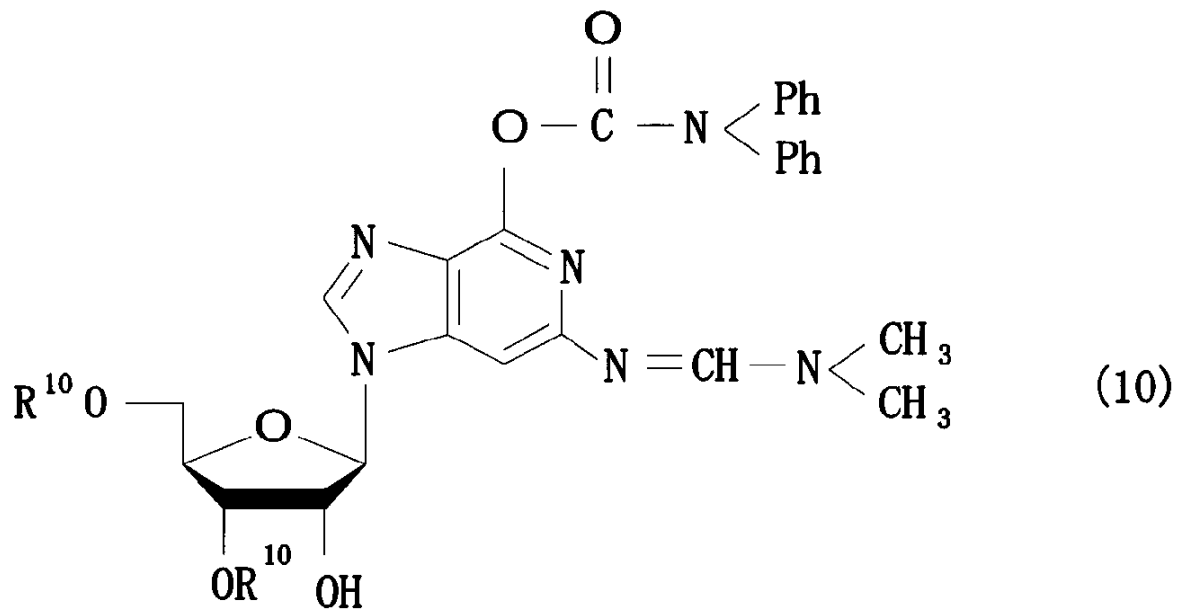
30

$^1\text{H NMR}$  (DMSO- $d_6$ ) 0.6, 1.3 (28H,  $\text{CCH}_3$ ,  $\text{SiCHC}_2$ ), 2.9-3.1 (6H,  $\text{NCH}_3$ ), 3.9-4.4 (5H, 2'H, 3'H, 4'H, 5'H), 5.7-5.9 (2H, 1'H, 2'OH), 6.9-7.0 (1H, 3H), 7.2-7.6 (10H,  $\text{C}_6\text{H}_5$ ), 8.2-8.5 (2H, 8H,  $\text{NCHN}$ )

40

【0098】

【化28】



10

【0099】

20

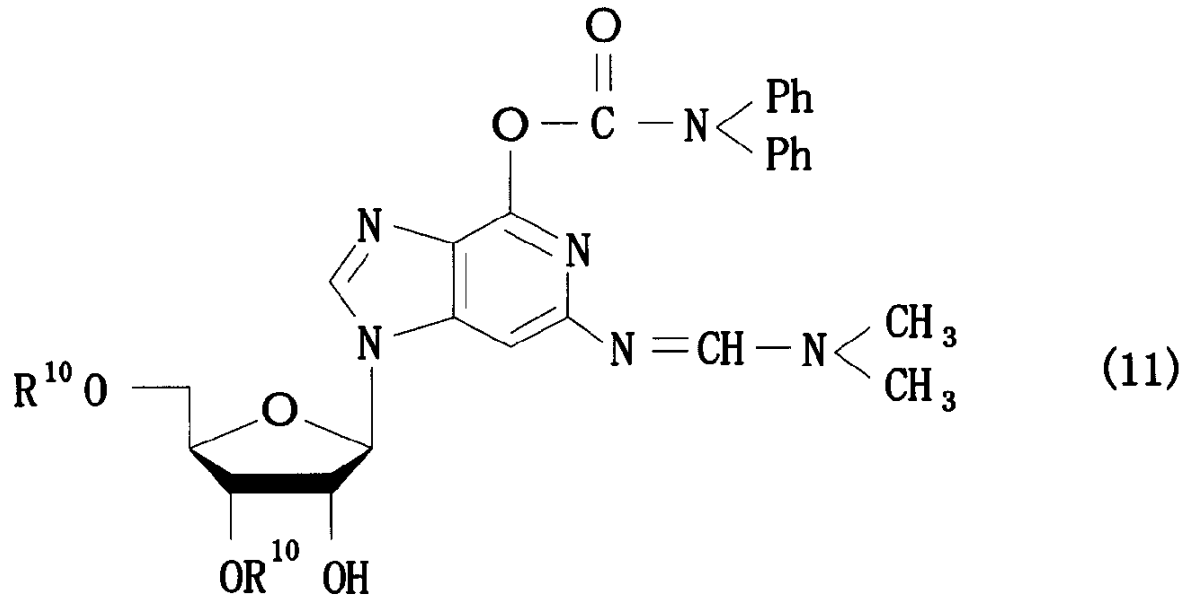
上記式(10)において、 $R^{10}$ はテトライソプロピルジシロキサンである。  
 次いで、上述のようにして得られた、3',5'-O-(1,1,3,3テトライソプロピルジシロキサン-1,3-ジイル)-6-O-ジフェニルカルバモイル-2-N-((ジメチルアミノ)メチレン)-3-デアザグアノシン(155mg)を、1mlの無水トルエンで共沸(x2)し、5mlの無水DMFに溶解し、62 $\mu$ lのヨウ化メチル、及び12mgの水素化ナトリウムを加え、-20 $^{\circ}$ で3時間攪拌した。3時間攪拌した後、50mlの酢酸エチルを加え、リン酸緩衝液(pH7.0)に注いで反応を停止させた。反応溶液を酢酸エチル/リン酸緩衝液(pH:7.0)で1回抽出した後、50mlの酢酸エチル/食塩水(1/1)で2回抽出した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を減圧下留去した後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(N60球状中性シリカゲル)を用いてヘキサン/酢酸エチル(ヘキサン濃度を70%~75%に変化させる)で精製し2'-O-メチル-3',5'-O-(1,1,3,3テトライソプロピルジシロキサン-1,3-ジイル)-6-O-ジフェニルカルバモイル-2-N-((ジメチルアミノ)メチレン)-3-デアザグアノシン(下記式(11)で表わされる化合物)を得た(118mg、収率:75%)。

30

$^1\text{H NMR}$  (DMSO- $d_6$ ) 0.6, 1.3 (28H, CCH<sub>3</sub>, SiCHC<sub>2</sub>), 2.9-3.1 (6H, NCH<sub>3</sub>), 3.5-3.6 (3H, OCH<sub>3</sub>), 3.9-4.6 (5H, 2'H, 3'H, 4'H, 5'H), 6.0-6.1 (1H, 1'H), 6.8-6.9 (1H, 3H), 7.2-7.6 (10H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 8.2-8.5 (2H, 8H, NCHN)

【0100】

【化 2 9】



10

【0101】

20

上記式(11)において、R<sup>10</sup>はテトライソプロピルジシロキサンである。

上述のようにして得られた、2'-O-メチル-3',5'-O-(1,1,3,3テトライソプロピルジシロキサン-1,3-ジイル)-6-O-ジフェニルカルバモイル-2-N-((ジメチルアミノ)メチレン)-3-デアザグアノシン(70mg)を1mlの無水テトラヒドロフラン(THF)で共沸(x2)し、2.2mlの無水THFに溶解し、36μlのトリエチルアミン3フッ化水素を加え、室温で3時間攪拌した。次いで、溶媒を減圧下留去した後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(N60球状中性シリカゲル)を用いて酢酸エチル/メタノール(酢酸エチル濃度を2%~4%に変化させる)で精製し、2'-O-メチル-6-O-ジフェニルカルバモイル-2-N-((ジメチルアミノ)メチレン)-3-デアザグアノシン(下記式(12)で表わされる化合物)を得た(41mg、収率:83%)。

30

【0102】

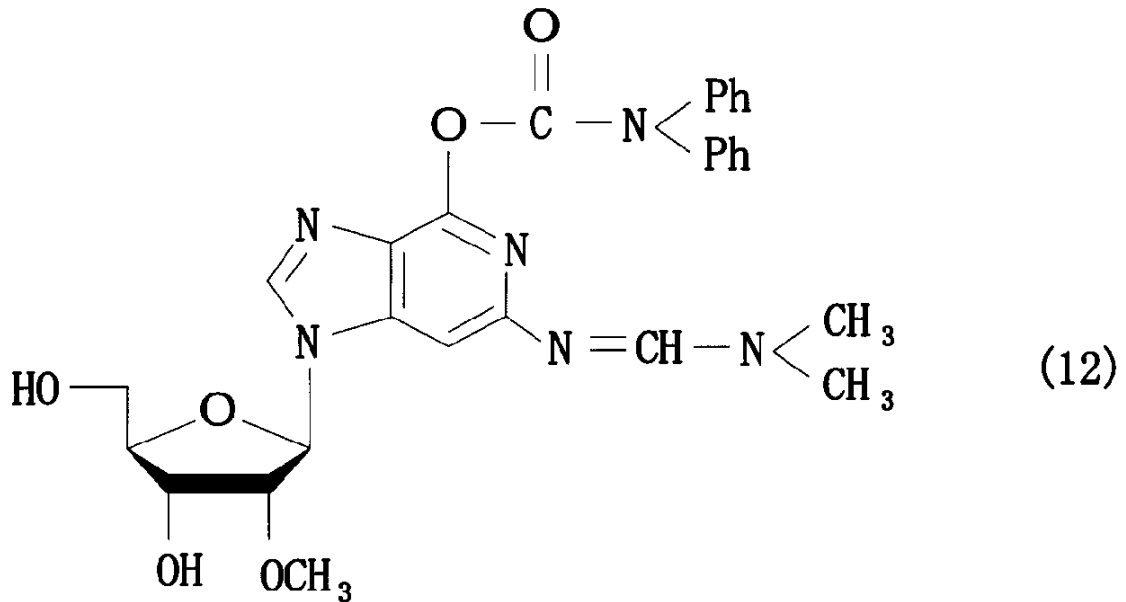
また、カラム中で化合物が結晶化した場合、酢酸エチル/メタノール(酢酸エチル濃度を2%~4%に変化させる)で副精製物を除去した後、シリカゲルを回収し、水/メタノール1:1(v/v)の溶液を用いて、室温で1時間攪拌した。その後濾過をおこないシリカゲルを取り除いた後、濾液を減圧下濃縮し、水相/クロロホルムで抽出を30回行い、有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を減圧下留去し、2'-O-メチル-6-O-ジフェニルカルバモイル-2-N-((ジメチルアミノ)メチレン)-3-デアザグアノシンを得た。

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) 2.9-3.1(6H, NCH<sub>3</sub>), 3.2-3.4(3H, OCH<sub>3</sub>), 3.5-4.4(5H, 2'H, 3'H, 4'H, 5'H), 5.1-5.4(2H, 3'OH, 5'OH), 5.9-6.0(1H, 1'H), 6.9-7.1(1H, 3H), 7.2-7.6(10H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 8.3-8.5(2H, 8H, NCHN)

40

【0103】

【化30】



10

【0104】

20

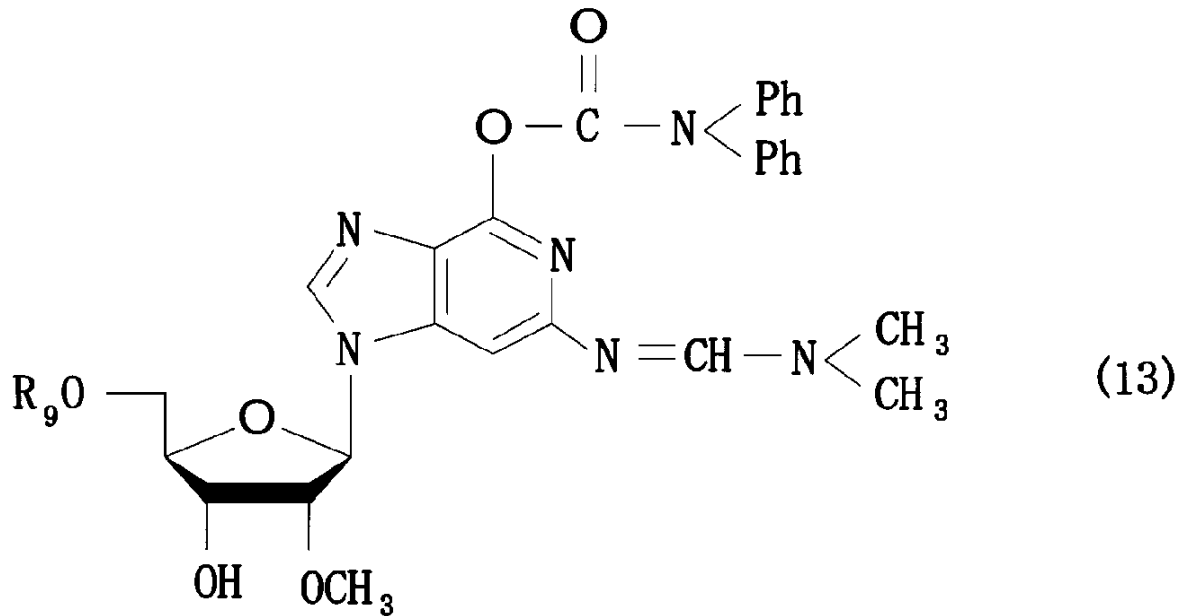
上述のようにして得られた、2'-O-メチル-6-O-ジフェニルカルバモイル-2-N-((ジメチルアミノ)メチレン)-3-デアザグアノシン(37mg)を1mlの無水ピリジンで共沸(×3)し、800μlの無水ピリジンに溶解し、27.5mgの4,4'-ジメトキシトリチルクロライドを加え室温で3時間攪拌した。3時間攪拌した後、20mlの重曹水(濃度:5質量%)を加え反応を停止した。反応溶液を40mlの酢酸エチル/重曹水(1/1)で1回抽出した後、40mlの酢酸エチル/食塩水(1/1)で2回抽出した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を減圧下留去した後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(N60球状中性シリカゲル)を用いて1%トリエチルアミンを添加したヘキサン/酢酸エチル(ヘキサン濃度を60%~80%に変化させる)で精製し、2'-O-メチル-5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-6-O-ジフェニルカルバモイル-2-N-((ジメチルア

