

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2013 年 10 月 10 日(10.10.2013)



(10) 国際公開番号
WO 2013/150902 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) C07H 19/173 (2006.01)
C07H 19/073 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2013/058349
- (22) 国際出願日: 2013 年 3 月 22 日(22.03.2013)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2012-084249 2012 年 4 月 2 日(02.04.2012) JP
- (71) 出願人: 独立行政法人理化学研究所(RIKEN)
[JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号
Saitama (JP).
- (72) 発明者: 上田 泰己(UEDA Hiroki); 〒6500047 兵庫県神戸市中央区港島南町 2-2-3 独立行政法人理化学研究所 神戸研究所内 Hyogo (JP). 池田 修司(IKEDA Shuji); 〒6500047 兵庫県神戸市中央区港島南町 2-2-3 独立行政法人理化学研究所 神戸研究所内 Hyogo (JP).

学研究所 神戸研究所内 Hyogo (JP). 田井中 一貴(TAINAKA Kazuki); 〒6500047 兵庫県神戸市中央区港島南町 2-2-3 独立行政法人理化学研究所 神戸研究所内 Hyogo (JP).

(74) 代理人: 平木 祐輔, 外(HIRAKI Yusuke et al.); 〒1056232 東京都港区愛宕 2 丁目 5 番 1 号 愛宕グリーンヒルズMORIタワー 3 2 階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

[続葉有]

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING 5'-TERMINAL-PHOSPHORYLATED OLIGODEOXYNUCLEOTIDE BY CLEAVING OLIGODEOXYNUCLEOTIDE CONTAINING NON-NATURALLY-OCCURRING NUCLEOTIDE

(54) 発明の名称: 非天然型塩基を含むオリゴデオキシヌクレオチドの切断による 5'末端リン酸化オリゴデオキシヌクレオチドの製造方法

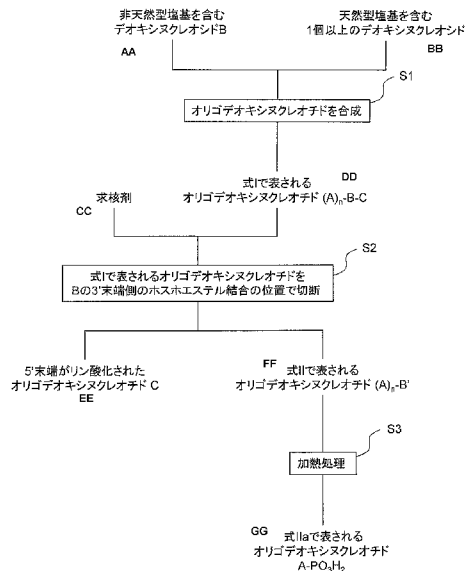


FIG. 1:
AA Deoxynucleoside (B) containing non-naturally-occurring nucleotide
BB At least one deoxynucleoside containing non-naturally-occurring nucleotide
S1 Synthesis of oligodeoxynucleotide
CC Nucleophile
DD Oligodeoxynucleotide (A)_n-B-C represented by formula (I)
S2 Cleavage of oligodeoxynucleotide represented by formula (I) at position corresponding to phosphodiester bond formed on 3'-terminal side of (B)
EE 5'-Terminal-phosphorylated oligodeoxynucleotide (C)
FF Oligodeoxynucleotide (A)_n-B' represented by formula (II)
S3 Heating treatment
GG Oligodeoxynucleotide A-PO₃H₂ represented by formula (IIa)

(57) Abstract: Provided is a terminal-phosphorylated oligodeoxynucleotide which is produced by introducing a deoxynucleotide containing a non-naturally-occurring nucleotide into a DNA strand and then cleaving the DNA strand through a chemical reaction at low cost and by a simple experimental procedure. The present invention relates to a method for producing an oligodeoxynucleotide, comprising a 5'-terminal-phosphorylated oligodeoxynucleotide formation step of bringing a nucleophile and an oligodeoxynucleotide represented by formula (I) into contact with each other to cause the detachment of a 5'-terminal-phosphorylated oligodeoxynucleotide moiety in a deoxynucleoside (C) that is contained in the oligodeoxynucleotide represented by formula (I) from the 3'-position of a deoxynucleoside (B) that is contained in the oligodeoxynucleotide represented by formula (I) and contains a non-naturally-occurring nucleotide, thereby cleaving a phosphodiester bond formed between the 3'-position of the deoxynucleoside (B) and the 5'-terminal of the deoxynucleoside (C), whereby a 5'-terminal-phosphorylated oligodeoxynucleotide (C) can be produced.

(57) 要約:

[続葉有]

WO 2013/150902 A1



(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR),

OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

非天然型塩基を含むデオキシヌクレオチドを DNA 鎖に導入することにより、化学反応によって低コスト且つ簡単な実験操作で DNA 鎖の切断を行い、結果として生じた末端がリン酸化されたオリゴデオキシヌクレオチドを提供する。本発明は、求核剤と式 I で表されるオリゴデオキシヌクレオチドとを接触させることによって、式 I で表されるオリゴデオキシヌクレオチドに含まれる非天然型塩基を含むデオキシヌクレオチド B の 3' 位と C の 5' 末端との間のホスホジエステル結合が、C の 5' 末端がリン酸化されたオリゴデオキシヌクレオチド部分が B の 3' 位から脱離することによって切断されて、5' 末端がリン酸化されたオリゴデオキシヌクレオチド C を得る、5' 末端リン酸化オリゴデオキシヌクレオチド形成工程を含む、オリゴデオキシヌクレオチドの製造方法に関する。

明 細 書

発明の名称：

非天然型塩基を含むオリゴデオキシヌクレオチドの切断による5' 末端リン酸化オリゴデオキシヌクレオチドの製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、非天然型塩基を含むオリゴデオキシヌクレオチドの切断による5' 末端リン酸化オリゴデオキシヌクレオチドの製造方法に関する。

背景技術

[0002] 分子生物学分野の研究においては、デオキシリボ核酸（以下「DNA」とも記載する）を複製又は増幅、切断、及び連結する技術が使用される。このうち、DNAを切断する技術としては、制限酵素を用いる方法が、DNAを連結する技術としては、DNA連結酵素(DNAリガーゼ)を用いる方法が、それぞれ一般的である。例えば、タイプIIの制限酵素を用いて突出末端を有するDNA断片を調製し（非特許文献1及び2）、当該突出末端を有するDNA断片と、当該突出末端と相補的な突出末端を有する別のDNA断片とをDNA連結酵素を用いて連結することができる。

[0003] しかしながら、上記の方法には、いくつかの問題点がある。第一に、タイプIIの制限酵素を用いて作製された突出末端は突出部分が短い。第二に、突出末端の突出部分の塩基配列が回文配列となる。第三に、制限酵素の認識配列でしか突出末端を作製することができない。これらの問題点のうち、第一及び第二の問題点は、DNA連結酵素によるDNA断片同士の連結効率の低下の原因となり、第三の問題点は、DNA断片を連結した結果形成される新たなDNAにおける塩基配列の大きな制約となる。

[0004] このような問題点を解決するため、非天然型塩基を含むデオキシ又はリボヌクレオチドを予めDNA鎖に導入しておき、非天然型塩基を含むデオキシ又はリボヌクレオチドの部位でDNA鎖を切断する技術が開発された。特許文献1及び2、並びに非特許文献3～5は、非天然型塩基としてウリジン（リボヌクレオ

チド)を導入したDNAプライマーを用いてポリメラーゼ連鎖反応(PCR)等でDNAを増幅した後、増幅されたDNAをウリジン(リボヌクレオチド)の位置で切断する方法を記載する。また、非特許文献6~12は、非天然型塩基として2'-デオキシウリジンを導入したDNAプライマーを用いてPCR等でDNAを増幅した後、増幅されたDNAを2'-デオキシウリジンの位置で切断する方法を記載する。上記文献に記載の方法は、DNAの切断にRNA分解酵素又はウラシル除去酵素のような酵素を用いる。それ故、コスト面で不利である。また、一般に酵素による切断反応は、pH及び/又は金属イオン濃度などに関する特別な反応条件を満たす必要がある。

[0005] 非特許文献13は、デプリネーションとして知られるDNA塩基の脱離反応とそれによって生じるアベシック部位を経由する、DNAの切断方法を記載する。デプリネーションは、酸性条件下で容易に引き起こされるが、塩基性条件下では非常に起きにくいことが知られている(非特許文献14)。非特許文献15は、天然型塩基ではデプリネーションが起こりにくい塩基性条件下で、デプリネーションと類似の反応を引き起こす非天然型塩基を含むデオキシヌクレオチドを記載する。しかしながら、当該文献記載のデオキシヌクレオチドを用いる場合、DNA切断のために酸素バブリングという煩雑な操作を必要とする。また、DNA自動合成機によるDNAの合成条件下及び/又はPCRのようなDNAの複製条件下で安定であり、且つ天然型塩基と同様にDNAの複製反応で鋳型として機能する非天然型塩基を含むデオキシヌクレオチドは報告されていない。

[0006] オリゴデオキシヌクレオチド(以下「DNAオリゴマー」又は「オリゴDNA」とも記載する)を人工的に合成する場合、DNA自動合成機が使用される。DNA自動合成機を用いて合成されたDNAオリゴマーは、通常、5'末端がリン酸化されていない。このため、DNA連結酵素を用いて当該合成DNAオリゴマーを他のDNA(DNA誘導体)と連結する場合、予め5'末端をリン酸化する必要がある。

[0007] DNAの5'及び/又は3'末端をリン酸化する方法としては、DNA断片をポリヌクレオチドキナーゼ処理する方法(5'末端リン酸化の場合)、並びにリン

酸化アミダイトを用いる合成DNAの末端リン酸化法を挙げることができる（特許文献3並びに非特許文献16及び17）。このうち、リン酸化アミダイトを用いる方法の場合、リン酸化アミダイトのカップリング効率が100%ではないため、リン酸化されたDNA及びリン酸化されなかったDNAが生成する。ここで、5'末端のリン酸化の場合、リン酸化されたDNAとリン酸化されなかったDNAとは、逆相HPLCでは分離が困難という問題点が存在する。逆相HPLCにおいてリン酸化されたDNAとリン酸化されなかったDNAとの分離を改善する方法として、DNAの末端リン酸部分をDMTr基のような保護基で保護した形態でDNAオリゴマーを精製し、その後、酸処理によってDMTr基を脱保護するという方法がある。しかしながら、この方法の場合、脱保護に酸を使用するため、デプリネーション反応が起こってDNAが破壊されるという問題が存在する（非特許文献18）。

先行技術文献

特許文献

[0008] 特許文献1：特開平10-66576号公報

特許文献2：米国特許第7393635号明細書

特許文献3：米国特許第5959090号明細書

特許文献4：米国特許第7794936号明細書

特許文献5：米国特許第5432272号明細書

特許文献6：米国特許第5645985号明細書

特許文献7：国際公開第2007/058326号パンフレット

特許文献8：国際公開第2009/101810号パンフレット

特許文献9：米国特許第6864049号明細書

非特許文献

[0009] 非特許文献1：How restriction enzymes became the workhorses of molecular biology. Roberts, R.J., PNAS, 2005年, 102, 17, p. 5905-5908

非特許文献2：Structure and function of type II restriction endonucleases. Pingoud, A. 及び Jeltsch, A., Nucleic Acids Res., 2001年, 29, 18,

p. 3705-3727

非特許文献3: Cleavage of a DNA-RNA-DNA/DNA chimeric substrate containing a single ribonucleotide at the DNA-RNA junction with prokaryotic RNases HII., Haruki, M., Tsunaka, Y., Morikawa, M. 及び Kanaya, S., FEB S Letters, 2002年, 531, p. 204-208

非特許文献4: Universal restriction site-free cloning method using chimeric primers. Chen, G. J., Qiu, N. 及び Page, M. G. P., Biotechniques, 2002年, 32, 3, p. 518-520

非特許文献5: Seamless gene engineering using RNA- and DNA-overhang cloning. Coljee, V. W., Mrrray, H. L., Donahue, W. F. 及び Jarrell, K. A., Nature Biotechnology, 2000年, 18, p. 789-791

非特許文献6: PHUSER (Primer Help for USER): a novel tool for USER fusion primer design. Olson, L. R., Hansen, N. B., Bonde, M. T., Genee, H. J., Holm, D. K., Carlsen, S., Hansen, B. G., Patil, K. R., Mortensen, U. H. 及び Wernersson, R. Nucleic Acids Res. 2011年, 39, p. W61-67.

非特許文献7: A mutant Pfu DNA polymerase designed for advanced uracil-excision DNA engineering. Norholm, M. H. BMC Biotechnol. 2010年, 10, p. 21.

非特許文献8: An efficient method to assemble linear DNA templates for in vitro screening and selection systems. Stein, V. 及び Hollfelder, F. Nucleic Acids Res. 2009年, 37, 18, p. e122.

非特許文献9: USER friendly DNA engineering and cloning method by uracil excision. Bitinaite, J., Rubino, M., Varma, K. H., Schildkraut, I., Vaisvila, R. 及び Vaiskunaite, R. Nucleic Acids Res. 2007年, 35, 6, p. 1992-2002.

非特許文献10: USER fusion: a rapid and efficient method for simultaneous fusion and cloning of multiple PCR products. Geu-Flores, F., Nour-Eldin, H. H., Nielsen, M. T. 及び Halkier, B. A. Nucleic Acids Res. 20

07年, 35, 7, p. e55.

非特許文献11: Total synthesis of long DNA sequences: Synthesis of a contiguous 32-kb polyketide synthase gene cluster. Kodumal, S. J., Patel, K. G., Reid, R., Menzella, H. G., Welch, M. 及び Santi, D. V. PNAS 2004年, 101, 44, p. 15573-15578.

非特許文献12: Generation of cohesive ends on PCR products by UDG-mediated excision of dU, and application for cloning into restriction digest-linearized vectors. Smith, C., Day, P. J. R. 及び Walker, M. R. Genome Res. 1993年, 2, p. 328-332

非特許文献13: Chemistry of thermal degradation of abasic sites in DNA. Mechanistic investigation on thermal DNA strand cleavage of alkylated DNA. Sugiyama, H., Fujiwara, T., Ur, A., Tahiro, T., Yamamoto, K., Kawanishi, S. 及び Saito, I., Chem. Res. Toxicol., 1994年, 7, p. 673-683

非特許文献14: Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid. Lidahl, T. 及び Nyberg, B. Biochemistry, 1972年, 11, 19, p. 3610-3618

非特許文献15: Chemical restriction: strand cleavage by ammonia treatment at 8-oxoguanine yields biologically active DNA. Meyer, C., Meyer, D., Bickle, T. A. 及び Giese, B. ChemBioChem, 2003年, 4, p. 610-614

非特許文献16: A new approach for chemical phosphorylation of oligonucleotides at the 5' -terminus. Guzaev, A., Salo, H., Azhayev, A. 及び Lonnberg, H., Tetrahedron, 1995年, 51, 34, p. 9375-9384

非特許文献17: A chemical 5' -phosphorylation of oligodeoxyribonucleotides that can be monitored by trityl cation release. Horn, T. 及び Urdea, M. S. Tetrahedron Letters, 1986年, 27, 39, p. 4705-4708

非特許文献18: Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid. Lidahl, T. 及び Nyberg, B., Biochemistry, 1972年, 11, 19, p. 3610-3618

非特許文献19: Efficient Sonogashira coupling of unprotected halonucle

osides in aqueous solvents using water-soluble palladium catalysts. Cho, J. H., Prickett, C. D. 及び Shaughnessy, K. H. *Eur. J. Org. Chem.* 2010年, p. 3678-3683

非特許文献20: Design and studies of novel 5-substituted alkynyl-pyrimidine nucleosides as potent inhibitors of mycobacteria. Rai, D., Johar, M., Manning, T., Agrawal, B., Kunimoto, D. Y. 及び Kumar, R. *J. Med. Chem.* 2005年, 48, 22, p. 7012-7017

非特許文献21: Palladium-catalyzed synthesis of uridines on polystyrene-based solid support. Aucagne, V., Berteina-Raboin, S., Guenot, P. 及び Agrofoglio, L. A. *J. Comb. Chem.* 2004年, 6, 5, p. 717-723

非特許文献22: Palladium-copper catalyzed coupling of terminal alkynes with iodouridines. Yu, J., Zhang, W., Zhang, L., Lu, J. 及び Zhu, J. *Zhongguo aowu Huaxue Zazhi* 2001年, 11, 6, p. 349-352

非特許文献23: Synthesis, biological activities, and conformation study of 5-alkynyl-2'-deoxyuridines. Vincent, P., Beaucourt, J. P., Pichat, L., Balzarini, J. 及び De Clercq, E. *Nucleosides & Nucleotides* 1985年, 4, 4, p. 429-445

非特許文献24: Electron transfer of plurimodified DNA SAMs. Rospigliosi, A., Ehlich, R., Hoerber, H., Middelberg, A. 及び Moggridge, G. *Langmuir* 2007年, 23, 15, p. 8264-8271

非特許文献25: Oligodeoxynucleotides incorporating structurally simple 5-alkynyl-2'-deoxyuridines fluorometrically respond to hybridization. Hudson, R. H. E. 及び Ghorbani-Choghmarani, A. *Org. Biomol. Chem.* 2007年, 5, p. 1845-1848

非特許文献26: Zinc-catalyzed cycloisomerizations. Synthesis of substituted furans and furopyrimidine nucleosides. Sniady, A., Durham, A., Morreale, M. S., Marcinek, A., Szafert, S., Lis, T., Brzezinska, K. R., Iwasaki, T., Osshima, T., Mashima, K. 及び Dembinski, R. *J. Org. Chem.*

m. 2008年, 73, p. 5881-5889

非特許文献27: Synthesis and antiviral activity of novel acyclic nucleosides in the 5-alkynyl- and 6-alkylfuro[2,3-d]pyrimidine series. Amblard, F., Aucagne, V., Guenot, P., Schinazi, R. F. 及び Agrofoglio, L. A. Bioorg. Med. Chem. 2005年, 13, p. 1239-1248

非特許文献28: NMR conformational analysis of p-tolyl furanopyrimidine 2'-deoxyribonucleoside and crystal structure of its 3',5'-di-O-acetyl derivative. Esho, N., Desaulniers, J., Davies, B., Chui, H. M.-P., Rao, M. S., Chow, S. S., Szafert, S. 及び Dembinski, R. Bioorg. Med. Chem. 2005年, 13, p. 1231-1238

非特許文献29: Highly potent and selective inhibition of varicella-zoster virus by bicyclic furopyrimidine nucleosides bearing an aryl side chain. McGuigan, C., Barucki, H., Blewett, S., Carangio, A., Erichsen, J. T., Andrei, G., Snoeck, R., Clercq, E. D. 及び Balzarini, J. J. Med. Chem. 2000年, 43, p. 4993-4997

非特許文献30: CyDNA: Synthesis and replication of highly Cy-dye substituted DNA by an evolved polymerase. Ramsay, N., Jemth, A., Brown, A., Crampton, N., Dear, P. 及び Holliger, P. J. Am. Chem. Soc. 2010年, 132, p. 5096-5104

非特許文献31: Cross-coupling reactions of nucleoside triphosphates followed by polymerase incorporation. Construction and application of base-functionalized nucleic acids. Hocek, M. 及び Fojta, M. Org. Biomol. Chem. 2008年, 6, p. 2233-2241

非特許文献32: An efficient method for the construction of functionalized DNA bearing amino acid groups through cross-coupling reactions of nucleoside triphosphates followed by primer extension or PCR. Capek, P., Cahove, H., Pohl, R., Hocek, M., Cloeckner, C. 及び Marx, A. Chem. Eur. J. 2007年, 13, p. 6196-6203

非特許文献33 : Systematic characterization of 2' -deoxynucleoside-5' -triphosphate analogs as substrates for DNA polymerases by polymerase chain reaction and kinetic studies on enzymatic production of modified DNA. Kuwahara, M., Nagashima, J., Hasegawa, M., Tamura, T., Kitagata, R., Hanawa, K., Hososhima, S., Kasamatsu, T., Ozaki, H. 及び Sawai, H. *Nucleic Acids Res.* 2006年, 34, 19, p. 5383-5394

非特許文献34 : Enhancing the catalytic repertoire of nucleic acids: a systematic study of linker and rigidity. Lee, S. E., Sidorov, A., Gourelain, T., Mignet, N., Thorpe, S. J., Brazier, J. A., Dickman, M. J., Hornby, D. P., Grasby, J. A. 及び Williams, D. M. *Nucleic Acids Res.* 2001年, 29, 7, p. 1565-1573

非特許文献35 : Synthesis of metallointercalator-DNA conjugates on a solid support. Holmlin, R. E., Dandliker, P. J. 及び Barton, J. K., *Biocombinug Chem.* 1999年, 10, 6, p. 1122-30

非特許文献36 : Nucleic acid related compounds. 40. Synthesis and biological activities of 5-alkynyluracil nucleosides. De Clercq E., Descamps J., Balzarini J., Giziewicz J., Barr P. J. 及び Robins M. J. *J. Med. Chem.* 1983年, 26, p. 661-666

非特許文献37 : Structural requirements of olefinic 5-substituted deoxyuridines for antiherpes activity. Goodchild J., Porter R. A., Raper R. H., Sim I. S., Upton R. M., Viney J. 及び Wadsworth H. J. *J. Med. Chem.* 1983年, 26, p. 1252-1257

非特許文献38 : Synthesis and enzymatic incorporation of a novel, bicyclic pyrimidine nucleoside: a thymidine mimic. Loakes, D., Brown, D. M., Salisbury, S. A., McDougall, M. G., Neagu, C., Nampalli, S. 及び Kumar, S. *Tetrahedron Lett.* 2003年, 44, p. 3387-3389

非特許文献39 : Synthesis and some biochemical properties of a novel 5,6,7,8-tetrahydropyrimido[4,5-c]pyridazine nucleoside. Loakes, D., Bro

wn, D. M., Salisbury, S. A., McDougall, M. G., Neagu, C., Nampalli, S .及びKumar, S. Helvetica Chimica Acta 2003年, 86, p. 1193-1204

非特許文献40 : Pyrrolo-dC and pyrrolo-C: fluorescent analogs of cytidine and 20-deoxycytidine for the study of oligonucleotides. Berry, D. A., Jung, K-Y., Wise, D. S., Sercel, A. D., Pearson, W. H., Mackie, H ., Randolph, J. B. 及び Somers, R. L. Tetrahedron Lett. 2004年, 45, p. 2457-2461

非特許文献41 : Design and studies of novel 5-substituted alkynylpyrimidine nucleosides as potent inhibitors of mycobacteria. Rai D., Johar M., Manning T., Agrawal B., Kunitomo D. Y. 及び Kumar R. J. Med. Chem. 2005年, 48, p. 7012-7017

非特許文献42 : Oligodeoxynucleotides containing C-5 propyne analogs of 2'-deoxyuridine and 2'-deoxycytidine. Froehler, B. C., Wadwani, S., Terhorst, T. J. 及び Gerrard, S. R. Tetrahedron Lett. 1992年, 33, p. 5307-5310

非特許文献43 : Antisense gene inhibition by oligonucleotides containing C-5 propyne pyrimidines. Wagner, R. W., Matteucci, M. D., Lewis, J. G., Gutierrez, A. J., Moulds, C. 及び Froehler, B. C. Science 1993年, 260, 5113, p. 1510-1513

非特許文献44 : Antisense gene inhibition by C-5-substituted deoxyuridine-containing oligodeoxynucleotides. Gutierrez, A. J., Matteucci, M. D., Grant, D., Matsumura, S., Wagner, R. W. 及び Froehler, B. C. Biochemistry. 1997年, 36, p. 743-748

非特許文献45 : Long-range cooperativity in molecular recognition of RNA by oligodeoxynucleotides with multiple C5-(1-propynyl) pyrimidines. Barnes, T. W. 3rd 及び Turner, D. H. J. Am. Chem. Soc. 2001年, 123, p. 4107-4118

非特許文献46 : Propynyl groups in duplex DNA: stability of base pairs

incorporating 7-substituted 8-aza- 7-deazapurines or 5-substituted pyrimidines. He, J. 及び Seela, F.. Nucleic Acids Res. 2002年, 30, p. 5485-5496

非特許文献47 : 8-Aza-7-deazapurine-pyrimidine base pairs: the contribution of 2- and 7-substituents to the stability of duplex DNA. He, J. and Seela, F. Tetrahedron 2002年, 58, p. 4535-4542

非特許文献48 : DNA triplex formation with 5-dimethylaminopropargyl deoxyuridine. Rusling, D. A., Peng, G., Srinivasan, N., Fox, K. R. 及び Brown, T. Nucleic Acids Res. 2009年, 37, p. 1288-1296

非特許文献49 : <http://www.glenresearch.com/ProductFiles/10-1054.html>

非特許文献50 : Nucleic acid related compounds. 40. Synthesis and biological activities of 5-alkynyluracil nucleosides. De Clercq, E., Descamps, J., Balzarini, J., Giziewicz, J., Barr, P. J., 及び Robins, M. J. J. Med. Chem. 1983年, 26, 5, p. 661-6

非特許文献51 : Synthesis and antiviral activity of the carbocyclic analogues of 5-ethyl-2'-deoxyuridine and of 5-ethynyl-2'-deoxyuridine. Shealy, Y. F., O'Dell, C. A., Arnett, G., 及び Shannon, W. M. J. Med. Chem. 1986年, 29, 1, p. 79-84

非特許文献52 : 5-Alkynyl-2'-deoxyuridines: chromatography-free synthesis and cytotoxicity evaluation against human breast cancer cells. Meneni, S., Ott, I., Sergeant, C. D., Sniady, A., Gust, R., 及び Dembinski, R. Bioorg Med Chem. 2007年, 15, 8, p. 3082-8

非特許文献53 : C5-Modified nucleosides exhibiting anticancer activity. Lee, Y. S., Park, S. M., Kim, H. M., Park, S. K., Lee, K., Lee, C. W., 及び Kim, B. H. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2009年, 19, 16, p. 4688-91

非特許文献54 : A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo. Salic, A. 及び Mitchison, T. J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2008年, 105, 7, p. 2415-20

非特許文献55 : A rapid non-radioactive technique for measurement of repair synthesis in primary human fibroblasts by incorporation of ethynyl deoxyuridine (EdU). Limsirichaikul, S., Niimi, A., Fawcett, H., Lehmann, A., Yamashita, S. 及び Ogi, T. *Nucleic Acids Res.* 2009年, 37, 4, e31

非特許文献56 : Chick embryo proliferation studies using EdU labeling. Warren, M., Puskarczyk, K. 及び Chapman, S. C. *Dev. Dyn.* 2009年, 238, 4, p. 944-9

非特許文献57 : Evaluation of 5-ethynyl-2'-deoxyuridine staining as a sensitive and reliable method for studying cell proliferation in the adult nervous system. Zeng, C., Pan, F., Jones, L. A., Lim, M. M., Griffin, E. A., Sheline, Y. I., Mintun, M. A., Holtzman, D. M., 及び Mach, R. H. *Brain Res.* 2010年, 1319, p. 21-32

非特許文献58 : A rapid and robust assay for detection of S-phase cell cycle progression in plant cells and tissues by using ethynyl deoxyuridine. Kotogany, E., Dudits, D., Horvath, G. V. 及び Ayaydin, F. *Plant Methods* 2010年, 6, 1, p. 5

非特許文献59 : Fluorogenic "click" reaction for labeling and detection of DNA in proliferating cells., Li, K., Lee, L. A., Lu, X. 及び Wang, Q., *Biotechniques.* 2010年, 49, 1, p. 525-7

非特許文献60 : Visualization of mitochondrial DNA replication in individual cells by EdU signal amplification. Haines, K. M., Feldman, E. L., Lentz, S. I. *J. Vis. Exp.* 2010年, 45, pii, 2147

非特許文献61 : Monitoring DNA replication in fission yeast by incorporation of 5-ethynyl-2'-deoxyuridine. Hua, H. 及び Kearsley, S. E. *Nucleic Acids Res.* 2011年, 39, 9, e60

非特許文献62 : Replication Banding Patterns in Human Chromosomes Detected Using 5-ethynyl-2'-deoxyuridine Incorporation. Hoshi, O. 及び Ushiki

, T. *Acta Histochem Cytochem.* 2011年, 44, 5, p. 233-7

非特許文献63: Super-resolution fluorescence imaging of chromosomal DNA. Zessin, P. J., Finan, K. 及び Heilemann, M. J. *Struct. Biol.* 2012年, 177, 2, p. 344-8

非特許文献64: Imaging of EdU, an alkyne-tagged cell proliferation probe, by Raman microscopy. Yamakoshi, H., Dodo, K., Okada, M., Ando, J., Palonpon, A., Fujita, K., Kawata, S. 及び Sodeoka, M. *J. Am. Chem. Soc.* 2011年, 133, 16, p. 6102-5

非特許文献65: 5-Alkynyl-2'-deoxyuridines: chromatography-free synthesis and cytotoxicity evaluation against human breast cancer cells. Meneni, S., Ott, I., Sergeant, C. D., Sniady, A., Gust, R. 及び Dembinski, R. *Bioorg Med Chem.* 2007年, 15, 8, p. 3082-8

非特許文献66: Synthesis and enzymatic incorporation of modified deoxyuridine triphosphates. Borsenberger, V., Kukwikila, M. 及び Howorka, S. *Org. Biomol. Chem.* 2009年, 7, 18, p. 3826-35

非特許文献67: Cleavage of functionalized DNA containing 5-modified pyrimidines by type II restriction endonucleases. Macickova-Cahova, H., Pohl, R., 及び Hocek, M. *Chembiochem.* 2011年, 12, 3, p. 431-8

非特許文献68: DNA duplexes stabilized by modified monomer residues: synthesis and stability. Graham, D., Parkinson, J. A. 及び Brown, T. J. *Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 1998年, p. 1131-1138

非特許文献69: Site-directed spin-labeling of DNA by the azide-alkyne 'click' reaction: nanometer distance measurements on 7-deaza-2'-deoxyadenosine and 2'-deoxyuridine nitroxide conjugates spatially separated or linked to a 'dA-dT' base pair. Ding, P., Wunnicke, D., Steinhoff, H. J. 及び Seela, F. *Chem. Eur. J.* 2010年, 16, 48, p. 14385-96

非特許文献70: Highly sequence specific RNA terminal labeling by DNA photoligation. Yoshimura, Y., Noguchi, Y. 及び Fujimoto, K. *Organic Biomol. Chem.* 2011年, 9, 12, p. 2151-2158

ol. Chem. 2007年, 5, p. 139-142

非特許文献71: Effective synthesis of photosensitive oligonucleotides. Ogino, M., Taya, Y. 及び Fujimoto, K. Nucleic Acids Symp. Ser. 2008年, 52, p. 395-396

非特許文献72: Photochemical site-specific mutation of 5-methylcytosine to thymine. Matsumura, T., Ogino, M., Nagayoshi, K. 及び Fujimoto, K. Chem. Lett. 2008年, 37, p. 94-95

非特許文献73: The synthesis and antiviral properties of (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine-related compounds. Ashwell, M., Jones, A. S., Sayers, J. R., Walker, R. T., Sakuma, T. 及び De Clercq, E. Tetrahedron 1987年, 43, p. 4601-4608

非特許文献74: Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes. Langer, P. R., Waldrop, A. A. 及び Ward, D. C. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 1981年, 78, p 6633-6637

非特許文献75: The application of a modified nucleotide in aptamer selection: novel thrombin aptamers containing 5-(1-pentynyl)-2'-deoxyuridine. Latham, J.A., Johnson, R. 及び Toole, J. J. Nucleic Acids Res. 1994年, 22, p 2817-2822.

非特許文献76: Expanding the potential of DNA for binding and catalysis: highly functionalized dUTP derivatives that are substrates for the most stable DNA polymerases. Sakthivel, K. 及び Barbas, III, C. F. Angew. Chem. Int. Ed. 1998年, 37, p 2872-2875.

非特許文献77: Systematic characterization of 2'-deoxynucleoside-5'-triphosphate analogs as substrates for DNA polymerases by polymerase chain reaction and kinetic studies on enzymatic production of modified DNA. Kuwahara, M., Nagashima, J., Hasegawa, M., Tamura, T., Kitagata, R., Hanawa, K., Hososhima, S., Kasamatsu, T., Ozaki, H., 及び Sawai, H. Nucleic Acids Res. 2006年, 34, p. 5383-5394

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0010] DNAを切断する方法として公知の特許文献1及び2、並びに非特許文献3～12に記載の方法は、上記のようにDNAの切断にRNA分解酵素又はウラシル除去酵素のような酵素を用いる。それ故、コスト面で不利である。また、一般に酵素による切断反応は、pH及び／又は金属イオン濃度などに関する特別な反応条件を満たす必要がある。非特許文献15に記載の方法は、酵素を使用せず化学反応によってDNAの切断を行うため、コスト及び反応効率の点で有利である。しかしながら、当該文献に記載の非天然型塩基を含むデオキシヌクレオチドは、対応する天然型塩基（A、T、G又はC）を含むデオキシヌクレオチドと比較して、DNA自動合成機によるDNAの合成条件下及び／又はPCRのようなDNAの複製条件下における安定性が低く、且つDNA複製反応のような*in vivo*及び*in vitro*の反応において使用した場合にフィデリティが低くなる。また、当該文献記載のデオキシヌクレオチドを用いる場合、DNA切断のために酸素バブリングという煩雑な操作を必要とする。

[0011] DNAの5' 及び／又は3' 末端をリン酸化する方法として公知の特許文献3並びに非特許文献16及び17に記載の方法は、上記のようにリン酸化アミダイトのカップリング効率が100%ではなく、且つリン酸化されたDNAとリン酸化されなかったDNAとの分離が困難という問題点が存在する。

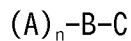
[0012] 所望の部位でのDNA鎖の切断、及び切断された末端のリン酸化を行うためには、化学反応によってDNAを二つの断片に切断し、それによって生じるDNA断片の5' 末端をリン酸末端とすることが可能である、非天然型塩基を含むデオキシヌクレオチドを切断部位としてDNA鎖に導入する方法が、低コストで、反応条件の制約が少なく、且つ実験操作が簡便である点で有利である。それ故、本発明は、非天然型塩基を含むデオキシヌクレオチドをDNA鎖に導入することにより、化学反応によって低コスト且つ簡単な実験操作でDNA鎖の切断を行い、結果として生じた末端がリン酸化されたオリゴデオキシヌクレオチドを提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0013] 本発明者らは、前記課題を解決するための手段を種々検討した結果、求核剤によって脱離可能な部分を有する、非天然型塩基を含むデオキシヌクレオチド又はデオキシヌクレオシドを用いることにより、上記目的を達成できることを見出し、本発明を完成した。

[0014] すなわち、本発明の要旨は以下の通りである。

[0015] (1) 求核剤と、式I：



[式中、

Aは、オリゴデオキシヌクレオチドであり、

Bは、求核剤によって脱離可能な部分Eを有する、非天然型塩基を含むデオキシヌクレオシドであり、

Cはオリゴデオキシヌクレオチドであり、

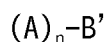
nは0又は1であり、

nが1のとき、Aの3' 末端とBの5' 位とは、ホスホジエステル結合で連結されており、

Bの3' 位とCの5' 末端とは、ホスホジエステル結合で連結されており、

BとCとの間のホスホジエステル結合は、求核剤の攻撃によって誘発されるEの脱離に伴って、Cの5' 末端がリン酸化されたオリゴデオキシヌクレオチド部分がBの3' 位から脱離することによって切断される]

で表されるオリゴデオキシヌクレオチドとを接触させることによって、BとCとの間のホスホジエステル結合が、Cの5' 末端がリン酸化されたオリゴデオキシヌクレオチド部分がBの3' 位から脱離することによって切断されて、前記Cの5' 末端がリン酸化されたオリゴデオキシヌクレオチドと、式II：



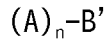
[式中、

A及びnは、式Iにおいて定義したのと同様の意味であり、

B' は、求核剤の攻撃によるEの脱離に伴って形成されるBの残基部分である]

で表されるオリゴデオキシヌクレオチドとを得る、5' 末端リン酸化オリゴデオキシヌクレオチド形成工程を含む、オリゴデオキシヌクレオチドの製造方法。

[0016] (2) 式II :

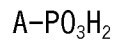


[式中、

A及びB' は、前記 (1) と同様の意味であり、

nは1である]

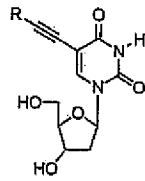
で表されるオリゴデオキシヌクレオチドを反応させることによって、B' とAとの間のホスホジエステル結合が、Aの3' 末端がリン酸化されたオリゴデオキシヌクレオチド部分がB' から脱離することによって切断されて、式IIa :



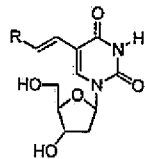
で表される3' 末端がリン酸化されたオリゴデオキシヌクレオチドを得る、3' 末端リン酸化オリゴデオキシヌクレオチド形成工程をさらに含む、前記 (1) の方法。

[0017] (3) 前記非天然型塩基を含むデオキシヌクレオシドBが、以下 :

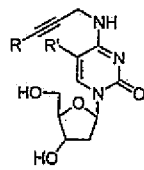
[化1]



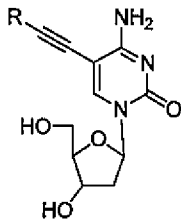
B-1



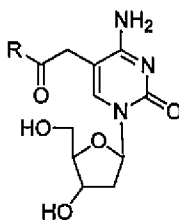
B-2



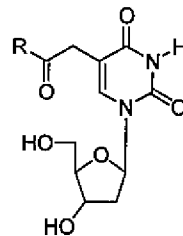
B-3



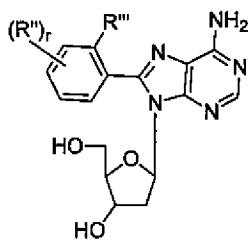
B-5



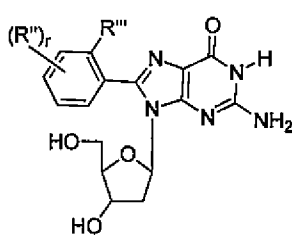
B-6



B-7



B-21



B-22

[0018] [式中、

Rは、水素、置換若しくは非置換のアルキル、置換若しくは非置換のシクロアルキル、置換若しくは非置換のヘテロシクリル、置換若しくは非置換のアリール、置換若しくは非置換のアリールアルキル、置換若しくは非置換のヘテロアリール、置換若しくは非置換のヘテロアリールアルキル又はカルボニルであり；

R' は、水素、又は置換若しくは非置換のアルキル、アルケニル若しくはアルキニルであり；

rは、0～4の整数であり；

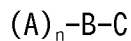
R' ' は、ハロゲン、又は置換若しくは非置換のアルキル、アルケニル若しくはアルキニルであり；

R' ' ' は、-COZ、-C≡C-Z又は-CNであり；

Zは、水素、置換若しくは非置換のアルキル、置換若しくは非置換のシクロアルキル、置換若しくは非置換のヘテロシクリル、置換若しくは非置換のアリール、置換若しくは非置換のアリールアルキル、置換若しくは非置換のヘテロアリール、又は置換若しくは非置換のヘテロアリールアルキルである〕
で表されるデオキシヌクレオチドから選択される、前記 (1) 又は (2) の方法。

[0019] (4) 前記5' 末端リン酸化オリゴデオキシヌクレオチド形成工程の前に、求核剤によって脱離可能な部分Eを有する、非天然型塩基を含むデオキシヌクレオチドB又はその誘導体と、天然型塩基を含む1個以上のデオキシヌクレオチド又はその誘導体とを含む基質を用いて、式Iで表されるオリゴデオキシヌクレオチドを合成する、オリゴデオキシヌクレオチド合成工程をさらに含む、前記 (1) ~ (3) のいずれかの方法。

[0020] (5) 式I：



[式中、

Aは、オリゴデオキシヌクレオチドであり、

Bは、求核剤によって脱離可能な部分Eを有する、非天然型塩基を含むデオキシヌクレオチドであり、

Cはオリゴデオキシヌクレオチドであり、

nは0又は1であり、

nが1のとき、Aの3' 末端とBの5' 位とは、ホスホジエステル結合で連結されており、

Bの3' 位とCの5' 末端とは、ホスホジエステル結合で連結されており、

BとCとの間のホスホジエステル結合は、求核剤の攻撃によって誘発されるEの脱離に伴って、Cの5' 末端がリン酸化されたオリゴデオキシヌクレオチド部分がBの3' 位から脱離することによって切断される〕

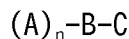
で表されるオリゴデオキシヌクレオチドをプライマーとして用いて、直鎖状二本鎖DNA断片を増幅するDNA断片増幅工程；

求核剤と、増幅された直鎖状二本鎖DNA断片とを接触させることによって、BとCとの間のホスホジエステル結合が、Cの5'末端がリン酸化されたオリゴデオキシヌクレオチド部分がBの3'位から脱離することによって切断されて、直鎖状二本鎖DNA断片に含まれる前記Cの5'末端がリン酸化されており、且つ式Iで表されるプライマー部分の少なくとも一部と相補的な配列を含む3'突出末端を有する直鎖状二本鎖DNA断片を形成させる、3'突出末端形成工程；並びに

前記3'突出末端を有する直鎖状二本鎖DNA断片と、別の二本鎖DNA断片とを連結する連結工程；

を含む、二本鎖DNAの連結方法。

[0021] (6) 前記(1)～(4)のいずれかのオリゴデオキシヌクレオチドの製造方法又は前記(5)の二本鎖DNAの連結方法に使用するためのキットであって、式I：



[式中、

Aは、オリゴデオキシヌクレオチドであり、

Bは、求核剤によって脱離可能な部分Eを有する、非天然型塩基を含むデオキシヌクレオチドであり、

Cはオリゴデオキシヌクレオチドであり、

nは0又は1であり、

nが1のとき、Aの3'末端とBの5'位とは、ホスホジエステル結合で連結されており、

Bの3'位とCの5'末端とは、ホスホジエステル結合で連結されており、

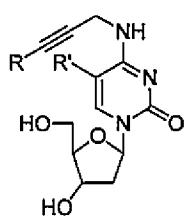
BとCとの間のホスホジエステル結合は、求核剤の攻撃によって誘発されるEの脱離に伴って、Cの5'末端がリン酸化されたオリゴデオキシヌクレオチド部分がBの3'位から脱離することによって切断される]

で表されるオリゴデオキシヌクレオチド、又は求核剤によって脱離可能な部分Eを有する、非天然型塩基を含むデオキシヌクレオチドB若しくはその誘導

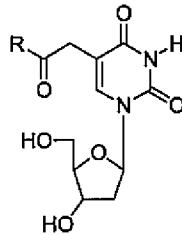
体を少なくとも含む、前記キット。

[0022] (7) 以下の式：

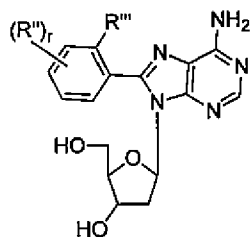
[化2]



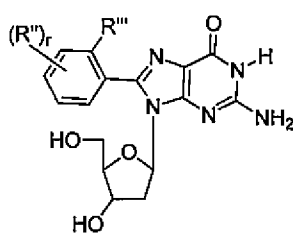
B-3



B-7



B-21



B-22

[0023] [式中、

Rは、水素、置換若しくは非置換のアルキル、置換若しくは非置換のシクロアルキル、置換若しくは非置換のヘテロシクリル、置換若しくは非置換のアリール、置換若しくは非置換のアリールアルキル、置換若しくは非置換のヘテロアリール、置換若しくは非置換のヘテロアリールアルキル又はカルボニルであり；

R' は、メチルであり；

rは、0～4の整数であり；

R' ' は、ハロゲン、又は置換若しくは非置換のアルキル、アルケニル若しくはアルキニルであり；

R' ' ' は、-COZ、-C≡C-Z又は-CNであり；

Zは、水素、置換若しくは非置換のアルキル、置換若しくは非置換のシクロアルキル、置換若しくは非置換のヘテロシクリル、置換若しくは非置換のアリール、置換若しくは非置換のアリールアルキル、置換若しくは非置換のヘテ

ロアリアル、又は置換若しくは非置換のヘテロアリアルアルキルである」
で表される非天然型塩基を含むデオキシヌクレオシド。

発明の効果

[0024] 本発明により、化学反応によって低コスト且つ簡単な実験操作でDNA鎖の切断を行い、結果として生じた末端がリン酸化されたオリゴデオキシヌクレオチドを提供することが可能となる。

[0025] 本明細書は、本願の優先権の基礎である日本国特許出願第2012-084249号の明細書及び／又は図面に記載される内容を包含する。

図面の簡単な説明

[0026] [図1]本発明のオリゴデオキシヌクレオチドの製造方法の一実施形態を示す工程図である。

[図2]合成例1-4において、合成したDNAオリゴマー（5' -TTTTCTTPTCCTTTT-3'）の逆相HPLCクロマトグラムを示す図である。A：合成したDNAオリゴマー；B：合成したDNAオリゴマーを酵素分解した分解物。

[図3]合成例1-4において、合成したDNAオリゴマー（5' -TTTTTPTTTTTT-3'）の逆相HPLCクロマトグラムを示す図である。

[図4]合成例1-4において、合成したDNAオリゴマー（5' -TTTTTAPATTTTT-3'）の逆相HPLCクロマトグラムを示す図である。

[図5]合成例1-4において、合成したDNAオリゴマー（5' -TTTTTCPCCTTTTT-3'）の逆相HPLCクロマトグラムを示す図である。

[図6]合成例1-4において、合成したDNAオリゴマー（5' -TTTTTGPGTTTTT-3'）の逆相HPLCクロマトグラムを示す図である。

[図7]合成例1-4において、合成したDNAオリゴマー（5' -CGCAATPTAACGC-3'）の逆相HPLCクロマトグラムを示す図である。

[図8]使用例1-3において、合成したDNAオリゴマーの反応前後の逆相HPLCクロマトグラムを示す図である。A：反応前のDNAオリゴマー；B：メチルアミンによる反応後の反応混合物；C：生成物1を酵素分解した分解物；D：生成物2を酵素分解した分解物。

[図9]使用例1-4において、各反応混合物のHPLCクロマトグラムを示す図である。A：メチルアミンによる反応後の反応混合物；B：エチレンジアミンによる反応後の反応混合物；C：2-アミノエタノールによる反応後の反応混合物。

[図10]使用例1-5において、合成した各DNAオリゴマー（5' -TTTTCTTPTCCTTTT-3'）の反応前後の逆相HPLCクロマトグラムを示す図である。A：反応前のDNAオリゴマー；B：エチレンジアミンによる反応後の反応混合物。

[図11]使用例1-5において、合成した各DNAオリゴマー（5' -TTTTTPTTTTTT-3'）の反応前後の逆相HPLCクロマトグラムを示す図である。A：反応前のDNAオリゴマー；B：エチレンジアミンによる反応後の反応混合物。

[図12]使用例1-5において、合成した各DNAオリゴマー（5' -TTTTAPATTTTT-3'）の反応前後の逆相HPLCクロマトグラムを示す図である。A：反応前のDNAオリゴマー；B：エチレンジアミンによる反応後の反応混合物。

[図13]使用例1-5において、合成した各DNAオリゴマー（5' -TTTTCPCTTTTT-3'）の反応前後の逆相HPLCクロマトグラムを示す図である。A：反応前のDNAオリゴマー；B：エチレンジアミンによる反応後の反応混合物。

[図14]使用例1-5において、合成した各DNAオリゴマー（5' -TTTTGPGTTTTT-3'）の反応前後の逆相HPLCクロマトグラムを示す図である。A：反応前のDNAオリゴマー；B：エチレンジアミンによる反応後の反応混合物。

[図15]使用例1-5において、合成した各DNAオリゴマー（5' -CGCAATPTAACGC-3'）の反応前後の逆相HPLCクロマトグラムを示す図である。A：反応前のDNAオリゴマー；B：エチレンジアミンによる反応後の反応混合物。

[図16]使用例1-6において、合成したDNAオリゴマーの反応前後の逆相HPLCクロマトグラムを示す図である。A：反応前のDNAオリゴマー；B：2-アミノエタノールによる反応後の反応混合物；C：反応後の反応混合物のHPLCクロマトグラムの拡大図。

[図17]使用例1-7において、切り出し及び脱保護後のDNAオリゴマーの逆相HPLCクロマトグラムを示す図である。

[図18]使用例1-8において、切り出し及び脱保護後のDNAオリゴマーの逆相HPLC

Cクロマトグラムを示す図である。

[図19]使用例1-8において、エチレンジアミンによる反応後のDNAオリゴマーの逆相HPLCクロマトグラムを示す図である。

[図20]使用例1-9において、切り出し及び脱保護後のDNAオリゴマーの逆相HPLCクロマトグラムを示す図である。

[図21]使用例1-9において、100 mMリン酸バッファー中で120℃処理後のDNAオリゴマーの逆相HPLCクロマトグラムを示す図である。

[図22]使用例1-10において、切り出し及び脱保護後のDNAオリゴマーの逆相HPLCクロマトグラムを示す図である。

[図23]使用例1-10において、エチレンジアミンによる反応後のDNAオリゴマーの逆相HPLCクロマトグラムを示す図である。

[図24]使用例1-10において、100 mMリン酸バッファー中で120℃処理後のDNAオリゴマーの逆相HPLCクロマトグラムを示す図である。

[図25]使用例1-11において、切り出し及び脱保護後の5'-末端がDMTr保護されたDNAオリゴマーの逆相HPLCクロマトグラムを示す図である。

[図26]使用例1-11において、エチレンジアミンによる反応後の5'-末端がリン酸化されたDNAオリゴマーの逆相HPLCクロマトグラムを示す図である。

[図27]使用例1-12において、切り出し及び脱保護後のTT1及びTT2の逆相HPLCクロマトグラムを示す図である。A：TT1の逆相HPLCクロマトグラム；B：TT2の逆相HPLCクロマトグラム。

[図28]使用例1-12において、各DNAオリゴマーの塩基配列及びポリアクリルアミドゲル電気泳動による分析結果を示す図である。A：各DNAオリゴマーの塩基配列；B：ポリアクリルアミドゲル電気泳動による分析結果。

[図29]合成例2において、合成したDNAオリゴマー（5'-TTTTCTT(Pr)TCCTTTT-3'）の逆相HPLCクロマトグラムを示す図である。

[図30]合成例2において、合成したDNAオリゴマー（5'-TTTTTT(Pr)TTTTTT-3'）の逆相HPLCクロマトグラムを示す図である。

[図31]使用例2-1において、合成した合成したDNAオリゴマー（5'-TTTTCTT(P

r)TCCTTTT-3') の反応前後の逆相HPLCクロマトグラムを示す図である。A : 反応前のDNAオリゴマー ; B : 70℃、3時間反応後の反応混合物 ; C : 70℃、16時間反応後の反応混合物。

[図32]使用例2-1において、生成物1及び他の副生成物のMALDI TOF-MSスペクトルを示す図である。A : 生成物1 ; B : 保持時間9.9分の小さなピーク ; C : 保持時間10.2分のピーク。

[図33]使用例2-1において、合成した合成したDNAオリゴマー (5' -TTTTTT(Pr)TTTTTT-3') の反応前後の逆相HPLCクロマトグラムを示す図である。A : 反応前のDNAオリゴマー ; B : 70℃、3時間反応後の反応混合物 ; C : 70℃、16時間反応後の反応混合物。

[図34]使用例2-1において、生成物1及び他の副生成物のMALDI TOF-MSスペクトルを示す図である。A : 生成物1 ; B : 保持時間10.3分のピーク。

[図35]合成例3において、合成したDNAオリゴマー (5' -TTTTCTT(Pa)TCCTTTT-3') の逆相HPLCクロマトグラムを示す図である。

[図36]合成例3において、合成したDNAオリゴマー (5' -TTTTTT(Pa)TTTTTT-3') の逆相HPLCクロマトグラムを示す図である。

[図37]使用例3-1において、合成したDNAオリゴマー (5' -TTTTCTT(Pa)TCCTTTT-3') の反応前後の逆相HPLCクロマトグラムを示す図である。A : 反応前のDNAオリゴマー ; B : 70℃、10分間反応後の反応混合物 ; C : 70℃、30分間反応後の反応混合物。

[図38]使用例3-1において、合成したDNAオリゴマー (5' -TTTTTT(Pa)TTTTTT-3') の反応前後の逆相HPLCクロマトグラムを示す図である。A : 反応前のDNAオリゴマー ; B : 70℃、10分間反応後の反応混合物 ; C : 70℃、30分間反応後の反応混合物。

[図39]使用例3-2において、合成したDNAオリゴマー (5' -TTTTTT(Pa)TTTTTT-3') の反応後の逆相HPLCクロマトグラムを示す図である。A : メチルアミンによる反応後の反応混合物 ; B : エチレンジアミンによる反応後の反応混合物。

[図40]使用例3-3において、合成した各DNAオリゴマー（5′ -TTTTTT(Pa)TTTTT T-3′）の切断反応前後の逆相HPLCクロマトグラムを示す図である。A：反応前のDNAオリゴマー；B：切断反応後の反応混合物。

[図41]合成例4-3において、合成したDNAオリゴマーの逆相HPLCクロマトグラムを示す図である。A：5′ -TTTTCTT(CvU)TCCTTTT-3′；B：5′ -TTTTTT(CvU)TTTTTT-3′。

[図42]使用例4-1において、合成した各DNAオリゴマー（5′ -TTTTCTT(CvU)TCC TTTT-3′）の反応前後の逆相HPLCクロマトグラムを示す図である。A：反応前のDNAオリゴマー；B：70℃、3時間反応後の反応混合物；C：70℃、8時間反応後の反応混合物。

[図43]使用例4-1において、生成物1及び他の副生成物のMALDI TOF-MSスペクトルを示す図である。A：生成物1；B：保持時間10.3分のピーク。

[図44]使用例4-1において、合成した各DNAオリゴマー（5′ -TTTTTT(CvU)TTTT TT-3′）の反応前後の逆相HPLCクロマトグラムを示す図である。A：反応前のDNAオリゴマー；B：70℃、3時間反応後の反応混合物；C：70℃、8時間反応後の反応混合物。

[図45]使用例4-1において、生成物1及び他の副生成物のMALDI TOF-MSスペクトルを示す図である。A：生成物1；B：保持時間10.5分のピーク。

[図46]合成例5-4において、合成したDNAオリゴマーの逆相HPLCクロマトグラムを示す図である。A：5′ -TTTTCTT(PC)TCCTTTT-3′；B：5′ -TTTTTT(PC)TTTT TTT-3′。

[図47]使用例5-1において、合成した各DNAオリゴマー（5′ -TTTTCTT(PC)TCCT TTT-3′）の反応前後の逆相HPLCクロマトグラムを示す図である。A：反応前のDNAオリゴマー；B：70℃、3時間反応後の反応混合物；C：70℃、16時間反応後の反応混合物。

[図48]使用例5-1において、生成物1及び他の副生成物のMALDI TOF-MSスペクトルを示す図である。A：生成物1；B：保持時間10.2分のピーク；C：保持時間10.6分のピーク。

[図49]使用例5-1において、合成した各DNAオリゴマー（5′ -TTTTTT(PC)TTTTT T-3′ ）の反応前後の逆相HPLCクロマトグラムを示す図である。A：反応前のDNAオリゴマー；B：70℃、3時間反応後の反応混合物；C：70℃、16時間反応後の反応混合物。

[図50]使用例5-1において、生成物1及び他の副生成物のMALDI TOF-MSスペクトルを示す図である。A：生成物1；B：保持時間10.4分のピーク；C：保持時間10.9分のピーク。

[図51]使用例6-1において、非天然塩基を含むDNAオリゴマーをプライマーとして用いたポリメラーゼ連鎖反応によって標的DNAを増幅し、増幅産物を10%非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析した結果を示す図である。レーン1：100塩基対遺伝子マーカー；レーン2：遺伝子1の増幅産物（X = P）；レーン3：遺伝子2の増幅産物（X = Pa）；レーン4：遺伝子2の増幅産物（X = P）；レーン5：遺伝子2の増幅産物（X = Pa）。

[図52]使用例6-2において、非天然塩基を含むDNA増幅産物を本発明の切断反応で切断して得られた5′末端リン酸化DNA断片の連結反応産物を10%非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析した結果を示す図である。レーン1：100塩基対遺伝子マーカー；レーン2：遺伝子1（X = P）の増幅産物を本発明の切断反応で切断し、得られた5′末端リン酸化DNA断片；レーン3：遺伝子2（X = P）の増幅産物を本発明の切断反応で切断し、得られた5′末端リン酸化DNA断片；レーン4：遺伝子1及び2（X = P）のDNA増幅産物を本発明の切断反応で切断し、得られた遺伝子1及び2の5′末端リン酸化DNA断片をリガーゼと反応させた連結反応産物；レーン5：遺伝子1及び2（X = Pa）のDNA増幅産物を本発明の切断反応で切断し、得られた遺伝子1及び2の5′末端リン酸化DNA断片をリガーゼと反応させた連結反応産物；レーン6：遺伝子3（遺伝子1及び2が連結した連結反応産物と同一の塩基配列を有する遺伝子；299塩基対）の増幅産物。

[図53]合成例7-4において、合成したDNAオリゴマー（5′ -TTTTTTQTTTTTT-3′ ）の逆相HPLCクロマトグラムを示す図である。

[図54]合成例7-4において、合成したDNAオリゴマー (5' -TTTTCTTQTCCTTTT-3') の逆相HPLCクロマトグラムを示す図である。

[図55]使用例7-1において、合成したDNAオリゴマー (5' -TTTTTTQTTTTTTT-3') の反応後の逆相HPLCクロマトグラムを示す図である。

[図56]使用例7-1において、合成したDNAオリゴマー (5' -TTTTCTTQTCCTTTT-3') の反応後の逆相HPLCクロマトグラムを示す図である。

[図57]使用例7-2において、合成したDNAオリゴマー (5' -TTTTTTQTTTTTTT-3') の反応後の逆相HPLCクロマトグラムを示す図である。A：メチルアミンによる反応後の反応混合物；B：エチレンジアミンによる反応後の反応混合物。