30

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) 2.8-3.1 (6H, NCH<sub>3</sub>), 3.1-3.3 (2H, 5'H), 3.3-3.4 (3H, OCH<sub>3</sub>), 3.6-3.7 (6H, OCH<sub>3</sub>), 4.0-4.4 (3H, 2'H, 3'H, 4'H), 5.2-5.4 (1H, 3'OH), 5.9-6.1 (1H, 1'H), 6.7-7.6 (24H, 3H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 8.2-8.4 (2H, 8H, NCHN)

【0105】

【化31】



10

【0106】

上記式(13)において、 $R^9$ は4,4'-ジメトキシトリチル基である。

20

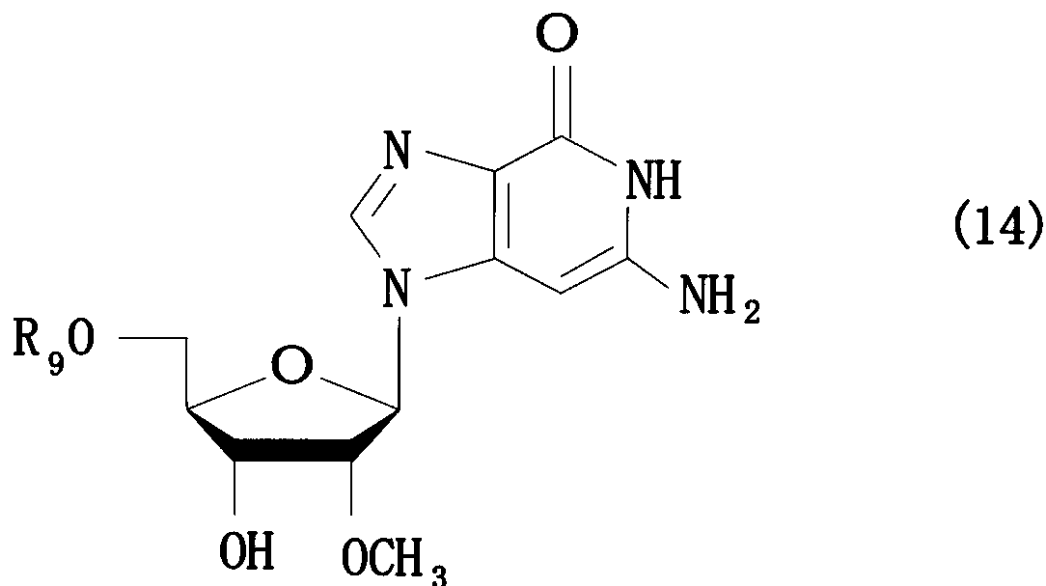
上述のようにして得られた、

2'-O-メチル-5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-6-O-ジフェニルカルバモイル-2-N-((ジメチルアミノ)メチレン)-3-デアザグアノシン(290mg)を28%アンモニア水：40%メチルアミン：ピリジン(2：2：1)の混合溶液3.5mlに溶解させた後、50℃で6時間攪拌した。溶媒を減圧下留去した後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(N60球状中性シリカゲル)を用いて1%トリエチルアミンを添加したヘキサン/酢酸エチル(1/1)で精製し、2'-O-メチル-5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-3-デアザグアノシン(下記式(14)で表わされる化合物)を得た(50mg、収率：74%)。

【0107】

30

【化32】



40

【0108】

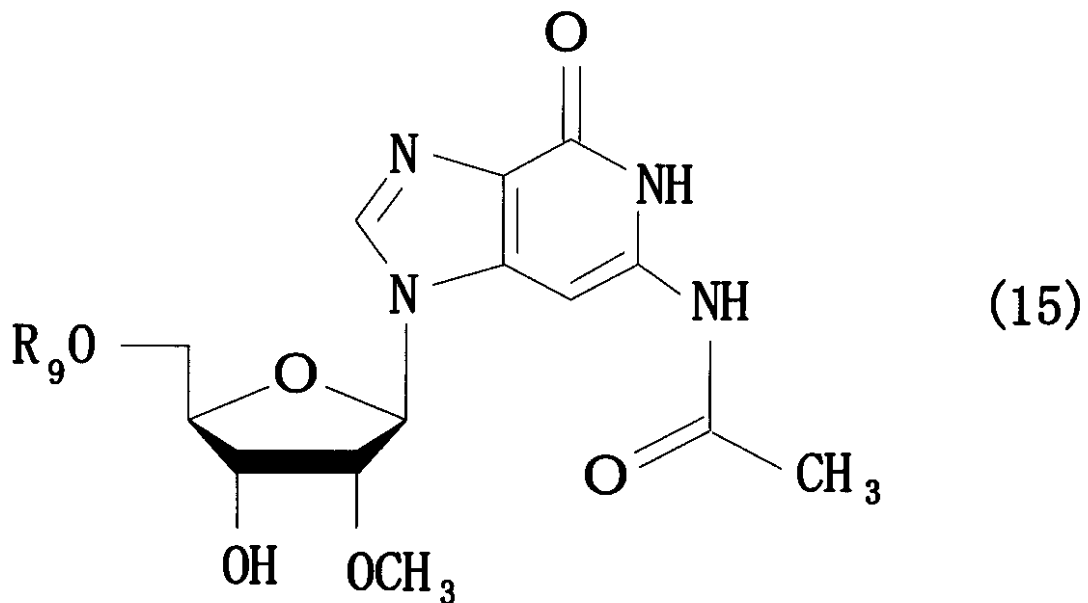
上記式(14)において、 $R^9$ は4,4'-ジメトキシトリチル基である。

50

上述のようにして得られた、2'-0-メチル-5'-0-(4,4'-ジメトキシトリチル)-3-デアザグアノシン(18 mg)を1 mlの無水ピリジンで共沸(x3)し、300 μlのアセトニトリルに溶解させた後、室温で31 μlのヘキサメチルジシラザンを加え2時間撹拌した。溶媒を減圧下留去した後、残渣を300 μlの無水ピリジンに溶解させた。0で8 μlのアセチルクロライドを加え、その後室温に戻し3時間撹拌した。1 mlの水を加え反応を停止させた。次いで、500 μlのアンモニア水を加えて、15分撹拌した後、40 mlの酢酸エチル/食塩水(1/1)で2回抽出した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(N60球状中性シリカゲル)を用いて1%トリエチルアミンを添加したヘキサン/酢酸エチル(1/1)で精製し、2'-0-メチル-5'-0-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2-N-アセチル-3-デアザグアノシン(下記式(15)で表わされる化合物)を得た(14.3 mg、収率: 70%)。

【0109】

【化33】



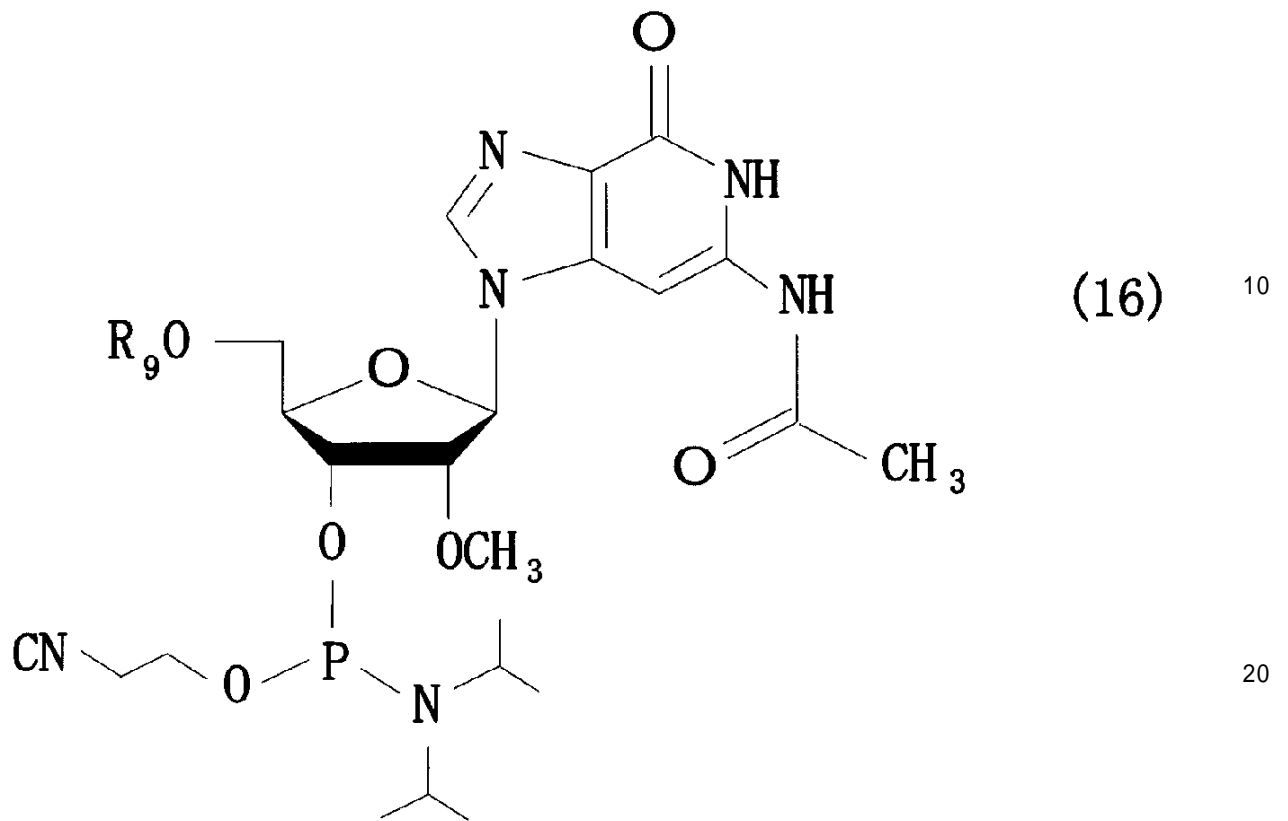
【0110】

上記式(15)において、R<sup>9</sup>は4,4'-ジメトキシトリチル基である。

上述のようにして得られた、2'-0-メチル-5'-0-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2-N-アセチル-3-デアザグアノシン(599 mg)を、1 mlの無水トルエンで共沸(x3)し、10 mlの無水塩化メチレンに溶解し、260 μlのイソプロピルエチルアミン、及び230 μlの2-シアノジイソプロピルホスホロアミドクロリダイトを加え、室温で4.5時間撹拌した。撹拌した後、1 mlの水を加え反応を停止させた。反応溶液200 mlの塩化メチレン/5%重炭酸ナトリウム水(1/1)で5回抽出した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧下留去した後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(N60球状中性シリカゲル)を用いて1%トリエチルアミンを添加したヘキサン/クロロホルム(ヘキサン濃度を50%~80%に変化させる)で精製し、2'-0-メチル-3'-0-(2-シアノエトキシエチル-N,N'-ジイソプロピルホスホロアミド)-5'-0-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2-N-アセチル-3-デアザグアノシン(下記式(16)で表わされる化合物)を得た(460 mg、収率: 62%)。

【0111】

【化34】



【0112】

上記式(16)において、R<sup>9</sup>は4,4'-ジメトキシトリチル基である。

実施例4

2'-デオキシ-7-デアザ-アデノシン(1g、4mmol)を無水ピリジンで3回共沸脱水をおこなった後、無水ピリジン(40 mL)に溶解した。得られた溶液にトリエチルアミン(559 μL、4 mmol)、ジクロロ酢酸(329 μL、4 mmol)、及び4,4'-ジメトキシトリチルクロライド(1.48g、4.4 mmol)を、この順で加え、室温で4時間攪拌した。次いで反応溶液をCHCl<sub>3</sub>(80 mL)で希釈した。CHCl<sub>3</sub>層を飽和食塩水で3回洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥してろ過し、溶媒を減圧留去し、粗生成物を得た。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(20g、1%ピリジン)により精製し、ヘキサンに50~100%クロロホルム、次いで、クロロホルムに0~3%メタノールのグラジエントをかけて溶出し、溶媒を留去し目的の固体(5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2'-デオキシ-7-デアザ-アデノシン)を得た。(1.5 g、68%)

30

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) 2.31 -2.49 (m, 2H), 2.25 (s, 1H), 3.66 (s, 6H), 4.08 (d, 1H, 2.97 Hz), 4.54 -4.56 (m, 1H), 5.55 (brs, 2H), 6.19 (d, 1H, J = 4.1 Hz), 6.66 (d, 4H, J = 8.9 Hz), 7.05 - 7.22 (m, 9H), 7.33 (d, 2H, J = 1.4 Hz), 8.13 (s, 1H), 8.46 (d, 1H, J = 4.3 Hz); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) 40.8, 55.2, 64.1, 72.2, 83.4, 85.6, 86.4, 99.1, 103.6, 113.6, 121.9, 123.9, 125.3, 126.9, 127.9, 128.3, 129.1, 130.1, 135.9, 136.3, 144.7, 149.6, 150.3, 151.5, 156.9, 158.5.

40

【0113】

上述のようにして得られた5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2'-デオキシ-7-デアザ-アデノシン(1.37g、2.5mmol)を無水ピリジンで3回共沸脱水をおこなった後、無水ピリジン(25mL)に溶解した。得られた溶液にトリメチルシリルクロライド(935 μL、7.45mmol)を加え、室温で30分間攪拌した後、アセチルクロライド(531 μL、7.45 mmol)を加えてさらに3.5時間攪拌を行った。次いで、反応溶液に28%アンモニア水(12 mL)を加えて10分間攪拌し、CHCl<sub>3</sub>(50 mL)で希釈した。有機層を飽和食塩水で3回洗浄

50

した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥してろ過し、溶媒を減圧留去させた。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (25g, 1% ピリジン) により精製し、ヘキサンに50~100%クロロホルム、次いで、クロロホルムに0~3%メタノールのグラジエントをかけて溶出し、溶媒を留去し目的の固体 (5' - O - (4,4' - ジメトキシトリチル) - 2' - デオキシ - 6N - アセチル - 7 - デアザアデノシン) を得た。 (1.4 g, 95%)

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) : 2.30 (s, 3H), 2.39 - 2.46 (m, 1H), 2.52-2.57 (m, 1H), 3.33-3.39 (m, 2H), 3.75 (s, 6H), 4.06 (d, 1H, 4.3 Hz), 4.59 (dd, 1H, 6.2 Hz, 9.9 Hz), 6.77 (d, 4H,  $J = 8.6$  Hz), 6.86 (d, 1H,  $J = 4.1$  Hz), 7.18 - 7.31 (m, 9H), 7.39 (d, 2H,  $J = 6.75$  Hz), 8.46 (s, 1H), 8.63 (s, 1H);  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) : 24.6, 40.4, 55.2, 63.9, 72.7, 77.2, 83.1, 85.2, 86.6, 108.6, 113.2, 123.5, 126.9, 127.9, 128.1, 130.0, 135.6, 135.7, 144.5, 149.9, 150.3, 158.5

10

## 【 0 1 1 4 】

上述のようにして得られた5' - O - (4,4' - ジメトキシトリチル) - 2' - デオキシ - 6N - アセチル - 7 - デアザアデノシン(1.4g, 2.4mmol)を無水アセトニトリルで3回共沸脱水を行った後、無水ジクロロメタン(25 mL)に溶解した。得られた溶液にエチルジイソプロピルアミン (575  $\mu\text{L}$ , 3.5mmol)、クロロ(2 - シアノエトキシ) (-N,N' - ジイソプロピルアミノ)ホスフィン(571  $\mu\text{L}$ , 2.6mmol)を、この順で加え、室温で30分間攪拌した。次いで、反応溶液に水(1mL)を加えて5分間攪拌し、次いで $\text{CHCl}_3$ (25 mL)で希釈した。有機層を飽和食塩水で3回洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥してろ過し、溶媒を減圧留去し、粗生成物を得た。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(25g, 1% トリエチルアミン)により精製し、ヘキサンに50~100%クロロホルム、次いで、クロロホルムに0~3%メタノールのグラジエントをかけて溶出し、溶媒を留去し目的の固体(下記式(20))で表わされる化合物、5' - O - (4,4' - ジメトキシトリチル) - 2' - デオキシ - 6N - アセチル - 7 - デアザアデノシン - 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)を得た。 (1.7 g, 91%)

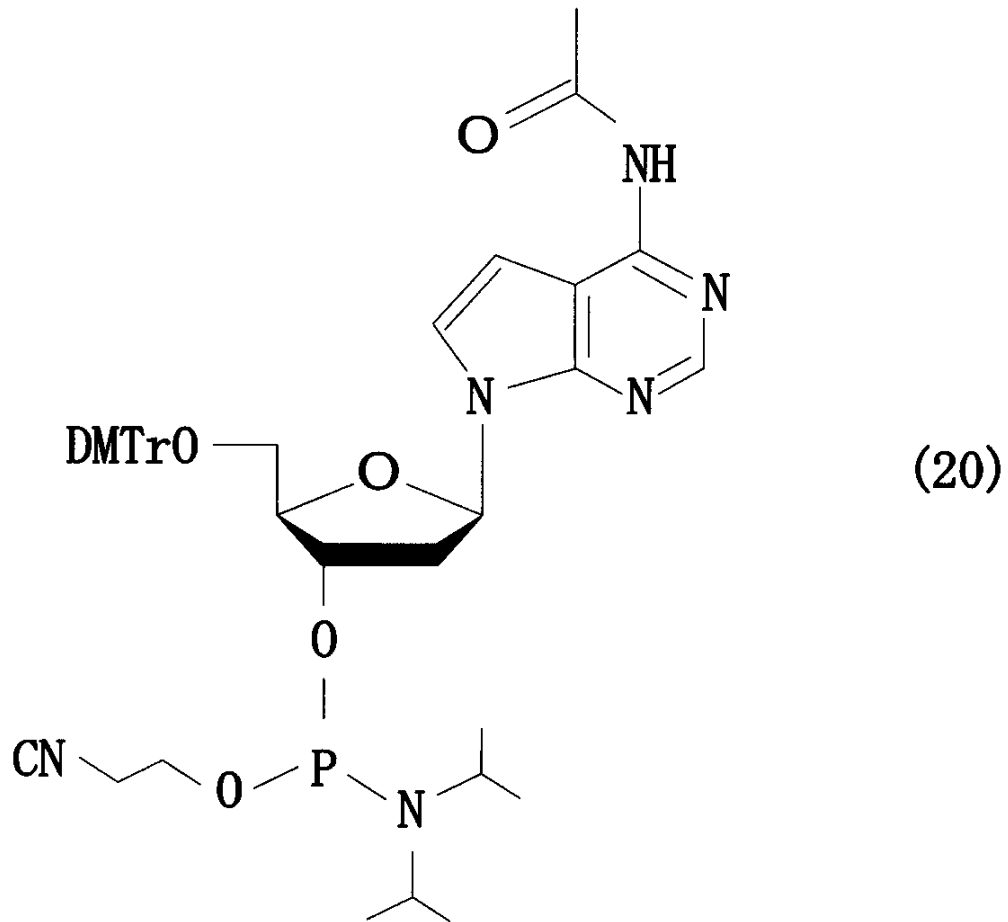
20

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) : 1.01-1.12 (m, 12H), 2.36 (s, 3H), 2.39 (t, 1H,  $J = 6.8$  Hz), 3.23-3.27 (m, 2H), 3.49-4.16 (m, 10H), 4.16 (s, 1H), 4.65 (s, 1H), 6.77 (dd, 4H,  $J = 4.3$  Hz,  $J = 7.8$  Hz), 6.81 (d, 1H,  $J = 3.2$  Hz), 7.11 - 7.36 (m, 11H), 8.43 (s, 1H), 9.37 (s, 1H);  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) : 20.1, 20.2, 20.3, 20.4, 22.8, 24.5, 24.6, 24.7, 29.7, 39.8, 43.1, 43.1, 43.3, 43.3, 55.2, 58.1, 58.2, 58.4, 58.5, 63.4, 63.6, 68.3, 73.3, 73.6, 73.9, 74.2, 77.3, 83.4, 84.9, 85.0, 85.1, 85.2, 86.4, 104.2, 109.0, 113.1, 117.4, 117.5, 123.7, 126.9, 127.8, 128.2, 128.2, 130.1, 130.5, 135.7, 135.7, 144.6, 150.2, 152.8, 152.8, 158.5, 169.0;  $^{31}\text{P NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) : 149.2, 149.4.

30

## 【 0 1 1 5 】

【化 3 5】



10

20

【 0 1 1 6 】

実施例 5

5', 3'-ピストルオイル2'-デオキシ-6-クロロ-7-デアザプリン(2.0 g, 4mmol)を飽和アンモニア-MeOH(40mL)に溶解し、得られた溶液を密封可能な容器に入れ、密封した状態で60 の温度で、3日間攪拌した。3日間攪拌を行った後、溶媒を減圧留去し、ジエチルエーテル(50 mL)及び水(40 mL)を用いて抽出操作を行った。水層を回収し、溶媒を減圧留去した残留物を無水ピリジンで3回共沸脱水を行い、無水ピリジン(40 mL)に溶解した。次いで、反応溶液にトリエチルアミン(559  $\mu$ L, 4 mmol)、ジクロロ酢酸(329  $\mu$ L, 4 mmol)、4,4'-ジメトキシトリチルクロライド(1.48 g, 4.4 mmol)を、この順で加え室温で4時間攪拌した。次いで、反応溶液を $\text{CHCl}_3$ (80 mL)で希釈した。 $\text{CHCl}_3$ 層を飽和食塩水で3回洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥してろ過し、溶媒を減圧留去し、粗生成物を得た。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(20g, 1% ピリジン)により精製し、ヘキサンに50~100%クロロホルム、続いてクロロホルムに0~3%メタノールのグラジエントをかけて溶出し、溶媒を留去し目的の固体(5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2'-デオキシ-8-アザ-7-デアザ-アデノシン)を得た(1.9 g, 85%)。

30

40

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) : 2.35 -2.49 (m, 1H), 3.02 -3.11 (m, 1H), 3.22 (dd, 1H,  $J = 6.2$  Hz,  $J = 9.2$  Hz), 3.32 (dd, 1H,  $J = 5.1$  Hz,  $J = 9.7$  Hz), 3.79 (s, 6H), 4.03 (dd, 1H,  $J = 5.1$  Hz,  $J = 11.1$  Hz), 4.86 (dd, 1H,  $J = 6.1$  Hz,  $J = 11.5$  Hz), 5.55 (brs, 2H), 6.73 (d, 4H,  $J = 8.1$  Hz), 6.76 - 6.83 (m, 1H), 7.16 - 7.34 (m, 9H), 7.39 (d, 2H,  $J = 1.6$  Hz), 7.82 (s, 1H), 8.38 (s, 1H);  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) : 21.2, 38.0, 54.9, 64.2, 72.3, 77.2, 84.0, 85.6, 86.0, 100.9, 112.8, 123.8, 125.1, 126.5, 127.5, 127.6, 127.7, 128.0, 128.0, 129.0, 129.9, 132.0, 135.9, 136.3, 144.7, 149.0,

50

153.8, 155.3, 157.4, 158.1, 158.2, 158.3.

【 0 1 1 7 】

上述のようにして得られた5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2'-デオキシ-8-アザ-7-デアザ-アデノシン(1.62g, 2.9mmol)を無水ピリジンで3回共沸脱水を行った後、無水ピリジン(30 mL)に溶解した。得られた溶液にトリメチルシリルクロライド(2.97 mL, 8.8 mmol)を加え、室温で30分間攪拌した後、アセチルクロライド(627  $\mu$ L, 8.8 mmol)を加えてさらに3.5時間攪拌を行った。次いで、反応溶液に28%アンモニア水(15mL)を加えて10分間攪拌し、次いでCHCl<sub>3</sub>(60 mL)で希釈した。有機層を飽和食塩水で3回洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥してろ過し、溶媒を減圧留去し、粗生成物を得た。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(25g, 1%ピリジン)により精製し、ヘキサンに50~100%クロロホルム、次いでクロロホルムに0~3%メタノールのグラジエントをかけて溶出し、溶媒を留去し目的の固体(5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2'-デオキシ-6N-アセチル-8-アザ-7-デアザアデノシン)を得た(1.4 g, 85%)。

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 2.30 (s, 3H), 2.38-2.48 (m, 1H), 3.01-3.10 (m, 1H), 3.20-3.25 (m, 2H), 3.76 (s, 6H), 4.06 (dd, 1H, J = 5.1 Hz, J = 11.3 Hz), 4.84 (m, 1H), 6.72-6.83 (m, 5H), 7.15 - 7.35 (m, 9H), 7.36 (d, 2H, J = 6.48 Hz), 8.22 (s, 1H), 8.56-8.65 (s, 2H);

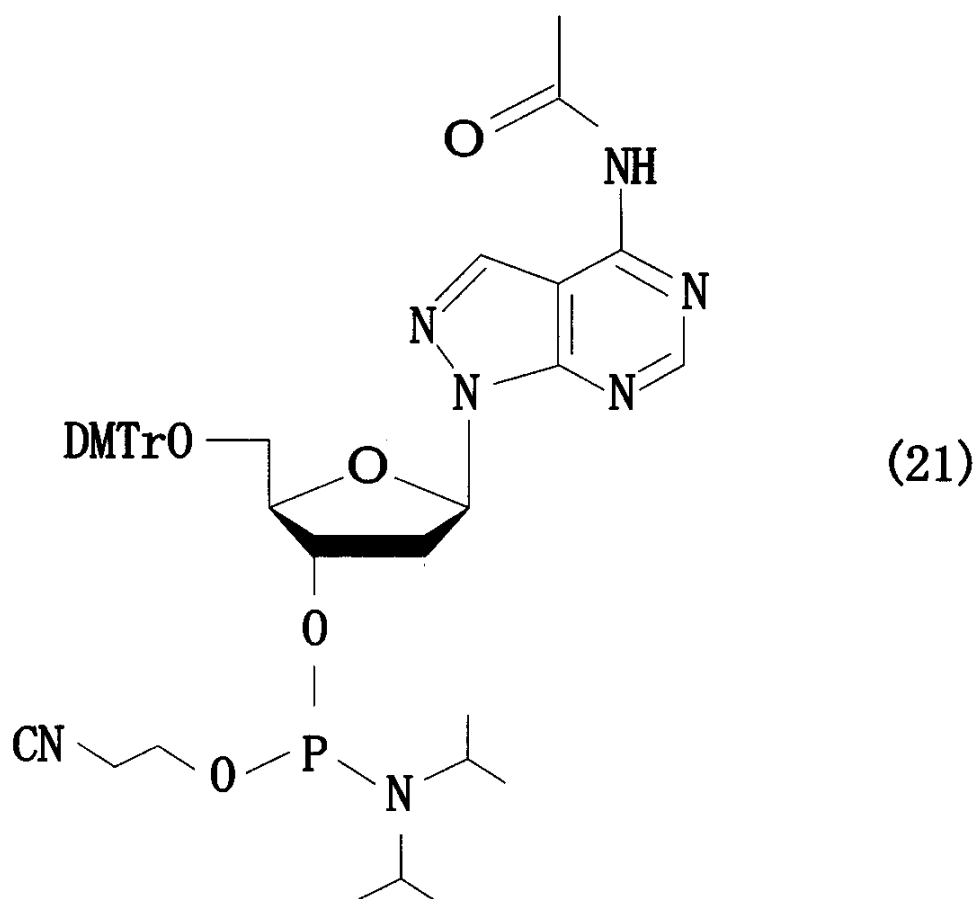
【 0 1 1 8 】

上述のようにして得られた5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2'-デオキシ-6N-アセチル-8-アザ-7-デアザ-アデノシン(560mg, 0.9 mmol)を無水アセトニトリルで3回共沸脱水を行った後、無水ジクロロメタン(10mL)に溶解した。得られた溶液にエチルジイソプロピルアミン(230  $\mu$ L, 1.4 mmol)、クロロ(2-シアノエトキシ)(-N,N'-ジイソプロピルアミノ)ホスフィン(228  $\mu$ L, 1.0 mmol)を、この順で加え、室温で30分間攪拌した。次いで、反応溶液に水(1mL)を加えて5分間攪拌し、次いでCHCl<sub>3</sub>(20 mL)で希釈した。有機層を飽和食塩水で3回洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥してろ過し、溶媒を減圧留去し、粗生成物を得た。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(25g, 1%トリエチルアミン)により精製し、ヘキサンに50~100%クロロホルム、次いでクロロホルムに0~3%メタノールのグラジエントをかけて溶出し、溶媒を留去し目的の固体(下記式(21)で表わされる化合物、5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2'-デオキシ-6N-アセチル-8-アザ-7-デアザアデノシン-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)を得た(672 mg, 90%)。

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 1.07-1.28 (m, 12H), 2.30 (s, 3H), 2.42-2.62 (m, 3H), 3.14-3.29 (m, 3H), 3.56-3.81 (m, 10H), 4.22 (s, 1H), 4.82-4.97 (m, 1H), 6.67-6.73 (m, 4H), 6.83 (t, 1H, J = 4.1 Hz), 7.12 - 7.37 (m, 11H), 8.22 (s, 1H), 8.56 (s, 1H), 8.58 (s, 1H); <sup>31</sup>P NMR (CDCl<sub>3</sub>): 149.2, 149.4.