[図58]使用例7-2において、合成したDNAオリゴマー (5' -TTTTCTTQTCCTTTT-3') の反応後の逆相HPLCクロマトグラムを示す図である。A：メチルアミンによる反応後の反応混合物；B：エチレンジアミンによる反応後の反応混合物。

[図59]合成例8-1において、合成したDNAオリゴマー (5' -TTTTTT(HP)TTTTTT-3') の逆相HPLCクロマトグラムを示す図である。

[図60]合成例8-1において、合成したDNAオリゴマー (5' -TTTTCTT(HP)TCCTTTT-3') の逆相HPLCクロマトグラムを示す図である。

[図61]使用例8-1において、合成したDNAオリゴマー (5' -TTTTTT(HP)TTTTTT-3') の反応後の逆相HPLCクロマトグラムを示す図である。

[図62]使用例8-1において、合成したDNAオリゴマー (5' -TTTTCTT(HP)TCCTTTT-3') の反応後の逆相HPLCクロマトグラムを示す図である。

[図63]使用例8-2において、合成したDNAオリゴマー (5' -TTTTTT(HP)TTTTTT-3') の反応後の逆相HPLCクロマトグラムを示す図である。A：メチルアミンによる反応後の反応混合物；B：エチレンジアミンによる反応後の反応混合物。

[図64]使用例8-2において、合成したDNAオリゴマー (5' -TTTTCTT(HP)TCCTTTT-3') の反応後の逆相HPLCクロマトグラムを示す図である。A：メチルアミンによる反応後の反応混合物；B：エチレンジアミンによる反応後の反応混合物。

[図65]合成例9-5において、合成したDNAオリゴマー（5' -TTTTTT(fPG)TTTTTT-3'）の逆相HPLCクロマトグラムを示す図である。

[図66]合成例9-5において、合成したDNAオリゴマー（5' -TTTTCTT(fPG)TCCTTT-3'）の逆相HPLCクロマトグラムを示す図である。

[図67]使用例9-1において、合成したDNAオリゴマー（5' -TTTTTT(fPG)TTTTTT-3'）の反応後の逆相HPLCクロマトグラムを示す図である。

[図68]使用例9-1において、合成したDNAオリゴマー（5' -TTTTCTT(fPG)TCCTTT-3'）の反応後の逆相HPLCクロマトグラムを示す図である。

[図69]合成例10-5において、合成したDNAオリゴマー（5' -TTTTTT(fPA)TTTTTT-3'）の逆相HPLCクロマトグラムを示す図である。

[図70]合成例10-5において、合成したDNAオリゴマー（5' -TTTTCTT(fPA)TCCTTT-3'）の逆相HPLCクロマトグラムを示す図である。

[図71]使用例10-1において、合成したDNAオリゴマー（5' -TTTTTT(fPA)TTTTTT-3'）の反応後の逆相HPLCクロマトグラムを示す図である。

[図72]使用例10-1において、合成したDNAオリゴマー（5' -TTTTCTT(fPA)TCCTTT-3'）の反応後の逆相HPLCクロマトグラムを示す図である。

[図73]使用例11-1において、5-エチニル-2'-デオキシウリジン（Pa）を含むDNAオリゴマーをプライマーとして用いたポリメラーゼ連鎖反応によって標的DNAを増幅し、増幅産物を1%アガロースゲル電気泳動で分析した結果を示す図である。レーン1：DNAマーカー；レーン2：LL1及びLL3をプライマーセットとして用いた場合の増幅産物；レーン3：LL2及びLL4をプライマーセットとして用いた場合の増幅産物；レーン4：LL5及びLL8をプライマーセットとして用いた場合の増幅産物；レーン5：LL6及びLL7をプライマーセットとして用いた場合の増幅産物。

[図74]使用例11-2において、5-エチニル-2'-デオキシウリジン（Pa）を含むDNA増幅産物を本発明の切断反応で切断して得られた5'末端リン酸化DNA断片の連結反応産物を、1%アガロースゲル電気泳動で分析した結果を示す図である。レーン1：DNAマーカー；レーン2及び3：10回の温度サイクルで連結反応

を行った場合の連結反応産物；レーン4及び5：20回の温度サイクルで連結反応を行った場合の連結反応産物；レーン6及び7：30回の温度サイクルで連結反応を行った場合の連結反応産物。レーン2、4及び6：LL1及びLL3をプライマーセットとして用いた場合の増幅産物のDNAと、LL6及びLL7をプライマーセットとして用いた場合の増幅産物のDNAとを連結反応させた場合の連結反応産物；レーン3、5及び7：LL2及びLL4をプライマーセットとして用いた場合の増幅産物のDNAと、LL6及びLL7をプライマーセットとして用いた場合の増幅産物のDNAとを連結反応させた場合の連結反応産物。

[図75]使用例11-2において、5-エチニル-2'-デオキシウリジン (Pa) を含むDNA増幅産物を本発明の切断反応で切断して得られた5'末端リン酸化DNA断片の、連結反応前のDNAと連結反応後のDNAとを1%アガロースゲル電気泳動で分析した結果を示す図である。レーン1：DNAマーカー；レーン2及び3：メチルアミン処理を9時間行ってDNAの切断反応を行った場合の切断反応産物；レーン4及び5：メチルアミン処理を24時間行ってDNAの切断反応を行った場合の切断反応産物；レーン6及び7：メチルアミン処理を48時間行ってDNAの切断反応を行った場合の切断反応産物；レーン8及び9：メチルアミン処理を48時間行ってDNAの切断反応を行った後、30回の温度サイクルで連結反応を行った場合の連結反応産物。レーン2、4、6及び8：LL1及びLL3をプライマーセットとして用いた場合の増幅産物のDNAと、LL6及びLL7をプライマーセットとして用いた場合の増幅産物のDNAとを切断反応させた場合の切断反応産物又は切断反応及び連結反応させた場合の連結反応産物；レーン3、5、7及び9：LL2及びLL4をプライマーセットとして用いた場合の増幅産物のDNAと、LL6及びLL7をプライマーセットとして用いた場合の増幅産物のDNAとを切断反応させた場合の切断反応産物又は切断反応及び連結反応させた場合の連結反応産物。

[図76]使用例11-3において、5-エチニル-2'-デオキシウリジン (Pa) を含むDNA増幅産物を本発明の切断反応で切断して得られた5'末端リン酸化DNA断片の連結反応産物を、1%アガロースゲル電気泳動で分析した結果を示す図である。レーン1：DNAマーカー；レーン2、3、6及び7：LL1及びLL4をプライマー

セットとして用いた場合の増幅産物のDNAと、LL5及びLL8をプライマーセットとして用いた場合の増幅産物のDNAとを連結反応させた場合の連結反応産物；レーン4、5、8及び9：LL2及びLL3をプライマーセットとして用いた場合の増幅産物のDNAと、LL6及びLL7をプライマーセットとして用いた場合の増幅産物のDNAとを連結反応させた場合の連結反応産物。レーン2～5：T4 DNAリガーゼを用いてDNAを連結反応させた場合の連結反応産物；レーン6～9：Taq DNAリガーゼを用いてDNAを連結反応させた場合の連結反応産物。レーン2、4、6及び8：2 μ Lの前記増幅産物のDNAの混合溶液を用いてDNAを連結反応させた場合の連結反応産物；レーン3、5、7及び9：4 μ Lの前記増幅産物のDNAの混合溶液を用いてDNAを連結反応させた場合の連結反応産物。

発明を実施するための形態

[0027] 以下、本発明の好ましい実施形態について詳細に説明する。

[0028] <1. 定義>

本明細書において、「オリゴデオキシヌクレオチド」は、デオキシリボ核酸（DNA）、一本鎖若しくは二本鎖のオリゴデオキシヌクレオチド若しくはポリデオキシヌクレオチド、又はそれらの誘導体を意味する。オリゴデオキシヌクレオチド（DNAオリゴマー又はオリゴDNA）は、天然のものでも合成のものでもよく、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）産物であってもよい。好適なオリゴデオキシヌクレオチド誘導体としては、限定するものではないが、例えば、オリゴデオキシヌクレオチド中のホスホジエステル結合が、ホスホロチオエート結合、N3' -P5' ホスホロアミダイト結合又はペプチド結合に変換されたオリゴデオキシヌクレオチド誘導体、オリゴデオキシヌクレオチド中のデオキシリボースが、モルホリン、2' -O-プロピルリボース、2' -O-メチルリボース、2' -フルオロ-2' -デオキシリボース、トレオフラノース（TNA）又は2' 位のOと4' 位のCとをメチレンで架橋したリボース（ロックされた核酸（LNA）若しくは架橋された核酸（BNA））に変換されたオリゴデオキシヌクレオチド誘導体、並びにペプチド核酸（PNA）を挙げることができる。

[0029] オリゴデオキシヌクレオチドの5' 末端及び／又は3' 末端は、特に記載す

る場合を除き、リン酸化されていてもよく、リン酸化されていなくてもよい。或いは、DNA自動合成機を用いるDNAオリゴマー合成において、最後のデオキシヌクレオチドの5'位ヒドロキシル基の保護基を脱保護しない条件で合成を行う場合のように、5'位のヒドロキシル基が保護基で保護された形態であってもよい。いずれの場合も、オリゴデオキシヌクレオチドに包含されるものとする。

[0030] 本明細書において、「保護基」は、末端ヒドロキシル基と結合して望ましくない副反応を実質的に抑制又は防止する基を意味し、限定するものではないが、例えば、トリチル基、モノ置換若しくはジ置換トリチル基、*o*-ニトロベンジル基及びレブリニル基を挙げることができる。ジメトキシトリチル (DMTr) であることが好ましい。上記の保護基は、所定の脱保護処理をすることによって除去される。保護基がトリチル基又はモノ置換若しくはジ置換トリチル基の場合、脱保護処理を行うために用いる脱保護剤としては、トリクロロ酢酸及びトリフルオロ酢酸のような酸を挙げることができる。保護基がレブリニル基の場合、脱保護処理を行うために用いる脱保護剤としては、ヒドラジンを挙げることができる。保護基が*o*-ニトロベンジル基の場合、脱保護処理としては、UV光照射処理を挙げることができる。

[0031] オリゴデオキシヌクレオチドは、5'末端及び／若しくは3'末端のヒドロキシル基、並びに／又は塩基がプローブ分子で標識された形態であってもよい。いずれの場合も、オリゴデオキシヌクレオチドに包含されるものとする。本明細書において、「プローブ（標識）分子」は、オリゴデオキシヌクレオチドの標識のために当該技術分野で慣用される分子を意味し、ビオチン、ポリエチレングリコール (PEG)、蛍光色素、ジコキシゲニン、タンパク質（例えば、細胞透過性ペプチド又は細胞内局在シグナルペプチドを含む）、及び標識分子を付与するためのリンカー分子を挙げることができる。フルオレセイン誘導体及びシアニン色素からなる群より選択される蛍光色素が好ましい。当該プローブ分子は、そのままの形態であってもよく、活性エステル（例えばスクシンイミジルエステル）、アジド基、アミノ基、チオール基、マ

レインイミド基又はアルキニル基のような、他の官能基との間で共有結合を形成し得る基が導入された形態でもよい。いずれの形態も、プローブ分子に包含されるものとする。

[0032] 本明細書において、「アルキル」は、特定の数の炭素原子を含む、直鎖又は分枝鎖の脂肪族炭化水素基を意味する。例えば、「員数1~20のアルキル」及び「 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル」は、少なくとも1個且つ多くても20個の炭素原子を含む、直鎖又は分枝鎖の炭化水素鎖を意味する。好適なアルキルは、限定するものではないが、例えばメチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピル、*n*-ブチル、*sec*-ブチル、イソブチル、*tert*-ブチル、*n*-ペンチル、*n*-ヘキシル、*n*-ヘプチル及び*n*-オクチル等を挙げることができる。

[0033] 本明細書において、「アルケニル」は、前記アルキルの1個以上のC-C単結合が二重結合に置換された基を意味する。好適なアルケニルは、限定するものではないが、例えばビニル、1-プロペニル、アリル、1-メチルエテニル（イソプロペニル）、1-ブテニル、2-ブテニル、3-ブテニル、1-メチル-2-プロペニル、2-メチル-2-プロペニル、1-メチル-1-プロペニル、2-メチル-1-プロペニル、1-ペンテニル、1-ヘキセニル、*n*-ヘプテニル及び1-オクテニル等を挙げることができる。

[0034] 本明細書において、「アルキニル」は、前記アルキルの1個以上のC-C単結合が三重結合に置換された基を意味する。好適なアルキニルは、限定するものではないが、例えばエチニル、1-プロピニル、2-プロピニル、1-ブチニル、2-ブチニル、3-ブチニル、1-メチル-2-プロピニル、1-ペンチニル、1-ヘキシニル、1-ヘプチニル及び1-オクチニル等を挙げることができる。

[0035] 本明細書において、「シクロアルキル」は、特定の数の炭素原子を含む、脂環式アルキルを意味する。例えば、「(環の)員数3~20のシクロアルキル」及び「 $C_3 \sim C_{20}$ シクロアルキル」は、少なくとも3個且つ多くても20個の炭素原子を含む、環式の炭化水素基を意味する。好適なシクロアルキルは、限定するものではないが、例えばシクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル及びシクロヘキシル等を挙げることができる。

- [0036] 本明細書において、「シクロアルケニル」は、前記シクロアルキルの1個以上のC-C単結合が二重結合に置換された基を意味する。好適なシクロアルケニルは、限定するものではないが、例えばシクロプロペニル、シクロブテニル、シクロペンテニル及びシクロヘキセニル等を挙げることができる。
- [0037] 本明細書において、「シクロアルキニル」は、前記シクロアルキルの1個以上のC-C単結合が三重結合に置換された基を意味する。好適なシクロアルキニルは、限定するものではないが、例えばシクロブチニル、シクロペンチニル及びシクロヘキシニル等を挙げることができる。
- [0038] 本明細書において、「ヘテロシクリル」は、前記シクロアルキル、シクロアルケニル又はシクロアルキニルの1個以上の炭素原子が、それぞれ独立して窒素原子(N)、硫黄原子(S)及び酸素原子(O)から選択される複素原子に置換された基を意味する。例えば、「(環の)員数3~20のヘテロシクリル」及び「 $C_3 \sim C_{20}$ ヘテロシクリル」は、少なくとも3個且つ多くても20個の炭素原子を含む環式の炭化水素基の1個以上の炭素原子が、それぞれ独立して上記の複素原子に置換された基を意味する。この場合において、N又はSによる置換は、それぞれN-オキシド又はSのオキシド若しくはジオキシドによる置換を包含する。好適なヘテロシクリルは、限定するものではないが、例えばピロリジニル、テトラヒドロフラニル、ジヒドロフラニル、テトラヒドロチエニル、テトラヒドロピラニル、ジヒドロピラニル、テトラヒドロチオピラニル、ピペリジニル、モルホリニル、チオモルホリニル及びピペラジニル等を挙げることができる。
- [0039] 本明細書において、「アリール」は、5~20の炭素原子数を有する芳香族基を意味する。例えば、「(環の)員数5~20のアリール」及び「 $C_5 \sim C_{20}$ アリール」は、少なくとも5個且つ多くても20個の炭素原子を含む芳香族基を意味する。好適なアリールは、限定するものではないが、例えばフェニル、ナフチル及びアントリル(アントラセニル)等を挙げることができる。
- [0040] 本明細書において、「アリールアルキル」は、前記アルキルの水素原子の1個が前記アリールに置換された基を意味する。好適なアリールアルキルは、

限定するものではないが、例えばベンジル、1-フェネチル及び2-フェネチル等を挙げることができる。

[0041] 本明細書において、「アリーラルケニル」は、前記アルケニルの水素原子の1個が前記アリールに置換された基を意味する。好適なアリーラルケニルは、限定するものではないが、例えばスチリル等を挙げることができる。

[0042] 本明細書において、「ヘテロアリール」は、前記アリールの1個以上の炭素原子が、それぞれ独立して窒素原子 (N)、硫黄原子 (S) 及び酸素原子 (O) から選択される複素原子に置換された基を意味する。例えば、「(環の) 員数5~20のヘテロアリール」及び「C₅~C₂₀ヘテロアリール」は、少なくとも5個且つ多くても20個の炭素原子を含む芳香族基の1個以上の炭素原子が、それぞれ独立して上記の複素原子に置換された基を意味する。この場合において、N又はSによる置換は、それぞれN-オキシド又はSのオキシド若しくはジオキシドによる置換を包含する。好適なヘテロアリールは、限定するものではないが、例えばフラニル、チエニル、ピロリル、イミダゾリル、ピラゾリル、トリアゾリル、テトラゾリル、チアゾリル、オキサゾリル、イソオキサゾリル、オキサジアゾリル、チアジアゾリル、イソチアゾリル、ピリジル、ピリダジニル、ピラジニル、ピリミジニル、キノリニル、イソキノリニル及びインドリル等を挙げることができる。

[0043] 本明細書において、「ヘテロアリーラルキル」は、前記アルキルの水素原子の1個が前記ヘテロアリールに置換された基を意味する。

[0044] 本明細書において、「カルボニル」は、カルボニル基を有する一価の基を意味する。好適なカルボニルは、限定するものではないが、例えばホルミル、アセチル、ベンゾイル、カルボキシ、メトキシカルボニル、ハロカルボニル及びカルバモイル (アミノカルボニル) 等を挙げることができる。

[0045] 上記で説明した基は、それぞれ独立して、酸素原子 (O)、窒素原子 (N)、硫黄原子 (S)、ケイ素原子 (Si) 及びリン原子 (P) からなる群より選択される1個以上の複素原子を含んでいてもよい。酸素原子、窒素原子又は硫黄原子であることが好ましい。この場合、上記の基を構成する1個以上の炭素原

子が、それぞれ独立してこれらの複素原子に置換される。それ故、上記で説明した基は、それ自体の形態だけでなく、該基において一部の炭素原子が複素原子と置き換えられた形態も含むものとする。

[0046] 上記で説明した基は、それぞれ独立して、非置換であるか、又は1個以上のハロゲン、ヒドロキシル基、置換若しくは非置換のアミノ基、ニトロ基、シアノ基、メルカプト基、カルボニル基、アミド基又は複素原子を含んでいてもよい置換若しくは非置換の一価の炭化水素基（例えば置換若しくは非置換の $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルケニル、 $C_2 \sim C_{20}$ アルキニル、 $C_1 \sim C_{20}$ アルコキシル、 $C_3 \sim C_{20}$ シクロアルキル、 $C_3 \sim C_{20}$ シクロアルキルオキシ、 $C_3 \sim C_{20}$ シクロアルケニル、 $C_3 \sim C_{20}$ シクロアルケニルオキシ、 $C_4 \sim C_{20}$ シクロアルキニル、 $C_4 \sim C_{20}$ シクロアルキニルオキシ、 $C_3 \sim C_{20}$ ヘテロシクリル、 $C_3 \sim C_{20}$ ヘテロシクリルオキシ、 $C_5 \sim C_{20}$ アリール、 $C_5 \sim C_{20}$ アリールオキシ、 $C_6 \sim C_{20}$ アリールアルキル、 $C_6 \sim C_{20}$ アリールアルケニル、 $C_5 \sim C_{20}$ ヘテロアリール、 $C_5 \sim C_{20}$ ヘテロアリールオキシ又は $C_6 \sim C_{20}$ ヘテロアリールアルキルであって、これらの基において一部の炭素原子が複素原子と置き換えられていてもよい）によって置換することもできる。この場合、上記の基は、それぞれ独立して、1個以上の上記の基で更に置換されていてもよい。

[0047] なお、本明細書において、「ハロゲン」又は「ハロ」は、フッ素、塩素、臭素又はヨウ素を意味する。

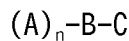
[0048] <2. オリゴデオキシヌクレオチド>

[2-1. オリゴデオキシヌクレオチド]

本発明者らは、化学反応によって低コスト且つ簡単な実験操作でDNA鎖の切断及び切断された末端のリン酸化を行う手段を検討したところ、以下において説明する非天然型塩基を含むデオキシヌクレオシドを導入したDNAオリゴマーと一級アミンのような求核剤とを反応させると、DNAオリゴマーが非天然型塩基を含むデオキシヌクレオシドの部位で切断されて、5'末端がリン酸化されたオリゴデオキシヌクレオチドが形成されることを見出した。当該反応は、前記DNAオリゴマーを求核剤存在下（塩基性条件下）で反応させることによ

って進行するため、デプリネーション反応のような酸性条件下で進行するDNAの分解反応を実質的に抑制又は防止することが可能となる。また、非天然型塩基を含むデオキシヌクレオシドは、DNA自動合成機によるDNA合成条件下で安定であるため、当該非天然型塩基を含むデオキシヌクレオシドをモノマーユニットとして、DNA自動合成機を用いてDNAを高収率で化学合成することが可能となる。加えて、当該非天然型塩基は、PCRのようなDNA複製条件下で天然型塩基と実質的に同一又は略同一の相補性を示すため、非天然型塩基を含むDNAは、*in vivo*及び*in vitro*における反応において、天然型塩基からなるDNAと実質的に同一又は略同一の鋳型としての機能を発揮することが可能となる。

[0049] 本発明の方法において、式I：



で表されるオリゴデオキシヌクレオチドを使用する。

[0050] ここで、式I中、

Aは、オリゴデオキシヌクレオチドであり、

Bは、求核剤によって脱離可能な部分Eを有する、非天然型塩基を含むデオキシヌクレオシドであり、

Cはオリゴデオキシヌクレオチドであり、

nは0又は1であり、

nが1のとき、Aの3'末端とBの5'位とは、ホスホジエステル結合で連結されており、

Bの3'位とCの5'末端とは、ホスホジエステル結合で連結されており、

BとCとの間のホスホジエステル結合は、求核剤の攻撃によって誘発されるEの脱離に伴って、Cの5'末端がリン酸化されたオリゴデオキシヌクレオチド部分がBの3'位から脱離することによって切断される。

[0051] 式Iにおいて、オリゴデオキシヌクレオチドA及びCは、上記で説明した特徴を有するオリゴデオキシヌクレオチドであることが好ましい。オリゴデオキシヌクレオチドA及びCの塩基数は特に限定されないが、オリゴデオキシヌク

レオチドAの場合、通常、0～100,000の範囲であり、0～20,000の範囲であることが好ましく、0～10,000の範囲であることがより好ましい。オリゴデオキシヌクレオチドCの場合、通常、1～100,000の範囲であり、1～20,000の範囲であることが好ましく、1～10,000の範囲であることがより好ましい。

[0052] 求核剤によって脱離可能な部分Eを有する、非天然型塩基を含むデオキシヌクレオシドBは、以下で説明する特徴を有する非天然型塩基を含むデオキシヌクレオシドであることが好ましい。

[0053] 式Iにおいて、nが0の場合、非天然型塩基を含むデオキシヌクレオシドBの5'末端のヒドロキシル基は、無保護の形態であってもよく、トリチル基又はモノ置換若しくはジ置換トリチル基、好ましくはDMTr基のような上記で説明した保護基で保護された形態であってもよい。いずれの形態も式Iで表されるオリゴヌクレオチドに包含されるものとする。

[0054] 上記の特徴を有する式Iで表されるオリゴデオキシヌクレオチドを用いることにより、化学反応によって低コスト且つ簡単な実験操作でDNA鎖の切断を行い、結果として生じた末端がリン酸化されたオリゴデオキシヌクレオチドを得ることが可能となる。

[0055] [2-2. 非天然型塩基を含むデオキシヌクレオシド]

本発明の方法で使用される非天然型塩基を含むデオキシヌクレオシドBは、求核剤によって脱離可能な部分を有する。具体的には、以下の特徴を有する。

[0056] (i) DNA合成条件下において安定に存在する。

[0057] (ii) *in vivo*及び／又は*in vitro*における反応（例えばPCR反応）のようなDNA複製条件下において安定に存在する。

[0058] (iii) 求核剤存在下（塩基性条件下）で反応させることによって脱離可能な部分Eを有する。

[0059] (iv) *in vivo*及び／又は*in vitro*における反応（例えばPCR反応）のようなDNA複製条件下において、フィデリティが高く、天然型塩基と実質的に同一又は略同一の相補性を示す。

- [0060] (v) 3' 位のヒドロキシル基において、別のオリゴデオキシヌクレオチドCの5' 末端のリン酸基とホスホジエステル結合を形成している場合、Bの3' 位とCの5' 末端との間のホスホジエステル結合は、求核剤の攻撃によって誘発されるEの脱離に伴って、Cの5' 末端がリン酸化されたオリゴデオキシヌクレオチド部分がBの3' 位から脱離することによって切断される。これにより、5' 末端がリン酸化された別のオリゴヌクレオチドCが形成される。
- [0061] 本明細書において、「DNA合成条件」は、当該技術分野において通常使用されるDNA自動合成機によってDNA合成を行う際に適用される、ホスホロアミダイト法のような一般的な合成条件を意味する。前記DNA自動合成機としては、限定するものではないが、例えば、ABI 392 DNA/RNAシンセサイザー（アプライドバイオシステムズ社）、及びNTS H-6 DNA/RNAシンセサイザー（日本テクノサービス社）を挙げることができる。DNA合成条件は、式Iで表されるオリゴデオキシヌクレオチドを合成する際の基質として使用される、非天然型塩基を含むデオキシヌクレオシドB及び天然型塩基を含む1個以上のデオキシヌクレオシドの組み合わせに基づいて、例えばDNA自動合成機に添付される取扱説明書を参照することによって適宜設定することができる。
- [0062] 特徴 (i) 「DNA合成条件下において安定に存在する」とは、具体的には以下の特徴を満足することを意味する。
- [0063] (i-1) カップリング反応生成物の垂リン酸エステル部分の酸化に用いられるヨウ素存在下において、ヨウ素と実質的に反応しないこと。
- [0064] (i-2) DMTr基の脱保護に用いられるトリクロロ酢酸のような酸存在下（酸性条件下）において、酸と実質的に反応しないこと。
- [0065] (i-3) 合成されたDNAの切り出し及び脱保護に用いられるアンモニア水のようなアルカリ存在下（アルカリ性条件下）において、アルカリと実質的に反応しないこと。
- [0066] また、本明細書において、「DNA複製条件」は、当該技術分野において通常使用されるPCR反応によってDNAを複製する際に適用される、一般的な反応条件を意味する。DNA複製条件は、式Iで表されるオリゴデオキシヌクレオチド

を複製する際の鋳型として使用される当該オリゴデオキシヌクレオチドの塩基配列に基づいて、例えばKramer M. F.及びCoen D. M., “Enzymatic amplification of DNA by PCR: standard procedures and optimization.” , Curr Protoc Cytom. 2006 Aug;Appendix 3:Appendix 3Kを参照することによって適宜設定することができる。

[0067] 特徴 (ii) 「in vivo及び／又はin vitroにおける反応（例えばPCR反応）のようなDNA複製条件下において安定に存在する」とは、具体的には以下の特徴を満足することを意味する。

[0068] (ii-1) PCRで通常使用される緩衝溶液（例えば塩化マグネシウム又は塩化カリウムのような塩を含む、常温でpH8付近のトリスバッファー（場合により界面活性剤又はBSAを含んでもよい））中、PCRサイクルにおいて95℃で加熱しても実質的に分解されない。

[0069] 非天然型塩基を含むデオキシヌクレオシドBは、より具体的には、以下の特徴 (vi) 及び (vii) を有することが好ましい。

[0070] (vi) 非天然型塩基が、置換若しくは非置換のアルケニル又はアルキニルで置換されたプリン型若しくはピリミジン型塩基の構造を有する。

[0071] (vii) 求核剤存在下（塩基性条件下）で反応させることによって、デオキシリボースの1' 位の炭素原子が求核剤の攻撃を受け、グリコシド結合が切断されるとともに、グリコシド結合を形成していた電子対の流れがアルケニル又はアルキニルの炭素原子をさらに攻撃することにより、非天然型塩基部分で分子内環化反応を生じながら非天然型塩基に由来する部分Eが脱離する。

[0072] 或いは、非天然型塩基を含むデオキシヌクレオシドBは、以下の特徴 (vi') 及び (vii') を有することが好ましい。

[0073] (vi') 非天然型塩基が、置換若しくは非置換のアルケニル又はアルキニルで置換されたプリン型若しくはピリミジン型塩基の水付加体若しくは求核剤付加体、又はそれらの互変異性体の構造を有する。

[0074] (vii') 求核剤存在下（塩基性条件下）で反応させることによって、置換若しくは非置換のアルケニル又はアルキニルで置換されたプリン型若しく

はピリミジン型塩基に水若しくは求核剤が付加して該デオキシヌクレオシドの水付加体若しくは求核剤付加体を形成するか、又はそれらの互変異性体を形成する。そして、前記デオキシヌクレオシドの水付加体若しくは求核剤付加体、又はそれらの互変異性体のデオキシリボースの1'位の炭素原子が求核剤の攻撃を受け、グリコシド結合が切断されるとともに、非天然型塩基に由来する部分Eが脱離する。

[0075] 或いは、非天然型塩基を含むデオキシヌクレオシドBは、以下の特徴 (vi') 及び (vii') を有することが好ましい。

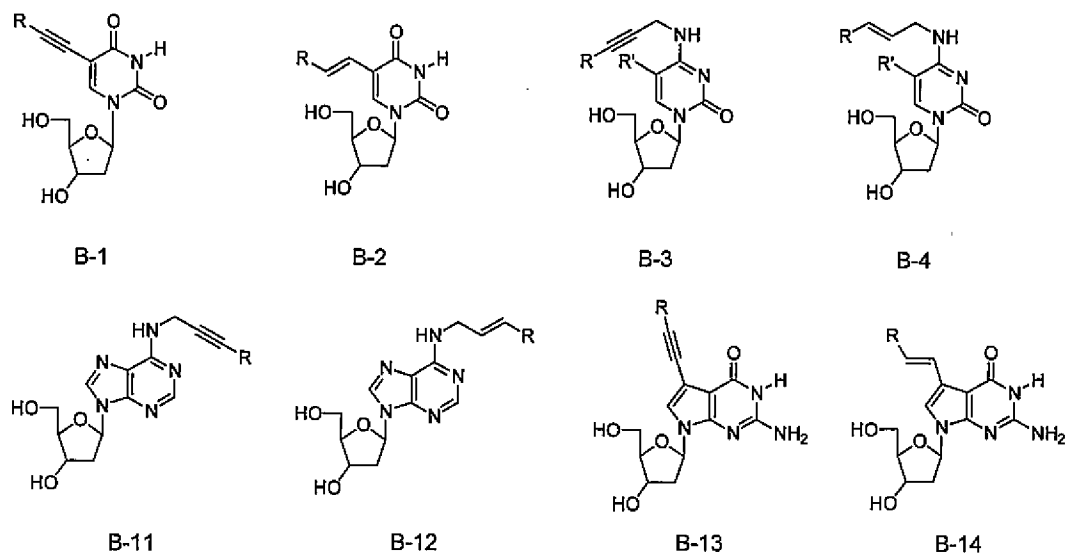
[0076] (vi') 非天然型塩基が、カルボニル、置換若しくは非置換のアルキニル若しくはシアノを有する置換若しくは非置換のアリールで置換されたプリン型塩基の構造を有する。

[0077] (vii') 求核剤存在下（塩基性条件下）で反応させることによって、デオキシリボースの1'位の炭素原子が求核剤の攻撃を受け、グリコシド結合が切断されるとともに、グリコシド結合を形成していた電子対の流れがカルボニル、置換若しくは非置換のアルキニル又はシアノの炭素原子をさらに攻撃することにより、非天然型塩基に由来する部分Eが脱離する。

[0078] 本明細書において、「非天然型塩基を含むデオキシヌクレオシドB」は、化合物B自体だけでなく、該化合物の水付加体若しくは求核剤付加体又はそれらの互変異性体も意味するものとする。

[0079] 例えば、非天然型塩基を含むデオキシヌクレオシドBが上記の特徴 (vi) 及び (vii) を有する下記の式：

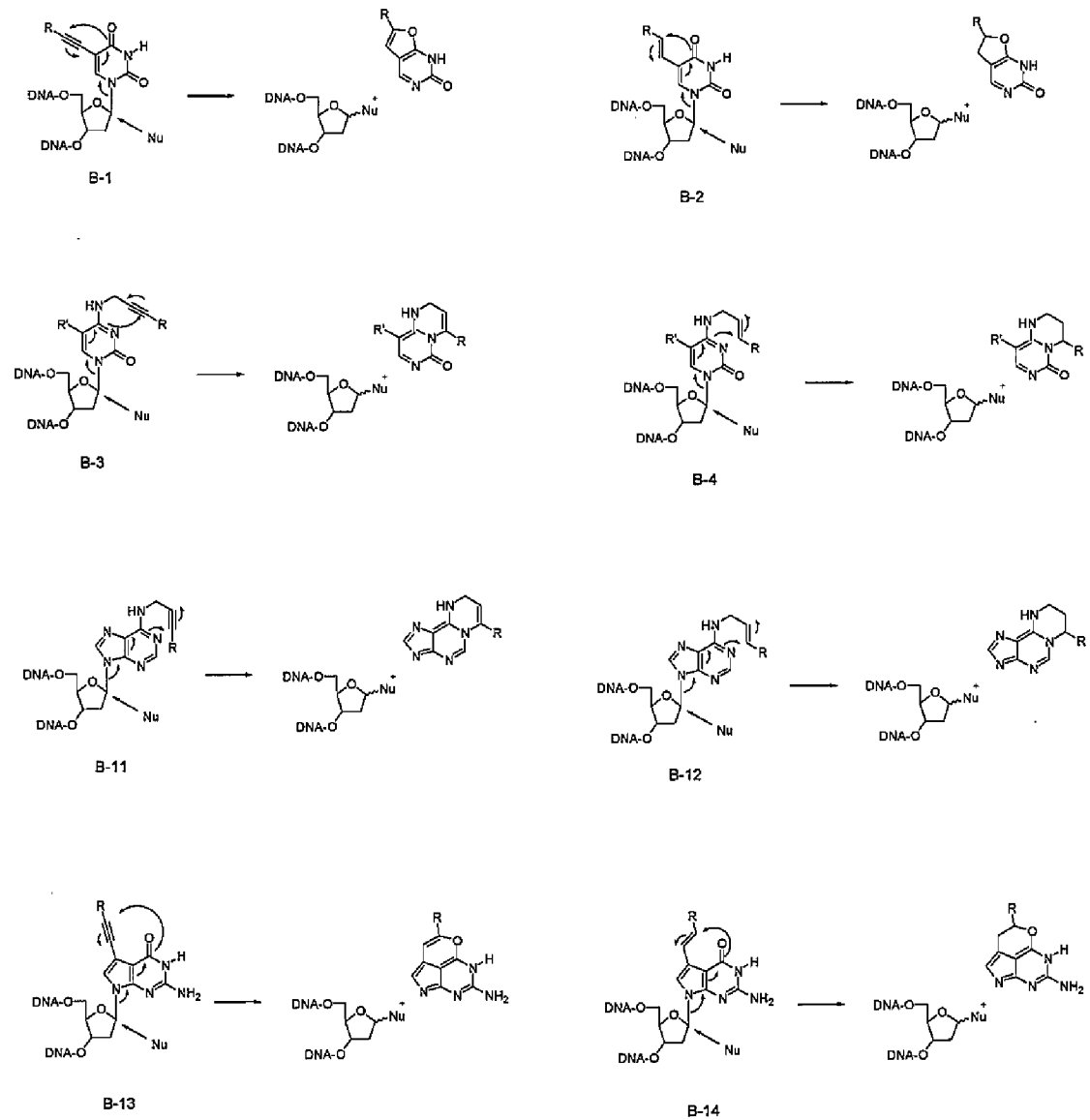
[化3]



[0080] [式中、R及びR' は、下記で定義するものと同様の基を意味する。]

で表される化合物である場合、Bを含むオリゴデオキシヌクレオチドを、求核剤存在下（塩基性条件下）で反応させることにより、以下の反応が進行すると考えられる。なお、本発明の作用効果は、下記の反応機構に限定されるものではない。

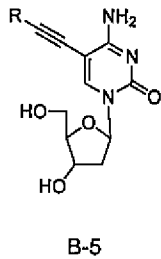
[化4]



[0081] 上記の反応式において、R及びR' は下記で定義するものと同様の基を意味し、DNAはオリゴデオキシヌクレオチドを、Nuは求核剤を意味する。

[0082] 例えば、非天然型塩基を含むデオキシヌクレオチドBが上記の特徴 (vi') 及び (vii') を有する下記の式：

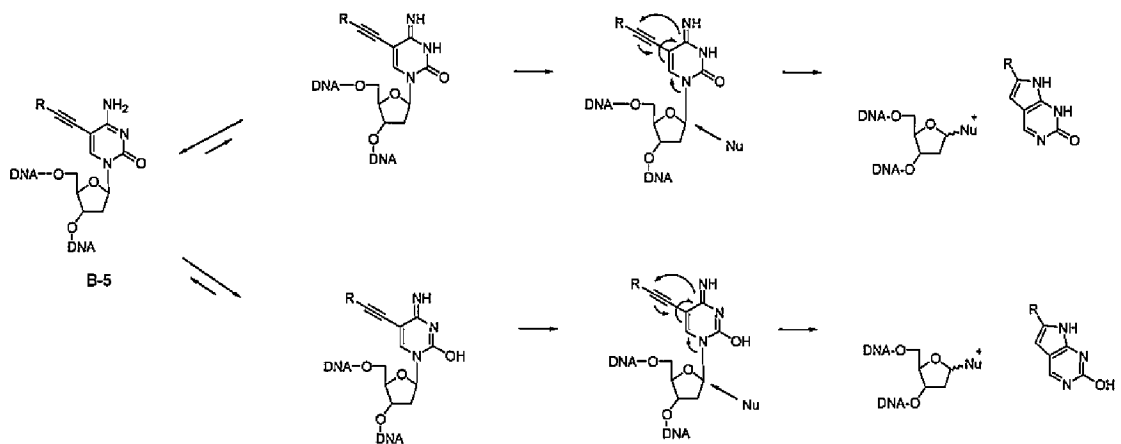
[化5]



[0083] [式中、Rは、下記で定義するものと同様の基を意味する。]

で表される化合物である場合、Bを含むオリゴデオキシヌクレオチドを、求核剤存在下（塩基性条件下）で反応させることにより、該化合物の互変異性化を伴う以下の反応が進行すると考えられる。なお、本発明の作用効果は、下記の反応機構に限定されるものではない。

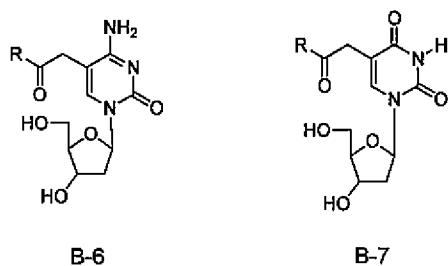
[化6]



[0084] 上記の反応式において、Rは下記で定義するものと同様の基を意味し、DNAはオリゴデオキシヌクレオチドを、Nuは求核剤を意味する。

[0085] 例えば、非天然型塩基を含むデオキシヌクレオシドBが上記の特徴（vi'）及び（vii'）を有する下記の式：

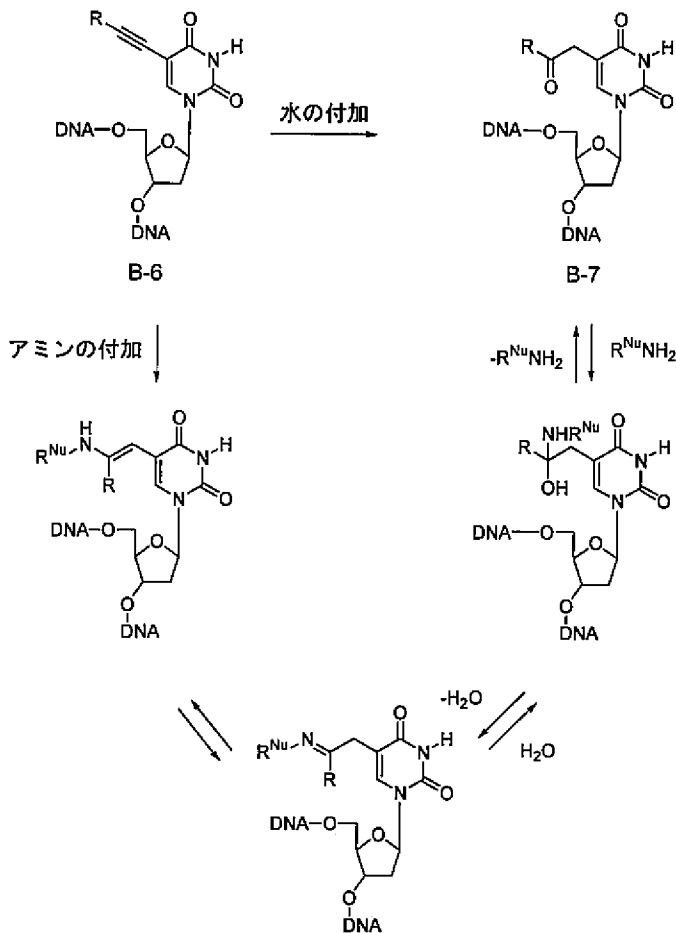
[化7]



[0086] [式中、Rは、下記で定義するものと同様の基を意味する。]

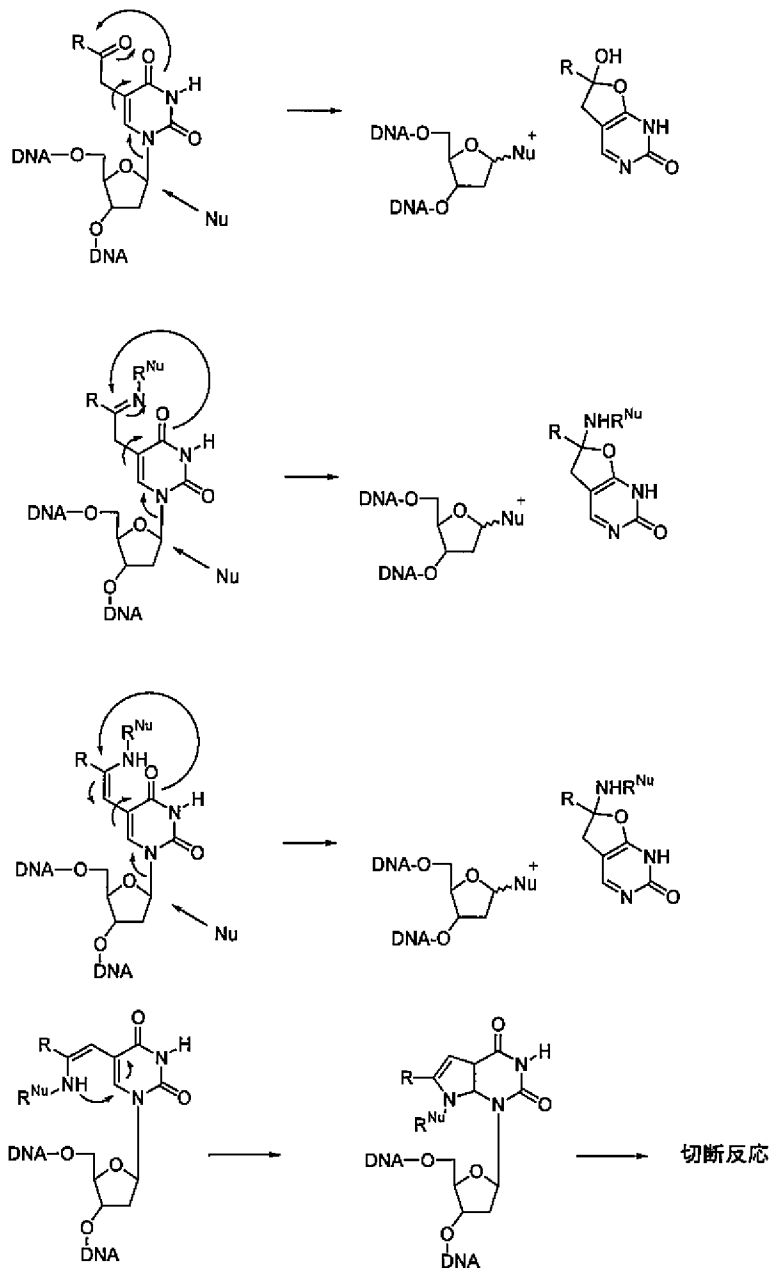
で表される化合物である場合、Bを含むオリゴデオキシヌクレオチドを、求核剤存在下（塩基性条件下）で反応させることにより、該化合物の水付加反応又は求核剤付加反応が進行する可能性がある。

[化8]



[0087] 前記反応によって生じたBの水付加体又は求核剤付加体を含有オリゴデオキシヌクレオチドを、求核剤存在下（塩基性条件下）でさらに反応させることにより、以下の反応が進行すると考えられる。なお、本発明の作用効果は、下記の反応機構に限定されるものではない。

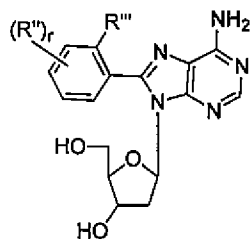
[化9]



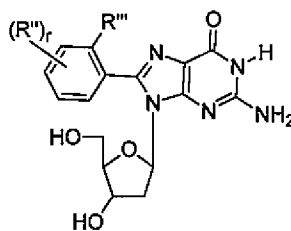
[0088] 上記の反応式において、Rは下記で定義するものと同様の基を意味し、DNAはオリゴデオキシヌクレオチドを、Nuは求核剤を、 R^{Nu} は求核剤付加に伴って生じる基を意味する。

[0089] 例えば、非天然型塩基を含むデオキシヌクレオシドBが上記の特徴 (vi'') 及び (vii'') を有する下記の式：

[化10]



B-21

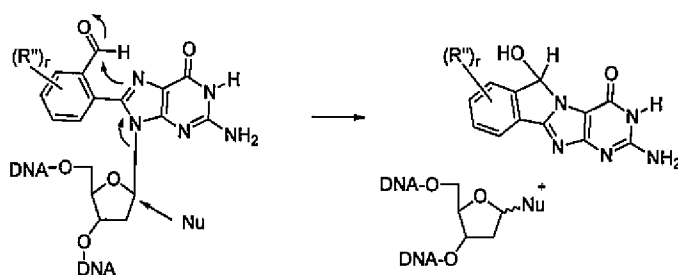


B-22

[0090] [式中、 r 、 R'' 、 R''' 及び Z は、下記で定義するものと同様の基を意味する。]

で表される化合物である場合、 B を含むオリゴデオキシヌクレオチドを、求核剤存在下（塩基性条件下）で反応させることにより、以下の反応が進行すると考えられる。以下の反応式では、 R''' がホルミル基（ $-COZ$ 、 $Z=H$ ）の場合を例示したが、 R''' が他の基の場合であっても同様の反応が進行すると考えられる。なお、本発明の作用効果は、下記の反応機構に限定されるものではない。

[化11]



[0091] 上記の反応式において、 r 及び R'' は下記で定義するものと同様の基を意味し、 DNA はオリゴデオキシヌクレオチドを、 Nu は求核剤を意味する。

[0092] 上記の特徴を有する非天然型塩基を含むデオキシヌクレオシド B を本発明の方法に用いることにより、求核剤存在下（塩基性条件下）で反応させることによって低コスト且つ簡単な実験操作で DNA 鎖の切断を行い、結果として生じた末端がリン酸化されたオリゴデオキシヌクレオチドを得ることが可能となる。また、本発明の方法による DNA の切断は、求核剤の攻撃によって誘発される、非天然型塩基を含むデオキシヌクレオシドからの E の脱離に伴って生じる

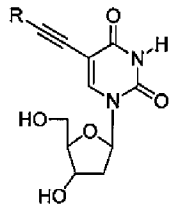
ことから、当該一塩基のデオキシヌクレオシドBの挿入又は置換によってDNA鎖の任意の位置に切断部位を導入することが可能となる。

[0093] DNA自動合成機を用いて式Iで表されるオリゴデオキシヌクレオチドを調製する場合、モノマーユニットとして準備される非天然型塩基を含むデオキシヌクレオシドBの5'末端のヒドロキシル基は、トリチル基又はモノ置換若しくはジ置換トリチル基、好ましくはDMTr基のような上記で説明した保護基で保護された形態であることが好ましい。また、式Iで表されるオリゴデオキシヌクレオチドにおいて、nが0である場合、非天然型塩基を含むデオキシヌクレオシドBの5'末端のヒドロキシル基は、無保護、或いはトリチル基又はモノ置換若しくはジ置換トリチル基、好ましくはDMTr基のような上記で説明した保護基で保護された形態であることが好ましい。

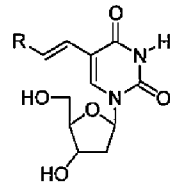
[0094] 本明細書において、「非天然型塩基を含むデオキシヌクレオチドB」は、非天然型塩基を含むデオキシヌクレオシドBの5'末端のヒドロキシル基がリン酸化された形態を意味する。

[0095] 非天然型塩基を含むデオキシヌクレオシドBは、以下：

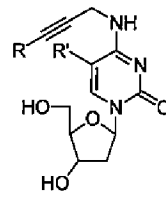
[化12]



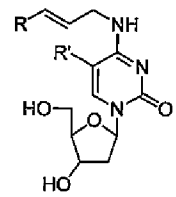
B-1



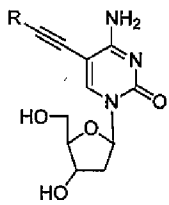
B-2



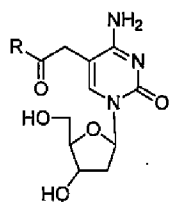
B-3



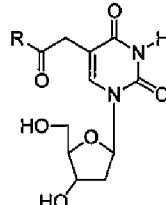
B-4



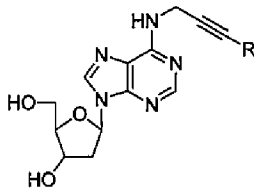
B-5



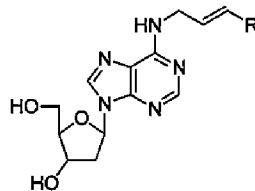
B-6



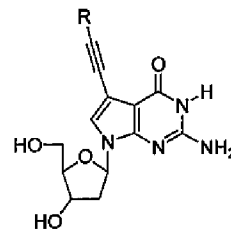
B-7



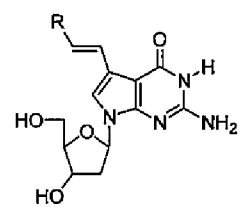
B-11



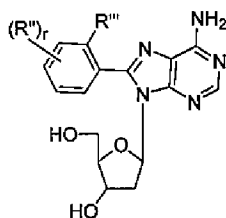
B-12



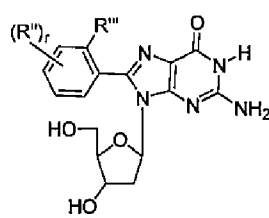
B-13



B-14



B-21



B-22

[0096] で表されるデオキシヌクレオシドであることが好ましく、式B-1、B-2、B-3、B-5、B-6、B-7、B-21又はB-22で表されるデオキシヌクレオシドであることがより好ましい。前記の化合物のうち、式B-3、B-7、B-21及び22（式中、Rは、水素、置換若しくは非置換のアルキル、置換若しくは非置換のシクロアルキル、置換若しくは非置換のヘテロシクリル、置換若しくは非置換のアリール

、置換若しくは非置換のアリールアルキル、置換若しくは非置換のヘテロアリール、置換若しくは非置換のヘテロアリールアルキル又はカルボニルであり； R' は、メチルであり； r は、0～4の整数であり； R'' は、ハロゲン、又は置換若しくは非置換のアルキル、アルケニル若しくはアルキニルであり； R''' は、 $-COZ$ 、 $-C\equiv C-Z$ 又は $-CN$ であり； Z は、水素、置換若しくは非置換のアルキル、置換若しくは非置換のシクロアルキル、置換若しくは非置換のヘテロシクリル、置換若しくは非置換のアリール、置換若しくは非置換のアリールアルキル、置換若しくは非置換のヘテロアリール、又は置換若しくは非置換のヘテロアリールアルキルである）で表される化合物は、本発明者らが見出した新規化合物である。

[0097] 式B-1～B-7、B-11～B-14、B-21及びB-22において、 R は、水素、置換若しくは非置換のアルキル、置換若しくは非置換のシクロアルキル、置換若しくは非置換のヘテロシクリル、置換若しくは非置換のアリール、置換若しくは非置換のアリールアルキル、置換若しくは非置換のヘテロアリール、置換若しくは非置換のヘテロアリールアルキル又はカルボニルである。具体的には、 R は、水素、置換若しくは非置換の $C_1\sim C_{10}$ アルキル、置換若しくは非置換の $C_3\sim C_{20}$ シクロアルキル、置換若しくは非置換の $C_3\sim C_{20}$ ヘテロシクリル、置換若しくは非置換の $C_5\sim C_{20}$ アリール、置換若しくは非置換の $C_6\sim C_{20}$ アリールアルキル、置換若しくは非置換の $C_5\sim C_{20}$ ヘテロアリール、置換若しくは非置換の $C_5\sim C_{20}$ ヘテロアリールアルキル又はカルボニルであることが好ましい。特に好適な R は、水素、メチル、エチル、フェニル、ヒドロキシメチル、アミノメチル、メルカプトメチル、ハロメチル、ホルミル、カルボキシル、カルバモイル及びアセチルを挙げることができる。水素、メチル、フェニル又はカルバモイルであることが特に好ましい。

[0098] 式B-1～B-7、B-11～B-14、B-21及びB-22において、 R' が存在する場合、 R' は、水素、又は置換若しくは非置換のアルキル、アルケニル若しくはアルキニルである。具体的には、 R' は、水素原子、又は置換若しくは非置換の $C_1\sim C_{10}$ アルキル、 $C_2\sim C_{10}$ アルケニル若しくは $C_2\sim C_{10}$ アルキニルであることが好ましく

、メチルであることが特に好ましい。

[0099] 式B-21及びB-22において、 r は、0～4の整数であり、 R' は、ハロゲン、又は置換若しくは非置換のアルキル、アルケニル若しくはアルキニルである。具体的には、 r は、0～4の整数であり、 R' は、ハロゲン、又は置換若しくは非置換の $C_1 \sim C_{10}$ アルキル、 $C_2 \sim C_{10}$ アルケニル若しくは $C_2 \sim C_{10}$ アルキニルであることが好ましく、 r は、0であることが特に好ましい。

[0100] 式B-21及びB-22において、 R'' は、 $-COZ$ 、 $-C \equiv C-Z$ 又は $-CN$ である。具体的には、 R'' は、 $-COZ$ であることが好ましい。

[0101] 式B-21及びB-22において、 Z は、水素、置換若しくは非置換のアルキル、置換若しくは非置換のシクロアルキル、置換若しくは非置換のヘテロシクリル、置換若しくは非置換のアリール、置換若しくは非置換のアリールアルキル、置換若しくは非置換のヘテロアリール、又は置換若しくは非置換のヘテロアリールアルキルである。具体的には、 Z は、水素、置換若しくは非置換の $C_1 \sim C_{10}$ アルキル、置換若しくは非置換の $C_3 \sim C_{20}$ シクロアルキル、置換若しくは非置換の $C_3 \sim C_{20}$ ヘテロシクリル、置換若しくは非置換の $C_5 \sim C_{20}$ アリール、置換若しくは非置換の $C_6 \sim C_{20}$ アリールアルキル、置換若しくは非置換の $C_5 \sim C_{20}$ ヘテロアリール、又は置換若しくは非置換の $C_5 \sim C_{20}$ ヘテロアリールアルキルであることが好ましい。特に好適な R は、水素、メチル、エチル、フェニル、ヒドロキシメチル、アミノメチル、メルカプトメチル又はハロメチルを挙げることができる。水素、メチル又はフェニルであることが好ましく、水素であることがより好ましい。

[0102] 上記の基は、一部の炭素原子が、1又は複数、好ましくは1～5個、より好ましくは1～3個の複素原子と置き換えられていてもよい。前記複素原子は、酸素原子、窒素原子、硫黄原子、ケイ素原子及びリン原子からなる群より選択される複素原子であることが好ましい。

[0103] また、上記の基が置換されている場合、当該基は、1個以上のハロゲン、ヒドロキシ基、置換若しくは非置換のアミノ基、ニトロ基、シアノ基、メルカプト基、カルボニル基、アミド基又は複素原子を含んでいてもよい置換若

しくは非置換の一価の炭化水素基（例えば置換若しくは非置換の $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、 $C_1 \sim C_{20}$ アルコキシル、 $C_3 \sim C_{20}$ シクロアルキル、 $C_3 \sim C_{20}$ シクロアルキルオキシ、 $C_3 \sim C_{20}$ ヘテロシクリル、 $C_3 \sim C_{20}$ ヘテロシクリルオキシ、 $C_5 \sim C_{20}$ アリール、 $C_5 \sim C_{20}$ アリールオキシ、 $C_6 \sim C_{20}$ アリールアルキル、 $C_5 \sim C_{20}$ ヘテロアリール、 $C_5 \sim C_{20}$ ヘテロアリールオキシ又は $C_6 \sim C_{20}$ ヘテロアリールアルキルであって、これらの基において一部の炭素原子が複素原子と置き換えられていてもよい）によって置換されていることが好ましい。

[0104] 非天然型塩基を含むデオキシヌクレオシドBは、該化合物自体だけでなく、その塩も包含する。非天然型塩基を含むデオキシヌクレオシドBの塩の対イオンとしては、限定するものではないが、例えば、ナトリウムイオン、カリウムイオン、カルシウムイオン若しくはマグネシウムイオンのようなカチオン、又は塩化物イオン、臭化物イオン、ギ酸イオン、酢酸イオン、マレイン酸イオン、フマル酸イオン、安息香酸イオン、アスコルビン酸イオン、パモ酸イオン、コハク酸イオン、ビスメチレンサリチル酸イオン、メタンサルホン酸イオン、エタンジスルホン酸イオン、プロピオン酸イオン、酒石酸イオン、サリチル酸イオン、クエン酸イオン、グルコン酸イオン、アスパラギン酸イオン、ステアリン酸イオン、パルミチン酸イオン、イタコン酸イオン、グリコール酸イオン、p-アミノ安息香酸イオン、グルタミン酸イオン、ベンゼンサルホン酸イオン、シクロヘキシルスルファミン酸イオン、メタンサルホン酸イオン、エタンサルホン酸イオン、イセチオン酸イオン、ベンゼンサルホン酸イオン、p-トルエンサルホン酸イオン、ナフタレンサルホン酸イオン、リン酸イオン、硝酸イオン、硫酸イオン、炭酸イオン、炭酸水素イオン又は過塩素酸イオンのようなアニオンが好ましい。