【 0 1 1 9 】

【化 3 6】



10

20

【 0 1 2 0】

実施例 6

実施例 4 で得られた、上記式 (20) で表わされる化合物又は上記 (21) で表わされる化合物と、実施例 5 で得られた、上記式 (3) で表わされる化合物、上記式 (5) で表わされる化合物、上記式 (6) で表わされる化合物とを用いてプローブの合成を行った。

30

プローブの合成は、Applied Biosynthesis Incの自動合成機、商品名「DNA/RNA Synthesizer 392」を用いて行い、配列TACCTAXATACCATA (配列番号：5、Xは、デオキシ - 6 N - アセチル - 7 - デアザアデノシン (上記式 (20) で表わされる化合物を用いた場合) 又は 2' - デオキシ - 6 N - アセチル - 8 - アザ - 7 - デアザアデノシン (上記式 (21) で表わされる化合物を用いた場合) で表わされるプローブを作成した。プローブの自動合成機による合成は、シリルリンカーを介してチミジンを導入したハイリークロスリンクポリスチレン (HCP) 固相担体 (1 μmol、24 μmol/g) を用いて行った。合成各鎖伸長サイクルは、以下の表 2 に示す通りであり、縮合反応では、6 - ニトロ - 1 - ヒドロキシベンゾトリアゾール (Ho<sup>n</sup>Bt) 及びベンゾイミダゾリウムトリフラート (BIT) を用いた。

40

【 0 1 2 1】

【表 2】

工程	操作	試薬	時間
1	洗浄	CH <sub>3</sub> CN	0.2
2	脱トリチル化	3% Cl <sub>3</sub> CCOOH/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1.5
3	洗浄	CH <sub>3</sub> CN	0.4
4	結合	0.1M amidide + 0.1M Ho <sup>n</sup> Bt in + BIT in CH <sub>3</sub> CN	1.0
5	洗浄	CH <sub>3</sub> CN	0.2
6	結合	0.1M amidide + 0.1M Ho <sup>n</sup> Bt in + BIT in CH <sub>3</sub> CN-NMP(15:1,v/v)	1.0
7	洗浄	CH <sub>3</sub> CN	0.2
8	酸化	0.2M I2 in Py-H <sub>2</sub> O-THF(20:2:78,v/v/v)	0.5
9	洗浄	CH <sub>3</sub> CN	0.4

10

20

## 【0122】

次いで、2 mL DMT r 基を 3% トリクロロ酢酸溶液 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) で除去し、1 mL の CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> で 3 回、次いで、1 mL の CH<sub>2</sub>CN で 3 回、固相担体を洗浄した。次いで、10% ジアザピシクロウンデセン (DBU) の CH<sub>3</sub>CN 溶液 (500 μL) を用いてシアノエチル基を除去した。CH<sub>3</sub>CN (1 mL x 3) で固相担体を洗浄した後に、TBAF (131 mg, 0.5 mmol) 及び酢酸 (24 μL, 0.5 mmol) を無水 THF 500 μL に溶解した反応溶液で固相担体を 1 時間処理し、DNA オリゴマーの切り出しを行った。得られた混合溶液を Sep-Pak C18 カートリッジを用いて、脱塩後、さらに水で希釈し、陰イオン交換 HPLC を用いて精製を行った。

## 【0123】

上述のようにして作製した、配列番号：5 で表わされる塩基配列を有するオリゴヌクレオチドの二重鎖形成能及び塩基識別能を調べた。コントロールとして、配列番号：5 で表わされる塩基配列の X がアデニンであるものについても調べた。上述のオリゴヌクレオチドと、別途合成を行った相補鎖 (ATGGTGTGTAGGTA、配列番号：6、Y はチミジン、2'-デオキシチジン、2'-デオキシアデノシン、2'-デオキシグアノシンのいずれかを表わす) とを混和し、溶液中二重鎖形成時に、二重鎖の濃度が 2 μM の濃度となるように、500 μL のリン酸バッファー (150 mM リン酸ナトリウム、pH 7.0、0.1 M NaCl、0.1 mM EDTA) に溶解させた測定試料を調整した。測定には、Pharma Spec UV-1700 (島津製作所 (株) 製) を用いた。測定は、まず試料を 80 の温度に 30 分間保持し、オリゴヌクレオチドをランダムコイル状態とした後、1.0 / 分で温度を 5 まで変化させてアニーリングを行い、次いで、1.0 / 分の速度で昇温させて、1.0 毎に UV 吸光度を測定することにより行った。

30

40

## 【0124】

測定により得られた UV 吸光度を温度変化に対してプロットし、二重鎖融解曲線とした。Stavilzky-Golay 法 (25 point) を用いて融解曲線をスムージングした後、曲線を一次微分することにより変曲点を求め変曲点を二重鎖融解温度 (T<sub>m</sub> 値) とした。なお、二重鎖のアニーリング時の曲線から得られる値と二重鎖融解時の曲線から得られる値において、1.0 以上値のずれが観測された場合には、各測定温度における系内の平衡が不完全であるとみなし、変温レートを 0.5 / 分に変更する等、適宜条件を変更して再度測定を行った。また、塩基識別能を調べるため、一塩基ミスマッチ配列を有するオリゴヌクレオチドとの二重鎖融解温度を測定した。測定は、0.1 M NaCl, 0.1 mM E

50

DTA を含む150 mM リン酸ナトリウム緩衝液中で(pH 7.0) 各オリゴヌクレオチド濃度2.0 mMにて行った。

測定結果を表3に示す。なお、表においては、 $T_m$ は、配列番号：6のYの位置がチミジンである相補鎖の場合の $T_m$ と、最も安定なミスマッチである、2'-デオキシアデノシンである場合の $T_m$ との差を表わす。

【0125】

【表3】

X	Y	$T_m$ (°C)	$\Delta T_m$ (°C)
A	T	45	—
A	G	32	-13
A	C	26	-19
A	A	29	-16
実施例4	T	43	—
実施例4	G	32	-11
実施例4	C	24	-19
実施例4	A	27	-16
実施例5	T	45	—
実施例5	G	31	-14
実施例5	C	26	-19
実施例5	A	29	-16

10

20

【0126】

表3から下記のことわかる。

配列番号：5で表わされる塩基配列のXの位置に、2'-デオキシ-6N-アセチル-8-アザ-7-デアザアデノシン(8aza7deazaA)を含むオリゴヌクレオチド(実施例5で得られたものから製造されたもの)は、Xの位置に2'-デオキシ-アデノシン(A)を含むオリゴヌクレオチドに比べ、配列番号：6のYの位置がチミジンである相補鎖に対する $T_m$ が同等(45)であった。また、配列番号：5のXの位置に2'-デオキシ-6N-アセチル-8-アザ-7-デアザアデノシン(8aza7deazaA)を含むオリゴヌクレオチド(実施例4)は、Xの位置に2'-デオキシ-アデノシン(A)を含むオリゴヌクレオチド(実施例5)に比べ、配列番号：6のYの位置にチミジンがある相補鎖に対する $T_m$ が同等(45)であった。一方、最も安定なミスマッチである、配列番号：6のYの位置が2'-デオキシアデノシンである場合の $T_m$ は、配列番号：5のXの位置が8aza7deazaAを含む場合(31)の方がXがAの場合(32)よりも塩基識別能1低かった。この結果、8aza7deazaAを含むオリゴヌクレオチドはミスマッチ塩基識別能が向上していることが明らかである。

30

40

【0127】

実施例7

実施例5で得られた化合物(式(21)で表わされる化合物)、及び2'-デオキシ-4N-アセチルシチジンをを用い、合成各鎖伸長サイクルを、以下の表4に示す通りに行った以外は、実施例6と同様に操作を行い、 $TA^*C^*C^*TA^*A^*A^*TA^*C^*C^*A^*TA^*$ (配列番号：7、 $A^*$ は2'-デオキシ-6N-アセチル-8-アザ-7-デアザアデノシンを表し、 $C^*$ は2'-デオキシ-4N-アセチルシチジンを表す)の配列を有するオリゴヌクレオチドを得た。

【0128】

50

【表4】

工程	操作	試薬	時間
1	洗浄	CH <sub>3</sub> CN	0.2
2	脱トリチル化	3% Cl <sub>3</sub> CCOOH/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1.5
3	洗浄	CH <sub>3</sub> CN	0.4
4	結合	0.1M amidite + 0.2M BIT in CH <sub>3</sub> CN-NMP (15:1, v/v)	1.0
5	洗浄	CH <sub>3</sub> CN	0.2
6	結合	0.1M amidite + 0.2M BIT in CH <sub>3</sub> CN-NMP (15:1, v/v)	1.0
7	洗浄	CH <sub>3</sub> CN	0.2
8	酸化	0.2M I <sub>2</sub> in Py·H <sub>2</sub> O-THF(20:2:78, v/v/v)	0.5
9	洗浄	CH <sub>3</sub> CN	0.4

10

## 【0129】

20

次いで、2 ml DMT r 基を3%トリクロロ酢酸溶液(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)で除去し、1 mlのCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>で3回、次いで、1 mlのCH<sub>2</sub>CNで3回、固相担体を洗浄した。次いで、10% ジアザピシクロウンデセン(DBU)のCH<sub>3</sub>CN溶液(500 μL)を用いてシアノエチル基を除去した。CH<sub>3</sub>CN(1 mL x 3)で固相担体を洗浄した後に、TBAF(131 mg, 0.5 mmol)及び酢酸(24 μL, 0.5 mmol)を無水THF 500 μLに溶解した反応溶液で固相担体を1時間処理し、DNAオリゴマーの切り出しを行った。得られた混合溶液をSep-Pak C18カートリッジを用いて、脱塩後、さらに水で希釈し、陰イオン交換HPLCを用いて精製を行った。

## 【0130】

## 実施例8

実施例7で得られたオリゴヌクレオチドと、その相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド(ATGGTGYTAGGTA、配列番号：8、Yはチミジン、2'-デオキシシチジン、2'-デオキシアデノシン、2'-デオキシグアノシンのいずれかを表わす)との二重鎖融解温度を、実施例6と同様にして測定し、また、実施例6と同様にして塩基識別能を調べた。また、コントロールとして、配列番号：7で表わされるオリゴヌクレオチド(実施例5で得られた化合物(式(21)で表わされる化合物)、及び2'-デオキシ-4N-アセチルシチジンをを用いないで製造したもの、すなわち修飾されていないオリゴヌクレオチド)を用いて同様に実験を行った。

30

## 【0131】

結果は、図示しないが、実施例7で得られたオリゴヌクレオチドを用いた場合、その二重鎖形成能は+15.2上昇し、T<sub>m</sub><sub>A-G</sub>は17.5であった。これに対し、コントロールとして用いたオリゴヌクレオチドにおいては、T<sub>m</sub><sub>A-G</sub>は12.7であった。従って、塩基識別能は4.8上昇したことがわかった。

40

## 【0132】

## 実施例9

2-N-((ジメチルアミノ)メチレン)-5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-6-O-ジフェニルカルバモイル-2'-O-メチル-3-デアザグアノシン(290mg, 0.342mmol)を55で28%アンモニア水：40%メチルアミン/メタノール溶液：ピリジン(2：2：1, v/v/v)(3.5ml)に溶解し、5時間攪拌した。攪拌を行った後、クロロホルム(100 ml)/5%食塩水(70 ml)で2回抽出した。有機層を減圧下留去した後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(N60球状中性シリカゲル)を用いて1%トリエチルアミンを添加したメタノ

50

ール/クロロホルム4%で精製し、5'-0-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2'-0-メチル-3-デアザグアノシンを得た(150mg,73%)。

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) 3.39 ( 3H, s ), 3.72 ( 6H, s ), 4.01 ( 1H, d, J = 3.4 Hz ), 4.14 ( 1H, t, J = 4.9 Hz ), 4.21 ( 1H, t, J = 5.6 Hz ), 5.27 ( 1H, d, J = 6.4 Hz ), 5.45 ( 1H, s ), 5.56 ( 2H, d, J = 8.3 Hz ), 5.66 ( 1H, d, J = 4.6 Hz ), 6.82 - 6.84 ( 4H, m ) 7.18 - 7.32 ( 9H, m ), 7.77 ( 1H, s ), 10.32 ( 1H, s br ) : MS m/z calcd for C<sub>33</sub> H<sub>35</sub> N<sub>4</sub> O<sub>7</sub><sup>+</sup> : 599.2506, found 599.2550

【 0 1 3 3 】

上述のようにして得られた5'-0-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2'-0-メチル-3-デアザグアノシン(170mg,0.284mmol)を無水ピリジンで3回共沸し、無水アセトニトリル(2.8 ml)に溶解させた後、室温でヘキサメチルジシラザンを加え2時間攪拌した。溶媒を減圧下留去した後、残渣を無水ピリジン ( 2.8 ml ) に溶解させた。0 でアセチルクロライド(44 μl, 0.65 mmol)を加え、次いで、反応溶液を室温に戻し、3時間攪拌した。水を加え反応を停止した。アンモニア水を加えて、一晚攪拌した後、酢酸エチル(100ml)/食塩水(70ml)で2回抽出した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(N60球状中性シリカゲル)を用いて1%トリエチルアミンを添加したメタノール/クロロホルム2%~4%で精製し、2-N-アセチル-5'-0-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2'-0-メチル-3-デアザグアノシンを得た(120mg, 65%)。

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) 2.09 ( 3H, s ), 3.14 - 3.20 ( 2H, m ), 3.41 ( 3H, s ), 3.71 ( 6H, s ), 4.06 ( 1H, dd, J = 5.1 Hz, J = 8.6 Hz), 4.20 ( 1H, t, J = 4.7 Hz ), 4.24 ( 1H, dd, J = 5.4 Hz, J = 11.5 Hz ), 5.31 ( 1H, d, J = 6.4 Hz ), 5.86 ( 1H, d, J = 4.4 Hz ), 6.45 ( 1H, s br ), 6.80 - 6.83 ( 4H, m ), 7.15 - 7.29 ( 9H, m ), 8.07 ( 1H, s ), 10.54 ( 1H, s br ), 11.28 ( 1H, s br ) : MS m/z calcd for C<sub>35</sub> H<sub>37</sub> N<sub>4</sub> O<sub>8</sub><sup>+</sup> : 641.2611, found 641.2642

【 0 1 3 4 】

上述のようにして得られた2-N-アセチル-5'-0-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2'-0-メチル-3-デアザグアノシン(119 mg, 0.185mmol)を無水トルエンで3回共沸し、無水塩化メチレン(1.9ml)に溶解し、ジイソプロピルエチルアミン(54 μl,0.27mmol)を加え、クロロ(2-シアノエトキシ)(-N,N'-ジイソプロピルアミノ)ホスフィン(57 μl,0.259mmol)を加え、室温で4.5時間攪拌した。次いで、水を加え反応を停止した後、反応溶液を塩化メチレン(40ml)/5%重炭酸ナトリウム水(50 ml)で5回抽出した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧下留去した後、残渣をゲル濾過カラムクロマトグラフィー(アセトニトリル)を用いて精製し、2-N-アセチル-5'-0-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2'-0-メチル-3-デアザグアノシン-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)を得た(47mg,30%)。

<sup>1</sup>H NMR ( CDCl<sub>3</sub>-d<sub>1</sub> ) 1.03 - 1.05 ( 4H, m ), 1.17 - 1.29 ( 8H, m ), 2.02 ( 3H, m ), 2.37, 2.68 ( 2H, m ), 3.36 - 3.67 ( 7H, m ), 3.77 ( 6H, m ), 3.87 - 3.98 ( 1 H, m ), 4.13 -4.16 ( 1 H, m ), 4.32 - 4.38 ( 1 H, m ), 4.47 - 4.50 ( 1 H, m ), 5.85 ( 1 H, m ), 6.80 ( 4 H, m ), 7.20 - 7.49 ( 9H, m ), 7.96 ( 1 H, m ), 10.21 ( 1 H, s br ), 11.80 ( 1 H, s br ) : <sup>31</sup>P NMR ( CDCl<sub>3</sub>-d<sub>1</sub> ) 151.6, 152.2

【 0 1 3 5 】

実施例 10

3',5'-ビス-0-(tert-ブチルジメチルシリル)デオキシグアノシン ( 1.5 g, 3.02 mmol ) を無水ピリジンで3回共沸し、無水ピリジン(15 ml)に溶解し、トリメチルシリルクロライド(576 μl,4.53 mmol)を加え、室温で1時間攪拌した。次いで、クロロギ酸フェニル(569 μl,3.93mmol)を加え、室温で4時間攪拌した。40%メチルアミンのメタノール溶液 ( 1.8 ml, 15.1 mmol ) を加え室温で2時間攪拌した。反応溶液を酢酸エチル( 200 ml ) / 水( 150 ml ) で1回抽出した後、酢酸エチル( 200 ml ) / 食塩水( 150 ml ) で2

10

20

30

40

50

回抽出した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を減圧下留去した後、残渣をNHシリカゲルカラムクロマトグラフィーを用いてメタノール/クロロホルム50%~80%で精製し、3',5'-ビス-0-(tert-ブチルジメチルシリル)-2-N-メチルカルバモイルデオキシグアノシンを得た(1.38g,78%)。

$^1\text{H NMR}$  (DMSO- $d_6$ ) 0.01 (6H, d), 0.08 (6H, s), 0.84 (9H, s), 0.86 (9H, s), 2.26 - 2.30 (1H, m), 2.61 - 2.67 (1H, m), 2.70 (3H, d,  $J = 3.9$  Hz), 3.62 - 3.71 (2H, m), 3.81 (1H, m), 4.48 (1H, m), 6.15 (1H, t,  $J = 6.5$  Hz), 7.02 (1H, s br), 8.05 (1H, s), 10.26 (1H, s br), 11.98 (1H, s br) :  $^{13}\text{C NMR}$  (DMSO- $d_6$ ) -5.6, -5.6, -5.0, -4.9, 17.6, 17.9, 25.6, 25.7, 26.1, 62.6, 71.9, 82.5, 87.1, 119.1, 136.2, 148.9, 149.2, 155.5 : MS  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{24} \text{H}_{44} \text{N}_6 \text{O}_5 \text{Si}_2^+$  : 553.2990, found 553.3027

【0136】

上述のようにして得られた、3',5'-ビス-0-(tert-ブチルジメチルシリル)-2-N-メチルカルバモイルデオキシグアノシン(889mg,1.61mmol)を無水ピリジンで3回共沸し、無水ピリジン(16ml)に溶解した。次いで、ジイソプロピルエチルアミン(421 $\mu\text{l}$ ,2.41 mmol)を加え、ジフェニルカルバモイルクロライド(424 mg, 1.93 mmol)を加え、室温で0.5時間攪拌した。次いで、酢酸エチル(10 ml)を加えた後、重曹水(10 ml)を加え反応を停止した。反応溶液を酢酸エチル(150 ml)/重曹水(150 ml)で1回抽出した後、酢酸エチル(150 ml)/食塩水(100 ml)で2回抽出した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を減圧下留去した後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(C200)を用いて酢酸エチル/ヘキサン40%~50%で精製し、3',5'-ビス-0-(tert-ブチルジメチルシリル)-6-0-ジフェニルカルバモイル-2-N-メチルカルバモイルデオキシグアノシンを得た(1.13 g, 94%)。

$^1\text{H NMR}$  (DMSO- $d_6$ ) 0.00 (6H, s), 0.10 (6H, s), 0.83 (9H, s), 0.88 (9H, s), 2.34 - 2.39 (1H, m), 2.77 (3H, d,  $J = 4.6$  Hz), 2.79 - 2.84 (1H, m), 3.65 - 3.76 (2H, m), 3.86 (1H, m), 4.55 (1H, m), 6.39 (1H, t,  $J = 6.5$  Hz), 7.29 - 7.50 (10H, m), 8.36 (1H, dd,  $J = 4.6$  Hz,  $J = 9.2$  Hz), 8.49 (1H, s), 9.87 (1H, s br) :  $^{13}\text{C NMR}$  (DMSO- $d_6$ ) -5.5, -4.9, -4.7, 17.6, 17.9, 25.6, 25.7, 26.3, 62.5, 71.7, 83.3, 87.3, 118.6, 127.4, 129.4, 141.6, 142.8, 153.4, 154.0, 154.0, 155.2 : MS  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{37} \text{H}_{54} \text{N}_7 \text{O}_6 \text{Si}_2^+$  : 748.3674, found 748.3677

【0137】

上述のようにして得られた3',5'-ビス-0-(tert-ブチルジメチルシリル)-6-0-ジフェニルカルバモイル-2-N-メチルカルバモイルデオキシグアノシン(1.13g,1.52mmol)を無水テトラヒドロフランで3回共沸し、無水テトラヒドロフラン(15 ml)に溶解し、トリエチルアミン3フッ化水素(743 $\mu\text{l}$ ,4.56mmol)を加え、室温で1晩攪拌した。次いで、トルエン(5 ml)を加え、溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(C200)を用いてメタノール/クロロホルム5%~6%で精製した残渣に、酢酸エチル(5 ml)及びジエチルエーテル(15ml)を加えて再沈殿を行い、濾過により精製を行い、6-0-ジフェニルカルバモイル-2-N-メチルカルバモイルデオキシグアノシンを得た(643 mg, 81%)

$^1\text{H NMR}$  (DMSO- $d_6$ ) 2.33 - 2.36 (1H, m), 2.67 (1H, m), 2.79 (3H, d,  $J = 3.4$  Hz), 3.50 - 3.60 (2H, m), 3.85 (1H, d,  $J = 2.7$  Hz), 4.41 (1H, s), 4.93 (1H, s), 5.34 (1H, d,  $J = 3.2$  Hz), 6.39 (1H, t,  $J = 6.0$  Hz), 7.31 - 7.48 (10H, m), 8.39 (1H, d,  $J = 3.4$  Hz), 8.56 (1H, s), 9.87 (1H, s br) :  $^{13}\text{C NMR}$  (DMSO- $d_6$ ) 26.4, 61.3, 70.3, 83.4, 87.8, 118.7, 127.4, 129.4, 141.6, 143.2, 150.0, 153.4, 154.0, 154.1, 155.1 : MS  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{25} \text{H}_{25} \text{N}_7 \text{O}_6^+$  : 520.1945, found 520.1945

【0138】

上述のようにして得られた6-0-ジフェニルカルバモイル-2-N-メチルカルバモイルデ

オキシグアノシン(643mg,1.24mmol)を無水ピリジンで3回共沸し、無水ピリジン(12ml)に溶解し、4,4'-ジメトキシトリチルクロライド(629mg,1.86mmol)を加え、室温で3時間撹拌した。次いで、重曹水(5ml)を加えて反応を停止した。反応溶液を酢酸エチル(100 ml) / 重曹水(100 ml) で1回抽出した後、酢酸エチル(100 ml) / 食塩水(80 ml)で2回抽出した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を減圧下留去した後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(N60球状中性シリカゲル)を用いて1%トリエチルアミンを添加した酢酸エチル/ヘキサン50%~60%で精製し、5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-6-O-ジフェニルカルバモイル-2-N-メチルカルバモイルデオキシグアノシンを得た(889 mg,87%)。

$^1\text{H NMR}$  (DMSO- $d_6$ ) 2.37 - 2.42 (1H, m), 2.76 (3H, d,  $J = 4.6$  Hz), 2.80 - 2.84 (1H, m), 3.12 - 3.19 (2H, m), 3.65 (6H, d,  $J = 8.5$  Hz), 3.96 (1H, d,  $J = 2.4$  Hz), 4.43 (1H, s), 5.36 (1H, d,  $J = 3.7$  Hz), 6.43 (1H, t,  $J = 6.0$  Hz), 6.73 - 6.78 (4H, m), 7.08 - 7.49 (19H, m), 8.42 (1H, d,  $J = 4.6$  Hz), 8.46 (1H, s), 9.88 (1H, s) :  $^{13}\text{C NMR}$  (DMSO- $d_6$ ) 26.4, 64.0, 70.2, 83.5, 85.4, 85.9, 113.0, 113.0, 118.9, 126.5, 127.6, 127.6, 129.4, 129.6, 129.7, 135.4, 135.6, 141.6, 143.2, 144.9, 149.9, 153.4, 153.9, 154.1, 155.2, 158.0 : MS  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{46}\text{H}_{43}\text{N}_7\text{NaO}_8^+$  : 844.3071, found 844.3075

【0139】

上述のようにして得られた5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-6-O-ジフェニルカルバモイル-2-N-メチルカルバモイルデオキシグアノシン(760 mg,0.925mmol)を無水トルエンで3回共沸し、無水アセトニトリルで3回共沸し、無水塩化メチレン(9.2ml)に溶解し、ジイソプロピルエチルアミン(410  $\mu\text{l}$ ,2.35mmol)を加え、クロロ(2-シアノエトキシ)(-N,N-ジイソプロピルアミノ)ホスフィン(410  $\mu\text{l}$ ,1.85mmol)を加え、室温で2時間撹拌した。水(1ml)を加え反応を停止した。反応溶液を酢酸エチル(150 ml) / 5%重炭酸ナトリウム水(100 ml)で5回抽出した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧下留去した後、残渣をゲル濾過クロマトグラフィー(アセトニトリル)を用いて精製し、下記式(22)で表わされる化合物、5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-6-O-ジフェニルカルバモイル-2-N-メチルカルバモイルデオキシグアノシン-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)を得た(644mg, 68%)。

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ - $d_1$ ) 1.13 - 1.27 (14H, m), 2.43 (1H, m), 2.58 - 2.76 (3H, m), 2.94 (3H, m), 3.35 (2H, m), 3.61 - 3.84 (4H, m), 3.73 (6H, m), 4.29 - 4.33 (1H, m), 4.71 (1H, m), 6.35 (1H, m), 6.80 (4H, m), 7.18 - 7.43 (19H, m), 7.63 (1H, m), 8.09 (1H, m), 8.61 (1H, s) :  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ - $d_1$ ) 20.1, 20.2, 20.3, 20.4, 24.5, 24.5, 24.6, 26.7, 39.5, 39.7, 43.2, 43.3, 55.1, 55.1, 58.1, 58.1, 58.2, 58.3, 63.3, 63.4, 73.4, 73.6, 74.0, 74.1, 84.4, 85.7, 85.8, 86.0, 86.5, 113.1, 117.4, 117.5, 119.8, 126.9, 126.9, 127.8, 128.0, 128.0, 129.2, 129.9, 130.0, 130.0, 135.4, 135.5, 141.7, 144.4, 150.1, 153.0, 154.4, 154.5, 155.6, 155.6, 158.5 :  $^{31}\text{P NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ - $d_1$ ) 150.0, 150.3 : MS  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{55}\text{H}_{60}\text{N}_9\text{NaO}_9\text{P}^+$  : 1044.4149, found 1044.3683