[0105] 非天然型塩基を含むデオキシヌクレオシドBは、該化合物自体だけでなく、その溶媒和物も包含する。非天然型塩基を含むデオキシヌクレオシドBと溶媒和物を形成し得る溶媒としては、限定するものではないが、例えば、メタノール、エタノール、2-プロパノール（イソプロピルアルコール）、ジメチルスルホキシド（DMSO）、酢酸、エタノールアミン若しくは酢酸エチルのよう

な有機溶媒、又は水が好ましい。

[0106] また、非天然型塩基を含むデオキシヌクレオシドBは、該化合物自体だけでなく、その保護形態も包含する。本明細書において、「保護形態」は、1個又は複数の官能基に保護基が導入された形態を意味する。

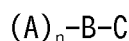
[0107] 上記の特徴を有する非天然型塩基を含むデオキシヌクレオシドBを本発明の方法に用いることにより、求核剤存在下（塩基性条件下）で反応させることによって低コスト且つ簡単な実験操作でDNA鎖の切断を行い、結果として生じた末端がリン酸化されたオリゴデオキシヌクレオチドを得ることが可能となる。

[0108] <3. オリゴデオキシヌクレオチドの製造方法>

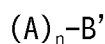
図1は、本発明のオリゴデオキシヌクレオチドの製造方法の一実施形態を示す工程図である。以下、図1に基づき、本発明の方法の好ましい実施形態について詳細に説明する。

[0109] [3-1. 5' 末端リン酸化オリゴヌクレオチド形成工程]

本発明の方法は、求核剤と、式I：



で表されるオリゴデオキシヌクレオチドとを接触させることによって、前記Cの5' 末端がリン酸化されたオリゴデオキシヌクレオチドと、式II：



で表されるオリゴデオキシヌクレオチドとを得る、5' 末端リン酸化オリゴヌクレオチド形成工程を含む（工程S2）。本工程は、BとCとの間のホスホジエステル結合を、Cの5' 末端がリン酸化されたオリゴデオキシヌクレオチド部分をBの3' 位から脱離させることによって切断して、前記Cの5' 末端がリン酸化されたオリゴデオキシヌクレオチドを得ることを目的とする。

[0110] 式I及びIIにおいて、A、B、C及びnは、上記で定義したのと同様の意味を表す。

[0111] 式IIにおいて、B' は、求核剤の攻撃によるEの脱離に伴って形成されるBの残基部分である。

[0112] 式IIにおいて、AとB'とは、ホスホジエステル結合で連結されている。より具体的には、B'は、Bの5'位に由来する位置において、Aの3'末端とホスホジエステル結合で連結されている。本明細書において、「B'の5'位」は、B'において、Bの5'位に由来する位置を意味する。

[0113] 式Iにおいて、nが0である場合、求核剤と、式I'：

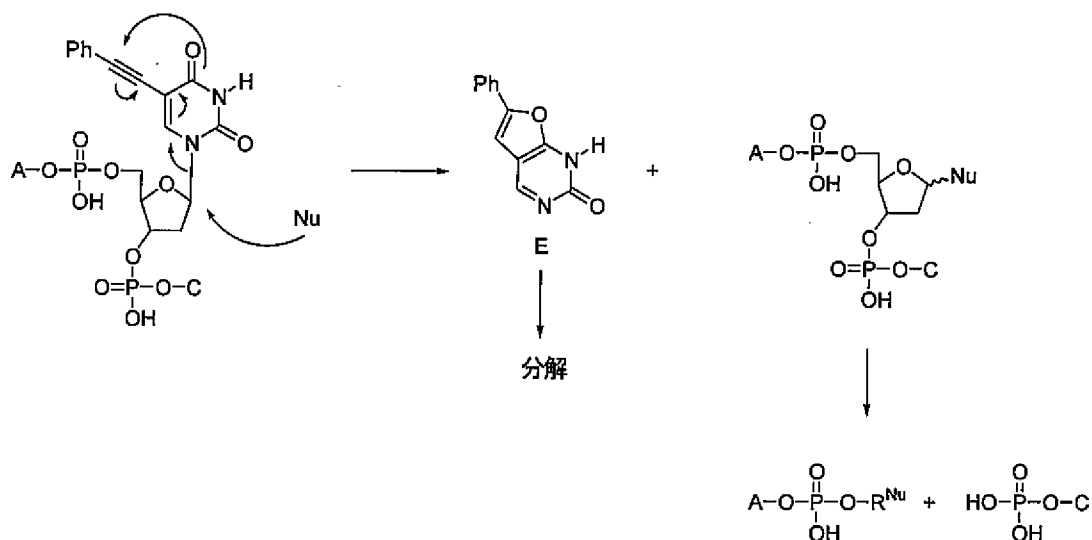


で表されるオリゴデオキシヌクレオチドとを接触させることによって、BとCとの間のホスホジエステル結合を、Cの5'末端がリン酸化されたオリゴデオキシヌクレオチド部分をBの3'位から脱離させることによって切断して、前記Cの5'末端がリン酸化されたオリゴデオキシヌクレオチドを生じる。また、式Iにおいて、nが1である場合、求核剤と式Iで表されるオリゴデオキシヌクレオチドとを接触させることによって、BとCとの間のホスホジエステル結合を、Cの5'末端がリン酸化されたオリゴデオキシヌクレオチド部分をBの3'位から脱離させることによって切断して、前記Cの5'末端がリン酸化されたオリゴデオキシヌクレオチドと、式IIで表されるオリゴデオキシヌクレオチドとを生じる。それ故、DNA自動合成機を用いて式I'で表されるオリゴデオキシヌクレオチドを合成した後、本工程を実施することにより、5'末端がリン酸化されたオリゴデオキシヌクレオチドCを製造することが可能となる。

[0114] 本工程は、酵素処理を必要とせず、化学反応（求核剤による求核反応）によって式I又は式I'で表されるオリゴデオキシヌクレオチドの切断と、5'末端のリン酸化が行われる。それ故、ポリヌクレオチドキナーゼのような酵素を用いる従来技術の方法と比較して、低コスト且つ簡単な実験操作で5'末端がリン酸化されたオリゴデオキシヌクレオチドを製造することが可能となる。

[0115] 例えば、非天然型塩基を含むデオキシヌクレオチドBが式B-1で表される化合物である場合、本工程における反応は以下のように進行すると考えられる。なお、本発明の作用効果は、以下の原理に限定されるものではない。

[化13]



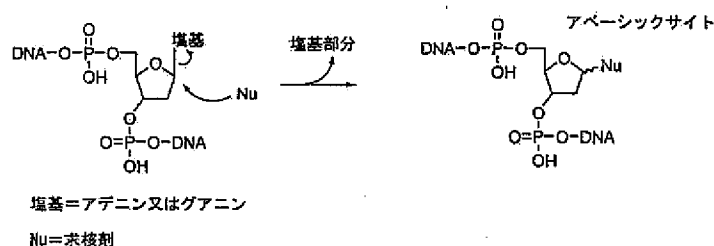
[0116] 前記の反応式において、A、C及びEは、上記で定義された式Iと同様の意味であり、R^{Nu}は、分解したヌクレオチドに求核剤 (Nu) が一分子付加して非天然型塩基が除去されてできたものを意味する。

[0117] 本工程において、非天然型塩基を含むデオキシヌクレオシドB-1を含む式Iで表されるオリゴデオキシヌクレオチドを求核剤存在下で反応させることにより、非天然型塩基を含むデオキシヌクレオシドB-1から部分Eが脱離すると考えられる（特徴 (iii)）。より具体的には、デオキシリボースの1'位の炭素原子が求核剤Nuの攻撃を受け、グリコシド結合が切断されるとともに、グリコシド結合を形成していた電子対の流れがアルキニルの炭素原子をさらに攻撃することにより、非天然型塩基部分で分子内環化反応を生じながら非天然型塩基に由来する部分Eが脱離すると考えられる（特徴 (vii)）。上記式では、1'位の炭素原子が求核剤の攻撃を受けた場合の反応機構を示したが、4'位の炭素原子が求核剤の攻撃を受けた場合にも同様の反応が進行すると考えられる。なお、ここでは、特徴 (vi) 及び (vii) を有するチミンに対応する非天然型塩基を含むデオキシヌクレオシドB-1を例示して説明した。前記の反応機構は、チミン及びシトシンのようなピリミジン型塩基に対応する非天然型塩基だけでなく、アデニン及びグアニンのようなプリン型塩基に対応する非天然型塩基を含むデオキシヌクレオシドBについても適用される。また

、前記の反応機構は、特徴 (vi) 及び (vii) を有する非天然型塩基を含むデオキシヌクレオシドBだけでなく、特徴 (vi') 及び (vii') 又は特徴 (vi'') 及び (vii'') を有する非天然型塩基を含むデオキシヌクレオシドBについても、これらの非天然型塩基を含むデオキシヌクレオシドBに関する前記の説明を考慮することにより、同様に適用することができる。

[0118] この反応過程は、以下に示すデプリネーション反応で生じるアベーシック部位の分解反応と類似していると考えられる（非特許文献13）。

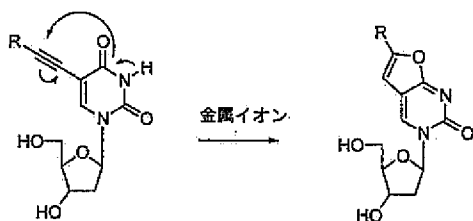
[化14]



[0119] デプリネーション反応は、DNAに含まれるプリン塩基であるアデニン及び／又はグアニンがヌクレオシドより脱離する反応である。ここで、アデニン及びグアニンは、プロトン化することによって脱離しやすくなるので、デプリネーション反応は塩基性条件下では起こりにくく酸性条件下で起こりやすい。また、ピリミジン塩基であるシトシン及びチミンは、プリン塩基よりも脱離しにくく、塩基性条件及び中性条件だけでなく、酸性条件でもDNAからのピリミジン塩基の脱離は起きにくい。

[0120] また、以下に示すように、塩基部分の3位の水素が脱離する環化反応は公知である（非特許文献26～29）。しかしながら、上記のようにデオキシヌクレオシドBに含まれる非天然型塩基が環化すると同時にヌクレオシドから脱離すると考えられるメカニズムによりDNAが切断される反応はこれまでに報告されておらず、本発明者らが見出した新規な反応である。

[化15]



[0121] DNAポリメラーゼを用いるDNAの複製反応において、チミジンとして働くチミジン誘導体の非天然型塩基を含むDNAは公知である（特許文献4及び5並びに非特許文献30～34）。しかしながら、本工程の如く、塩基性条件下（求核剤存在下）で反応させた場合、DNAに含まれる天然型塩基は損傷を受けず、非天然型塩基を含むデオキシヌクレオチドの部位でのみ特異的にDNAが切断され、且つ切断で生じる5'末端がリン酸化される反応はこれまでに報告されておらず、本発明者らが見出した新規な反応である。

[0122] 本工程において使用される式Iで表されるオリゴデオキシヌクレオチドは、予め合成されたものを購入等することによって準備してもよく、以下で説明するオリゴデオキシヌクレオチド合成工程を実施することによって準備してもよい。いずれの場合も、本工程の実施形態に包含されるものとする。

[0123] 本工程において使用される求核剤は、式Iで表されるオリゴデオキシヌクレオチドに含まれる非天然型塩基を含むデオキシヌクレオチドBの部位を攻撃して、Bから脱離可能な部分Eを脱離させ、且つEの脱離に伴って、Cの5'末端がリン酸化されたオリゴデオキシヌクレオチド部分をBの3'位から脱離させることによって切断することができる化合物である。求核剤は、限定するものではないが、例えば、一級アミンを挙げることができる。メチルアミン、エチレンジアミン、2-アミノエタノール、エチルアミン、プロピルアミン、2-アミノエタントール、1,3-ジアミノプロパン及びトリス（2-アミノエチル）アミンからなる群より選択される一級アミンであることが好ましい。上記の求核剤を用いることにより、式Iで表されるオリゴデオキシヌクレオチドに含まれるBとCとの間のホスホジエステル結合を、Cの5'末端がリン酸化されたオリゴデオキシヌクレオチド部分をBの3'位から脱離させることによって

切断して、5' 末端がリン酸化されたオリゴデオキシヌクレオチドCを得ることが可能となる。

[0124] 本工程は、通常、求核剤と式Iで表されるオリゴデオキシヌクレオチドとを所定の反応条件下で接触させることにより実施される。前記反応条件は、本工程で使用される求核剤及び非天然型塩基を含むデオキシヌクレオチドBの組み合わせに基づき適宜設定すればよい。具体的には、反応温度は、0～90℃の範囲の温度であることが好ましく、4～70℃の範囲の温度であることがより好ましい。また、前記反応条件が加熱条件の場合、反応温度は、60～90℃の範囲の温度であることが好ましく、70～80℃の範囲の温度であることがより好ましい。反応温度が90℃以下、特に4～70℃の範囲の場合、低温であればあるほど長鎖のオリゴヌクレオチドのアルカリ変性を抑制することができる。反応時間は、0.1～168時間の範囲の時間であることが好ましく、0.1～48時間の範囲の時間であることがより好ましく、0.1～24時間の範囲の時間であることがさらに好ましく、0.1～12時間の範囲の時間であることが特に好ましい。上記の反応条件で本工程を実施することにより、求核剤と式Iで表されるオリゴデオキシヌクレオチドとの反応を促進することが可能となる。

[0125] 本工程は、通常、求核剤と式Iで表されるオリゴデオキシヌクレオチドとを媒体中で接触させることにより実施される。媒体は、本工程で使用される求核剤及び非天然型塩基を含むデオキシヌクレオチドBの組み合わせに基づき適宜設定すればよい。具体的には、水であることが好ましい。上記の媒体中で本工程を実施することにより、望ましくない副反応を抑制し、且つ求核剤と式Iで表されるオリゴデオキシヌクレオチドとの反応を促進することが可能となる。

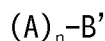
[0126] 本工程は、脱保護された形態の式Iで表されるオリゴデオキシヌクレオチドを用いて実施してもよく、例えば5' 末端がトリチル基又はモノ置換若しくはジ置換トリチル基、好ましくはDMTr基のような上記で説明した保護基で保護された形態の式Iで表されるオリゴデオキシヌクレオチドを用いて実施してもよい。後者の場合、本工程で得られる式IIで表されるオリゴデオキシヌクレ

オチドは、5' 末端が保護された形態となる。この場合、所望により、以下で説明する3' 末端リン酸化オリゴデオキシヌクレオチド形成工程において、上記で説明した脱保護処理を行うことによって脱保護すればよい。

[0127] 本工程において得られた5' 末端がリン酸化されたオリゴデオキシヌクレオチドC、及び場合により式IIで表されるオリゴデオキシヌクレオチドは、当該技術分野で通常使用される精製手段により、互いに並びに原料及び副生成物から分離されることによって、精製及び単離することができる。それ故、本工程は、精製単離工程をさらに含んでもよい。精製手段としては、限定するものではないが、例えば、中圧液体クロマトグラフィー (MPLC)、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)、減圧濃縮 (留去)、凍結乾燥、再結晶、アガロースゲル電気泳動、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、逆相若しくはイオン交換担体を充填した簡易カートリッジによる処理及びエタノール沈殿、並びにそれらの組み合わせを挙げることができる。或いは、本工程では精製単離工程を実施せず、以下において説明する3' 末端リン酸化オリゴデオキシヌクレオチド形成工程において、5' 末端がリン酸化されたオリゴデオキシヌクレオチドC及び3' 末端がリン酸化されたオリゴデオキシヌクレオチドの精製及び単離を一緒に実施してもよい。上記の精製単離工程を実施することにより、高純度の5' 末端がリン酸化されたオリゴデオキシヌクレオチドCを製造することが可能となる。

[0128] [3-2. 3' 末端リン酸化オリゴデオキシヌクレオチド形成工程]

本発明の方法は、場合により式II：



で表されるオリゴデオキシヌクレオチドを反応させて、式IIa：



で表される3' 末端がリン酸化されたオリゴデオキシヌクレオチドを得る、3' 末端リン酸化オリゴデオキシヌクレオチド形成工程をさらに含んでもよい (工程S3)。本工程は、B' とAとの間のホスホジエステル結合を、Aの3' 末端がリン酸化されたオリゴデオキシヌクレオチド部分をBから脱離させること

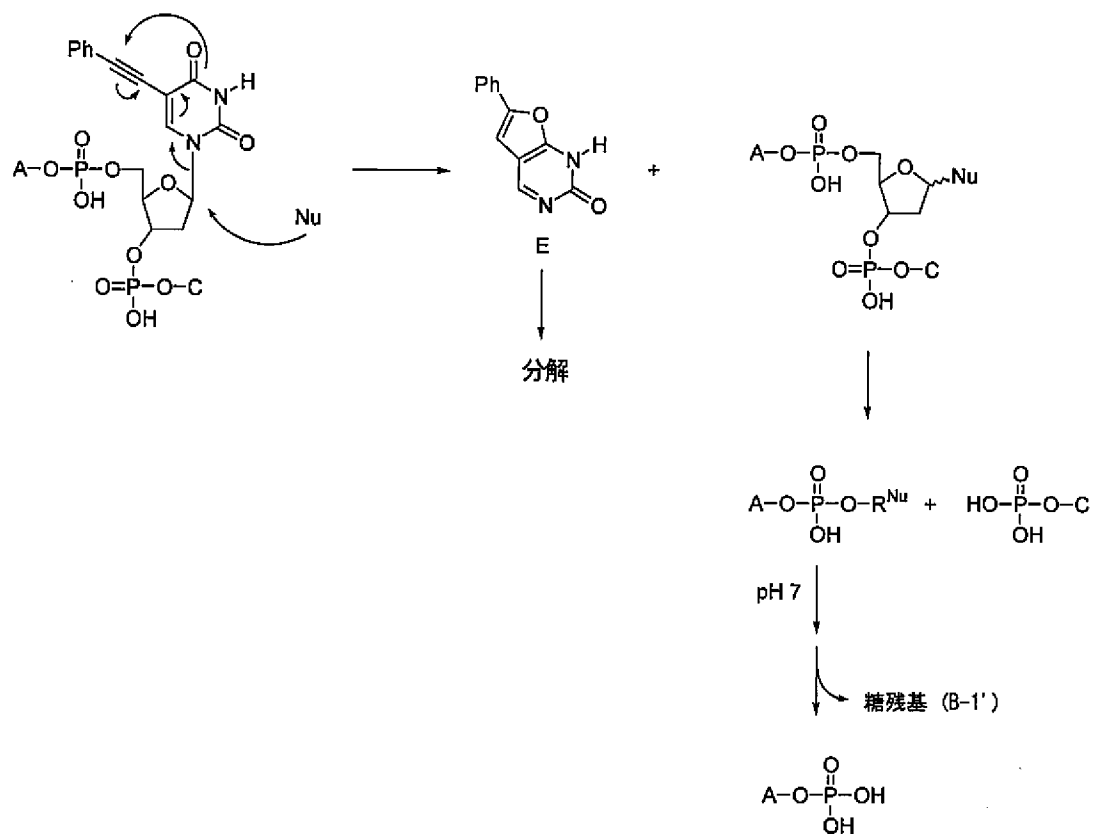
によって切断して、式IIaで表される3'末端がリン酸化されたオリゴデオキシヌクレオチドを得ることを目的とする。

[0129] 式II及びIIaにおいて、A及びB'は、上記と同様の意味であり、
nは1である。

[0130] 本工程は、化学反応（脱離反応）によって式IIで表されるオリゴデオキシヌクレオチドに含まれるB'とAとの間のホスホジエステル結合を切断することにより、Aの3'末端がリン酸化されたオリゴデオキシヌクレオチドを生じる。それ故、リン酸化アミダイトを用いる合成DNAの末端リン酸化法と比較して、低コスト且つ簡単な実験操作で3'末端がリン酸化されたオリゴデオキシヌクレオチドを製造することが可能となる。

[0131] 非天然型塩基を含むデオキシヌクレオチドBが式B-1で表される化合物である場合、本工程における反応は以下のように進行すると考えられる。なお、本発明の作用効果は、以下の原理に限定されるものではない。

[化16]



[0132] 前記の反応式において、A、C及びEは、上記で定義された式Iと同様の意味

であり、 R^{Nu} は、分解したヌクレオチドに求核剤 (Nu) が一分子付加して非天然型塩基が除去されてできたものを意味する。

[0133] 前工程における求核剤の攻撃によるEの脱離に伴って形成された式IIで表されるオリゴデオキシヌクレオチドA-(B-1') は、本工程において加熱処理することにより、B-1' とAとの間のホスホジエステル結合が、Aの3' 末端がリン酸化されたオリゴデオキシヌクレオチド部分がB-1' から脱離することによって切断されて、Aの3' 末端がリン酸化されたオリゴデオキシヌクレオチドを生じる。

[0134] 本工程は、通常、式IIで表されるオリゴデオキシヌクレオチドを所定の反応条件下で反応させることにより実施される。前記反応条件は、使用される非天然型塩基を含むデオキシヌクレオチドB及びBの切断により形成されたB' に基づき適宜設定すればよい。具体的には、反応温度は、0~120℃の範囲の温度であることが好ましく、4~70℃の範囲の温度であることがより好ましい。また、前記反応条件が加熱条件の場合、反応温度は、90~120℃の範囲の温度であることが好ましく、110~120℃の範囲の温度であることがより好ましい。反応時間は、0.1~168時間の範囲の時間であることが好ましく、0.1~48時間の範囲の時間であることがより好ましく、0.1~24時間の範囲の時間であることがさらに好ましく、0.1~1時間の範囲の時間であることが特に好ましい。また、反応系のpHは、通常は中性条件であり、具体的には、6~8の範囲の値であることが好ましく、6.8~7.2の範囲の値であることがより好ましい。上記の条件で本工程を実施することにより、Aの3' 末端がリン酸化されたオリゴデオキシヌクレオチド部分をB' から脱離させて、B' とAとの間のホスホジエステル結合を切断することが可能となる。

[0135] 本工程は、通常、式IIで表されるオリゴデオキシヌクレオチドを媒体中で反応させることにより実施される。媒体は、本工程で使用される式IIで表されるオリゴデオキシヌクレオチドに基づき適宜設定すればよい。具体的には、水であることが好ましい。また、媒体は、反応系のpHを上記で説明した好ましいpH範囲に保持するために、1以上の緩衝成分を含んでもよい。前記緩衝

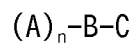
成分は、限定するものではないが、例えば、リン酸塩及びカコジル酸塩、並びにそれらの組み合わせを挙げることができる。リン酸塩であることが好ましい。緩衝成分の濃度は、10～1000 mMの範囲であることが好ましく、10～100 mMの範囲であることがより好ましい。上記の媒体中で本工程を実施することにより、望ましくない副反応を抑制し、且つAの3'末端がリン酸化されたオリゴデオキシヌクレオチド部分をB'から脱離させて、B'とAとの間のホスホジエステル結合を切断することが可能となる。

[0136] 本工程において得られた式IIaで表される3'末端がリン酸化されたオリゴデオキシヌクレオチドは、当該技術分野で通常使用される精製手段により、原料及び副生成物から分離されることによって、精製及び単離することができる。それ故、本工程は、精製単離工程をさらに含んでもよい。精製手段としては、限定するものではないが、例えば、中圧液体クロマトグラフィー (MPLC)、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)、減圧濃縮 (留去)、凍結乾燥及び再結晶、アガロースゲル電気泳動、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、逆相若しくはイオン交換担体を充填した簡易カートリッジによる処理及びエタノール沈殿、並びにそれらの組み合わせを挙げることができる。上記の精製単離工程を実施することにより、高純度の式IIaで表される3'末端がリン酸化されたオリゴデオキシヌクレオチドを製造することが可能となる。

[0137] 本工程は、脱保護された形態の式IIで表されるオリゴデオキシヌクレオチドを用いて実施してもよく、例えば5'末端がトリチル基又はモノ置換若しくはジ置換トリチル基、好ましくはDMTr基のような上記で説明した保護基で保護された形態の式IIで表されるオリゴデオキシヌクレオチドを用いて実施してもよい。後者の場合、本工程で得られる式IIaで表される3'末端がリン酸化されたオリゴデオキシヌクレオチドは、5'末端が保護された形態となる。この場合、所望により、上記で説明した脱保護処理を行うことによって脱保護することにより、脱保護された形態の式IIaで表される3'末端がリン酸化されたオリゴデオキシヌクレオチドを得ることが可能となる。

[0138] [3-3. オリゴデオキシヌクレオチド合成工程]

本発明の方法は、予め合成された式Iで表されるオリゴデオキシヌクレオチドを購入等することによって実施してもよい。しかしながら、式Iで表されるオリゴデオキシヌクレオチドを合成した後に、その場で又は逐次的に5' 末端リン酸化オリゴデオキシヌクレオチド形成工程を実施してもよい。それ故、本発明の方法は、場合により前記5' 末端リン酸化オリゴデオキシヌクレオチド形成工程の前に、求核剤によって脱離可能な部分Eを有する、非天然型塩基を含むデオキシヌクレオシドB又はその誘導体と、天然型塩基を含む1個以上のデオキシヌクレオシド又はその誘導体とを含む基質を用いて、式I：



で表されるオリゴデオキシヌクレオチドを合成する、オリゴデオキシヌクレオチド合成工程をさらに含んでもよい（工程S1）。本工程は、前記5' 末端リン酸化オリゴデオキシヌクレオチド形成工程の原料となる、式Iで表されるオリゴデオキシヌクレオチドを得ることを目的とする。

[0139] 式Iにおいて、A、B及びCは、上記と同様の意味であり、
nは0又は1である。

[0140] 本工程において、求核剤によって脱離可能な部分Eを有する、非天然型塩基を含むデオキシヌクレオシドBは、上記で説明した非天然型塩基を含むデオキシヌクレオシドBを使用することができる。また、天然型塩基を含む1個以上のデオキシヌクレオシドは、式Iで表されるオリゴデオキシヌクレオチドに含まれるデオキシヌクレオチドのうち、非天然型塩基を含むデオキシヌクレオチドB以外の、アデニン、チミン、グアニン及びシトシンからなる群より選択される天然型塩基を含むデオキシヌクレオチドに対応するものを意味し、当該技術分野で通常使用される純度の天然型塩基を含むデオキシヌクレオシドを使用することができる。

[0141] 求核剤によって脱離可能な部分Eを有する、非天然型塩基を含むデオキシヌクレオシドBの誘導体、及び天然型塩基を含むデオキシヌクレオシドの誘導体は、限定するものではないが、例えば、3' 位にホスホロアミダイト基を有する当該デオキシヌクレオシドの誘導体を挙げることができる。上記の誘導体

を用いることにより、当該技術分野において通常使用されるDNA自動合成機によって式Iで表されるオリゴデオキシヌクレオチドを得ることが可能となる。

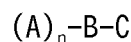
[0142] 本工程において使用される基質は、上記で説明した求核剤によって脱離可能な部分Eを有する、非天然型塩基を含むデオキシヌクレオシドB又はその誘導体と、天然型塩基を含む1個以上のデオキシヌクレオシド又はその誘導体とを含む。前記基質は、所望により、他の非天然型塩基を含むデオキシヌクレオシド若しくはその誘導体、又は蛍光色素、ビオチン若しくはジコギシゲニンなどの標識分子のような他の成分を含んでもよい。

[0143] 本工程は、前記基質と、所望により、アセトニトリル又はN,N-ジメチルホルムアミドのような媒体と、テトラゾール、テトラゾール誘導体又は4,5-ジシアノイミダゾールのような活性化剤とを接触させることにより、実施することができる。この場合、本工程は、上記で説明したDNA合成条件下で実施すればよい。

[0144] 上記の条件で本工程を実施することにより、式Iで表されるオリゴデオキシヌクレオチドを高収率で得ることが可能となる。

[0145] <4. 二本鎖DNAの連結方法>

本発明の方法により、低コスト且つ簡単な実験操作でDNA鎖の切断を行い、結果として生じた末端がリン酸化されたオリゴデオキシヌクレオチドを得ることができる。それ故、本発明はまた、式I：



[式中、A、B、C及びnは、上記で定義したのと同様の意味を表し、nが1のとき、Aの3'末端とBの5'位とは、ホスホジエステル結合で連結されており、

Bの3'位とCの5'末端とは、ホスホジエステル結合で連結されており、

BとCとの間のホスホジエステル結合は、求核剤の攻撃によって誘発されるEの脱離に伴って、Cの5'末端がリン酸化されたオリゴデオキシヌクレオチド部分がBの3'位から脱離することによって切断される]

で表されるオリゴデオキシヌクレオチドをプライマーとして用いて、直鎖状

二本鎖DNA断片を増幅するDNA断片増幅工程；

求核剤と、増幅された直鎖状二本鎖DNA断片とを接触させることによって、BとCとの間のホスホジエステル結合が、Cの5'末端がリン酸化されたオリゴデオキシヌクレオチド部分がBの3'位から脱離することによって切断されて、直鎖状二本鎖DNA断片に含まれる前記Cの5'末端がリン酸化されており、且つ式Iで表されるプライマー部分の少なくとも一部と相補的な配列を含む3'突出末端を有する直鎖状二本鎖DNA断片を形成させる、3'突出末端形成工程；並びに

前記3'突出末端を有する直鎖状二本鎖DNA断片と、別の二本鎖DNA断片とを連結する連結工程；

を含む、二本鎖DNAの連結方法に関する。

[0146] DNA断片増幅工程において、直鎖状二本鎖DNA断片を増幅する手段としては、限定するものではないが、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を挙げることができる。この場合、本工程は、上記で説明したDNA複製条件下で実施すればよい。また、式Iで表されるオリゴデオキシヌクレオチドにおいて、オリゴデオキシヌクレオチドCは、ポリメラーゼ連鎖反応の標的となる鋳型DNAの少なくとも一部と相補的な塩基配列を有すればよい。

[0147] 3'突出末端形成工程において使用される求核剤、及び本工程の具体的な反応条件としては、5'末端リン酸化オリゴデオキシヌクレオチド形成工程に関して上記で説明した条件を適用することが好ましい。

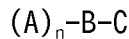
[0148] 本発明の方法は、タイプIIの制限酵素を用いる方法と比較して、切断するDNA断片中の制限酵素認識配列の有無を考慮せずにDNAを切断でき、且つ突出末端の突出部分の長さ及び配列を任意に設定できるという利点を有する。それ故、本発明の方法で製造された3'突出末端を有する直鎖状二本鎖DNA断片は、DNA連結酵素を用いる連結の際に、タイプIIの制限酵素を用いて製造されたDNA断片と比較して高い連結効率を発揮することが可能となる。

[0149] <5. オリゴデオキシヌクレオチドの製造方法に使用するためのキット>

本発明の方法により、5'末端がリン酸化されたオリゴデオキシヌクレオチ

ドC及び／又は式IIaで表される3'末端がリン酸化されたオリゴデオキシヌクレオチドを得ることができる。それ故、本発明はまた、上記で説明した本発明のオリゴデオキシヌクレオチドの製造方法又は二本鎖DNAの連結方法に使用するためのキットに関する。

[0150] 前記キットは、式I：



で表されるオリゴデオキシヌクレオチド、又は求核剤によって脱離可能な部分Eを有する、非天然型塩基を含むデオキシヌクレオシドB若しくはその誘導体を少なくとも含む。

[0151] 式Iにおいて、A、B及びCは、上記と同様の意味であり、
nは0又は1である。

[0152] また、前記キットは、式Iで表されるオリゴデオキシヌクレオチド又は非天然型塩基を含むデオキシヌクレオシドB若しくはその誘導体に加えて、アデニン、チミン、グアニン及びシトシンからなる群より選択される天然型塩基を含む1個以上のデオキシヌクレオシド又はその誘導体、求核剤、媒体、触媒、DNA連結酵素（リガーゼ）及び使用説明書からなる群より選択される1個以上のさらなる要素を含んでもよい。ここで、前記求核剤、媒体、触媒及びDNA連結酵素は、上記で説明した本発明の方法に使用し得るものの中から適宜選択することができる。上記の要素を含むことにより、前記キットを用いて本発明のオリゴデオキシヌクレオチドの製造方法を実施することが可能となる。

[0153] 本発明のキットは、必ずしも上記の要素が一体化された形態で提供される必要はなく、該要素が別々に包装された形態で提供されてもよい。いずれの形態も前記キットに包含されるものとする。

[0154] 上記の特徴を有するキットを用いることにより、本発明のオリゴデオキシヌクレオチドの製造方法を実施して、低コスト且つ簡単な実験操作で5'末端がリン酸化されたオリゴデオキシヌクレオチドC及び／又は式IIaで表される3'末端がリン酸化されたオリゴデオキシヌクレオチドを得ることが可能となる。

[0155] 以上詳細に説明したように、本発明により、化学反応によって低コスト且つ簡単な実験操作でDNA鎖の切断を行い、さらにポリヌクレオチドキナーゼのような酵素法又はリン酸化アミダイトを用いる合成DNAの末端リン酸化法と比較してより高収率で末端のリン酸化を行うことが可能となる。

実施例

[0156] 以下、実施例を用いて本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明の技術的範囲はこれら実施例に限定されるものではない。

[0157] <1. 有機合成及びDNA合成の試薬並びに機器>

有機合成及び／又はDNA合成のための試薬は、Sigma-Aldrich、和光純薬、東京化成、ナカライテスク又はグレンリサーチより購入した。合成反応に用いた溶媒は無水のものを使用した。合成反応は窒素雰囲気下で行った。合成した化合物の精製で使用したシリカゲルはワコーゲルC-200（和光純薬）を使用した。DNAの精製にはギルソン社製のHPLCシステムを使用した。逆相カラムはケムコ社のケムコボンD5-ODS-H（10×150 mm）を使用した。NMRスペクトルは日本電子社製のJNM-ECS400を使用して測定した。¹H-NMRのケミカルシフトは、DMSO-d₆の残留プロトンのケミカルシフト（2.49 ppm）を基準としてppm単位で記載した。HRMSスペクトルは、ウォータース社製のSYNAPT G2 MSを使用して測定した。MALDI TOF-MSスペクトルは、島津製作所社製のAXIMA Assuranceを使用して測定した。

[0158] <2. 合成例1：5-フェニルエチニル-2'-デオキシウリジンを含むDNAオリゴマー>

[合成例1-1：5-フェニルエチニル-2'-デオキシウリジンの合成]

3.54 g(10.0 mmol)の5-ヨード-2'-デオキシウリジン(分子量354.10)と1.16 g(2.00 mmol)のPd(PPh₃)₄(分子量1155.56)と190 mg(1.00 mmol)のCuI(分子量190.45)とを撹拌子とともにナスフラスコに入れ、そこへ20 mLのDMFと2.78 mL(20.0 mmol)のEt₃N(分子量101.19, 比重0.73 g/mL)と2.52 mL(23.0 mmol)のエチニルベンゼン(分子量102.13, 比重0.93 g/mL)とを加え、窒素雰囲気下、80℃で加熱しながら1時間撹拌した。溶媒を減圧留去し、シリカゲルカラム

で目的物質を精製した（展開溶媒は2～10% MeOH/AcOEt）。目的のフラクションの溶媒を減圧留去し、少量のメタノールに溶かし、約200 mLの酢酸エチルを加え、減圧下で溶液を濃縮し、生じた白色沈殿をろ過、真空ポンプで乾燥することにより2.02 g(6.15 mmol, 収率61.5%)の目的物質(分子量328.32)を白色粉末として得た。

[0159] 得られた物質の¹H NMRスペクトルを測定したところ、非特許文献19 (Cho, J. H. ら, Eur. J. Org. Chem. 2010年, p. 3678-3683) に記載の¹H NMRスペクトルデータとほぼ一致した。

[0160] ¹H NMR(400 MHz, DMSO-d₆) δ 11.67 (s, 1H), 8.37 (s, 1H), 7.47-7.38 (m, 5H), 6.12 (t, J = 6.6 Hz, 1H), 5.25 (d, J = 4.1 Hz, 1H), 5.15 (t, J = 4.8 Hz, 1H), 4.26-4.24 (m, 1H), 3.81-3.79 (m, 1H), 3.64-3.58 (m, 2H), 2.18-2.14 (m, 2H).

[合成例1-2 : 5-フェニルエチニル-5'-O-ジメトキシトリチル-2'-デオキシウリジンの合成]

656 mg(2.00 mmol)の5-フェニルエチニル-2'-デオキシウリジン(分子量328.32)と813 mg(4.00 mmol)のDMTrCl(分子量338.83)とをナスフラスコに入れ、そこへ10 mLのピリジンを加え、室温で1時間攪拌した。約2 mLのメタノールを加え、反応を停止させ、溶媒を減圧留去した。シリカゲルカラムで目的物質を精製した（展開溶媒は2～5% MeOH, 2% Et₃N/CH₂Cl₂）。目的のフラクションの溶媒を減圧留去し、真空ポンプで乾燥した。少量の塩化メチレンに溶かし、約400 mLのヘキサンを加え、生じた白色沈殿をろ過、真空ポンプで乾燥することにより1.20 g (1.64 mmol, 収率82.0%) の目的物質(分子量731.88 (トリエチルアミン一分子を含む))を白色粉末として得た。

[0161] 得られた物質の¹H NMRスペクトルを測定したところ、一分子のトリエチルアミンが残った点を除いて、非特許文献24 (Rospigliosi, A. ら, Langmuir 2007年, 23, 15, p. 8264-8271) に記載の¹H NMRスペクトルデータとほぼ一致した。

[0162] ¹H NMR(400 MHz, DMSO-d₆) δ 11.75 (s, 1H), 8.06 (s, 1H), 7.41-7.39 (m

, 2H), 7.33–7.26 (m, 9H), 7.16–7.10 (m, 3H), 6.84–6.80 (m, 4H), 6.14 (t, $J = 6.9$ Hz, 1H), 5.40 (d, $J = 4.1$ Hz, 1H), 4.34–4.28 (m, 1H), 3.98–3.95 (m, 1H), 3.644 (s, 3H), 3.640 (s, 3H), 3.24–3.14 (m, 2H), 3.04–3.03 (m, 6H), 2.32–2.21 (m, 2H), 1.19 (t, $J = 7.3$ Hz, 9H).

[合成例1-3 : 5-フェニルエチニル-5'-0-ジメトキシトリチル-2'-デオキシウリジン-3'-N,N-ジイソプロピル(シアノエチル)ホスホロアミダイトの合成]

366 mg(0.500 mmol)の5-フェニルエチニル-5'-0-ジメトキシトリチル-2'-デオキシウリジン(分子量731.88(トリエチルアミン一分子を含む))をナスフラスコに入れ、5 mLの CH_3CN と261 μL (1.50 mmol)のN,N-ジイソプロピルエチルアミン(分子量129.25, 比重0.742 g/mL)を加え、攪拌し、さらに223 μL (1.00 mmol)の2-シアノエチル N,N,N',N'-テトライソプロピルホスホロアミダイト(分子量236.68, 比重1.061 g/mL)を加え、室温で30分間攪拌した。25 mLのAcOEtと25 mLの飽和食塩水とを加え、分液し、有機層をさらに2回飽和食塩水で洗った。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、フィルターでろ過し、ろ液の溶媒を減圧留去した。アセトニトリルで3回共沸した後、10 mLのアセトニトリルを加えた。溶液を0.45 μm のフィルターに通し、少量のモレキュラーシーブを加えた。DNA自動合成機に取り付けてDNA合成に使用した。

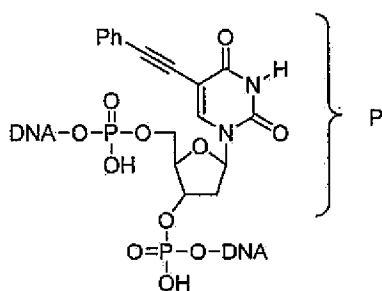
[0163] [合成例1-4 : 5-フェニルエチニル-2'-デオキシウリジンを含むDNAオリゴマーの合成]

チミジン誘導体のカップリング時間を30分に伸ばした以外は通常のDNA自動合成機のDNA合成のプロトコールで、1 μmol スケールでホスホロアミダイト法により合成した (Synthetic strategies and parameters involved in the synthesis of oligodeoxyribonucleotides according to the phosphoramidite method. Beaucage, S. L. 及び Caruthers, M. H. Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry UNIT 3.3)。担体からの切り出しは28%アンモニア水で行った。脱保護はDNAオリゴマーを切り出した後、室温で16時間静置することにより行った。脱保護後、アンモニアを遠心濃縮装置により減圧留去し、D

NAを含む溶液を $0.45\mu\text{m}$ のフィルターに通した後、逆相HPLCにより10分付近の保持時間に溶出されたメインピークを精製し(0-50% CH_3CN /50 mM ギ酸アンモニウム水溶液, 20分, 254 nmで検出)、遠心濃縮装置と凍結乾燥によりギ酸アンモニウムと溶媒とを留去した。得られたDNAオリゴマーはMALDI TOF-MS測定により同定した。合成したDNAオリゴマーは、約 $500\mu\text{L}$ の蒸留水を加えて水溶液とした。

[0164] 以下において、5-フェニルエチニル-2'-デオキシウリジン：

[化17]



[0165] を「P」で示す。

[0166] 合成したDNAオリゴマーの逆相HPLCクロマトグラムを図2～7に示す。

[0167] 合成したDNAオリゴマーの上記逆相HPLCにおける保持時間は以下の通りである。

[0168] 5'-TTTTCTTPTCCTTTT-3' について10.9分 (配列番号1)

5'-TTTTTPTTTTTT-3' について11.0分 (配列番号2)

5'-TTTTTAPATTTTT-3' について10.9分 (配列番号3)

5'-TTTTTCPCCTTTTT-3' について10.8分 (配列番号4)

5'-TTTTTGPGTTTTT-3' について10.6分 (配列番号5)

5'-CGCAATPTAACGC-3' について10.0分 (配列番号6)

合成したDNAオリゴマーのMALDI TOF-MSのデータは以下の通りである。

[0169] 5'-TTTTCTTPTCCTTTT-3' について分子式 $\text{C}_{154}\text{H}_{195}\text{N}_{33}\text{O}_{100}\text{P}_{14}$ 、 $[\text{M}-\text{H}]^-$ の計算値 4541.0、実測値 4541.9 (配列番号1)

5'-TTTTTPTTTTTT-3' について分子式 $\text{C}_{137}\text{H}_{172}\text{N}_{26}\text{O}_{89}\text{P}_{12}$ 、 $[\text{M}-\text{H}]^-$ の計算値 3977.6、実測値 3978.0 (配列番号2)

5' -TTTTTAPATTTTT-3' について分子式 $C_{137}H_{170}N_{32}O_{85}P_{12}$ 、 $[M-H]^-$ の計算値 3995.

7、実測値 3996.3 (配列番号3)

5' -TTTTTCPCCTTTTT-3' について分子式 $C_{135}H_{170}N_{28}O_{87}P_{12}$ 、 $[M-H]^-$ の計算値 3947.

6、実測値 3948.4 (配列番号4)

5' -TTTTTGPGTTTTT-3' について分子式 $C_{137}H_{170}N_{32}O_{87}P_{12}$ 、 $[M-H]^-$ の計算値 4027.

7、実測値 4028.2 (配列番号5)

5' -CGCAATPTAACGC-3' について分子式 $C_{133}H_{162}N_{48}O_{75}P_{12}$ 、 $[M-H]^-$ の計算値 4003.

7、実測値 4004.7 (配列番号6)

<3. 使用例1: 5-フェニルエチニル-2' -デオキシウリジンを含むDNAオリゴマー>

[使用例1-1: DNAオリゴマーの濃度決定]

DNAの濃度決定は、5' -TTTTCTTPTCCTTTT-3' について、DNAの水溶液10 μ Lを10 μ Lの酵素分解溶液 (子ウシ腸由来アルカリホスファターゼ (100 U/mL) とP1ヌクレアーゼ (100 U/mL)とを含む水溶液) と混合して、室温で12時間放置してデオキシヌクレオシドに分解したものを、逆相HPLC (3-20% CH_3CN /50 mMギ酸アンモニウム水溶液, 20分, 254 nmで検出)により定量することによって行った。この結果より、5' -TTTTCTTPTCCTTTT-3' の260 nmのモル吸光定数は119,000と計算された。この値は、5' -TTTTCTTTTCCTTTT-3' の260 nmにおけるモル吸光定数の計算値である119,400と非常に近い値であったので (Predicting ultraviolet spectrum of single and double stranded deoxyribonucleic acids. Tataurov, A. V., You, Y.及びOwczarzy, R. Biophys. Chem. 2008, 133, 66-70)、Pを一つ含むDNAオリゴマーの260 nmにおけるモル吸光係数は、PをTに置換して計算したDNAのモル吸光係数に近い値であることが示唆された。よって、本実施例では、DNAオリゴマーを希釈して260 nmの吸光度を測定し、PをTに置換して計算した260 nmにおけるモル吸光係数を用いて (Predicting ultraviolet spectrum of single and double stranded deoxyribonucleic acids. Tataurov, A. V., You, Y.及びOwczarzy, R. Biophys. Chem. 2008, 133, 66-70)、元のDNAオリゴマーの濃度を決定した。

[0170] PをTに置換した場合の260 nmにおける各DNAオリゴマーのモル吸光定数 ϵ は以下の通りである。

[0171] 5' -TTTTCTTPTCCTTTT-3' について $\epsilon = 119,400$

5' -TTTTTPTTTTTT-3' について $\epsilon = 105,900$

5' -TTTTTAPATTTTT-3' について $\epsilon = 117,700$

5' -TTTTTCPCCTTTTT-3' について $\epsilon = 104,100$

5' -TTTTTGPGTTTTT-3' について $\epsilon = 111,000$

5' -CGCAATPTAACGC-3' について $\epsilon = 122,700$

[使用例1-2 : 5-フェニルエチニル-2' -デオキシウリジンを含むDNAオリゴマーの切断反応]

一般的な方法では、DNA水溶液に等体積の一級アミンを加え、密閉状態で70℃に加熱すると、DNAオリゴマーは切断される。ここで、使用される一級アミンが異なると、切断反応の速度及び切断で生じる一方のDNA断片が異なる。切断で生じる2つのDNA断片のうち、3' -末端を新たに生じるDNA断片には使用されるアミンが付加するので、使用される一級アミンにより生成するDNA断片は異なる。このDNA断片がさらに分解されて3' -リン酸末端になる場合があるが、その場合、使用される一級アミンに依らず、同一のDNA断片が生じる。切断で生じる2つのDNA断片のうち、5' -リン酸末端を新たに生じるDNA断片については、原料DNAオリゴマーが同じ場合、使用される一級アミンに依らず同じDNA断片が生じる。具体的な一級アミンの反応については以下に示した。

[0172] [使用例1-3 : メチルアミンによる5-フェニルエチニル-2' -デオキシウリジンを含むDNAオリゴマーの切断反応及び生成物の同定]

スクリーチューブに30 μ Lの5' -TTTTCTTPTCCTTTT-3' の水溶液(ストランド濃度 500 μ M)と30 μ Lのメチルアミン (40% 水溶液) とを加え、水浴中で70℃、12時間加熱した。反応後は、メチルアミンを遠心濃縮装置で減圧留去し、逆相HPLCにより分析して生成物を分取した(0-50% CH₃CN/50 mM ギ酸アンモニウム水溶液, 20分, 254 nmで検出)。分取した生成物は、MALDI TOF-MSにより分子量を測定した。さらに生成物の一部について、酵素分解して得られた

デオキシヌクレオシドの比を求めた。pTCCTTTTに関しては、アルカリホスファターゼ処理した生成物の逆相HPLCにおける保持時間が、別途合成したTCCTTTTと一致し、MALDI TOF-MS測定による分子量も一致することを確認した。DNAオリゴマーの脱塩が不十分でギ酸アンモニウムがDNAオリゴマーに含まれている場合は、生成物2の一部がさらに分解して3'-リン酸末端となる場合がある。

[0173] 合成したDNAオリゴマーの反応前後の逆相HPLCクロマトグラムを図8に示す。

[0174] 生成物1及び2のMALDI TOF-MSのデータは以下の通りである。以下において、「R^{Nu}」は、切断反応に伴って生成するP由来の部分の意味する。

[0175] 生成物1 : pTCCTTTT 分子式C₆₈H₉₁N₁₆O₄₈P₇ FW 2117.3 [M-H]⁻ 2116.3 実測値 2116.4

生成物2 : TTTTCTTpR^{Nu} 分子式C₇₅H₁₀₃N₁₆O₅₁P₇ FW 2261.5 [M-H]⁻ 2260.5 実測値 2262.2

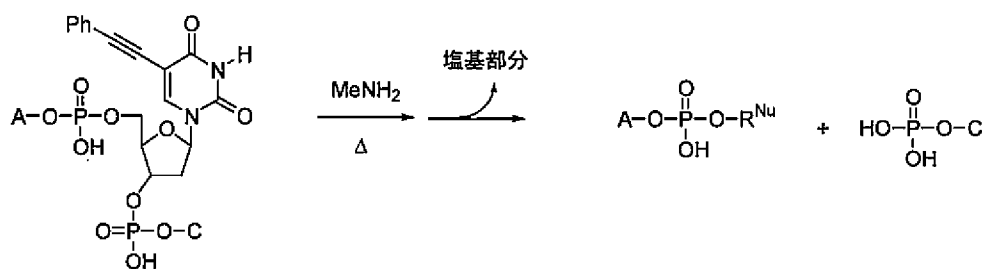
DNAオリゴマーを分解して生じるデオキシヌクレオシドの比は以下の通りである。

[0176] 生成物1 : dC:dT = 2:5

生成物2 : dC:dT = 1:6

メチルアミンによるDNAオリゴマーの分解反応を下記に示す。下記反応式において、左側の生成物が生成物2に、右側の生成物が生成物1に、それぞれ対応する。

[化18]



[0177] 前記の反応式において、A及びCは、上記で定義された式Iと同様の意味であ

る。生成物の分子量より、 R_{Nu} は、分解したヌクレオチドに求核剤が一分子付加して非天然型塩基が除去されてできたものと予想される。

[0178] [使用例1-4：メチルアミン、エチレンジアミン又は2-アミノエタノールによる5-フェニルエチニル-2'-デオキシウリジンを含むDNAオリゴマーの切断反応速度の比較]

スクリーチューブに30 μ Lの5'-TTTTCTTPTCCTTTT-3'の水溶液(ストランド濃度 500 μ M)と30 μ Lの一級アミン(メチルアミン、エチレンジアミン又は2-アミノエタノール)を加え、水浴中で70°C、1時間加熱した。反応混合物を酢酸で中和し、逆相HPLCにより分析した(0-50% CH_3CN /50 mM ギ酸アンモニウム水溶液, 20分, 254 nmで検出)。各反応混合物のHPLCクロマトグラムを図9に示す。

[0179] 5'-TCCTTTT-3'の260 nmにおけるモル吸光係数 $\epsilon=55,500$ 、5'-TTTTCTTTTCTTTT-3'の260 nmにおけるモル吸光係数 $\epsilon=119,400$ を利用して、HPLCクロマトグラム上のピーク面積に基づき定量したところ、メチルアミンを用いて得られた反応混合物における原料消失は24%、エチレンジアミンを用いて得られた反応混合物における原料消失は76%、そして2-アミノエタノールを用いて得られた反応混合物における原料消失は31%と計算された。この結果より、メチルアミン、エチレンジアミン又は2-アミノエタノールの一級アミンを用いるDNAオリゴマーの切断反応において、最も反応速度の速いものはエチレンジアミンを用いる切断反応であることが示唆された。

[0180] [使用例1-5：エチレンジアミンによる5-フェニルエチニル-2'-デオキシウリジンを含むさまざまな配列を有するDNAオリゴマーの切断反応及び生成物の同定]

スクリーチューブに30 μ LのDNAオリゴマー水溶液(ストランド濃度 500 μ M)と30 μ Lのエチレンジアミン(無水)とを加え、水浴中で70°C、3時間加熱した。反応混合物を酢酸で中和し、逆相HPLCにより分析し、生成物を分取した(0-50% CH_3CN /50 mM ギ酸アンモニウム水溶液, 20分, 254 nmで検出)。分取した生成物は、MALDI TOF-MSにより分子量を測定した。

[0181] 合成した各DNAオリゴマーの反応前後の逆相HPLCクロマトグラムを図10～15に示す。

[0182] 各DNAオリゴマーにおける生成物1及び2のMALDI TOF-MSのデータは以下の通りである。以下において、「R^{Nu}」は、切断反応に伴って生成するP由来の部分を意味する。

[0183] 5' -TTTTCTTPTCCTTTT-3' について

生成物1 : pTCCTTTT 分子式 $C_{68}H_{91}N_{16}O_{48}P_7$ FW 2117.3 [M-H]⁻ 2116.3 実測値 2116.4

生成物2 : TTTTCTTpR^{Nu} 分子式 $C_{76}H_{106}N_{17}O_{51}P_7$ FW 2290.6 [M-H]⁻ 2289.5 実測値 2290.4

5' -TTTTTPTTTTTT-3' について

生成物1 : pTTTTTT 分子式 $C_{60}H_{80}N_{12}O_{43}P_6$ FW 1843.2 [M-H]⁻ 1842.2 実測値 1842.3

生成物2 : TTTTTTpR^{Nu} 分子式 $C_{67}H_{94}N_{14}O_{45}P_6$ FW 2001.4 [M-H]⁻ 2000.4 実測値 2000.3

5' -TTTTTAPATTTTTT-3' について

生成物1 : pATTTTT 分子式 $C_{60}H_{79}N_{15}O_{41}P_6$ FW 1852.2 [M-H]⁻ 1851.2 実測値 1851.0

生成物2 : TTTTTApR^{Nu} 分子式 $C_{67}H_{93}N_{17}O_{43}P_6$ FW 2010.4 [M-H]⁻ 2009.4 実測値 2009.2

5' -TTTTTCPCTTTTT-3' について

生成物1 : pCTTTTT 分子式 $C_{59}H_{79}N_{13}O_{42}P_6$ FW 1828.2 [M-H]⁻ 1827.2 実測値 1826.9

生成物2 : TTTTTCpR^{Nu} 分子式 $C_{66}H_{93}N_{15}O_{44}P_6$ FW 1986.4 [M-H]⁻ 1985.4 実測値 1985.5

5' -TTTTTGPGTTTTT-3' について

生成物1 : pGTTTTT 分子式 $C_{60}H_{79}N_{15}O_{42}P_6$ FW 1868.2 [M-H]⁻ 1867.2 実測値 1867.2

生成物2 : TTTTGTpR^{Nu} 分子式C₆₇H₉₃N₁₇O₄₄P₆ FW 2026.4 [M-H]⁻ 2025.4 実測値 2025.2

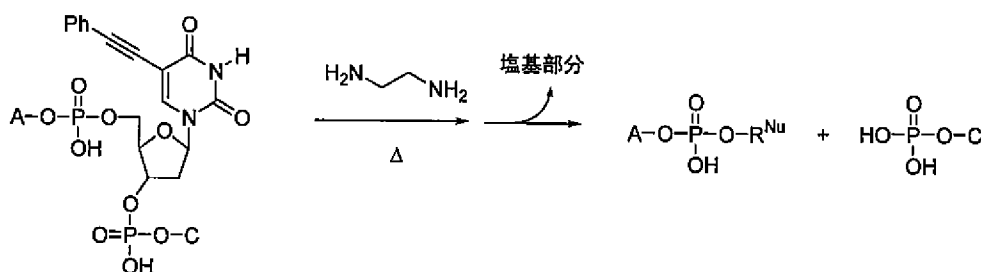
5' -CGCAATPTAACGC-3' について

生成物1 : pTAACGC 分子式C₅₈H₇₅N₂₃O₃₆P₆ FW 1856.2 [M-H]⁻ 1855.2 実測値 1855.2

生成物2 : CGCAATpR^{Nu} 分子式C₆₅H₈₉N₂₅O₃₈P₆ FW 2014.4 [M-H]⁻ 2013.4 実測値 2013.2

エチレンジアミンによるDNAオリゴマーの分解反応を下記に示す。下記反応式において、左側の生成物が生成物2に、右側の生成物が生成物1に、それぞれ対応する。

[化19]



[0184] 前記の反応式において、A及びCは、上記で定義された式Iと同様の意味である。生成物の分子量より、R^{Nu}は、分解したヌクレオチドに求核剤が一分子付加して非天然型塩基が除去されてできたものと予想される。

[0185] [使用例1-6 : 2-アミノエタノールによる5-フェニルエチニル-2' -デオキシウリジンを含むDNAオリゴマーの切断反応及び生成物の同定]

スクリーチューブに30 μLの5' -TTTTCTTPTCCTTTT-3' の水溶液(ストランド濃度 500 μM)と30 μLの2-アミノエタノール(無水)とを加え、水浴中で70 °C、12時間加熱した。反応混合物を酢酸で中和し、逆相HPLCにより分析し、生成物を分取した(0-50% CH₃CN/50 mM ギ酸アンモニウム水溶液, 20分, 254 nmで検出)。分取した生成物は、MALDI TOF-MSにより分子量を測定した。

[0186] 合成したDNAオリゴマーの反応前後の逆相HPLCクロマトグラムを図16に示す。

[0187] 生成物1、2及び3のMALDI TOF-MSのデータは以下の通りである。以下において、「R^{Nu}」は、切断反応に伴って生成するP由来の部分の意味する。

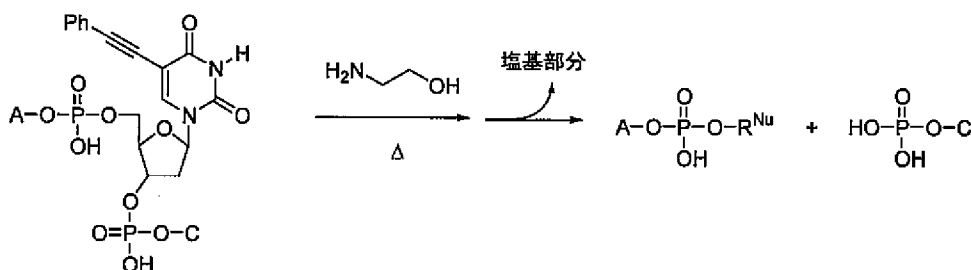
[0188] 生成物1：pTCCTTTT 分子式C₆₈H₉₁N₁₆O₄₈P₇ FW 2117.3 [M-H]⁻ 2116.3 実測値 2116.2

生成物2：TTTTCTTp 分子式C₆₉H₉₂N₁₅O₄₉P₇ FW2132.4 [M-H]⁻ 2131.3 実測値 2131.1

生成物3：TTTTCTTpR^{Nu} 分子式C₇₆H₁₀₅N₁₆O₅₂P₇ FW 2291.5 [M-H]⁻ 2290.5 実測値 2290.5

2-アミノエタノールによるDNAオリゴマーの分解反応を下記に示す。2-アミノエタノールの場合、反応混合物にギ酸アンモニウムが含まれていなくても、切断で生じる5'-末端側の生成物の一部がさらに分解して、3'-リン酸末端を形成する。下記反応式において、左側の生成物が生成物3に、右側の生成物が生成物1に、それぞれ対応する。生成物2は、生成物3から糖由来の残基部分が脱離して3'-リン酸末端を形成した化合物に対応する。

[化20]



[0189] 前記の反応式において、A及びCは、上記で定義された式Iと同様の意味である。生成物の分子量より、R^{Nu}は、分解したヌクレオチドに求核剤が一分子付加して非天然型塩基が除去されてできたものと予想される。

[0190] [使用例1-7：5-フェニルエチニル-2'-デオキシウリジンを含むDNAオリゴマーを用いる5'-リン酸化 (1)]

DNAオリゴマーの脱保護とチミジン誘導体の位置でのDNA切断反応とを同時に行った。

[0191] DNA自動合成機を用いて、5'-PTTATTGTT-3'の配列を有するDNAオリゴマー

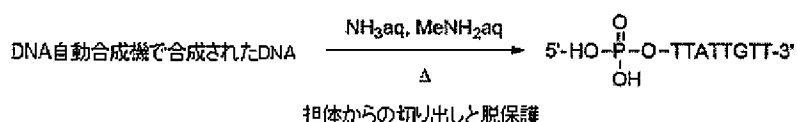
を上記と同じ方法で合成した。担体からの切り出しを28%アンモニア水と40%メチルアミン水溶液との1:1混合溶液で行った。切り出したDNAオリゴマー溶液をスクリーチューブに入れ、水浴中で70℃、16時間加熱することによって脱保護を行った。遠心濃縮装置を用いてアンモニア及びメチルアミンを減圧留去し、0.45 μmのフィルターに通した。その後、逆相HPLCによりメインピークを含むフラクションを分取し(0-50% CH₃CN/50 mM ギ酸アンモニウム水溶液, 20分, 254 nmで検出)、遠心濃縮装置及び凍結乾燥機を用いてギ酸アンモニウム及び溶媒を留去した。MALDI TOF-MS測定により、得られたDNAオリゴマーは5'-末端がリン酸化された5'-TTATTGTT-3'の分子量と一致することを確認した。得られたDNAオリゴマーの水溶液10 μLを、10 μLのアルカリホスファターゼ(子ウシ腸由来アルカリホスファターゼ(100 U/mL))と混合し、40℃で2時間加熱することにより、末端リン酸部分を除去した。生成物と5'-TTATTGTT-3'とを混合して逆相HPLCで分析したところ、両化合物は同一の保持時間を示すことが確認された。また、この生成物は、5'-TTATTGTT-3'と同一の分子量であることをMALDI TOF-MSによって確認した。

[0192] 切り出し及び脱保護後のDNAオリゴマーの逆相HPLCクロマトグラムを図17に示す。

[0193] メインピーク: 5'-pTTATTGTT-3' 分子式C₈₀H₁₀₄N₂₂O₅₄P₈ FW 2485.6 [M-H]⁻ 2484.6 実測値 2484.7

反応スキームを下記に示す。

[化21]



[0194] [使用例1-8: 5-フェニルエチニル-2'-デオキシウリジンを含むDNAオリゴマーを用いる5'-リン酸化(2)]

DNAオリゴマーの切り出し及び脱保護とチミジン誘導体の位置でのDNA切断反応とを別々に行った。

[0195] DNA自動合成機を用いて、5'-PTTATTGTT-3'の配列を有するDNAオリゴマー

を上記と同じ方法で合成した。担体からの切り出しを28%アンモニア水で行い、脱保護は室温（約25℃）で16時間静置することにより行った。遠心濃縮装置を用いてアンモニアを減圧留去し、0.45 μ mのフィルターに通した。その後、逆相HPLCによりメインピークを含むフラクションを分取し（0-50% CH₃CN/50 mM ギ酸アンモニウム水溶液, 20分, 254 nmで検出）、遠心濃縮装置及び凍結乾燥機を用いてギ酸アンモニウム及び溶媒を留去した。得られた凍結乾燥物に30 μ Lの蒸留水及び30 μ Lのエチレンジアミンを加え、水浴中で70℃、3時間加熱した。反応混合物を酢酸で中和した後、上記使用例1-7と同様の方法によりDNAオリゴマーを精製した。得られたDNAオリゴマーはMALDI TOF-MSにより同定した。得られたDNAオリゴマーの水溶液10 μ Lを、10 μ Lのアルカリホスファターゼ（子ウシ腸由来アルカリホスファターゼ（100 U/mL））と混合し、40℃で2時間加熱することにより、末端リン酸部分を除去した。生成物と5'-TTATTGTT-3' とを混合して逆相HPLCで分析したところ、両化合物は同一の保持時間を示すことが確認された。また、この生成物は、5'-TTATTGTT-3' と同一の分子量であることをMALDI TOF-MSによって確認した。

[0196] 切り出し及び脱保護後のDNAオリゴマーの逆相HPLCクロマトグラムを図18に、エチレンジアミンによる反応後のDNAオリゴマーの逆相HPLCクロマトグラムを図19に、それぞれ示す。

[0197] 切り出し及び脱保護後のDNAオリゴマー

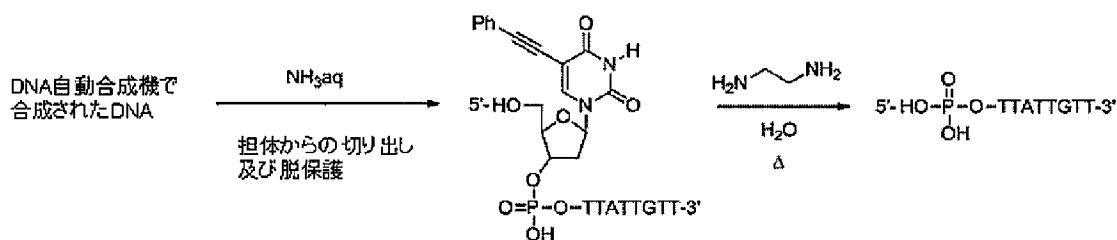
メインピーク：5'-PTTATTGTT-3' 分子式C₉₇H₁₁₈N₂₄O₅₈P₈ FW 2795.9 [M-H]⁻ 2794.9 実測値 2795.1

エチレンジアミンによる反応後のDNAオリゴマー

メインピーク：5'-PTTATTGTT-3' 分子式C₉₇H₁₁₈N₂₄O₅₈P₈ FW 2795.9 [M-H]⁻ 2794.9 実測値 2795.1

反応スキームを下記に示す。

[化22]



[0198] [使用例1-9：5-フェニルエチニル-2'-デオキシウリジンを含むDNAオリゴマーを用いる3'-リン酸化 (1)]

DNAオリゴマーの脱保護とチミジン誘導体の位置でのDNA切断反応とを同時に行った。

[0199] DNA自動合成機を用いて、5'-TTATTGTTPT-3'の配列を有するDNAオリゴマーを上記と同じ方法で合成した。担体からの切り出しを28%アンモニア水と40%メチルアミン水溶液との1:1混合溶液で行った。切り出したDNAオリゴマー溶液をスクリーチューブに入れ、水浴中で70℃、16時間加熱することによって脱保護を行った。遠心濃縮装置を用いてアンモニア及びメチルアミンを減圧留去し、0.45 μmのフィルターに通した。その後、逆相HPLCにより保持時間10分付近のピークを含むフラクションを分取し(0-50% CH₃CN/50 mM ギ酸アンモニウム水溶液, 20分, 254 nmで検出)、遠心濃縮装置及び凍結乾燥機を用いてギ酸アンモニウム及び溶媒を留去した。分取HPLCクロマトグラム上において、メインピークに近い小さなピークは、メインピークの生成物から糖に由来する部分が脱離して3'-リン酸末端になったものであった。得られたDNAオリゴマーに100 mMリン酸バッファー500 μL (pH 7)を加え、スクリーチューブに移し、120℃に設定した乾燥器中で一時間静置した。逆相HPLCによりメインピークを含むフラクションを分取し(0-50% CH₃CN/50 mM ギ酸アンモニウム水溶液, 20分, 254 nmで検出)、遠心濃縮装置及び凍結乾燥機を用いてギ酸アンモニウム及び溶媒を留去した。分取HPLCクロマトグラム上において、メインピークより少し後に溶出されたピークは、3'-末端のリン酸が脱離したものであった。MALDI TOF-MS測定により、得られたDNAオリゴマーは3'-末端がリン酸化された5'-TTATTGTT-3'の分子量と一致することを確認した。得

られたDNAオリゴマーの水溶液10 μ Lを、10 μ Lのアルカリホスファターゼ（子ウシ腸由来アルカリホスファターゼ（100 U/mL））と混合し、40℃で2時間加熱することにより、末端リン酸部分を除去した。生成物と5'-TTATTGTT-3' とを混合して逆相HPLCで分析したところ、両化合物は同一の保持時間を示すことが確認された。また、この生成物は、5'-TTATTGTT-3' と同一の分子量であることをMALDI TOF-MSによって確認した。

[0200] 切り出し及び脱保護後のDNAオリゴマーの逆相HPLCクロマトグラムを図20に、100 mMリン酸バッファー中で120℃処理後のDNAオリゴマーの逆相HPLCクロマトグラムを図21に、それぞれ示す。

[0201] 切り出し及び脱保護後のDNAオリゴマー

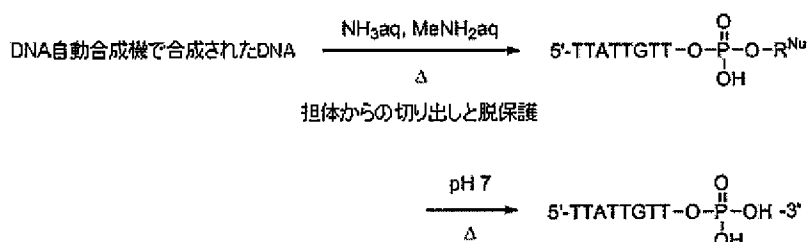
メインピーク：5'-TTATTGTTpR^{Nu}-3' 分子式C₈₆H₁₁₅N₂₃O₅₆P₈ FW 2614.7 [M-H]⁻ 2613.7 実測値 2613.4

リン酸バッファー中で120℃処理後のDNAオリゴマー

メインピーク：5'-TTATTGTTp-3' 分子式C₈₀H₁₀₄N₂₂O₅₄P₈ FW 2485.6 [M-H]⁻ 2484.6 実測値 2484.6

反応スキームを下記に示す。

[化23]



[0202] 生成物の分子量より、R^{Nu}は、分解したヌクレオチドに求核剤が一分子付加して非天然型塩基が除去されてできたものと予想される。

[0203] [使用例1-10：5-フェニルエチニル-2'-デオキシウリジンを含むDNAオリゴマーを用いる3'-リン酸化（2）]

DNAオリゴマーの切り出し及び脱保護とチミジン誘導体の位置でのDNA切断反応とを別々に行った。

[0204] DNA自動合成機を用いて、5'-TTATTGTTPT-3' の配列を有するDNAオリゴマ

一を上記と同じ方法で合成した。担体からの切り出しを28 %アンモニア水で行い、脱保護は室温（約25℃）で16時間静置することにより行った。遠心濃縮装置を用いてアンモニアを減圧留去し、0.45 μmのフィルターに通した。その後、逆相HPLCによりメインピークを含むフラクションを分取し(0-50% CH₃CN /50 mM ギ酸アンモニウム水溶液, 20分, 254 nmで検出)、遠心濃縮装置及び凍結乾燥機を用いてギ酸アンモニウム及び溶媒を留去した。得られた凍結乾燥物に30 μLの蒸留水及び30 μLのエチレンジアミンを加え、水浴中で70℃、3時間加熱した。反応混合物を酢酸で中和した後、0.45 μmのフィルターに通した。その後、逆相HPLCにより保持時間10分付近のピークを精製し(0-50% CH₃CN /50 mM ギ酸アンモニウム水溶液, 20分, 254 nmで検出)、遠心濃縮装置及び凍結乾燥機を用いてギ酸アンモニウム及び溶媒を留去した。得られた凍結乾燥物に500 μLの100 mMリン酸バッファー (pH 7) を加えた後、スクリュウチューブに移し、120℃に設定した乾燥器中で一時間静置した。逆相HPLCによりメインピークを含むフラクションを分取し(0-50% CH₃CN/50 mM ギ酸アンモニウム水溶液, 20分, 254 nmで検出)、遠心濃縮装置及び凍結乾燥機を用いてギ酸アンモニウム及び溶媒を留去した。得られたDNAオリゴマーはMALDI TOF-MSにより同定した。得られたDNAオリゴマーの水溶液10 μLを、10 μLのアルカリホスファターゼ（子ウシ腸由来アルカリホスファターゼ（100 U/mL））と混合し、40℃で2時間加熱することにより、末端リン酸部分を除去した。生成物と5' -TTATTGTT-3' とを混合して逆相HPLCで分析したところ、両化合物は同一の保持時間を示すことが確認された。また、この生成物は、5' -TTATTGTT-3' と同一の分子量であることをMALDI TOF-MSによって確認した。

[0205] 切り出し及び脱保護後のDNAオリゴマーの逆相HPLCクロマトグラムを図22に、エチレンジアミンによる反応後のDNAオリゴマーの逆相HPLCクロマトグラムを図23に、100 mMリン酸バッファー中で120℃処理後のDNAオリゴマーの逆相HPLCクロマトグラムを図24に、それぞれ示す。

[0206] 切り出し及び脱保護後のDNAオリゴマー

メインピーク : 5' -TTATTGTTPT-3' 分子式C₁₀₇H₁₃₁N₂₆O₆₅P₉ FW 3100.1 [M-H]⁻

3099.1 実測値 3099.4

エチレンジアミンによる反応後のDNAオリゴマー

メインピーク : 5' -TTATTGTTpR^{Nu}-3' 分子式C₈₇H₁₁₈N₂₄O₅₆P₈ FW 2643.8 [M-H]⁻

2642.8 実測値 2642.9

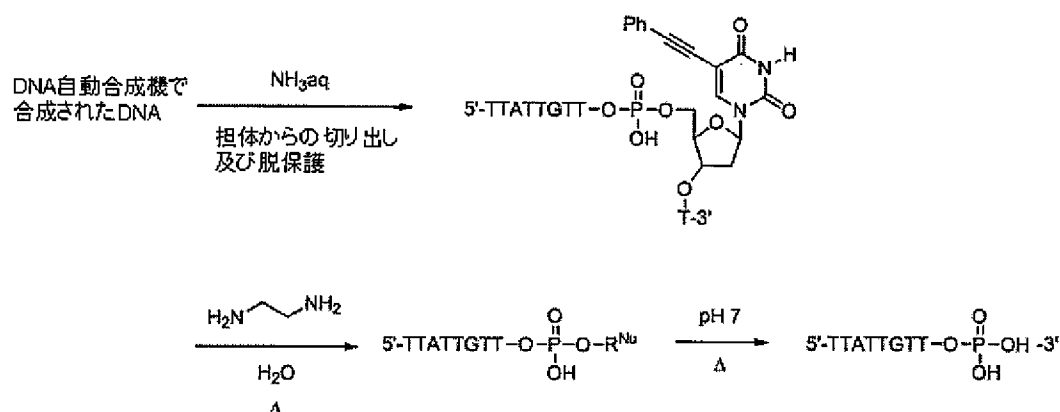
リン酸バッファー中で120℃処理後のDNAオリゴマー

メインピーク : 5' -TTATTGTTp-3' 分子式C₈₀H₁₀₄N₂₂O₅₄P₈ FW 2485.6 [M-H]⁻ 24

84.6 実測値 2484.7

反応スキームを下記に示す。

[化24]



[0207] 生成物の分子量より、R^{Nu}は、分解したヌクレオチドに求核剤が一分子付加して非天然型塩基が除去されてできたものと予想される。

[0208] [使用例1-11 : 5-フェニルエチニル-2'-デオキシウリジンを含むDNAオリゴマーを用いるDMTr ON合成]

DNA自動合成機を用いるDNAオリゴマー合成において、最後のデオキシヌクレオシドの5'-末端のDMTr基を脱保護しない条件（以下「DMTr ON」とも記載する）で合成を行った。

[0209] DNA自動合成機を用いて、5'-PTTATTGTT-3'の配列を有するDNAオリゴマーを上記と同じ方法で合成した。但し、最後のデオキシヌクレオシドの5'-末端のDMTr基は脱保護せず、「DMTr ON」の条件で合成を行った。担体からの切り出しを28%アンモニア水で行い、脱保護は室温（約25℃）で16時間静置することにより行った。遠心濃縮装置を用いてアンモニアを減圧留去し、0.45 μm

のフィルターに通した。その後、逆相HPLCによりメインピークを含むフラクションを分取し(0-50% CH₃CN/50 mM ギ酸アンモニウム水溶液, 20分, 254 nmで検出)、遠心濃縮装置及び凍結乾燥機を用いてギ酸アンモニウム及び溶媒を留去した。得られた凍結乾燥物に100 μ Lの蒸留水及び100 μ Lのエチレンジアミンを加え、水浴中で70°C、8時間加熱した。反応混合物を水で1 mLに希釈し、酢酸で中和した後、逆相HPLCによりメインピークを含むフラクションを分取し(0-50% CH₃CN/50 mM ギ酸アンモニウム水溶液, 20分, 254 nmで検出)、遠心濃縮装置及び凍結乾燥機を用いてギ酸アンモニウム及び溶媒を留去した。得られたDNAオリゴマーは、5' -末端がリン酸化された5' -TTATTGTT-3' と同一の分子量であることをMALDI TOF-MSによって確認した。

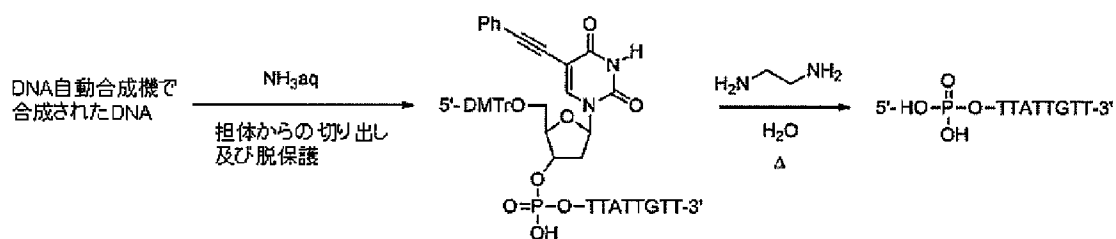
[0210] 切り出し及び脱保護後の5' -末端がDMTr保護されたDNAオリゴマーの逆相HPLCクロマトグラムを図25に、エチレンジアミンによる反応後の5' -末端がリン酸化されたDNAオリゴマーの逆相HPLCクロマトグラムを図26に、それぞれ示す。

[0211] 切り出し及び脱保護後の5' -末端がDMTr保護されたDNAオリゴマー
 メインピーク : 5' -DMTr-PTTATTGTT-3' 分子式C₁₁₈H₁₃₇N₂₄O₆₀P₈ FW 3099.3 [M-H]⁻ 3098.3 実測値 3097.7

エチレンジアミンによる反応後の5' -末端がリン酸化されたDNAオリゴマー
 メインピーク : 5' -pTTATTGTT-3' 分子式C₈₀H₁₀₄N₂₂O₅₄P₈ FW 2485.6 [M-H]⁻ 2484.6 実測値 2484.6

反応スキームを下記に示す。

[化25]



[0212] [使用例1-12 : 5-フェニルエチニル-2' -デオキシウリジンを含むDNAオリゴマーより調製された5' 末端がリン酸化されたDNAオリゴマーと別のDNAオリゴ

マーとの連結反応]

DNA自動合成機を用いて、下記の配列を有するDNAオリゴマーを上記と同じ方法で合成した。但し、TS3は、最後のデオキシヌクレオシドの5'末端のDMTr基は脱保護せず、「DMTr ON」の条件で合成を行った。5'末端及び3'末端のFAM修飾には、それぞれグレンリサーチ社の5'-フルオレセインホスホロアミダイト（カタログ番号10-5901）及び3'-(6-FAM)-CPG（カタログ番号20-2961）を使用した。TF3の5'末端へのアミノ基の導入は、非特許文献35に記載の方法に従って行った。

[0213] TS1 : 5' -FAM-ATAGTGAGTCGTATTAGGCCCGATCCAGGCCATCGCGCATGCTCAG-3'（配列番号7）

TS3 : 5' -ATAGTGAGTCGTATTAGGCCCGATCCAGGCCATCGCGCATGCTCAG-3'（配列番号8）

TF3 : 5' -NH₂-TTAACTGAGCATGCGCGATGGCCTG-3'（配列番号9）

TT1 : 5' -pGATCGGGCCTAATACGACTCACTAT-FAM-3'（配列番号10）

TT2 : 5' -pATCGGGCCTAATACGACTCACTAT-FAM-3'（配列番号11）

5'末端がリン酸化されたDNAオリゴマーであるTT1及びTT2は、以下の方法で調製した。5-フェニルエチニル-2'-デオキシウリジンをを用いて、5'-pGATCGGGCCTAATACGACTCACTAT-FAM-3'（配列番号12）及び5'-pATCGGGCCTAATACGACTCACTAT-FAM-3'（配列番号13）の配列を有するDNAオリゴマーを上記使用例1-7と同じ方法で合成した。担体からの切り出しを28%アンモニア水と40%メチルアミン水溶液との1:1混合溶液で行った。切り出したDNAオリゴマー溶液をスクリーチューブに入れ、水浴中で70℃、16時間加熱することによって脱保護を行った。遠心濃縮装置を用いてアンモニア及びメチルアミンを減圧留去し、0.45 µmのフィルターに通した。その後、逆相HPLCによりメインピークを含むフラクションを分取し（0-50% CH₃CN/50 mM ギ酸アンモニウム水溶液, 20分, 254 nmで検出）、遠心濃縮装置及び凍結乾燥機を用いてギ酸アンモニウム及び溶媒を留去した。MALDI TOF-MS測定により、得られたDNAオリゴマーは5'末端がリン酸化されたDNAオリゴマーであるTT1及びTT2の分子量とそれぞれ

れ一致することを確認した。

[0214] 切り出し及び脱保護後のTT1及びTT2の逆相HPLCクロマトグラムを図27A及びBにそれぞれ示す。

[0215] TT1 :

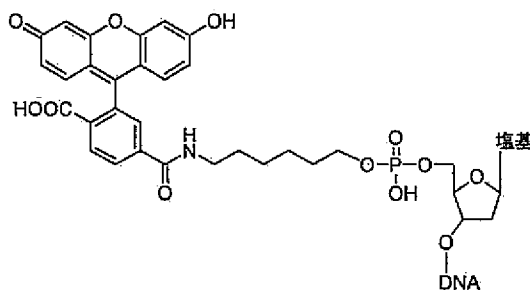
メインピーク : 5' -pGATCGGGCCTAATACGACTCACTAT-FAM-3' 分子式 $C_{270}H_{332}N_{94}O_{16}$
 ${}^1P_{26}$ FW 8275.4 [M-H]⁻8274.4 実測値 8273.7

TT2 :

メインピーク : 5' -pATCGGGCCTAATACGACTCACTAT-FAM-3' 分子式 $C_{260}H_{320}N_{89}O_{155}$
 P_{25} FW 7946.2 [M-H]⁻7945.2 実測値 7946.1

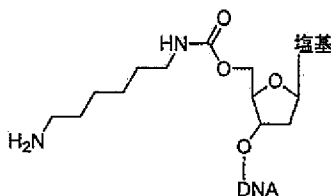
5' 末端がFAM修飾されたDNAオリゴマー（以下「5' -FAM」とも称する）の構造を下記に示す。

[化26]



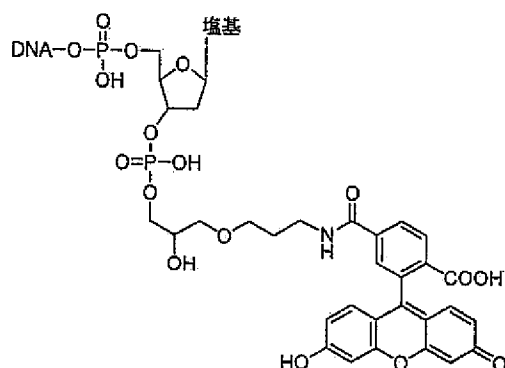
[0216] 5' 末端がアミノ基で修飾されたDNAオリゴマー（以下「5' -NH₂」とも称する）の構造を下記に示す。

[化27]



[0217] 3' 末端がFAM修飾されたDNAオリゴマー（以下「FAM-3'」とも称する）の構造を下記に示す。

[化28]



[0218] DNAオリゴマーの連結反応は、40 μ MのTF3及びTS3と、33 μ MのTT1（比較のためTT2）との混合溶液15 μ Lに対して、15 μ LのLigation high（TOYOBO社製カタログ番号LGK-101）を混合し、16°Cにおいて1時間から3時間振盪することによって行った。対照区として、TT1をTT2に変更した試料を上記と同様に反応させた。得られた反応混合物を、7 M 尿素を含む15% ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分析して、連結反応の確認を行った。各DNAオリゴマーの塩基配列及びポリアクリルアミドゲル電気泳動による分析結果を図28に示す。

[0219] 図28Bに示すように、ポリアクリルアミドゲルに紫外線を照射すると、蛍光色素FAMが蛍光を発するため、FAM修飾されたDNAオリゴマーはゲル上で白いバンドとして検出される。左から一番目のレーンのバンドは、46塩基からなるDNAオリゴマーであるTS1に、左から二番目及び六番目のレーンのバンドは、それぞれ25塩基及び24塩基からなるDNAオリゴマーであるTT1及びTT2に、それぞれ対応する。左から三番目～五番目のレーンは、TS3を鋳型としてTT1及びTF3を1、2又は3時間連結反応させて得られたDNAオリゴマーのうち、FAM修飾されたTT1由来のDNAオリゴマーのゲル上の位置を示す。これらのレーンで検出されたメインバンドの位置は、46塩基からなるTS1の位置と近いことから、連結反応混合物中ではTT1及びTF3が連結されて、50塩基からなるDNAオリゴマーが形成されたことが示唆される。

[0220] 右から一番目のレーンは、TS3を鋳型としてTT2及びTF3を3時間連結反応させて得られた対照区のDNAオリゴマーのゲル上の位置を示す。このレーンで検

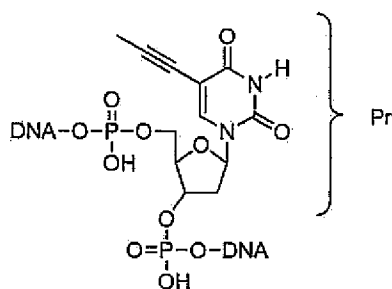
出されたメインバンドの位置は、24塩基からなる連結前のDNAオリゴマーであるTT2の位置と近いことから、TT2は、鋳型であるTS3とアニールするもののTF3とは連結されなかったことが示唆される。TT2は、TT1の5'末端が1塩基欠失した塩基配列からなるDNAオリゴマーであるため、TS3を鋳型としてTT2及びTF3をアニールさせると、TT2とTF3との間には1塩基のギャップが生じる（図28A）。このため、対照区の試料では連結反応が進行しなかったと考えられる。

[0221] <4. 合成例2：5-(1-プロピニル)-2'-デオキシウリジンを含むDNAオリゴマー>

非天然型塩基を含むデオキシヌクレオシド（5-(1-プロピニル)-2'-デオキシウリジン）のモノマーユニットであるホスホロアミダイト（非特許文献36～41）は、グレンリサーチ社より購入した（非特許文献49）。DNA自動合成機を用いて、5-(1-プロピニル)-2'-デオキシウリジンを含むDNAオリゴマーを上記と同じ方法で合成した（非特許文献42～49）。担体からの切り出しを28%アンモニア水で行い、脱保護は室温（約25℃）で16時間静置することにより行った。遠心濃縮装置を用いてアンモニアを減圧留去し、0.45 μmのフィルターに通した。その後、逆相HPLCによりメインピークを含むフラクションを分取し（0-50% CH₃CN/50 mM ギ酸アンモニウム水溶液, 20分, 254 nmで検出）、遠心濃縮装置及び凍結乾燥機を用いてギ酸アンモニウム及び溶媒を留去した。得られたDNAオリゴマーはMALDI TOF-MS測定により同定した。

[0222] 以下において、5-(1-プロピニル)-2'-デオキシウリジン：

[化29]



[0223] を「Pr」で示す。

[0224] 合成したDNAオリゴマーの逆相HPLCクロマトグラムを図29～30に示す。

[0225] 合成したDNAオリゴマーの上記逆相HPLCにおける保持時間は以下の通りである。

[0226] 5' -TTTTCTT(Pr)TCCTTTT-3' について10.5分 (配列番号14)

5' -TTTTTT(Pr)TTTTTT-3' について10.7分 (配列番号15)

合成したDNAオリゴマーのMALDI TOF-MSのデータは以下の通りである。

[0227] 5' -TTTTCTT(Pr)TCCTTTT-3' について分子式 $C_{149}H_{193}N_{33}O_{100}P_{14}$ 、 $[M-H]^-$ の計算値 4478.8、実測値 4479.4 (配列番号14)

5' -TTTTTT(Pr)TTTTTT-3' について分子式 $C_{132}H_{170}N_{26}O_{89}P_{12}$ 、 $[M-H]^-$ の計算値 3915.6、実測値 3915.8 (配列番号15)

<5. 使用例2 : 5-(1-プロピニル)-2' -デオキシウリジンを含むDNAオリゴマー>

[使用例2-1 : 5-(1-プロピニル)-2' -デオキシウリジンを含むDNAオリゴマーの切断反応]

スクリーチューブに30 μ LのDNAオリゴマー水溶液(ストランド濃度 500 μ M)と30 μ Lのエチレンジアミン(無水)とを加え、水浴中で70°C、3時間又は16時間加熱した。反応混合物を酢酸で中和し、逆相HPLCにより分析し、生成物を分取した(0-50% CH_3CN /50 mM ギ酸アンモニウム水溶液, 20分, 254 nmで検出)。分取した生成物は、MALDI TOF-MSにより分子量を測定した(16時間反応後の試料の生成物)。

[0228] 合成した各DNAオリゴマーの反応前後の逆相HPLCクロマトグラムを図31及び33に、生成物1及び他の副生成物のMALDI TOF-MSスペクトルを図32及び34に、それぞれ示す。

[0229] 各DNAオリゴマーにおける生成物1のMALDI TOF-MSのデータは以下の通りである。

[0230] 5' -TTTTCTT(Pr)TCCTTTT-3' について

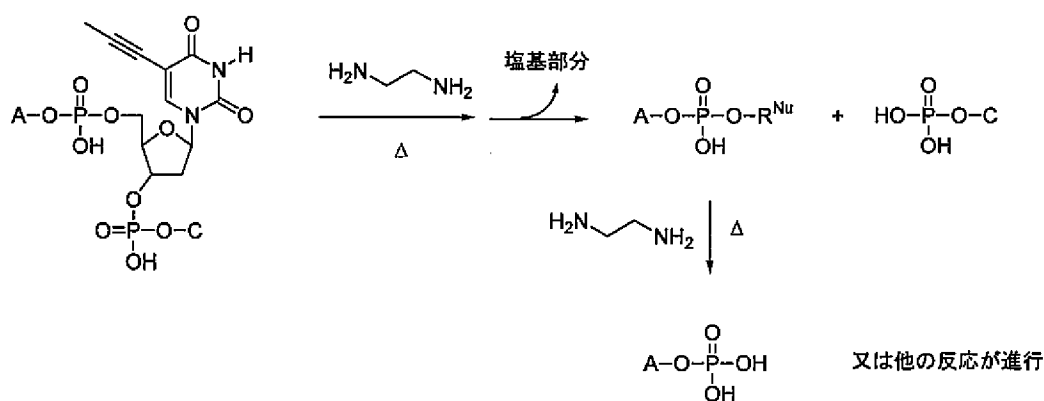
生成物1 : pTCCTTTT 分子式 $C_{68}H_{91}N_{16}O_{48}P_7$ FW 2117.3 $[M-H]^-$ 2116.3 実測値 2116.4

5' -TTTTTT(Pr)TTTTTT-3' について

生成物1 : pTTTTT 分子式 $C_{60}H_{80}N_{12}O_{43}P_6$ FW 1843.2 $[M-H]^-$ 1842.2 実測値 1841.9

エチレンジアミンによるDNAオリゴマーの分解反応を下記に示す。下記反応式において、右側の生成物が生成物1に対応する。左側の生成物は、反応時間が長くなったことに起因して、糖残基の脱離又は分子量が64増す反応が生じてさらに別の副生成物を形成したことがMALDI TOF-MSスペクトルより予想される。

[化30]



[0231] 前記の反応式において、A及びCは、上記で定義された式Iと同様の意味である。生成物の分子量より、 R^{Nu} は、分解したヌクレオチドに求核剤が一分子付加して非天然型塩基が除去されてできたものと予想される。

[0232] <6. 合成例3 : 5-エチニル-2'-デオキシウリジンを含むDNAオリゴマー>

非天然型塩基を含むデオキシヌクレオシドである5-エチニル-2'-デオキシウリジンは、抗ウイルス活性及び抗癌活性を有する公知の化合物である（非特許文献50～53）。また、当該デオキシヌクレオシドは、細胞中のDNA標識法にも用いられている（非特許文献54～63）。細胞培地に前記デオキシヌクレオシドを加えると、該デオキシヌクレオシドは、細胞のDNA中にチミジンと間違われて取り込まれる。このデオキシヌクレオシドは、エチニル基を有するため、クリックケミストリーによってアジド基を有する別の標識分子（例えば蛍光色素など）と容易にカップリングさせることができる。上記の機構により、細胞のDNA中に取り込まれた前記デオキシヌクレオシドを、蛍光色素な

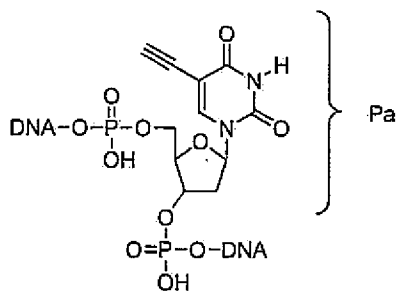
どの標識により検出することが可能となる。或いは、ラマン分光を利用することにより、上記のような標識反応を行うことなく前記デオキシヌクレオシドを検出することもできる。それ故、生細胞中でも当該デオキシヌクレオシドをモニターすることが可能となる（非特許文献64）。

[0233] 5-エチニル-2'-デオキシウリジンの合成は、これまでに多くの方法が報告されている（例えば、非特許文献65～67）。また、DNA自動合成機を用いて、5-エチニル-2'-デオキシウリジンを含むDNAオリゴマーを合成する方法も、すでに報告されている（非特許文献68及び69）。しかしながら、前記デオキシヌクレオシドを、DNA鎖の切断及び切断された末端のリン酸化に適用した例は存在しない。

[0234] 5-エチニル-2'-デオキシウリジンのモノマーユニットであるホスホロアミダイトは、非特許文献66及び68に記載の方法に従い合成した。DNA自動合成機を用いて、5-エチニル-2'-デオキシウリジンを含むDNAオリゴマーを合成例1-4と同じ方法で合成した（非特許文献69）。担体からの切り出し及び脱保護を、50 mM K_2CO_3 /MeOH中、室温（約25℃）で16時間静置することにより行った。DNAオリゴマーがアデニン及び／又はグアニンを含む場合、DNAオリゴマーに水を500 μ L加えた後、遠心濃縮装置を用いてメタノールを減圧留去し、さらに一体積分の28%アンモニア水を加えて攪拌して密閉し、24時間静置することによって、塩基部分を完全に脱保護することが可能である。遠心濃縮装置を用いてメタノールを減圧留去し、1 mLの蒸留水を加えた後に0.45 μ mのフィルターに通した。その後、逆相HPLCによりメインピークを含むフラクションを分取し（0-50% CH_3CN /50 mM ギ酸アンモニウム水溶液, 20分, 254 nmで検出）、遠心濃縮装置及び凍結乾燥機を用いてギ酸アンモニウム及び溶媒を留去した。得られたDNAオリゴマーはMALDI TOF-MS測定により同定した。

[0235] 以下において、5-エチニル-2'-デオキシウリジン：

[化31]



[0236] を「Pa」で示す。

[0237] 合成したDNAオリゴマーの逆相HPLCクロマトグラムを図35及び36に示す。

[0238] 合成したDNAオリゴマーの上記逆相HPLCにおける保持時間は以下の通りである。

[0239] 5' -TTTTCTT(Pa)TCCTTTT-3' について10.4分（配列番号16）

5' -TTTTTT(Pa)TTTTTT-3' について10.7分（配列番号17）

合成したDNAオリゴマーのMALDI TOF-MSのデータは以下の通りである。

[0240] 5' -TTTTCTT(Pa)TCCTTTT-3' について分子式 $C_{148}H_{191}N_{33}O_{100}P_{14}$ 、 $[M-H]^-$ の計算値 4464.9、実測値 4465.3（配列番号16）

5' -TTTTTT(Pa)TTTTTT-3' について分子式 $C_{131}H_{168}N_{26}O_{89}P_{12}$ 、 $[M-H]^-$ の計算値 3901.5、実測値 3901.8（配列番号17）

<7. 使用例3：5-エチニル-2'-デオキシウリジンを含むDNAオリゴマー>

[使用例3-1：5-エチニル-2'-デオキシウリジンを含むDNAオリゴマーの切断反応]

スクリーチューブに30 μ LのDNAオリゴマー水溶液（ストランド濃度 500 μ M）と30 μ Lのメチルアミン（40% 水溶液）とを加え、水浴中で70℃、10分間又は30分間加熱した。遠心濃縮装置を用いて反応混合物からメチルアミンを減圧留去し、該反応混合物を逆相HPLCにより分析し、生成物を分取した（0-50% CH_3CN /50 mM ギ酸アンモニウム水溶液，20分，254 nmで検出）。分取した生成物は、MALDI TOF-MSにより分子量を測定した（30分間反応後の試料の生成物）。

[0241] 合成した各DNAオリゴマーの反応前後の逆相HPLCクロマトグラムを図37及び

38に、それぞれ示す。

[0242] 各DNAオリゴマーにおける生成物1のMALDI TOF-MSのデータは以下の通りである。

[0243] 5' -TTTTCTT(Pa)TCCTTTT-3' について

生成物1 : pTCCTTTT 分子式 $C_{68}H_{91}N_{16}O_{48}P_7$ FW 2117.3 [M-H]⁻ 2116.3 実測値 2116.2

生成物2 : TTTTCTTR^{Nu} 分子式 $C_{75}H_{103}N_{16}O_{51}P_7$ FW 2261.5 [M-H]⁻ 2260.5 実測値 2260.6

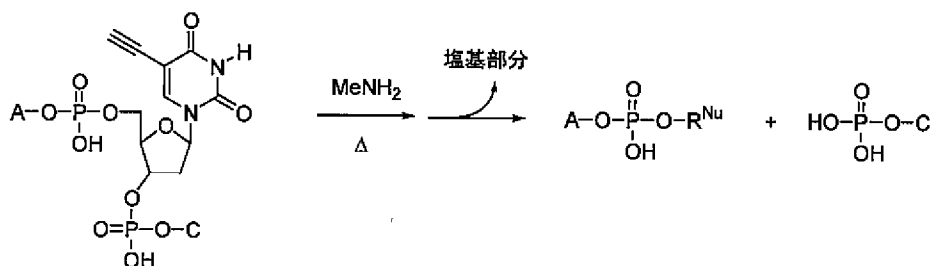
5' -TTTTTT(Pa)TTTTTT-3' について

生成物1 : pTTTTTT 分子式 $C_{60}H_{80}N_{12}O_{43}P_6$ FW 1843.2 [M-H]⁻ 1842.2 実測値 1841.8

生成物2 : TTTTTTR^{Nu} 分子式 $C_{66}H_{91}N_{13}O_{45}P_6$ FW 1972.3 [M-H]⁻ 1971.3 実測値 1971.3

メチルアミンによるDNAオリゴマーの分解反応を下記に示す。下記反応式において、右側の生成物が生成物1に、左側の生成物が生成物2にそれぞれ対応することがMALDI TOF-MSスペクトルより示された。

[化32]



[0244] 前記の反応式において、A及びCは、上記で定義された式Iと同様の意味である。生成物の分子量より、R^{Nu}は、分解したヌクレオチドに求核剤が一分子付加して非天然型塩基が除去されてできたものと予想される。

[0245] 上記のように、5-エチニル-2'-デオキシウリジンを含むDNAオリゴマーは、70°Cで30分間加熱することにより切断反応が略完結した。この結果から、5-エチニル-2'-デオキシウリジンを含むDNAオリゴマーは、5-フェニルエチニル

ル-2' -デオキシウリジンを含むDNAオリゴマー（使用例1）及び5-(1-プロピニル)-2' -デオキシウリジンを含むDNAオリゴマー（使用例2）と比較して極めて迅速に切断反応が進行することが明らかとなった。

[0246] [使用例3-2：メチルアミン又はエチレンジアミンによる5-エチニル-2' -デオキシウリジン（Pa）を含むDNAオリゴマーの25℃における切断反応速度の比較]

スクリーチューブに、200 μ Lの5' -T₆(Pa)T₆-3' の水溶液（ストランド濃度 100 μ M）と200 μ Lのメチルアミン又はエチレンジアミン（40%水溶液）とを加え、よく攪拌し、25℃で40時間静置した。メチルアミンによる反応の場合、反応後、反応溶液を加熱せずに遠心濃縮機で濃縮し、該反応溶液からメチルアミンを減圧留去した。エチレンジアミンによる反応の場合、酢酸で反応溶液を中和した。得られたそれぞれの反応混合物を、逆相HPLCにより分析した（8-20% CH₃CN/50 mM ギ酸アンモニウム水溶液，20分，254 nmで検出）。反応溶液のHPLCチャートを図39に示す。

[0247] 図39に示すように、メチルアミンによる反応の場合、保持時間8.2分及び10.3分付近に（図39A）、エチレンジアミンによる反応の場合、保持時間8.1分及び10.3分付近に（図39B）、それぞれピークが検出された。前記使用例3-1と同様のMALDI TOF-MSスペクトル測定により、これらのピークが5' -T₆(Pa)T₆-3' の切断に由来する生成物に対応することが確認された。以上の結果から、25℃においてもDNAオリゴマーの切断が進行することが確認された。

[0248] [使用例3-3：炭酸カリウム水溶液中におけるPaを含むDNAオリゴマーの切断反応と生成物の同定]

スクリーチューブに、100 μ Lの5' -T₆PaT₆-3' の水溶液（ストランド濃度 400 μ M）と100 μ Lの炭酸カリウム水溶液（1 M）とを加え、乾燥機で120℃、4時間加熱した。反応溶液を酢酸で中和した。得られた反応混合物を、逆相HPLCにより分析し、生成物を分取した（5-20% CH₃CN/50 mM ギ酸アンモニウム水溶液，20分，254 nmで検出）。DNAオリゴマーの切断反応前後のHPLCチャートを図40に示す。

[0249] 図40に示すように、前記の切断反応により、生成物1及び2が生成した。分取した生成物1及び2は、MALDI TOF-MSにより分子量を測定した。生成物1及び2のMALDI TOF-MSのデータは以下の通りである。

[0250] 生成物1 : pTTTTTT 分子式 $C_{60}H_{80}N_{12}O_{43}P_6$ FW 1843.2 $[M-H]^-$ 1842.2 実測値 1842.2

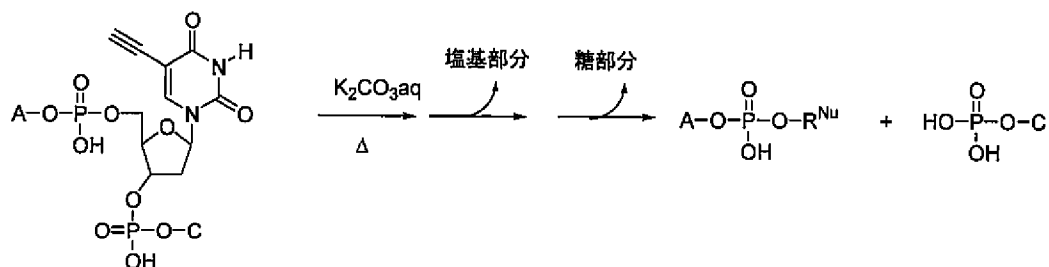
HPLCの保持時間 12.1分

生成物2 : TTTTTTp 分子式 $C_{60}H_{80}N_{12}O_{43}P_6$ FW 1843.2 $[M-H]^-$ 1842.2 実測値 1842.0

HPLCの保持時間 12.8分

炭酸カリウムによるDNAオリゴマーの分解反応を下記に示す。下記反応式において、右側の生成物が生成物1に、左側の生成物が生成物2にそれぞれ対応することがMALDI TOF-MSスペクトルより示された。

[化33]



[0251] 前記の反応式において、A及びCは、上記で定義された式Iと同様の意味である。生成物の分子量より、 R^{Nu} は、分解したヌクレオチドに求核剤が一分子付加して非天然型塩基が除去されてできたものと予想される。

[0252] 生成物1は、メチルアミンによる分解生成物との重ね打ちによるHPLC分析により、同一の保持時間を有することが確認された。本反応の求核種は、水酸化物イオンと考えられる。本反応では、非特許文献13に示されたアベシックスサイトを有するDNAの水中における分解反応と、同様の反応が起きたものと予想される。シトシンを含むDNAオリゴマーの反応では、生成物のピークが2つよりも多くなった。この結果から、アルカリ条件下で加熱することにより、シトシンのデアミネーションが起きることが示唆される。

[0253] <8. 合成例4 : 5-[(E)-2-カルバモイルビニル]-2'-デオキシウリジンを含むDNAオリゴマー>

[合成例4-1 : 5'-O-ジメトキシトリチル-5-[(E)-2-カルボメトキシビニル]-2'-デオキシウリジンの合成]

非特許文献73に従って合成した767 mg(2.46 mmol)の5-[(E)-2-カルボメトキシビニル]-2'-デオキシウリジン(分子量312.28)と1.05 g(3.10 mmol)のDMTrCl(分子量338.83)とをナスフラスコに入れ、そこへ20 mLのピリジンを加え、室温で1時間攪拌した。約2 mLのメタノールを加え、反応を停止させた後、溶媒を減圧留去した。シリカゲルカラムで目的物質を精製した(展開溶媒は2~5% MeOH, 2% Et₃N/CH₂Cl₂)。目的のフラクションの溶媒を減圧留去し、真空ポンプで乾燥した。少量の塩化メチレンに溶かし、ヘキサンを加え、溶媒を減圧留去した後、真空ポンプで乾燥することにより、1.49 g (1.94 mmol, 収率79%) の目的物質(分子量766.43トリエチルアミン1.5分子を含む)を白色粉末として得た。

[0254] ¹H NMR(400 MHz, DMSO-d₆) δ 11.70 (s, 1H), 8.01 (s, 1H), 7.39-7.36 (m, 2H), 7.29-7.15 (m, 8H), 6.86-6.81 (m, 5H), 6.15 (t, J = 6.4 Hz, 1H), 5.34 (d, J = 5.0 Hz, 1H), 4.23-4.20 (m, 1H), 3.93-3.88 (m, 1H), 3.70 (s, 1H), 3.69 (s, 1H), 3.63 (s, 1H), 3.26-3.12 (m, 2H), 3.07-2.98 (m, 9H), 2.36-2.28 (m, 1H), 2.24-2.16 (m, 1H), 1.20-1.15 (m, 13.5 H); HRMS (ESI): C₃₄H₃₄N₂O₉Naに対する計算値: 637.2157 [M+Na]⁺; 実測値: 637.2162.

[合成例4-2 : 5'-O-ジメトキシトリチル-5-[(E)-2-カルボメトキシビニル]-2'-デオキシウリジン-3'-N,N-ジイソプロピル(シアノエチル)ホスホロアミダイトの合成]

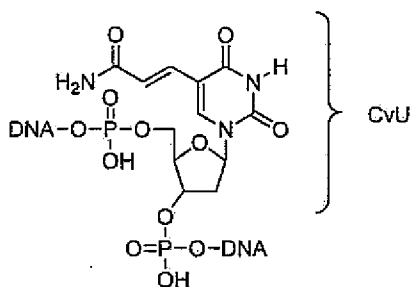
300 mg(0.391 mmol)の5'-O-ジメトキシトリチル-5-[(E)-2-カルボメトキシビニル]-2'-デオキシウリジン(分子量766.43 ; トリエチルアミン1.5分子を含む)をナスフラスコに入れ、5 mLのCH₃CNと261 μL(1.50 mmol)のN,N-ジイソプロピルエチルアミン(分子量129.25, 比重0.742 g/mL)とを加え、攪拌し、さらに223 μL(1.00 mmol)の2-シアノエチル N,N,N',N'-テトライソプロ

ピルホスホロアミダイト(分子量236.68, 比重1.061 g/mL)を加え、室温で30分間攪拌した。25 mLのAcOEtと25 mLの飽和食塩水とを加え、分液し、有機層をさらに2回飽和食塩水で洗った。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、フィルターでろ過し、ろ液の溶媒を減圧留去した。アセトニトリルで3回共沸した後、10 mLのアセトニトリルを加えた。溶液を0.45 μ mのフィルターに通し、少量のモレキュラーシーブを加えた。DNA自動合成機に取り付けてDNA合成に使用した。

[0255] [合成例4-3: 5-[(E)-2-カルバモイルビニル]-2'-デオキシウリジンを含むDNAオリゴマーの合成]

DNA自動合成機を用いて、5-[(E)-2-カルバモイルビニル]-2'-デオキシウリジンを含むDNAオリゴマーを上記と同じ方法で合成した(非特許文献70~72)。担体からの切り出しを28%アンモニア水で行い、脱保護は室温(約25°C)で16時間静置することにより行った。塩基部分のカルボメトキシビニル基は脱保護条件でカルバモイルビニル基に変換される。遠心濃縮装置を用いてアンモニアを減圧留去し、0.45 μ mのフィルターに通した。その後、逆相HPLCによりメインピークを含むフラクションを分取し(0-50% CH₃CN/50 mM ギ酸アンモニウム水溶液, 20分, 254 nmで検出)、遠心濃縮装置及び凍結乾燥機を用いてギ酸アンモニウム及び溶媒を留去した。得られたDNAオリゴマーはMALDI TOF-MS測定により同定した。

[0256] 以下において、5-[(E)-2-カルバモイルビニル]-2'-デオキシウリジン:
[化34]



[0257] を「CvU」で示す。

[0258] 合成したDNAオリゴマーの逆相HPLCクロマトグラムを図41に示す。

[0259] 合成したDNAオリゴマーの上記逆相HPLCにおける保持時間は以下の通りである。

[0260] 5' -TTTTCTT(CvU)TCCTTTT-3' について10.5分 (配列番号18)

5' -TTTTTT(CvU)TTTTTT-3' について10.6分 (配列番号19)

合成したDNAオリゴマーのMALDI TOF-MSのデータは以下の通りである。

[0261] 5' -TTTTCTT(CvU)TCCTTTT-3' について分子式 $C_{149}H_{194}N_{34}O_{101}P_{14}$ 、 $[M-H]^-$ の計算値 4509.9、実測値 4510.0 (配列番号18)

5' -TTTTTT(CvU)TTTTTT-3' について分子式 $C_{132}H_{171}N_{27}O_{90}P_{12}$ 、 $[M-H]^-$ の計算値 3946.6、実測値 3946.6 (配列番号19)

<9. 使用例4 : 5-[(E)-2-カルバモイルビニル]-2' -デオキシウリジンを含むDNAオリゴマー>

[使用例4-1 : 5-[(E)-2-カルバモイルビニル]-2' -デオキシウリジンを含むDNAオリゴマーの切断反応]

スクリーチューブに30 μ LのDNAオリゴマー水溶液(ストランド濃度 500 μ M)と30 μ Lのエチレンジアミン(無水)とを加え、水浴中で70°C、3時間又は16時間加熱した。反応混合物を酢酸で中和し、逆相HPLCにより分析し、生成物を分取した(0-50% CH_3CN /50 mM ギ酸アンモニウム水溶液, 20分, 254 nmで検出)。分取した生成物は、MALDI TOF-MSにより分子量を測定した(8時間反応後の試料の生成物)。

[0262] 合成した各DNAオリゴマーの反応前後の逆相HPLCクロマトグラムを図42及び44に、生成物1及び他の副生成物のMALDI TOF-MSスペクトルを図43及び45に、それぞれ示す。

[0263] 各DNAオリゴマーにおける生成物1のMALDI TOF-MSのデータは以下の通りである。

[0264] 5' -TTTTCTT(CvU)TCCTTTT-3' について

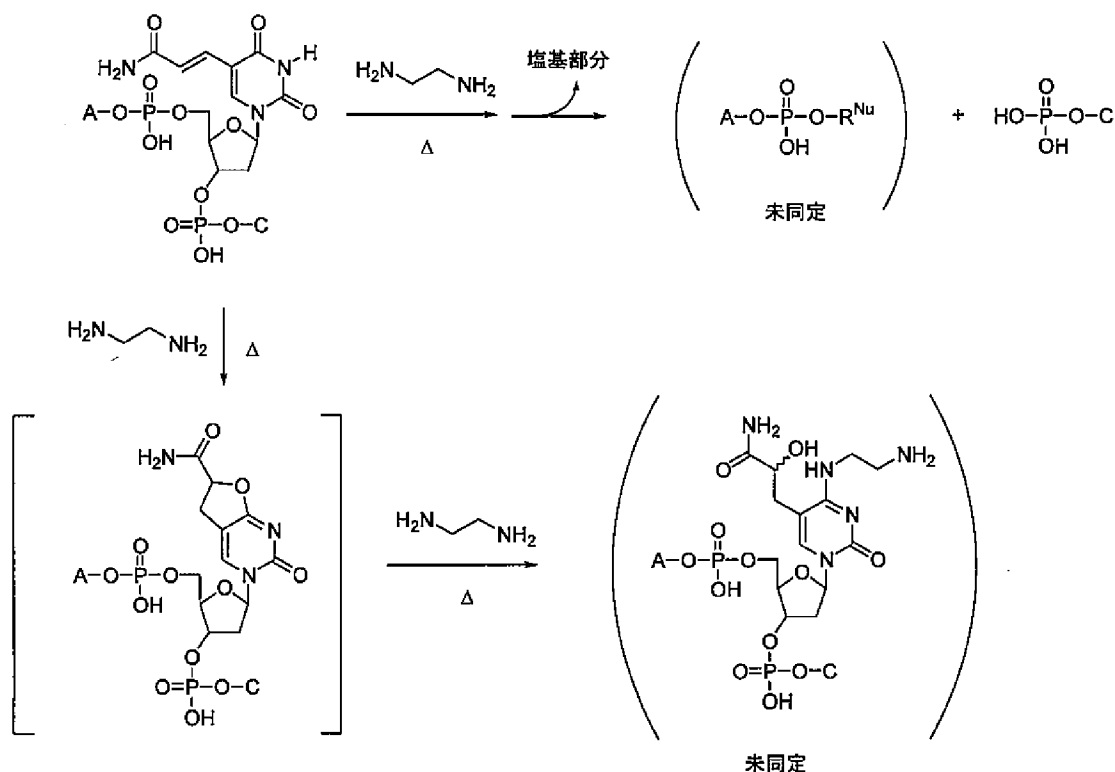
生成物1 : pTCCTTTT 分子式 $C_{68}H_{91}N_{16}O_{48}P_7$ FW 2117.3 $[M-H]^-$ 2116.3 実測値 2116.2

5' -TTTTTT(CvU)TTTTTT-3' について

生成物1 : pTTTTT 分子式 $C_{60}H_{80}N_{12}O_{43}P_6$ FW 1843.2 $[M-H]^-$ 1842.2 実測値 1841.9

エチレンジアミンによるDNAオリゴマーの分解反応を下記に示す。下記反応式において、右側の生成物がHPLCクロマトグラム上の小さなピークである生成物1に対応する。反応後の分取HPLCにおいて原料のDNAオリゴマーと同じリテンションタイムに溶出されるピークを含むフラクションをMALDI TOF-MS測定すると、MALDI TOF-MSスペクトル上に原料+60に相当するピークが検出された。この結果から、反応後の前記フラクションには、原料のDNAオリゴマーにエチレンジアミンが一分子付加した化合物が多く含まれていることが示唆された。それ故、DNAオリゴマーの分解反応とは別の反応が同時に起きたことが予想される。

[化35]



[0265] 前記の反応式において、A及びCは、上記で定義された式Iと同様の意味である。生成物の分子量より、R^{Nu}は、分解したヌクレオチドに求核剤が一分子付加して非天然型塩基が除去されてできたものと予想される。

[0266] <10. 合成例5 : N6-(3-プロピニル)-5-メチル-2'-デオキシシチジンを含むD

NAオリゴマー>

[合成例5-1 : N6-(3-プロピニル)-5-メチル-2'-デオキシシチジンの合成]

1.21 g(5.00 mmol)のチミジン(分子量242.23)を20 mLのアセトニトリルに懸濁し、そこへ5.58 mL(40.0 mmol)のトリエチルアミン(分子量101.19, 比重0.73 g/mL)と1.89 mL(20.0 mmol)の無水酢酸(分子量102.09, 比重1.08 g/mL)とを加え、25℃で21時間攪拌した。溶媒を減圧留去し、100 mLの酢酸エチルと100 mLの飽和食塩水とを加えて分液した。有機層を100 mLの飽和食塩水で2回洗浄した後、有機層を硫酸マグネシウムで乾燥した。乾燥後の有機層をろ過し、ろ液の溶媒を減圧留去して、真空ポンプにより乾燥した。3.45 g(50.0 mmol)の1,2,4-トリアゾール(分子量69.07)を加え、30 mLのアセトニトリルを加え、7.67 mL(55.0 mmol)のトリエチルアミン(分子量101.19, 比重0.73 g/mL)を加えた。混合物をよく攪拌しながら932 μ L(10.0 mmol)の塩化ホスホリル(分子量153.33, 比重1.645 g/mL)を加えた。25℃で1時間攪拌した。溶媒を減圧留去し、100 mLの酢酸エチルと100 mLの飽和食塩水とを加えて分液した。有機層を100 mLの飽和食塩水で2回洗浄した後、有機層を硫酸マグネシウムで乾燥した。乾燥後の有機層をろ過し、ろ液の溶媒を減圧留去して、真空ポンプにより乾燥した。約30 mLの1,4-ジオキサンを加え、溶解させた後、961 μ L(15.0 mmol)のプロパルギルアミン(分子量55.08, 比重0.86)を加え、25℃で2時間攪拌した。溶媒を減圧留去し、30 mLのメタノールと30 mLの28%アンモニア水とを加えて25℃で24時間攪拌した。溶媒を減圧留去し、シリカゲルカラムで目的生成物を精製した(10-15% MeOH/CH₂Cl₂)。873 mg(3.13 mmol, 収率63%)の目的物質(分子量279.29)を白色粉末として得た。

[0267] ¹H NMR(400 MHz, DMSO-d₆) δ 7.65 (d, J= 0.9Hz, 1H), 7.57 (t, J= 5.7Hz, 1H), 5.19 (d, J= 4.6Hz, 1H), 5.01 (t, J= 5.3Hz, 1H), 4.23-4.18 (m, 1H), 4.14-4.01 (m, 2H), 3.76-3.74 (m, 1H), 3.62-3.50 (m, 2H), 3.04 (t, J= 2.5 Hz, 1H), 2.12-2.05 (m, 1H), 1.99-1.92 (m, 1H), 1.84 (s, 3H); HRMS (ESI): C₁₃H₁₇N₃O₄Naに対する計算値: 302.1116 [M+Na]⁺; 実測値: 302.1117.