【0140】

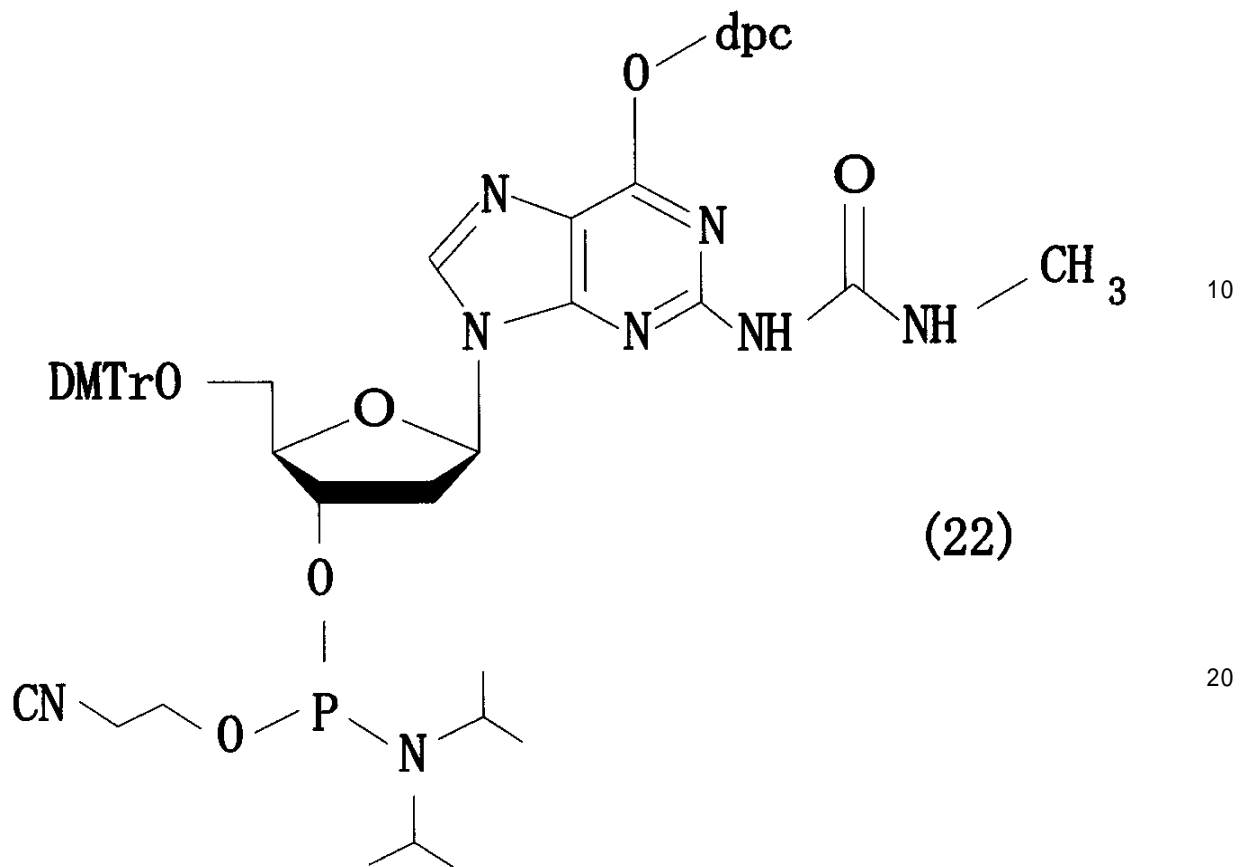
10

20

30

40

【化 3 7】



【 0 1 4 1】

実施例 1 1

3',5'-ビス-0-(tert-ブチルジメチルシリル)デオキシグアノシン(2.8g,5.83mmol)を無水ピリジンで3回共沸し、無水ピリジン(60ml)に溶解し、トリメチルシリルクロライド(1.11ml,8.75mmol)を加え室温で1時間攪拌した。次いで、クロロギ酸フェニル(1.10ml,8.75mmol)を加え室温で4時間攪拌した。次いで、28%アンモニア水(4.1ml,29.1mmol)を加え室温で2時間攪拌した。反応溶液を酢酸エチル(250ml)/水(200ml)で1回抽出した後、酢酸エチル(250ml)/食塩水(150ml)で2回抽出した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を減圧下留去した後、残渣をNHシリカゲルカラムクロマトグラフィー(25g)を用いてメタノール/クロロホルム6%~30%で精製し、3',5'-ビス-0-(tert-ブチルジメチルシリル)-2-N-カルバモイルデオキシグアノシンを得た(2.12g,68%)。

$^1\text{H NMR}$  (DMSO- $d_6$ ) 0.02 (6H, d), 0.10 (6H, s), 0.86 (9H, s), 0.88 (9H, s), 2.26 - 2.35 (1H, m), 2.62 - 2.68 (1H, m), 3.62 - 3.71 (2H, m), 3.82 (1H, m), 4.48 (1H, m), 6.15 (1H, t,  $J = 6.8$  Hz), 6.41 (1H, s br), 7.23 (1H, s br), 8.07 (1H, s), 10.07 (1H, s br), 12.03 (1H, s br) :  $^{13}\text{C NMR}$  (DMSO- $d_6$ ) -5.5, -5.5, -5.0, -4.8, 17.7, 18.0, 25.7, 25.8, 62.6, 71.9, 82.6, 87.1, 119.2, 136.4, 148.9, 149.1, 156.2 : MS  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{23}\text{H}_{43}\text{N}_6\text{O}_5\text{Si}_2^+$  : 539.2834, found 539.2809

【 0 1 4 2】

上述のようにして得られた3',5'-ビス-0-(tert-ブチルジメチルシリル)-2-N-カルバモイルデオキシグアノシン(1.23g,2.29mmol)を無水ピリジンで3回共沸し、無水ピリジン(23ml)に溶解した。次いで、ジイソプロピルエチルアミン(797 $\mu\text{l}$ ,4.58mmol)を加え、ジフェニルカルバモイルクロライド(689mg,2.98mmol)を加え、室温で0.5時間攪拌した

。次いで、重曹水( 5 ml )を加え反応を停止した。反応溶液を酢酸エチル( 180 ml ) / 重曹水(150 ml)で1回抽出した後、酢酸エチル( 180 ml ) / 食塩水( 100 ml )で2回抽出した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を減圧下留去した後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(C200)を用いて酢酸エチル / ヘキサン 50 % ~ 60 %で精製し、3', 5'-ビス-0-(tert-ブチルジメチルシリル)-2-N-カルバモイル-6-0-ジフェニルカルバモイルデオキシグアノシンを得た(1.53g, 91%)。

$^1\text{H NMR}$  ( DMSO- $d_6$  ) 0.00 ( 6H, s ), 0.10 ( 6H, s ), 0.82 ( 9H, s ), 0.88 ( 9H, s ), 2.33 - 2.35 ( 1H, m ) 2.62 - 2.67 ( 1H, m ), 3.65 - 3.74 ( 2H, m ), 3.84 ( 1H, m ), 4.55 ( 1H, m ), 6.34 ( 1H, t, J = 6.5 Hz ), 7.05 ( 1H, s br ) 7.11 - 7.48 ( 10H, m), 8.36 ( 1H, dd, J = 4.6 Hz, J = 9.2 Hz ), 7.98 ( 1H, s br ), 8.49 ( 1H, s ), 9.71 ( 1H, s ) :  $^{13}\text{C NMR}$  ( DMSO- $d_6$  ) -5.5, -5.5, -5.0, -4.7, 17.7, 18.0, 25.7, 25.8, 62.5, 71.6, 83.2, 87.3, 118.6, 127.3, 129.4, 141.6, 142.8, 149.9, 153.4, 154.2, 154.3, 155.1 : MS m/z calcd for  $\text{C}_{36}\text{H}_{52}\text{N}_7\text{O}_6\text{Si}_2^+$  : 734.3518, found 734.3581

【 0 1 4 3 】

上述のようにして得られた3', 5'-ビス-0-(tert-ブチルジメチルシリル)-2-N-カルバモイル-6-0-ジフェニルカルバモイルデオキシグアノシン(1.53g, 2.09mmol)を無水テトラヒドロフランで3回共沸し、無水テトラヒドロフラン( 10 ml )に溶解し、トリエチルアミン3フッ化水素(1.02ml, 6.27mmol)を加え、室温で1晩攪拌した。トルエン(10 ml)を加え、溶媒を減圧下留去した。次いで、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(N60球状中性シリカゲル)を用いてメタノール / クロロホルム 4 % ~ 10 %で精製し、2-N-カルバモイル-6-0-ジフェニルカルバモイルデオキシグアノシンを得た(1.21g, quant)。

$^1\text{H NMR}$  ( DMSO- $d_6$  ) 2.31 - 2.35 ( 1H, m ), 2.65 - 2.70 ( 1H, m ), 3.49 - 3.58 ( 2H, m ), 3.85 ( 1H, dd, J = 4.5 Hz, J = 7.6 Hz ), 4.44 ( 1H, dd, J = 3.2 Hz, J = 5.4 Hz ), 4.92 ( 1H, s ), 5.33 ( 1H, d, J = 3.9 Hz ), 6.35 ( 1H, t, J = 6.7 Hz ), 7.12 ( 1H, s br ) 7.29 - 7.48 ( 10H, m), 8.06 ( 1H, s br ), 8.57 ( 1H, s ), 9.75 ( 1H, s ) :  $^{13}\text{C NMR}$  ( DMSO- $d_6$  ) 61.4, 70.5, 83.4, 88.0, 118.7, 127.4, 129.4, 141.6, 143.2, 150.0, 153.4, 154.2, 154.3, 155.2 : MS m/z calcd for  $\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{N}_7\text{O}_6^+$  : 506.1788, found 506.1796

【 0 1 4 4 】

上述のようにして得られた2-N-カルバモイル-6-0-ジフェニルカルバモイルデオキシグアノシン(1.19g, 2.35mmol)を無水ピリジンで3回共沸し、無水ピリジン(23ml)に溶解し、4,4'-ジメトキシトリチルクロライド(917mg, 2.70mmol)を加え室温で2時間攪拌した。重曹水(8 ml)を加え反応を停止した。次いで、反応溶液を酢酸エチル(150 ml) / 重曹水(120 ml)で1回抽出した後、酢酸エチル(150 ml) / 食塩水(100ml)で2回抽出した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を減圧下留去した後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(N60球状中性シリカゲル)を用いて1%トリエチルアミンを添加したメタノール / クロロホルム 2 % ~ 3 %で精製し、2-N-カルバモイル-5'-0-(4,4'-ジメトキシトリチル)-6-0-ジフェニルカルバモイルデオキシグアノシンを得た(1.45 g, 76 %)。

$^1\text{H NMR}$  ( DMSO- $d_6$  ) 2.35 - 2.40 ( 1H, m ), 2.78 - 2.83 ( 1H, m ), 3.11 - 3.16 ( 2H, m ), 3.65 ( 6H, d, J = 7.8 Hz ), 3.95 ( 1H, dd, J = 4.4 Hz, J = 9.5 Hz ), 4.43 ( 1H, m ), 5.35 ( 1H, d, J = 4.9 Hz ), 6.39 ( 1H, t, J = 6.1 Hz ), 6.73 - 6.79 ( 4H, m), 7.09 - 7.48 ( 19H, m), 7.48 ( 1H, s br ), 8.46 ( 1H, s ), 9.73 ( 1H, s ) :  $^{13}\text{C NMR}$  ( DMSO- $d_6$  ) 54.9, 54.9, 63.9, 70.2, 79.2, 83.4, 85.4, 86.0, 113.0, 113.0, 118.8, 126.5, 127.6, 127.6, 129.4, 129.6, 129.7, 135.4, 135.6, 141.6, 143.0, 144.9, 149.6, 153.5, 154.2, 154.3, 155.2, 158.0 : MS m/z calcd for  $\text{C}_{45}\text{H}_{41}\text{N}_7\text{NaO}_8^+$  : 830.2914, found 830.2907

【 0 1 4 5 】

上述のようにして得られた2-N-カルバモイル-5'-0-(4,4'-ジメトキシトリチル)-6-0-ジフェニルカルバモイルデオキシグアノシン(250mg, 0.309mmol)を無水トルエンで3回共

10

20

30

40

50

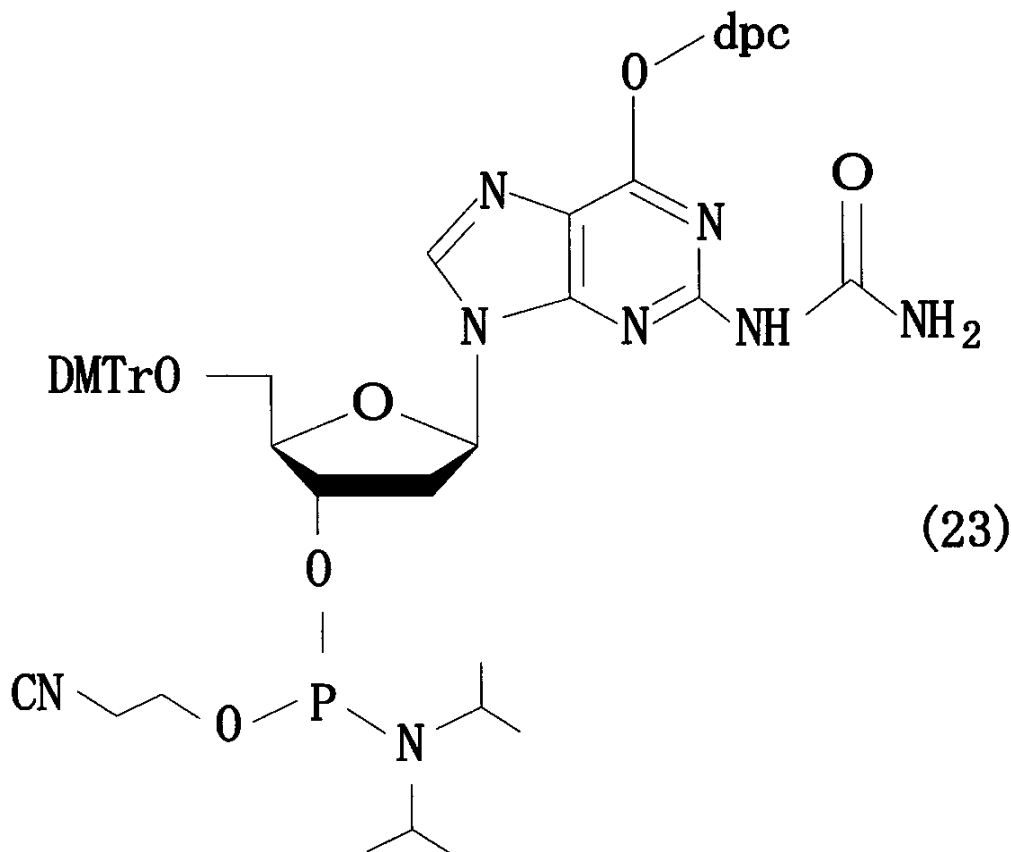
沸し、無水アセトニトリルで3回共沸し、無水塩化メチレン(3.0 ml)に溶解し、ジイソプロピルエチルアミン(27  $\mu$ l, 0.145 mmol)を加え、1H-テトラゾール(11 mg, 0.145 mmol)を加え、(2-シアノエトキシ)ジ(-N,N'-ジイソプロピルアミノ)ホスフィン(410  $\mu$ l, 1.85 mmol)を加え、室温で2時間撹拌した。反応溶液を酢酸エチル(50 ml) / 0.2 M水酸化ナトリウム水溶液(40 ml)で5回抽出した。次いで、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧下留去した後、残渣をゲル濾過クロマトグラフィー(アセトニトリル)を用いて精製し、酢酸エチル(50 ml) / 0.2 M水酸化ナトリウム水溶液(70 ml)で5回抽出し、