[合成例5-2 : 5'-O-ジメトキシトリチル- N6-(3-プロピニル)-5-メチル-2'

-デオキシシチジンの合成]

312 mg(1.12 mmol)のN6-(3-プロピニル)-5-メチル-2'-デオキシシチジン(分子量279.29)と454 mg(1.34 mmol)のDMTrCl(分子量338.83)とをナスフラスコに入れ、そこへ10 mLのピリジンを加え、室温で1時間攪拌した。約2 mLのメタノールを加え、反応を停止させ、溶媒を減圧留去した。シリカゲルカラムで目的物質を精製した(展開溶媒は2~5% MeOH, 2% Et₃N/CH₂Cl₂)。目的のフラクションの溶媒を減圧留去し、真空ポンプで乾燥した。少量の塩化メチレンに溶かし、ヘキサンを加え、溶媒を減圧留去し、真空ポンプで乾燥することにより、631 mg (0.924 mmol, 収率83%) の目的物質(分子量682.85 ; トリエチルアミン一分子を含む)を白色粉末として得た。

[0268] ¹H NMR(400 MHz, DMSO-d₆) δ 7.63 (t, J= 5.7Hz, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.39-7.35 (m, 2H), 7.32-7.19 (m, 7H), 6.90-6.86 (m, 4H), 6.21 (t, J = 6.6 Hz, 1H), 5.34 (d, J= 4.1Hz, 1H), 4.31-4.25 (m, 1H), 4.14-4.02 (m, 2H), 3.90-3.86 (m, 1H), 3.72 (s, 6H), 3.22-3.16 (m, 2H), 3.09-3.00 (m, 6H), 2.21-2.06 (m, 2H), 1.50 (s, 3H), 1.23-1.15 (m, 9H); HRMS (ESI): C₃₄H₃₅N₃O₆Na に対する計算値: 604.2525 [M+Na]⁺; 実測値: 604.2424.

[合成例5-3: 5'-O-ジメトキシトリチル-N6-(3-プロピニル)-5-メチル-2'-デオキシシチジン-3'-N,N-ジイソプロピル(シアノエチル)ホスホロアミダイトの合成]

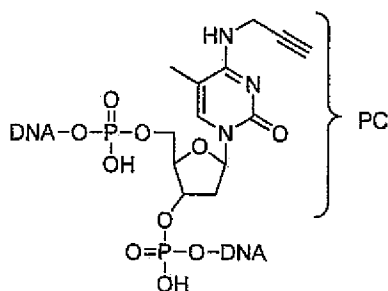
291 mg(0.426 mmol)の5'-O-ジメトキシトリチル-N6-(3-プロピニル)-5-メチル-2'-デオキシシチジン (分子量682.85 ; トリエチルアミン一分子を含む)をナスフラスコに入れ、5 mLのCH₃CNと261 μL(1.50 mmol)のN,N-ジイソプロピルエチルアミン(分子量129.25, 比重0.742 g/mL)とを加え、攪拌し、さらに223 μL(1.00 mmol)の2-シアノエチル N,N,N',N'-テトライソプロピルホスホロアミダイト(分子量236.68, 比重1.061 g/mL)を加え、室温で30分間攪拌した。25 mLのAcOEtと25 mLの飽和食塩水とを加え、分液し、有機層をさらに2回飽和食塩水で洗った。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、フィルターでろ過し、ろ液の溶媒を減圧留去した。アセトニトリルで3回共沸し

た後、10 mLのアセトニトリルを加えた。溶液を $0.45\mu\text{m}$ のフィルターに通し、少量のモレキュラーシーブを加えた。DNA自動合成機に取り付けてDNA合成に使用した。

[0269] [合成例5-4：N6-(3-プロピニル)-5-メチル-2'-デオキシシチジンを含むDNAオリゴマーの合成]

DNA自動合成機を用いて、N6-(3-プロピニル)-5-メチル-2'-デオキシシチジンを含むDNAオリゴマーを上記と同じ方法で合成した。担体からの切り出しを28 %アンモニア水で行い、脱保護は室温（約 25°C ）で16時間静置することにより行った。遠心濃縮装置を用いてアンモニアを減圧留去し、 $0.45\mu\text{m}$ のフィルターに通した。その後、逆相HPLCによりメインピークを含むフラクションを分取し（0-50% $\text{CH}_3\text{CN}/50\text{ mM}$ ギ酸アンモニウム水溶液，20分，254 nmで検出）、遠心濃縮装置及び凍結乾燥機を用いてギ酸アンモニウム及び溶媒を留去した。得られたDNAオリゴマーはMALDI TOF-MS測定により同定した。

[0270] 以下において、N6-(3-プロピニル)-5-メチル-2'-デオキシシチジン：
[化36]



[0271] を「PC」で示す。

[0272] 合成したDNAオリゴマーの逆相HPLCクロマトグラムを図46に示す。

[0273] 合成したDNAオリゴマーの上記逆相HPLCにおける保持時間は以下の通りである。

[0274] 5'-TTTTCTT(PC)TCCTTTT-3' について10.6分（配列番号20）

5'-TTTTTTT(PC)TTTTTTT-3' について10.9分（配列番号21）

合成したDNAオリゴマーのMALDI TOF-MSのデータは以下の通りである。

[0275] 5'-TTTTCTT(PC)TCCTTTT-3' について分子式 $\text{C}_{150}\text{H}_{196}\text{N}_{34}\text{O}_{99}\text{P}_{14}$ 、 $[\text{M}-\text{H}]^-$ の計算値 4

492.0、実測値 4491.9 (配列番号20)

5' -TTTTTT(PC)TTTTTT-3' について分子式 $C_{133}H_{173}N_{27}O_{88}P_{12}$ 、 $[M-H]^-$ の計算値 392

8.6、実測値 3928.8 (配列番号21)

<11. 使用例5 : N6-(3-プロピニル)-5-メチル-2' -デオキシシチジンを含むDNAオリゴマー>

[使用例5-1 : N6-(3-プロピニル)-5-メチル-2' -デオキシシチジンを含むDNAオリゴマーの切断反応]

スクリーチューブに30 μ LのDNAオリゴマー水溶液(ストランド濃度 500 μ M)と30 μ Lのエチレンジアミン(無水)とを加え、水浴中で70°C、3時間又は16時間加熱した。反応混合物を酢酸で中和し、逆相HPLCにより分析し、生成物を分取した(0-50% CH_3CN /50 mM ギ酸アンモニウム水溶液, 20分, 254 nmで検出)。分取した生成物は、MALDI TOF-MSにより分子量を測定した(16時間反応後の試料の生成物)。

[0276] 合成した各DNAオリゴマーの反応前後の逆相HPLCクロマトグラムを図47及び49に、生成物1及び他の副生成物のMALDI TOF-MSスペクトルを図48及び50に、それぞれ示す。

[0277] 各DNAオリゴマーにおける生成物1のMALDI TOF-MSのデータは以下の通りである。

[0278] 5' -TTTTCTT(PC)TCCTTTT-3' について

生成物1 : pTCCTTTT 分子式 $C_{68}H_{91}N_{16}O_{48}P_7$ FW 2117.3 $[M-H]^-$ 2116.3 実測値 2116.5

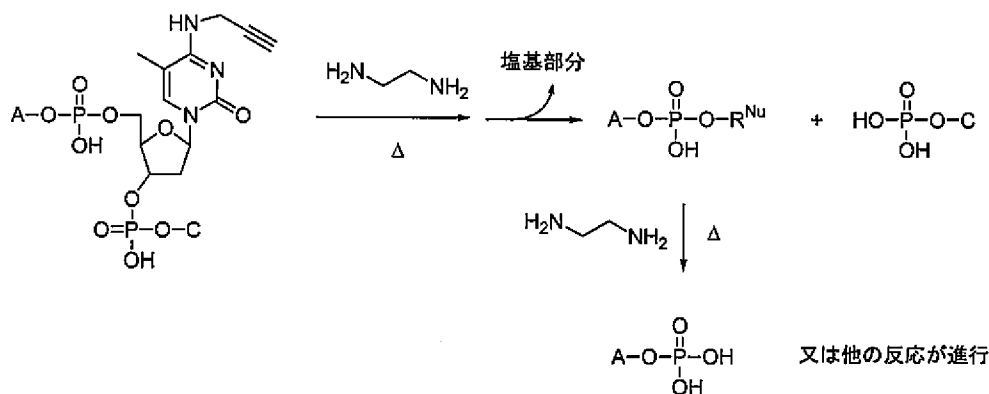
5' -TTTTTT(PC)TTTTTT-3' について

生成物1 : pTTTTTT 分子式 $C_{60}H_{80}N_{12}O_{43}P_6$ FW 1843.2 $[M-H]^-$ 1842.2 実測値 1841.8

エチレンジアミンによるDNAオリゴマーの分解反応を下記に示す。下記反応式において、右側の生成物がHPLCクロマトグラム上の小さなピークである生成物1に対応する。反応後の分取HPLCにおいて原料のDNAオリゴマーと同じリテンションタイムに溶出されるピークを含むフラクションをMALDI TOF-MS測

定したところ、原料のDNAオリゴマーが多く含まれていることが示唆された。それ故、当該DNAオリゴマーの分解反応は、使用例1の5-フェニルエチニル-2'-デオキシウリジンを含むDNAオリゴマーの場合と比較してかなり遅いことが示唆された。

[化37]



[0279] 前記の反応式において、A及びCは、上記で定義された式Iと同様の意味である。生成物の分子量より、R^{Nu}は、分解したヌクレオチドに求核剤が一分子付加して非天然型塩基が除去されてできたものと予想される。

[0280] <12. 使用例6：非天然塩基を含むDNAオリゴマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応によるDNAの増幅と増幅産物の連結反応>

[使用例6-1：非天然塩基を含むDNAオリゴマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応によるDNAの増幅]

鋳型DNAとして、λ DNA(New England BioLabs社製 カタログ番号 N3011)を、酵素としてKOD FX Neo(TOYOBO 社製 カタログ番号 KFX-201)を用い、5-フェニルエチニル-2'-デオキシウリジン (P) 又は5-エチニル-2'-デオキシウリジン (Pa) を含むDNAオリゴマーをプライマーとして用いて、ポリメラーゼ連鎖反応を行った。ポリメラーゼ連鎖反応後の増幅産物に対して本発明のDNA鎖の切断反応を実施することにより、リガーゼによる連結が可能な突出末端が生成するように非天然塩基を含むDNAオリゴマーの配列設計を行い、2つの標的DNAを鋳型としてポリメラーゼ連鎖反応を実施した。

[0281] 標的DNAの塩基配列は、λ DNA中において5' 末端から28634-28770番目に相

当する遺伝子1 (136塩基対) と、28743-28932番目に相当する遺伝子2 (179塩基対) とからなる。遺伝子1のフォワードプライマー鎖として5' -GTAGCGATCAAGCCATGAATGTAACG-3' (配列番号22)、及びリバースプライマー鎖として5' -ACAGGCGAATCGCAAXCACTG-3' (X = 5-フェニルエチニル-2' -デオキシウリジン (P) 又は5-エチニル-2' -デオキシウリジン (Pa)) (配列番号23) を、遺伝子2のフォワードプライマー鎖として5' -ATTGCGATTGCGCTGXCTCTGC-3' (5-フェニルエチニル-2' -デオキシウリジン (P) 又は5-エチニル-2' -デオキシウリジン (Pa)) (配列番号24)、及びリバースプライマー鎖として5' -GGTTGACTTAAATCGACCAGTAACAGG-3' (配列番号25) を設計した。

[0282] ポリメラーゼ連鎖反応は、終濃度0.3 μ M プライマー、1 ng λ DNA、0.4 mM dNTPs、1 U KOD Fx neo、及び製品添付のバッファーを用いて、TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice (登録商標) Gradient (Takara社製サーマルサイクラー、カタログ番号 TP600)により、アニーリング：94°C、2分、変性：98°C、10秒、伸長：68°C、10秒（変性→伸長を35回繰り返す）の条件下において実施した。増幅産物を、10%非変性ポリアクリルアミドゲルに供することによって、ポリメラーゼ連鎖反応による増幅産物の確認を行った。結果を図51に示す。

[0283] 図51では、電気泳動後のゲルを、30分間室温にてエチジウムブロマイド溶液に浸潤させることで、二本鎖DNA選択的な染色操作を行い、紫外線照射して発する蛍光を検出することにより、DNA鎖を白いバンドとして検出している。レーン1のバンドは、遺伝子マーカーとして100塩基対毎にバンドが検出されるTrackIt (商標) 100 bp DNAラダー (Invitrogen社製 カatalog番号 10488-058)を用いた。レーン2及び3のバンドは、それぞれX = 5-フェニルエチニル-2' -デオキシウリジン (P) 又は5-エチニル-2' -デオキシウリジン (Pa) を含むDNAオリゴマーをプライマー鎖として用いた場合の遺伝子1の増幅産物を示しており、レーン4及び5のバンドは、それぞれX = 5-フェニルエチニル-2' -デオキシウリジン (P) 又は5-エチニル-2' -デオキシウリジン (Pa) を含むDNAオリゴマーをプライマー鎖として用いた場合の遺伝子2の増幅産物を示

している。マーカ由来の100塩基対と200塩基対の泳動度から、目的産物の増幅が確認された。

[0284] [使用例6-2：非天然塩基を含むDNA増幅産物の切断反応及び得られた5'末端リン酸化DNA断片の連結反応]

PCRチューブに、50 μ Lの使用例5-1で調製されたDNA増幅産物及び50 μ Lのエチレンジアミンを加え、TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice（登録商標）Gradientにより、70°C、3時間加熱した。反応後、50 μ Lの蒸留水を加え、さらに150 μ LのPCI（フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール=25:24:1）混合溶液を加えた後、ボルテックスミキサーを用いて前記溶液を激しく混ぜ、2層に均一に層分離するまで遠心分離した。上清を回収し、再び150 μ LのPCI混合溶液を加えた後、ボルテックスミキサーを用いて前記溶液を激しく混ぜ、2層に均一に層分離するまで遠心分離した。この操作を合計5回繰り返した。上記の操作によって得られた上清を、Bio-Spin 6カラム（BIO-RAD社製 カタログ番号 732-6227）に供した後、エタノール沈殿により精製を行った。遠心濃縮装置を用いて5'末端リン酸化DNA断片を乾燥させ、5 μ LのTEバッファに再溶解させた。

[0285] それぞれ5 μ Lの遺伝子1及び遺伝子2の5'末端リン酸化DNA断片を含む溶液を混合し、1.5 μ Lの1 M NaCl及び3.5 μ Lの蒸留水を加え、TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice（登録商標）Gradientにより、98°C、15分間加熱した後に室温まで徐冷した。15 μ LのLigation High（TOYOBO社製 カタログ番号 LGK-101）を加え、16°C、40時間振盪させた。リガーゼ反応後のサンプルを、PCI抽出操作及びエタノール沈殿により精製し、10%非変性ポリアクリルアミドゲルに供し、連結反応の解析を行った。結果を図52に示す。

[0286] レーン1のバンドは、遺伝子マーカとして100塩基対毎にバンドが検出されるTrackIt（商標）100 bp DNAラダーを用いた。レーン2及び3のバンドは、それぞれX = 5-フェニルエチニル-2'-デオキシウリジン（P）を含む遺伝子1又は遺伝子2の増幅産物を本発明の切断反応で切断し、得られた5'末端リン酸化DNA断片を示しており、レーン4及び5のバンドは、それぞれX = 5-フェニ

ルエチニル-2' -デオキシウリジン (P) 又は5-エチニル-2' -デオキシウリジン (Pa) を含む遺伝子1及び2のDNA増幅産物を本発明の切断反応で切断し、得られた遺伝子1及び2の5' 末端リン酸化DNA断片をリガーゼと反応させた連結反応産物を示している。レーン6のバンドは、 λ DNA中において5' 末端から28634-28932番目に相当する塩基配列を有するDNA断片、すなわち遺伝子1及び2が連結した連結反応産物と同一の塩基配列を有する遺伝子3(299塩基対)の増幅産物を示している。X = P又はPaを含む遺伝子1及び2のDNA増幅産物を本発明の切断反応で切断し、得られた5' 末端リン酸化DNA断片をリガーゼと反応させた連結反応産物 (レーン4及び5) は、遺伝子3 (レーン6) の泳動度と一致することから、連結反応が高効率に進行していることが示された。

[0287] <13. 合成例7 : 2' -デオキシ-4-N-{N' , N' -ジ(n-ブチル)ホルムアミジン}-5-フェニルエチニルシチジンを含むDNAオリゴマー>

[合成例7-1 : 2' -デオキシ-4-N-{N' , N' -ジ(n-ブチル)ホルムアミジン}-5-フェニルエチニルシチジンの合成]

2' -デオキシ-5-フェニルエチニルシチジンは、非特許文献41に従って合成した。708 mg(2.16 mmol)の2' -デオキシ-5-フェニルエチニルシチジン(分子量327.33)を10 mLのメタノールに溶解した。得られた溶液に、2.0 mL(8.6 mmol)のN,N-ジ(n-ブチル)ホルムアミジンジメチルアセタール(分子量203.32、密度0.87 g/mL)(Dialkylformamidines: depurination resistant N6-protecting group for deoxyadenosine. Froehler, B. C. 及びMatteucci, M. D. Tetrahedron Letters 1983年, 11, p. 8031-8036)を加え、25°Cで2時間攪拌した。反応液の溶媒を減圧留去し、シリカゲルカラムで目的物質を精製した(展開溶媒はCH₂Cl₂のみ~5~10% MeOH/CH₂Cl₂)。目的のフラクションの溶媒を減圧留去し、700 mg(1.50 mmol, 収率69 %)の目的物質(分子量466.57)を、うす褐色のオイル状物質として得た。

[0288] ¹H NMR(400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.64 (s, 1H), 8.44 (s, 1H), 7.43-7.34 (m, 5H), 6.12 (t, J = 6.2 Hz, 1H), 5.23 (d, J = 4.1 Hz, 1H), 5.13 (t, J = 4.8 Hz, 1H), 4.26-4.21 (m, 1H), 3.84-3.81 (m, 1H), 3.70-3.44 (m, 6H)

), 2.26–2.20 (m, 1H), 2.08–2.01 (m, 1H), 1.66–1.52 (m, 4H), 1.32–1.22 (m, 4H), 0.90 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H), 0.82 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 169.7, 157.4, 153.4, 145.3, 130.7, 128.6, 128.1, 123.2, 97.5, 91.6, 87.6, 85.8, 84.5, 69.7, 60.7, 54.9, 51.4, 45.4, 41.0, 30.4, 28.5, 19.6, 19.1, 13.5; HRMS (ESI): $\text{C}_{26}\text{H}_{35}\text{N}_4\text{O}_4$ に対する計算値: 467.2658 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 実測値: 467.2653.

[合成例7-2: 4-N-{N', N'-ジ(n-ブチル)ホルムアミジン}-5-フェニルエチニル-5'-O-ジメトキシトリチル-2'-デオキシシチジンの合成]

700 mg (1.50 mmol) の2'-デオキシ-4-N-{N', N'-ジ(n-ブチル)ホルムアミジン}-5-フェニルエチニル-シチジン (分子量466.57) を、10 mL のピリジンに溶解した。得られた溶液に、763 mg (2.25 mmol) の4,4'-ジメトキシトリチルクロリド (分子量338.83) を加え、25°C で1時間攪拌した。反応液に約10 mL のメタノールを加え、溶媒を減圧留去した。得られた残渣に、少量の塩化メチレン及びヘキサンを加えて混合した。前記混合物を3回共沸した後、シリカゲルカラムで目的物質を精製した (展開溶媒は2% Et_3N 、0~2~5% $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$)。目的のフラクションの溶媒を減圧留去し、少量の塩化メチレン及びヘキサンを加え共沸した。924 mg (1.20 mmol, 収率80%) の目的生成物を、白色粉末として得た。

[0289] ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.65 (s, 1H), 8.17 (s, 1H), 7.44–6.81 (m, 18H), 6.14 (t, $J = 6.6$ Hz, 1H), 5.32 (d, $J = 4.6$ Hz, 1H), 4.31–4.26 (m, 1H), 4.02–3.97 (m, 1H), 3.644 (s, 3H), 3.637 (s, 3H), 3.57–3.49 (m, 4H), 3.23–3.16 (m, 2H), 2.36–2.30 (m, 1H), 2.17–2.10 (m, 1H), 1.66–1.53 (m, 4H), 1.32–1.22 (m, 4H), 0.91 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H), 0.82 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 169.7, 158.03, 158.01, 157.5, 153.4, 144.7, 144.3, 135.6, 135.4, 130.6, 129.7, 129.6, 128.3, 127.93, 127.86, 127.6, 126.6, 123.0, 113.2, 97.9, 91.7, 86.2, 85.9, 83.9, 70.6, 63.5, 54.9, 54.5, 45.4, 41.2, 30.4, 28.5, 19.6, 19.1, 13.5; HRMS (ESI): $\text{C}_{47}\text{H}_{53}\text{N}_4\text{O}_6$ に対する計算値: 769.3965 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 実測値: 769.3985

・
[合成例7-3 : 4-N-{N', N' -ジ(n-ブチル)ホルムアミジン}-5-フェニルエチニル-5' -0-ジメトキシトリチル-2' -デオキシシチジン-3' -N,N-ジイソプロピル(シアノエチル)ホスホロアミダイトの合成]

109 mg(0.142 mmol)の4-N-{N', N' -ジ(n-ブチル)ホルムアミジン}-5-フェニルエチニル-5' -0-ジメトキシトリチル-2' -デオキシシチジン(分子量768.94)をナスフラスコに入れ、5 mLのCH₃CN及び157 μ L(1.13 mmol)のトリエチルアミン(分子量101.19, 比重0.726 g/mL)を加え、攪拌し、さらに126 μ L(0.56 mmol)の2-シアノエチル N,N,N', N' -テトライソプロピルホスホロジアミダイト(分子量236.68, 比重1.061 g/mL)を加え、室温で30分間攪拌した。得られた混合物に、25 mLのAcOEtと25 mLの飽和食塩水とを加え、分液し、有機層をさらに2回飽和食塩水で洗った。得られた有機層を、無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、フィルターでろ過し、ろ液の溶媒を減圧留去した。アセトニトリルで3回共沸した後、4.7 mLのアセトニトリルを加えた。前記溶液に、少量のモレキュラーシーブを加えた。DNA自動合成機に取り付けてDNA合成に使用した。

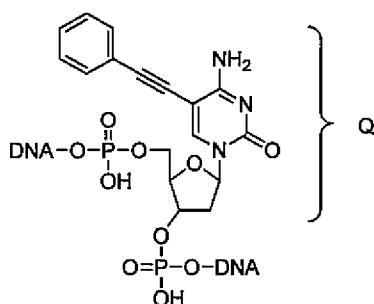
[0290] [合成例7-4 : 5-フェニルエチニル-2' -デオキシシチジン(Q)を含むDNAオリゴマーの合成]

通常のDNA自動合成機のDNA合成のプロトコールで、1 μ molスケール、DMTr ONでホスホロアミダイト法により合成した。担体からの切り出しは28%アンモニア水で行い、脱保護は25℃で16時間静置することにより行った。脱保護後、アンモニアを遠心濃縮装置により減圧留去し、DNAを含む溶液を0.45 μ mのフィルターに通した後、逆相HPLCによりメインピークを精製し(0-50% CH₃CN /50 mM ギ酸アンモニウム水溶液, 20分, 254 nmで検出)、遠心濃縮装置と凍結乾燥によりギ酸アンモニウムと溶媒とを留去した。得られた残渣に100 μ Lの80%酢酸水溶液を加え、よく混合し、25℃で30分間静置した。その後、前記混合物に蒸留水を約1 mLとなるように加えて、0.45 μ mのフィルターに通した後、逆相HPLCにより13~14分の保持時間に溶出されたメインピークを精製し(

8-20% CH₃CN/50 mM ギ酸アンモニウム水溶液, 20分, 254 nmで検出)、遠心濃縮装置と凍結乾燥によりギ酸アンモニウムと溶媒とを留去した。得られたDNAオリゴマーはMALDI TOF-MS測定により同定した。合成したDNAオリゴマーは、約500 μLの蒸留水を加えて水溶液とした。

[0291] 以下において、5-フェニルエチニル-2'-デオキシシチジン：

[化38]



[0292] を「Q」で示す。

[0293] DNAの濃度決定は、QをCと近似して260 nmのモル吸光係数を計算し、260 nmのUV吸収より濃度を計算した。

[0294] 合成したDNAオリゴマーの逆相HPLCクロマトグラムを図53及び54に示す。

[0295] 合成したDNAオリゴマーの上記逆相HPLCにおける保持時間は以下の通りである。

[0296] 5'-TTTTTQTTTTT-3' について13.6分 (配列番号26)

5'-TTTTCTTQTCCTTTT-3' について13.1分 (配列番号27)

合成したDNAオリゴマーのMALDI TOF-MSのデータは以下の通りである。

[0297] 5'-TTTTTQTTTTT-3' について分子式C₁₃₇H₁₇₃N₂₇O₈₈P₁₂、[M-H]⁻の計算値 3976.6、実測値 3977.1 (配列番号26)

5'-TTTTCTTQTCCTTTT-3' について分子式C₁₅₄H₁₉₆N₃₄O₉₉P₁₄、[M-H]⁻の計算値 4540.0、実測値 4540.0 (配列番号27)

<14. 使用例7: 5-フェニルエチニル-2'-デオキシシチジンを含むDNAオリゴマー>

[使用例7-1: メチルアミンによる5-フェニルエチニル-2'-デオキシシチジンを含むDNAオリゴマーの切断反応及び生成物の同定]

スクリーチューブに300 μ Lの5' -T₆QT₆-3' 又は5' -TTTTCTTQTCCTTTT-3' の水溶液(ストランド濃度 100 μ M)と300 μ Lのメチルアミン (40% 水溶液) とを加え、水浴中で70℃、12時間加熱した。反応後は、メチルアミンを遠心濃縮装置で減圧留去し、逆相HPLCにより分析して生成物を分取した(8-20% CH₃CN /50 mM ギ酸アンモニウム水溶液, 20分, 254 nmで検出)。分取した生成物は、MALDI TOF-MSにより分子量を測定した。

[0298] 合成した各DNAオリゴマーの反応後の逆相HPLCクロマトグラムを図55及び56に示す。

[0299] 各DNAオリゴマーにおける生成物1及び2のMALDI TOF-MSのデータは以下の通りである。以下において、「R^{Nu}」は、切断反応に伴って生成するQ由来の部分を意味する。

[0300] 5' -TTTTTTQTTTTT-3' について

生成物1 : pTTTTTT 分子式C₆₀H₈₀N₁₂O₄₃P₆ FW 1843.2 [M-H]⁻ 1842.2 実測値 1842.0

HPLCの保持時間 8.5分

生成物2 : TTTTTTpR^{Nu} 分子式C₆₆H₉₁N₁₃O₄₅P₆ FW 1972.3 [M-H]⁻ 1971.3 実測値 1971.1

HPLCの保持時間 10.6分

5' -TTTTCTTQTCCTTTT-3' について

生成物1 : pTCCTTTT 分子式C₆₈H₉₁N₁₆O₄₈P₇ FW 2117.3 [M-H]⁻ 2116.3 実測値 2116.3

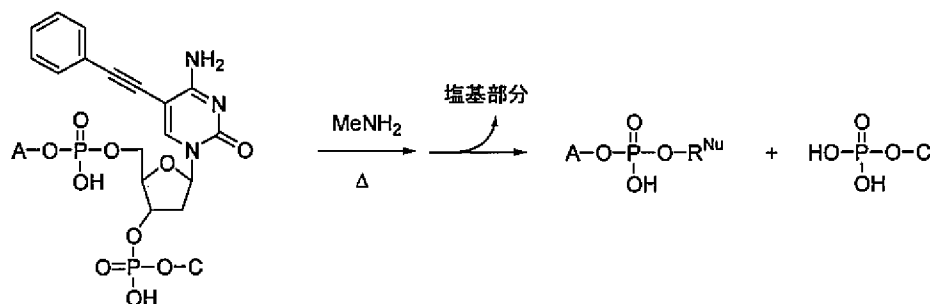
HPLCの保持時間7.1分

生成物2 : TTTTCTTpR^{Nu} 分子式C₇₅H₁₀₃N₁₆O₅₁P₇ FW 2261.5 [M-H]⁻ 2260.5 実測値 2260.5

HPLCの保持時間 9.7分

メチルアミンによるDNAオリゴマーの分解反応を下記に示す。下記反応式において、左側の生成物が生成物2に、右側の生成物が生成物1に、それぞれ対応する。

[化39]



[0301] 前記の反応式において、A及びCは、上記で定義された式Iと同様の意味である。生成物の分子量より、 R^{Nu} は、分解したヌクレオチドに求核剤が一分子付加して非天然型塩基が除去されてできたものと予想される。

[0302] [使用例7-2：メチルアミン又はエチレンジアミンによる5'-フェニルエチニル-2'-デオキシシチジンを含むDNAオリゴマーの切断反応速度の比較]

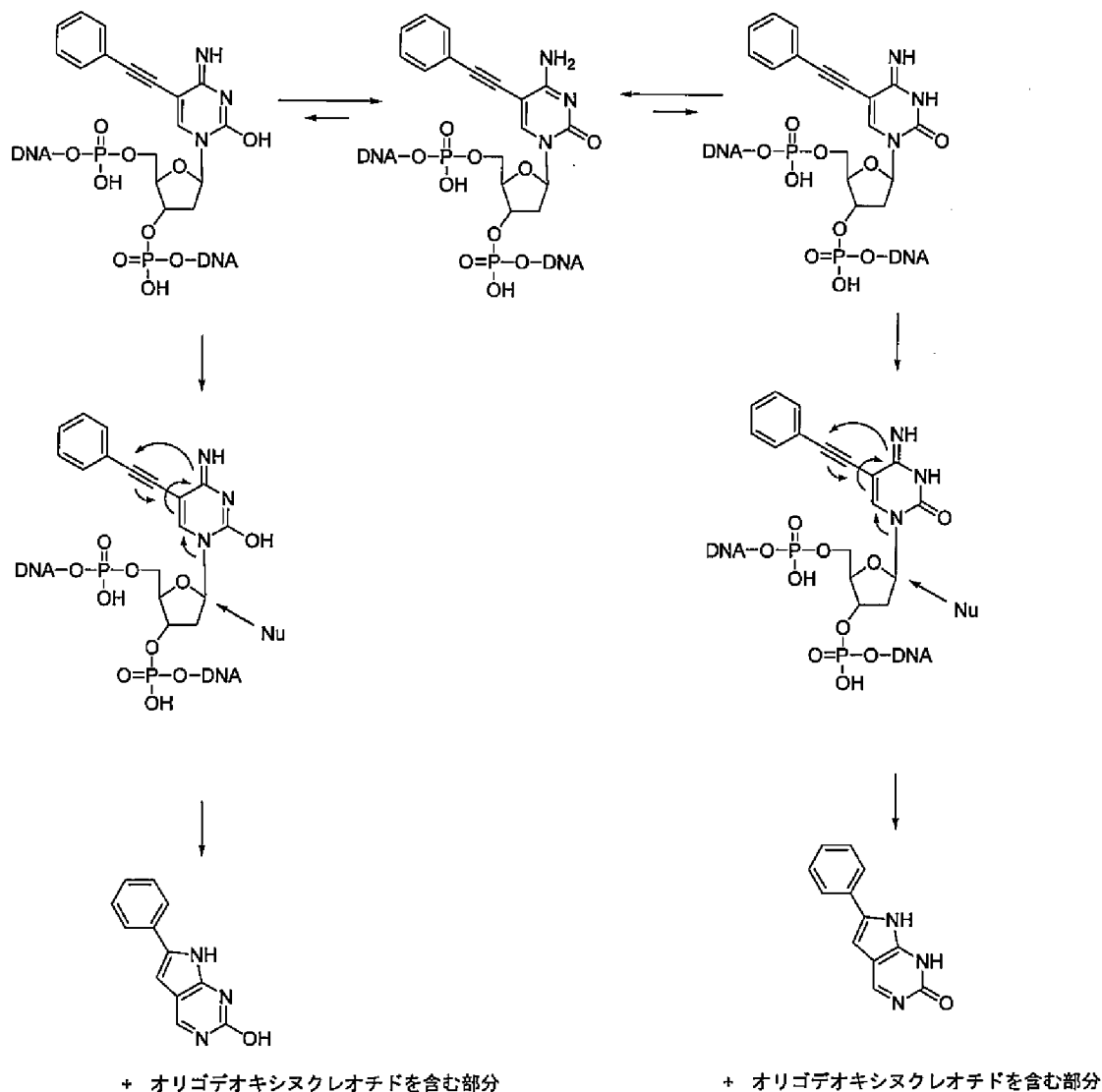
スクリーチューブに30 μ Lの5'- $T_6(Q)T_6$ -3' 又は5'-TTTTCTT(Q)TCCTTTT-3'の水溶液(ストランド濃度 100 μ M)と、30 μ Lのメチルアミン40%水溶液又はエチレンジアミンを加え、水浴中で70℃、2時間加熱した。反応混合物を酢酸で中和し、逆相HPLCにより分析した(8-20% CH_3CN /50 mM ギ酸アンモニウム水溶液, 20分, 254 nmで検出)。5'- $T_6(Q)T_6$ -3'の反応混合物のHPLCチャートを図57に、5'-TTTTCTT(Q)TCCTTTT-3'の反応混合物のHPLCチャートを図58に、それぞれ示す。

[0303] 5'- T_6QT_6 -3'の5'-側の切断生成物である5'- T_6p -3'のピーク面積に基づき定量したところ、5'- T_6QT_6 -3'の5'-側の切断産物の量は、メチルアミン処理の方がエチレンジアミン処理よりも3.6倍多いことが計算された。また、5'-TTTTCTTQTCTTTT-3'の5'-側の切断生成物である5'-TTTTCTTp-3'のピーク面積に基づき定量したところ、5'-TTTTCTTQTCTTTT-3'の5'-側の切断産物の量は、メチルアミン処理の方がエチレンジアミン処理よりも2.6倍多いことが計算された。この結果より、メチルアミン又はエチレンジアミンの一级アミンを用いるDNAオリゴマーの切断反応において、最も反応速度の速いものはメチルアミンを用いる切断反応であることが示唆された。

[0304] 合成例7で得られたQには、下記に示すように複数の互変異性体が存在する

。それ故、Qを含むオリゴデオキシヌクレオチドにおいて、Qの互変異性体が求核剤と反応することにより、Eの脱離反応及びオリゴデオキシヌクレオチドの切断反応が進行すると考えられる。

[化40]



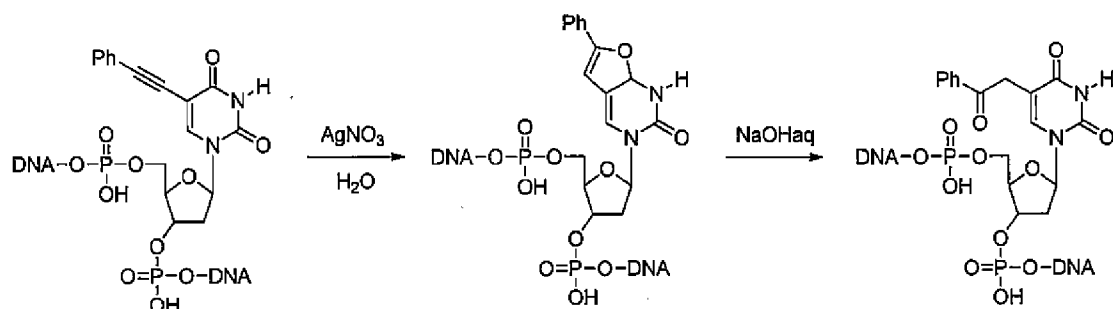
[0305] 上記の反応式において、DNAはオリゴデオキシヌクレオチドを、Nuは求核剤を意味する。

[0306] <15. 合成例8：5-(2-オキシ-2-フェニルエチル)-2'-デオキシウリジン(HP)を含むDNAオリゴマー>

[合成例8-1：5-(2-オキシ-2-フェニルエチル)-2'-デオキシウリジン(HP)を含むDNAオリゴマーの合成]

ヌクレオシドレベルで公知の反応に基づき、合成例1で得られたPを含むDNAオリゴマーにおいて、Pの塩基部分を銀イオンで環化させて(A facile synthesis of fluorophores based on 5-phenylethynyluracils. Hudson, H. E. R. 及びMoszybski, J. M. Synlett 2006年, 18, p. 2997-3000)、その後、水酸化ナトリウム処理することにより、Pを5-(2-オキシ-2-フェニルエチル)-2'-デオキシウリジンに変換した(非特許文献39)。

[化41]

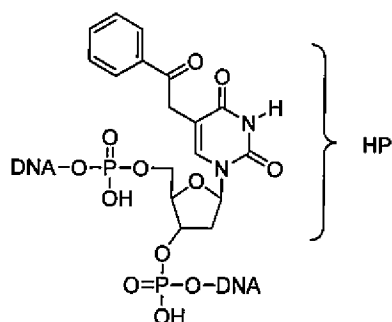


[0307] 合成例1で得られた5'-T₆PT₆-3' 水溶液(1 mMストランド濃度)200 μ Lに、硝酸銀水溶液(100 mM)200 μ Lを加え、よく混合し、25℃で16時間静置した。前記混合物に、NaOH水溶液(10規定)20 μ Lを加え、よく混合した。得られた混合物を、25℃で2時間静置した。その後、前記混合物に水を加えて約1 mLとし、酢酸20 μ Lを加えた。得られた溶液を0.45 μ mのフィルターに通した後、逆相HPLCで精製(8-20% CH₃CN/50 mM ギ酸アンモニウム水溶液, 20分, 254 nmで検出)し、脱塩した。メインピークとして得られた生成物は、MALDI TOF-MS測定により同定した。

[0308] 以下において、5-(2-オキシ-2-フェニルエチル)-2'-デオキシウリジン

:

[化42]



[0309] を「HP」で示す。

[0310] DNAの濃度決定は、HPをTと近似して260 nmのモル吸光係数を計算し、260 nmのUV吸収より濃度を計算した。

[0311] 合成したDNAオリゴマーの逆相HPLCクロマトグラムを図59及び60に示す。

[0312] 合成したDNAオリゴマーの上記逆相HPLCにおける保持時間は以下の通りである。

[0313] 5' -TTTTTT(HP)TTTTTT-3' について12.5分 (配列番号28)

5' -TTTTCTT(HP)TCCTTTT-3' について11.4分 (配列番号29)

合成したDNAオリゴマーのMALDI TOF-MSのデータは以下の通りである。

[0314] 5' -TTTTTT(HP)TTTTTT-3' について分子式 $C_{137}H_{174}N_{26}O_{90}P_{12}$ 、 $[M-H]^-$ の計算値 3995.6、実測値 3995.6 (配列番号28)

5' -TTTTCTT(HP)TCCTTTT-3' について分子式 $C_{154}H_{197}N_{33}O_{101}P_{14}$ 、 $[M-H]^-$ の計算値 4559.0、実測値 4559.4 (配列番号29)

<16. 使用例8: 5-(2-オキシ-2-フェニルエチル)-2' -デオキシウリジンを含むDNAオリゴマー>

[使用例8-1: メチルアミンによる5-(2-オキシ-2-フェニルエチル)-2' -デオキシウリジンを含むDNAオリゴマーの切断反応及び生成物の同定]

スクリーチューブに300 μ Lの5' -T₆(HP)T₆-3' 又は5' -TTTTCTT(HP)TCCTTTT-3' の水溶液(ストランド濃度100 μ M)と300 μ Lのメチルアミン (40% 水溶液)を加え、水浴中で70°C、12時間加熱した。反応後は、メチルアミンを遠心濃縮装置で減圧留去し、逆相HPLCにより分析して生成物を分取した(8-20% CH₃CN/50 mM ギ酸アンモニウム水溶液, 20分, 254 nmで検出)。分取した生成物は、MALDI TOF-MSにより分子量を測定した。

[0315] 合成した各DNAオリゴマーの反応後の逆相HPLCクロマトグラムを図61及び62に示す。

[0316] 各DNAオリゴマーにおける生成物1及び2のMALDI TOF-MSのデータは以下の通りである。以下において、「R^{Nu}」は、切断反応に伴って生成するHP由来の部分を意味する。

[0317] 5'-TTTTTT(HP)TTTTTT-3' について

生成物1 : pTTTTTT 分子式 $C_{60}H_{80}N_{12}O_{43}P_6$ FW 1843.2 [M-H]⁻ 1842.2 実測値 1841.6

HPLCの保持時間 8.5分

生成物2 : TTTTTTpR^{Nu} 分子式 $C_{66}H_{91}N_{13}O_{45}P_6$ FW1972.3 [M-H]⁻ 1971.3 実測値 1971.0

HPLCの保持時間 10.6分

5'-TTTTCTT(HP)TCCTTTT-3' について

生成物1 : pTCCTTTT 分子式 $C_{68}H_{91}N_{16}O_{48}P_7$ FW 2117.3 [M-H]⁻ 2116.3 実測値 2116.2

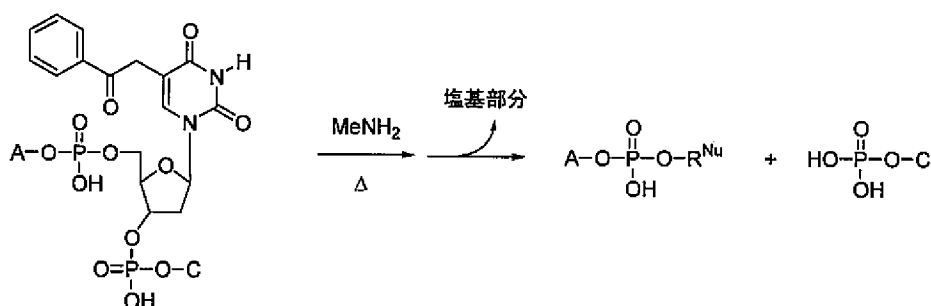
HPLCの保持時間 7.3分

生成物2 : TTTTCTTpR^{Nu} 分子式 $C_{75}H_{103}N_{16}O_{51}P_7$ FW 2261.5 [M-H]⁻ 2260.5 実測値 2260.5

HPLCの保持時間 9.9分

メチルアミンによるDNAオリゴマーの分解反応を下記に示す。下記反応式において、左側の生成物が生成物2に、右側の生成物が生成物1に、それぞれ対応する。

[化43]



[0318] 前記の反応式において、A及びCは、上記で定義された式Iと同様の意味である。生成物の分子量より、R^{Nu}は、分解したヌクレオチドに求核剤が一分子付加して非天然型塩基が除去されてできたものと予想される。

[0319] [使用例8-2 : メチルアミン又はエチレンジアミンによる5-(2-オキシ-2-フェニルエチル)-2'-デオキシウリジンを含むDNAオリゴマーの切断反応速度の比

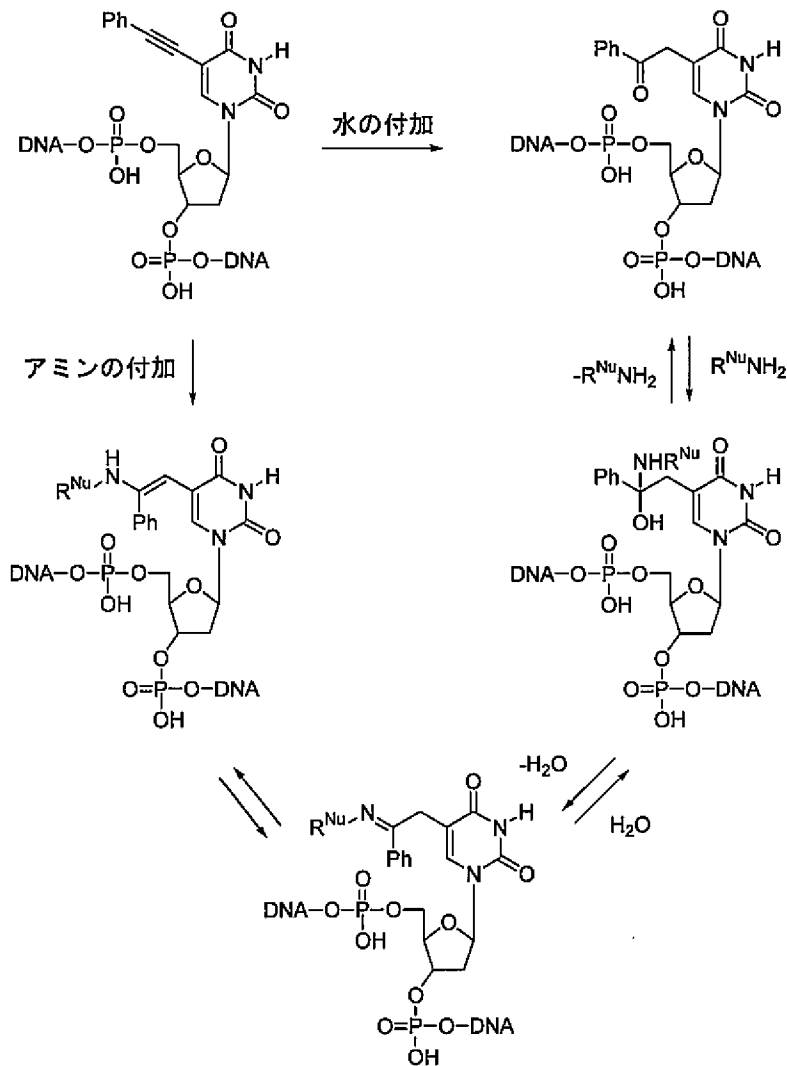
較]

スクリーチューブに30 μ Lの5' -T₆(HP)T₆-3' 又は5' -TTTTCTT(HP)TCCTTTT-3' の水溶液(ストランド濃度100 μ M)と、30 μ Lのメチルアミン40%水溶液又はエチレンジアミンを加え、水浴中で70℃、2時間加熱した。反応混合物を酢酸で中和し、逆相HPLCにより分析した(8-20% CH₃CN/50 mM ギ酸アンモニウム水溶液, 20分, 254 nmで検出)。5' -T₆(HP)T₆-3' の反応混合物のHPLCチャートを図63に、5' -TTTTCTT(HP)TCCTTTT-3' の反応混合物のHPLCチャートを図64に、それぞれ示す。

[0320] 5' -T₆(HP)T₆-3' の5' -側の切断生成物である5' -T₆p-3' のピーク面積に基づき定量したところ、5' -T₆(HP)T₆-3' の5' -側の切断産物の量は、メチルアミン処理の方がエチレンジアミン処理よりも2.4倍多いことが計算された。また、5' -TTTTCTT(HP)TCCTTTT-3' の5' -側の切断生成物である5' -TTTTCTTp-3' のピーク面積に基づき定量したところ、5' -TTTTCTT(HP)TCCTTTT-3' の5' -側の切断産物の量は、メチルアミン処理の方がエチレンジアミン処理よりも2.1倍多いことが計算された。この結果より、メチルアミン又はエチレンジアミンの一級アミンを用いるDNAオリゴマーの切断反応において、最も反応速度の速いものはメチルアミンを用いる切断反応であることが示唆された。

[0321] 合成例8で得られたHPは、合成例1で得られたPの三重結合に水が付加した構造を有する。Pは、求核剤として用いるアミン存在下で加熱することにより、三重結合にアミンが付加したアミン付加体を形成し、さらに互変異性及びアミンの脱離を経由して、HPを形成する可能性がある。

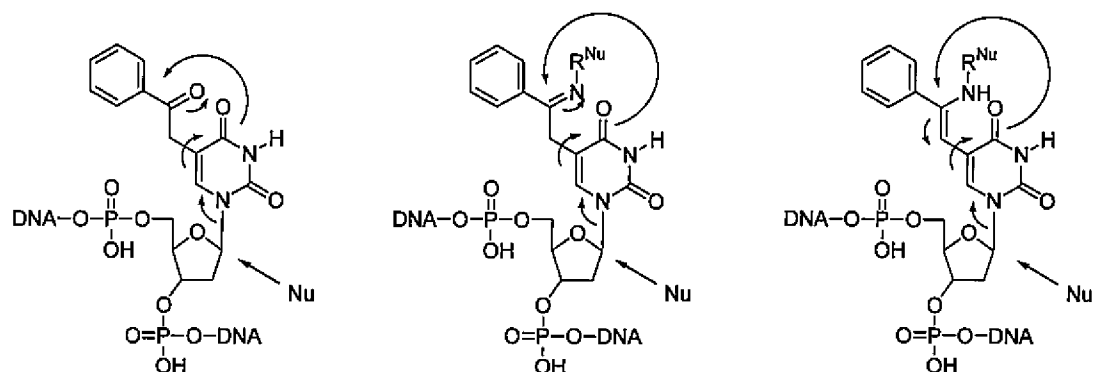
[化44]



[0322] 上記の反応式において、 R^{Nu} は、求核剤付加に伴って生じる基を意味する。

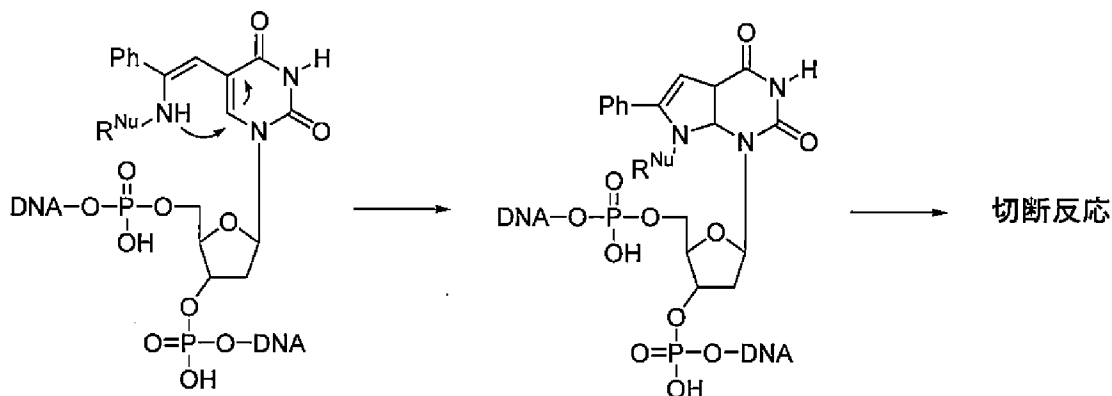
上記のオリゴデオキシヌクレオチドは、下記のような分子内環化反応を生じながら非天然塩基に由来する部分が脱離して、切断されると考えられる。

[化45]



[0323] 或いは、アミン付加体を含むオリゴデオキシヌクレオチドは、下記のような分子内環化反応を生じた後、切断されるとも考えられる。

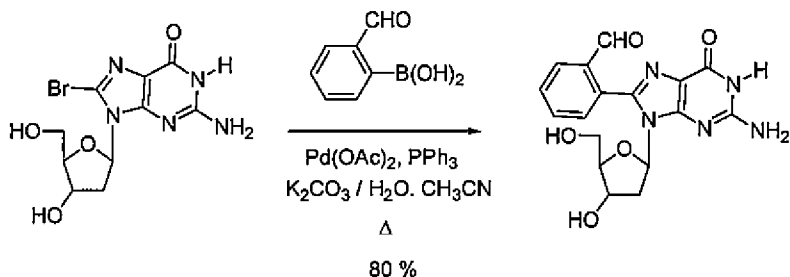
[化46]



[0324] <17. 合成例9：8-(2-ホルミルフェニル)-2'-デオキシグアノシンを含むDNAオリゴマー>

[合成例9-1：8-(2-ホルミルフェニル)-2'-デオキシグアノシンの合成]

[化47]



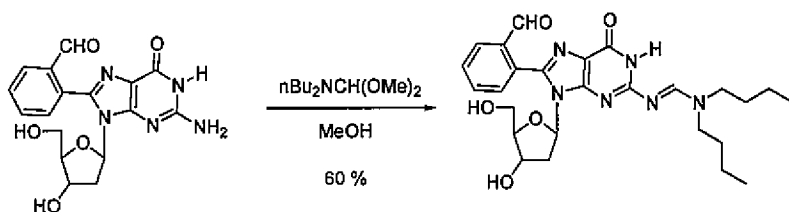
[0325] 8-ブromo-2'-デオキシグアノシンは、公知文献 (Cation-Mediated Energy Transfer in G-Quadruplexes Revealed by an Internal Fluorescent Probe. Dumas A. 及びLuedtke, N. W. J. Am. Chem. Soc. 2010年, 132, p. 18004-18007) に従って合成した。3.46 g(10.0 mmol)の8-ブromo-2'-デオキシグアノシン(分子量346.14)と3.00 g(20.0 mmol)の2-ホルミルベンゼンボロン酸(分子量149.94)と224 mg(1.00 mmol)の酢酸パラジウム(分子量224.51)と787 mg(3.00 mmol)のトリフェニルホスフィン(分子量262.29)と2.76 g(20.0 mmol)の炭酸カリウムをナスフラスコに加え、そこへ80 mLのアセトニトリルと40 mLの水を加え、80℃で4時間攪拌した。反応液の溶媒を減圧留去し、メタノ

ールを200 mL加え、ろ過した。残渣をメタノールで洗浄した。ろ液を回収し、溶媒を減圧留去し、シリカゲルカラムで目的物質を精製した(展開溶媒は10~20% MeOH/CH₂Cl₂)。目的のフラクションの溶媒を減圧留去し、少量のメタノールとアセトニトリルで生じる沈殿をろ過し、減圧下で乾燥した。ろ液を濃縮して少量のメタノールとアセトニトリルで生じる沈殿をろ過し、減圧下で乾燥する操作を計3回繰り返し、2.97 g(8.00 mmol, 収率80%)の目的物質(分子量371.35)を、薄黄色粉末として得た。

[0326] ¹H NMR(400 MHz, DMSO-d₆) δ 10.80 (br, 1H), 9.85 (s, 1H), 7.98 (dd, J = 7.8, 1.4 Hz, 1H), 7.84–7.80 (m, 1H), 7.75–7.67 (m, 2H), 6.47 (br, 2H), 5.92 (dd, J = 8.2, 6.4 Hz, 1H), 5.10 (d, J = 4.1 Hz, 1H), 4.89–4.86 (m, 1H), 4.21–4.18 (m, 1H), 3.72–3.69 (m, 1H), 3.49–3.38 (m, 2H), 2.98 (ddd, J = 13.2, 8.2, 5.9 Hz, 1H), 4.20 (ddd, J = 13.3, 6.4, 2.3 Hz, 1H); ¹³C NMR(100 MHz, DMSO-d₆) δ 191.7, 156.5, 153.3, 151.8, 143.4, 135.5, 133.5, 132.5, 131.4, 130.1, 128.4, 117.5, 87.8, 84.6, 71.0, 61.9, 36.8; HRMS (ESI): C₁₇H₁₇N₅O₅Naに対する計算値: 394.1127 [M+Na]⁺; 実測値: 394.1115.

[合成例9-2: 2-N-{N', N' -ジ(n-ブチル)ホルムアミジン}-8-(2-ホルミルフェニル)-2'-デオキシグアノシンの合成]

[化48]



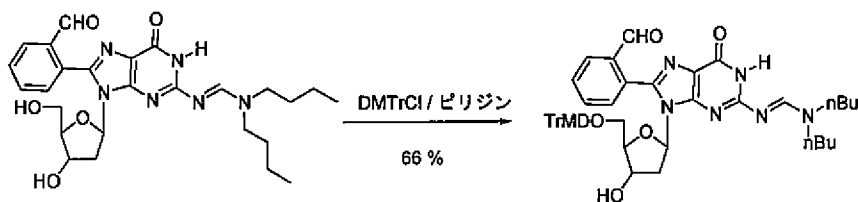
[0327] 2.32 g(6.25 mmol)の8-(2-ホルミルフェニル)-2'-デオキシグアノシン(分子量371.35)を20 mLのメタノールに溶解した。得られた溶液に11.7 mL(50.0 mmol)のN,N-ジ(n-ブチル)ホルムアミドジメチルアセタール(分子量203.32、密度0.87 g/mL) (Dialkylformamidines: depurination resistant N6-protecting group for deoxyadenosine. Froehler, B. C.及びMatteucci, M. D.

Tetrahedron Letters 1983年, 11, p. 8031-8036)を加え、25℃で2時間撹拌した。溶媒を減圧留去し、シリカゲルカラムで目的物質を精製した(展開溶媒は5~10% MeOH/CH₂Cl₂)。目的のフラクションの溶媒を減圧留去し、少量の酢酸エチルとヘキサンで生じる沈殿をろ過し、減圧下で乾燥した。2.10 g(4.11 mmol, 収率66%)の目的物質(分子量510.59)を、薄黄色粉末として得た。

[0328] ¹H NMR(400 MHz, DMSO-d₆) δ 11.51 (s, 1H), 9.89 (s, 1H), 8.53 (s, 1H), 8.02-8.00 (m, 1H), 7.87-7.83 (m, 1H), 7.77-7.73 (m, 1H), 7.69-7.67 (m, 1H), 5.92 (dd, J = 7.8, 6.9 Hz, 1H), 5.16 (d, J = 4.2 Hz, 1H), 4.85-4.82 (m, 1H), 4.33-4.29 (m, 1H), 3.76-3.73 (m, 1H), 3.58-3.35 (m, 6H), 3.14 (ddd, J = 13.7, 7.3, 6.4 Hz, 1H), 2.05 (ddd, J = 13.3, 6.4, 2.8 Hz, 1H), 1.63-1.54 (m, 4H), 1.35-1.23 (m, 4H), 0.94-0.89 (m, 6H); ¹³C NMR(100 MHz, DMSO-d₆) δ 191.7, 157.8, 157.4, 157.3, 150.5, 144.6, 135.5, 133.6, 132.1, 131.3, 130.2, 128.7, 120.5, 87.8, 85.0, 71.0, 62.0, 51.2, 44.9, 37.3, 30.3, 28.5, 19.6, 19.1, 13.7, 13.5; HRMS (ESI): C₂₆H₃₄N₆O₅Naに対する計算値: 533.2488 [M+Na]⁺; 実測値: 533.2481.

[合成例9-3: 2-N-{N', N'-ジ(n-ブチル)ホルムアミジン}-8-(2-ホルミルフェニル)-5'-O-ジメトキシトリチル-2'-デオキシグアノシンの合成]

[化49]



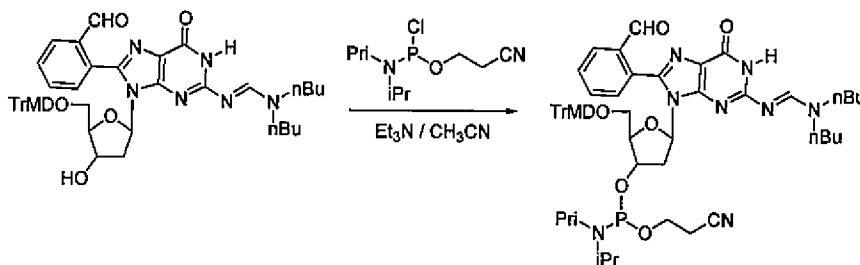
[0329] 2.10 g(4.11 mmol)の2-N-{N', N'-ジ(n-ブチル)ホルムアミジン}-8-(2-ホルミルフェニル)-2'-デオキシグアノシン(分子量510.59)を16 mLのピリジンに溶解した。得られた溶液に1.53 g(4.52 mmol)の4,4'-ジメトキシトリチルクロリド(分子量338.83)を加え、25℃で1時間撹拌した。約10 mLのメタノールを加え、溶媒を減圧留去した。残渣に少量の塩化メチレンとヘキサンを加え、3回共沸した後、シリカゲルカラムで目的物質を精製した(展開溶媒

は2% Et₃N, AcOEt : n-ヘキサン=8 : 2~AcOEt)。目的のフラクションの溶媒を減圧留去し、少量の塩化メチレンとヘキサンを加え共沸した。2.20 g(2.71 mmol, 収率66%)の目的生成物(分子量812.95)を、薄黄色粉末として得た。

[0330] ¹H NMR(400 MHz, DMSO-d₆) δ 11.52 (s, 1H), 9.88 (s, 1H), 8.38 (s, 1H), 7.98 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.80–7.79 (m, 2H), 7.74–7.70 (m, 1H), 7.31–7.29 (m, 2H), 7.20–7.15 (m, 7H), 6.79–6.72 (m, 4H), 6.00 (dd, J = 8.0, 4.8 Hz, 1H), 5.19 (d, J = 5.1 Hz, 1H), 4.54–4.48 (m, 1H), 3.84–3.80 (m, 1H), 3.70 (s, 3H), 3.69 (s, 3H), 3.47–3.43 (m, 2H), 3.31–3.26 (m, 1H), 3.21–3.13 (m, 3H), 3.07–3.04 (m, 1H), 2.17 (ddd, J = 13.7, 8.0, 5.8 Hz, 1H), 1.59–1.51 (m, 2H), 1.45–1.36 (m, 2H), 1.33–1.24 (m, 2H), 1.15–1.09 (m, 2H), 0.93–0.89 (m, 3H), 0.79–0.75 (m, 3H); ¹³C NMR(100 MHz, DMSO-d₆) δ 191.6, 158.0, 157.9, 157.5, 157.3, 156.9, 150.3, 144.9, 144.8, 135.7, 135.6, 133.4, 132.5, 131.2, 130.1, 129.6, 129.4, 128.3, 127.6, 126.5, 120.4, 112.9, 85.4, 85.2, 84.0, 70.6, 63.6, 55.0, 54.9, 51.2, 45.0, 37.6, 30.2, 28.5, 19.6, 19.0, 13.7, 13.5; HRMS (ESI): C₄₇H₅₃N₆O₇に対する計算値: 813.3976 [M+H]⁺; 実測値: 813.3976.

[合成例9-4 : 2-N-{N', N' -ジ(n-ブチル)ホルムアミジン}-8-(2-ホルミルフェニル)-5' -O-ジメトキシトリチル-2' -デオキシグアノシン-3' -N,N-ジイソプロピル(シアノエチル)ホスホロアミダイトの合成]

[化50]

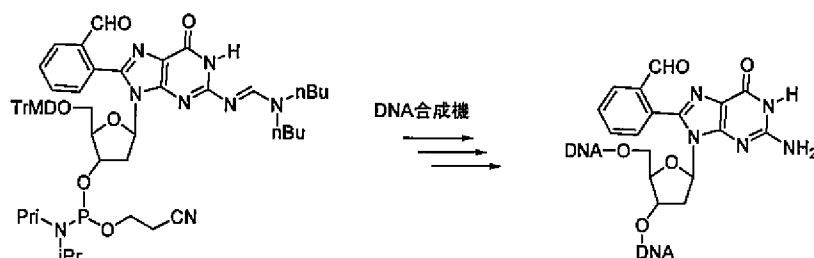


[0331] 163 mg(0.200 mmol)の2-N-{N', N' -ジ(n-ブチル)ホルムアミジン}-8-(2-ホルミルフェニル)-5' -O-ジメトキシトリチル-2' -デオキシグアノシン(分子量812.95)をナスフラスコに入れ5 mLのCH₃CNと223 μL(1.600 mmol)のトリ

エチルアミン(分子量101.19, 比重0.726 g/mL)を加え、攪拌し、さらに178 μ L(0.800 mmol)の2-シアノエチル N,N,N',N'-テトライソプロピルホスホロアミダイト(分子量236.68, 比重1.061 g/mL)を加え、室温で30分間攪拌した。25 mLのAcOEtと25 mLの飽和食塩水を加え、分液し、有機層をさらに2回飽和食塩水で洗った。得られた有機層を、無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、フィルターでろ過し、ろ液の溶媒を減圧留去した。アセトニトリルで3回共沸した後、10 mLのアセトニトリルを加えて溶解し、少量のモレキュラーシーブを加えた。DNA自動合成機に取り付けてDNA合成に使用した。

[0332] [合成例9-5: 8-(2-ホルミルフェニル)-2'-デオキシグアノシン(fPG)を含むDNAオリゴマーの合成]

[化51]

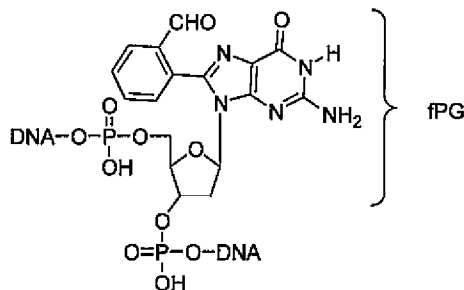


[0333] 通常のDNA自動合成機のDNA合成のプロトコールで1 μ molスケール、DMTr ONでホスホロアミダイト法により合成した。担体からの切り出しは28%アンモニア水で行い、脱保護は25℃で16時間静置することにより行った。脱保護後、アンモニアを遠心濃縮装置により減圧留去し、DNAを含む溶液を0.45 μ mのフィルターに通した後、逆相HPLCによりメインピークを精製し(0-50% CH₃CN/50 mM ギ酸アンモニウム水溶液, 20分, 254 nmで検出)、遠心濃縮装置と凍結乾燥によりギ酸アンモニウムと溶媒を留去した。得られた残渣に100 μ Lの80%酢酸水溶液を加え、よく混合し、25℃で30分間静置した。その後、前記混合物に蒸留水を約1 mLとなるように加えて、0.45 μ mのフィルターに通した後、逆相HPLCにより13~14分の保持時間に溶出されたメインピークを精製し(5-20% CH₃CN/50 mM ギ酸アンモニウム水溶液, 20分, 254 nmで検出)、遠心濃縮装置と凍結乾燥によりギ酸アンモニウムと溶媒とを留去した。得られたDNAオリ

ゴマーはMALDI TOF-MS測定により同定した。合成したDNAオリゴマーは、約500 μ Lの蒸留水を加えて水溶液とした。

[0334] 以下において、8-(2-ホルミルフェニル)-2'-デオキシグアノシンン：

[化52]



[0335] を「fPG」で示す。

[0336] DNAの濃度決定は、fPGをCと近似して260 nmのモル吸光係数を計算し、260 nmのUV吸収より濃度を計算した。

[0337] 合成したDNAオリゴマーの逆相HPLCクロマトグラムを図65及び66に示す。

[0338] 合成したDNAオリゴマーの上記逆相HPLCにおける保持時間は以下の通りである。

[0339] 5'-TTTTTT(fPG)TTTTTT-3' について14.6分 (配列番号30)

5'-TTTTCTT(fPG)TCCTTTT-3' について14.0分 (配列番号31)

合成したDNAオリゴマーのMALDI TOF-MSのデータは以下の通りである。

[0340] 5'-TTTTTT(fPG)TTTTTT-3' について分子式 $C_{137}H_{173}N_{29}O_{89}P_{12}$ 、 $[M-H]^-$ の計算値 4020.7、実測値 4022.0 (配列番号30)

5'-TTTTCTT(fPG)TCCTTTT-3' について分子式 $C_{154}H_{196}N_{36}O_{100}P_{14}$ 、 $[M-H]^-$ の計算値 4584.0、実測値 4584.3 (配列番号31)

<18. 使用例9：8-(2-ホルミルフェニル)-2'-デオキシグアノシンン(fPG)を含むDNAオリゴマー>

[使用例9-1：8-(2-ホルミルフェニル)-2'-デオキシグアノシンン(fPG)を含むDNAオリゴマーのメチルアミンによる切断反応と生成物の同定]

スクリーチューブに300 μ Lの5'-T₆(fPG)T₆-3' 又は5'-TTTTCTT(fPG)TCC TTTT-3' の水溶液(ストランド濃度100 μ M)と300 μ Lのメチルアミン (40% 水

溶液) とを加え、水浴中で70℃、6時間加熱した。反応後は、メチルアミンを遠心濃縮装置で減圧留去し、逆相HPLCにより分析して生成物を分取した(5-20 % CH₃CN/50 mM ギ酸アンモニウム水溶液, 20分, 254 nmで検出)。分取した生成物は、MALDI TOF-MSにより分子量を測定した。

[0341] 合成した各DNAオリゴマーの反応後の逆相HPLCクロマトグラムを図67及び68に示す。

[0342] 各DNAオリゴマーにおける生成物1及び2のMALDI TOF-MSのデータは以下の通りである。以下において、「R^{Nu}」は、切断反応に伴って生成するfPG由来の部分を意味する。

[0343] 5' -TTTTTT(fPG)TTTTTT-3' について

生成物1 : pTTTTTT 分子式C₆₀H₈₀N₁₂O₄₃P₆ FW 1843.2 [M-H]⁻ 1842.2 実測値 1842.2

HPLCの保持時間 12.0分

生成物2 : TTTTTTpR^{Nu} 分子式C₆₆H₉₁N₁₃O₄₅P₆ FW 1972.3 [M-H]⁻ 1971.3 実測値 1971.0

HPLCの保持時間 13.9分

5' -TTTTCTT(fPG)TCCTTTT-3' について

生成物1 : pTCCTTTT 分子式C₆₈H₉₁N₁₆O₄₈P₇ FW 2117.3 [M-H]⁻ 2116.3 実測値 2116.2

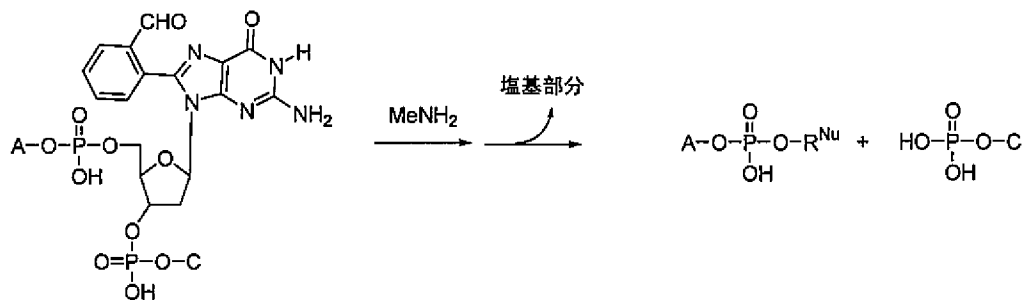
HPLCの保持時間11.1分

生成物2 : TTTTCTTpR^{Nu} 分子式C₇₅H₁₀₃N₁₆O₅₁P₇ FW 2261.5 [M-H]⁻ 2260.5 実測値 2260.5

HPLCの保持時間 13.3分

メチルアミンによるDNAオリゴマーの分解反応を下記に示す。下記反応式において、左側の生成物が生成物2に、右側の生成物が生成物1に、それぞれ対応する。

[化53]

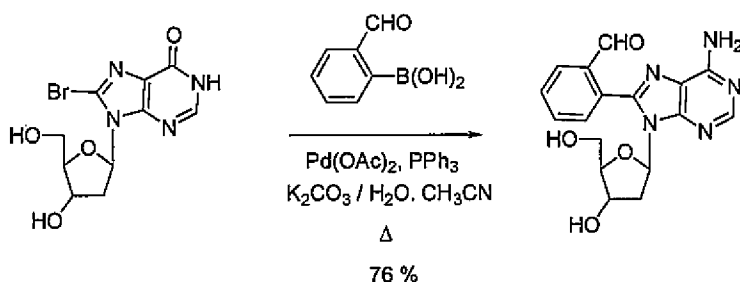


[0344] 前記の反応式において、A及びCは、上記で定義された式Iと同様の意味である。生成物の分子量より、 R^{Nu} は、分解したヌクレオチドに求核剤が一分子付加して非天然型塩基が除去されてできたものと予想される。

[0345] <19. 合成例10：8-(2-ホルミルフェニル)-2'-デオキシアデノシンを含むDN Aオリゴマー>

[合成例10-1：8-(2-ホルミルフェニル)-2'-デオキシアデノシンの合成]

[化54]



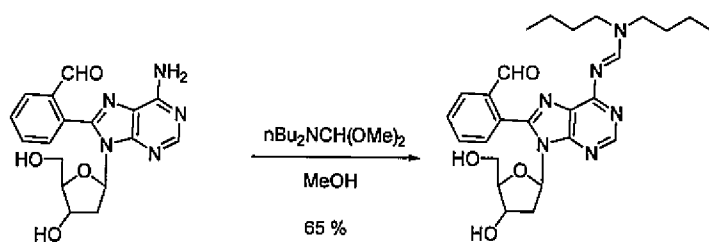
[0346] 8-ブromo-2'-デオキシアデノシンは、公知文献（特開2011-37796号公報）に従って合成した。2.20 g(6.66 mmol)の8-ブromo-2'-デオキシアデノシン(分子量330.14)と2.00g(13.3 mmol)の2-ホルミルベンゼンボロン酸(分子量149.94)と150 mg(0.666 mmol)の酢酸パラジウム(分子量224.51)と525 mg(2.00 mmol)のトリフェニルホスフィン(分子量262.29)と1.84 g(13.3 mmol)の炭酸カリウムをナスフラスコに加え、そこへ40 mLのアセトニトリルと20 mLの水を加え、80℃で4時間攪拌した。反応液の溶媒を減圧留去し、メタノールを200 mL加え、ろ過した。残渣をメタノールで洗浄した。ろ液を回収し、溶媒を減圧留去し、シリカゲルカラムで目的物質を精製した(展開溶媒は10% $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$)。目的のフラクションの溶媒を減圧留去し、少量のアセトニトリルに溶か

し、塩化メチレンを加え、さらにヘキサンを加えることで生じる沈殿をろ過し、減圧下で乾燥した。1.81 g(5.09 mmol, 収率76%)の目的物質(分子量355.35)を、白色粉末として得た。

[0347] ^1H NMR(400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.93 (s, 1H), 8.18 (s, 1H), 8.09–8.07 (m, 1H), 7.90–7.80 (m, 2H), 7.74–7.72 (m, 1H), 7.46 (br, 2H), 5.90 (dd, J = 8.5, 6.2 Hz, 1H), 5.49 (dd, J = 8.3, 4.1 Hz, 1H), 5.17 (d, J = 4.1 Hz, 1H), 4.39–4.35 (m, 1H), 3.82–3.79 (m, 1H), 3.65–3.59 (m, 1H), 3.50–3.44 (m, 1H), 3.19 (ddd, J = 12.8, 8.7, 6.0 Hz, 1H), 2.06 (ddd, J = 13.0, 6.2, 1.8 Hz, 1H); ^{13}C NMR(100 MHz, DMSO- d_6) δ 191.7, 156.2, 152.3, 149.6, 147.4, 135.4, 133.8, 131.5, 131.4, 130.8, 129.5, 119.3, 88.3, 85.7, 71.3, 62.2, 37.4; HRMS (ESI): $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_5\text{O}_4$ に対する計算値: 356.1359 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 実測値: 356.1364.

[合成例10-2: 6-N-{N', N' -ジ(n-ブチル)ホルムアミジン}-8-(2-ホルミルフェニル)-2' -デオキシアデノシンの合成]

[化55]



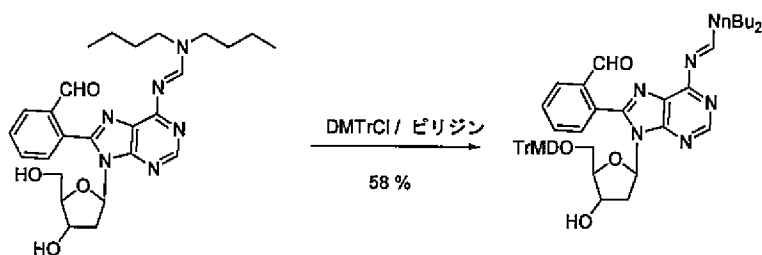
[0348] 1.55 g(4.36 mmol)の8-(2-ホルミルフェニル)-2' -デオキシアデノシン(分子量355.35)を20 mLのメタノールに溶解し、得られた溶液に8.14 mL(34.8 mmol)のN,N-ジ(n-ブチル)ホルムアミドジメチルアセタール(分子量203.32、密度0.87 g/mL)(Dialkylformamidines: depurination resistant N6-protecting group for deoxyadenosine. Froehler, B. C.及びMatteucci, M. D. Tetrahedron Letters 1983年, 11, p. 8031-8036)を加え、25℃で2時間攪拌した。溶媒を減圧留去し、シリカゲルカラムで目的物質を精製した(展開溶媒は2~5% MeOH/ CH_2Cl_2)。目的のフラクションの溶媒を減圧留去し、少量の塩化メチレンを加え、ジエチルエーテルを加え、さらにヘキサンを加えることで生じる

沈殿をろ過し、減圧下で乾燥した。1.40 g(2.83 mmol, 収率65%)の目的物質(分子量494.59)を、白色粉末として得た。

[0349] ^1H NMR(400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.92 (s, 1H), 8.91 (s, 1H), 8.45 (s, 1H), 8.09 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.91–7.82 (m, 2H), 7.74 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 5.94 (dd, J = 7.8, 6.8 Hz, 1H), 5.28 (dd, J = 7.6, 4.4 Hz, 1H), 5.18 (d, J = 4.1 Hz, 1H), 4.40–4.36 (m, 1H), 3.81–3.77 (m, 1H), 3.64–3.41 (m, 6H), 3.25–3.18(m, 1H), 2.09–2.04 (m, 1H), 1.62–1.52 (m, 4H), 1.33–1.22 (m, 4H), 0.94–0.83 (m, 6H); ^{13}C NMR(100 MHz, DMSO- d_6) δ 191.8, 159.5, 157.9, 151.7, 151.6, 149.3, 135.5, 133.8, 131.5, 131.3, 130.9, 129.7, 125.8, 88.2, 85.5, 71.2, 62.1, 50.9, 44.4, 37.2, 30.4, 28.7, 19.6, 19.1, 13.7, 13.5; HRMS (ESI): $\text{C}_{26}\text{H}_{35}\text{N}_6\text{O}_4$ に対する計算値: 495.2720 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 実測値: 495.2718.

[合成例10-3 : 6-N-{N', N' -ジ(n-ブチル)ホルムアミジン}-8-(2-ホルミルフェニル)-5' -O-ジメトキシトリチル-2' -デオキシアデノシンの合成]

[化56]

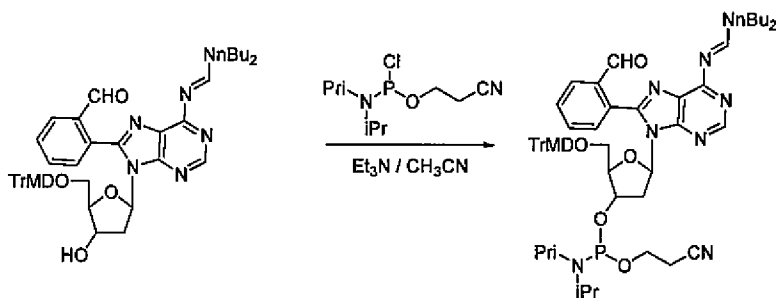


[0350] 1.31 g(2.64 mmol)の6-N-{N', N' -ジ(n-ブチル)ホルムアミジン}-8-(2-ホルミルフェニル)-2' -デオキシグアノシン (分子量494.59)を10 mLのピリジンに溶解した。得られた溶液に991 mg(2.92 mmol)の4,4' -ジメトキシトリチルクロリド(分子量338.83)を加え、25℃で1時間攪拌した。約10 mLのメタノールを加え、溶媒を減圧留去した。残渣に少量の塩化メチレンとヘキサンを加え、3回共沸した後、シリカゲルカラムで目的物質を精製した(展開溶媒は2% Et_3N , 2% $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$)。目的のフラクションの溶媒を減圧留去し、少量の塩化メチレンとヘキサンを加え共沸した。1.24 g(1.56 mmol, 収率59%)の目的生成物(分子量796.95)を、白色粉末として得た。

[0351] ^1H NMR(400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.89 (s, 1H), 8.88 (s, 1H), 8.25 (s, 1H), 8.06–8.04 (m, 1H), 7.88–7.78 (m, 3H), 7.33–7.31 (m, 2H), 7.21–7.15 (m, 7H), 6.81–6.73 (m, 4H), 5.98 (t, J = 6.9 Hz, 1H), 5.25 (d, J = 4.6 Hz, 1H), 4.57–4.53 (m, 1H), 3.94–3.90 (m, 1H), 3.71 (s, 3H), 3.69 (s, 3H), 3.59–3.53 (m, 2H), 3.44–3.32 (m, 3H), 3.20–3.12 (m, 2H), 2.11 (ddd, J = 13.0, 7.3, 4.3 Hz, 1H), 1.62–1.52 (m, 4H), 1.34–1.23 (m, 4H), 0.90–0.87 (m, 6H); ^{13}C NMR(100 MHz, DMSO- d_6) δ 191.6, 159.2, 157.9, 157.9, 157.7, 151.8, 149.5, 145.0, 135.7, 135.60, 135.55, 133.6, 131.7, 131.4, 130.7, 129.7, 129.5, 129.1, 127.6, 126.5, 125.6, 113.0, 112.9, 85.8, 85.2, 84.8, 71.0, 63.6, 54.94, 54.90, 50.9, 44.4, 36.3, 30.4, 28.7, 19.6, 19.1, 13.7, 13.5; HRMS (ESI): $\text{C}_{47}\text{H}_{53}\text{N}_6\text{O}_6$ に対する計算値: 797.4027 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 実測値: 797.4046.

[合成例10-4: 6-N-{N', N' -ジ(n-ブチル)ホルムアミジン}-8-(2-ホルミルフェニル)-5' -0-ジメトキシトリチル-2' -デオキシアデノシン-3' -N,N-ジイソプロピル(シアノエチル)ホスホロアミダイトの合成]

[化57]

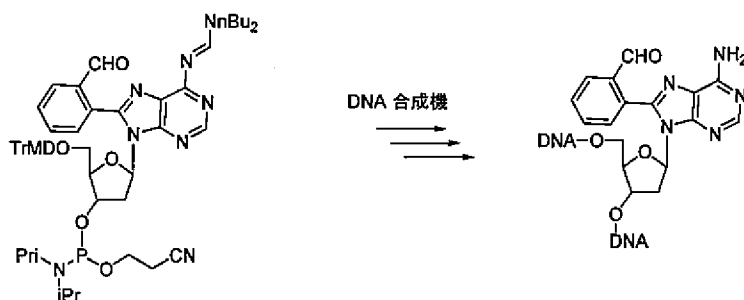


[0352] 159 mg(0.200 mmol)の6-N-{N', N' -ジ(n-ブチル)ホルムアミジン}-8-(2-ホルミルフェニル)-5' -0-ジメトキシトリチル-2' -デオキシアデノシン(分子量796.95)をナスフラスコに入れ5 mLの CH_3CN と223 μL (1.600 mmol)のトリエチルアミン(分子量101.19, 比重0.726 g/mL)を加え、攪拌し、さらに178 μL (0.800 mmol)の2-シアノエチル N,N,N', N' -テトライソプロピルホスホロジアミダイト(分子量236.68, 比重1.061 g/mL)を加え、室温で30分間攪拌した。25 mLのAcOEtと25 mLの飽和食塩水を加え、分液し、有機層をさらに2回飽

和食塩水で洗った。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、フィルターでろ過し、ろ液の溶媒を減圧留去した。アセトニトリルで3回共沸した後、10 mLのアセトニトリルを加えて溶解し、少量のモレキュラーシーブを加えた。DNA自動合成機に取り付けてDNA合成に使用した。

[0353] [合成例10-5：8-(2-ホルミルフェニル)-2'-デオキシアデノシン(fPA)を含むDNAオリゴマーの合成]

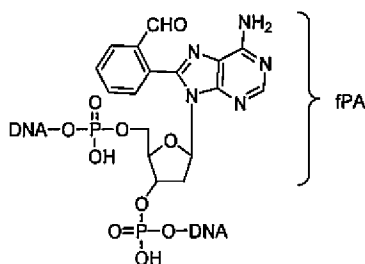
[化58]



[0354] 通常のDNA自動合成機のDNA合成のプロトコールで1 μ molスケール、DMTr ONでホスホロアミダイト法により合成した。切り出しは28%アンモニア水で行い、脱保護は25℃で16時間静置することにより行った。脱保護後、アンモニアを遠心濃縮装置により減圧留去し、DNAを含む溶液を0.45 μ mのフィルターに通した後、逆相HPLCによりメインピークを精製し(0-50% CH₃CN/50 mM ギ酸アンモニウム水溶液, 20分, 254 nmで検出)、遠心濃縮装置と凍結乾燥によりギ酸アンモニウムと溶媒を留去した。得られた残渣に100 μ Lの80%酢酸水溶液を加え、よく混合し、25℃で30分間静置した。その後、前記混合物に蒸留水を約1 mLとなるように加えて、0.45 μ mのフィルターに通した後、逆相HPLCで13-14分の保持時間に溶出されたメインピークを精製し(5-20% CH₃CN/50 mM ギ酸アンモニウム水溶液, 20分, 254 nmで検出)、遠心濃縮装置と凍結乾燥によりギ酸アンモニウムと溶媒とを留去した。得られたDNAオリゴマーはMALDI TOF-MS測定により同定した。合成したDNAオリゴマーは、約500 μ Lの蒸留水を加えて水溶液とした。

[0355] 以下において、8-(2-ホルミルフェニル)-2'-デオキシアデノシン：

[化59]



[0356] を「fPA」で示す。

[0357] DNAの濃度決定は、fPAをCと近似して260 nmのモル吸光係数を計算し、260 nmのUV吸収より濃度を計算した。

[0358] 合成したDNAオリゴマーの逆相HPLCクロマトグラムを図69及び70に示す。

[0359] 合成したDNAオリゴマーの上記逆相HPLCにおける保持時間は以下の通りである。

[0360] 5' -TTTTTT(fPA)TTTTTT-3' について14.9分 (配列番号32)

5' -TTTTCTT(fPA)TCCTTTT-3' について13.8分 (配列番号33)

合成したDNAオリゴマーのMALDI TOF-MSのデータは以下の通りである。

[0361] 5' -TTTTTT(fPA)TTTTTT-3' について分子式 $C_{137}H_{173}N_{29}O_{88}P_{12}$ 、 $[M-H]^-$ の計算値 4004.7、実測値 4005.2 (配列番号32)

5' -TTTTCTT(fPA)TCCTTTT-3' について分子式 $C_{154}H_{196}N_{36}O_{99}P_{14}$ 、 $[M-H]^-$ の計算値 4568.0、実測値 4568.5 (配列番号33)

<20. 使用例10: 8-(2-ホルミルフェニル)-2' -デオキシアデノシン(fPA)を含むDNAオリゴマー>

[使用例10-1: 8-(2-ホルミルフェニル)-2' -デオキシアデノシン(fPA)を含むDNAオリゴマーのメチルアミンによる切断反応と生成物の同定]

スクリーチューブに300 μ Lの5' -T₆(fPA)T₆-3' 又は5' -TTTTCTT(fPA)TCC TTTT-3' の水溶液(ストランド濃度 100 μ M)と300 μ Lのメチルアミン (40% 水溶液) とを加え、水浴中で70℃、6時間加熱した。反応後は、メチルアミンを遠心濃縮装置で減圧留去し、逆相HPLCにより分析して生成物を分取した(5-20 % CH₃CN/50 mM ギ酸アンモニウム水溶液, 20分, 254 nmで検出)。分取した生

成物は、MALDI TOF-MSにより分子量を測定した。

[0362] 合成した各DNAオリゴマーの反応後の逆相HPLCクロマトグラムを図71及び72に示す。

[0363] 各DNAオリゴマーにおける生成物1及び2のMALDI TOF-MSのデータは以下の通りである。以下において、「R^{Nu}」は、切断反応に伴って生成するfPA由来の部分を意味する。

[0364] 5' -TTTTTT(fPA)TTTTTT-3' について

生成物1 : pTTTTTT 分子式 $C_{60}H_{80}N_{12}O_{43}P_6$ FW 1843.2 [M-H]⁻ 1842.2 実測値 1842.0と4019.5(後者の分子量ピークの方が大きい)

HPLCの保持時間 12.1分

生成物2 : TTTTTTpR^{Nu} 分子式 $C_{66}H_{91}N_{13}O_{45}P_6$ FW 1972.3 [M-H]⁻ 1971.3 実測値 1971.2

HPLCの保持時間 13.9分

5' -TTTTCTT(fPA)TCCTTTT-3' について

生成物1 : pTCCTTTT 分子式 $C_{68}H_{91}N_{16}O_{48}P_7$ FW 2117.3 [M-H]⁻ 2116.3 実測値 2116.2

HPLCの保持時間11.1分

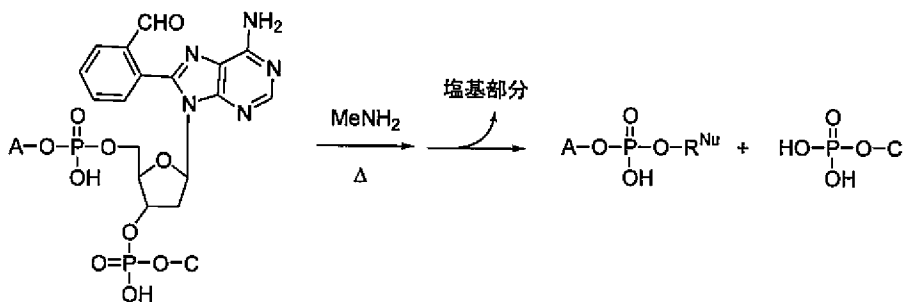
生成物2 : TTTTCTTpR^{Nu} 分子式 $C_{75}H_{103}N_{16}O_{51}P_7$ FW 2261.5 [M-H]⁻ 2260.5 実測値 2260.6

HPLCの保持時間 13.2分

生成物の分子量より、5' -T₆(fPA)T₆-3' に関しては、生成物1と同じ保持時間に別の生成物が同時に溶出されたことが予想される。メチルアミンとアデノシン類似体上のアルデヒドにより、安定なイミン(分子式 $C_{138}H_{176}N_{30}O_{87}P_{12}$ 、分子量4018.7)の生成が予想される。

[0365] メチルアミンによるDNAオリゴマーの分解反応を下記に示す。下記反応式において、左側の生成物が生成物2に、右側の生成物が生成物1に、それぞれ対応する。

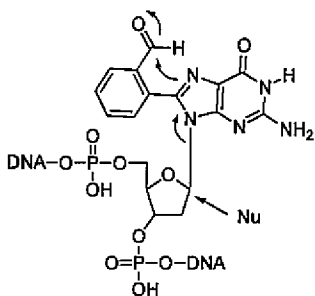
[化60]



[0366] 前記の反応式において、A及びCは、上記で定義された式Iと同様の意味である。生成物の分子量より、 R^{Nu} は、分解したヌクレオチドに求核剤が一分子付加して非天然型塩基が除去されてできたものと予想される。

[0367] fPG又はfPAを含むオリゴデオキシヌクレオチドは、下記のような分子内環化反応を生じながら非天然塩基に由来する部分が脱離して、切断されると考えられる。下記反応式は、fPGを含むオリゴデオキシヌクレオチドの場合であるが、fPAを含むオリゴデオキシヌクレオチドの場合も同様の反応が進行すると考えられる。

[化61]



[0368] <21. 使用例11: 5-エチニル-2'-デオキシウリジン (Pa) を含むDNAオリゴマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応による比較的長いDNAの増幅及び切断と増幅産物の連結反応>

[使用例11-1: 5-エチニル-2'-デオキシウリジン (Pa) を含むDNAオリゴマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応によるDNAの増幅]

合成例3と同様の手順で、下記の塩基配列を有する5-エチニル-2'-デオキシウリジン (Pa) を含むDNAオリゴマーを合成した。

[0369] LL1: 5'-AGG(Pa)GCTTTATGACTCTGCCG-3' (配列番号34)

- LL2 : 5' -AGGTGCTTTA(Pa)GACTCTGCCG-3' (配列番号35)
LL3 : 5' -ACCGAAGCG(Pa)GGTGTTCACGAAGG-3' (配列番号36)
LL4 : 5' -AGCG(Pa)GGTGTTCACGAAGG-3' (配列番号37)
LL5 : 5' -ACGC(Pa)TCGGTATCGCTCTG-3' (配列番号38)
LL6 : 5' -ACGCTTCGG(Pa)ATCGCTCTG-3' (配列番号39)
LL7 : 5' -ATAAAGCACCC(Pa)CGGTGGTGAAAGG-3' (配列番号40)
LL8 : 5' -ACC(Pa)CGGTGGTGAAAGGGCAG-3' (配列番号41)

鋳型DNAとして、 λ DNA(New England BioLabs社製 カタログ番号 N3011)を、酵素としてKOD FX Neo(TOYOBO 社製 カタログ番号 KFX-201)を用い、前記DNAオリゴマーをプライマーとして用いて、ポリメラーゼ連鎖反応を行った。ストランド濃度 $10\mu\text{M}$ プライマーを $2\mu\text{L}\times 2$ 、 $1\text{ ng}/\mu\text{L}$ λ DNAを $1\mu\text{L}$ 、各 2 mM dNTPsを $10\mu\text{L}$ 、KOD Fx neo(東洋紡社製 KFX-201)を $1\mu\text{L}$ (1 U)、及び製品添付のバッファー ($\times 2$) を $25\mu\text{L}$ 、ポリメラーゼ連鎖反应用チューブに加えた。前記反应用チューブを、TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice (登録商標) Gradient(Takara社製サーマルサイクラー、カタログ番号 TP600)に装着し、 94°C 、2分 $\rightarrow$ [98°C 、10秒 $\rightarrow 60^{\circ}\text{C}$ 、30秒 $\rightarrow 68^{\circ}\text{C}$ 、2分] $\times 30\rightarrow 4^{\circ}\text{C}$ の温度サイクルで反応させて、約 1.5 kb 及び約 2.3 kb のDNAを増幅した。LL1又はLL2とLL3又はLL4とのプライマーセットを用いることにより、約 1.5 kb のDNAが、LL5又はLL6とLL7又はLL8とのプライマーセットを用いることにより、約 2.3 kb のDNAが、それぞれ増幅された。ポリメラーゼ連鎖反応後の反応溶液 ($0.5\mu\text{L}$) を、1%アガロースゲル電気泳動で分析した。電気泳動後のゲルをエチジウムブロマイド染色して、DNAを蛍光検出した。エチジウムブロマイド染色後のゲルを図73に示す。なお、図中の写真は、白黒を反転させている。

[0370] 図73において、レーン1のバンドは、DNAマーカー (100 、 200 、 300 、 400 、 500 、 600 、 700 、 800 、 900 、 1000 、 1100 、 1200 、 1300 、 1400 、 1500 及び 2072 bp 、強く現れたバンドは、 600 、 1500 及び 2072 bp のDNAである)を示す。レーン2のバンドは、LL1及びLL3をプライマーセットとして用いた場合の増幅産物のDNAを示しており、レーン3のバンドは、LL2及びLL4をプライマーセットとし

て用いた場合の増幅産物のDNAを示しており、レーン4のバンドは、LL5及びLL8をプライマーセットとして用いた場合の増幅産物のDNAを示しており、レーン5のバンドは、LL6及びLL7をプライマーセットとして用いた場合の増幅産物のDNAを示している。

[0371] [使用例11-2：5-エチニル-2'-デオキシウリジン (Pa) を含むDNA増幅産物の切断反応及び得られた5'末端リン酸化DNA断片の連結反応 (1)]

使用例11-1で調製された2種類のDNA増幅産物を当量混合した。得られた混合物に、1体積分の40%メチルアミン水溶液を加えて、よく混合した。得られた混合物を、25℃で2日間(48時間)静置した。遠心濃縮装置を用いて、加熱せずにメチルアミンを前記溶液中から除去した。その後、水を加えて、元の反応溶液と同じ体積に調製した。この溶液を2 μ L、水を6.5 μ L、Taq DNAリガーゼ (New England BioLabs社製 カタログ番号 M0208S) を0.5 μ L、及び製品添付のバッファー (×10) を1 μ L、ポリメラーゼ連鎖反应用チューブに加えた。前記反应用チューブを、TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice (登録商標) Gradient (Takara社製サーマルサイクラー、カタログ番号 TP600) に装着し、[80℃, 1分→45℃, 5分]×10、20又は30→4℃の温度サイクルで反応させて、DNAを連結した。連結反応後の反応溶液 (4 μ L) を、1%アガロースゲル電気泳動で分析した。電気泳動後のゲルをエチジウムブロマイド染色して、DNAを蛍光検出した。エチジウムブロマイド染色後のゲルを図74に示す。なお、図中の写真は、白黒を反転させている。

[0372] 図74において、レーン1のバンドは、DNAマーカー (0.5, 1.0, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 10及び12 kb) を示す。レーン2及び3のバンドは、10回の温度サイクルで連結反応を行った場合の連結反応産物のDNAを示しており、レーン4及び5のバンドは、20回の温度サイクルで連結反応を行った場合の連結反応産物のDNAを示しており、レーン6及び7のバンドは、30回の温度サイクルで連結反応を行った場合の連結反応産物のDNAを示している。また、レーン2、4及び6のバンドは、LL1及びLL3をプライマーセットとして用いた場合の増幅産物のDNAと、LL6及びLL7をプライマーセットとして用いた場合の増幅産物のDNAとを

連結反応させた場合の連結反応産物のDNAを示しており、レーン3、5及び7のバンドは、LL2及びLL4をプライマーセットとして用いた場合の増幅産物のDNAと、LL6及びLL7をプライマーセットとして用いた場合の増幅産物のDNAとを連結反応させた場合の連結反応産物のDNAを示している。

[0373] 図74に示すように、1.5 kb及び2.3 kbの原料DNAを連結反応させることにより、3.8 kbのDNAのバンドが確認された。これは、メチルアミン処理によりDNAが切断されて、1ヌクレオチドギャップ（欠損部位）を有する二つのDNA鎖のハイブリダイゼーションがライゲーションのための加熱及び冷却のサイクル中におきたことを示唆している。リガーゼにより、二つのDNA間に共有結合が生じていると考えられる。しかしながら、どの程度の割合で、リガーゼにより二つのDNAが共有結合で結ばれたかは、アガロースゲル電気泳動による分析の結果のみからは不明である。ハイブリダイズしたDNAを大腸菌などに導入すると、連結されていない場合のニック（切れ目）は一般に修復される。

[0374] 連結前のDNAと連結後のDNAとを比較するために、これらのDNAと一緒に1%アガロースゲル電気泳動で分析した。電気泳動後のゲルをエチジウムブロマイド染色して、DNAを蛍光検出した。エチジウムブロマイド染色後のゲルを図75に示す。なお、図中の写真は、白黒を反転させている。

[0375] 図75において、レーン1のバンドは、DNAマーカー（0.5, 1.0, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 10及び12 kb）を示す。レーン2及び3のバンドは、メチルアミン処理を9時間行ってDNAの切断反応を行った場合の切断反応産物のDNAを示しており、レーン4及び5のバンドは、メチルアミン処理を24時間行ってDNAの切断反応を行った場合の切断反応産物のDNAを示しており、レーン6及び7のバンドは、メチルアミン処理を48時間行ってDNAの切断反応を行った場合の切断反応産物のDNAを示している。レーン8及び9のバンドは、メチルアミン処理を48時間行ってDNAの切断反応を行った後、30回の温度サイクルで連結反応を行った場合の連結反応産物のDNAを示している。また、レーン2、4、6及び8のバンドは、LL1及びLL3をプライマーセットとして用いた場合の増幅産物のDNAと、LL6及びLL7をプライマーセットとして用いた場合の増幅産物のDNAとを切断反応

させた場合の切断反応産物のDNA又は切断反応及び連結反応させた場合の連結反応産物のDNAを示しており、レーン3、5、7及び9のバンドは、LL2及びLL4をプライマーセットとして用いた場合の増幅産物のDNAと、LL6及びLL7をプライマーセットとして用いた場合の増幅産物のDNAとを切断反応させた場合の切断反応産物のDNA又は切断反応及び連結反応させた場合の連結反応産物のDNAを示している。

[0376] DNA増幅産物の切断反応において、DNA増幅産物にメチルアミンを加えて加熱した場合、DNAがアルカリ変性し、鮮明なバンドが検出されなかった。これに対し、図74及び75に示すように、DNA増幅産物をメチルアミン存在下、25℃で反応させた場合、DNAのアルカリ変性が抑えられたことが確認された。また、図75に示すように、連結反応前の状態では、原料DNAを混合しても、連結反応産物に相当する3.8 kbのDNAバンドは生じないことが確認された。これは、切断後のDNAの末端部分には、切断で生じた短いDNA断片が結合しており、切断後のDNAをただ混合したのみではDNAの末端部分同士がハイブリダイゼーションしにくい状態にあることを示唆している。

[0377] 5位置換2'-デオキシウリジン誘導体は、DNAの複製反応の基質又は鋳型として適していることが知られており、5位置換2'-デオキシウリジン三リン酸を利用したDNAの複製反応の報告は数多い（例えば非特許文献74～76）。Paと類似の構造の5-(1-プロピニル)-2'-デオキシウリジン三リン酸を利用するDNAの複製及び増幅反応も報告されており、比較的高い忠誠度で複製反応が効率よく進行することが知られている（非特許文献77）。これまで、Paを鋳型とするDNA複製反応の報告は存在しなかった。本使用例で、DNAの連結が確認されたので、Paを鋳型としてDNAの伸長が起きたことが示唆される。

[0378] [使用例11-3：5-エチニル-2'-デオキシウリジン（Pa）を含むDNA増幅産物の切断反応及び得られた5'末端リン酸化DNA断片の連結反応（2）]

使用例11-2では、2種類のDNA増幅産物の片側の末端のみが完全に相補的で連結されるように、DNA増幅産物の組み合わせを選択した。本使用例では、2種類のDNA増幅産物の両側の末端が相補的で連結されるように、DNA増幅産物

の組み合わせを選択した。使用例11-2と同様の手順でメチルアミン処理したDNAの混合溶液を2又は4 μ L、水を6.5又は4.5 μ L、Taq DNAリガーゼ (New England BioLabs社製 カタログ番号 M0208S) 又はT4 DNAリガーゼ (New England BioLabs社製 カタログ番号 M0202S) を0.5 μ L、及び製品添付のバッファー (×10) を1 μ L、ポリメラーゼ連鎖反应用チューブに加えた。Taq DNAリガーゼを用いる場合、前記反应用チューブを、TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice (登録商標) Gradient (Takara社製サーマルサイクラー、カタログ番号 TP600) に装着し、[80°C, 1分→45°C, 5分]×30→4°Cの温度サイクルで反応させて、DNAを連結した。T4 DNAリガーゼを用いる場合、前記反应用チューブを、25°Cで18時間静置することにより、DNAを連結した。連結反応後の反応溶液 (4又は2 μ L) を、1%アガロースゲル電気泳動で分析した。電気泳動後のゲルをエチジウムブロマイド染色して、DNAを蛍光検出した。エチジウムブロマイド染色後のゲルを図76に示す。なお、図中の写真は、白黒を反転させている。

[0379] 図76において、レーン1のバンドは、DNAマーカー (0.5, 1.0, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 10及び12 kb) を示す。レーン2、3、6及び7のバンドは、LL1及びLL4をプライマーセットとして用いた場合の増幅産物のDNAと、LL5及びLL8をプライマーセットとして用いた場合の増幅産物のDNAとを連結反応させた場合の連結反応産物のDNAを示しており、レーン4、5、8及び9のバンドは、LL2及びLL3をプライマーセットとして用いた場合の増幅産物のDNAと、LL6及びLL7をプライマーセットとして用いた場合の増幅産物のDNAとを連結反応させた場合の連結反応産物のDNAを示している。レーン2～5のバンドは、T4 DNAリガーゼを用いてDNAを連結反応させた場合の連結反応産物のDNAを示しており、レーン6～9のバンドは、Taq DNAリガーゼを用いてDNAを連結反応させた場合の連結反応産物のDNAを示している。また、レーン2、4、6及び8のバンドは、2 μ Lの前記増幅産物のDNAの混合溶液を用いてDNAを連結反応させた場合の連結反応産物のDNAを示しており、レーン3、5、7及び9のバンドは、4 μ Lの前記増幅産物のDNAの混合溶液を用いてDNAを連結反応させた場合の連結反応産物のDNAを示している。

[0380] 図76に示すように、本発明の切断反応によって長い突出末端を形成させたDNAを、Taq DNAリガーゼを用いて連結反応させた場合（レーン8及び9）に、最も効率よくDNAがハイブリダイゼーション又は連結されて、非常に長いDNAを生成したことが確認された。

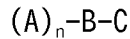
産業上の利用可能性

[0381] 本発明の方法により、化学反応によって低コスト且つ簡単な実験操作でDNA鎖の切断を行い、さらにポリヌクレオチドキナーゼのような酵素法又はリン酸化アミダイトを用いる合成DNAの末端リン酸化法と比較してより高収率で末端がリン酸化されたオリゴデオキシヌクレオチドを得ることが可能となる。

[0382] 本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

請求の範囲

[請求項1] 求核剤と、式I：



[式中、

Aは、オリゴデオキシヌクレオチドであり、

Bは、求核剤によって脱離可能な部分Eを有する、非天然型塩基を含むデオキシヌクレオチドであり、

Cはオリゴデオキシヌクレオチドであり、

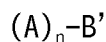
nは0又は1であり、

nが1のとき、Aの3' 末端とBの5' 位とは、ホスホジエステル結合で連結されており、

Bの3' 位とCの5' 末端とは、ホスホジエステル結合で連結されており、

BとCとの間のホスホジエステル結合は、求核剤の攻撃によって誘発されるEの脱離に伴って、Cの5' 末端がリン酸化されたオリゴデオキシヌクレオチド部分がBの3' 位から脱離することによって切断される]

で表されるオリゴデオキシヌクレオチドとを接触させることによって、BとCとの間のホスホジエステル結合が、Cの5' 末端がリン酸化されたオリゴデオキシヌクレオチド部分がBの3' 位から脱離することによって切断されて、前記Cの5' 末端がリン酸化されたオリゴデオキシヌクレオチドと、式II：



[式中、

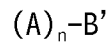
A及びnは、式Iにおいて定義したのと同様の意味であり、

B' は、求核剤の攻撃によるEの脱離に伴って形成されるBの残基部分である]

で表されるオリゴデオキシヌクレオチドとを得る、5' 末端リン酸化オリゴデオキシヌクレオチド形成工程を含む、オリゴデオキシヌクレ

オチドの製造方法。

[請求項2] 式II :

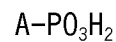


[式中、

A及びB' は、請求項1と同様の意味であり、

nは1である]

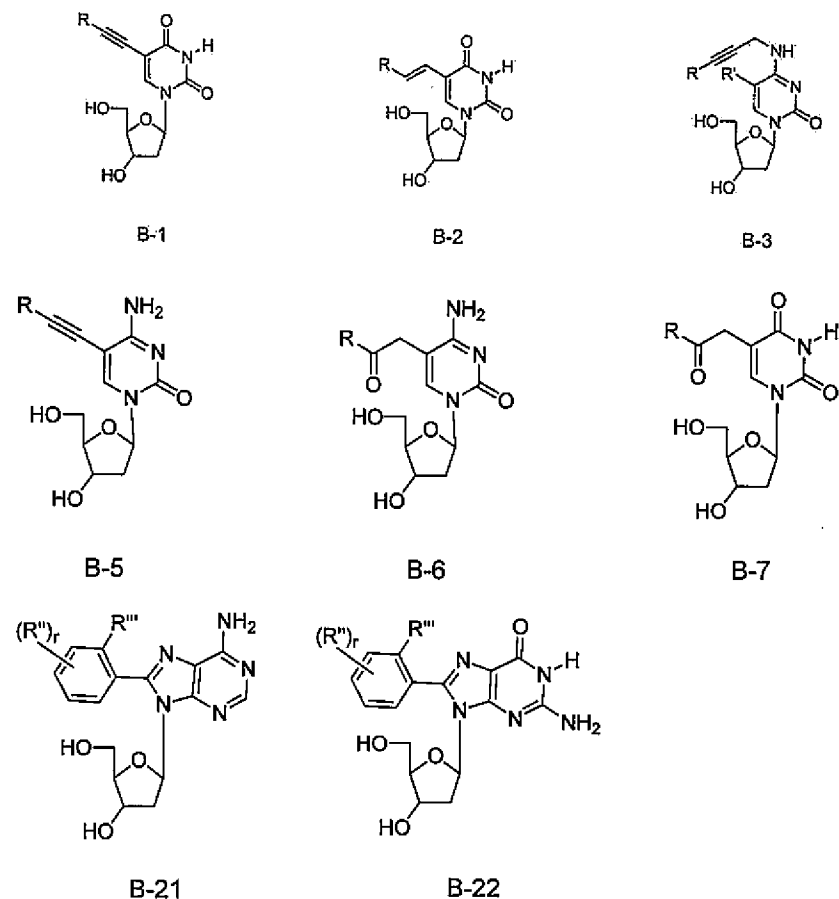
で表されるオリゴデオキシヌクレオチドを反応させることによって、
B' とAとの間のホスホジエステル結合が、Aの3' 末端がリン酸化されたオリゴデオキシヌクレオチド部分がB' から脱離することによって切断されて、式IIa :



で表される3' 末端がリン酸化されたオリゴデオキシヌクレオチドを得る、3' 末端リン酸化オリゴデオキシヌクレオチド形成工程をさらに含む、請求項1の方法。

[請求項3] 前記非天然型塩基を含むデオキシヌクレオシドBが、以下 :

[化1]



[式中、

Rは、水素、置換若しくは非置換のアルキル、置換若しくは非置換のシクロアルキル、置換若しくは非置換のヘテロシクリル、置換若しくは非置換のアリール、置換若しくは非置換のアリールアルキル、置換若しくは非置換のヘテロアリール、置換若しくは非置換のヘテロアリールアルキル又はカルボニルであり；

R' は、水素、又は置換若しくは非置換のアルキル、アルケニル若しくはアルキニルであり；

rは、0～4の整数であり；

R' ' は、ハロゲン、又は置換若しくは非置換のアルキル、アルケニル若しくはアルキニルであり；

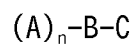
R' ' ' は、-COZ、-C≡C-Z又は-CNであり；

Zは、水素、置換若しくは非置換のアルキル、置換若しくは非置換のシクロアルキル、置換若しくは非置換のヘテロシクリル、置換若しくは非置換のアリール、置換若しくは非置換のアリールアルキル、置換若しくは非置換のヘテロアリール、又は置換若しくは非置換のヘテロアリールアルキルである]

で表されるデオキシヌクレオシドから選択される、請求項1又は2の方法。

[請求項4] 前記5' 末端リン酸化オリゴデオキシヌクレオチド形成工程の前に、求核剤によって脱離可能な部分Eを有する、非天然型塩基を含むデオキシヌクレオシドB又はその誘導体と、天然型塩基を含む1個以上のデオキシヌクレオシド又はその誘導体とを含む基質を用いて、式Iで表されるオリゴデオキシヌクレオチドを合成する、オリゴデオキシヌクレオチド合成工程をさらに含む、請求項1～3のいずれか1項の方法。

[請求項5] 式I：



[式中、

Aは、オリゴデオキシヌクレオチドであり、

Bは、求核剤によって脱離可能な部分Eを有する、非天然型塩基を含むデオキシヌクレオシドであり、

Cはオリゴデオキシヌクレオチドであり、

nは0又は1であり、

nが1のとき、Aの3' 末端とBの5' 位とは、ホスホジエステル結合で連結されており、

Bの3' 位とCの5' 末端とは、ホスホジエステル結合で連結されており、

BとCとの間のホスホジエステル結合は、求核剤の攻撃によって誘発されるEの脱離に伴って、Cの5' 末端がリン酸化されたオリゴデオキシ

ヌクレオチド部分がBの3' 位から脱離することによって切断される]で表されるオリゴデオキシヌクレオチドをプライマーとして用いて、直鎖状二本鎖DNA断片を増幅するDNA断片増幅工程；

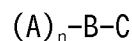
求核剤と、増幅された直鎖状二本鎖DNA断片とを接触させることによって、BとCとの間のホスホジエステル結合が、Cの5' 末端がリン酸化されたオリゴデオキシヌクレオチド部分がBの3' 位から脱離することによって切断されて、直鎖状二本鎖DNA断片に含まれる前記Cの5' 末端がリン酸化されており、且つ式Iで表されるプライマー部分の少なくとも一部と相補的な配列を含む3' 突出末端を有する直鎖状二本鎖DNA断片を形成させる、3' 突出末端形成工程；並びに

前記3' 突出末端を有する直鎖状二本鎖DNA断片と、別の二本鎖DNA断片とを連結する連結工程；

を含む、二本鎖DNAの連結方法。

[請求項6]

請求項1～4のいずれか1項のオリゴデオキシヌクレオチドの製造方法又は請求項5の二本鎖DNAの連結方法に使用するためのキットであって、式I：



[式中、

Aは、オリゴデオキシヌクレオチドであり、

Bは、求核剤によって脱離可能な部分Eを有する、非天然型塩基を含むデオキシヌクレオチドであり、

Cはオリゴデオキシヌクレオチドであり、

nは0又は1であり、

nが1のとき、Aの3' 末端とBの5' 位とは、ホスホジエステル結合で連結されており、

Bの3' 位とCの5' 末端とは、ホスホジエステル結合で連結されており、

、

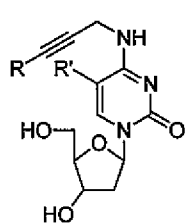
BとCとの間のホスホジエステル結合は、求核剤の攻撃によって誘発さ

れるEの脱離に伴って、Cの5'末端がリン酸化されたオリゴデオキシヌクレオチド部分がBの3'位から脱離することによって切断される]で表されるオリゴデオキシヌクレオチド、又は求核剤によって脱離可能な部分Eを有する、非天然型塩基を含むデオキシヌクレオチドB若しくはその誘導体を少なくとも含む、前記キット。

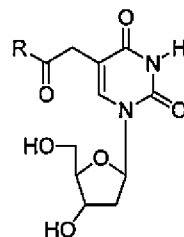
[請求項7]

以下の式：

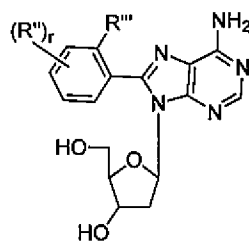
[化2]



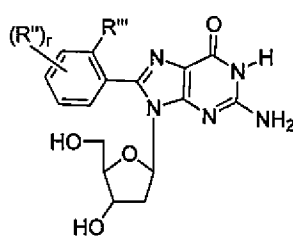
B-3



B-7



B-21



B-22

[式中、

Rは、水素、置換若しくは非置換のアルキル、置換若しくは非置換のシクロアルキル、置換若しくは非置換のヘテロシクリル、置換若しくは非置換のアリール、置換若しくは非置換のアリールアルキル、置換若しくは非置換のヘテロアリール、置換若しくは非置換のヘテロアリールアルキル又はカルボニルであり；

R' は、メチルであり；

rは、0～4の整数であり；

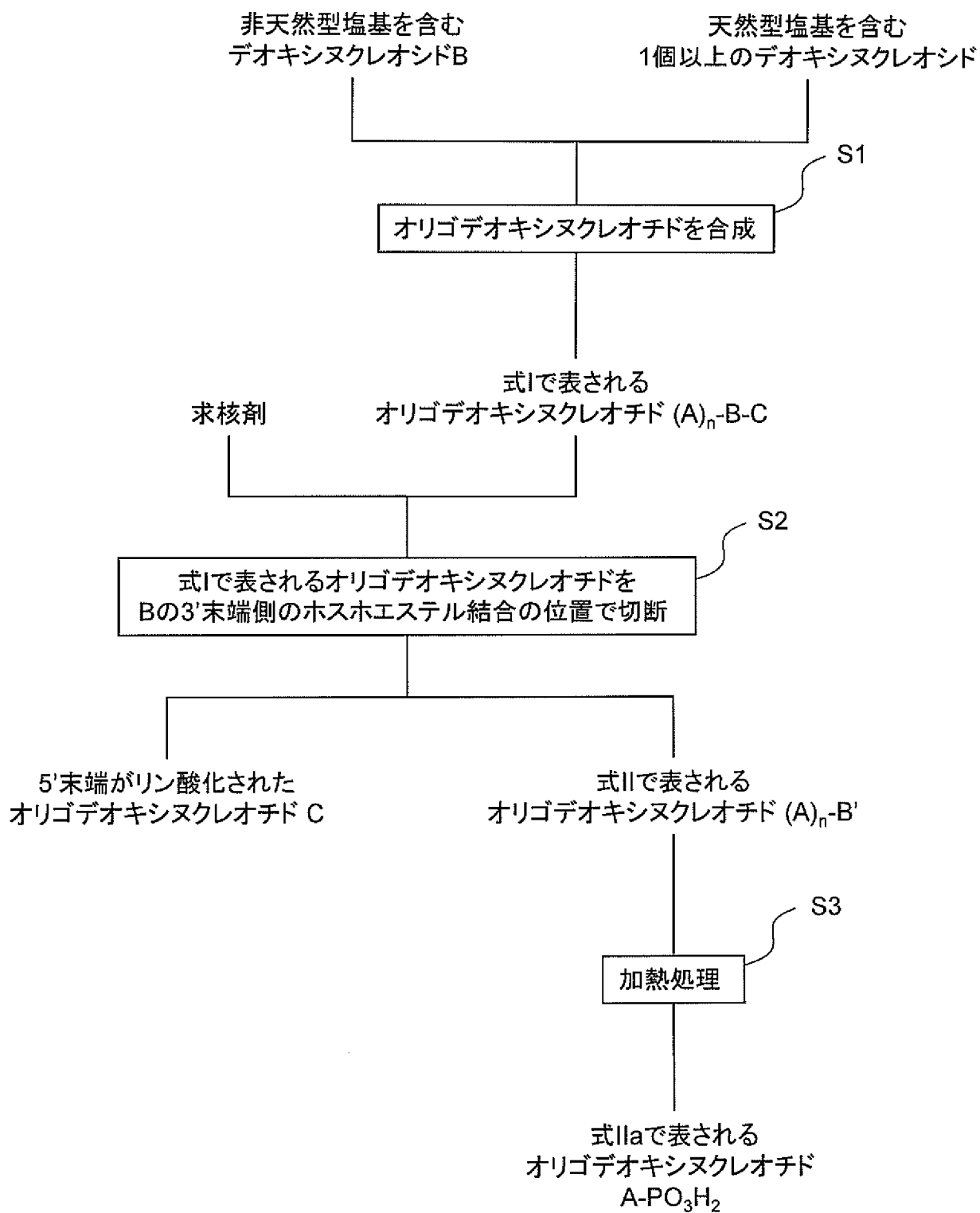
R' ' は、ハロゲン、又は置換若しくは非置換のアルキル、アルケニル若しくはアルキニルであり；

R' ' ' は、-COZ、-C≡C-Z又は-CNであり；

Zは、水素、置換若しくは非置換のアルキル、置換若しくは非置換のシクロアルキル、置換若しくは非置換のヘテロシクリル、置換若しくは非置換のアリール、置換若しくは非置換のアリールアルキル、置換若しくは非置換のヘテロアリール、又は置換若しくは非置換のヘテロアリールアルキルである]

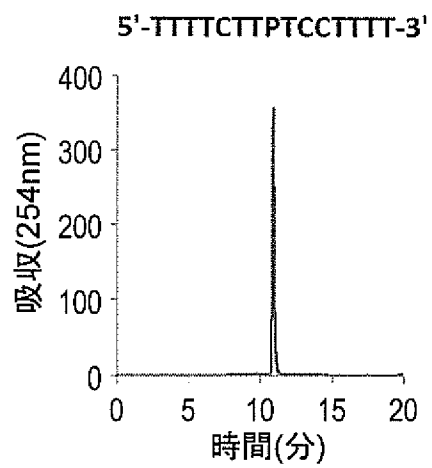
で表される非天然型塩基を含むデオキシヌクレオシド。

[図1]

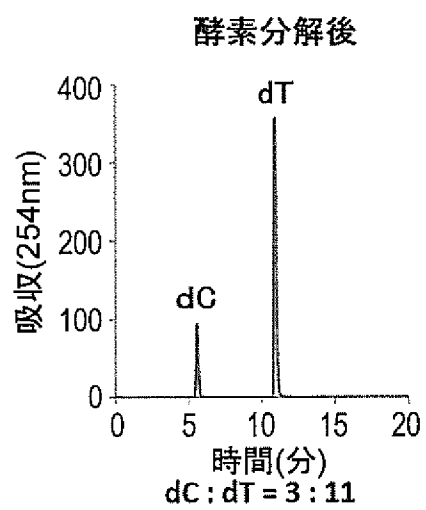


[図2]

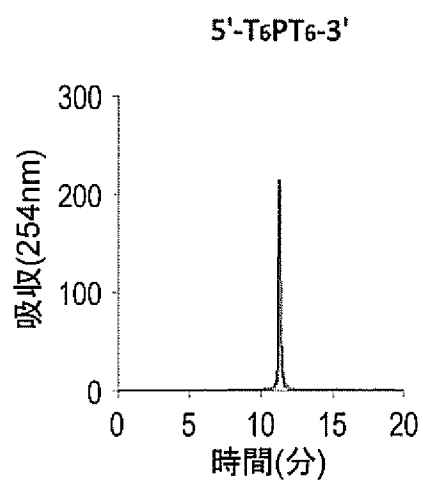
A



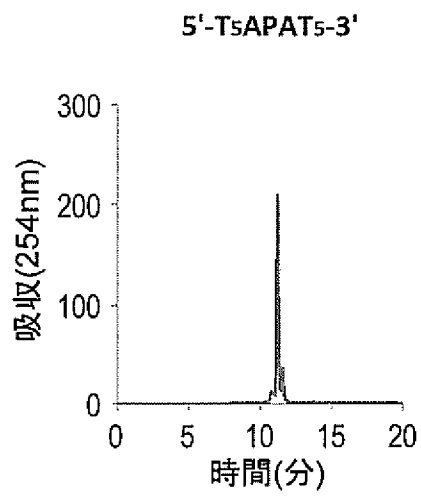
B



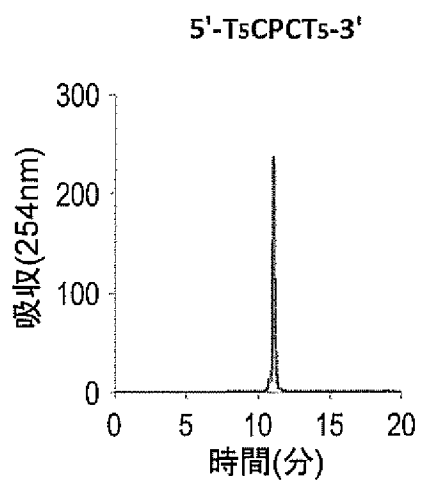
[図3]



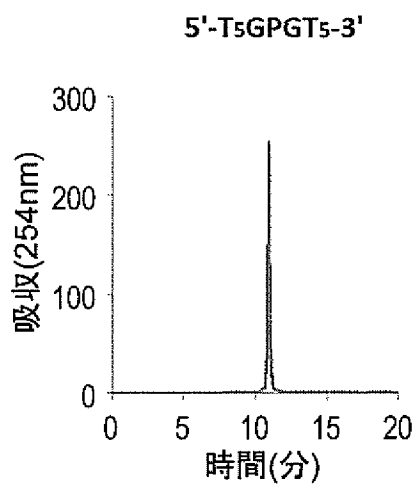
[図4]



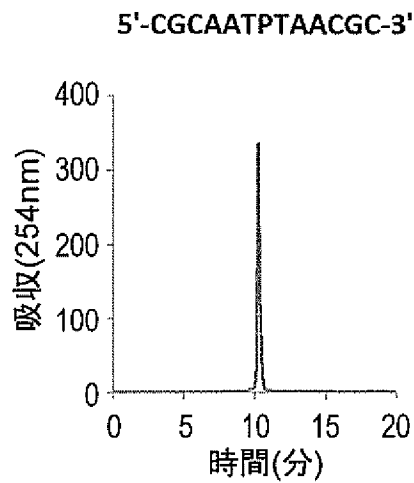
[図5]



[図6]

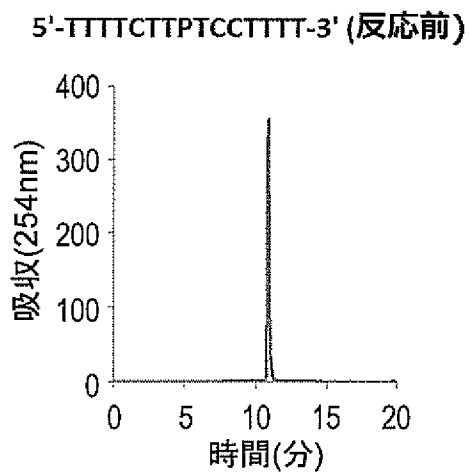


[図7]

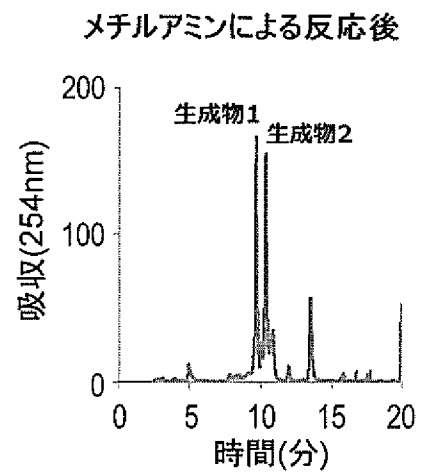


[図8]

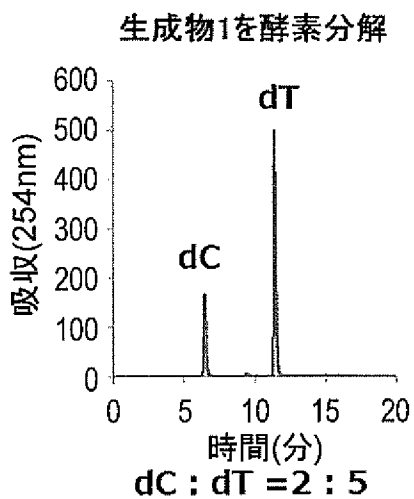
A



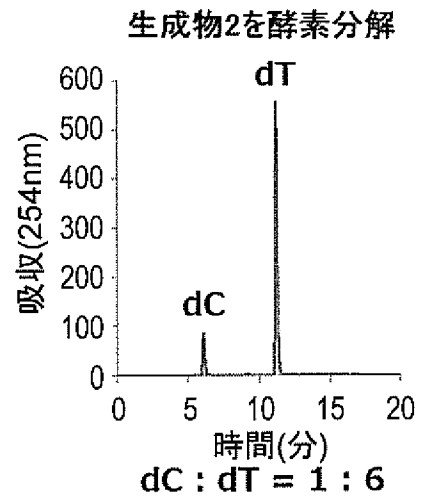
B



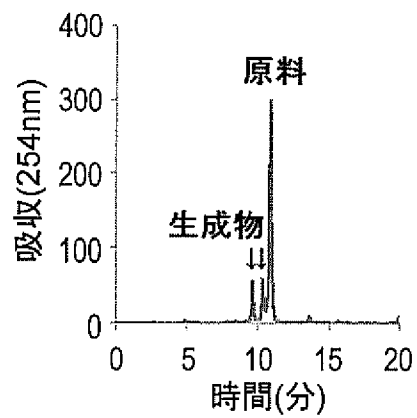
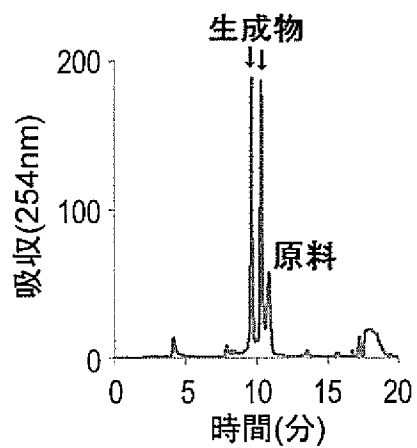
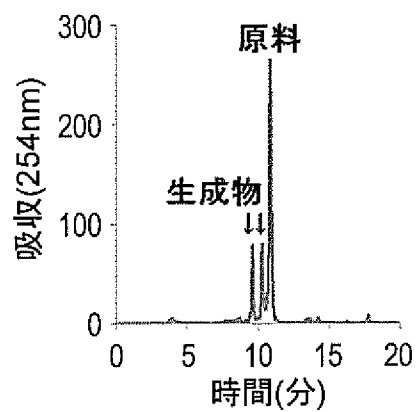
C



D

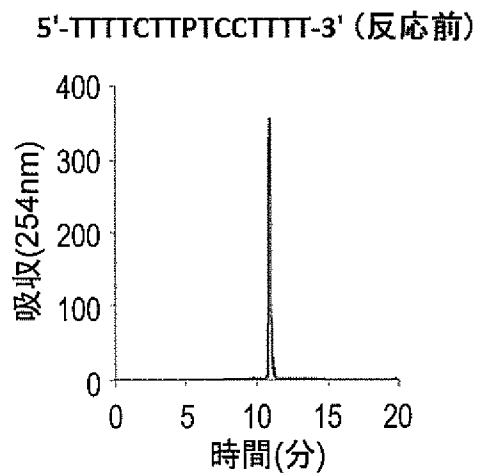


[図9]

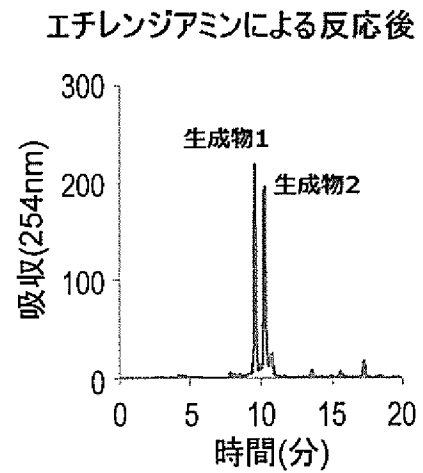
A メチルアミンによる反応後**B** エチレンジアミンによる反応後**C** 2-アミノエタノールによる反応後

[図10]

A

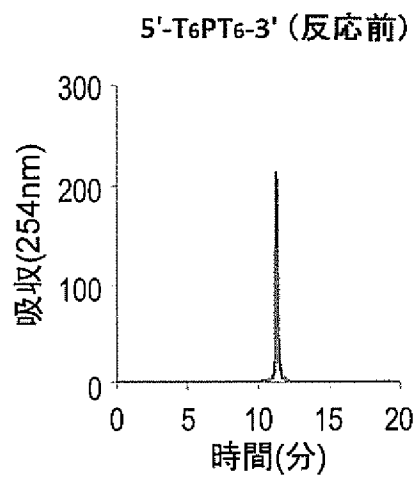


B

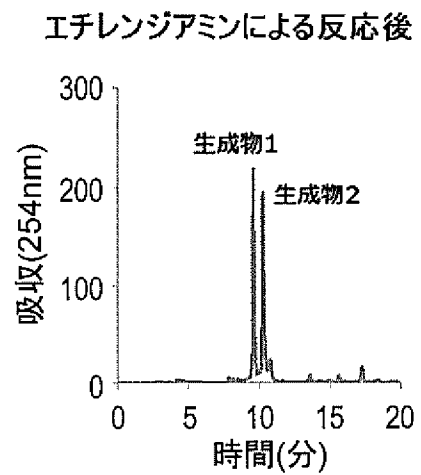


[図11]

A

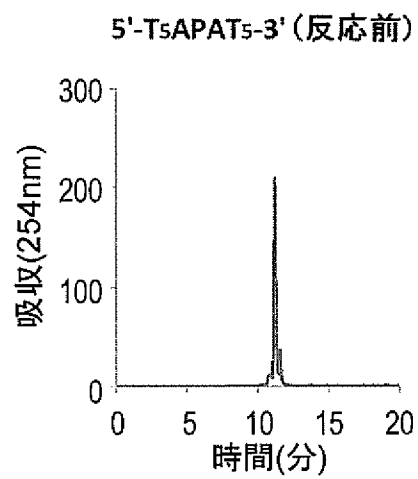


B

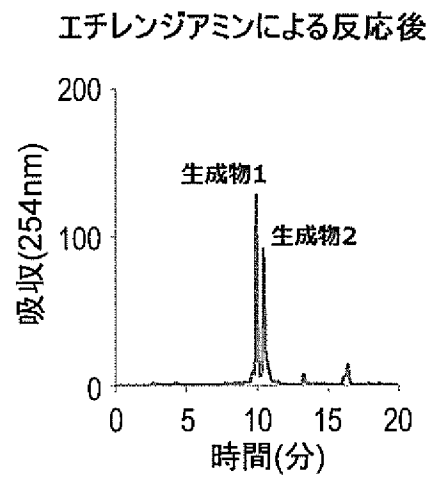


[図12]

A

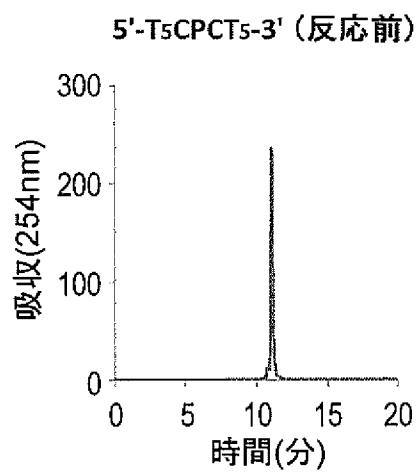


B

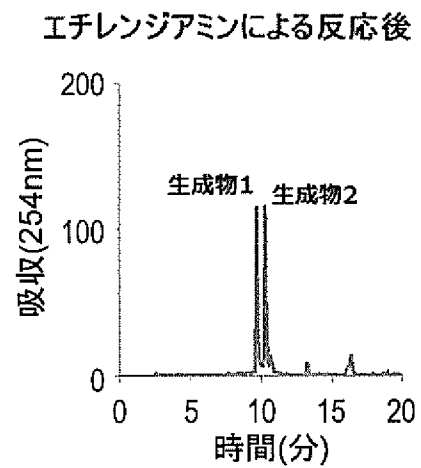


[図13]

A

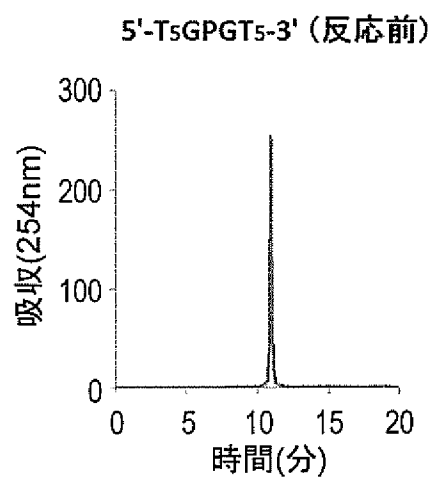


B

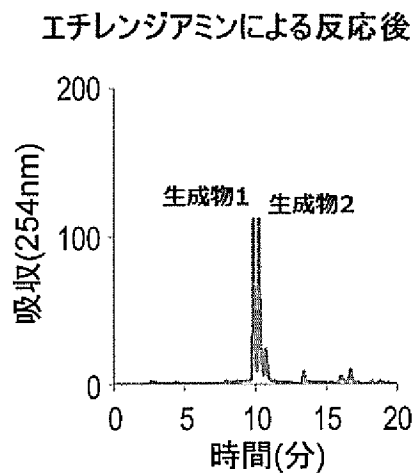


[図14]

A

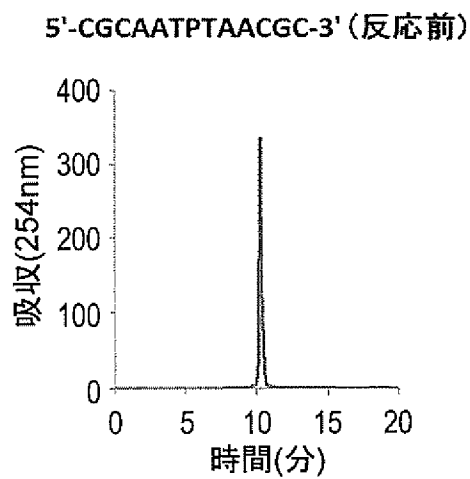


B

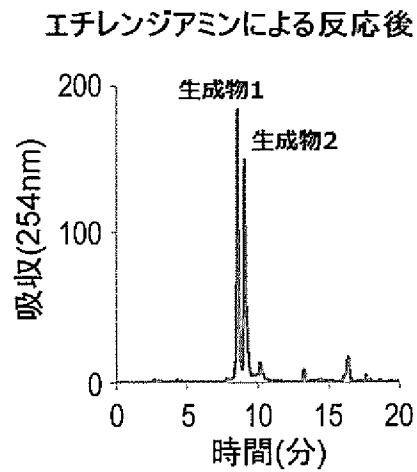


[図15]

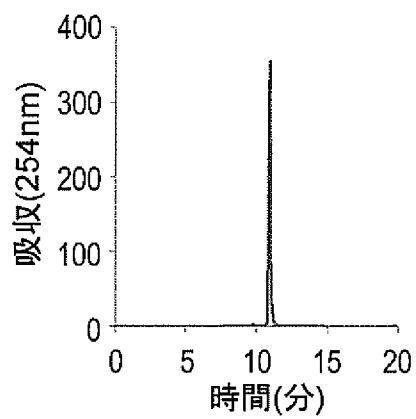
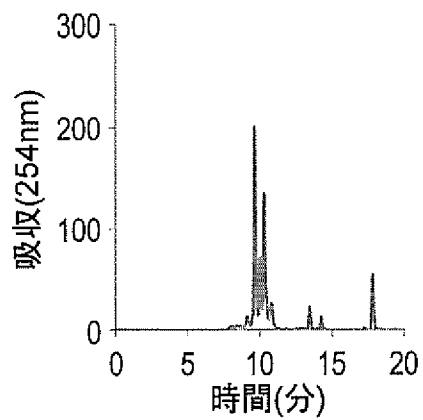
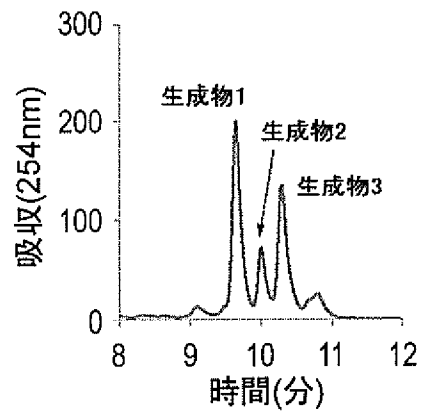
A



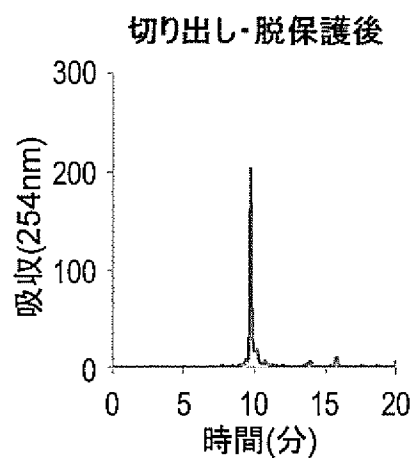
B



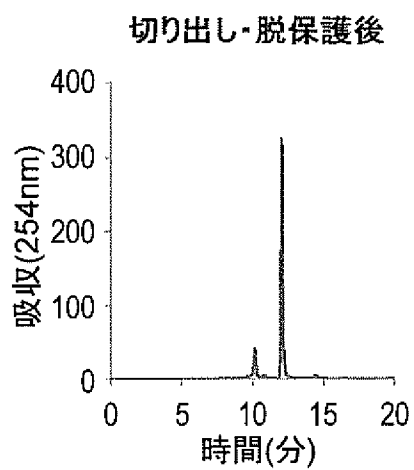
[図16]

A 5'-TTTTCTTPTCCTTTT-3' (反応前)**B** 2-アミノエタノールによる反応後**C** 反応後のチャートの拡大

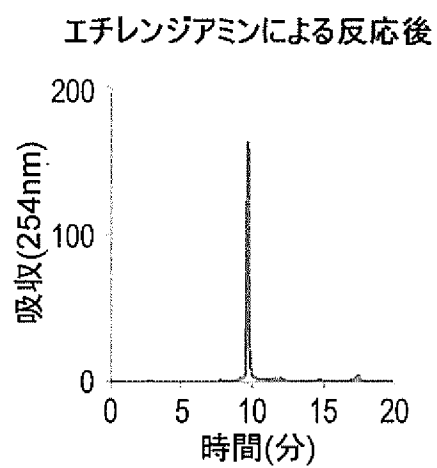
[図17]



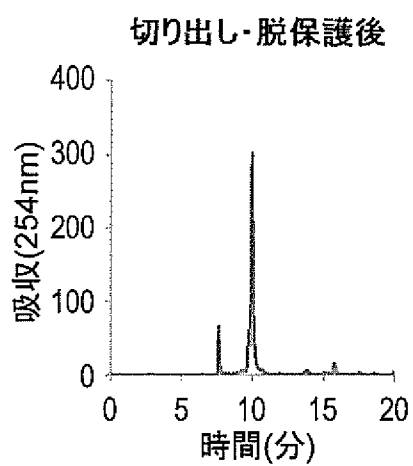
[図18]



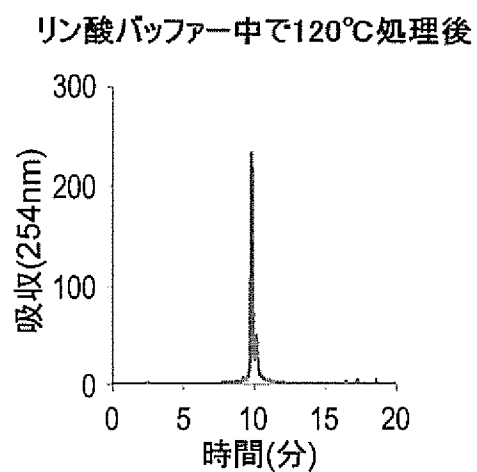
[図19]



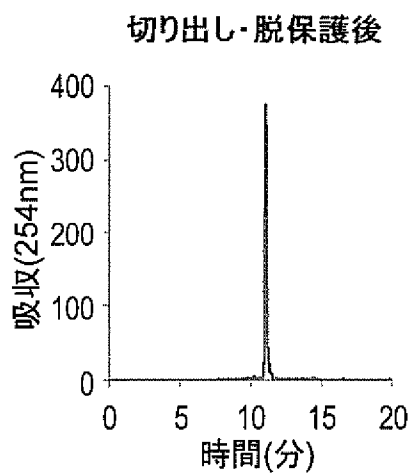
[図20]



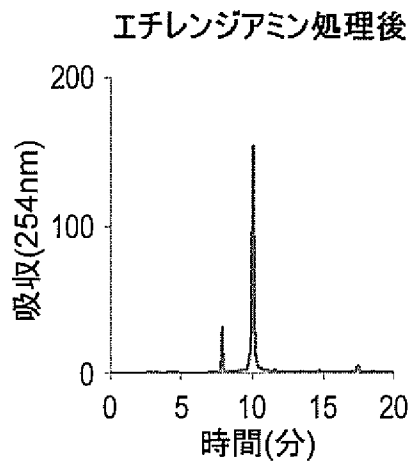
[図21]



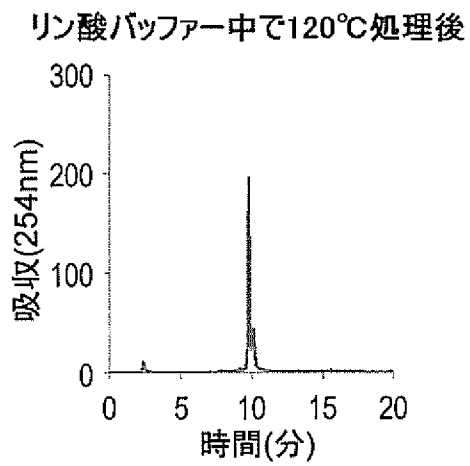
[図22]



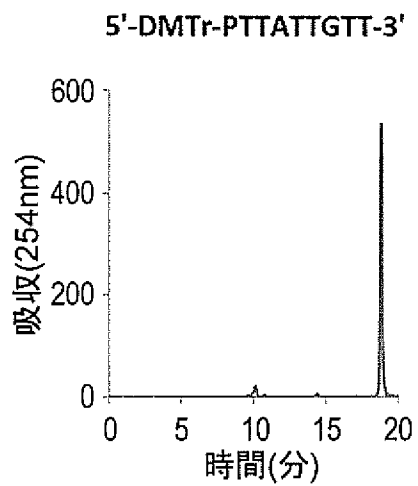
[図23]



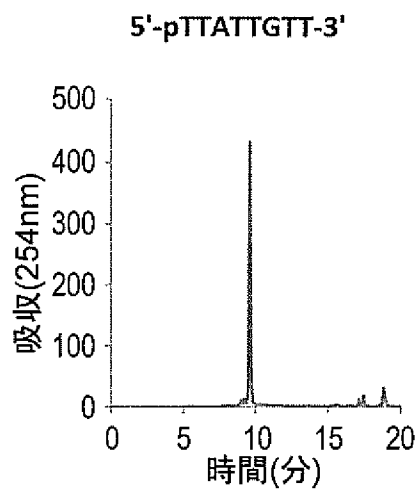
[図24]



[図25]

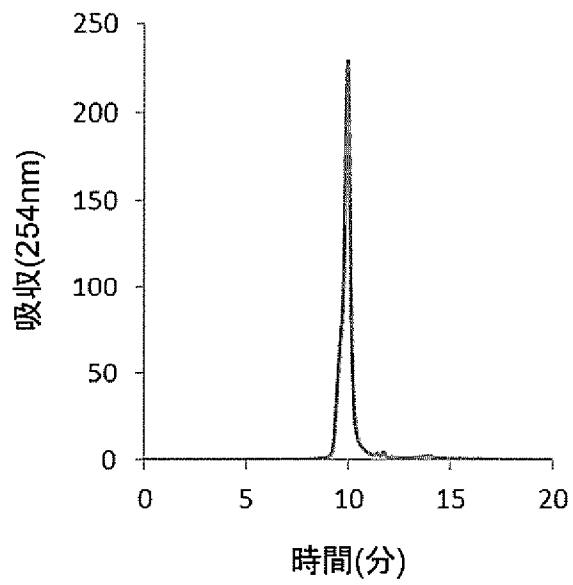


[図26]

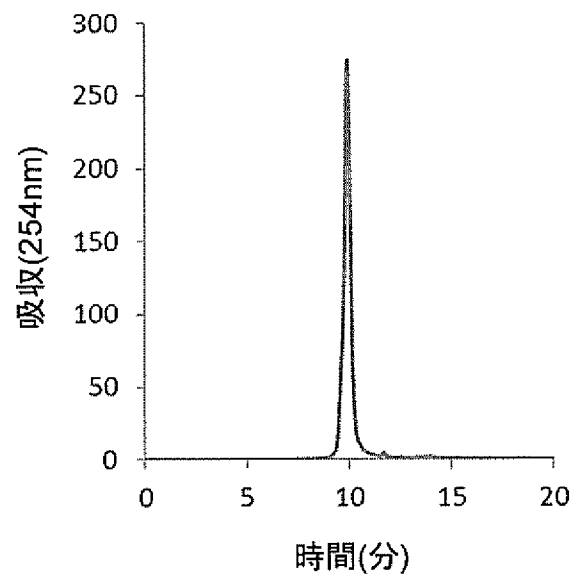


[図27]

A



B



[図28]

A

TS1 (46 mer)

5'-FAM-ATAGTGAGTCGTATTAGGCCCCGATCCAGGCCATCGCGCATGCTCAG-3'

TF3 (25 mer)

TT1 (25 mer)

NH₂-TTAACTGAGCATGCGCGATGGCCTG pGATCGGGCCTAATACGACTCACTAT-FAM
 3'-GACTCGTACGCGCTACCGGAC--CATGCCCCGGATTATGCTGAGTGATA-5'

TS3 (46 mer)

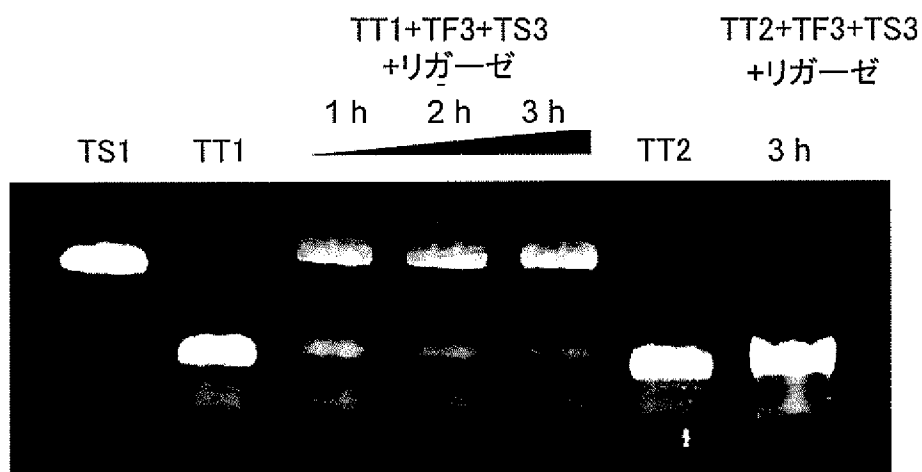
TF3 (25 mer)

TT2 (24 mer)

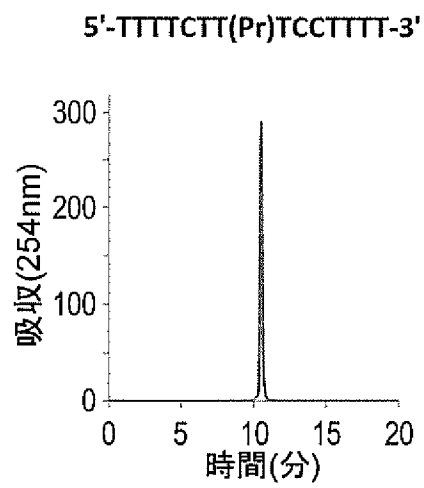
NH₂-TTAACTGAGCATGCGCGATGGCCTG pATCGGGCCTAATACGACTCACTAT-FAM
 3'-GACTCGTACGCGCTACCGGAC--CATGCCCCGGATTATGCTGAGTGATA-5'

TS3 (46 mer)

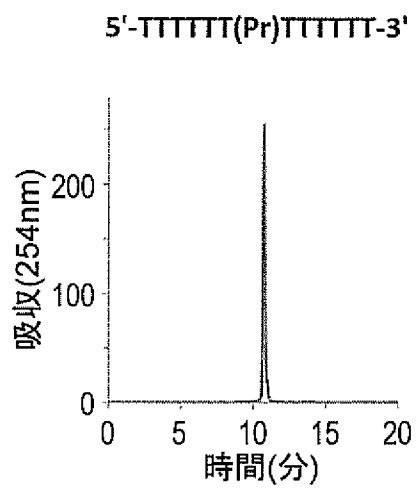
B



[図29]



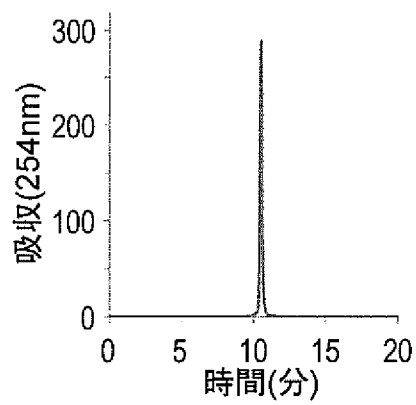
[図30]



[図31]

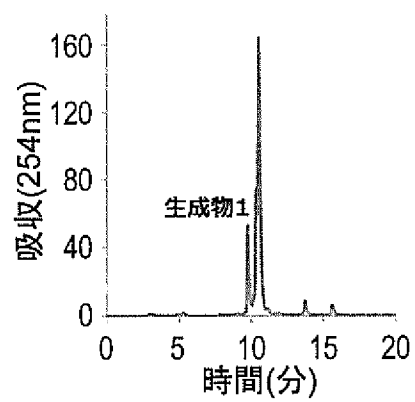
A

5'-TTTTCTT(Pr)TCCTTTT-3' (反応前)



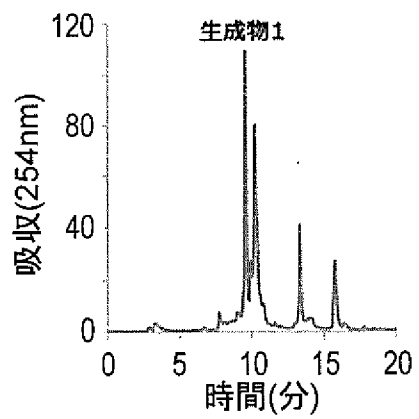
B

70°C、3時間反応後

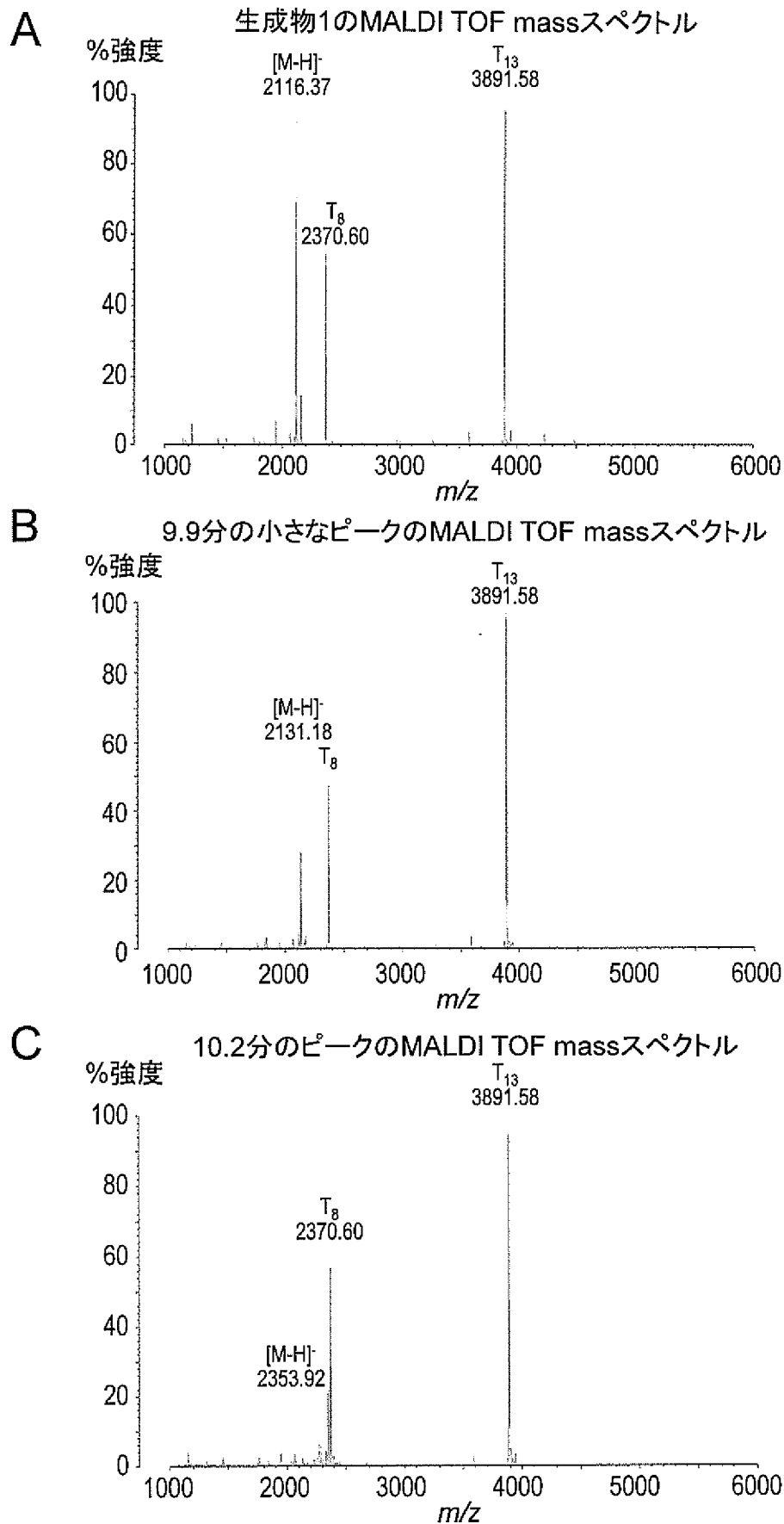


C

70°C、16時間反応後



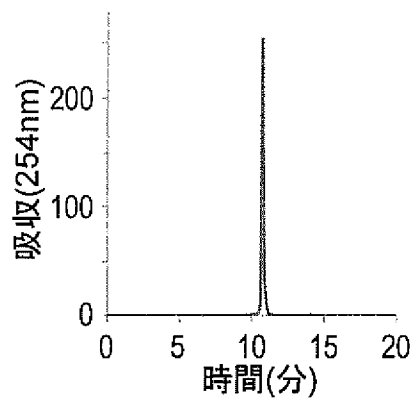
[図32]



[図33]

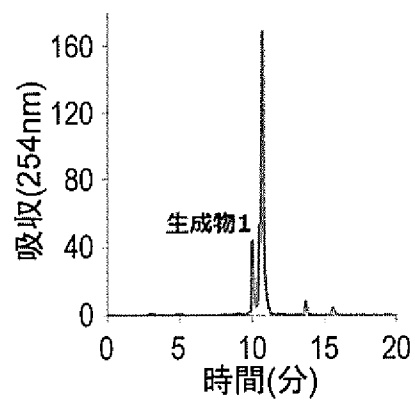
A

5'-TTTTTT(Pr)TTTTTT-3' (反応前)



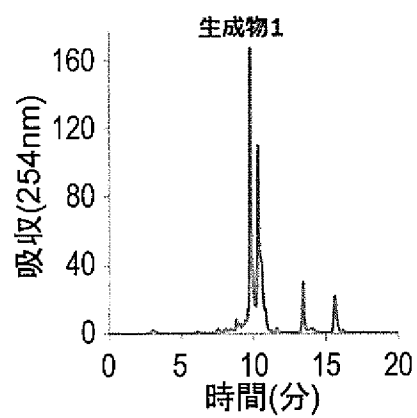
B

70°C、3時間反応後



C

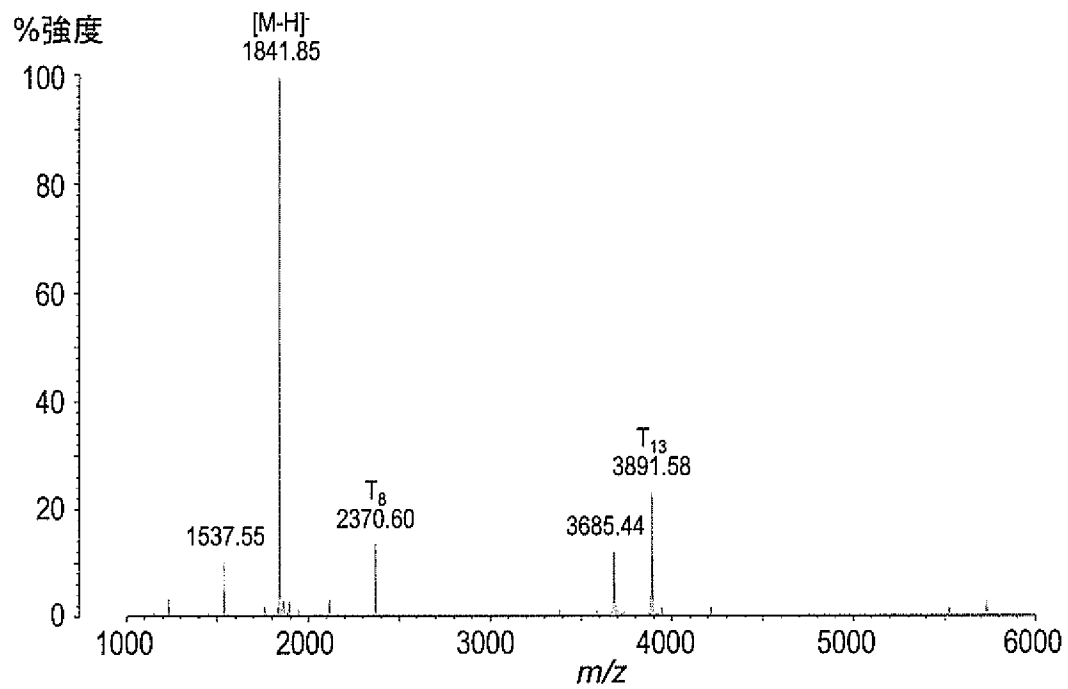
70°C、16時間反応後



[図34]

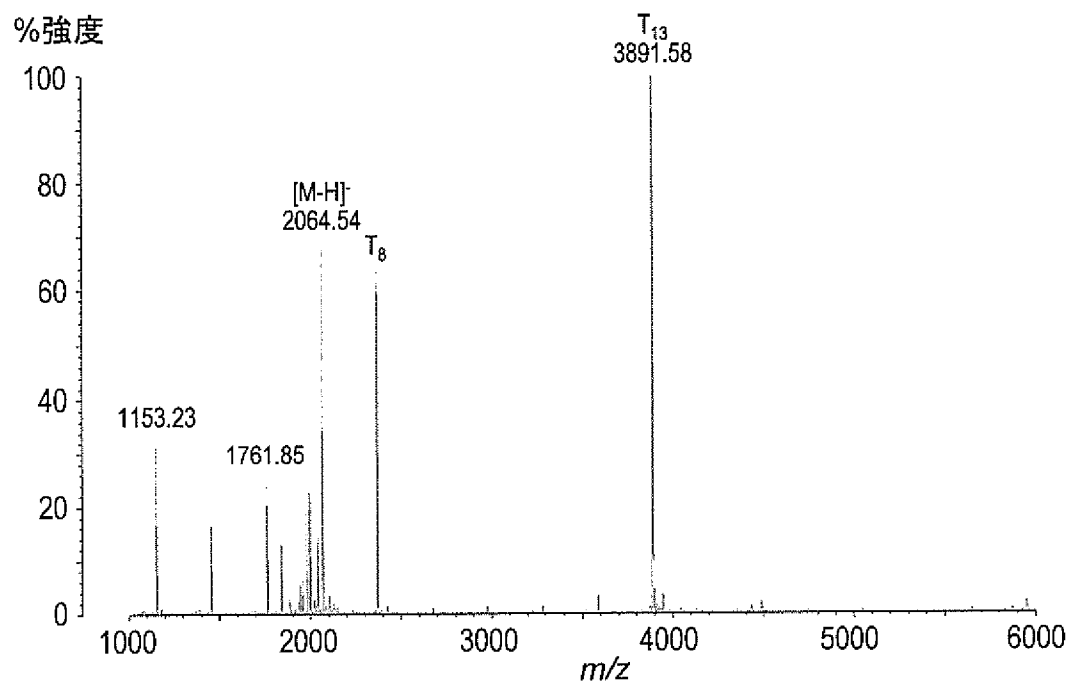
A

生成物1のMALDI TOF massスペクトル

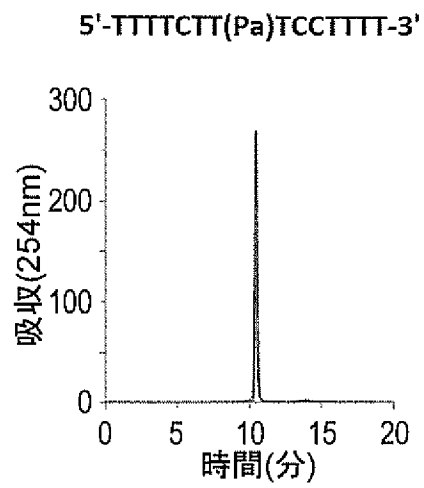


B

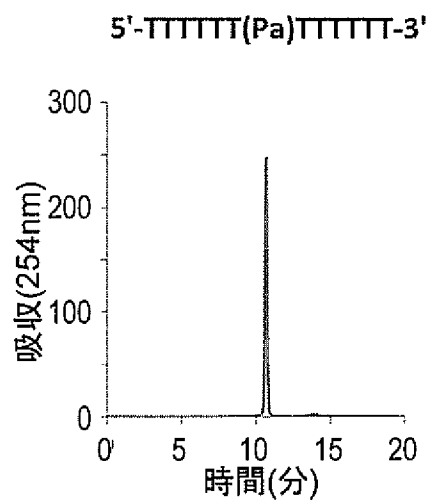
10.3分のピークのMALDI TOF massスペクトル



[図35]



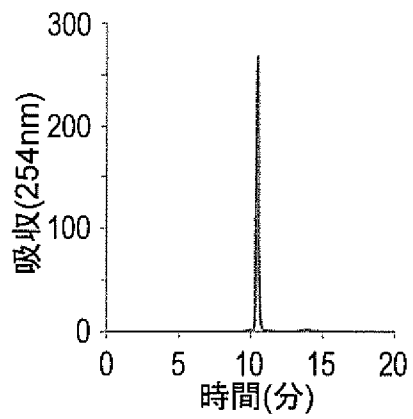
[図36]



[図37]

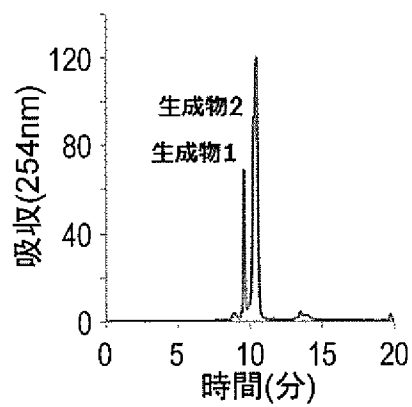
A

5'-TTTTCTT(Pa)TCCTTT-3'(反応前)



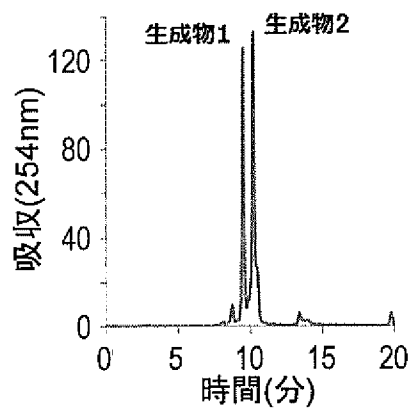
B

70°C、10分間反応後



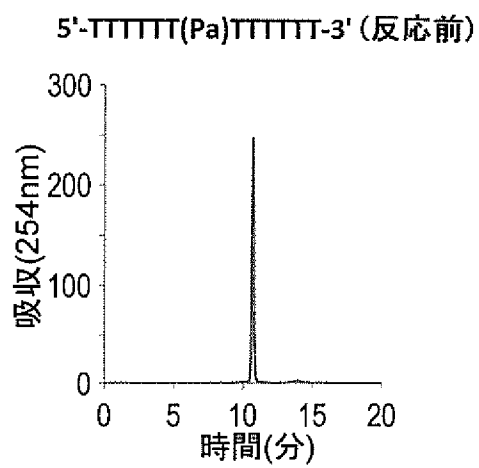
C

70°C、30分間反応後

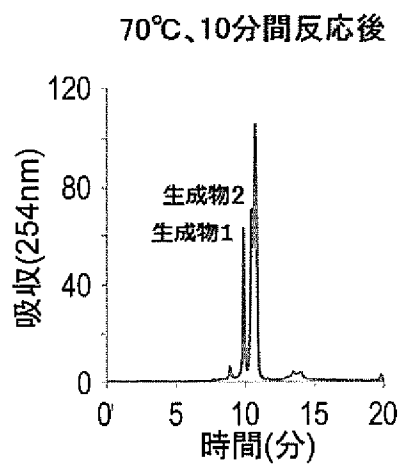


[図38]

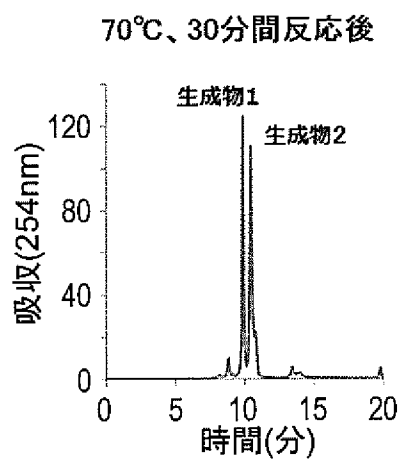
A



B

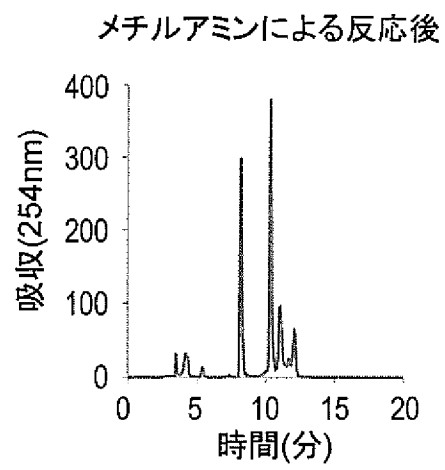


C

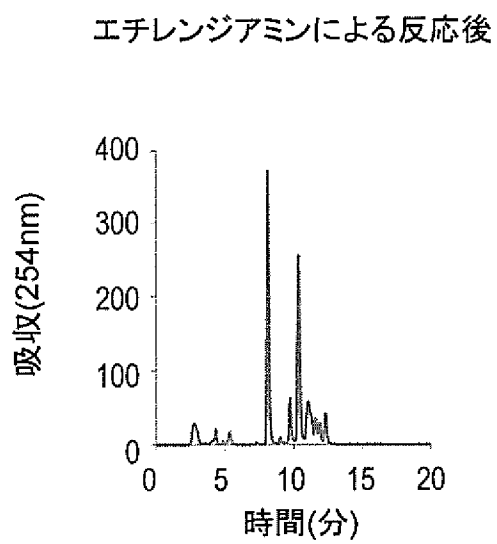


[図39]

A

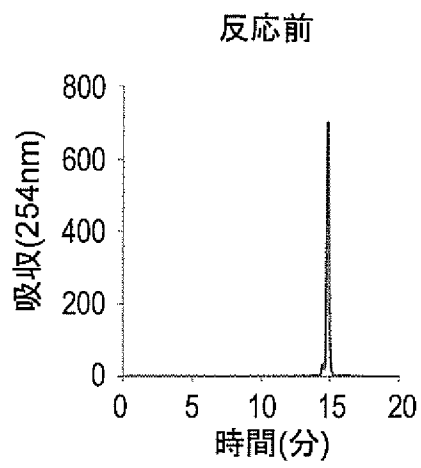


B

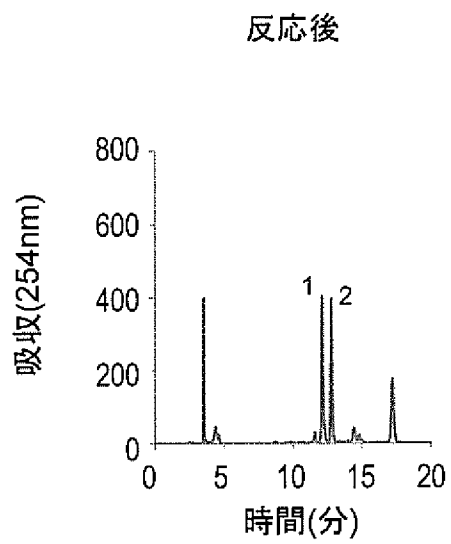


[図40]

A

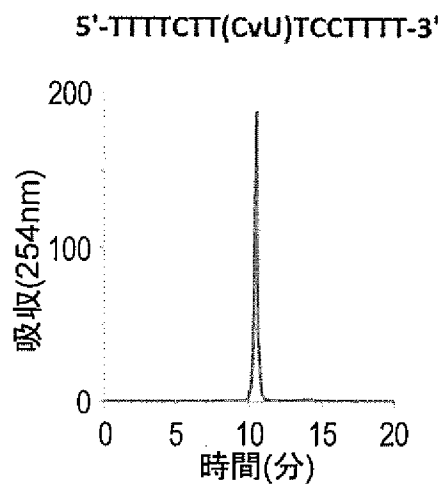


B

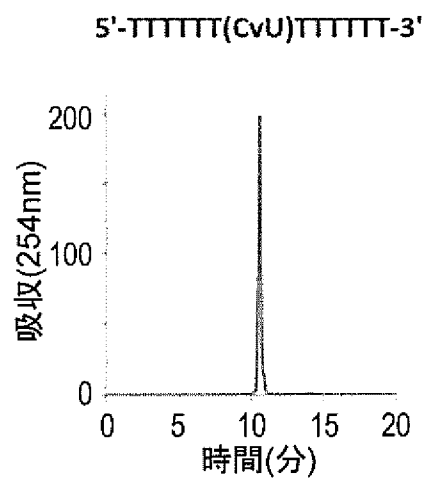


[図41]

A



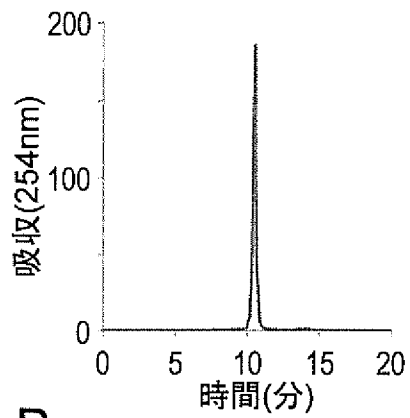
B



[図42]

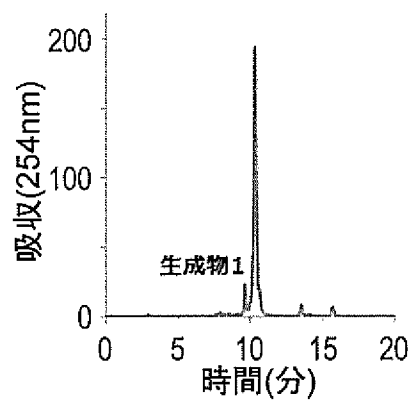
A

5'-TTTTCTT(CvU)TCCTTTT-3' (反応前)



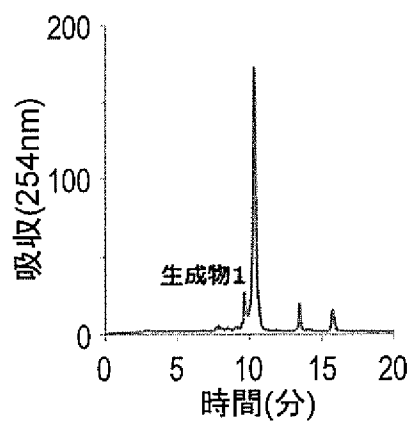
B

70°C、3時間反応後



C

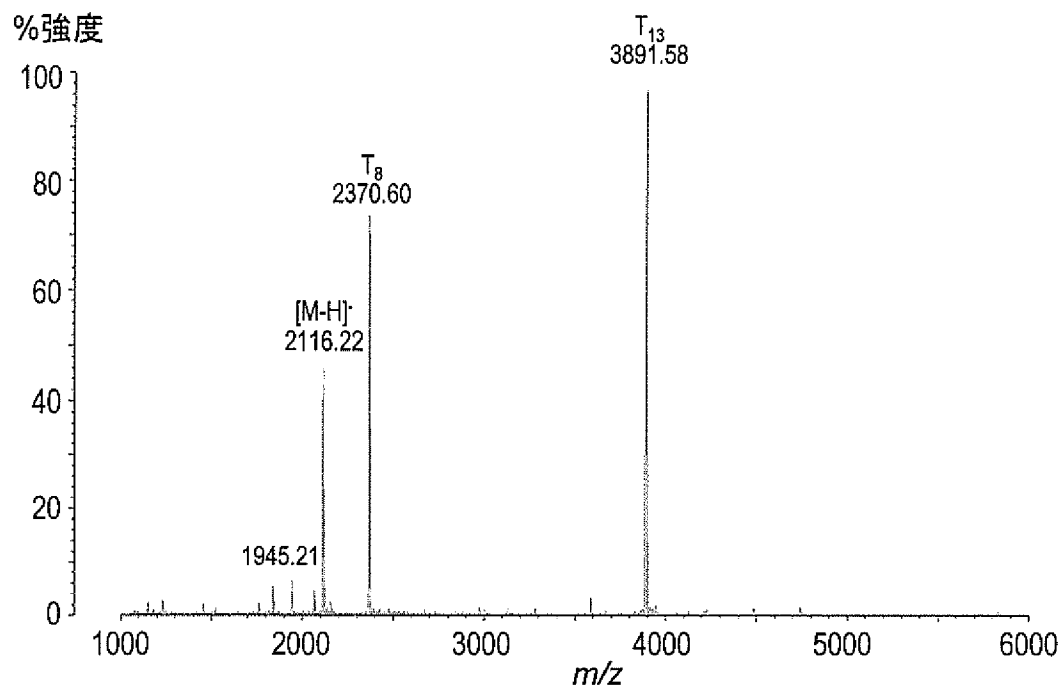
70°C、8時間反応後



[図43]

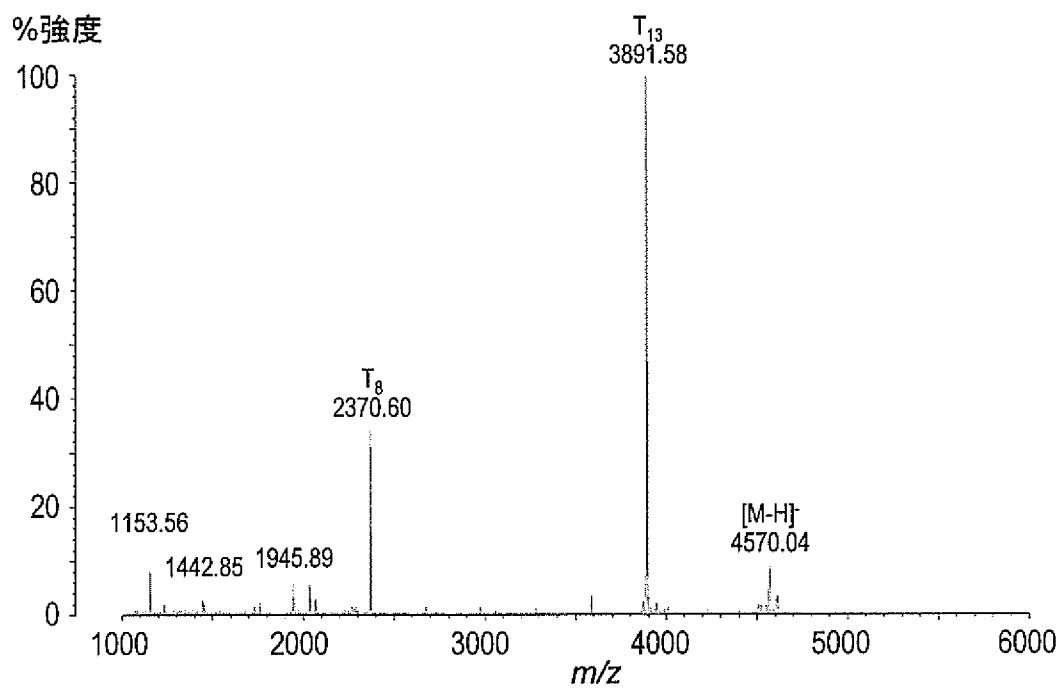
A

生成物1のMALDI TOF massスペクトル



B

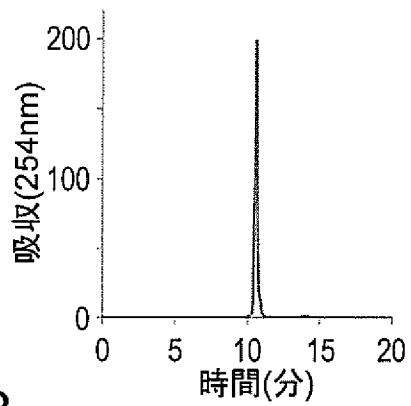
10.3分のピークのMALDI TOF massスペクトル



[図44]

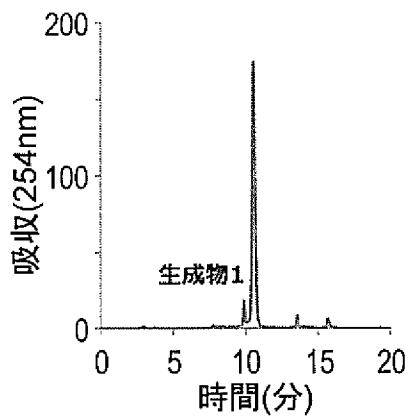
A

5'-TTTTT(CvU)TTTTT-3'(反応前)



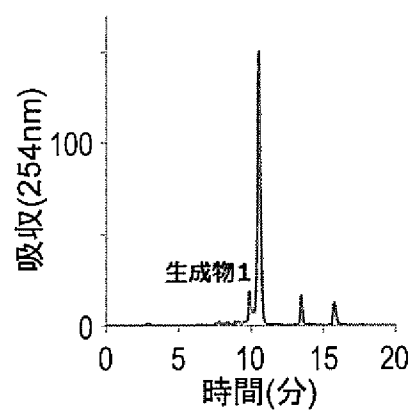
B

70°C、3時間反応後



C

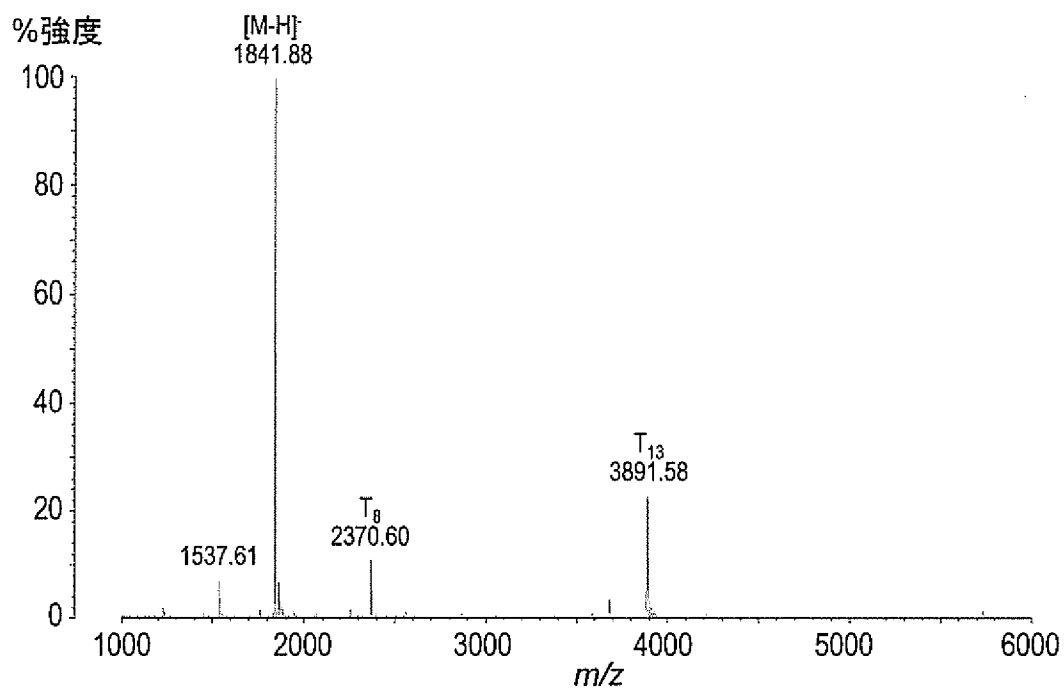
70°C、8時間反応後



[図45]

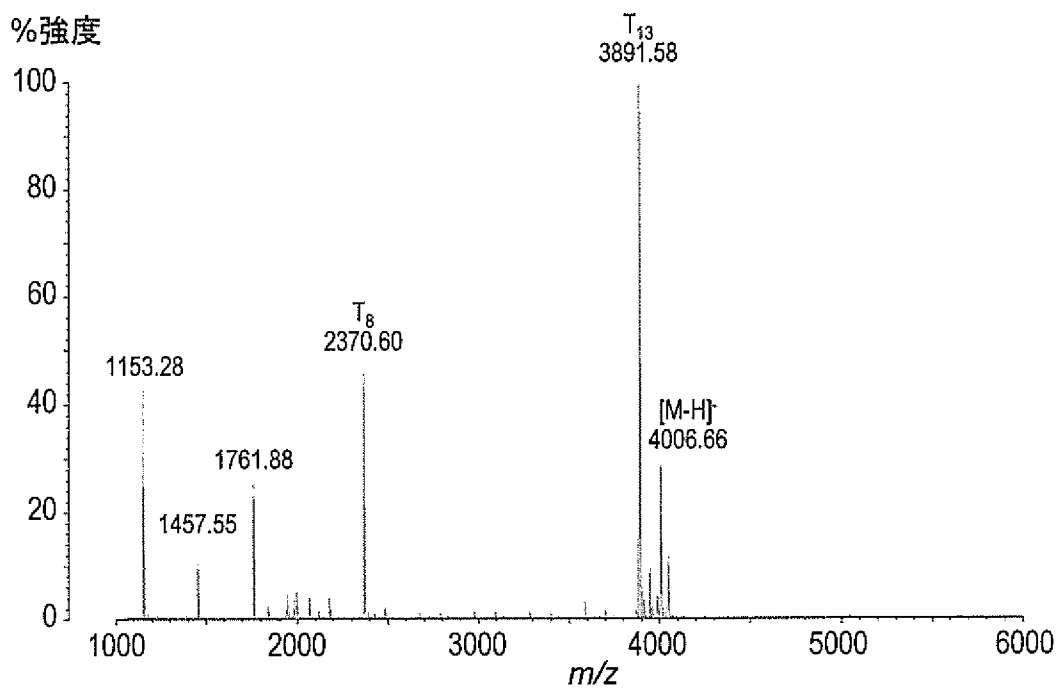
A

生成物1のMALDI TOF massスペクトル



B

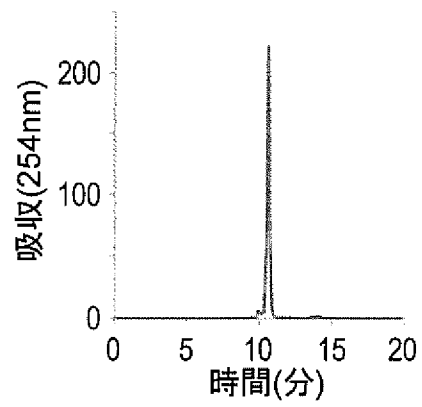
10.5分のピークのMALDI TOF massスペクトル



[図46]

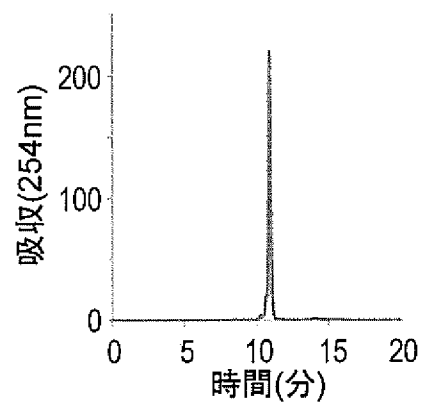
A

5'-TTTTCTT(PC)TCCTTTT-3'



B

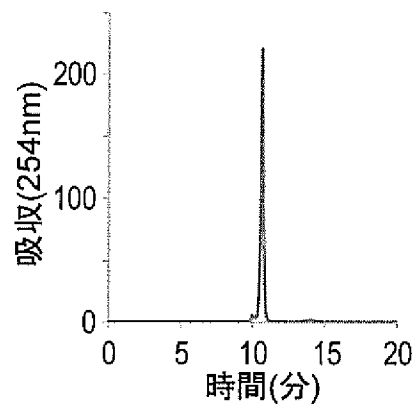
5'-TTTTTT(PC)TTTTTT-3'



[図47]

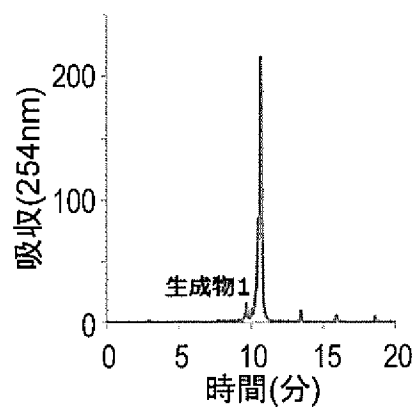
A

5'-TTTTCTT(PC)TCCTTTT-3' (反応前)



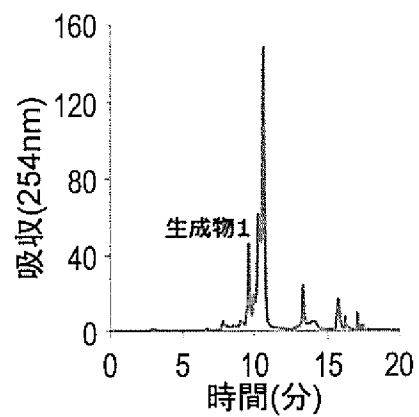
B

70°C、3時間反応後

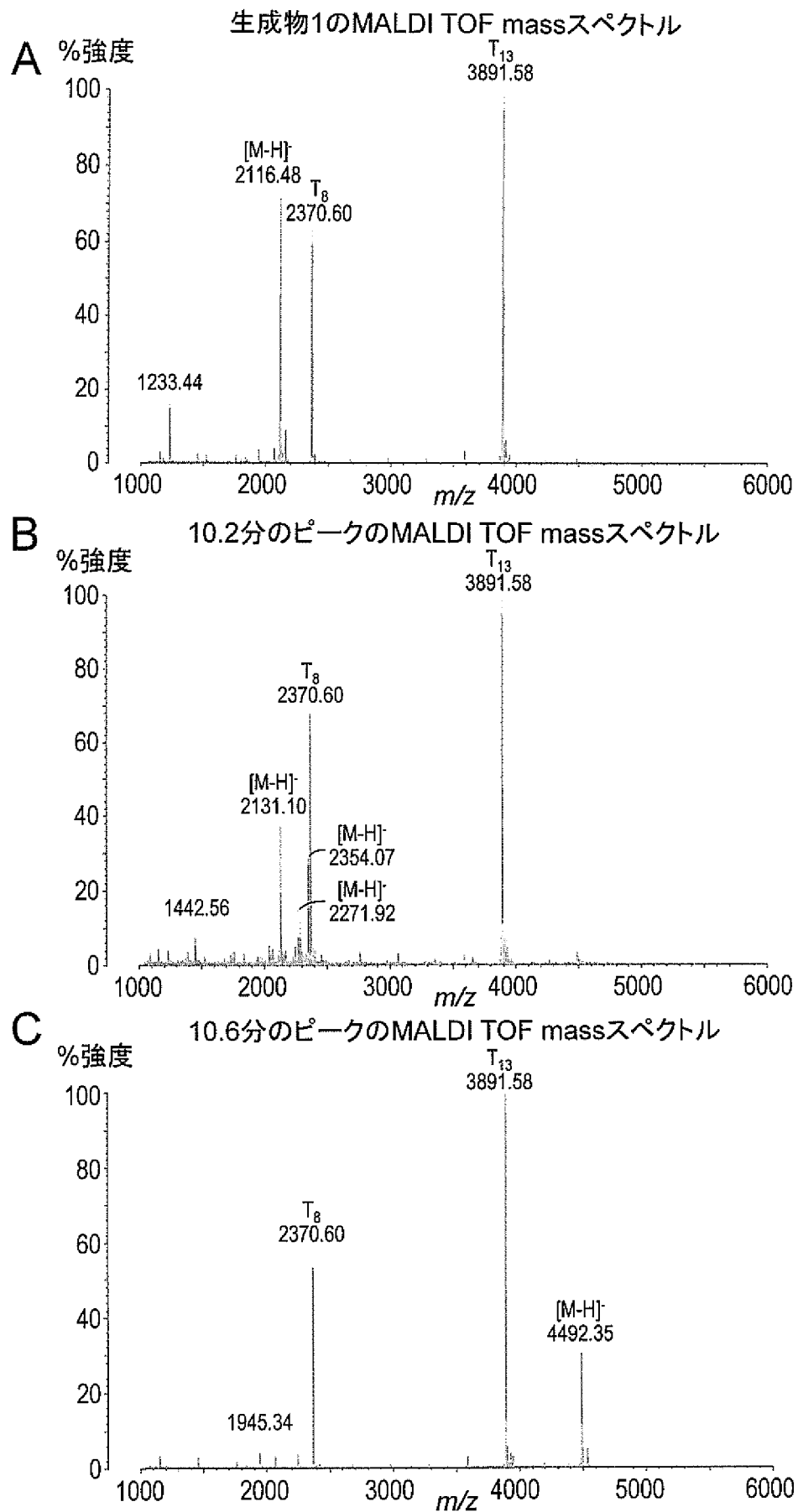


C

70°C、16時間反応後



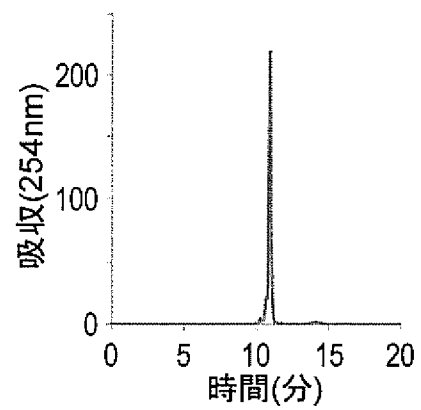
[図48]



[図49]

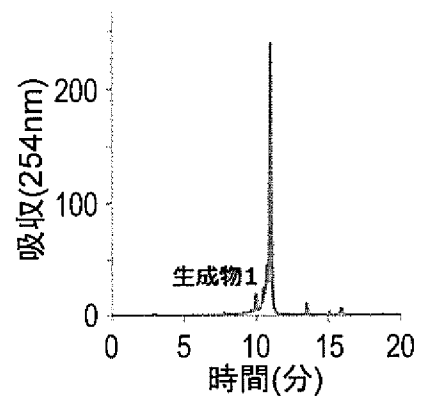
A

5'-TTTTT(PC)TTTTT-3' (反応前)



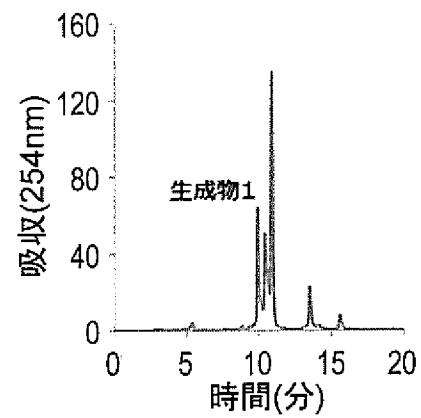
B

70°C、3時間反応後

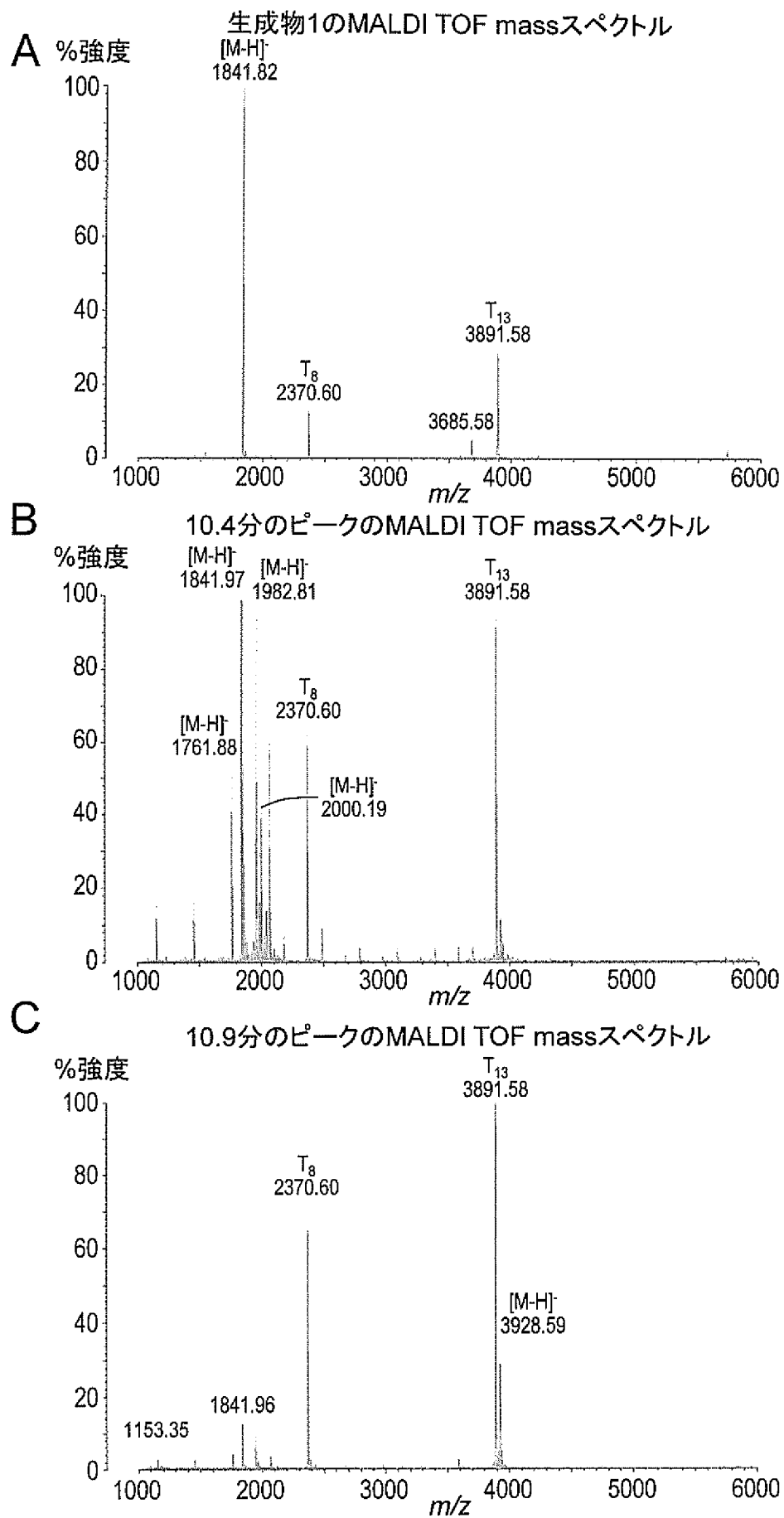


C

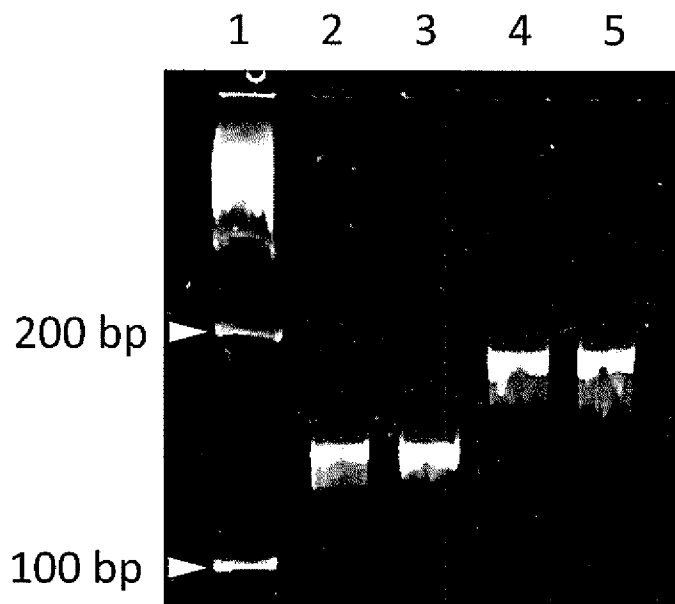
70°C、16時間反応後



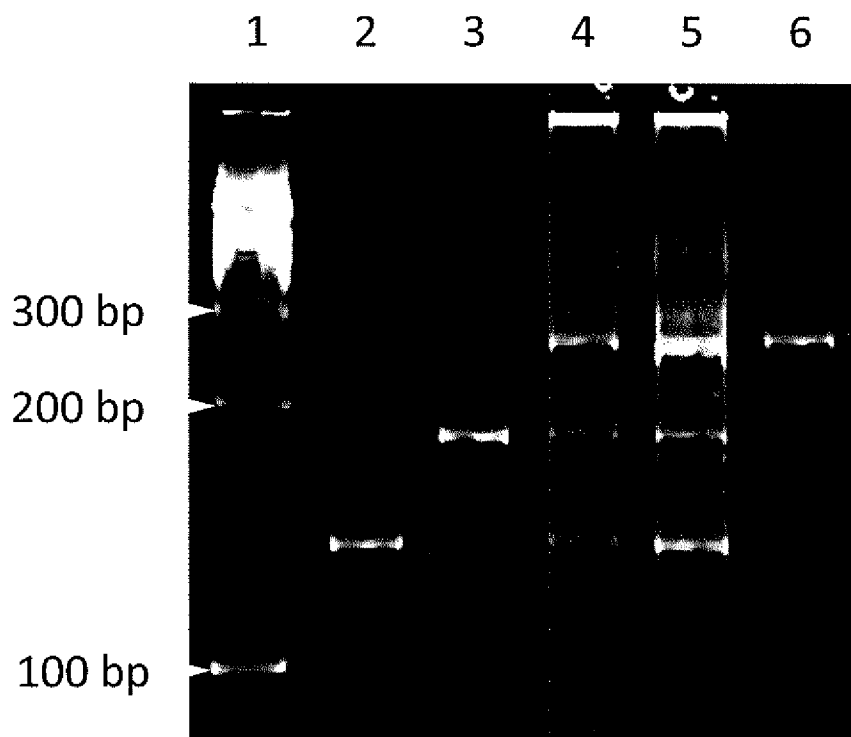
[図50]



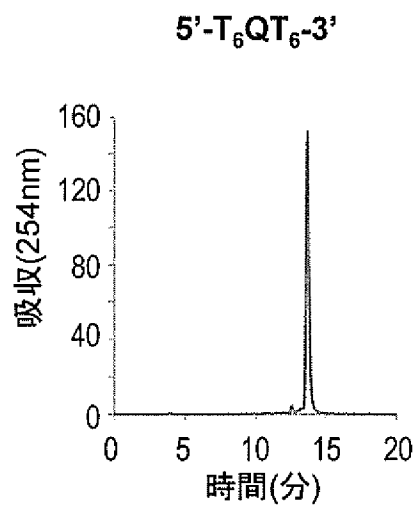
[図51]



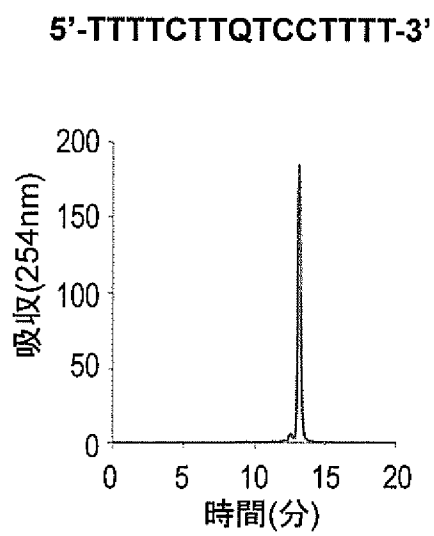
[図52]



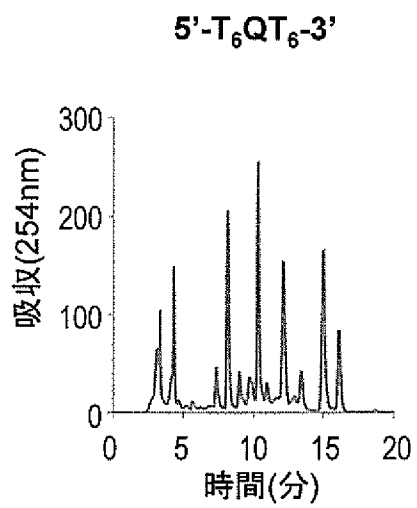
[図53]



[図54]

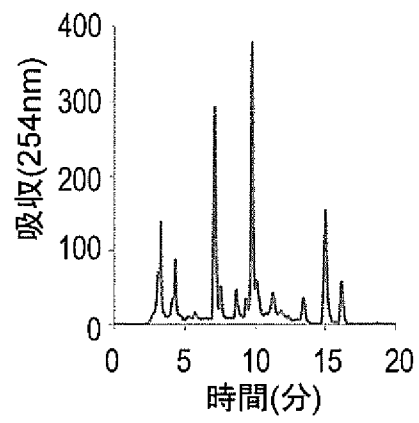


[図55]



[図56]

5'-TTTTCTTQTCCTTTT-3'

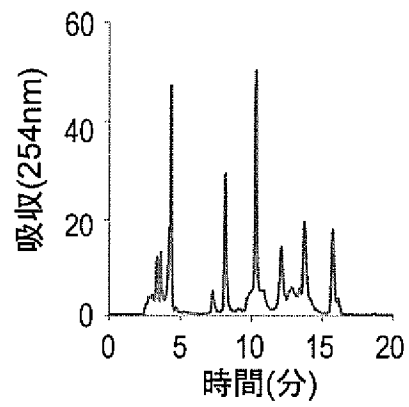


[図57]

A

 $5'\text{-T}_6\text{QT}_6\text{-3}'$

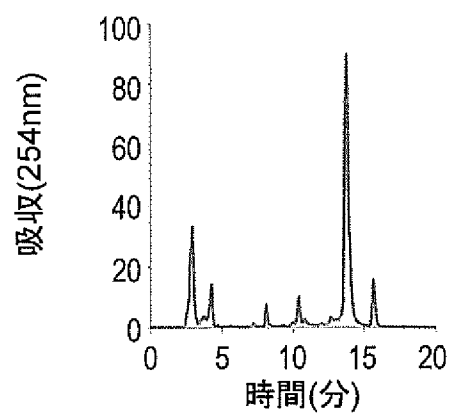
メチルアミンによる反応後



B

 $5'\text{-T}_6\text{QT}_6\text{-3}'$

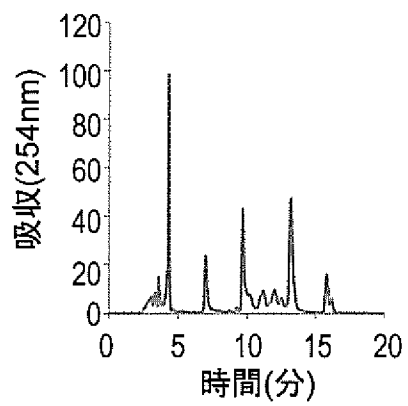
エチレンジアミンによる反応後



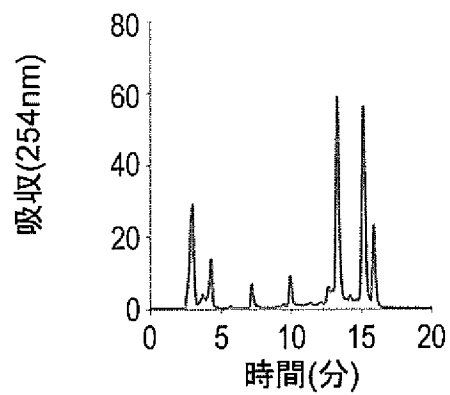
[図58]

A**5'-TTTTCTTQTCCTTTT-3'**

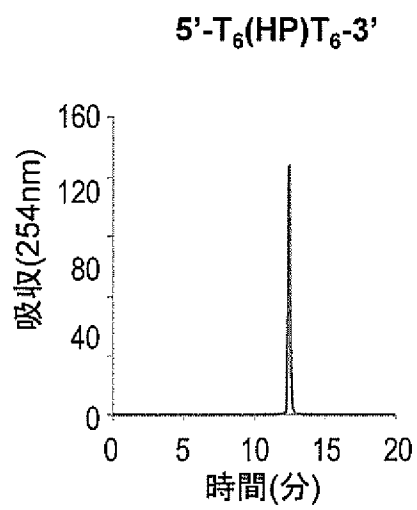
メチルアミンによる反応後

**B****5'-TTTTCTTQTCCTTTT-3'**

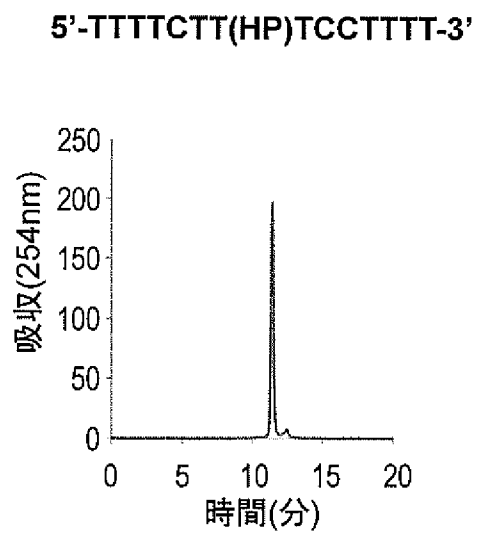
エチレンジアミンによる反応後



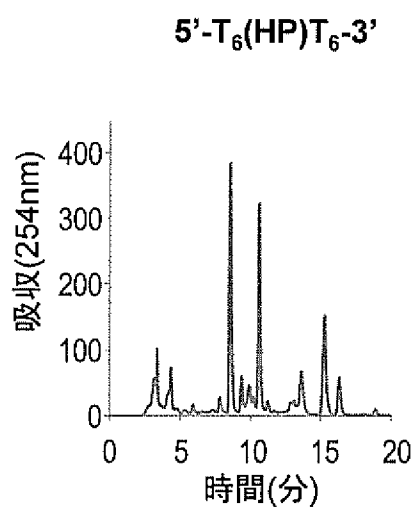
[図59]



[図60]

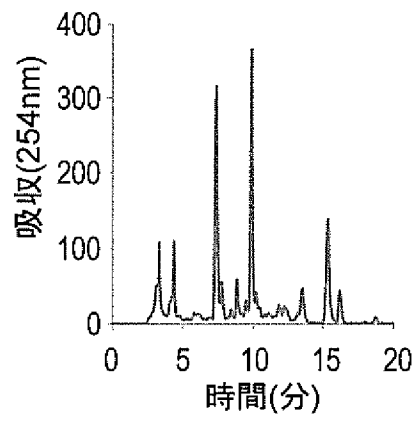


[図61]



[図62]

5'-TTTTCTT(HP)TCCTTTT-3'

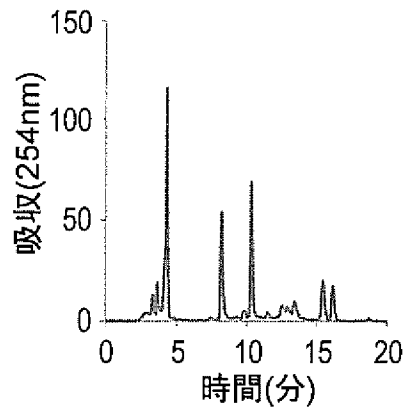


[図63]

A

 $5'\text{-T}_6(\text{HP})\text{T}_6\text{-3}'$

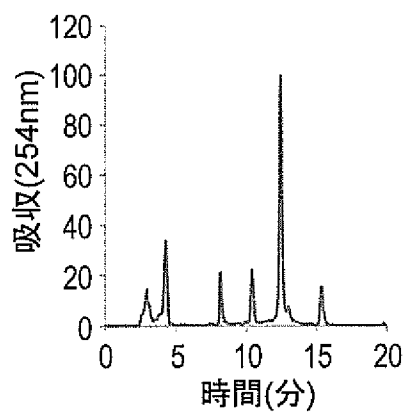
メチルアミンによる反応後



B

 $5'\text{-T}_6(\text{HP})\text{T}_6\text{-3}'$

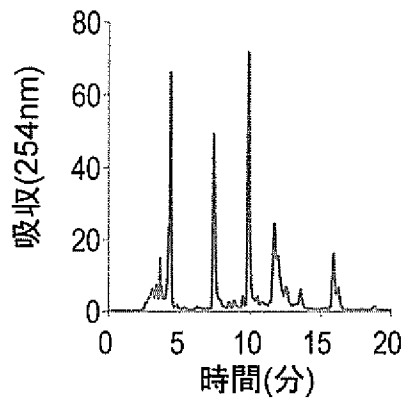
エチレンジアミンによる反応後



[図64]

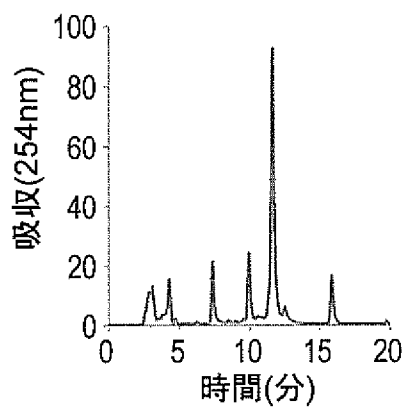
A 5'-TTTTCTT(HP)TCCTTTT-3'

メチルアミンによる反応後

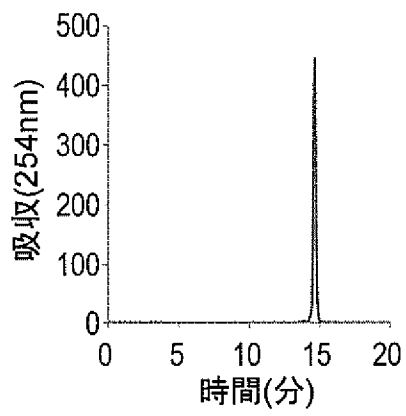


B 5'-TTTTCTT(HP)TCCTTTT-3'

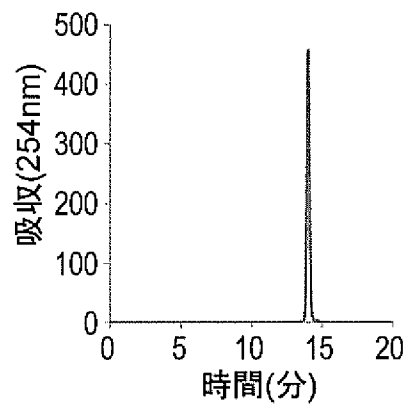
エチレンジアミンによる反応後



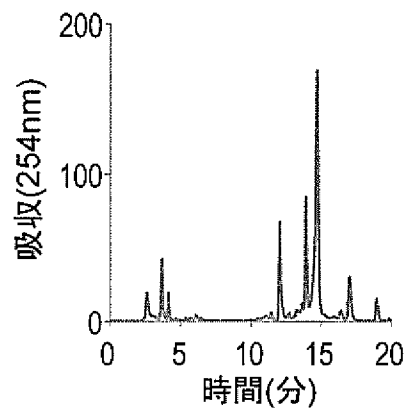
[図65]

5'-T₆(fPG)T₆-3'

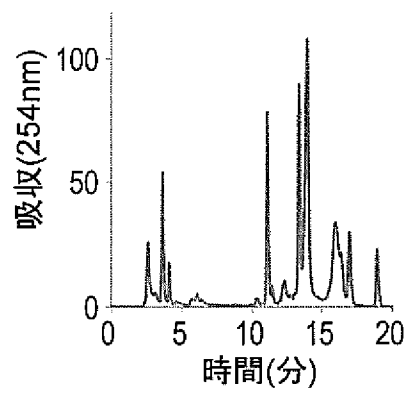
[図66]

5'-TTTTCTT(fPG)TCCTTTT-3'

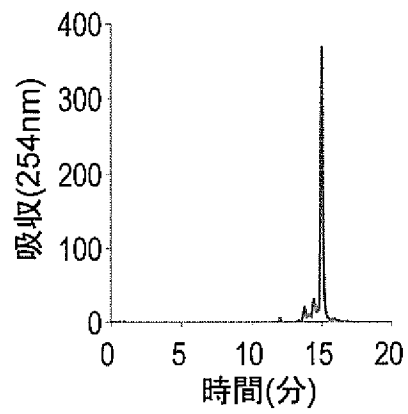
[図67]

 $5'-T_6(fPG)T_6-3'$ 

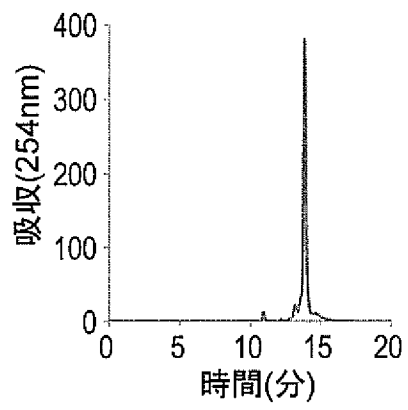
[図68]

 $5'-TTTTCTT(fPG)TCCTTTT-3'$ 

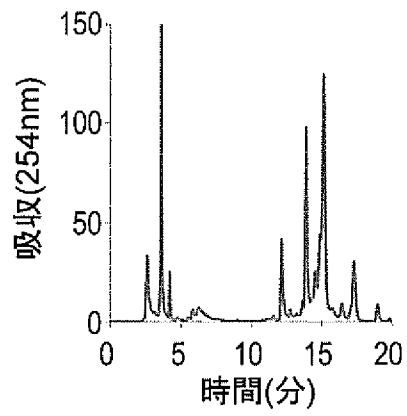
[図69]

5'-T₆(fPA)T₆-3'

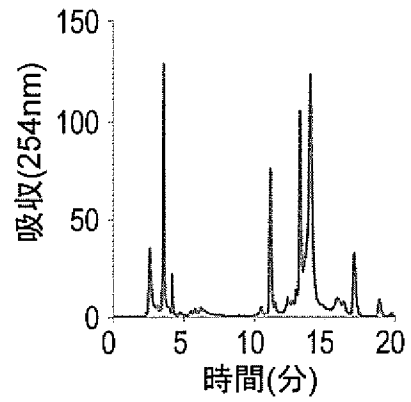
[図70]

5'-TTTTCTT(fPA)TCCTTTT-3'

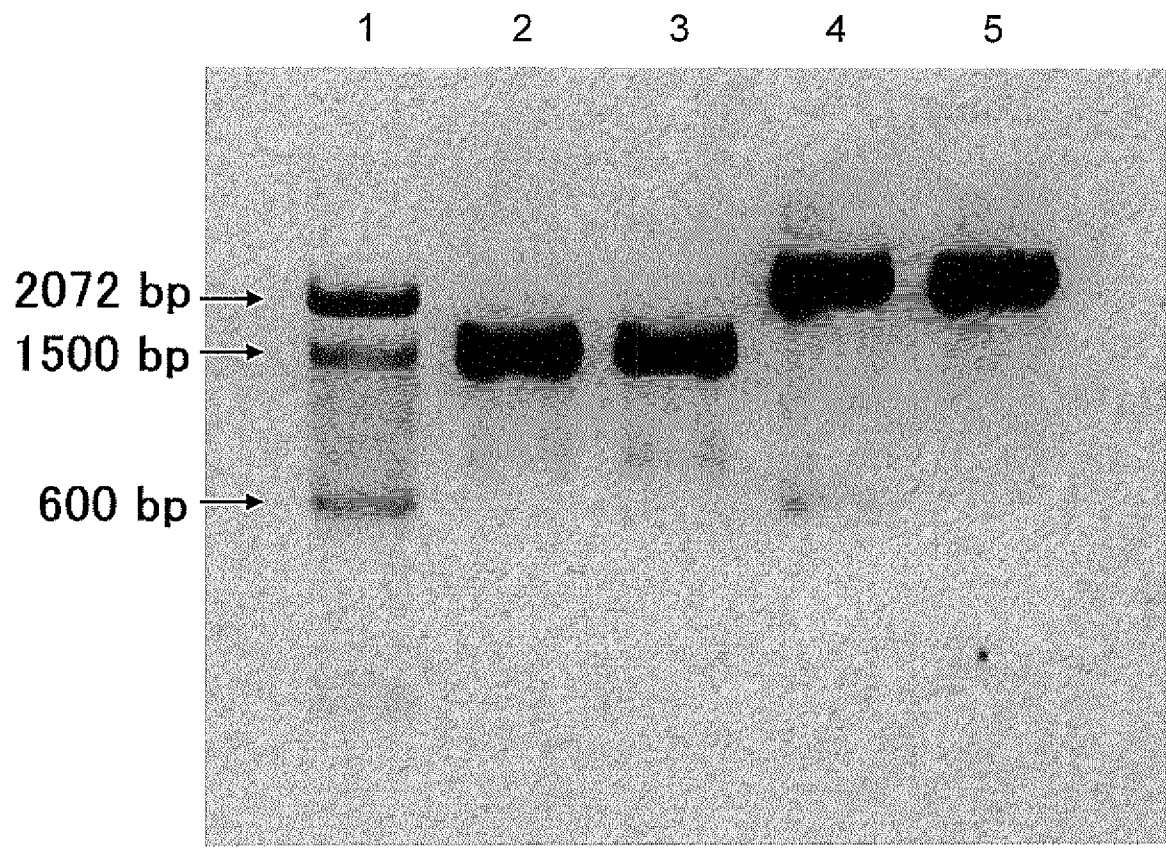
[図71]

5'-T₆(fPA)T₆-3'

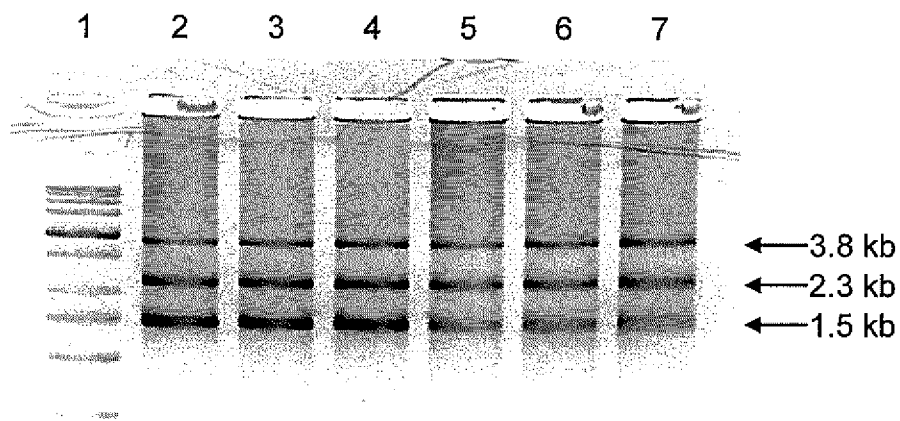
[図72]

5'-TTTTCTT(fPA)TCCTTTT-3'

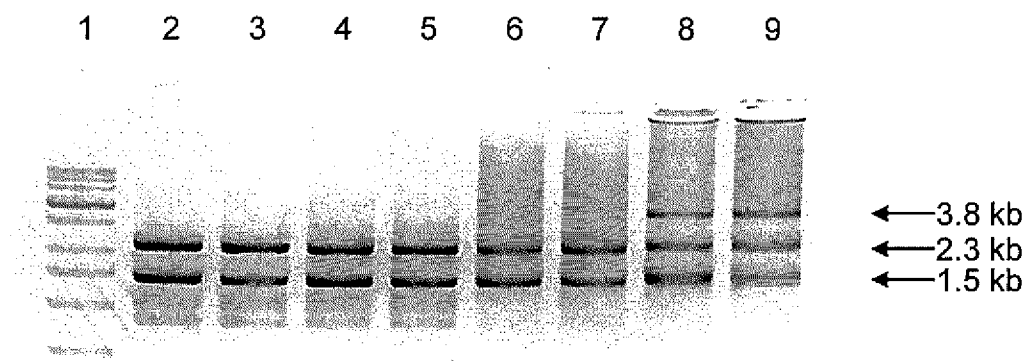
[図73]



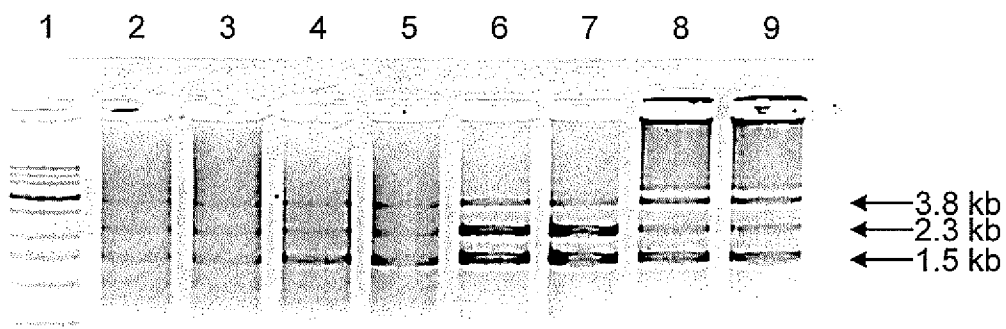
[図74]



[図75]



[図76]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/058349

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, C07H19/073(2006.01)i, C07H19/173(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/00-15/90, C07H19/00-19/24, C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA/REGISTRY (STN), JSTPlus/JMEDPlus(JDreamIII), WPIDS/MEDLINE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> A	ANDERSON, Aaron S., et al., Independent generation and reactivity of 2'-deoxy-5-methyleneuridin-5-yl, a significant reactive intermediate produced from thymidine as a result of oxidative stress., The Journal of organic chemistry, 2000, Vol.65, No.15, pages 4648-4654	<u>7</u> 1-6

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
06 June, 2013 (06.06.13)Date of mailing of the international search report
18 June, 2013 (18.06.13)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/058349

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2003/048387 A2 (SOLEXA LTD.), 12 June 2003 (12.06.2003), entire text & US 2003/0104437 A1 & AU 2002349155 A1 & EP 1451351 A2 & JP 2005-511058 A & CN 1617937 A & US 7057026 B2 & KR 2005044668 A & US 2006/0160075 A1 & US 7427673 B2 & EP 2119722 A1 & JP 2011-088898 A & EP 2338893 A1 & WO 2003/048387 A3 & HK 1156320 A0	1-7
A	WO 2004/011665 A2 (NUGEN TECHNOLOGIES, INC.), 05 February 2004 (05.02.2004), entire text & US 2009/0159815 A1 & AU 2003279697 A1 & EP 1573056 A2 & JP 2005-534304 A & ZA 2004009152 A & JP 2010-011872 A & JP 4551216 B2 & WO 2004/011665 A3	1-7
A	WO 1999/011819 A1 (THE PERKIN-ELMER CORP.), 11 March 1999 (11.03.1999), entire text & AU 9887727 A & EP 991779 A1 & AU 731069 B & JP 2002-511767 A	1-7
A	SCHLITT, Katherine M., et al., Concerning the hydrolytic stability of 8-aryl-2'- deoxyguanosine nucleoside adducts: implications for abasic site formation at physiological pH., The Journal of organic chemistry, 2009, Vol.74, No.16, pages 5793-5802	1-7
A	PESNOT, Thomas, et al., Two-step synthesis of novel, bioactive derivatives of the ubiquitous cofactor nicotinamide adenine dinucleotide (NAD)., Journal of medicinal chemistry, 2011, Vol.54, No.10, pages 3492-3499	1-7

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C07H19/073(2006.01)i, C07H19/173(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N15/00-15/90, C07H19/00-19/24, C12Q1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

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

CA/REGISTRY (STN), JSTPlus/JMEDPlus (JDreamIII), WPIDS/MEDLINE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
<u>X</u> A	ANDERSON, Aaron S., et al., Independent generation and reactivity of 2'-deoxy-5-methyleneuridin-5-yl, a significant reactive intermediate produced from thymidine as a result of oxidative stress., The Journal of organic chemistry, 2000, Vol.65, No.15, pages 4648-4654	<u>7</u> 1-6

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

0 6 . 0 6 . 2 0 1 3

国際調査報告の発送日

1 8 . 0 6 . 2 0 1 3

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

清水 晋治

4 B

3 5 3 5

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	WO 2003/048387 A2 (SOLEXA LIMITED) 2003.06.12, 全文 & US 2003/0104437 A1 & AU 2002349155 A1 & EP 1451351 A2 & JP 2005-511058 A & CN 1617937 A & US 7057026 B2 & KR 2005044668 A & US 2006/0160075 A1 & US 7427673 B2 & EP 2119722 A1 & JP 2011-088898 A & EP 2338893 A1 & WO 2003/048387 A3 & HK 1156320 A0	1-7
A	WO 2004/011665 A2 (NUGEN TECHNOLOGIES, INC.) 2004.02.05, 全文 & US 2009/0159815 A1 & AU 2003279697 A1 & EP 1573056 A2 & JP 2005-534304 A & ZA 2004009152 A & JP 2010-011872 A & JP 4551216 B2 & WO 2004/011665 A3	1-7
A	WO 1999/011819 A1 (THE PERKIN-ELMER CORPORATION) 1999.03.11, 全文 & AU 9887727 A & EP 991779 A1 & AU 731069 B & JP 2002-511767 A	1-7
A	SCHLITT, Katherine M., et al., Concerning the hydrolytic stability of 8-aryl-2'-deoxyguanosine nucleoside adducts: implications for abasic site formation at physiological pH., The Journal of organic chemistry, 2009, Vol.74, No.16, pages 5793-5802	1-7
A	PESNOT, Thomas, et al., Two-step synthesis of novel, bioactive derivatives of the ubiquitous cofactor nicotinamide adenine dinucleotide (NAD)., Journal of medicinal chemistry, 2011, Vol.54, No.10, pages 3492-3499	1-7