下記式(23)で表わされる化合物、2-N-カルバモイル-5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-6-O-ジフェニルカルバモイルデオキシグアノシン-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)を得た(245 mg, 75%)。

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ -d1) 1.11 - 1.33 (14H, m), 2.46 (1H, m), 2.55 - 2.74 (3H, m), 3.32 - 3.40 (2H, m), 3.57 - 3.87 (4H, m), 3.75 (6H, m), 4.26 - 4.32 (1H, m), 4.67 - 4.72 (1H, m), 5.36 (1H, s br), 6.35 (1H, m), 6.79 (4H, m), 7.17 - 7.50 (19H, m), 8.07 (1H, m), 8.53 (1H, s br) :  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ -d1) 20.6, 20.7, 20.8, 20.9, 24.9, 25.0, 25.0, 40.2, 43.6, 43.6, 43.7, 43.7, 55.6, 55.6, 58.5, 58.6, 58.6, 58.7, 63.7, 63.8, 73.9, 74.0, 74.4, 74.5, 84.7, 84.8, 86.2, 86.2, 86.4, 86.9, 113.6, 117.8, 117.9, 120.5, 127.3, 127.4, 128.3, 128.4, 128.5, 129.6, 130.3, 130.4, 130.4, 135.8, 135.8, 135.9, 135.9, 142.1, 144.7, 150.4, 153.1, 154.8, 154.9, 155.0, 156.2, 159.0 :  $^{31}\text{P NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ -d1) 149.9 : MS m/z calcd for  $\text{C}_{54}\text{H}_{59}\text{N}_9\text{NaO}_9\text{P}^+$  : 1030.3993, found 1033.4001

【0146】

【化38】



【0147】

#### 実施例 1.2

3', 5'-ビス-O-(tert-ブチルジメチルシリル)デオキシグアノシン(3.0g, 6.05 mmol)を無水トルエンで3回共沸し、無水ジメチルホルムアミド(30 ml)に溶解し、水酸化ナトリウム(199 mg, 7.86 mmol)を加え、70 の温度で1時間撹拌した。次いで、反応溶液を室

温に戻しメチルチオイソシアネート(1.24ml,18.2mmol)を加え、70の温度で36時間攪拌した。反応溶液を0.5M酢酸アンモニウム緩衝液(150ml)に注ぎ、酢酸エチル(200ml)/0.5M酢酸アンモニウム緩衝液(150ml)で1回抽出した後、酢酸エチル(200ml)/水(150ml)で2回抽出した。有機層を減圧下留去した後、残渣をNHシリカゲルカラムクロマトグラフィーを用いてメタノール/クロロホルム5%で原料を除き、ゲルを回収してメタノール/クロロホルム80%で40回溶出し、濃縮し、3',5'-ビス-0-(tert-ブチルジメチルシリル)-2-N-メチルチオカルバモイルデオキシグアノシンを得た(1.65g,48%)。

$^1\text{H NMR}$  (DMSO- $d_6$ ) 0.01 (6H, d), 0.09 (6H, s), 0.84 (9H, s), 0.87 (9H, s), 2.30 - 2.34 (1H, m), 2.58 - 2.63 (1H, m), 3.07 (3H, s), 3.63 - 3.74 (2H, m), 3.83 (1H, dd,  $J = 4.4$  Hz,  $J = 8.5$  Hz), 4.51 (1H, m), 6.30 (1H, t,  $J = 6.5$  Hz), 8.06 (1H, s), 10.73 (2H, s br), 11.98 (1H, s br) :  $^{13}\text{C NMR}$  (DMSO- $d_6$ ) -5.6, -5.5, -5.0, -4.8, 17.6, 17.9, 25.6, 25.7, 25.7, 31.7, 62.4, 71.5, 82.7, 86.9, 119.8, 136.6, 147.4, 179.0 : MS m/z calcd for  $\text{C}_{24} \text{H}_{44} \text{N}_6 \text{O}_4 \text{S Si}_2^+$  : 569.2762, found 569.2750

【0148】

上述のようにして得られた、3',5'-ビス-0-(tert-ブチルジメチルシリル)-2-N-メチルチオカルバモイルデオキシグアノシン(1.0g,1.76mmol)を無水ピリジンで3回共沸し、無水ピリジン(17ml)に溶解した。ジイソプロピルエチルアミン(511 $\mu$ l,3.16mmol)を加え、ジフェニルカルバモイルクロライド(489mg,2.11mmol)を加え、室温で0.5時間攪拌した。重曹水(5ml)を加え反応を停止した。次いで、反応溶液を酢酸エチル(150ml)/重曹水(120ml)で1回抽出した後、酢酸エチル(150ml)/食塩水(100ml)で2回抽出した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を減圧下留去した後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(N60球状中性シリカゲル)を用いて酢酸エチル/ヘキサン40%~50%で精製し、3',5'-ビス-0-(tert-ブチルジメチルシリル)-6-0-ジフェニルカルバモイル-2-N-メチルチオカルバモイルデオキシグアノシンを得た(1.09g,81%)。

$^1\text{H NMR}$  (DMSO- $d_6$ ) 0.00 (6H, s), 0.11 (6H, s), 0.82 (9H, s), 0.89 (9H, s), 2.34 - 2.39 (1H, m), 2.81 - 2.87 (1H, m), 3.11 (3H, d,  $J = 4.6$  Hz), 3.65 - 3.78 (2H, m), 3.86 (1H, dd,  $J = 4.5$  Hz,  $J = 8.8$  Hz), 4.55 (1H, m), 6.42 (1H, t,  $J = 6.4$  Hz), 7.29 - 7.50 (10H, m), 8.56 (1H, s), 10.59 (1H, dd,  $J = 4.5$  Hz,  $J = 9.1$  Hz), 10.78 (1H, s) :  $^{13}\text{C NMR}$  (DMSO- $d_6$ ) -5.5, -5.5, -5.0, -4.8, 17.7, 17.9, 25.6, 25.7, 31.9, 62.4, 71.6, 83.6, 87.3, 119.1, 127.3, 129.4, 141.5, 143.5, 149.7, 15.0, 153.6, 155.0, 179.7 : MS m/z calcd for  $\text{C}_{37} \text{H}_{54} \text{N}_7 \text{O}_5 \text{S Si}_2^+$  : 764.3446, found 764.3432

【0149】

上述のようにして得られた3',5'-ビス-0-(tert-ブチルジメチルシリル)-6-0-ジフェニルカルバモイル-2-N-メチルチオカルバモイルデオキシグアノシン(900mg,1.17mmol)を無水テトラヒドロフランで3回共沸し、無水テトラヒドロフラン(6.0ml)に溶解し、トリエチルアミン3フッ化水素(574 $\mu$ l,3.51mmol)を加え、室温で1晩攪拌した。次いで、トルエン(5ml)を加え、溶媒を減圧下留去した。残渣に、メタノール(5ml)及びヘキサン(25ml)を加え、再沈殿をおこない濾過して精製し、6-0-ジフェニルカルバモイル-2-N-メチルチオカルバモイルデオキシグアノシンを得た(504mg,80%)。

$^1\text{H NMR}$  (DMSO- $d_6$ ) 2.32 - 2.37 (1H, m), 2.70 - 2.75 (1H, m), 3.12 (3H, d,  $J = 4.4$  Hz), 3.48 - 3.61 (2H, m), 3.85 (1H, dd,  $J = 4.2$  Hz,  $J = 8.1$  Hz), 4.42 (1H, dd,  $J = 3.8$  Hz,  $J = 5.9$  Hz), 4.92 (1H, t,  $J = 5.4$  Hz), 5.34 (1H, d,  $J = 4.2$  Hz), 6.41 (1H, t,  $J = 6.5$  Hz), 7.30 - 7.50 (10H, m), 8.62 (1H, s), 10.56 (1H, dd,  $J = 4.4$  Hz,  $J = 9.1$  Hz), 10.80 (1H, s) :  $^{13}\text{C NMR}$  (DMSO- $d_6$ ) 32.1, 61.2, 70.2, 83.8, 87.8, 119.3, 127.3, 129.4, 141.5, 144.0, 149.8, 152.0, 153.6, 155.0, 179.7 : MS m/z calcd for  $\text{C}_{25} \text{H}_{26} \text{N}_7 \text{O}_5 \text{S}^+$  : 536.1716, found 536.1546

10

20

30

40

50

## 【 0 1 5 0 】

上述のようにして得られた6-0-ジフェニルカルバモイル-2-N-メチルチオカルバモイルデオキシグアノシン(400mg,0.744mmol)を無水ピリジンで3回共沸し、無水ピリジン(8.0 ml)に溶解し、4,4'-ジメトキシトリチルクロライド(278 mg,0.818mmol)を加え室温で3時間攪拌した。次いで、重曹水(3 ml)を加え反応を停止した。反応溶液を酢酸エチル(150 ml) / 重曹水(120 ml)で1回抽出した後、酢酸エチル(150ml) / 食塩水(100 ml)で2回抽出した。次いで、有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を減圧下留去した後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(N60球状中性シリカゲル)を用いて1%トリエチルアミンを添加メタノール/クロロホルム3%~4%で精製し、5'-0-(4,4'-ジメトキシトリチル)-6-0-ジフェニルカルバモイル-2-N-メチルチオカルバモイルデオキシグアノシンを得た(570mg,78%)。

$^1\text{H NMR}$  (DMSO- $d_6$ ) 2.37 - 2.42 (1H, m), 2.84 - 2.89 (1H, m), 3.01 (3H, d,  $J = 4.4$  Hz), 3.11- 3.21 (2H, m), 3.65 (6H, d,  $J = 10.2$  Hz), 3.97 (1H, m), 4.46 (1H, t,  $J = 5.5$  Hz), 5.35 (1H, d,  $J = 4.6$  Hz), 6.45 (1H, t,  $J = 5.4$  Hz), 6.72 - 6.77 (4H, m), 7.06 - 7.50 (19H, m), 8.53 (1H, s), 10.62 56 (1H, dd,  $J = 4.4$  Hz,  $J = 8.8$  Hz), 10.82 (1H, s) :  $^{13}\text{C NMR}$  (DMSO- $d_6$ ) 32.0, 40.0, 54.9, 55.0, 64.0, 70.2, 84.0, 85.3, 86.1, 113.0, 113.0, 119.5, 126.5, 127.6, 127.6, 129.4, 129.6, 129.7, 135.3, 135.7, 141.6, 144.2, 144.9, 149.8, 152.0, 153.5, 155.0, 158.0, 179.8 : MS m/z calcd for  $\text{C}_{46} \text{H}_{43} \text{N}_7 \text{Na O}_7 \text{S}^+$  : 860.2842, found 860.2859

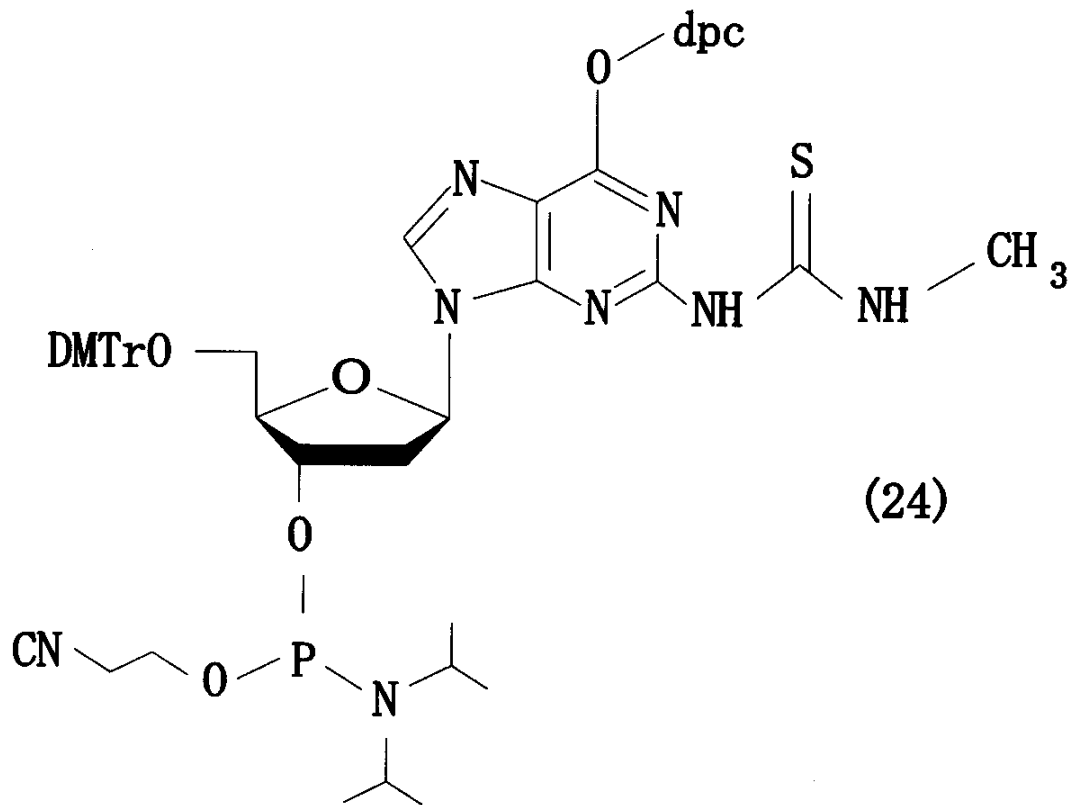
## 【 0 1 5 1 】

上述のようにして得られた5'-0-(4,4'-ジメトキシトリチル)-6-0-ジフェニルカルバモイル-2-N-メチルチオカルバモイルデオキシグアノシン(250mg,0.298mmol)を無水トルエンで3回共沸し、無水アセトニトリルで3回共沸し、次いで、無水塩化メチレン(3.0ml)に溶解し、ジイソプロピルエチルアミン(83  $\mu\text{l}$ ,0.477mmol)を加え、クロロ(2-シアノエトキシ)(-N,N'-ジイソプロピルアミノ)ホスフィン(86  $\mu\text{l}$ , 0.387 mmol)を加え、室温で2時間攪拌した。次いで、水(1 ml)を加えて反応を停止した。反応溶液を酢酸エチル(50 ml) / 5%重碳酸ナトリウム水(50ml)で5回抽出した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧下留去した後、残渣をゲル濾過クロマトグラフィー(アセトニトリル)を用いて精製し、次いで、酢酸エチル(50 ml) / 0.2 M水酸化ナトリウム水溶液(50 ml)で5回抽出し、下記式(24)で表わされる化合物、5'-0-(4,4'-ジメトキシトリチル)-6-0-ジフェニルカルバモイル-2-N-メチルチオカルバモイルデオキシグアノシン-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)を得た(144 mg,47%)。

$^1\text{H NMR}$  (CDCl<sub>3</sub>- $d_1$ ) 1.12 - 1.29 (14H, m), 2.46 (1H, m), 2.57 - 2.75 (3H, m), 2.25 (3H, m), 3.30 - 3.38 (2H, m), 3.58 - 3.88 (4H, m), 3.75 (6H, m), 4.27 - 4.33 (1H, m), 4.67 (1H, m), 6.32 (1H, m), 6.79 (4H, m), 7.16 - 7.43 (19H, m), 8.10 (1H, m), 8.52 (1H, s), 10.59 (1H, m) :  $^{13}\text{C NMR}$  (CDCl<sub>3</sub>- $d_1$ ) 20.3, 20.4, 20.6, 20.6, 24.7, 24.7, 24.8, 32.6, 39.8, 43.4, 43.4, 43.5, 55.3, 58u.2, 58.3, 58.4, 58.4, 63.4, 63.6, 73.6, 74.1, 74.2, 84.8, 84.8, 86.1, 86.1, 86.3, 86.7, 113.3, 113.3, 117.5, 117.6, 120.2, 120.3, 127.1, 127.1, 128.0, 128.2, 128.2, 129.4, 130.1, 130.1, 130.2, 135.5, 135.6, 135.7, 141.7, 142.4, 144.5, 150.0, 151.8, 158.7, 158.7, 180.0 :  $^{31}\text{P NMR}$  (CDCl<sub>3</sub>- $d_1$ ) 150.0, 150.2 : MS m/z calcd for  $\text{C}_{55} \text{H}_{60} \text{N}_9 \text{Na O}_8 \text{P S}^+$  : 1060.3921, found 1060.3889

## 【 0 1 5 2 】

【化 3 9】



【 0 1 5 3 】

## 実施例 1 3

実施例 3 で得られた 2'-O-メチル-3'-O-(2-シアノエトキシエチル-N,N'-ジイソプロピルホスホロアミダイト)-5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2-N-アセチル-3-デアザグアノシンを用い、2'-O-メチルRNA である、2'-O-Me-5'-(CGGCXGAGGAG) (配列番号：9、X=2'-O-メチル-2-N-アセチル 3-デアザグアノシン) を合成した。合成は、Applied Biosystem Inc. (ABI) の DNA/RNA Synthesizer 392 を使用して行った。2'-O-メチルRNA オリゴマーの自動合成機による合成は、Glen Research より購入した 2'-O-メチルグアニンを担持した固相担体 (1 μmol) を用いて行った。X に相当するヌクレオチド残基以外は上記自動合成装置の典型的な RNA 合成プロトコールに従って行い、X の残基のみは以下のプロトコール 1) ~ 3) に従い、各ステップの間にはアセトニトリルによる洗浄を行いマニュアル合成にて鎖伸長を行った。

## 1) カップリング

アミダイトユニット 20 μmol 1H-テトラゾール 80 μmol アセトニトリル - 塩化メチレン (200 μL - 50 μL) 5 分間

## 2) 酸化

0.1 M ヨウ素 / ピリジン - 水 (180 μL - 20 μL) 2 分間

## 3) 3% トリクロロ酢酸 / 塩化メチレン (1 mL) × 3

【 0 1 5 4 】

鎖伸長反応終了後、アンモニア水で上記自動合成装置のオートクレーブ機能を用いて切り出しを行い、ここにアンモニア水 - エタノール (1.5 mL ~ 0.5 mL) を加え、室温で 24 時間放置した。得られた溶液を C18 カートリッジに通し、不純物を除去した後、2% TFA 水でカラム内で DMTro 基を切断した後、20% アセトニトリルを含む水で目的物を溶出した。得られた溶液を凍結乾燥し、次いで、陰イオン交換 HPLC を用いて精製をおこなった。

MALDI-TOF マス calcd. 3456.6 found 3456.7。

## 【 0 1 5 5 】

上述のようにして得られたオリゴヌクレオチドと、それに相補鎖であるRNA、5'-CUCCY CGCCG-3' (配列番号：10、Y=アデノシン、グアノシン、シチジン、ウリジンのいずれかを表わす) もしくはDNA 5'-CTCCYCGCCG-3' (配列番号：11、Y=2'-デオキシアデノシン、2'-デオキシグアノシン、2'-デオキシシチジン、チミジンのいずれかを表わす) との二本鎖の融解温度( $T_m$ )を測定した。方法は、実施例6に記載された方法で行った。コントロールとして、配列番号：9で表わされる塩基配列のXがグアノシンであるものについても調べた。

測定条件は0.1M NaCl、0.1mM EDTAを含む10mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) 中、各オリゴヌクレオチド濃度2 $\mu$ Mで測定した。

10

## 【 0 1 5 6 】

配列番号：10で表わされる塩基配列を有するRNAとの試験の結果(測定結果1)を表5に、配列番号：11で表わされる塩基配列を有するDNAとの試験(測定結果2)の結果を表6に示す。

## 【 0 1 5 7 】

## 【表5】

X	Y	$T_m$ (°C)	$\Delta T_m$ (°C)
G	C	71	—
G	A	50	-21
G	G	54	-17
G	U	62	-9
ad3G	C	70	—
ad3G	A	51	-19
ad3G	G	57	-13
ad3G	U	55	-15

20

30

## 【 0 1 5 8 】

## 【表6】

X	Y	$T_m$ (°C)	$\Delta T_m$ (°C)
G	C	59	—
G	A	40	-19
G	G	41	-18
G	T	50	-9
ad3G	C	60	—
ad3G	A	38	-22
ad3G	G	43	-18
ad3G	T	46	-14

40

## 【 0 1 5 9 】

測定結果1結果Xの位置に2'-O-メチル-2N-アセチル-3-デアザグアノシン(ad3G)を含むオリゴヌクレオチドは、Xの位置に2'-O-メチル-グアノシン(G)を含むオリゴヌクレオチドにくらべ、Y=Cである相補鎖に対する $T_m$ が同等(71 と70)であった。

50

一方、最も安定なミスマッチである場合のTmはXがad3Gを含む場合(57, Y=G)の方がXがGの場合(62, Y=U)よりも5低かった。この結果、ad3Gを含むオリゴヌクレオチドはミスマッチ塩基識別能が向上していることが明らかになった。

また、測定結果2の結果Xの位置に2'-O-メチル-2N-アセチル-3-デアザグアノシン(ad3G)を含むオリゴヌクレオチドは、Xの位置にデオキシグアノシン(G)を含むオリゴヌクレオチドに比べ、Y=Cである相補鎖に対するTmが同等(59と60)であった。

一方、最も安定なミスマッチである場合のTmはXがad3Gを含む場合(46, Y=T)の方がXがGの場合(50, Y=T)よりも4低かった。この結果、ad3Gを含むオリゴヌクレオチドはミスマッチ塩基識別能が向上していることが明らかになった。

【0160】

#### 実施例14

実施例11で得られた2-N-カルバモイル-5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル))-6-O-ジフェニルカルバモイルデオキシグアノシン-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)を得た(245 mg, 75%)を用いて、2'-デオキシ-2-N-カルバモイルグアノシンを含むオリゴヌクレオチドを合成した。合成したDNAは5'-CGGCXAGGAG-3'(配列番号:12、Xは2'-デオキシ-2-N-カルバモイルグアノシンを表わす)の配列を有するDNAである。合成には、Applied Biosystem Inc.のDNA/RNA synthesizer 392を使用した。天然型ホスホロアミダイトユニットおよびその他の必要な試薬は、Glen Research Inc.より購入して用いた。原料合成例(追加16)で合成したホスホロアミダイトユニットは無水アセトニトリル(0.1M)に溶解し、DNA自動合成機に適用した。塩基部の脱保護は、アンモニア水(2mL)を加え、室温で12時間放置することで行い、その後の精製は実施例13と同様に行った。

MALDI-TOFマス calcd. 3158.4 found 3158.6。

【0161】

#### 実施例15

実施例10で得られた5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル))-6-O-ジフェニルカルバモイル-2-N-メチルカルバモイルデオキシグアノシン-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)を用いて、2'-デオキシ-2-N-メチルカルバモイルグアノシンを有するオリゴヌクレオチドを合成した。合成したDNAは5'-CGGCXAGGAG-3'(配列番号:13、Xは2'-デオキシ-2-N-メチルカルバモイルグアノシンを表わす)の配列をもつDNAである。Applied Biosystem Inc.のDNA/RNA synthesizer 392を使用した。天然型ホスホロアミダイトユニットおよびその他の必要な試薬は、Glen Research Inc.より購入した。用いたホスホロアミダイトユニットは無水アセトニトリル(0.1M)に溶解し、DNA自動合成機に適用した。塩基部の脱保護は、アンモニア水(2mL)を加え、室温で12時間放置することで行い、その後の精製は実施例14と同様に行った。

MALDI-TOFマス calcd. 3172.5 found 3172.6。

【0162】

#### 実施例16

実施例12で得られた5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル))-6-O-ジフェニルカルバモイル-2-N-メチルチオカルバモイルデオキシグアノシン-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)を用いて、2'-デオキシ-2-N-メチルチオカルバモイルグアノシンを含むオリゴヌクレオチドを合成した。合成したDNAは5'-CGGCXAGGAG-3'(Xは2'-デオキシ-2-N-メチルチオカルバモイルグアノシンを表わす)の配列をもつDNAである。Applied Biosystem Inc.のDNA/RNA synthesizer 392を使用した。天然型ホスホロアミダイトユニットおよびその他の必要な試薬は、Glen Research Inc.より購入した。用いた合成したホスホロアミダイトユニットは無水アセトニトリル(0.1M)に溶解し、DNA自動合成機に適用した。塩基部の脱保護は、アンモニア水(2mL)を加え、室温で12時間放置することで行い、その後の精製は実施例14と同様に行った。

MALDI-TOFマス calcd. 3188.8 found 3188.6。

【0163】

10

20

30

40

50

得られたオリゴヌクレオチドと、それに相補鎖と、それに相補的な鎖であるDNA、5'-CTCCYCGCCG-3' (配列番号: 14、Y=2'-デオキシアデノシン、2'-デオキシグアノシン、2'-デオキシチジン、チミジンのいずれかを表わす) との二本鎖の融解温度( $T_m$ )を測定した。測定条件は0.1M NaCl、0.1mM EDTAを含む10mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) 中、各オリゴヌクレオチド濃度2  $\mu$ Mで測定した。

【0164】

【表7】

X	Y	$T_m$ (°C)	$\Delta T_m$ (°C)
G	C	52	—
G	A	37	-15
G	G	36	-16
G	T	39	-13
cmG	C	52	—
cmG	A	36	-16
cmG	G	37	-15
cmG	T	36	-16

10

20

【0165】

Xの位置に2'-デオキシ-2-N-カルバモイルグアノシン(cmG)を含むオリゴヌクレオチドは、Xの位置に2'-デオキシグアノシン(G)を含むオリゴヌクレオチドに比べ、Y=Cである相補鎖に対する $T_m$ が同等(52)であった。

一方、最も安定なミスマッチである場合の $T_m$ はXがcmGを含む場合(36, Y=G, T)の方がXがGの場合(39, Y=T)よりも3低かった。この結果、cmGを含むオリゴヌクレオチドはミスマッチ塩基識別能が向上していることが明らかになった。

【配列表】

0004882074000001.app

30

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I			
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	A
C 1 2 M	1/00	(2006.01)	C 1 2 M	1/00	A

(72)発明者 大窪 章寛  
 神奈川県横浜市緑区長津田町4 2 5 9番地 国立大学法人 東京工業大学内

(72)発明者 坂本 一石  
 神奈川県横浜市緑区長津田町4 2 5 9番地 国立大学法人 東京工業大学内

(72)発明者 佐々見 武志  
 神奈川県横浜市緑区長津田町4 2 5 9番地 国立大学法人 東京工業大学内

審査官 伊藤 幸司

(56)参考文献 特開2 0 0 5 - 0 0 0 1 6 2 ( J P , A )  
 特開2 0 0 4 - 2 3 3 2 1 7 ( J P , A )  
 特表2 0 0 2 - 5 1 0 5 0 7 ( J P , A )  
 HELVETICA CHIMICA ACTA , 1 9 8 9 年 , Vol.72 , pp.868-881  
 Biochemistry , 1 9 9 2 年 , Vol.31 , No.45 , pp.10941-10949  
 Biochemistry , 1 9 9 2 年 , Vol.31 , No.25 , pp.5925-5936  
 NUCLEOSIDES & NUCLEOTIDES , 1 9 8 9 年 , Vol.8 , No.5 & 6 , pp.789-792  
 Eur. J. Org. Chem. , 2 0 0 1 年 , (24) , pp.4583-4593

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C07H21/04  
 A61K48/00  
 A61K31/7115  
 C07H19/04  
 C07H19/14  
 C07H19/173  
 C12N15/09  
 C12Q1/68  
 C12M1/00  
 A61P43/00  
 CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN)