

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-514005

(P2005-514005A)

(43) 公表日 平成17年5月19日(2005.5.19)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B O 2 4
A 6 1 K 31/7088	A 6 1 K 31/7088	4 B O 6 3
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 48/00	4 C O 5 7
A 6 1 P 31/00	A 6 1 P 31/00	4 C O 8 4
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	4 C O 8 6
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 77 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2003-525009 (P2003-525009)	(71) 出願人	500115398
(86) (22) 出願日	平成14年9月4日 (2002. 9. 4)		エクシコン エ/エス
(85) 翻訳文提出日	平成16年4月27日 (2004. 4. 27)		E X I Q O N A / S
(86) 国際出願番号	PCT/IB2002/003911		デンマーク、ヴェドベク ディーケー-2
(87) 国際公開番号	W02003/020739		950、ビッグストアップン 9
(87) 国際公開日	平成15年3月13日 (2003. 3. 13)		B y g s t u b b e n 9, D K - 2 9 5
(31) 優先権主張番号	60/317, 034		O V e d b a e k D E N M A R K
(32) 優先日	平成13年9月4日 (2001. 9. 4)	(74) 代理人	100064908
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 志賀 正武
(31) 優先権主張番号	60/323, 967	(74) 代理人	100089037
(32) 優先日	平成13年9月22日 (2001. 9. 22)		弁理士 渡邊 隆
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100101465
			弁理士 青山 正和
		(74) 代理人	100108453
			弁理士 村山 靖彦
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 新規の LNA 組成物およびその使用

(57) 【要約】

特有の塩基基を含む修飾LNAユニットを提供する。核酸塩基およびヌクレオシド塩基の望ましい置換は、核酸鎖に組み込まれるとき、万能的なハイブリッド形成を媒介することができる。新規のLNA組成物は、PCRプライマー、配列決定、アンチセンスオリゴヌクレオチドの合成、診断等の広範囲の適用分野に用いることができる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

10℃以下のT_m差をもたらす修飾塩基を有するLNAユニットを含む核酸。

【請求項 2】

任意に置換された炭素環式アリール部分を含む修飾塩基を有する、LNAユニットを含む核酸。

【請求項 3】

任意に置換された炭素環式アリール部分が、LNAユニットの1'位にリンカーを介して結合している請求項2に記載の核酸。

【請求項 4】

リンカーが分枝または直鎖アルキレンまたはアルケニレンである請求項3に記載の核酸。

【請求項 5】

オキサゾールまたはイミダゾール以外の修飾核酸塩基またはヌクレオシド塩基を有する、LNAユニットを含む核酸。

【請求項 6】

修飾塩基が多環炭素環式アリール部分を含む請求項1から5のいずれか一項に記載の核酸。

【請求項 7】

修飾塩基が3～6個の融合環を含む炭素環式アリール部分を含む請求項1から5のいずれか一項に記載の核酸。

【請求項 8】

LNAユニットが任意に置換されたピレニル部分を含む請求項1から5のいずれか一項に記載の核酸。

【請求項 9】

修飾塩基が、任意に置換されたピリジルオキサゾール、任意に置換されたピレニルメチルグリセロール、任意に置換されたピロール、任意に置換されたジアゾール、任意に置換されたトリアゾール、5-ニトロインドールまたはヒポキサンチンを含む請求項1に記載の核酸。

【請求項 10】

LNAユニットが4～6員環の炭素または複素脂環式環を含み、脂環式環の1員または複数員が別の環状連結部を形成している請求項1から9のいずれか一項に記載の核酸。

【請求項 11】

脂環式環または環状連結部の少なくとも一つが、少なくとも1つのヘテロ原子環員を含む請求項10に記載の核酸。

【請求項 12】

脂環式環が少なくとも1つのヘテロ原子環員を有する請求項10または11に記載の核酸。

【請求項 13】

脂環式環が少なくとも1つのN、O、SまたはSe環原子を有する請求項10から12のいずれか一項に記載の核酸。

【請求項 14】

脂環式環が少なくとも1つの酸素環原子を有する請求項10から13のいずれか一項に記載の核酸。

【請求項 15】

環状連結部が該連結部中に少なくとも1つのヘテロ原子を有する請求項10から14のいずれか一項に記載の核酸。

【請求項 16】

環状連結部が該連結部中に少なくとも1つのN、O、SまたはSe原子を有する請求項10から15のいずれか一項に記載の核酸。

【請求項 17】

10

20

30

40

50

環状連結部が該連結部中に少なくとも1つの酸素原子を有する請求項10から15のいずれか一項に記載の核酸。

【請求項18】

該連結部が2つの隣接する脂環式環員を含む請求項10から17のいずれか一項に記載の核酸。

【請求項19】

前記連結部が隣接しない2つの脂環式環員を含む請求項10から17のいずれか一項に記載の核酸。

【請求項20】

前記連結部がC-1'とC-2'、C-2'とC-3'、C-2'とC-4'、またはC-2'とC-5'との連結部である請求項10から17のいずれか一項に記載の核酸。 10

【請求項21】

前記連結部がC-2'とC-3'またはC-2'とC-4'との連結部である請求項10から17のいずれか一項に記載の核酸。

【請求項22】

前記連結部が、脂環式環員以外に合計3～6個の原子を含む請求項10から21のいずれか一項に記載の核酸。

【請求項23】

前記連結部が、脂環式環員以外に合計3または4個の原子を含む請求項10から21のいずれか一項に記載の核酸。 20

【請求項24】

脂環式基が1つの環状連結部を含む請求項10から23のいずれか一項に記載の核酸。

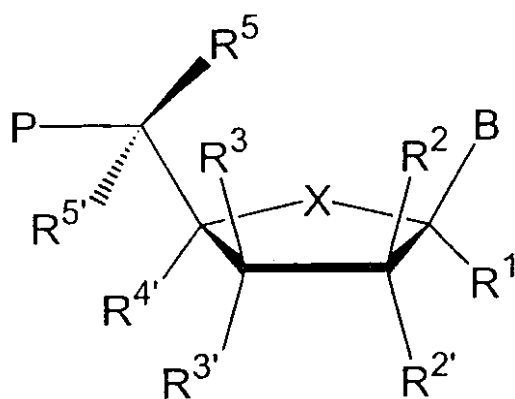
【請求項25】

脂環式基が2つの環状連結部を含む請求項10から23のいずれか一項に記載の核酸。

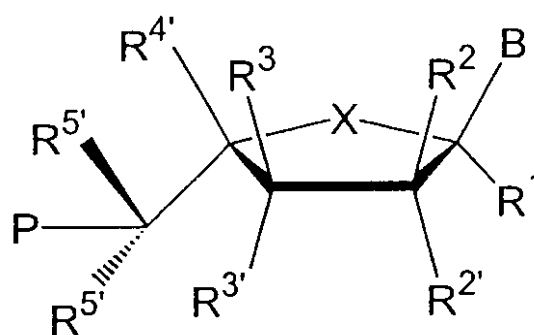
【請求項26】

次の式IaまたはIb

【化1】



Ia



Ib

〔式中、Xは酸素、硫黄および炭素であり、Bは修飾塩基であり、式IaにおけるR¹、R²、式IbにおけるR²'、R³またはR³'のいずれか、R⁵およびR⁵'は水素、メチル、エチル、プロピル、プロピニル、アミノアルキル、メトキシ、プロポキシ、メトキシ-エトキシ、フルオロまたはクロロであり、Pは後続するモノマーへのヌクレオシド間連結部のラジカル位置または5'末端基を表し、R³またはR³'は先行するモノマーへのヌクレオシド間連結部または3'末端基であり、式IaにおいてR⁴'およびR²'は、一緒になって-CH₂-O-、-CH₂-S-、-CH₂-NH-、-CH₂-NMe-、-CH₂-CH₂-O-、-CH₂-CH₂-S-、-CH₂-CH₂-NH-または-CH₂-CH₂-NMe-を表し、前式中、酸素、硫黄または窒素がそれぞれ2'位に結合しており、式IbにおいてR⁴'およびR²'は、一緒になって-CH₂-O-、-CH₂-S-、-CH₂-NH-、-CH₂-NMe-、-CH₂-CH₂-O-、-CH₂-C 30

30

40

50

H₂-S-, -CH₂-CH₂-NH-または-CH₂-CH₂-NMe-を表し、前式中、酸素、硫黄または窒素がそれぞれ2位に結合している(R²立体配置)]の少なくとも1つのユニットを含む請求項10から23のいずれか一項に記載の核酸。

【請求項 2 7】

Bが、任意に置換されたピレニル、任意に置換されたビリジルオキサゾール、任意に置換されたピレニルメチルグリセロール、任意に置換されたピロール、任意に置換されたジアゾール、または任意に置換されたトリアゾールから選択される部分を含む請求項26に記載の核酸。

【請求項 2 8】

Bがピレニルである請求項24に記載の核酸。

10

【請求項 2 9】

LNAユニットが二環性基の2'位における修飾を含む請求項1から9のいずれか一項に記載の核酸。

【請求項 3 0】

2'-デオキシ-2'-フルオロリボヌクレオチド、2'-0-メチルリボヌクレオチド、2'-0-メトキシエチルリボヌクレオチド、ペプチド核酸、5-プロピニルピリジンリボヌクレオチド、7-デアザプリンリボヌクレオチド、2,6-ジアミノプリンリボヌクレオチドおよび2-チオ-ピリジンリボヌクレオチドからなる群から選択される部分を含む請求項29に記載の核酸。

【請求項 3 1】

単一の核酸ユニット(モノマー)を含む請求項1から30のいずれか一項に記載の核酸。

20

【請求項 3 2】

複数の核酸ユニットを含む請求項1から30のいずれか一項に記載の核酸。

【請求項 3 3】

オリゴヌクレオチドである請求項1から30のいずれか一項に記載の核酸。

【請求項 3 4】

前記オリゴヌクレオチドが4~50個の核酸ユニットを含む請求項33に記載の核酸。

【請求項 3 5】

1つまたは複数の天然のDNAまたはRNAヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドである請求項1から34のいずれか一項に記載の核酸。

30

【請求項 3 6】

天然核酸塩基を有する1つまたは複数のLNAユニットを含むオリゴヌクレオチドである請求項1から35のいずれか一項に記載の核酸。

【請求項 3 7】

天然核酸塩基を有する1つまたは複数のLNAユニットが、修飾塩基を有する1~6個の塩基のLNAユニットからある距離において前記オリゴヌクレオチドに組込まれている請求項36に記載の核酸。

【請求項 3 8】

天然核酸塩基を有する1つまたは複数のLNAユニットが、修飾塩基を有する1~4個の塩基のLNAユニットからある距離において前記オリゴヌクレオチドに組込まれている請求項36に記載の核酸。

40

【請求項 3 9】

天然核酸塩基を有する少なくとも2つのLNAユニットが、修飾塩基を有するLNAユニットの両側に隣接している請求項37または38に記載の核酸。

【請求項 4 0】

少なくとも2つのLNAユニットが、修飾塩基を有する1~6個の塩基のLNAユニットからある距離において独立に配置されている請求項39に記載の核酸。

【請求項 4 1】

少なくとも2つのLNAユニットが、修飾塩基を有する1~4個の塩基のLNAユニットからある距離において独立に配置されている請求項39に記載の核酸。

50

【請求項 4 2】

LNAユニットが8℃以下のT_m差をもたらす請求項1から41のいずれか一項に記載の核酸。

【請求項 4 3】

LNAユニットが6℃以下のT_m差をもたらす請求項1から41のいずれか一項に記載の核酸。

【請求項 4 4】

核酸がPCRプライマーとしての使用に適している請求項1から43のいずれか一項に記載の核酸。

【請求項 4 5】

請求項1から44のいずれか一項に記載の核酸をPCRプライマーとして使用することを含む核酸の増幅方法。

10

【請求項 4 6】

プライマーが標的分子に結合する請求項45に記載の方法。

【請求項 4 7】

プライマーが未知の配列の標的分子に結合する請求項45または46に記載の方法。

【請求項 4 8】

相補性標的分子に対する前記核酸の会合定数(K_a)が、2本鎖標的分子の相補鎖の会合定数より大きい請求項45から47のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 9】

前記核酸と相補性標的分子との間の二重鎖の融解温度が、2本鎖標的分子の相補鎖の融解温度より高い請求項45から47のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 5 0】

請求項1から44のいずれか一項に記載の核酸を含む反応基質。

【請求項 5 1】

核酸が捕捉プローブである請求項50に記載の反応基質。

【請求項 5 2】

捕捉プローブが、問題の核酸の野生型配列とその1つまたは複数の対立遺伝子の間の少なくとも1塩基対の差を検出することができる請求項51に記載の反応基質。

【請求項 5 3】

捕捉プローブが1本鎖DNA標的に結合する請求項50から52のいずれか一項に記載の反応基質。

30

【請求項 5 4】

全ユニットの50%超がLNAユニット以外である請求項1から44のいずれか一項に記載の核酸を含むオリゴヌクレオチド。

【請求項 5 5】

5～100個の全ユニットを含む請求項54に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 5 6】

5～50個の全ユニットを含む請求項54に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 5 7】

5～30個の全ユニットを含む請求項54に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 5 8】

8～15個の全ユニットを含む請求項54に記載のオリゴヌクレオチド。

40

【請求項 5 9】

LNAユニットがリボースにおける2'位の修飾を含む請求項54から58のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 6 0】

1つまたは複数のオキシ-LNAユニットを含む請求項54から59のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 6 1】

1つまたは複数のチオ-LNAユニットを含む請求項54から60のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド。

50

【請求項 6 2】

1つまたは複数のアミノ-LNAユニットを含む請求項54から61のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 6 3】

2'-0,4'-C-メチレン-β-D-リボフラノシル、2'-デオキシ-2'-フルオロリボヌクレオチド、2'-0-メチルリボヌクレオチド、2'-0-メトキシエチルリボヌクレオチド、ペプチド核酸、5-プロピニルピリミジンリボヌクレオチド、7-デアザプリンリボヌクレオチド、2,6-ジアミノプリンリボヌクレオチドおよび2-チオ-ピリミジンリボヌクレオチドからなる群から選択される1つまたは複数のユニットを含む請求項54から62のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド。

10

【請求項 6 4】

非修飾ユニットがデオキシリボヌクレオチドを含む請求項54から63のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 6 5】

共有または非共有結合を形成することにより、タンパク質、アンプリコン、酵素、多糖、抗体、ハプテンおよびペプチドから選択される化合物と複合する請求項54から64のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 6 6】

ヌクレオチドからの蛍光シグナルの変化により、オリゴヌクレオチドのハイブリッド形成状態をオリゴヌクレオチドの非結合状態と区別することができるように、位置決めされた蛍光団部分と消光団部分を含む請求項54から65のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド。

20

【請求項 6 7】

TaqmanプローブまたはMolecular Beaconとしての使用に適している請求項54から66のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 6 8】

請求項54から67のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドを、核酸活性酵素の基質として使用することを含む、核酸を操作する方法。

【請求項 6 9】

オリゴヌクレオチドをDNAまたはRNAポリメラーゼの基質として使用する請求項68に記載の方法。

30

【請求項 7 0】

第1の標的ヌクレオチドと、第1の標的ヌクレオチドと比較して単一塩基変異を有する第2の標的ヌクレオチドとを区別しないプローブの設計のための請求項1から43のいずれか一項に記載の核酸の使用。

【請求項 7 1】

1つまたは複数の単一塩基変異以外は、同じヌクレオチド配列を有する一群の標的核酸を検出するプローブの調製のための請求項1から43のいずれか一項に記載の核酸の使用。

【請求項 7 2】

アンチセンス技術により治療可能な疾患を治療する薬剤組成物の製造のための請求項1から43のいずれか一項に記載の核酸の使用。

40

【請求項 7 3】

(a)請求項1または2に記載の第1の核酸を標的分子とともに、第1の核酸の前記標的分子への結合を可能にする条件下でインキュベートする段階と、
(b)前記標的分子を鋳型として前記第1の核酸を伸長させる段階とを含む標的核酸分子を増幅する方法。

【請求項 7 4】

段階(a)がさらに、前記第1の核酸が結合する前記標的分子の領域とは異なる領域に結合する第2の核酸と、前記標的分子とを接触させることを含む請求項73に記載の方法。

【請求項 7 5】

50

前記標的分子の配列が既知である請求項73に記載の方法。

【請求項76】

前記標的分子の配列が不明である請求項73に記載の方法。

【請求項77】

相補性標的分子に対する第1の核酸の会合定数(K_a)が、2本鎖標的分子の相補鎖の会合定数より大きい請求項73に記載の方法。

【請求項78】

第1の核酸と相補性標的分子との間の二重鎖の融解温度が、2本鎖標的分子の相補鎖の融解温度より高い請求項73に記載の方法。

【請求項79】

(a)請求項1または2に記載の第1の核酸を標的分子とともに、第1の核酸を標的分子とハイブリッド形成させる条件下でインキュベートする段階と、

(b)前記ハイブリッド形成を検出する段階と

を含む標的核酸分子を検出する方法。

【請求項80】

段階(a)がさらに、前記第1の核酸が結合する前記標的分子の領域とは異なる領域に結合する第2の核酸と、前記標的分子とを接触させることを含む請求項79に記載の方法。

【請求項81】

前記第1の核酸が、1つまたは複数のヌクレオチドが異なるポリヌクレオチド配列を有する2つ以上の標的分子と結合する請求項79に記載の方法。

【請求項82】

前記第1の核酸が、2つ以上の標的分子の間の異なるヌクレオチドに対応する位置に修飾塩基を有する請求項81に記載の方法。

【請求項83】

請求項1または2に記載の核酸を、酵素が前記核酸に結合するか、または化学的に修飾することを可能にする条件下で、前記酵素とインキュベートすることを含む核酸を操作する方法。

【請求項84】

前記酵素がDNAまたはRNAポリメラーゼである請求項83に記載の方法。

【請求項85】

前記酵素が制限酵素である請求項83に記載の方法。

【請求項86】

標的核酸の発現を特異的に減少させるのに十分な量の請求項1または2に記載の核酸を細胞に導入することを含み、前記の導入核酸が前記標的核酸の少なくとも20ヌクレオチドの領域と本質的に相補的なヌクレオチド配列を含む、細胞中の標的核酸の発現を阻害する方法。

【請求項87】

細胞が哺乳動物に存在する請求項86に記載の方法。

【請求項88】

標的核酸の発現を特異的に減少させるのに十分な量の請求項1または2に記載の核酸を哺乳動物に導入することを含み、前記導入核酸が前記標的核酸の少なくとも20ヌクレオチドの領域と本質的に相補的なヌクレオチド配列を含む、哺乳動物における標的核酸に関連する疾患、障害または状態を予防、安定化または治療する方法。

【請求項89】

病原体の標的核酸の発現を特異的に減少させるのに十分な量の、請求項1または2に記載の核酸を哺乳動物に導入することを含み、前記導入核酸が前記標的核酸の少なくとも20ヌクレオチドの領域と本質的に相補的なヌクレオチド配列を含む、哺乳動物における病原体感染を予防、安定化または治療する方法。

【請求項90】

前記哺乳動物がヒトである請求項88または89に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 9 1】

前記導入核酸が1本鎖である請求項88または89に記載の方法。

【請求項 9 2】

前記導入核酸の相補性の前記領域が2本鎖である請求項88または89に記載の方法。

【請求項 9 3】

(a)5～10個の連続するチミンを含む請求項1または2に記載の核酸と標的RNAをインキュベートする段階と、

(b)前記標的RNAを鋳型として前記核酸を伸長させる段階とを含む標的RNAを増幅する方法。

【請求項 9 4】

核酸がピレン-LNAヌクレオチドを含む請求項93に記載の方法。

【請求項 9 5】

1つまたは複数の前記チミンがLNA Tヌクレオチドの一部である請求項93に記載の方法。

【請求項 9 6】

前記核酸が蛍光標識されている請求項93に記載の方法。

【請求項 9 7】

前記標的RNAが全RNA細胞抽出物に含まれている請求項93に記載の方法。

【請求項 9 8】

前記標的RNAが真核生物のポリアデニル化mRNAである請求項93に記載の方法。

【請求項 9 9】

前記インキュベーションを逆転写酵素および安定化量のトレハロース溶液の存在下で行う請求項93に記載の方法。

【請求項 1 0 0】

前記インキュベーションを耐熱性逆転写酵素の存在下で行う請求項93に記載の方法。

【請求項 1 0 1】

(a)標的分子を、2つ以上の核酸の保存領域と実質的に相補性を有する領域を含む請求項1または2に記載の核酸とともに、前記核酸分子が前記標的分子に結合することを可能にする条件下でインキュベートする段階と、

(b)前記標的分子を鋳型として前記核酸を伸長させる段階とを含む標的核酸分子を増幅する方法。

【請求項 1 0 2】

(a)標的分子を、2つ以上の核酸の保存領域と実質的に相補性を有する領域を含む請求項1または2に記載の核酸とともに、前記核酸分子が前記標的分子にハイブリダイズすることを可能にする条件下でインキュベートする段階と、

(b)前記ハイブリッド形成を検出する段階とを含む標的核酸分子を検出する方法。

【請求項 1 0 3】

核酸がピレン-LNAヌクレオチドを含む請求項101または102に記載の方法。

【請求項 1 0 4】

核酸が少なくとも5個のLNAヌクレオチドを含む請求項101または102に記載の方法。

【請求項 1 0 5】

前記保存領域が、触媒作用、基質結合またはDNA結合に関与するタンパク質中の領域をコードする請求項101または102に記載の方法。

【請求項 1 0 6】

細胞または生物試料由来の全RNA抽出物から直接得た、真核生物ポリ(A)+RNAを逆転写するための第1鎖cDNA合成における、オリゴ(T)オリゴヌクレオチドプライマー中での請求項1または2に記載の核酸の使用。

【請求項 1 0 7】

請求項1または2に記載の核酸がオリゴ(T)のアンカー配列の一部である請求項106に記載の使用。

10

20

30

40

50

【請求項108】

原核生物、古細菌または真核生物内で、関連するタンパク質、酵素またはプロテインキナーゼドメインを同定および/または選択するための、縮重オリゴヌクレオチドプローブにおける請求項1または2に記載の核酸の使用。

【請求項109】

前記タンパク質、酵素またはプロテインキナーゼドメインが、レトロウイルスアスパルチルプロテアーゼ(受入れ番号PF00077)、ラットmapキナーゼerk2(受入れ番号PF00069)を含む真核生物プロテインキナーゼ、C型肝炎ウイルス非構造タンパク質E2/NS1(受入れ番号PF01560)、古細菌ATPアーゼ(受入れ番号PF01637)、ホメオボックス関連ロイシンジッパー(PF02183)、アポトーシス予防タンパク質(PF02331)、DNA修復タンパク質rad10(PF03834)、グリコヒドロラーゼファミリー11(PF00457)およびグリコヒドロラーゼファミリー12(PF01670)からなる群から選択される請求項108に記載の使用。 10

【請求項110】

請求項1、2または5に記載の核酸を10個以上含む核酸の集団。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、修飾Locked Nucleic Acid(LNA)ユニット(例えば、個々のLNAモノマーおよびLNAモノマーを含むオリゴマー)、特に、特有の塩基基を有するそのようなモノマーおよびオリゴマーに関する。望ましい核酸塩基およびヌクレオシド塩基置換は、核酸鎖に組込まれるとき、万能的な(universal)ハイブリッド形成を媒介することができる。新規のLNA組成物は、PCRプライマー、配列決定、アンチセンスオリゴヌクレオチドの合成、診断等の広範囲の適用分野に用いることができる。 20

【背景技術】

【0002】

疾患状態に対しては、古典的療法は、タンパク質の疾患を引き起こす、または疾患を増強する機能を調節しようとしてタンパク質との相互作用に一般的に焦点を合わせてきた。より新しい治療アプローチにおいては、そのようなタンパク質の実際の産生の調節が望まれる。タンパク質の産生を妨害することにより、副作用が最小限で、最大限の治療効果を得ることができる。したがって、さもないと望ましくないタンパク質または複数のタンパク質の生成をもたらすような遺伝子発現を妨害または別の方法で調節することがそのような治療アプローチの一般的目的である。特定の遺伝子発現を阻害する1つの方法は、オリゴヌクレオチド、特に、特定の標的メッセンジャーRNA(mRNA)配列と相補性であるオリゴヌクレオチドの使用である。 30

【0003】

オリゴヌクレオチドは、研究用試薬としても広く用いられている。それらは、他の多くの生体分子の機能の理解ならびに他の分子の調製に有用である。例えば、PCR反応におけるプライマーとしてのオリゴヌクレオチドの使用は、拡大しつつある商業を生じさせた。PCRは商業および研究施設の主力となり、PCRの適用分野は増加した。例えば、PCR技術は今日、法医学、古生物学、進化論研究および遺伝相談の分野で用いられている。商業化は、非分子生物学の訓練を受けた人員がPCRを適用する際の助けとなるキットの開発につながった。オリゴヌクレオチドはそのようなPCR技術におけるプライマーとしても用いられている。 40

【0004】

オリゴヌクレオチドは他の実験操作においても用いられている。これらのうちのいくつかは、Molecular Cloning、A Laboratory Manual、Second Ed.、J.Sambrook et al.編、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1989およびCurrent Protocols In Molecular Biology、F.M.Ausubel et al.編、Current Publications、1993のような一般的な実験マニュアルに記述されている。そのような使用としては、i)in situハイブリッド形成後の可視化のための合成標識オリゴヌクレオチドプローブの生成、ii)マイクロアレイ捕捉プロー 50

ブの生成、iii)核酸試料調製用捕捉プローブの生成、iv)オリゴマー化合物を含むライブラリーのスクリーニング、v)DNA配列決定、vi)ポリメラーゼ連鎖反応によるin vitro増幅、vii)PCR増幅効率の実時間可視化のための蛍光標識オリゴヌクレオチド(二重色素プローブ、分子ビーコンおよびスコピオン)の使用、およびviii)クローン化DNAの部位特異的突然変異誘発などがある。Molecular Cloning、A Laboratory Manualの第2版(前出)を参照のこと。Current Protocols In Molecular Biology(前出)の第2巻における「DNA-protein interactions and The Polymerase Chain Reaction」も参照のこと。オリゴヌクレオチドは、定まった幾何形状(立方体、円柱等)を有する分子構造を作るナノテクノロジー応用における構築ブロックとしても用いられてきた。

【0005】

診断における、研究用試薬としての、また治療薬としてのオリゴヌクレオチドの有用性を高めるために、オリゴヌクレオチドに特定の化学的修飾が導入された。そのような修飾は、標的鎖への結合を増大させるため(すなわち、融解温度、 T_m を上昇させる)、オリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド標的複合体の同定を助けるため、細胞浸透を増大させるため、オリゴヌクレオチドの構造または活性を分解または妨害するヌクレアーゼおよび他の酵素に対して安定化するため、いったん標的に配列特異的に結合した後の破壊(終結事象)の様式をもたらすため、およびオリゴヌクレオチドの薬物動態特性を改善するために設計されたものである。

【非特許文献1】Molecular Cloning、A Laboratory Manual、Second Ed.、J.Sambrook et al.Ed、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1989

【非特許文献2】Current Protocols In Molecular Biology、F.M.Ausbel et al.Ed、Current Publications、1993

【特許文献1】国際特許公開第99/14226号

【特許文献2】国際特許公開第00/56746号

【特許文献3】国際特許公開第00/66604号

【特許文献4】米国特許第6440739号

【非特許文献3】Samuel、「Host genetic variability and West Nile virus susceptibility」、Proc.Natl.Acad.Sci.USA、2002年8月21日

【非特許文献4】Beasley、Virology 296:17~23頁、2002

【特許文献5】国際公開第0056748号

【非特許文献5】C.R.Newton et al.、PCR、2nd ED.、Springer-Verlag(New York:1997)、p.24

【特許文献6】米国特許第5432272号

【非特許文献6】Susan M.Freier and Karl-Heinz Altmann、Nucleic Acids Research、1997、vol.25、4429~4443頁

【特許文献7】米国特許第3687808号

【非特許文献7】Antisense Research and Application、Ed.S.T.Crooke and B.Lebbleu、CRC Press、1993

【非特許文献8】Englisch et al.、Angewandte Chemie、International Edition、1991、30、613~722頁

【非特許文献9】Concise Encyclopedia of Polymer Science and Engineering、J.I.Kroschwitz Ed.、John Wiley & Sons、1990、858~859頁

【非特許文献10】Cook、Anti-Cancer Drug Design、1991、6、585~607頁

【非特許文献11】Singh et al.、J.Org.Chem.、1998、6、6078~9頁

【非特許文献12】Nielsen et al.、J.Chem.Soc.、Perkin Trans.、1997、3423~33頁

【非特許文献13】Beier et al.、Science、1999、283、699頁

【非特許文献14】Eschenmoser、Science、1999、2118頁

【非特許文献15】Mesmacker et al.、Current Opinion in Structure Biology 1995、5、343~355頁

【非特許文献16】Peyman and Ulmann、Chemical Reviews、90:543~584頁、1999

- 【非特許文献 17】Crooke, Ann.Rev.Pharmacol.Toxicol., 32;329~376頁(1992)
- 【非特許文献 18】Zamecnik and Stephenson, Proc.Natl.Acad.Sci., 75:280~284頁(1974)
- 【特許文献 8】米国特許第4806463号
- 【非特許文献 19】Matray and Kool, J,Am.Chem.Soc., 120, 6191頁
- 【非特許文献 20】Hermanson et al., 「Immobilized Affinity Ligand Techniques」、Academic Press, San Diego, California(1992)、137頁~
- 【非特許文献 21】Nature Genetics, suppl., vol.21, 1999年1月、1~60頁
- 【非特許文献 9】国際公開第96/31557号
- 【非特許文献 22】Harrington and Lieber, Gene and Develop., 3:1344頁[1994] 10
- 【非特許文献 23】Murante et al., J.Biol.Chem., 269:1191頁[1994]
- 【非特許文献 24】R.Yamaguchi, T.Imanishi, S.Kohgo, H.Horie and H.Ohrui, Biosci. Biotechnol.Biochem., 1999, 63, 736頁
- 【非特許文献 25】S.Obika, D.Nanbu, Y.Hari, K.Morio, Y.In, T.Ishida, およびT.Imanishi, Tetrahedron Lett., 1997, 38, 8735頁
- 【非特許文献 26】S.K.Singh, P.Nielsen, A.A.KoshkinおよびJ.Wengel, Chem.Comm., 1998, 455頁
- 【非特許文献 27】A.A.Koshkin, S.K.Singh, P.Nielsen, V.K.Rajwanshi, R.Kumar, M.Meldgaard, C.E.OlsenおよびJ.Wengel, Tetrahedron, 1998, 54, 3607頁
- 【非特許文献 28】S.Obika, D.Nanbu, Y.Hari, J.Andoh, K.Morio, T.DoiおよびT.Imanishi, Tetrahedron Lett., 1998, 39, 5401頁 20
- 【非特許文献 29】S.Obika, Y.Hari, K.MorioおよびT.Imanishi, Tetrahedron Lett., 2000, 41, 215頁
- 【非特許文献 30】S.Obika, Y.Hari, K.MorioおよびT.Imanishi, Tetrahedron Lett., 2000, 41, 221頁
- 【非特許文献 31】L.KvaernoおよびJ.Wengel, Chem.Comm., 1999, 657頁
- 【非特許文献 32】Sanger, Nicklen, およびCoulson, 1977, PNAS, USA, 74:5463-5467頁
- 【非特許文献 33】Devereux, J., Haeberli, P., およびSmithies, O., (1984), Nucleic Acids Res., 12, 387-395頁
- 【発明の開示】 30
- 【発明が解決しようとする課題】
- 【0006】
- ハイブリッド形成適用分野を含む様々な適用分野に有用な特性を提供することができる新規の核酸化合物を有することが望ましいと思われる。
- 【課題を解決するための手段】
- 【0007】
- 本発明は、修飾核酸化合物、特に、1つまたは複数の特有の塩基基を含むLNAユニット(例えば、個々のLNAモノマーおよびLNAモノマーを含むオリゴマー)を用いて核酸ハイブリッド形成、合成、PCR、DNA制限および配列決定を変化させる新規のLocked Nucleic Acid(LNA)組成物に関する。 40
- 【0008】
- 本発明の修飾モノマーおよびオリゴマーは、少なくとも1つのLNAユニットおよび/または少なくとも1つの修飾核酸塩基またはヌクレオシド塩基(本明細書でしばしば万能的または修飾塩基と称する)を含む。修飾核酸塩基またはヌクレオシド塩基は、非天然塩基基(すなわち、アデニン、グアニン、シトシン、ウラシルまたはチミン以外)を含むが、アデニン、グアニン、シトシン、ウラシルまたはチミン部分を含む核酸と効率よくハイブリッド形成する。具体例としてのオリゴマーは、2~100、5~100、4~50、5~50、5~30または8~15核酸ユニットを含む。いくつかの実施形態において、天然核酸塩基を含む1つまたは複数のLNAが1~6または1~4個の塩基の修飾塩基を有するLNAユニットからある距離においてオリゴヌクレオチドに組込まれている。特定の実施形態において、天然核酸塩基を有す 50

る少なくとも2つのLNAユニットが、その両側に修飾塩基を有するLNAユニットの両側に隣接している。望ましくは、少なくとも2つのLNAユニットが、1~6または1~4個の塩基の修飾塩基を有するLNAユニットからある距離において独立に配置されている。

【0009】

本発明の一般的な修飾塩基は、すべてのLNAユニットまたはLNAおよびDNAもしくはRNAユニットの混合物を含むオリゴヌクレオチドに組込まれているとき、相補性オリゴヌクレオチドとのハイブリッド形成により、相補性オリゴヌクレオチドに存在する塩基(天然)と無関係に実質的に一定の T_m 値を示す。

【0010】

特に、本発明の一般的に望ましい修飾塩基は、9量体オリゴヌクレオチドに組込まれているとき(他の8つの残基またはユニットが天然塩基を含む天然DNAもしくはRNAユニットである)、LNAユニットに相当するユニット以外は同一であり、それぞれが天然塩基ウラシル、シトシン、チミン、アデニンまたはグアニンの1つを有する4つの相補性オリゴヌクレオチド変異体とのハイブリッド形成により、約15、12、10、9、8、7、6、5、4、3または2°C以下の T_m 差を示す。すなわち、そのような4つの相補性配列を用いた場合に得られる最高及び最低 T_m (本明細書では T_m 差と称する)は、約15、12、10、9、8、7、6、5、4、3または2°C以下である。

【0011】

本発明の核酸組成物用の望ましい修飾核酸塩基またはヌクレオシド塩基としては、場合によって置換されている炭素脂環式または炭素環式アリール基(すなわち、炭素環メンバーのみ)、特に2、3、4、5、6、7または8つの連結部した、特に縮合炭素環式アリール部分のような多環炭素環式アリール基などがある。場合によって置換されているピレンも望ましい。そのような核酸塩基またはヌクレオシド塩基は、後続の実施例における例について実証されているように、重要な性能結果をもたらし得る。複素脂環式および複素芳香族核酸塩基も下記のように適している。いくつかの実施形態において、炭素環式部分がリンカーを介してLNAユニットの1'位に連結部されている(例えば、分枝または直鎖アルキレンまたはアルケニレン)。

【0012】

本明細書におけるLNAに関する記載は、4~6つの環メンバーを有する炭素または複素脂環式環、例えば、フラノース環、またはシクロペンチル、シクロヘプチル、テトラヒドロピラニル、オキセパニル、テトラヒドロチオフェニル、ピロリジニル、チアニル、チエパニル、ピペリジニル等の他の環構造を有する核酸ユニットを示している。本発明の1つの態様において、炭素または複素脂環式基の少なくとも1つの環原子がさらなる環状連結部を形成している。この環状連結部は、炭素または複素脂環式基の1つまたは複数、一般的に2つの原子を含んでいてよい。この環状連結部はまた、炭素または複素脂環式基の置換基であるが、環メンバーでない1つまたは複数の原子を含んでいてよい。

【0013】

望ましいLNAユニットは、フラノシル型および次の連結部の1つまたは複数を含むものなどである。すなわち、C-1', C-2', C-2', C-3', C-2', C-4'またはC-2', C-5'連結部。C-2', C-4'が特に望ましい。本発明の他の態様において、望ましいLNAユニットは、一般的にNorth (または短縮のために単にN)立体配座と称されているC3'エンド立体配座に有利である、中央の糖部分(例えば、リボースまたはキシロース)の2'位に置換基を有する化合物またはその誘導体である。本発明のこの第2の態様による望ましいLNAユニットは、2'-O-メチル、2'-フルオロ、2'-アリールおよび2'-O-メトキシエトキシ誘導体などである。他の望ましいLNAユニットは、以下でさらに論じ、また、国際特許公開第99/14226号、第00/56746号および第00/66604号に記載されている。具体例としての核酸は、2'-O,4'-C-メチレン-β-D-リボフラノシル、2'-デオキシ-2'-フルオロリボヌクレオチド、2'-O-メチルリボヌクレオチド、2'-O-メトキシエチルリボヌクレオチド、ペプチド核酸、5-プロピニルピリミジンリボヌクレオチド、7-デアザプリンリボヌクレオチド、2,6-ジアミノプリンリボヌクレオチドおよび2-チオ-ピリミジンリボヌクレオチドからなる群から選択される1つまたは複数の

ユニットを含む。

【0014】

本発明のオリゴヌクレオチドは、本明細書に開示する修飾塩基を含む少なくとも1つのLNAユニットを含む。適切なオリゴヌクレオチドは、天然塩基を含む天然DNAまたはRNAユニット(例えば、ヌクレオチド)ならびに天然塩基を含むLNAユニットも含んでいてよい。さらに、本発明のオリゴヌクレオチドは、天然塩基を含む、2'-O-メチルRNAのような修飾DNAまたはRNAも含んでいてよい。望ましいオリゴヌクレオチドは、修飾塩基を含むLNAユニットに加えて、1)天然塩基を含む1つまたは複数のDNAまたはRNAユニット(例えば、ヌクレオチド)、および2)天然塩基を含む1つまたは複数のLNAユニットの少なくとも1つ、望ましくは両方を含んでいる。

10

【0015】

天然塩基を含むLNAオリゴヌクレオチドは、ワトソンクリック塩基対合則に従い、DNAオリゴヌクレオチドにより形成される同様な二重鎖よりも著しく安定である二重鎖を形成する。さらに、LNAオリゴヌクレオチドは、2本鎖DNA標的分子ならびに鎖浸入によりRNA二次構造とハイブリッド形成し、また、制限エンドヌクレアーゼによる2本鎖DNAの消化ならびにデオキシリボヌクレアーゼおよびリボヌクレアーゼによるそれぞれDNAおよびRNAの消化のような幅広く選択される酵素反応を特異的に阻害することができる。

【0016】

本明細書に開示するシステムは、万能的ハイブリッド形成のための重要な核酸プローブを提供することができる。特に、万能的ハイブリッド形成は、望ましいピレンLNAモノマーを含む、立体配座的に制限されているモノマーを用いて実現することができる。万能的ハイブリッド形成挙動は、RNAが関わる状況においても実現することができる。さらに、万能的ハイブリッド形成のプローブの結合親和力は、高親和性モノマーを導入することにより、万能的塩基(universal base)に隣接する塩基の塩基対合選択性を損なわずに増加させることができる。

20

【0017】

オリゴヌクレオチドへの1つまたは複数の修飾核酸塩基またはヌクレオシド塩基の組み込みは、著しい利点をもたらす。とりわけ、LNAオリゴヌクレオチドは、他のオリゴヌクレオチドとハイブリッド形成せずに、しばしば自己ハイブリッド形成することができる。1つまたは複数の修飾塩基をLNAユニットとともに用いることにより、オリゴヌクレオチドの親和性のレベルを調節し、それにより望ましくない自己ハイブリッド形成を阻害することができる。

30

【0018】

本発明は、以下のスキーム1および2ならびに後続の実施例に開示する合成を含む、本明細書に開示するモノマーおよびオリゴマーの合成の方法も含む。

【0019】

塩基置換(下文で万能的塩基としばしば称する)を含む本発明の修飾核酸化合物は、例えば、DNA鎖、RNA鎖および/または2'-OMe-RNA/LNAキメラ鎖のようなキメラ分子に組み込まれたとき、万能的ハイブリッド形成を媒介することができる。置換を含む新規のLNAヌクレオチドの望ましい例は、ピレン-LNAまたはピレニル-LNAヌクレオチドなどである。2'-OMe-RNA/LNAキメラ鎖に対して、本発明の化合物は、万能的塩基に隣接する塩基の塩基対合選択性を損なわずに高い親和性ハイブリッド形成を示す。万能的塩基を検出し、評価する方法は、後続の実施例に詳細に記述する。

40

【0020】

本発明のオリゴヌクレオチドは、広範囲の適用分野、特に、ハイブリッド形成反応を伴う適用分野で用いることができる。オリゴヌクレオチドはまた、大規模ショットガンゲノム配列決定プロジェクトの処理能力の改善、キャピラリーDNA配列決定(例えば、ABI prism 3700)の処理能力の改善、ならびに1)タンデム反復ゲノム領域を配列決定する、2)ゲノム配列決定プロジェクトにおけるギャップを埋める、3)高GC含有鋳型を配列決定する方法の改善を目的とするDNA配列決定に用いることができる。DNA配列決定において、オリゴヌ

50

クレオチド配列決定プライマーを、ゲノム配列決定プロジェクトに対して多くの課題をしばしば提示する高GC含有および/またはタンデム反復ゲノム領域の読み過しのためのLNAエンハンサー要素と合わせる。

【0021】

本発明のオリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドのユニットまたは残基の総数に基づき、望ましくは少なくとも50%またはそれ以上、より望ましくは55、60、65または70%またはそれ以上の非修飾または天然DNAまたはRNAユニット(例えば、ヌクレオチド)またはLNAユニット以外のユニットを有する。本明細書に記載する非修飾核酸は、10量対オリゴマーに組込まれるとき、オリゴマーの T_m を1°Cまたは2°C以上上昇させない。より望ましくは、非修飾核酸ユニット(例えば、ヌクレオチド)は、実質的または完全に「天然」核酸である、すなわち、ウラシル、シトシン、チミン、アデニンまたはグアニンなどの非修飾塩基ならびに β -D-リボース(RNAの場合)または β -D-2-デオキシリボース(DNAの場合)などの非修飾ペントース糖ユニットを含む。

10

【0022】

本発明のオリゴヌクレオチドは、適切には単一修飾(すなわち、LNA)核酸ユニットのみを含んでいてよいが、望ましくはオリゴヌクレオチドは2、3、4または5またはそれ以上の修飾核酸ユニットを含む。一般的に望ましいのは、オリゴヌクレオチドがオリゴヌクレオチドの全ユニットに基づき、約5~約40または45%の修飾(LNA)核酸ユニットを含む場合であり、より望ましくはオリゴヌクレオチドがオリゴヌクレオチドの全ユニットに基づき、約5または10%~20、25、30または35%の修飾核酸ユニットを含む場合である。

20

【0023】

本明細書に開示する修飾塩基を含む1つまたは複数のLNAユニットを含む一般的なオリゴヌクレオチドは、適切には3または4~約200個の核酸反復ユニットを含み、少なくとも1ユニットが修飾塩基を含むLNAユニットであり、より一般的には約3または4~約5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140または150個の核酸ユニットを含み、修飾塩基を含む1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個のLNAユニットが存在する。

【0024】

上述のように、特に望ましいオリゴヌクレオチドは、3'および/または5'末端に非修飾DNAまたはRNAユニットと3'および5'末端の非修飾核酸ユニットのいずれか、または両方から1位上流(本明細書で一般的に-1位と称する)に修飾DNAまたはRNAユニットを含む。いくつかの実施形態において、修飾塩基は、一塩基多形の検出のためのプライマーのような核酸プライマーの3'末端位置に存在する。

30

【0025】

修飾DNAまたはRNAユニットの拡張された伸長、例えば、約4、5または6連続修飾DNAまたはRNAユニットを有さないオリゴヌクレオチドも望ましい。すなわち、望ましくは1つまたは複数の非修飾DNAまたはRNAが約3、4または5個の連続伸長の後に存在する。

【0026】

非修飾または天然ヌクレ塩基(すなわち、アデニン、グアニン、シトシン、ウラシルまたはチミン)を有するLNAユニットと本明細書に開示する修飾塩基を有するLNAユニットとの混合物を含むオリゴヌクレオチドが一般的に望ましい。

40

【0027】

本発明の特に望ましいオリゴヌクレオチドは、修飾塩基を含むLNAユニットがそれぞれが非修飾または天然塩基(アデニン、グアニン、シトシン、ウラシルまたはチミン)を有する2つのLNAユニットの間に挿入されているものを含む。天然塩基部分を含むLNA「フランキング」ユニットは、修飾塩基部分を含むLNAに直接隣接していてもよく、望ましくは修飾塩基部分を含むLNAの2、3、4または5核酸ユニット以内である。修飾塩基を含むLNAユニットと天然塩基を含むLNAユニットとに間に存在してよい核酸ユニットは、DNAおよび/またはRNAユニットは修飾塩基も含んでいてよいが、一般的に天然塩基部分を含むDNAおよび/またはRNAおよび/またはアルキル修飾RNA/DNAユニットであることが適切である。

50

【0028】

本発明のオリゴヌクレオチドは、少なくとも約1つの万能的塩基で構成されている。本発明のオリゴヌクレオチドは、例えば、約1~6つの2'-Ome-RNA、少なくとも2つのLNAユニットおよび少なくとも約1つのLNAピレンユニットから構成されていてよい。

【0029】

上述のように、様々なlocked核酸は、2'-4'または2'-3'糖連結部、locked C3'-エンドRNA様フラノース立体配座をとることが知られている2'-O,4'-C-メチレン-β-D-リボフラノシル部分を有する二環式および三環式DNAまたはRNAを含む本発明のモノマーおよびオリゴマーに用いることができる。本発明のオリゴヌクレオチドに含めることができる事例となる修飾構造を図1に示す。本発明のオリゴヌクレオチドに含めることができる他の核酸ユニットは、2'-デオキシ-2'-フルオロリボヌクレオチド、2'-O-メチルリボヌクレオチド、2'-O-メトキシエチルリボヌクレオチド、ペプチド核酸、5-プロピニルピリミジンリボヌクレオチド、7-デアザプリンリボヌクレオチド、2,6-ジアミノプリンリボヌクレオチドならびに2-チオ-ピリミジンリボヌクレオチドおよび他の糖基(例えば、キシロース)を含むヌクレオチドを含んでいてよい。

10

【0030】

オリゴヌクレオチドは、SNPsを含む突然変異の検出および分析に特に有用であることも発見された。特に、少なくともいくつかの適用分野においては、オリゴヌクレオチドを「突然変異耐性プローブ」、すなわち、特定の単一塩基変異(修飾塩基を含むLNAと相補性)を検出しないが、このプローブの他のユニットの特定の塩基対合を維持するプローブとして用いることが望ましい。したがって、本発明のそのようなプローブは、一連の関連突然変異を検出することができる。

20

【0031】

他の態様において、本発明は、本発明の2つまたはそれ以上の核酸の集団を対象とする。本発明の核酸の集団は、いかなる数の特有の核酸を含んでいてよい。例えば、集団は 10 、 10^2 、 10^4 または 10^5 個と少ない特有の分子、あるいは 10^7 、 10^8 、 10^9 個またはそれ以上と多い特有の分子を含んでいてよい。望ましい実施形態において、少なくとも1、5、10、50、100またはそれ以上のポリヌクレオチド配列が天然に存在しない配列である。望ましくは、少なくとも20、40または60%の特有のポリヌクレオチド配列が天然に存在しない配列である。望ましくは、核酸はすべて同じ長さであるが、一部の配列は長さが異なっていてよい。

30

【0032】

一態様において、本発明は本発明の核酸をPCRプライマーとして用いることを含む核酸を増幅する方法を対象とする。望ましくは、そのプライマーは標的分子に結合している。種々の実施形態において、そのプライマーは未知または既知の配列の標的分子に結合している。

【0033】

他の態様において、本発明は、本発明の核酸を含む反応基質を提供する。望ましくは、核酸は、捕捉プローブ、すなわち問題の核酸の野生型配列とその1つまたは複数の対立遺伝子との少なくとも1塩基対の差を検出することができるような捕捉プローブである。望ましい捕捉プローブは、1本鎖DNA標的に結合する。

40

【0034】

他の態様において、本発明は、1つまたは複数の核酸活性酵素の基質として本発明のオリゴヌクレオチドを用いて核酸を操作する方法を提供する。望ましくは、オリゴヌクレオチドをDNAまたはRNAポリメラーゼの基質として用いる。

【0035】

他の態様において、本発明は、酵素(例えば、DNAまたはRNAポリメラーゼまたは制限酵素)が核酸に結合または化学的に修飾することを可能にする条件下で本発明の核酸を酵素とともにインキュベートして核酸を操作する方法を提供する。

【0036】

50

他の態様において、本発明は、第1の標的ヌクレオチドと第1の標的ヌクレオチドと比較して単一塩基変異を有する第2の標的ヌクレオチドとを区別しないプローブの設計のための本発明の核酸の使用を対象とする。

【0037】

他の態様において、本発明は、1つまたは複数の単一塩基変異を除き同じヌクレオチド配列を有する標的核酸の群を検出するためのプローブの調製のための本発明の核酸の使用を対象とする。

【0038】

他の態様において、本発明は、標的核酸分子を増幅する方法を対象とする。この方法は、(a)本発明の第1の核酸を標的分子とともに、第1の核酸の標的分子への結合を可能にする条件下でインキュベートすることと、(b)標的分子を鋳型として用いて第1の核酸を伸長させることとを含む。望ましくは、この方法はさらに、標的分子を、第1の核酸が結合する標的分子の異なる領域に結合する第2の核酸と接触させることを含む。種々の実施形態において、標的分子の配列は既知または未知である。

10

【0039】

他の態様において、本発明は、(a)本発明の第1の核酸を標的分子とともに、第1の核酸を標的分子とハイブリッド形成させる条件下でインキュベートし、(b)ハイブリッド形成を検出することにより、標的核酸分子を検出する方法を提供する。望ましくは、この方法は、標的分子を、第1の核酸が結合する標的分子の異なる領域に結合する第2の核酸と接触させることも含む。いくつかの実施形態において、第1の核酸が2つまたはそれ以上のヌクレオチドが異なっているポリヌクレオチド配列を有する2つまたはそれ以上の標的分子に結合している。望ましくは、第1の核酸は、2つまたはそれ以上の標的分子の間で異なっているヌクレオチドに対応する位置に修飾塩基を有している。

20

【0040】

一態様において、本発明は、アンチセンス技術により治療可能な疾患の治療用の薬剤組成物の製造のための本発明の核酸の使用を対象とする。

【0041】

一態様において、本発明は、細胞中の標的核酸の発現を阻害する方法を提供する。この方法は、標的核酸の発現を特異的に減少させるに十分な量の本発明の核酸を細胞に導入することを含む。導入する核酸は、標的核酸の望ましくは少なくとも20ヌクレオチドの領域と本質的に相補性であるヌクレオチド配列を有する。望ましくは、細胞は哺乳動物細胞である。

30

【0042】

関連態様において、本発明は、哺乳動物における標的核酸に関連する疾患、障害または状態を予防、安定化または治療する方法を提供する。この方法は、標的核酸の発現を特異的に減少させるのに十分な量の本発明の核酸を哺乳動物に導入することを含むものであり、導入する核酸は標的核酸の望ましくは少なくとも20ヌクレオチドの領域と本質的に相補性であるヌクレオチド配列を有する。

【0043】

他の態様において、本発明は、病原体の標的核酸の発現を特異的に減少させるのに十分な量の本発明の核酸を哺乳動物に導入することにより哺乳動物における病原体感染を予防、安定化または治療する方法を提供する。導入する核酸は標的核酸の望ましくは少なくとも20ヌクレオチドの領域と本質的に相補性であるヌクレオチド配列を有する。

40

【0044】

上記の態様の治療方法の望ましい実施形態において、哺乳動物はヒトである。いくつかの実施形態において、導入する核酸は1本鎖または2本鎖である。

【0045】

他の態様において、本発明は、(a)標的RNAを2つまたはそれ以上の(例えば、5~10個)の連続するチミンを有する本発明の核酸とともにインキュベートし、(b)標的RNAを鋳型として用いて核酸を伸長させることにより、標的RNAを増幅する方法を提供する。望ましくは

50

、核酸はピレン-LNAヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、1つまたは複数のチミンがLNA Tヌクレオチドの一部である。望ましくは、核酸が蛍光標識されている。いくつかの実施形態において、標的RNAが全RNA細胞抽出物に含まれており、かつ/または標的RNAが真核生物ポリアデニル化mRNAである。望ましくは、オリゴ(T)ヌクレオチドを細胞または生物学的試料の全RNA抽出物からの直接的な真核生物ポリ(A)+RNAの逆転写のための第1鎖cDNA合成に用いる。いくつかの実施形態において、核酸がオリゴ(T)のアンカー配列の一部である。

【0046】

いくつかの実施形態において、インキュベーションを逆転写酵素および安定化量のトレハロース溶液の存在下で行う。他の実施形態において、インキュベーションを耐熱性逆転写酵素の存在下で行う。 10

【0047】

他の態様において、本発明は、(a)標的分子を2つまたはそれ以上の核酸の保存領域と実質的相補性を有する領域を有する本発明の核酸とともに、核酸分子が標的分子に結合することを可能にする条件下でインキュベートすることと、(b)標的分子を鋳型として用いて核酸を伸長させることを含む核酸分子を増幅する方法を対象とする。望ましくは、核酸を原核生物、古細菌または真核生物における関連タンパク質、酵素またはプロテインキナーゼドメインの同定および/または選択のための縮重(degenerate)オリゴヌクレオチドプローブに用いる。望ましくは、タンパク質、酵素およびプロテインキナーゼドメインを、レトロウイルスアスパルチルプロテアーゼ(受入れ番号PF00077)、ラットmapキナーゼerk2(20 受入れ番号PF00069)を含む真核生物プロテインキナーゼ、C型肝炎ウイルス非構造タンパク質E2/NS1(受入れ番号PF01560)、古細菌ATPアーゼ(受入れ番号PF01637)、ホメオボックス関連ロイシンジッパー(PF02183)、アポトーシス予防タンパク質(PF02331)、DNA修復タンパク質rad10(PF03834)、グリコヒドロラーゼファミリー11(PF00457)およびグリコヒドロラーゼファミリー12(PF01670)からなる群から選択する。

【0048】

一態様において、本発明は、(a)標的分子を2つ以上の核酸の保存領域と実質的相補性を有する領域を含む本発明の核酸とともに、核酸分子が標的分子とハイブリッド形成することを可能にする条件下でインキュベートし、(b)ハイブリッド形成を検出することにより標的核酸分子を検出する方法を提供する。望ましくは、核酸を原核生物、古細菌または真核生物における関連タンパク質、酵素またはプロテインキナーゼドメインの同定および/または選択のための縮重オリゴヌクレオチドプローブに用いる。望ましくは、タンパク質、酵素およびプロテインキナーゼドメインを、レトロウイルスアスパルチルプロテアーゼ(受入れ番号PF00077)、ラットmapキナーゼerk2(受入れ番号PF00069)を含む真核生物プロテインキナーゼ、C型肝炎ウイルス非構造タンパク質E2/NS1(受入れ番号PF01560)、古細菌ATPアーゼ(受入れ番号PF01637)、ホメオボックス関連ロイシンジッパー(PF02183)、アポトーシス予防タンパク質(PF02331)、DNA修復タンパク質rad10(PF03834)、グリコヒドロラーゼファミリー11(PF00457)およびグリコヒドロラーゼファミリー12(PF01670)からなる群から選択する。 30

【0049】

上記の増幅または検出方法の望ましい実施形態において、核酸は、少なくとも5~10個のLNAユニットのような1つまたは複数のピレン-LNAユニットを含む。望ましくは、保存領域は触媒作用、基質結合またはDNA結合に関与するタンパク質における領域をコードする。 40

【0050】

一態様において、本発明は、細胞または生物学的試料の全RNA抽出物からの直接的な真核生物ポリ(A)+RNAの逆転写のための第1鎖cDNA合成におけるオリゴ(T)オリゴヌクレオチドプライマーにおける本発明の核酸の使用を対象とする。望ましくは、プライマーの核酸はオリゴ(T)のアンカー配列の一部である。

【0051】

他の実施形態において、本発明は、原核生物、古細菌または真核生物における関連タンパク質、酵素またはプロテインキナーゼドメインの同定および/または選択のための縮重オリゴヌクレオチドプローブへの本発明の核酸の使用を対象とする。望ましくは、タンパク質、酵素およびプロテインキナーゼドメインを、レトロウイルスアスパルチルプロテアーゼ(受入れ番号PF00077)、ラットmapキナーゼerk2(受入れ番号PF00069)を含む真核生物プロテインキナーゼ、C型肝炎ウイルス非構造タンパク質E2/NS1(受入れ番号PF01560)、古細菌ATPアーゼ(受入れ番号PF01637)、ホメオボックス関連ロイシンジッパー(PF02183)、アポトーシス予防タンパク質(PF02331)、DNA修復タンパク質rad10(PF03834)、グリコヒドロラーゼファミリー11(PF00457)およびグリコヒドロラーゼファミリー12(PF01670)からなる群から選択する。

10

【0052】

一態様において、本発明は、病原体の核酸(例えば、哺乳動物からの血液または尿試料のような試料中の核酸)を検出する方法を対象とする。この方法は、本発明の核酸プローブを、試料中の少なくとも1つの核酸とのハイブリッド形成を可能にする条件下で核酸試料と接触させることを含む。プローブは望ましくは、病原体(例えば、本明細書に記載する病原体のいずれかのような細菌、ウイルスまたは酵母)の核酸と少なくとも60、70、80、90、95または100%相補性である。プローブと試料中の核酸とのハイブリッド形成が検出されることは、試料が病原体の対応する核酸を含むことを示す。いくつかの実施形態において、この方法は、特定の核酸が試料中に存在するかどうかを検討することにより、どのような病原体の株が哺乳類(例えば、ヒト)に感染したかを判断するために用いる。他の実施形態において、プローブは種々の病原体の株で異なるヌクレオチドに対応する位置に万能的塩基を有し、それによりプローブは多数の病原性株のうちのいずれかの核酸の存在を検出する。

20

【0053】

本発明の種々の態様のうちの他の実施形態において、核酸プローブまたはプライマーは、標的核酸と特異的にハイブリッド形成するが、標的核酸の配列と99、95、90、80または70%未満同じまたは相補性配列を有する細胞または生物学的試料中の他の核酸を含む非標的分子と実質的にハイブリッド形成しない。望ましくは、標準的アッセイを用いて測定した、これらの非標的分子が核酸プローブまたはプライマーとハイブリッド形成または会合する量は、標的核酸が核酸プローブまたはプライマーとハイブリッド形成または会合する量よりも2倍、望ましくは5倍、より望ましくは10倍、最も望ましくは50倍低い。他の実施形態において、標準的アッセイを用いて測定した、標的核酸が核酸プローブまたはプライマーとハイブリッド形成または会合する量は、対照核酸が核酸プローブまたはプライマーとハイブリッド形成または会合する量よりも2倍、望ましくは5倍、より望ましくは10倍、最も望ましくは50倍大きい。特定の実施形態において、核酸プローブまたはプライマーRNAは、細胞からの標的核酸または標的核酸の群と実質的に相補性である(例えば、少なくとも80、90、95、98または100%相補性)。他の実施形態において、プローブまたはプライマーは、同じ遺伝子ファミリーのRNAまたはDNA分子のような複数のRNAまたはDNA分子と相同である。他の実施形態において、プローブまたはプライマーは、多数のRNAまたはDNA分子と相同である。望ましい実施形態において、プローブまたはプライマーは、プローブまたはプライマーにおける万能的塩基の位置に対応する位置における配列が異なっているポリヌクレオチド配列を有する核酸に結合する。対照配列の例としては、ランダム配列を有する核酸、または核酸プローブまたはプライマーに対するあったとしても小さい親和性を有することが知られている核酸などがある。

30

40

【0054】

望ましくは、相補性標的分子に対する核酸の会合定数(K_a)は、2本鎖標的分子の相補鎖の会合定数より高い。いくつかの望ましい実施形態において、核酸と相補性標的分子との間の二重鎖の融解温度は、2本鎖標的分子の相補鎖の融解温度より高い。

【0055】

本発明の方法を用いて治療することができる具体例としての哺乳動物は、ヒト、サルの

50

ような霊長類、獣医学対象動物(例えば、ウシ、ヒツジ、ヤギ、スイギュウおよびウマ)およびペット(例えば、イヌおよびネコ)などである。本発明の方法を用いて1つまたは複数の遺伝子の発現を阻害できる具体例としての細胞は、無脊椎動物、植物、細菌、酵母および脊椎動物(例えば、哺乳動物またはヒト)などである。

【0056】

本発明の治療方法に関しては、哺乳動物への核酸の投与を特定の投与方式、用量または投与頻度に限定することを意図するものではなく、本発明は、疾患(例えば、本発明の核酸により阻害される標的核酸の発現に関連する疾患)を予防または治療するに十分な量をもたらす経口、腹腔内、筋肉内、静脈内、関節内、病変内、皮下または他の経路を含むすべての投与方式を意図している。1つまたは複数の核酸を哺乳動物に単回または反復投与

10

【0057】

最適用量は、個々のオリゴヌクレオチドの相対的効力に応じて変化させることができ、*in vitro*および*in vivo*動物モデルにおいて有効であると認められた EC_{50} 値に基づいて一般的に推定することができる。一般的に、用量は体重1kg当たり $0.001\mu\text{g}\sim 100\text{g}$ (例えば、 $0.001\mu\text{g}/\text{kg}\sim 1\text{g}/\text{kg}$)であり、1日、1週、1カ月または1年1回または複数回、あるいは2～20年ごとに1回投与してもよい(米国特許第6440739号)。当業者は、体液または組織中の薬物の実測残留時間および濃度に基づいて投与の反復速度を容易に推定することができる。治療成功後に、疾患状態の再発を予防するために患者は、オリゴヌクレオチドを体重1kg

20

【0058】

適切な担体は、生理塩水、緩衝生理塩水、デキストロース、水、グリセロール、エタノールおよびそれらの組合せを含むが、これらに限定されない。組成物は、投与方式に適應させることができ、例えば、丸剤、錠剤、カプセル剤、噴霧剤、散剤または液剤の形態とすることができる。いくつかの実施形態において、薬剤組成物は選択した投与経路および

30

【0059】

「アンチセンス核酸」とは、長さにかかわらず、問題のコード鎖またはmRNAと相補性である核酸を意味する。いくつかの実施形態において、アンチセンス分子は1つの核酸のみの発現を示し、他の実施形態において、アンチセンス分子は複数の核酸の発現を示す。望ましくは、アンチセンス核酸は、核酸またはコードされたタンパク質の発現または生物学的活性を少なくとも20、40、50、60、70、80、90、95または100%低下させる。アンチセンス分子は、例えば、個々の細胞または丸ごとの動物に導入することができ、例えば、血流を介して全身に導入することができる。望ましくは、アンチセンス核酸のある領域またはアンチセンス核酸の全体は、問題のコード配列、調節領域(5'または3'非翻訳領域)またはmRNAと少なくとも70、80、90、95、98または100%相補性である。望ましくは、相補性の領域は、少なくとも5、10、20、30、50、75、100、200、500、1000、2000または5000ヌクレオチドを含むか、あるいはアンチセンス核酸におけるすべてのヌクレオチドを含む。

40

【0060】

50

いくつかの実施形態において、アンチセンス分子は、長さが200、150、100、75、50または25ヌクレオチドより短い。他の実施形態において、アンチセンス分子は、長さが5000、10000、5000または2000ヌクレオチドより短い。特定の実施形態において、アンチセンス分子は、長さが少なくとも200、300、500、1000または5000ヌクレオチドである。いくつかの実施形態において、アンチセンス分子中のヌクレオチドの数は、次の範囲の1つに含まれている。すなわち、5~15ヌクレオチド、16~20ヌクレオチド、21~25ヌクレオチド、26~35ヌクレオチド、36~45ヌクレオチド、46~60ヌクレオチド、61~80ヌクレオチド、81~100ヌクレオチド、101~150ヌクレオチドまたは151~200ヌクレオチド。さらに、アンチセンス分子は、全長配列より短い配列を含んでいてよく、あるいは、全長配列を含んでいてよい。

10

【0061】

「2本鎖核酸」とは、2本鎖立体配座に存在する2つまたはそれ以上のヌクレオチドの領域を含む核酸を意味する。種々の実施形態において、2本鎖核酸は、完全にLNAユニットからなるか、あるいはLNAユニット、リボヌクレオチドおよび/またはデオキシヌクレオチドの混合物からなる。2本鎖核酸は、分子の1つの部分におけるヌクレオチドが分子の他の部分におけるヌクレオチドと塩基対を形成しているような自己相補性の領域を有する単一分子であってよい。あるいは、2本鎖核酸は、互いに相補性の領域を有する2つの異なる鎖を含んでいてよい。望ましくは、相補性の領域は少なくとも70、80、90、95、98または100%相補性である。望ましくは、2本鎖立体配座に存在する2本鎖核酸の領域は、少なくとも5、10、20、30、50、75、100、200、500、1000、2000または5000ヌクレオチドを含むか、あるいは2本鎖核酸におけるすべてのヌクレオチドを含む。望ましい2本鎖核酸分子は、問題の核酸のコード領域または調節配列(例えば、転写因子結合部位、プロモーターまたは5'もしくは3'非翻訳領域)と少なくとも70、80、90、95、98または100%同一である鎖または領域を有する。いくつかの実施形態において、2本鎖核酸は、長さが200、150、100、75、50または25ヌクレオチドより短い。他の実施形態において、2本鎖核酸は、長さが50000、10000、5000または2000ヌクレオチドより短い。特定の実施形態において、2本鎖核酸は、長さが少なくとも200、300、500、1000または5000ヌクレオチドである。いくつかの実施形態において、2本鎖核酸中のヌクレオチドの数は、次の範囲の1つに含まれている。すなわち、5~15ヌクレオチド、16~20ヌクレオチド、21~25ヌクレオチド、26~35ヌクレオチド、36~45ヌクレオチド、46~60ヌクレオチド、61~80ヌクレオチド、81~100ヌクレオチド、101~150ヌクレオチドまたは151~200ヌクレオチド。さらに、2本鎖核酸は、全長配列より短い配列を含んでいてよく、あるいは、全長配列を含んでいてよい。

20

30

【0062】

いくつかの実施形態において、2本鎖核酸は1つの核酸のみの発現を示し、他の実施形態において、2本鎖核酸分子は複数の核酸の発現を示す。望ましくは、核酸は、問題の核酸または問題の核酸によりコードされたタンパク質の発現または生物学的活性を少なくとも20、40、50、60、70、80、90、95または100%低下させる。2本鎖核酸は、例えば、個々の細胞または丸ごとの動物に導入することができ、例えば、血流を介して全身に導入することができる。

【0063】

種々の実施形態において、2本鎖核酸またはアンチセンス分子は、1つまたは複数のLNAヌクレオチド、1つまたは複数の万能的塩基、および/または、糖における2'位が、対応する2'位が水素またはヒドロキシル基を含む対応する2本鎖核酸またはアンチセンス分子と比較してin vitroまたはin vivoで2本鎖核酸またはアンチセンス分子の半減期を延長させるハロゲン(フッ素基のような)を含むか、またはアルコキシ基(メトキシ基のような)を含む1つまたは複数の修飾ヌクレオチドを含む。他の実施形態において、2本鎖核酸またはアンチセンス分子は、天然に存在するリン酸ジエステル結合以外の、隣接ヌクレオチド間の1つまたは複数の結合を含む。そのような結合の例は、ホスホロアミド、ホスホロチオエートおよびホスホロジチオエート結合などである。望ましくは、2本鎖またはアンチセンス分子を精製する。

40

50

【0064】

「精製」とは、自然に随伴する他の成分から分離することを意味する。一般的に、少なくとも50重量%で、天然の状態で結合しているタンパク質、抗体および天然に存在する有機分子を含まないとき、要素は実質的に純粋である。望ましくは、要素は少なくとも75重量%、より望ましくは少なくとも90重量%、最も望ましくは少なくとも99重量%である。実質的に純粋な要素は、化学合成、天然源からの要素の分離または天然では要素を生産しない組換え宿主細胞中の要素の生産によって得ることができる。核酸およびタンパク質は、当業者がAusubel et al.(Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Yew York, 2000)により記載されているような標準的技術を用いて精製することができる。要素は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、カラムクロマトグラフィー、光学濃度、HPLC分析またはウエスタン分析(Ausubel et al., 前出)を用いて測定したとき、出発材料より望ましくは少なくとも2、5または10倍純粋である。望ましい精製方法は、免疫沈降、イムノアフィニティークロマトグラフィーのようなカラムクロマトグラフィー、磁気ビードイムノアフィニティー精製およびプレート結合抗体を用いたパンニング(panning)などである。

【0065】

「疾患、障害または状態を治療、安定化または予防すること」とは、疾患、障害または状態の最初または後続の発生を予防または遅延させること、状態の消失とその再発との間の無疾患生存期間を延長させること、状態に伴う有害な症状を安定化または低減させること、あるいは、状態の進行を抑制または安定化させることを意味する。望ましくは、治療対象の少なくとも20、40、60、80、90または95%が、疾患のすべての証拠が消失している完全寛解を有する。他の望ましい実施形態において、状態を診断され、本発明の核酸による治療を受けた後の患者の生存期間は、(i)無処置患者の平均生存期間または(ii)他の療法による治療を受けた患者の平均生存期間より少なくとも20、40、60、80、100、200または500%長い。

【0066】

「癌を治療、安定化または予防する」とは、腫瘍の大きさの低減させること、腫瘍の大きさの増加を減速または予防すること、腫瘍の消失とその再発との間の無疾患生存期間を延長させること、腫瘍の最初または後続の発生を予防すること、あるいは腫瘍に伴う有害な症状を低減させることを意味する。望ましい一実施形態において、標準的アッセイを用いて測定したとき、治療で生き残っている癌細胞数は、最初の癌細胞数より少なくとも20、40、60、80または100%低い。望ましくは、本発明の核酸(例えば、腫瘍遺伝子のような癌に関連する核酸と実質的な相補性を有する拡散)の投与によりもたらされる癌細胞数の低下は、非癌細胞数の低下より少なくとも2、5、10、20または50倍大きい。他の望ましい実施形態において、本発明の核酸の投与後に存在する癌細胞数は、化合物の投与前または緩衝液対照の投与後に存在する癌細胞数より2、5、10、20または50倍少ない。望ましくは、本発明の方法は、標準的方法を用いて測定した腫瘍の大きさの20、40、60、80または100%の低下をもたらす。望ましくは、治療を受けた対象の少なくとも20、40、60、80、90または95%が癌のすべての証拠が消失している完全寛解を有している。望ましくは、癌は再発しないか、少なくとも5、10、15または20年後に再発する。

【0067】

上記の方法を用いて治療、安定化または予防することができる具体例としての癌は、前立腺癌、乳癌、卵巣癌、膵臓癌、胃癌、膀胱癌、唾液腺癌、胃腸癌、肺癌、結腸癌、黒色腫、脳腫瘍、白血病、リンパ腫および癌などである。良性腫瘍も本発明の方法および核酸を用いて治療または予防することができる。

【0068】

「感染」とは、病原体(例えば、細菌、酵母またはウイルス)による宿主動物の侵襲を意味する。例えば、感染は、動物の体内または体表に通常存在する病原体の過度の増殖、または動物の体内または体表に通常存在しない病原体の増殖を含む。より一般的には、感染は病原体集団の存在が宿主にとって有害である状況であると言える。したがって、過度の

量の病原体集団が動物の体内または体表に存在するとき、あるいは病原体集団の存在が動物の細胞または組織に有害であるとき、動物は感染に「罹っている」。一実施形態において、病原体の特定の属または種の数、動物に通常認められる数の少なくとも2、4、16または8倍である。

【0069】

細菌感染は、グラム陽性および/またはグラム陰性菌によることがある。望ましい実施形態において、細菌感染は以下の1つまたは複数の細菌による。すなわち、*Chlamydomonas pneumoniae*、*C.psittaci*、*C.abortus*、*Chlamydia trachomatis*、*Simkania negevensis*、*Parachlamydia acanthamoebae*、*Pseudomonas aeruginosa*、*P.alcaligenes*、*P.chlororaphis*、*P.fluorescens*、*P.luteola*、*P.mendocina*、*P.monteilii*、*P.oryzihabitans*、*P.pertocinogena*、*P.pseudalcaligenes*、*P.putida*、*P.stutzeri*、*Burkholderia cepacia*、*Aeromonas hydrophila*、*Escherichia coli*、*Citrobacter freundii*、*Salmonella typhimurium*、*S.typhi*、*S.paratyphi*、*S.enteritidis*、*Shigella dysenteriae*、*S.flexneri*、*S.sonnei*、*Enterobacter cloacae*、*E.aerogenes*、*Klebsiella pneumoniae*、*K.oxytoca*、*Serratia marcescens*、*Francisella tularensis*、*Morganella morganii*、*Proteus mirabilis*、*Proteus vulgaris*、*Providencia alcalifaciens*、*P.rettgeri*、*P.stuartii*、*Acinetobacter calcoaceticus*、*A.haemolyticus*、*Yersinia enterocolitica*、*Y.pestis*、*Y.pseudotuberculosis*、*Y.intermedia*、*Bordetella pertussis*、*B.parapertussis*、*B.bronchiseptica*、*Haemophilus influenzae*、*H.parainfluenzae*、*H.haemolyticus*、*H.parahaemolyticus*、*H.ducreyi*、*Pasteurella multocida*、*P.haemolytica*、*Branhamella catarrhalis*、*Helicobacter pylori*、*Campylobacter fetus*、*C.jejuni*、*C.coli*、*Borrelia burgdorferi*、*V.cholerae*、*V.parahaemolyticus*、*Legionella pneumophila*、*Listeria monocytogenes*、*Neisseria gonorrhea*、*N.meningitidis*、*Kingella dentrificans*、*K.kingae*、*K.oralis*、*Moraxella catarrhalis*、*M.atlantae*、*M.lacunata*、*M.nonliquefaciens*、*M.osloensis*、*M.phenylpyruvica*、*Gardnerella vaginalis*、*Bacteroides fragilis*、*Bacteroides distasonis*、*Bacteroides 3452A*相同群、*Bacteroides vulgatus*、*B.ovalus*、*B.thetaiotaomicron*、*B.uniformis*、*B.eggerthii*、*B.splanchnicus*、*Clostridium difficile*、*Mycobacterium tuberculosis*、*M.avium*、*M.intracellulare*、*M.leprae*、*C.diphtheriae*、*C.ulcerans*、*C.accolens*、*C.afermentans*、*C.amycolatum*、*C.argentorensis*、*C.auris*、*C.bovis*、*C.confusum*、*C.coyleae*、*C.durum*、*C.falsenii*、*C.glucuronolyticum*、*C.imitans*、*C.jejikeium*、*C.kutsheri*、*C.kroppenstedtii*、*C.lipophilum*、*C.macginleyi*、*C.matruchoti*、*C.mucifaciens*、*C.pilosum*、*C.propinquum*、*C.renale*、*C.riegelii*、*C.sanguinis*、*C.singulare*、*C.striatum*、*C.sundsvallense*、*C.thomssenii*、*C.urealyticum*、*C.xerosis*、*Streptococcus pneumoniae*、*S.agalactiae*、*S.pyogenes*、*Enterococcus avium*、*E.casseliflavus*、*E.cecorum*、*E.dispar*、*E.durans*、*E.faecalis*、*E.faecium*、*E.flavescens*、*E.gallinarum*、*E.hirae*、*E.malodoratus*、*E.mundtii*、*E.pseudoavium*、*E.raffinosis*、*E.solitarius*、*Staphylococcus aureus*、*S.epidermidis*、*S.saprophyticus*、*S.intermedius*、*S.hyicus*、*S.haemolyticus*、*S.hominis*および/または*S.saccharolyticus*。望ましくは、核酸を、病原性細菌の増殖を予防、安定化または阻害あるいは病原性細菌を殺滅するに十分な量で投与する。

【0070】

種々の実施形態において、本発明の方法に関連するウイルス感染は、以下のウイルスの1つまたは複数による感染である。すなわち、西ナイルウイルス(例えば、Samuel、「Host genetic variability and West Nile virus susceptibility」、Proc.Natl.Acad.Sci.US A、2002年8月21日、Beasley、Virology 296:17~23頁、2002)、肝炎ウイルス、ピコナウイルス、ポリオ、HIV、コクサッキーウイルス、単純疱疹、セントルイス脳炎、エプスタイン-バー、ミクソウイルス、JC、コクサッキーウイルスB、トガウイルス、はしか、パラミクソウイルス、エコウイルス、ブニヤウイルス、サイトメガロウイルス、水痘-帯状疱疹、流行性耳下炎、ウマ脳脊髄炎、リンパ性脈絡膜炎、狂犬病、シミアンウイルス40、ヒトポリオーマウイルス、乳頭腫ウイルス、霊長類アデノウイルスおよび/またはBK。

【0071】

10

20

30

40

50

「治療を必要とする哺乳動物」とは、本発明の核酸の投与により疾患、障害または状態を治療、安定化または予防する哺乳動物を意味する。

【0072】

「突然変異」とは、挿入、欠失、フレームシフト突然変異、サイレント突然変異、ナンセンス突然変異またはミスセンス突然変異のような天然に存在する、または参照核酸配列における変異を意味する。望ましくは、核酸配列によりコードされるアミノ酸は、天然に存在する配列からの少なくとも1つのアミノ酸の変異を有する。

【0073】

本発明の他の態様については以下に論述する。

【発明を実施するための最良の形態】

10

【0074】

本発明は、新規の置換を含む新規の修飾核酸組成物およびそれらの合成に関する。これらの核酸組成物は、万能的塩基として有用であり、PCR用プライマー、未知の核酸の配列決定用、野生型遺伝子を含む塩基変異体の群ならびに突然変異等の検出用の配列決定プライマーのような広範囲の適用分野を有する。

【0075】

上述のように、望ましい修飾塩基は、1つまたは複数の炭素脂環式または炭素環式アリールユニット、すなわち、環メンバーとして炭素原子のみを含む非芳香族または芳香族環式ユニットを含む。炭素環式アリール基を含む塩基基が一般的に望ましく、特に複数の結合した芳香族基、特に縮合環を含む基が望ましい。すなわち、場合によって置換されているナフチル、場合によって置換されているアントラセニル、場合によって置換されているフェナントレニル、場合によって置換されているピレニル、場合によって置換されているクリセニル、場合によって置換されているベンズアントラセニル、場合によって置換されているジベンズアントラセニル、場合によって置換されているベンゾピレニルのような場合によって置換されている多核芳香族基が特に望ましく、置換または非置換ピレニルが特に望ましい。

20

【0076】

いかなる理論によっても拘束されることなく、そのような炭素脂環式および/または炭素環式アリール塩基基は、オリゴヌクレオチドの隣接塩基との疎水性相互作用を増大させると考えられている。それらの相互作用は、ハイブリッド形成したオリゴ対の安定性を増大することができ、ハイブリッド形成対の別個の塩基間の相互作用の必要がない。

30

【0077】

再び理論により拘束されることなく、さらにそのような疎水性相互作用は隣接塩基のプレート様スタッキング、すなわちインターカレーションにより特に有利となり得ると考えられている。塩基が、芳香族基、特に多縮合環を有する炭素環式アリール基が示すような比較的平面状に広がった構造を有する部分を含む場合に、そのような相互作用は促進される。これは、ナフチル塩基基を含むLNAユニットを有する同等なオリゴと比べて、ピレニル塩基を含むLNAユニットを有するオリゴが示す T_m が高いことから証明されている。

【0078】

1つまたは複数の複素脂環式または複素芳香族基を含む修飾(天然にない)核酸塩基またはヌクレオシド塩基もLNAユニット用に適しており、特に、1つまたは複数のN、OまたはSを環メンバーとして、特に少なくとも1つの硫黄原子および5~約8個の環メンバーを含むそのような非芳香族および芳香族基が適している。また、少なくとも1つの環が1、2または3個のN、OまたはSを環メンバーとして含む複素脂環式または複素芳香族基である、2つまたはそれ以上の縮合環を含む塩基基も望ましい。

40

【0079】

望ましい修飾核酸塩基またはヌクレオシド塩基は、フラノシル環の1'位、特に2',4'結合フラノシル環の1'位、特に2'-O,4'-C-メチレン- β -D-リボフラノシル環の1'位に共有結合している。

【0080】

50

一般的に、炭素脂環式、複素脂環式、炭素環式アリールおよび/または複素芳香族であってよい2、3、4、5、6、7または8縮合環、より望ましくは、炭素脂環式、複素脂環式、炭素環式アリールおよび/または複素芳香族であってよく、望ましくは縮合環がそれぞれ芳香族、特に炭素環式アリールである3~6縮合環を含む核酸塩基またはヌクレオシド塩基が望ましい。

【0081】

いくつかの実施形態において、LNAユニットは4~6個の環メンバーを有する炭素または複素脂環式環を有し、1つまたは複数の脂環式環員が別の環状結合を形成している。望ましくは、少なくとも1つの脂環式環または環状結合は、少なくとも1つのN、O、SまたはSe環原子のような少なくとも1つのヘテロ原子環員を含む。

10

【0082】

いくつかの実施形態において、その環状結合は、2つの隣接する脂環式環員を有する。いくつかの実施形態において、その環状結合は、隣接しない2つの脂環式環員を有する。具体例としての環状結合は、C-1',C-2'、C-2',C-3'、C-2',C-4'およびC-2',C-5'結合を含む。いくつかの実施形態において、環状結合は、脂環式環員に加えて、合計3~6個の原子(例えば、3または4個の原子)を有する。いくつかの実施形態において、脂環式基は、1つの環状結合または2つの環状結合を含む。いくつかの実施形態において、核酸は、オキサゾールまたはイミダゾール以外の修飾核酸塩基またはヌクレオシド塩基を有するLNAユニットを有する。

【0083】

より望ましくない、したがって、本発明の特定の実施形態から除外するものは、特にLNA基とともに用いる場合、2',4'結合を有する場合によって置換されているオキサゾール塩基ならびに場合によって置換されているイミダゾールおよび場合によって置換されているイソオキサゾール基である。

20

【0084】

本発明によるLNAユニットにおける使用に適した他の塩基基は、場合によって置換されているピリジルオキサゾール、場合によって置換されているピレニルメチルグリセロール、場合によって置換されているピロール、場合によって置換されているジアゾールおよび場合によって置換されているトリアゾールなどである。

【0085】

上述のように、本発明の一般的に望ましい修飾核酸塩基またはヌクレオシド塩基は、すべてのLNAユニットまたはLNAおよびDNAまたはRNAの混合物を含むオリゴヌクレオチドに組込まれているとき、相補性オリゴヌクレオチドとハイブリッド形成した場合、相補性オリゴヌクレオチドに存在する核酸塩基またはヌクレオシド塩基(天然)にかかわりなく、実質的に一定のT_mを示す。

30

【0086】

特に、本発明の一般的に望ましい修飾核酸塩基またはヌクレオシド塩基は、9量体オリゴヌクレオチドに組込まれているとき(他の8つの残基またはユニットが天然塩基を含む天然DNAもしくはRNAユニットである)、LNAユニットに相当するユニット以外は同一であり、それぞれが天然塩基ウラシル、シトシン、チミン、アデニンまたはグアニンの1つを有する4つの相補性オリゴヌクレオチド変異体とのハイブリッド形成により、約15、12、10、9、8、7、6、5、4、3または2°C未満のT_m差を示す。そのようなT_m差を得るために、ハイブリッド形成を10mMリン酸ナトリウム、100mM塩化ナトリウム、0.1mM EDTA、pH7.0のハイブリッド形成緩衝液中で行う(以下の段階a)からd)の規定されたプロトコルを参照)。

40

【0087】

本明細書に記載するように、規定された量のT_m差(例えば、約15、12、10、8、6、5、4、3、2°C以下)を有する核酸化合物は、この核酸化合物が、以下に規定されているように、4つの相補性変異体に関して規定されている9量体オリゴヌクレオチドに組込まれているとき、規定されているT_m差を示すことを意味する。

【0088】

50

別に示さない限り、本明細書に記載するように、特定の修飾塩基によりもたらされるT_m値は、以下のプロトコール(段階a)からd))により計算する。

a)問題の修飾塩基を次のオリゴヌクレオチドに組み込み[5'-d(GTGAMATGC)(Mは修飾塩基)]

b)修飾塩基を組み込んだ 1.5×10^{-6} Mのオリゴヌクレオチドを配列3'-d(CACTYTACG)[YはそれぞれA、C、G、Tである]を有する4種の 1.5×10^{-6} Mのオリゴヌクレオチドと10mMリン酸ナトリウム、100mM塩化ナトリウム、0.1mM EDTA、pH7.0の緩衝液中で混合し、

c)オリゴヌクレオチドをハイブリッド形成させ、

d)ハイブリッド形成したヌクレオチドを加熱し、260nmの波長で記録した融解曲線の一次導関数の最大値が得られる温度を観察して、4種のハイブリッド形成したヌクレオチドそれぞれのT_mを検出する。

10

【0089】

別に示さない限り、本明細書に記載するように、個々の修飾塩基のT_m差は、上記の段階a)からd)で測定した最高T_m値を上記の段階a)からd)で測定した最低T_m値から引くことによって求める。

【0090】

一態様において、本発明は、少なくとも10ヌクレオシドを含み、そのうちの少なくとも2つがA、T、CおよびGからなる群から選択され、少なくとも1つのヌクレオシドが万能的ヌクレオシドであるオリゴヌクレオチドを提供する。1つまたは複数の万能的ヌクレオシドのオリゴマーへの組み込みにより、未知の塩基への結合が可能となり、オリゴヌクレオチドが不明瞭または未知の核酸配列と調和することが可能となる。1つの望ましい態様において、すべての一般的なDNAヌクレオシド、すなわち、デオキシアデノシン(A)、チミジン(T)、デオキシシチジン(C)およびデオキシグアノシン(G)を少なくとも1つの万能的(修飾塩基)ヌクレオシドと結合させて、約5~100ヌクレオシドを有するオリゴヌクレオチドを合成する。

20

【0091】

本発明の他の態様において、すべてのRNAヌクレオシドまたは2'-O-メチル、2'-フルオロ、2'-アシルおよび2'-O-メトキシエトシキ誘導体のような、その一般的に用いられている誘導体を少なくとも1つの万能的(修飾塩基)ヌクレオシドと結合させて、約5~100ヌクレオシドを有するオリゴヌクレオチドを合成する。

30

【0092】

修飾核酸化合物は、種々の核酸ユニット、例えば、ヌクレオシドおよび/またはヌクレオチドユニットを含んでいてよい。上述のように、LNA核酸ユニットは、4~6個の環メンバーを有する炭素または複素脂環式環、例えば、フラノース環、またはシクロペンチル、シクロヘプチル、テトラヒドロピラニル、オキセパニル、テトラヒドロチオフエニル、ピロリジニル、チアニル、チエパニル、ピペリジニル等の他の脂環式環構造を有する。

【0093】

本発明の態様において、炭素または複素脂環式基の少なくとも1つの環原子を利用してさらなる環状結合を形成させ、それにより多環基を提供する。環状結合は、炭素または複素脂環基の1つまたは複数、一般的に2つの原子を含んでいてよい。環状結合はまた、炭素または複素脂環基の置換基であるが、環メンバーでない1つまたは複数の原子を含んでいてよい。

40

【0094】

別に示さない限り、本明細書に記載する脂環式基は、すべての炭素環メンバーを有する基ならびに1つまたは複数のヘテロ原子(例えば、N、O、SまたはSe)環メンバーを有する基を含む。「炭素または複素脂環式基」としての基の開示は、脂環式基はすべての炭素環メンバー(すなわち炭素脂環式)を含むか、あるいは1つまたは複数のヘテロ原子環員(すなわち複素脂環式)含んでいてよいことをさらに示している。脂環式基は、芳香族でなく、一般的に環内が完全に飽和されていると理解されている。

【0095】

50

望ましくは、脂環式環は複素脂環式である。すなわち、脂環式基が1つまたは複数のヘテロ原子環員、一般的にN、O、SまたはSeのような1つまたは複数のヘテロ原子環員を有し、酸素がしばしば望ましい。

【0096】

脂環式基の1つまたは複数の環状連結部は、完全に炭素原子から構成されていてよく、あるいは一般的により望ましくは、N、O、SまたはSeのような1つまたは複数のヘテロ原子、少なくともいくつかの実施形態では望ましくは酸素を含む。環状結合は、単一環状結合中に一般的に1つまたは2つまたは3つのヘテロ原子、より一般的には1つまたは2つのヘテロ原子を含む。

【0097】

本発明の核酸化合物の1つまたは複数の環状結合は、多数の別個の立体配置および/または立体配置を有することができる。例えば、本発明の核酸化合物の環状結合は、少なくとも1つの脂環式環原子を含む。環状結合が単一脂環式環原子に二置換されてよく、あるいは2つの隣接または非隣接脂環式環原子が環状結合に含まれていてよい。さらに、環状結合が単一脂環式環原子と、置換基であるが、脂環式基の環メンバーではない別の原子を含んでいてよい。

10

【0098】

例えば、上述のように、脂環式基がフラノシル型環である場合、望ましい環状結合はC-1', C-2', C-2', C-3', C-2', C-4'およびC-2', C-5'結合を含む。

【0099】

環状結合は、一般的に1つまたは複数の脂環式環原子に加えて、脂環式環員に加えて2〜6個の原子、より一般的に脂環式環員に加えて3〜4個の原子を含む。

20

【0100】

環状結合に組み込まれている脂環式基原子は一般的に炭素であるが、脂環式基の窒素のようなヘテロ原子も環状結合に組み込まれていてよい。

【0101】

本明細書における核酸ユニットまたは残基またはLNA残基または同様な用語の言及は、個々のLNA、ヌクレオシドおよびヌクレオチドユニットを含み、オリゴヌクレオチド内のLNA、ヌクレオシドユニットおよびヌクレオチドユニットを含むことが理解される。

【0102】

本明細書で用いているように、「万能的塩基」または「修飾塩基」または他の同様な用語は、一般的に、天然塩基(アデニン、グアニン、シトシン、ウラシルおよび/またはチミン)と望ましくは区別なく対合することができる核酸塩基またはヌクレオシド塩基のような組成物(例えば、非天然組成物)を指す。望ましくは、修飾塩基は、15、12、10、8、6、5、4、3、2°C以下あるいは上で開示したようなT_m差をもたらす。

30

【0103】

本発明のオリゴヌクレオチドに用いる特に望ましい修飾核酸としては、国際公開第99/14226号に開示されているlocked核酸(2'-4'または2'-3'糖結合を有する二環式および三環式DNAまたはRNAを含む)、2'-デオキシ-2'-フルオロリボヌクレオチド、2'-0-メチルリボヌクレオチド、2'-0-メトキシエチルリボヌクレオチド、ペプチド核酸、5-プロピニルピリミジンリボヌクレオチド、7-デアザプリンリボヌクレオチド、2,6-ジアミノプリンリボヌクレオチドおよび2-チオピリミジンリボヌクレオチドなどがある。

40

【0104】

「LNAユニット」とは、個々のLNAモノマー(例えば、LNAヌクレオシドまたはLNAヌクレオチド)または少なくとも1つのLNAモノマーを含むオリゴマー(例えば、オリゴヌクレオチドまたは核酸)を意味する。国際公開第99/14226号に開示されているLNAユニットは、本発明のオリゴヌクレオチドに組み込むための一般的に特に望ましい修飾核酸である。さらに、核酸は、当技術分野で知られているいずれかのタイプの修飾により3'および/または5'末端において修飾することができる。例えば、いずれかまたは両末端を、基質表面等への結合を促進するために、保護基でキャッピングし、柔軟な連結基に結合し、反応性基に結合

50

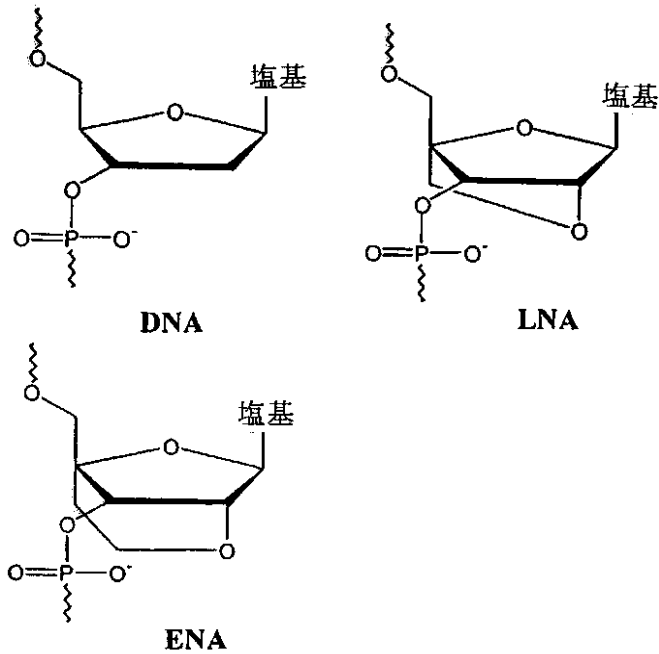
することができる。望ましいLNAユニットはまた国際公開第0056746号、国際公開第0056748号および国際公開第0066604号に開示されている。

【0105】

国際公開第99/14226号に開示されているように、LNAは、例外的に高い耐熱性を有するDNAまたはRNA二重鎖を形成する新規のクラスのDNA類似体である。LNAは、以下に示すような二環式化合物を含む。ENAは、2'0,4'C-エチレン架橋核酸を指す。

【0106】

【化1】



10

20

【0107】

Lockedヌクレオシド類似体、LNAユニット、LNA残基、LNAモノマーまたは同様の用語の本明細書における言及は、国際公開第99/14226号、国際公開第00/56746号、国際公開第00/56748号および国際公開第00/66604号に開示されているような化合物を含む。

30

【0108】

望ましいLNAユニットは、DNAおよびRNAの特性を共有することができる。それらは、水溶性で、アガロースゲル電気泳動に分離することができ、エタノール沈殿性等である。

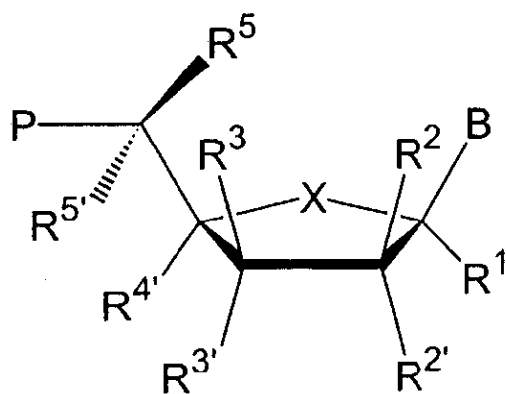
【0109】

望ましいLNAユニットは、国際特許出願99/14226号、国際公開第00/56746号、国際公開第00/56748号および国際公開第00/66604号に記載されているような2'-4'環状結合を有するヌクレオシドユニットを含む。望ましいLNAユニット構造は、以下の式IaおよびIbに例示する。式Iaではフラノースの立体配置はD-βを示し、式Ibではその立体配置はL-αを示す。2つ、例えばD-βとL-αとの混合物からなる立体配置も含まれる。

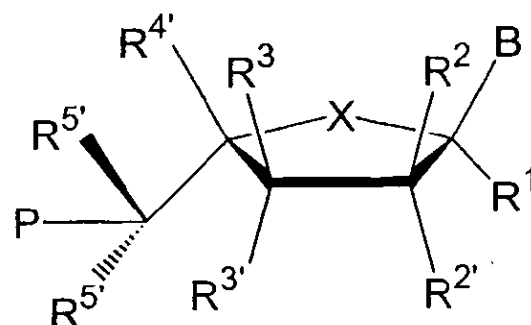
【0110】

40

【化 2】



Ia



Ib

10

【0111】

IaおよびIbにおいて、Xは酸素、硫黄および炭素であり、Bは万能的または修飾塩基(特に天然に存在しない核酸塩基またはヌクレオシド)、例えば、すべてが場合によって置換されている、ピレンおよびピリジロキサゾール誘導体、ピレニル、5-ニトロインドール、ヒポキサンチン、ピロール、ピレニルメチルグリセロール部分である。他の望ましい万能的塩基は、すべてが場合によって置換されていてよいピロール、ジアゾールまたはトリアゾールならびに他の基、例えば、修飾アデニン、シトシン、5-メチルシトシン、イソシトシン、プソイドイソシトシン、グアニン、チミン、ウラシル、5-プロモウラシル、5-プロピニルウラシル、5-プロピニ-6-フルオロウラシル、5-メチルチアゾルウラシル、6-アミノプリン、2-アミノプリン、イノシン、ジアミノプリン、7-プロピン-7-デアザアデニン、7-プロピン-7-デアザグアニンなどである。R¹、R²またはR^{2'}、R³またはR^{3'}、R⁵およびR^{5'}は水素、メチル、エチル、プロピル、プロピニル、アミノアルキル、メトキシ、プロポキシ、メトキシ-エトキシ、フルオロまたはクロロである。Pは後続するモノマーへのヌクレオシド間結合のラジカル位置または5'末端基を表し、R³またはR^{3'}は先行するモノマーへのヌクレオシド間結合または3'末端基である。ヌクレオシド間結合は、リン酸、ホスホロチオ酸、ホスホロジチオ酸、ホスホルアミダート、ホスホロセレン酸、ホスホロジセレン酸、アルキルホスホトリエステルまたはメチル亜リン酸であってよい。ヌクレオチド間結合も、非亜リン酸リンカー、ヒドロキシルアミン誘導体(例えば、-CH²-NCH³-O-CH²-)、ヒドラジン誘導体、例えば、-CH₂-NCH₃-NCH₃-CH₂-、アミド誘導体、例えば、-CH₂-CO-NH-CH₂-、CH₂-NH-CO-CH₂-を含んでいてよい。式IaにおいてR^{4'}およびR^{2'}は共に-CH₂-O-、-CH₂-S-、-CH₂-NH-、-CH₂-NMe-、-CH₂-CH₂-O-、-CH₂-CH₂-S-、-CH₂-CH₂-NH-または-CH₂-CH₂-NMe-を表し、酸素、硫黄または窒素がそれぞれ2'位に結合している。式IbにおいてR^{4'}およびR²は共に-CH₂-O-、-CH₂-S-、-CH₂-NH-、-CH₂-NMe-、-CH₂-CH₂-O-、-CH₂-CH₂-S-、-CH₂-CH₂-NH-または-CH₂-CH₂-NMe-を表し、酸素、硫黄または窒素がそれぞれ2位に結合している(R²立体配置)。具体例としての5'および/または3'末端基は、-H、-OH、-SH、ハロ(例えば、クロロ、フルオロ、ヨードまたはブromo)、場合によって置換されているアリール(例えば、フェニルまたはベンジル)、アルキル(例えば、メチルまたはエチル)、アルコキシ(例えば、メトキシ)、アシル(例えば、アセチルまたはベンゾイル)、アロイル、アラールキル、ヒドロキシ、ヒドロキシアルキル、アルコキシ、アリーロキシ、アラールコキシ、ニトロ、シアノ、カルボキシ、アルコキシカルボニル、アリーロキシカルボニル、アラールコキシカルボニル、アシルアミノ、アロイルアミン、アルキルスルホニル、アリールスルホニル、ヘテロアリールスルホニル、アルキルスルフィニル、アリールスルフィニル、ヘテロアリールスルフィニル、アルキルチオ、アリーロチオ、ヘテロアリーロチオ、アラールキルチオ、ヘテロアラールキルチオ、アミジノ、アミノ、カルバモイル、スルファモイル、アルケン、アルキン、保護基(例えば、シリル、4,4'-ジメトキシトリチル、モノメ

20

30

40

50

トキシトリチルまたはトリチル(トリフェニルメチル))、リンカー(例えば、アミン、エチレングリコール、アントラキノンのようなキノン)、検出可能な標識(例えば、放射標識または蛍光標識)およびビオチンなどである。

【0112】

最も望ましいLNAユニット構造は、Xは酸素であり(式Ia、Ib)、Bはピレンのような万能的塩基であり、 R^1 、 R^2 または $R^{2'}$ 、 R^3 または $R^{3'}$ 、 R^5 および $R^{5'}$ は水素であり、Pはリン酸、ホスホロチオ酸、ホスホロジチオ酸、ホスホルアミダートおよびメチル垂リン酸であり、 R^3 または $R^{3'}$ は先行するモノマーへのヌクレオシド間結合または3'末端基である。式Iaにおいて $R^{4'}$ および $R^{2'}$ は共に $-\text{CH}_2-\text{O}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{S}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{NH}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{NMe}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-$ または $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NMe}-$ を表し、酸素、硫黄または窒素がそれぞれ2'位に結合しており、式Ibにおいて $R^{4'}$ および $R^{2'}$ は共に $-\text{CH}_2-\text{O}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{S}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{NH}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{NMe}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-$ または $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NMe}-$ を表し、酸素、硫黄または窒素がそれぞれ R^2 立体配置における2位に結合している。

10

【0113】

天然塩基を含むLNAユニットをDNA、RNAまたは純粋なLNAオリゴヌクレオチドに導入することにより、同時にワトソンクリック塩基対合則に従いながら、相補性DNAまたはRNAを含む二重鎖の耐熱性を極めて高くすることができる。一般的に、ヘテロ二重鎖の耐熱性は、二重鎖におけるLNAユニット当たり3~8℃高い。LNAを含むオリゴヌクレオチドはポリメラーゼ(例えば、Taqポリメラーゼ)の基質となるように設計することができ、LNAプライマーに基づくPCRは、通常のDNAプライマー(すなわち、対立遺伝子特異的PCR)と比較して鋳型DNAにおける単一塩基突然変異に対する識別能が大きい。さらに、同様なDNAオリゴマーと比較して高い T_m を有する非常に短いLNAオリゴマー(例えば、8量体)は、単一塩基突然変異に対する優れた識別能を有する高度に特異的な捕捉プローブ(すなわちSNP検出)として用いることができる。

20

【0114】

本明細書で用いているように、「 T_m 」という用語は「融解温度」に関して用いる。融解温度は、2本鎖核酸分子の集団の50%が1本鎖に解離する温度である。核酸の T_m を計算する式は当技術分野でよく知られている。ハイブリッド核酸の T_m は、1M塩中のハイブリッドアッセイから採用され、PCRのための T_m を計算するために一般的に用いられている式である $T_m = [(A+T \text{ の数}) \times 2^\circ\text{C} + (G+C \text{ の数}) \times 4^\circ\text{C}]$ 、[C.R.Newton et al., PCR, 2nd ED., Springer-Verlag(New York:1997)、p.24]を用いてしばしば推定する。この式は、20ヌクレオチドよりも長い分子については不正確であることがわかった。 T_m の計算に構造ならびに配列特性を考慮に入れた他のより洗練された計算が当技術分野に存在する。 T_m の計算値は、単に推定である。最適温度は一般的に経験的に決定する。本明細書では T_m は、例えば、以下の実施例18に記載したように、ハイブリッド形成したヌクレオチドを加熱し、260nmの波長で記録された融解曲線の一次導関数の最大値が得られる温度を観測することにより決定する。

30

【0115】

本明細書で用いているように「相同」という用語は、相補性の程度を指す。部分的相同または完全な相同(すなわち、同一)が存在し得る。完全に相補性配列が標的核酸とハイブリッド形成することを少なくとも部分的に阻害する部分的に相補性配列は、機能的用語を用いて「実質的に相同」に当てはまる。

40

【0116】

cDNAまたはゲノムクローンのような2本鎖核酸配列に関して用いるとき、本明細書で用いる場合の「実質的に相同」という用語は、厳密度の低い条件下、例えば、0.8M生理塩水/0.08Mクエン酸ナトリウム(SSC)緩衝液中20%ホルムアミドを含むハイブリット形成緩衝液を用いて温度37℃で2本鎖核酸配列の1本の鎖とハイブリッド形成することができ、37℃のそのSSC緩衝液で1回洗浄しても結合を維持するプローブを指す。

【0117】

1本鎖核酸配列に関して用いるとき、本明細書で用いる場合の「実質的に相同」という用語は、厳密度の低い条件下、例えば、0.8M生理塩水/0.08Mクエン酸ナトリウム(SSC)緩

50

衝液中20%ホルムアミドを含むハイブリット形成緩衝液を用いて温度37℃で1本鎖核酸鋳型配列とハイブリッド形成することができ(すなわち、その相補体である)、37℃のそのSSC緩衝液で1回洗浄しても結合を維持するプローブに当てはまる。

【0118】

LNAを含むオリゴヌクレオチドは、標準ホスホルアミダイト化学により容易に合成される。ホスホルアミダイト合成法の柔軟性は、すべての種類の標準リンカー、蛍光団およびリポーター基を有するLNAオリゴマーの容易な生産をさらに促進する。

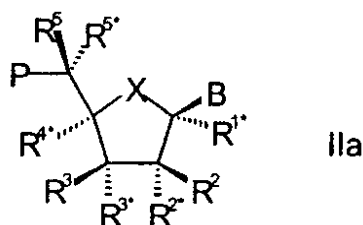
【0119】

本発明のオリゴヌクレオチドに組込むための特に望ましいLNAユニットとしては、次の式IIaのLNAユニットなどがある。

10

【0120】

【化3】



【0121】

20

【式中、Xは酸素、硫黄、窒素、置換窒素、炭素および置換炭素、望ましくは酸素であり、Bは上述のような修飾塩基、例えば、場合によって置換されているピレンまたは場合によって置換されているピレニルメチルグリセロールのような場合によって置換されている炭素環式アリール、あるいは場合によって置換されているピリジルオキサゾールのような場合によって置換されている複素環式または場合によって置換されている複素芳香族である。他の望ましい万能的塩基としては、すべてが場合によって置換されていてよい、ピロール、ジアゾールまたはトリアゾールであり、 R^{1*} 、 R^2 、 R^3 、 R^5 および R^{5*} は水素であり、Pは後続するモノマーへのヌクレオシド間結合のラジカル位置または5'末端基を表し、 R^{3*} は先行するモノマーへのヌクレオシド間結合または3'末端基であり、 R^{2*} および R^{4*} は共に、酸素が2'位に結合している $-O-CH_2-$ もしくは $-O-CH_2-CH_2-$ 、またはnが2、3もしくは4、望ましくは2である $-(CH_2)_n-$ の結合、または $-S-CH_2-$ もしくは $=NH-CH_2-$ の結合を表す。

30

【0122】

R^{2*} および R^{4*} が酸素を含む式IIaのユニットは、本明細書では時として「オキシ-LNA」と称し、 R^{2*} および R^{4*} が硫黄を含む式IIaのユニットは、本明細書では時として「チオ-LNA」と称し、 R^{2*} および R^{4*} が窒素を含む式IIaのユニットは、本明細書では時として「アミノ-LNA」と称する。多くの適用例において、オキシ-LNAが本発明の望ましい修飾核酸ユニットである。

【0123】

本明細書で用いているように、式IIaに関するものを含めて、「核酸塩基」または「塩基ユニット」という用語は、天然に存在する核酸塩基であるアデニン(A)、グアニン(G)、シトシン(C)、チミン(T)およびウラシル(U)、ならびにキサンチン、ジアミノプリン、8-オキソ- N^6 -メチルアデニン、7-デアザキサンチン、7-デアザグアニン、 N^4 , N^4 -エタノシトシン、 N^6 , N^6 -エタノ-2,6-ジアミノプリン、5-メチルシトシン、5- (C^3-C^6) -アルキルシトシン、5-フルオロウラシル、5-プロモウラシル、プソイドイソシトシン、2-ヒドロキシ-5-メチル-4-トリアゾルピリジン、イソシトシン、イソグアニン、イノシンのような天然に存在しない核酸塩基、およびBenner et al., 米国特許第5432272号およびSusan M.Freier and Karl-Heinz Altmann, Nucleic Acids Research, 1997, 第25巻, 4429~4443頁に記載されている「天然に存在しない」核酸塩基を対象として含む。したがって、「核酸塩基」という用語は、既知のプリンおよびピリジン複素環だけでなく、その複素環式類似体および互変異性体も含む。さらなる天然に存在または存在しない核酸塩基は、米国特許第

40

50

3687808号(Merigan et al.), Antisense Research and Application, Ed.S.T.Crooke and B.Lebbleu, CRC Press, 1993におけるSanghviによる第15章、Englisch et al., Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613~722頁(特に622および623頁、およびそれぞれ参照により全部が本明細書に組込まれている、Concise Encyclopedia of Polymer Science and Engineering, J.I.Kroschwitz Ed., John Wiley & Sons, 1990, 858~859頁、Cook, Anti-Cancer Drug Design, 1991, 6, 585~607頁を参照)に開示されているものを含む。「核酸塩基」または「塩基ユニット」という用語は、最も古典的な意味ではヌクレオシド塩基はでないが、ヌクレオシド塩基としての機能を果たす特定の「万能的塩基」を含む、核酸塩基と同様な機能を果たすことができる複素環式化合物のような化合物を対象として含めることをさらに意図したものである。特に万能的塩基として挙げるものは、3-ニトロピロール、場合によって置換されているインドール(例えば、5-ニトロインドール)および場合によって置換されているヒポキサンチンなどである。他の望ましい化合物としては、ピレンおよびピリジルオキサゾール誘導体、ピレニル、ピレニルメチルグリセロール誘導体などがある。他の望ましい万能的塩基としては、当技術分野で知られている万能的塩基を含む、ピロール、ジアゾールまたはトリアゾール誘導体などがある。

10

【0124】

上記のように、LNAユニットの種々の基は、場合によって置換されていてよい。核酸塩基またはヌクレオシド塩基等の「置換されている」基は、1つまたは複数の利用可能な位置、一般的に1~3または4つの位置において水素以外の本明細書に開示したような1つまたは複数の基により置換されていてよい。「置換されている」基に存在していてよい適切な基としては、フルオロ、クロロ、ブロモ、ヨード等のハロゲン、シアノ、ヒドロキシル、ニトロ、アジド、アシル等の C_{1-6} アルカノイル基のようなアルカノイル、カルボキサミド、1~12個の炭素原子または1、2、3、4、5または6個の炭素原子を有する基を含むアルキル基、1つまたは複数の不飽和結合ならびに2~約12個の炭素原子または2、3、4、5もしくは6個の炭素原子を有する基を含むアルケニルおよびアルキニル基、1つまたは複数の酸素結合ならびに1~約12個の炭素原子または1、2、3、4、5もしくは6個の炭素原子を有するものを含むアルコキシ基、フェノキシのようなアリールオキシ、1つまたは複数のチオエーテル結合ならびに1~約12個の炭素原子または1、2、3、4、5もしくは6個の炭素原子を有する部分を含むアルキルチオ基、1つまたは複数のスルフィニル結合ならびに1~約12個の炭素原子または1、2、3、4、5もしくは6個の炭素原子を有する部分を含むアルキルスルフィニル基、1つまたは複数のスルホニル結合ならびに1~約12個の炭素原子または1、2、3、4、5もしくは6個の炭素原子を有する部分を含むアルキルスルホニル基、1つまたは複数のN原子ならびに1~約12個の炭素原子または1、2、3、4、5もしくは6個の炭素原子を有する基のようなアミノアルキル基、6個またはそれ以上の炭素を有する炭素環式アリール、1~3個の独立または縮合環および6~約18個の炭素環原子を有し、ベンジルが望ましい基であるアラルキル、1~3個の独立または縮合環および6~約18個の炭素環原子を有し、0-ベンジルが望ましい基であるアラルコキシ、あるいは、環当たり3~約8個のメンバーならびに1個またはそれ以上のN、0またはS原子を含む1~3個の独立または縮合環を有する複素芳香族または複素脂環式基、例えば、クマリニル、キノリニル、ピリジル、ピラジニル、ピリミジル、フリル、ピロリル、チエニル、チアゾリル、オキサゾリル、イミダゾリル、インドリル、ベンゾフラニル、ベンゾチアゾリル、テトラヒドロフラニル、テトラヒドロピラニル、ピペリジニル、モルホリノおよびピロジニルなどがある。

20

30

40

【0125】

本発明のキメラオリゴヌクレオチドは、望ましくは非修飾核酸と修飾(天然にない)核酸との混合物を含む。以下の議論では、「オリゴヌクレオチド」という用語は、「万能的(修飾)塩基を含むオリゴヌクレオチド」を同義で指すものとする。この用語の使用は、この方法における可能な立体配置の列挙の繰り返しを回避するための便宜上のものにすぎず、下記の実施形態のそれぞれをブローブ/標的立体配置(例えば、標識ブローブおよび捕捉標的DNA、逆の場合も同様)と組み合わせて用いることを意図するものである。

【0126】

50

「LNA-万能的塩基複合体」は、共有結合した万能的塩基を含むLNAユニットを指す(例えば、式1aまたは1bの化合物)。万能的塩基の例は、本明細書に記載されている。

【0127】

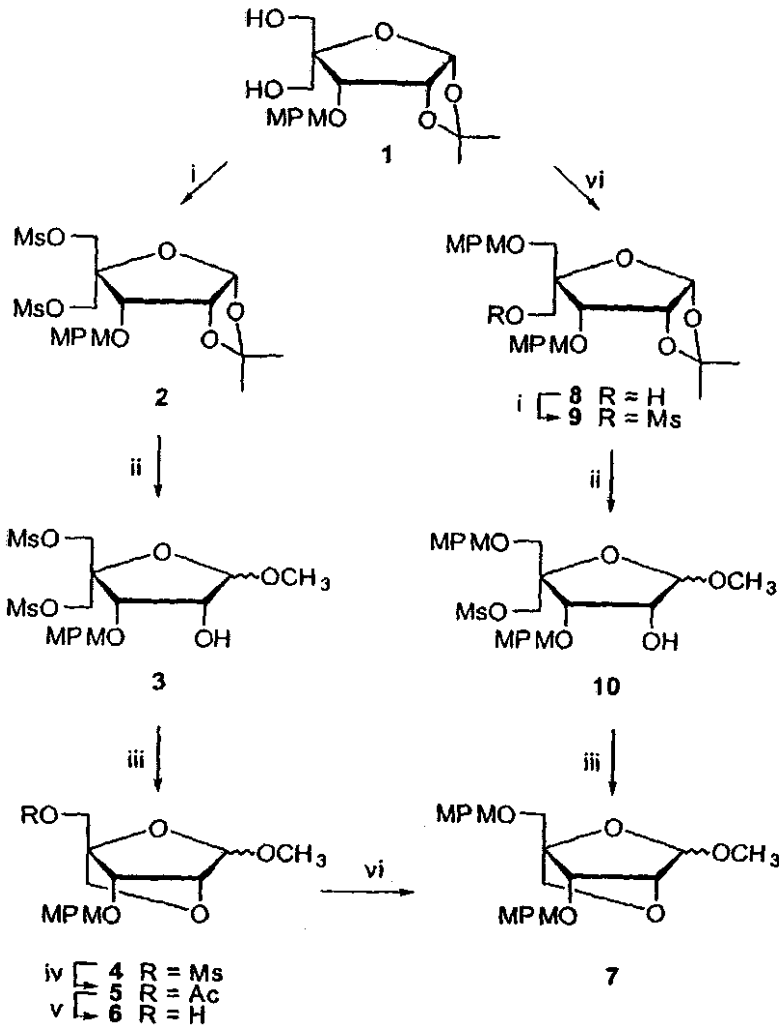
以前には「天然に存在しない」とみなされていた種々の核酸塩基がその後天然に存在することが発見されたことは、当業者には明らかであるはずである。

【0128】

ピレン-LNAユニットの望ましい合成を以下のスキーム1および2に示す。以下のスキーム1および2における化合物参照番号も以下の実施例に記載する。

【0129】

【化4】



スキーム1

【0130】

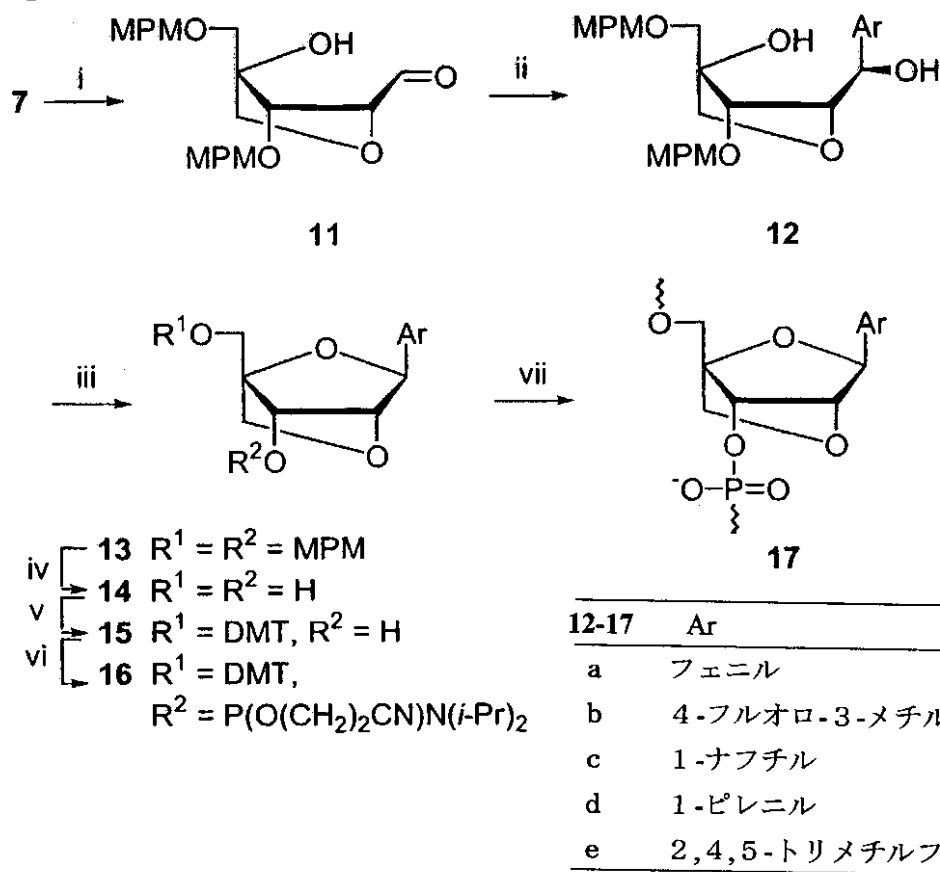
10

20

30

40

【化5】



10

20

スキーム2

【0131】

「非オキシ-LNA」モノマーまたはユニットは、2'-4'-糖結合に酸素原子を含まないヌクレオシド(すなわち、複素環式塩基のグリコシド)と広く定義される。非オキシ-LNAユニットの例としては、2'-デオキシヌクレオチド(DNA)またはヌクレオチド(RNA)または式Iaに
 30 関して上述、およびSingh et al., J.Org.Chem., 1998, 6, 6078~9頁に記載されている例えばチオ-LNAおよびアミノ-LNAのようなオキシ-LNAでないこれらの類似体ならびにSusan M.Freier and Karl-Heinz Altmann, Nucleic Acids Research, 1997, vol 25, 4429~4443頁に記載されている誘導体などがある。

【0132】

ヒドロキシル2'修飾を有するもの、2'-0-メチル、2'-フルオロ、2'-トリフルオロメチル、2'-0-(2-メトキシエチル)、2'-0-アミノフェニル、2'-0-ジメチルアミノオキシエチル、2'-0-フルオロエチルまたは2'-0-プロペニルなどの広範囲の修飾核酸を用いることができる。核酸はさらに、望ましくは、糖部分(例えば、リボースまたはキシロース)の2'位と3'位が結合している、3'修飾を含んでいてよい。核酸は、望ましくは、-CH₂-S-、-CH₂-NH-または-CH₂-NMe-架橋の2'-4'結合によるような糖部分(例えば、リボースまたはキシロース)の2'位と4'位が結合している、4'位における修飾も含んでいてよい。
 40

【0133】

核酸はまた、α-D-リボ、β-D-キシロまたはα-L-キシロ立体配置のような様々な立体配置を有してよい。

【0134】

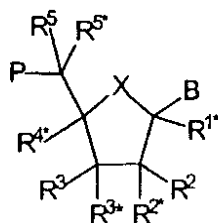
本発明のオリゴのヌクレオシド間結合は、天然リン酸ジエステル結合、または-0-P(O)₂-0-、-0-P(O,S)-0-、-0-P(S)₂-0-、NR^H-P(O)₂-0-、-0-P-(O,NR^H)-0-、-0-PO(R^H)-0-、-0-PO(CH₃)-0-および-0-PO(NHR^N)-0-のような他の結合であってよい。ただし、R^Hは水素およびC₁₋₄-アルキルから選択され、R^NはC₁₋₆-アルキルおよびフェニルから選択される。
 50

【0135】

本発明のオリゴマーに組込むための修飾核酸のさらなる望ましい基は、以下の式の基を含む。

【0136】

【化6】



10

【0137】

式中、Xは-O-であり、Bは上述のような修飾塩基、例えば、場合によって置換されているピレンまたは場合によって置換されているピレニルメチルグリセロールのような場合によって置換されている炭素環式アリール、あるいは場合によって置換されている複素脂環式または場合によって置換されているピリジルオキサゾールのような場合によって置換されている複素芳香族基である。他の望ましい万能的塩基は、すべてが場合によって置換されていてよいピロール、ジアゾールまたはトリアゾール部分などである。R^{1*}は水素であり、Pは後続するモノマーへのヌクレオシド間結合のラジカル位置または5'末端基を表し、そのようなヌクレオシド間結合または5'末端基は、置換基R⁵を場合によって含み、R⁵は水素であるか、またはヌクレオシド間結合に含まれている。R^{3*}は、先行するモノマーへのヌクレオシド間結合を表す基P^{*}または3'末端基であり、この式の置換基R²、R^{2*}、R³、R^{4*}から選択される非ジェミナル置換基の1つまたは2つの対は、-C(R^aR^b)-、=C(R^a)=C(R^a)-、-C(R^a)=N-、-O-、-S-、-SO₂-、-N(R^a)-および>C=Zから選択される1~4基/原子からなるビラジカルを表してよく、Zは-O-、-S-および-N(R^a)-から選択され、R^aおよびR^bはそれぞれ独立に、水素、場合によって置換されているC₁₋₆-アルキル、場合によって置換されているC₂₋₆-アルケニル、ヒドロキシ、C₁₋₆-アルコキシ、C₂₋₆-アルケニルオキシ、カルボキシ、C₁₋₆-アルコキシカルボニル、C₁₋₆-アルキルカルボニル、ホルミル、アミノ、モノおよびジ(C₁₋₆-アルキル)アミノ、カルバモイル、モノおよびジ(C₁₋₆-アルキル)アミノカルボニル、アミノ-C₁₋₆-アルキルアミノカルボニル、モノおよびジ(C₁₋₆-アルキル)アミノ-C₁₋₆-アルキルアミノカルボニル、C₁₋₆-アルキルカルボニルアミノ、カルバミド、C₁₋₆-アルカノイルオキシ、スルホノ、C₁₋₆-アルキルスルホニルオキシ、ニトロ、アジド、スルファニル、C₁₋₆-アルキルチオ、ハロゲン、光化学的に活性な基、熱化学的に活性な基、キレート基、リポーター基およびリガンドから選択され、前記非ジェミナル置換基の可能な対はそれにより、(i)前記非ジェミナル置換基が

20

30

40

結合している原子および(ii)介在原子とともに単環式部分を形成していて、存在し、可能なビラジカルに関与していない置換基R²、R^{2*}、R³、R^{4*}のそれぞれがそれぞれ独立に、水素、場合によって置換されているC₁₋₆-アルキル、場合によって置換されているC₂₋₆-アルケニル、ヒドロキシ、C₁₋₆-アルコキシ、C₂₋₆-アルケニルオキシ、カルボキシ、C₁₋₆-アルコキシカルボニル、C₁₋₆-アルキルカルボニル、ホルミル、アミノ、モノおよびジ(C₁₋₆-アルキル)アミノ、カルバモイル、モノおよびジ(C₁₋₆-アルキル)-アミノカルボニル、アミノ-C₁₋₆-アルキルアミノカルボニル、モノおよびジ(C₁₋₆-アルキル)アミノ-C₁₋₆-アルキルアミノカルボニル、C₁₋₆-アルキルカルボニルアミノ、カルバミド、C₁₋₆-アルカノイルオキシ、スルホノ、C₁₋₆-アルキルスルホニルオキシ、ニトロ、アジド、スルファニル、C₁₋₆-アルキルチオ、ハロゲン、光化学的に活性な基、熱化学的に活性な基、キレート基、リポーター基およびリガンドならびにそれらの塩基性塩および酸付加塩から選択される。

【0138】

本発明のオリゴヌクレオチドに使用するための特に望ましいLNAユニットは、2'-デオキ

50

シリボヌクレオチド、リボヌクレオチドおよび2'-0-メチル、2'-フルオロ、2'-トリフルオロメチル、2'-0-(2-メトキシエチル)、2'-0-アミノフェニル、2'-0-ジメチルアミノオキシエチル、2'-0-フルオロエチルまたは2'-0-プロペニルのような糖部分(例えば、リボースまたはキシロース)の2'位において修飾されているその類似体、ならびに修飾が2'および3'位の両方に関係する類似体、望ましくは、Nielsen et al., J.Chem.Soc., Perkin Trans., 1997, 3423~33頁および国際公開第99/14226に記載されているような修飾が糖部分(例えば、リボースまたはキシロース)の2'位と3'位を結合させるような類似体、ならびに修飾が2'および4'位の両方に関係する類似体、望ましくは、-CH₂-S-または-CH₂-NH-または-CH₂-NMe-架橋を有する類似体のような修飾が糖部分(例えば、リボースまたはキシロース)の2'位と4'位を結合させるような類似体(Singh et al., J.Org.Chem., 1998, 6, 60 78~9頁を参照)である。β-D-リボ立体配置を有するLNAユニットはしばしば最も適用可能であるが、他の立体配置も本発明の目的に適している。特に使用されているのは、特に2'-4'-CH₂-S-、-CH₂-NH-、-CH₂O-または-CH₂-NMe-架橋を有するものにおけるα-L-リボ、β-D-キシロおよびα-L-キシロ(Beier et al., Science, 1999, 283, 699頁およびEschenmoser, Science, 1999, 2118頁を参照)。

【0139】

この状況では、「オリゴ」と同じである「オリゴマー」と同じである「オリゴヌクレオチド」という用語は、ヌクレオシド間結合を介して結合されたヌクレオシドモノマー(例えば、複素環式塩基のグリコシド)の連続的な鎖を意味する。オリゴにおける2つの連続するモノマーの間の結合は、-CH₂-、-O-、-S-、-NR^H-、>C=O-、>C=NR^H-、>C=S-、-Si(R^H)₂-、-SO-、-S(O)₂-、-P(O)₂-、-PO(BH₃)-、-P(O,S)-、-P(S)₂-、-PO(R^H)-、-PO(OCH₃)-および-PO(NHR^H)-から選択される2~4個、望ましくは3個の基/分子からなり、R^Hは水素およびC₁₋₄-アルキルから選択され、R^HはC₁₋₆-アルキルおよびフェニルから選択される。そのような結合の実例は、-CH₂-CH₂-CH₂-、-CH₂-CO-CH₂-、-CH₂-CHOH-CH₂-、-O-CH₂-O-、-O-CH₂-CH₂-、-O-CH₂-CH(後続するモノマーとの結合として用いる場合にはR⁵を含む)、-CH₂-CH₂-O-、-NR^H-CH₂-CH₂-、-CH₂-CH₂-NR^H-、-CH₂NR^H-CH₂-、-O-CH₂-CH₂-NR^H-、-NR^H-CO-O-、-NR^H-CO-NR^H-、-NR^H-CS-NR^H-、-NR^H-C(=NR^H)-NR^H-、-NR^H-CO-CH₂-NR^H-、-O-CO-O-、-O-CO-CH₂-O-、-O-CH₂-CO-O-、-CH₂-CO-NR^H-、-O-CO-NR^H-、-NR^H-CO-CH₂-、-O-CH₂-CO-NR^H-、-O-CH₂-CH₂-NR^H-、-CH=N-O-、-CH₂-NR^H-O-、-CH₂-O-N(後続するモノマーとの結合として用いる場合にはR⁵を含む)、-CH₂-O-NR^H-、-CO-NR^H-CH₂-、-CH₂-NR^H-O-、-CH₂-NR^H-CO-、-O-NR^H-CH₂-、-O-NR^H-、-O-CH₂-S-、-S-CH₂-O-、-CH₂-CH₂-S-、-O-CH₂-CH₂-S-、-S-CH₂-CH(後続するモノマーとの結合として用いる場合にはR⁵を含む)、-S-CH₂-CH₂-、-S-CH₂-CH₂-O-、-S-CH₂-CH₂-S-、-CH₂-S-CH₂-、-CH₂-SO-CH₂-、-CH₂-SO₂-CH₂-、-O-SO-O-、-O-S(O)₂-O-、-O-S(O)₂-CH₂-、-O-S(O)₂-NR^H-、-NR^H-S(O)₂-CH₂-、-O-S(O)₂-CH₂-、-O-P(O)₂-O-、-O-P(O,S)-O-、-O-P(S)₂-O-、-S-P(O)₂-O-、-S-P(O,S)-O-、-S-P(S)₂-O-、-O-P(O)₂-S-、-O-P(O,S)-S-、-O=P(S)₂-S-、-S-P(O)₂-S-、-S-P(O,S)-S-、-S-P(S)₂-S-、-O-PO(R^H)-O-、-O-PO(OCH₃)-O-、-O-PO(OCH₂CH₃)-O-、-O-PO(OCH₂CH₂S-R)-O-、-O-PO(BH₃)-O-、-O-PO(NHR^N)-O-、-O-P(O)₂-NR^H-、-NR^H-P(O)₂-O-、-O-P(O,NR^H)-O-、-CH₂-P(O)₂-O-、-O-P(O)₂-CH₂-および-O-Si(R^H)₂-O-であり、これらのうち、-CH₂-CO-NR^H-、-CH₂-NR^H-O-、-S-CH₂-O-、-O-P(O)₂-O-、-O-P(O,S)-O-、-O-P(S)₂-O-、-NR^H-P(O)₂-O-、-O-P(O,NR^H)-O-、-O-PO(R^H)-O-、-O-PO(CH₃)-O-および-O-PO(NHR^N)-O-(ただし、R^Hは水素およびC₁₋₄-アルキルから選択され、R^NはC₁₋₆-アルキルおよびフェニルから選択される)が特に望ましい。さらなる実例は、Mesmacker et al., Current Opinion in Structure Biology 1995, 5, 343~355頁およびSusan M.Freier and Karl-Heinz Altmann, Nuclei Acids Research, 1997, vol25, 4429~4443頁に記載されている。ヌクレオシド間結合の左側は3'位における置換基P*としての5員環に結合しており、一方、右側は先行するモノマーの5'位に結合している。

【0140】

「後続するモノマー」という用語は5'末端方向の隣接モノマーを指し、「先行するモノマー」という用語は3'末端方向の隣接モノマーを指す。

【0141】

モノマーは、ワトソンクリック塩基対合則に従う水素結合(例えば、GとC、AとTまたはAとU)または例えば、ジアミノプリンとT、イノシンとC、プソイドイソシトシンとG等の他の水素結合モチーフを形成することができる核酸塩基を含んでいる場合、「相補性」と称する。

【0142】

本発明の実施に際して、標的遺伝子は1本鎖または2本鎖DNAまたはRNAであることが適切であるが、1本鎖DNAまたはRNAが望ましい。本発明のLNA-ヌクレオシド複合体を向ける標的は、標的遺伝子の対立遺伝子の形態およびスプライス変異体を含む対応するmRNAsなどであることが理解される。標的ポリヌクレオチド配列の知識を記載した文献、例えば、Pe
yman and Ulmann, Chemical Reviews, 90:543~584頁、1999、Crooke, Ann.Rev.Pharmacol.Toxicol., 32:329~376頁(1992)、およびZamecnik and Stephenson, Proc.Natl.Acad.Sci., 75:280~284頁(1974)にLNA-ヌクレオシド複合体の特定の配列を選択する実質的な指針が存在する。望ましいmRNAとしては、5'キャップ部位、tRNAプライマー結合部位、開始
10 コドン部位、mRNAドナースプライス部位およびmRNAアクセプタースプライス部位などがある(例えば、Goodchild et al., 米国特許第4806463号)。

【0143】

本明細書で用いているように、「対応する非修飾参照ヌクレオシド」という用語は、LNAに結合せず、LNA-万能的塩基複合体におけるヌクレオシドと同じ方向のヌクレオシドを指す。

【0144】

本明細書で用いているように、「対応する非修飾参照核酸塩基」という用語は、LNAに結合せず、LNA-万能的塩基複合体における核酸塩基と同じ方向の核酸塩基を指す。

【0145】

本発明のさらなる態様は、例えば、1つまたは複数のオキシ-LNA、チオ-LNAまたはアミノ-LNAユニットを含む核酸のような種々のLNAユニットの使用である。

【0146】

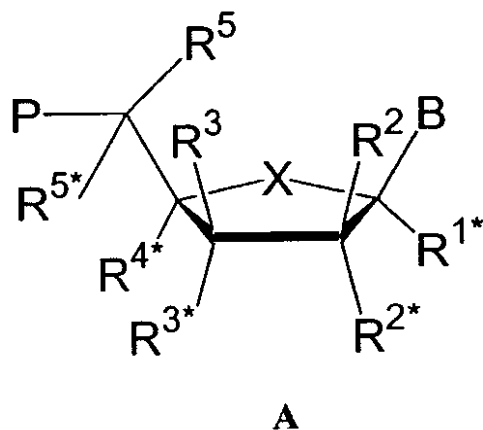
そのような種々のモノマーの使用は、ヌクレオシドの化学的、物理的、生物学的、薬物動態学的および薬理学的特性を「微調整」し、それにより治療薬として使用する場合にそれらの安全性および有効性の改善を促進する手段を提供する。

【0147】

本明細書では「LNA修飾オリゴヌクレオチド」は、下記の修飾の実例を有する下記の一
30 般的スキームAの少なくとも1つのLNAを含むオリゴヌクレオチドを述べるのに用いる。

【0148】

【化7】



【0149】

ここで、Xは-O-、-S-、-N(R^N)-、-C(R⁶R^{6*})-、-O-C(R⁷R^{7*})-、C(R⁶R^{6*})-、-S-C(R⁷R^{7*})-、-C(R⁶R^{6*})-S-、-N(R^{N*})-C(R⁷R^{7*})-、-C(R⁶R^{6*})-N(R^{N*})-および-C(R⁶R^{6*})-(R⁷R^{7*})-から選択される。

10

20

30

40

50

【0150】

Bは上述のような修飾塩基、例えば、場合によって置換されているピレンまたは場合によって置換されているピレニルメチルグリセロールのような場合によって置換されている炭素環式アリール、あるいは場合によって置換されているピリジルオキサゾール、場合によって置換されているピロール、場合によって置換されているジアゾールまたは場合によって置換されているトリアゾール部分のような場合によって置換されている複素脂環式または場合によって置換されている複素芳香族基、水素、ヒドロキシ、場合によって置換されている C_{1-4} -アルコキシ、場合によって置換されている C_{1-4} -アルキル、場合によって置換されている C_{1-4} -アシルオキシ、核酸塩基、DNAインターカレーター、光化学的に活性な基、熱化学的に活性な基、キレート基、リポーター基およびリガンドから選択され、Pは後続するモノマーへのヌクレオシド間結合のラジカル位置または5'末端基を表し、そのようなヌクレオシド間結合または5'末端基は、置換基 R^5 を場合によって含み、置換基 R^2 、 R^{2*} 、 R^3 および R^{3*} の1つが、先行するモノマーへのヌクレオシド間結合または2'/3'末端基を表わす基 P^* である。 R^{1*} 、 R^{4*} 、 R^5 、 R^{5*} 、 R^6 、 R^{6*} 、 R^7 、 R^{7*} 、RNならびに P^* を表さない R^2 、 R^{2*} 、 R^3 および R^{3*} の各基はそれぞれ、 $-C(R^aR^b)-$ 、 $-C(R^a)=C(R^a)-$ 、 $-C(R^a)=N-$ 、 $-C(R^a)-O-$ 、 $-O-$ 、 $-Si(R^a)_2-$ 、 $-C(R^a)-S-$ 、 $-S-$ 、 $-SO_2-$ 、 $-C(R^a)-N(R^b)-$ 、 $-N(R^a)-$ および $>C=Q$ から選択される約1~8個/原子を含むビラジカルを表し、Qは $-O-$ 、 $-S-$ および $-N(Ra)-$ から選択され、 R^a と R^b はそれぞれ独立に、水素、場合によって置換されている C_{1-12} -アルキル、場合によって置換されている C_{2-12} -アルケニル、場合によって置換されている C_{2-12} -アルキニル、ヒドロキシ、 C_{1-12} -アルコキシ、 C_{2-12} -アルケニルオキシ、カルボキシ、 C_{1-12} -アルコキシカルボニル、 C_{1-12} -アルキルカルボニル、ホルミル、アリール、アリールオキシカルボニル、アリールオキシ、アリールカルボニル、複素アリール、複素アリールオキシカルボニル、複素アリールオキシ、複素アリールカルボニル、アミノ、モノおよびジ(C_{1-6} -アルキル)アミノ、カルバモイル、モノおよびジ(C_{1-6} -アルキル)アミノカルボニル、アミノ- C_{1-6} -アルキル-アミノカルボニル、モノおよびジ(C_{1-6} -アルキル)アミノ- C_{1-6} -アルキル-アミノカルボニル、 C_{1-6} -アルキル-カルボニルアミノ、カルバミド、 C_{1-6} -アルカノイルオキシ、スルホノ、 C_{1-6} -アルキルスルホニルオキシ、ニトロ、アジド、スルファニル、 C_{1-6} -アルキルチオ、ハロゲン、DNAインターカレーター、光化学的に活性な基、熱化学的に活性な基、キレート基、リポーター基およびリガンドから選択され、アリールおよび複素アリールは場合によって置換されていてもよく、 R^a 、 R^b ならびに存在し、P、 P^* またはビラジカルに含まれない置換基 R^{1*} 、 R^2 、 R^{2*} 、 R^3 、 R^{3*} 、 R^{4*} 、 R^5 、 R^{5*} 、 R^6 および R^{6*} 、 R^7 および R^{7*} のいずれかから選択される2つの非ジェミナルまたはジェミナル置換基は、ともに、以前に定義したのと同じ種類のビラジカルから選択される関連ビラジカルを形成していてもよく、非ジェミナル置換基の対は、それにより(i)前記非ジェミナル置換基が結合している原子および(ii)介在原子とともに、単環または二環部分を形成しており、さらにP、 P^* またはビラジカルに含まれない置換基 R^{1*} 、 R^2 、 R^{2*} 、 R^3 、 R^{3*} 、 R^{4*} 、 R^5 、 R^{5*} 、 R^6 および R^{6*} 、 R^7 および R^{7*} のそれぞれは独立に、水素、場合によって置換されている C_{1-12} -アルキル、場合によって置換されている C_{2-12} -アルケニル、場合によって置換されている C_{2-12} -アルキニル、ヒドロキシ、 C_{1-12} -アルコキシ、 C_{2-12} -アルケニルオキシ、カルボキシ、 C_{1-12} -アルコキシカルボニル、 C_{1-12} -アルキルカルボニル、ホルミル、アリール、アリールオキシカルボニル、アリールオキシ、アリールカルボニル、複素アリール、複素アリールオキシカルボニル、複素アリールオキシ、複素アリールカルボニル、アミノ、モノおよびジ(C_{1-6} -アルキル)アミノ、カルバモイル、モノおよびジ(C_{1-6} -アルキル)アミノカルボニル、アミノ- C_{1-6} -アルキル-アミノカルボニル、モノおよびジ(C_{1-6} -アルキル)アミノ- C_{1-6} -アルキル-アミノカルボニル、 C_{1-6} -アルキル-カルボニルアミノ、カルバミド、 C_{1-6} -アルカノイルオキシ、スルホノ、 C_{1-6} -アルキルスルホニルオキシ、ニトロ、アジド、スルファニル、 C_{1-6} -アルキルチオ、ハロゲン、DNAインターカレーター、光化学的に活性な基、熱化学的に活性な基、キレート基、リポーター基およびリガンドから選択され、アリールおよび複素アリールは場合によって置換されていてもよく、2つのジェミナル置換基はともにオキソ、チオオキソ、イミノまたは場合によって置換されているメチレンを

表し、あるいはともに、 $-O-$ 、 $-S-$ および $-(NR^N)$ -から選択される1つまたは複数のヘテロ原子/基により場合によって中断および/または終結される1~5個の炭素原子のアルキレン鎖からなるスピロビラジカルを形成してよく、 R^N は水素および C_{1-4} -アルキルから選択され、2つの隣接する(非ジェミナル)置換基は二重結合をもたらずさらなる結合を示してよく、 R^{N*} は、存在し、ビラジカルに含まれない場合には、水素および C_{1-4} -アルキルならびにその塩基性塩および酸付加塩から選択される。

【0151】

具体例としての5'、3'および/または2'末端基としては、 $-H$ 、 $-OH$ 、ハロ(例えば、クロロ、フルオロ、ヨードまたはブロモ)、場合によって置換されているアリール(例えば、フェニルまたはベンジル)、アルキル(例えば、メチルまたはエチル)、アルコキシ(例えば、メトキシ)、アシル(例えば、アセチルまたはベンゾイル)、アロイル、アラルキル、ヒドロキシ、ヒドロキシアルキル、アルコキシ、アリールオキシ、アラルコキシ、ニトロ、シアノ、カルボキシ、アルコキシカルボニル、アリールオキシカルボニル、アラルコキシカルボニル、アシルアミノ、アロイルアミン、アルキルスルホニル、アリールスルホニル、複素アリールスルホニル、アルキルスルフィニル、アリールスルフィニル、複素アリールスルフィニル、アルキルチオ、アリールチオ、複素アリールチオ、アラルキルチオ、複素アラルキルチオ、アミジノ、アミノ、カルバモイル、スルファモイル、アルケン、アルキン、保護基(例えば、シリル、4,4'-ジメトキシトリチル、モノメトキシトリチルまたはトリチル(トリフェニルメチル))、リンカー(例えば、アミンを含むリンカー、エチレングリコール、アントラキノンのようなキノン)、検出可能な標識(例えば、放射標識または蛍光標識)およびビオチンなどがある。

【0152】

他の望ましい実施形態において、本発明で用いるLNA修飾オリゴヌクレオチドは、上の一般的スキームAの少なくとも1つのLNAユニットを含むオリゴヌクレオチドを含み、

X 、 B 、 P は上のように定義され、

置換基 R^2 、 R^{2*} 、 R^3 および R^{3*} の1つは、先行するモノマーへのヌクレオシド間結合または2'/3'末端基を表わす基 P^* であり、

R^{1*} 、 R^2 、 R^{2*} 、 R^3 、 R^{4*} 、 R^5 、 R^{5*} 、 R^6 、 R^{6*} 、 R^7 および R^{7*} の2つは、合わせたとき、 $-(CR^*R^*)_r-M-(CR^*R^*)_s-$ 、 $-(CR^*R^*)_r-M-(CR^*R^*)_s-M-$ 、 $-M-(CR^*R^*)_{r+s}-M-$ 、 $-M-(CR^*R^*)_r-M-(CR^*R^*)_s-$ 、 $-(CR^*R^*)_{r+s}-$ 、 $-M-$ 、 $-M-M-$ から選択され、各 M は独立に $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-Si(R^*)_2-$ 、 $-N(R^*)-$ 、 $>C=O$ 、 $-C(=O)-N(R^*)-$ および $-N(R^*)-C(=O)-$ から選択される。ビラジカルに含まれていない各 R^* および $R^{1(1*)}$ 、 $R^{7(7*)}$ は独立に、水素、ハロゲン、アジド、シアノ、ニトロ、ヒドロキシ、メルカプト、アミノ、モノまたはジ(C_{1-6} -アルキル)アミノ、場合によって置換されている C_{1-6} -アルコキシ、場合によって置換されている C_{1-6} -アルキル、DNAインターカレーター、光化学的に活性な基、熱化学的に活性な基、キレート基、リポーター基およびリガンドから選択され、かつ/または2つの隣接する(非ジェミナル) R^* はともに二重結合を示し、 r および s のそれぞれが0~4である。ただし、 $r+s$ の和は1~5である。

【0153】

LNAユニットの例をスキームBに示す。

【0154】

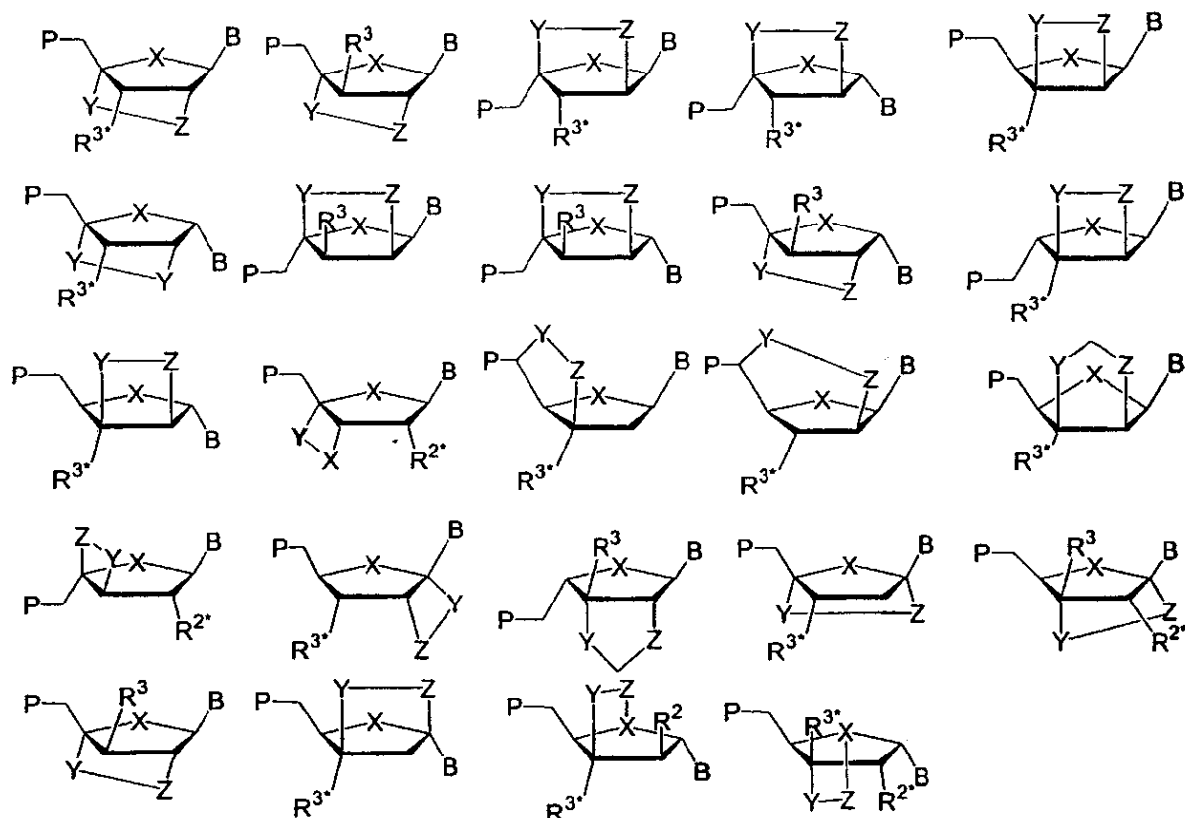
10

20

30

40

【化 8】



スキームB

【0155】

基XおよびBは上のように定義される。

【0156】

Pは後続するモノマーへのヌクレオシド間結合のラジカル位置、L-ヌクレオシドのようなヌクレオシドまたは5'末端基を表し、そのようなヌクレオシド間結合または5'末端基は場合によって置換基 R^5 を含み、置換基 R^2 、 R^{2*} 、 R^3 および R^{3*} の1つは、先行するモノマーへのヌクレオシド間結合または2'/3'末端基を表わす基 P^* である。具体例としての5'、3'および/または2'末端基は、上記のものを含む。

【0157】

望ましいヌクレオシドは、例えば、誘導ジヌクレオシドーリン酸のようなL-ヌクレオシドである。ヌクレオシドは β -D、 β -Lまたは α -Lヌクレオシドから構成されていてよい。望ましいヌクレオシドは、ヌクレオシドの少なくとも1つが α -Lまたは β -Lである、ダイマーとして結合していてよい。Bはまた、ピリミジン塩基シトシン、チミン、ウラシルもしくは5-フルオロウリジン(5-FUdR)、他のハロ化合物、またはプリン塩基アデニン、グアノシンもしくはイノシンを表す。

【0158】

いくつかの実施形態において、LNA-ピレンは、標的核酸のような他の核酸における非塩基の位置(例えば、塩基を含まないユニット)に対応する位置にある。4つの天然塩基に対してハイブリッド形成するDNA鎖におけるピレンの組込みにより、 T_m は4.5°C~6.8°C低下するが、非塩基に対向する位置のDNAにピレンを組み込んだ場合、おそらくB型二重鎖における適応がより良好であるため(Matray and Kool, J, Am. Chem. Soc., 120, 6191頁)、 T_m の低下は2.3°C~4.6°Cにすぎない。したがって、標的核酸における非塩基に対向する位置の核酸(例えば、塩基を含まないユニット、または塩基の代わりに非環状基のような小さい

10

20

30

40

50

基を含むユニット)へのLNA-ピレンの組込みによっても、ピレン置換に起因したT_mの低下の可能性を最小限とすることができる。

【0159】

本発明のキメラオリゴは、DNA、mRNAまたはtRNA、rRNA、snRNAおよびscrRNAのような非タンパク質コード細胞RNAsあるいは合成核酸のin vivoまたはin vitroでの分離、精製、増幅、検出、同定、定量または捕捉のためのような様々な診断目的のために極めて適している。

【0160】

オリゴマーは、オリゴマーの直接もしくは間接的検出、または固体担体への固定化を促進する光学的に活性な基、熱化学的に活性な基、キレート基、リポーター基またはリガンドを含んでいてよい。そのような基は、in situハイブリッド形成、サザンハイブリッド形成、ドットプロットハイブリッド形成、逆ドットプロットハイブリッド形成またはノーザンハイブリッド形成用のプローブとすることを目的とする場合、一般的にオリゴに結合させる。

10

【0161】

光学的に活性な基、熱化学的に活性な基、キレート基、リポーター基またはリガンドがスパーサー(K)を含んでいる場合、スパーサーは化学的に切断可能な基を含んでいることが適切である。

【0162】

これに関連して、「光学的に活性な基」という用語は、光照射による化学反応を受けることができる化合物を対象として含む。この官能基の実例は、キノン、特に6-メチル-1,4-ナフトキノン、アントラキノン、ナフトキノンおよび1,4-ジメチルアントラキノン、ジアジリン、芳香族アジド、ベンゾフェノン、ソラレン、ジアゾ化合物およびジアジリノ化合物である。

20

【0163】

これに関連して「熱化学的に活性な基」は、熱化学的に誘発される他の基との共有結合形成を受けることができる官能基と定義される。熱化学的に活性な基の機能部分の実例は、カルボン酸、活性化エステルのようなカルボン酸、酸フッ化物、酸塩化物、酸臭化物および酸ヨウ化物のようなカルボン酸ハロゲン化物、カルボン酸アジド、カルボン酸ヒドラジド、スルホン酸、スルホン酸エステル、スルホン酸ハロゲン化物、セミカルバジド、チオセミカルバジド、アルデヒド、ケトン、第一級アルコール、第二級アルコール、第三級アルコール、フェノール、ハロゲン化アルキル、チオール、ジスルフィド、第一級アミン、第二級アミン、第三級アミン、ヒドラジン、エポキシド、マレイミドおよびホウ酸誘導体である。

30

【0164】

これに関連して、「キレート基」という用語は、複数の結合部位を含み、同時に複数の結合部位によりしばしば他の分子、原子またはイオンに結合する分子を意味する。キレート基の機能部分の例は、イミノ二酢酸、ニトリロ三酢酸、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、アミノホスホン酸等である。

【0165】

これに関連して、「リポーター基」または「検出可能な標識」という用語は、それ自体または検出系列の一部として検出可能である基を意味する。リポーター基の機能部分の例は、ビオチン、ジゴキシゲニン、蛍光基(特定の波長の電磁放射線、例えば、光線またはX線を吸収し、その後、吸収したエネルギーをより長い波長の放射線として再放射することができる基、実例はダンシル(5-ジメチルアミノ)-1-ナフタレンスルホニル)、DOXYL(N-オキシル-4,4-ジメチルオキサゾリジン)、PROXYL(N-オキシル-2,2,5,5-テトラメチルピロリジン)、TEMPO(N-オキシル-2,2,6,6-テトラメチルピペリジン)、ジニトロフェニル、アクリジン、クマリン、Cy3およびCy5(Biological Detection Systems, Inc.の商標)、エリスロシン、クマル酸、ウンベリフェロン、Texasレッド、ローダミン、テトラメチルローダミン、Rox、7-ニトロベンゾ-2-オキサ-1-ジアゾール(NBD)、ピレン、フルオレセイン、ユ

40

50

ウロピウム、ルテニウム、サマリウムおよび他の希土類金属である)、放射性同位体標識、化学発光標識(化学反応時の発光により検出できる標識)、スピン標識(電子スピン共鳴分光法を用いて検出可能な、生体分子に結合するフリーラジカル(例えば、置換有機ニトロオキシド)または他の常磁性プローブ(例えば、 Cu^{2+} 、 Mg^{2+}))、酵素(ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼおよびグルコースオキシダーゼなど)、抗原、抗体、ハプテン(抗体と結合することができるが、それ自体では免疫応答を開始させることはできない基、例えば、ペプチドおよびステロイドホルモンなど)、脂肪酸残渣、ステロイド部分(コレステリル)、ビタミンA、ビタミンD、ビタミンE、特異的受容体に対する葉酸ペプチド、エンドサイトスを媒介する基のような細胞膜侵入のための担体系、上皮増殖因子(EGF)、ブラジキニンおよび血小板由来増殖因子(PDGF)を媒介する基である。特に興味深い例は、ビオチン、フルオレセイン、Texasレッド、ローダミン、ジニトロフェニル、ジゴキシゲニン、ルテニウム、ユウロピウム、Cy5、Cy3等である。

10

【0166】

これに関連して、「リガンド」は、結合するものを意味する。リガンドは、芳香族基(ベンゼン、ピリジン、ナフタレン、アントラセンおよびフェナントレンなど)、複素芳香族基(チオフェン、フラン、テトラヒドロフラン、ピリジン、ジオキサンおよびピリミジンなど)のような官能基、カルボン酸、カルボン酸エステル、カルボン酸ハロゲン化物、カルボン酸アジド、カルボン酸ヒドラジド、スルホン酸、スルホン酸エステル、スルホン酸ハロゲン化物、セミカルバジド、チオセミカルバジド、アルデヒド、ケトン、第一級アルコール、第二級アルコール、第三級アルコール、フェノール、ハロゲン化アルキル、チオール、ジスルフィド、第一級アミン、第二級アミン、第三級アミン、ヒドラジン、エポキシド、マレイミド、酸素原子、窒素原子および/または硫黄原子により場合によって中断または終結され、場合によって芳香族または一価/多価不飽和炭化水素を含む C_1 - C_{20} アルキル基、ポリエチレングリコールのようなポリオキシエチレン、ポリ- α -アラニンのようなオリゴ/ポリアミド、ポリグリシン、ポリリシン、ペプチド、オリゴ/多糖、オリゴ/ポリリン酸、トキシン、抗生物質、細胞毒およびステロイド、ならびにまた「アフィニティリガンド」すなわち、特定のタンパク質、抗体、多およびオリゴ糖および他の生体分子上の部位に対して特異的親和性を有する官能基または生体分子を含んでよい。

20

【0167】

DNAインターカレーター、光化学的に活性な基、熱化学的に活性な基、キレート基、リポーター基およびリガンドに関する上述の特定の例は、問題の基の「活性/機能」部分に対応すると理解すべきである。当業者には、DNAインターカレーター、光化学的に活性な基、熱化学的に活性な基、キレート基、リポーター基およびリガンドは、一般的にM-Kの形態で示され、Mは問題の基の「活性/機能」部分であり、Kは「活性/機能」部分の5または6員環への結合を介するスペーサーであることはさらに明らかである。したがって、BがDNAインターカレーター、光化学的に活性な基、熱化学的に活性な基、キレート基、リポーター基およびリガンドから選択される場合、基BはM-Kの形態を有し、Mは、DNAインターカレーター、光化学的に活性な基、熱化学的に活性な基、キレート基、リポーター基のそれぞれの「活性/機能」部分であり、Kは、5または6員環と「活性/機能」部分との間の1~50原子、望ましくは1~30原子、特に1~15原子を含む自由選択のスペーサーであると理解すべきである。

30

40

【0168】

これに関連して、「スペーサー」という用語は、熱化学的かつ光化学的に不活性の、間隔をあける基であり、上で定義した種類の2つまたはそれ以上の部分を接合するために用いる。スペーサーは、それらの疎水性、親水性、分子柔軟性および長さなどの種々の特性に基づいて選択する(例えば、Hermanson et al., 「Immobilized Affinity Ligand Techniques」、Academic Press, San Diego, California(1992)、137頁~を参照)。一般的に、スペーサーの長さは約400Å以下であり、一部の適用分野では100Å未満であることが望ましい。したがって、スペーサーは酸素原子、窒素原子および/または硫黄原子のような1つまたは複数のヘテロ原子により場合によって中断または終結される炭素原子の鎖を含む。

50

したがって、スパーサーKは、1つまたは複数のアミド、エステル、アミノ、エーテルおよび/またはチオエーテル機能性、ならびに場合によって芳香族または一価/多価不飽和炭化水素、ポリエチレングリコールのようなポリオキシエチレン、ポリ- α -アラニンのようなオリゴ/ポリアミド、ポリグリシン、ポリリシンおよび一般的ペプチド、オリゴ糖、オリゴ/ポリリン酸を含んでいてよい。さらに、スパーサーは、それらの複合ユニットからなっていてよい。5または6員環に対する問題の基の「活性/機能」部分の所望または必要な位置決めと空間的配向を考慮に入れて、スパーサーの長さを変化させることができる。特に、興味深い実施形態において、スパーサーは化学的に切断可能な基を含む。そのような化学的に切断可能な基の例としては、還元条件下で切断可能なジスルフィド基、ペプチダーゼにより切断可能なペプチド断片等がある。

10

【0169】

修飾核酸塩基およびヌクレオシド塩基は、枝分れ鎖アルキレンまたはアルケニレン基の直線部のようなリンカーを介してのフラソニル環の1'位のような核ユニットに結合する環状ユニット(例えば、ピレニルのような炭素環式ユニット)を含んでいてよい。アルキレン基は、1個(すなわち、 $-\text{CH}_2-$)~約12個の炭素原子、より一般的には1個~8個の炭素原子、さらにより一般的には1個~6個の炭素原子を有することが適切である。アルケニレン基は、1、2または3個の炭素-炭素二重結合ならびに2個~12個の炭素原子、より一般的には2個~約8個の炭素原子、さらにより一般的には2個~約6個の炭素原子を有することが適切である。

【0170】

20

上述のように、本発明のオリゴヌクレオチドは、例えば、複数の異なるオリゴがあらかじめ定められたパターンで固体表面に付加されているという、高い特異性のオリゴアレイとして用いることができる(Nature Genetics, suppl., vol.21, 1999年1月、1~60頁および国際公開第96/31557号)。多数の標的核酸を同時に分析するのに用いることができる、そのようなアレイの有用性は、表面に結合している個々のオリゴの特異性に著しく依存する。標的核酸は、検出可能な標識を有することがあり、あるいは本発明のオリゴヌクレオチドであってもよい適切な検出プローブとともにインキュベートすることによって検出することができる。

【0171】

本発明のさらなる目的は、相補性標的とミスマッチ標的とを区別する高い能力と、例えば、DNAおよびRNAポリメラーゼ、リガーゼ、ホスファターゼのような核酸活性酵素の基質として作用する能力とを合わせ持ったオリゴヌクレオチドを提供することである。そのようなオリゴヌクレオチドは、例えば、核酸の配列決定のためのプライマーとして、またPCR反応のようないくつかのよく知られている増幅反応のいずれかにおけるプライマーとして用いることができる。

30

【0172】

さらなる態様において、本発明のオリゴヌクレオチドは、互いに対して高い特異性を示す新規の親和対を構築するのに用いることができる。親和性定数は広範囲にわたって容易に調節することができ、多数の親和対を設計し、合成することができる。親和対の一方を標準的方法により問題の分子(例えば、タンパク質、アンプリコン、酵素、多糖、抗体、ハプテン、ペプチド等)に結合させることができ、一方、親和対の他方を例えば、ビーズ、膜、マイクロタイタープレート、スティック、チューブ等の固体担体に付着させることができる。固体担体は、例えば、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリカーボネートまたはポリエチレンのような広範囲のポリマー材料から選択することができる。親和対は、多様な標的分子の選択的分離、精製、捕捉および検出に用いることができる。

40

【0173】

本発明のオリゴヌクレオチドは、例えば、ウイルス、細菌および真菌のような病原性微生物の精製、分離および検出におけるプローブとしても用いることができる。本発明のオリゴヌクレオチドはまた、例えば、グラム陽性またはグラム陰性細菌、真菌、哺乳類細胞等からのrRNAのような関連種の群からの核酸の精製、分離および検出のための一般的ツ

50

ルとしても用いることができる。

【0174】

本発明のオリゴヌクレオチドは、分子診断における、例えば、RNA媒介性触媒過程における、抗生物質、薬物、アミノ酸、ペプチド、構造タンパク質、タンパク質受容体、タンパク質酵素、糖、多糖、生物学的補因子、核酸または三リン酸塩の特異的結合における、あるいは、立体特異的結合によるラセミ混合物からの鏡像異性体の分離におけるアダプターとしても用いることができる。

【0175】

本発明のオリゴヌクレオチドは、例えば、標識により細胞を非標識細胞から分離することを可能とする方法における細胞を標識するのに用いることができる。

10

【0176】

オリゴヌクレオチドは、タンパク質、アンプリコン、酵素、多糖、抗体、ハプテンおよびペプチドから選択される化合物に対する共有結合または非共有結合を形成させることにより複合体化することもできる。オリゴヌクレオチドは、ヌクレオチドからの蛍光シグナルの変化により、オリゴヌクレオチドのハイブリッド形成状態をオリゴヌクレオチドの非結合状態と区別することができるように配置された蛍光団部分と消光部分を有することが望ましい。他の望ましいオリゴヌクレオチドは、Taqmanプローブまたは分子ビーコンとして使用するように構成されている。

【0177】

天然または合成核酸の分離、精製、増幅、検出、同定、定量または捕捉のための1または複数の本発明のオリゴヌクレオチドを含むキットも提供する。キットは一般的に反応体、例えば、スライドまたはバイオチップを含む。本発明の1つまたは複数のオリゴヌクレオチドをそのような反応体上に適切に固定化することができる。

20

【0178】

本発明はまた、様々なバイオアッセイを行うための本発明のキットを用いる方法を提供する。1成分を固定化するあらゆるタイプのアッセイを本発明の基質プラットフォームを用いて行うことができる。固定化成分を用いるバイオアッセイは、当技術分野でよく知られている。固定化成分を用いるアッセイの例としては、例えば、イムノアッセイ、タンパク質-タンパク質相互作用の分析、タンパク質-核酸相互作用の分析、核酸-核酸相互作用の分析、受容体結合アッセイ、酵素アッセイ、リン酸化アッセイ、疾患状態の判定のための診断アッセイ、薬物適合性分析のための遺伝的プロファイリング、SNP検出等がある。

30

【0179】

問題の生体分子に結合することができる核酸配列の同定は、固有の核酸のそれぞれが定められた位置に配置されてアレイを形成するように核酸のライブラリーを基質表面に固定化することによって達成することができる。次に、生体分子の核酸への結合に有利な条件下でアレイを生体分子に曝露させる。非特異的に結合した生体分子は、所望の結合特異性のレベルに応じて、温和不いし厳格な緩衝液条件を用いて洗い流すことができよう。次いで、核酸アレイを分析して、どのような核酸配列が生体分子に結合しているかを確定することができる。生体分子は、結合した核酸の位置の検出用の蛍光標識を有することが望ましい。

40

【0180】

核酸配列の固定化アレイを用いるアッセイは、未知の核酸の配列の決定、一塩基多形(SNP)分析、特定の種、組織、細胞型等における遺伝子発現パターンの分析、遺伝子の同定等に用いることができる。

【0181】

上述のように、本発明のオリゴヌクレオチドは、治療適用分野に、例えば、アンチセンス2本鎖核酸(例えば、RNAi薬)、抗遺伝子またはリボザイム治療薬として用いることができる。これらの治療方法では、本発明の1つまたは複数のオリゴヌクレオチドを、標的疾患または障害、例えば、ウイルス感染症に罹患または罹患しやすい患者に所望のように投与する。

50

【0182】

本発明の方法に用いるオリゴヌクレオチドは、標的核酸により推定される構造の事前の分析なしに用いることができる。所与の事例について、選択したプローブまたはプローブのアレイが遺伝的変異体を特定のアッセイの必要に十分に区別することができるかどうかを適宜選択した参照標的分子を用いて経験的に判定することができる。一旦プローブまたはプローブのアレイが選択されれば、どのプローブが標的に結合し、これらのプローブがどの程度効率よく結合するか(すなわち、どれほど多くのプローブ/標的複合体を検出することができるか)という分析により、標的の立体配座のハイブリッド形成シグネチャー(signature)を作ることができる。シグネチャーを、線、パイ(pie)または領域グラフまたは3次元トポグラフ表示を含むが、これらに限定されない数学的および物理的情報の表示に汎用されるいずれかの方法により保存し、表示し、または解析することができると予想される。データはまた、数値マトリックスとして、あるいは視覚的に、数学的に、または例えば、EURAYdesign(商標)ソフトウェアおよび/またはニューラルネットワークのようなコンピュータ援用アルゴリズムにより解析することができる他の形式として用いることができる。

10

【0183】

得られた核酸構造のシグネチャーは、実際のヌクレオチド配列の決定を必要としない、特定の分子の配列特異的識別子としての役割を果たす。それらのシグネチャーを参照シグネチャーと比較することにより特定の配列を同定することはできるが、配列特異的ハイブリッド形成(すなわち、二次および三次構造の影響を除去するために高い厳密度での)による分子の実際の配列を推定するアルゴリズムの完全なマトリックス(すなわち、アレイの各場所で単一のヌクレオチド位置だけが変化するプローブ)への使用は、本発明の方法の特徴または要件でなく、また範囲内にもない。

20

【0184】

標的核酸により推定される構造に関する情報は、折りたたみに関与していることが知られている、または推定される領域をハイブリッド形成部位として選択するなどというように、プローブの設計に用いることができる。そのようなアプローチにより、問題の標的間の区別に必要であると考えられるプローブの数を低減することができる。

【0185】

フェナントロリン/銅、EDTA- Fe^{2+} 、シスプラチン、エチルニトロソ尿素、ジメチルピロカーボネート、ヒドラジン、硫酸ジメチルおよび重亜硫酸塩のような核酸構造に敏感な化学物質の使用を含む、核酸に関する構造情報を得るために用いられる多くの方法が存在する。Cleavase(商標)酵素(Third Wave Technologies, Inc., Madison, Wis)、Taq DNAポリメラーゼ、大腸菌(*E. coli*) DNAポリメラーゼIおよび真核生物構造特異的エンドヌクレアーゼ(例えば、ヒト、マウスアフリカツメガエルXPG酵素、酵母RAD2酵素)、マウスFEN-1エンドヌクレアーゼ(Harrington and Lieber, Gene and Develop., 3:1344頁[1994])およびウシ胸腺5'~3'エンドヌクレアーゼ(Murante et al., J. Biol. Chem., 269:1191頁[1994])のような様々な情報源からの構造特異的ヌクレアーゼを用いた酵素的調査。さらに、DNA修復エンドヌクレアーゼのファミリーのメンバーのような3'ヌクレアーゼ活性を有する酵素(例えば、キイロショウジョウバエ(*Drosophila melanogaster*)のRrpI酵素、酵母RAD1/RAD10複合体および大腸菌(*E. coli*) Exo III)も核酸構造の調査に適している。

30

40

【0186】

プローブの選択の1段階としての構造解析を、二次構造を形成している可能性のある領域に関する情報が得られていない核酸のセグメントについて用いる場合、構造誘発性の修飾または切断の部位を同定しなければならない。修飾または切断を部分的に反応性条件下(すなわち、試験試料中の分子の集団において個々の分子が1または数箇所の切断または修飾のみを受けるような)で修飾または切断を行うことができるならば、最も都合がよい。試料を全体として分析する場合、各反応部位を示し、それにより、すべての部位を同定できるようにすべきである。Cleavase Fragment Length Polymorphism(商標)切断反応を例として用いると、末端標識核酸断片の部分的切断生成物を大きさに分割する場合(例えば

50

、電気泳動により)、その結果は、標識末端から測定される、各切断の部位を示すバンドのラダーとなる。DNA合成を阻害する化学的修飾について同様な分析を行うことができ、部分的に修飾された分子におけるプライマーの伸長により、一組の入れ子状の終止生成物が得られる。切断/修飾の部位の決定は、生成物をサイズマーカー(例えば、市販の大きさ比較用のDNAの断片)と比較することによりある程度の確度で行うことはできるが、より正確に測定するには、試験試料と並行して分割するための核酸の同じセグメントのDNA配列決定ラダーを作製する。これにより、切断または修飾の精密な部位の迅速な同定が可能となる。

【0187】

オリゴヌクレオチドは、多くのしかたで標的と相互作用することができる。例えば、他の実施形態において、オリゴヌクレオチドは標的核酸の複数の領域に接触することができる。標的核酸が記載されているように折りたたまれている場合、1本鎖に留まっている2つまたはそれ以上の領域は、十分に接近しているため1つのオリゴヌクレオチドと接触することができる。そのような立体配置にある捕捉オリゴヌクレオチドは、本明細書では標的核酸内の遠位領域と接触することができることを反映させるために、「架橋」または「橋かけ」オリゴヌクレオチドと称する。「架橋」および「橋かけ」という用語の使用は、これらの遠位相互作用を特定の種類の相互作用に限定することを目的とするものではない。これらの相互作用は、G-T塩基対、フーグスティーン相互作用、三重らせん構造、四重らせん凝集体およびtRNAsに認められるような核酸三次構造内に認められるような多塩基水素結合のような当技術分野で知られている非標準核酸相互作用を含む。これらの用語は、標的鎖に対する相互作用の領域の特定の空間的配向を示すことを意図したものでもない。すなわち、架橋オリゴヌクレオチドにおける接触領域における順序が標的鎖における対応する接触領域と同じ配列順序を必要とすることを意図するものではない。その順序を逆にしてもよいし、あるいは組み替えてもよい。

10

20

【0188】

本明細書で用いているように、「標的核酸」または「核酸標的」という用語は、問題の特定の核酸配列を指す。したがって、「標的」は他の核酸分子の存在下に、または高分子量核酸分子内に存在し得る。

【0189】

「核酸」、「オリゴマー」または「オリゴヌクレオチド」という用語は、LNAユニットを含むまたは含まない核酸を指す。

30

【0190】

以下の非限定的実施例は、本発明を例示したものである。本明細書に記載したすべての文書は、参照によりすべてが本明細書に組込まれている。

【0191】

一般的コメント

以下の実施例において、化合物参照番号は、上記のスキーム1および2に示す化合物を表す。

【0192】

反応は、無水溶媒を用いた場合には窒素雰囲気中で行った。すべての反応を、蛍光指示薬(SiO_2 -60、F-25)を含むEM試薬プレートを用いた薄層クロマトグラフィー(TLC)によりモニターした。化合物は、5%水性硫酸とエタノールとの混合物を噴霧した後加熱してUV光下で可視化した。シリカゲル60(粒径0.040~0.063mm、Merck)をフラッシュカラムクロマトグラフィーに用いた。NMRスペクトルは、Varian Unity 300分光計で ^1H NMRについては300 MHzで、 ^{13}C NMRについては75.5MHzで、 ^{31}P NMRについては121.5MHzで記録した。 δ 値は、内標準としてのテトラメチルシラン(^1H および ^{13}C NMR)および外標準としての85% H_3PO_4 (^{31}P NMR)を基準したppm単位である。結合定数はヘルツの単位で示す。帰属は、示された場合、暫定的であり、メチレンプロトンの帰属は、示された場合、交換することができる。二環式化合物は、フォンバイヤー(Von Bayer)命名法に従って命名した。高速原子衝撃質量分析(FAB-MS)は、Kratos MS50TC分光計で陽イオンモードで記録した。オリゴヌクレオ

40

50

チドの組成は、クエン酸ジアンモニウムと2,6-ジヒドロキシアセトフェノンのマトリックスを用いてMicromass Tof Spec E質量分析計のMALDI-MSにより確認した。

【実施例】

【0193】

(実施例1)

1,2-0-イソプロピリデン-5-0-メタンスルホニル-4-C-メタンスルホニルオキシメチル-3-0-(p-メトキシベンジル)- α -メトキシベンジル)- α -D-リボフラノース[上のスキーム1における化合物2]の合成

塩化メシル(8.6g、7.5mmol)を無水ピリジン(30cm³)中4-C-ヒドロキシメチル-1,2-0-イソプロピリデン-3-0-p-メトキシベンジル- α -D-リボフラノース[R.Yamaguchi、T.Imanishi、S.Kohgo、H.Horie and H.Ohrui、Biosci.Biotechnol.Biochem.、1999、63、736頁](10.0g、29.4mmol)の攪拌溶液に1滴ずつ加え、反応混合物を室温で一夜攪拌した。混合物を減圧下で蒸発乾固し、残留物をトルエン(2×25cm³)で共蒸発し、CH₂Cl₂(200cm³)に溶解し、NaHCO₃飽和水溶液(2×100cm³)と塩水(50cm³)で連続的に洗浄した。有機相を乾燥し(Na₂SO₄)、ろ過し、減圧下で蒸発乾固した。得られた無色の粘稠油状物をカラムクロマトグラフィー[溶離剤CH₂Cl₂中0.5~1%(容量/容量)MeOH]に続いて、MeOHからの結晶化により精製して、フラノース2を白色固体物質(13.6g、93%)として得た。R_f 0.57(CH₂Cl₂/MeOH 95:5,v/v); δ_{H} (CDCl₃) 7.30(2H,d,J 8.7)、6.90(2H,d,J 8.5)、5.78(1H,d,J 3.7)、4.86(1H,d,J 12.0)、4.70(1H,d,J 11.4)、4.62(1H,dd,J 5.0および3.8)、4.50(1H,d,J 11.1)、4.39(1H,d,J 12.3)、4.31(1H,d,J 11.0)、4.17(1H,d,J 5.1)、4.11(1H,d,J 11.0)、3.81(3H,s)、3.07(3H,s)、2.99(3H,s)、1.68(3H,s)、1.34(3H,s); δ_{C} (CDCl₃) 159.8、129.9、128.8、114.1、114.0、104.5、83.2、78.0、77.9、72.6、69.6、68.8、55.4、38.1、37.5、26.3、25.7。

【0194】

(実施例2)

メチル5-0-メタンスルホニル-4-C-メタンスルホニルオキシメチル-3-0-(p-メトキシベンジル)-D-リボフラノシド[上のスキーム1における化合物3]の合成

H₂O(45cm³)とMeOH中15%HCl(450cm³、重量/重量)との混合物中フラノシド2(13.5g、27.2mmol)の懸濁液を室温で72時間にわたり攪拌した。NaHCO₃飽和水溶液(100cm³)に続いて、NaHCO₃(固体)を加えて混合物を注意深く中和した後、混合物を減圧下で蒸発乾固した。H₂O(100cm³)を加え、EtOAc(3×100cm³)を用いて抽出を行った。合わせた有機相を塩水(100cm³)で洗浄し、乾燥し(Na₂SO₄)、ろ過した後、減圧下で蒸発乾固した。残留物をトルエン(2×25cm³)で共蒸発し、カラムクロマトグラフィー[CH₂Cl₂中1~2%(容量/容量)MeOH]により精製して、フラノシド3をアノマー混合物(透明油状物、11/0g、86%、アノマー間比約6:1)として得た。R_f 0.39、0.33(CH₂Cl₂/MeOH 95:5,v/v); δ_{H} (CDCl₃,主アノマーのみ) 7.28(2H,d,J 8.4)、6.91(2H,d,J 8.9)、4.87(1H,s)、4.62(1H,d,J 11.4)、4.53(1H,d,J 11.2)、4.41(2H,s)、4.31(1H,d,J 9.8)、4.24(1H,d,J 4.6)、4.06(1H,d,J 10.0)、3.98(1H,br s)、3.81(3H,s)、3.33(3H,s)、3.06(3H,s)、3.03(3H,s); δ_{C} (CDCl₃,主アノマーのみ) 160.0、130.1、128.5、114.3、107.8、81.7、81.2、73.8、73.6、69.7、69.6、55.5、55.4、37.5、37.4。

【0195】

(実施例3)

(1R,3RS,4R,7S)-1-メタンスルホニルオキシメチル-3-メトキシ-7-(p-メトキシベンジルオキシ)-2,5-ジオキサビシクロ[2.2.2]ヘプタン[上のスキーム1における化合物4]の合成

0℃の無水DMF(50cm³)中化合物3(10.9g、23.2mmol)のアノマー混合物の攪拌溶液に水素化ナトリウム(2.28gの鉱油中60%(重量/重量)懸濁液、95.2mmol)を10分間にわたって加え、混合物を室温で12時間攪拌した。水冷H₂O(200cm³)を徐々に加え、EtOAc(3×200cm³)を用いて抽出を行った。合わせた有機相をNaHCO₃飽和水溶液(2×100cm³)と塩水(50cm³)で連続的に洗浄し、乾燥して(Na₂SO₄)、ろ過し、減圧下で蒸発乾固した。残留物をカラムクロマトグラフィー[CH₂Cl₂中0.5~1%(容量/容量)MeOH]により精製して、最初に主異性体(6.4

2g、74%)を、次いで[CH₂Cl₂中1.5%(容量/容量)MeOH]副異性体(1.13g、13%)を両者とも透明油状物として得た。R_f 0.56、0.45(CH₂Cl₂/MeOH 95:5,v/v); δ_H(CDCl₃,主要異性体)7.16(2H,d,J 8.8)、6.74(2H,d,J 8.4)、4.65(1H,s)、4.42~4.32(4H,m)、3.95~3.94(2H,m)、3.84(1H,d,J 7.4)、3.66(3H,s)、3.54(1H,d,J 7.4)、3.21(3H,s)、2.90(3H,s); δ_C(CDCl₃,主要異性体)159.6、129.5、129.3、114.0、105.3、83.2、78.6、77.2、72.1、71.8、66.3、55.6、55.4、37.8; δ_H(CDCl₃,副生異性体)7.27(2H,d,J 8.9)、6.89(2H,d,J 8.6)、4.99(1H,s)、4.63~4.39(4H,m)、4.19(1H,s)、4.10~3.94(2H,m)、3.91(1H,s)、3.81(3H,s)、3.47(3H,s)、3.05(3H,s); δ_C(CDCl₃,副生異性体)159.7、129.6、129.5、114.1、104.4、86.4、79.3、77.1、72.3、71.9、66.2、56.4、55.4、37.7。

【0196】

10

(実施例4)

(1R,4R,7S)-1-アセトキシメチル-3-メトキシ-7-(p-メトキシベンジルオキシ)-2,5-ジオキサビシクロ[2.2.1]ヘプタン[スキーム1における化合物5]の合成

ジオキササン(25cm³)中フラノシド4(主異性体、6.36g、17.0mmol)の攪拌溶液に18-クラウン-6(9.0g、34.1mmol)とKOAc(8.4g、85.6mmol)を加えた。攪拌混合物を還流下で12時間加熱し、次に、減圧下で蒸発乾固した。残留物をCH₂Cl₂(100cm³)に溶解し、洗浄をNaHCO₃飽和水溶液(2×50cm³)と塩水(50cm³)で連続的に行った。分離した有機相を乾燥し(Na₂SO₄)、ろ過し、減圧下で蒸発乾固した。残留物をカラムクロマトグラフィー[CH₂Cl₂中1%(容量/容量)MeOH]により精製して、フラノシド5を白色固体物質(1アノマー、5.23g、91%)を得た。R_f 0.63(CH₂Cl₂/MeOH 95:5,v/v); δ_H(CDCl₃)7.27~7.24(2H,m)、6.90~6.87(2H,m)、4.79(1H,s)、4.61(1H,d,J 11.0)、4.49(2H,m)、4.28(1H,d,J 11.0)、4.04(3H,m)、3.80(3H,s)、3.68(1H,m)、3.36(3H,s)、2.06(3H,s); δ_C(CDCl₃)170.7、159.5、129.5、129.4、113.9、105.1、83.3、78.9、77.2、72.0、71.9、61.0、55.4、55.3、20.8。

20

【0197】

(実施例5)

(1S,4R,7S)-1-ヒドロキシメチル-3-メトキシ-7-(p-メトキシベンジルオキシ)-2,5-ジオキサビシクロ[2.2.1]ヘプタン[スキーム1における化合物6]の合成

飽和メタノール性アンモニア(200cm³)中フラノシド5(1アノマー、5.16g、15.3mmol)の溶液を室温で48時間攪拌した。反応混合物を減圧下で蒸発乾固し、トルエン(2×50cm³)で共蒸発し、残留物をカラムクロマトグラフィー[CH₂Cl₂中2~3%(容量/容量)MeOH]により精製して、フラノシド6を白色固体物質(1アノマー、3.98g、88%)を得た。R_f 0.43(CH₂Cl₂/MeOH 95:5,v/v); δ_H(CDCl₃)7.27(2H,d,J 8.6)、6.88(2H,d,J 8.9)、4.79(1H,s)、4.59(1H,d,J 11.3)、4.53(1H,d,J 11.4)、4.09(2H,s)、3.97(1H,d,J 7.5)、3.86(2H,br s)、3.80(3H,s)、3.75~3.62(2H,m)、3.37(3H,s); δ_C(CDCl₃)159.4、129.7、129.3、113.9、105.2、85.6、78.3、77.4、71.9、71.8、58.8、55.5、55.3。

30

【0198】

(実施例6)

(1S,4R,7S)-3-メトキシ-7-(p-メトキシベンジルオキシ)-1-(p-メトキシベンジルオキシメチル)-2,5-ジオキサビシクロ[2.2.1]ヘプタン[スキーム1における化合物7]の合成

0℃の無水DMF(50cm³)中フラノシド6(1アノマー、3.94g、13.3mmol)の攪拌溶液にNaHの懸濁液[鉱油中60%(重量/重量)、1.46g、60.8mmol]を加えた後、塩化p-メトキシベンジル(2.74g、17.5mmol)を1滴ずつ加えた。混合物を室温まで加温し、攪拌をさらに4時間継続し、その後、氷冷H₂O(50cm³)を1滴ずつ加えた。混合物をCH₂Cl₂(3×100cm³)で抽出し、合わせた有機相を塩水(100cm³)で洗浄し、乾燥し(Na₂SO₄)、ろ過し、減圧下で蒸発乾固し、トルエン(3×50cm³)で共蒸発した。残留物(4.71g)を7とアルデヒド11との混合物であると暫定的に特定し、さらに精製せずに11(以下を参照)の調製に用いた。

40

【0199】

(実施例7)

4-C-メタンスルホニルオキシメチル-3,5-ジ-0-(p-メトキシベンジル)-1,2-0-イソプロピリデン-α-D-リボフラノース[スキーム1における化合物9]の合成

50

4-C-ヒドロキシメチル-3,5-ジ-0-(p-メトキシベンジル)--1,2-0-イソプロピリデン- α -D-リボフラノース[R.Yamaguchi、T.Imanishi、S.Kohgo、H.Horie and H.Ohrui、Biosci.Biotechnol.Biochem.、1999、63、736頁](8、3.2g、6.95mmol)を、2について述べた手順に従ってMsCl(2.00g、17.5mmol)およびピリジン(10cm³)を用いてメシル化した。処理の後に、無色の粘稠油状物をカラムクロマトグラフィー[CH₂Cl₂中1%(容量/容量)MeOH]により精製して、誘導体9を透明油状物として89%の収率(3.17g)で得た。R_f 0.45(CH₂Cl₂/MeOH 98:2,v/v); δ_{H} (CDCl₃) 7.22(2H,d,J 8.9)、7.18(2H,d,J 8.7)、6.86(4H,d,J 8.3)、5.76(1H,d,J 3.8)、4.83(1H,d,J 12.0)、4.64(1H,d,J 11.6)、4.59(1H,m)、4.49~4.35(4H,m)、4.24(1H,d,J 5.3)、3.80(6H,s)、3.56(1H,d,J 10.5)、3.45(1H,d,J 10.5)、3.06(3H,s)、1.67(3H,s)、1.33(3H,s); δ_{C} (CDCl₃) 159.6、159.4、129.9、129.8、129.7、129.5、129.4、129.3、114.0、113.9、113.8、113.7、113.6、104.5、84.9、78.6、78.1、73.4、72.4、71.0、69.9、55.3、38.0、26.4、25.9。 10

【0200】

(実施例8)

4-C-メタンスルホニルオキシメチル-3,5-ジ-0-(p-メトキシベンジル)-D-リボフラノース[スキーム1における化合物10]の合成

3の合成について述べた手順に従ってMeOH中15%HCl(重量/重量、120cm³)とH₂O(12cm³)の混合物を用いてフラノシド9(3.1g、5.76mmol)のメタノール分解を行った。処理後、粗生成物をカラムクロマトグラフィー[CH₂Cl₂中0.5~1%(容量/容量)MeOH]により精製して10の主アノマー(1.71g、58%)と[CH₂Cl₂中1~1.5%(容量/容量)MeOH]10の副アノマー(0.47g、16%)を両者とも透明油状物として得た。R_f 0.31、0.24(CH₂Cl₂/MeOH 98:2,v/v); δ_{H} (主アノマー,CDCl₃) 159.8、159.5、129.9、129.8、129.6、129.5、129.0、114.2、114.1、114.0、113.9、107.9、84.7、79.9、74.2、73.5、73.5、70.2、64.4、55.6、55.4、37.4。 20

【0201】

(実施例9)

スキーム1における化合物7の別法による調製

フラノシド10(主アノマー、1.68g、3.28mmol)の閉環を4の合成について述べた手順に従って無水DMF(10cm³)中NaH(鉱油中60%懸濁液(重量/重量)、0.32g、13.1mmol)を用いて行い、7とアルデヒド11との混合物であると暫定的に判断された粗生成物を得た(以下を参照)(1.13g)。 30

【0202】

(実施例10)

(2S,3R,4S)-4-ヒドロキシ-3-(p-メトキシベンジルオキシ)-4-(p-メトキシベンジルオキシメチル)-テトラヒドロフラン-2-カルバルデヒド[スキーム1における化合物11]

80%氷酢酸(100cm³)中粗フラノシド7(上述のように調製した11との混合物として)の溶液を50℃で4時間攪拌した。減圧下で溶媒を留出させ、残留物を無水エタノール(3×25cm³)とトルエン(2×25cm³)で連続的に共蒸発し、カラムクロマトグラフィー[CH₂Cl₂中4~5%(容量/容量)MeOH]により精製して、アルデヒド11を無色油状物(4.6g)として得た。R_f 0.37(CH₂Cl₂/MeOH 95:5,v/v); δ_{H} (CDCl₃) 9.64(1H,br s)、7.27~7.17(4H,m)、6.87~6.84(4H,m)、4.59(1H,d,J 11.6)、4.51~4.41(2H,m)、4.35(1H,s)、3.92~3.90(2H,m)、3.79(6H,s)、3.77~3.68(3H,m)、3.55(2H,br s); δ_{C} (CDCl₃) 203.6、159.5、159.4、129.7、129.6、129.5、129.2、114.0、113.9、113.8、87.3、86.7、81.0、75.1、73.4、71.6、67.6、55.3。 40

【0203】

(実施例11)

スキーム2における化合物12a~eを得るための臭化アリールマグネシウムとアルデヒド11との反応の一般的手順

無水DMF(10cm³)中アルデヒド11(スキーム2)の溶液を、0℃の無水THFに溶解した臭化アリールマグネシウムの攪拌溶液に、5分間にわたって1滴ずつ加えた。混合物を室温まで加熱し、12時間攪拌した。混合物を減圧下で蒸発乾固し、残留物をCH₂Cl₂で希釈し、NH₄Cl 50

飽和水溶液で数回洗浄した。有機相を乾燥し(Na_2SO_4)、ろ過し、減圧下で蒸発乾固した。得られた粗生成物のカラムクロマトグラフィーによりスキーム2に示した化合物12a~eを得た。

【0204】

(実施例11a)

(2S,3R,4S)-4-ヒドロキシ-2-[(R)-ヒドロキシ(フェニル)メチル]-4-(p-メトキシベンジルオキシ)-3-(p-メトキシベンジルオキシメチル)-テトラヒドロフラン[スキーム2の化合物12a]の合成

臭化フェニルマグネシウム(THF中1.0M溶液、 14.2cm^3 、14.2mモル)とアルデヒド11(515mg、1.28mモル)とのグリニャール反応により、スキーム2に示したように12aが得られた。粗生成物をカラムクロマトグラフィー[CH_2Cl_2 中4%(容量/容量)MeOH]により精製して、テトラヒドロフラン12a(540mg、88%)を無色油状物として得た。 R_f 0.34(CH_2Cl_2 /MeOH 95:5, v/v); δ_H (CDCl_3) 7.40~7.19(7H, m)、6.91~6.73(6H, m)、4.73(1H, d, J 6.4)、4.48(2H, s)、4.08(2H, s)、3.88(1H, d, J 9.4)、3.79(1H, m)、3.78(3H, s)、3.76(3H, s)、3.75~3.69(2H, m)、3.50(1H, d, J 9.4)、3.45(1H, s)、3.42(1H, br s)、3.26(1H, br s); δ_C (CDCl_3) 159.5、159.3、140.7、129.7、129.6、129.5、129.2、128.5、128.0、127.3、113.9、113.8、113.7、89.4、84.6、81.8、75.3、74.7、73.5、71.6、69.3、55.3; m/z (FAB) 503[M+Na]⁺、479[M-H]⁺、461[M-H-H₂O]⁺。

10

【0205】

(実施例11b)

(2S,3R,4S)-4-ヒドロキシ-2-[(R)-ヒドロキシ(4-フルオロ-3-メチルフェニル)メチル]-4-(p-メトキシベンジルオキシ)-3-(p-メトキシベンジルオキシメチル)-テトラヒドロフラン[スキーム2の化合物12b]の合成

臭化4-フルオロ-3-メチルフェニルマグネシウム(THF中1.0M溶液、 15.0cm^3 、15.0mモル)とアルデヒド11(603mg、1.5mモル)とのグリニャール反応により、スキーム2に示したように12bが得られた。粗生成物をカラムクロマトグラフィー[CH_2Cl_2 中4~5%(容量/容量)MeOH]により精製して、テトラヒドロフラン12b(611mg、85%)を無色油状物として得た。 R_f 0.34(CH_2Cl_2 /MeOH 95:5, v/v); δ_H (CDCl_3) 7.24~7.12(5H, m)、6.98~6.84(5H, m)、6.77(1H, d, J 8.5)、4.65(1H, dd, J 2.8および6.4)、4.49(2H, s)、4.15(2H, s)、4.01(1H, dd, J 2.3および6.5)、3.87(1H, d, J 9.3)、3.79(3H, s)、3.78(3H, s)、3.76~3.68(2H, m)、3.52(1H, s)、3.47(1H, d, J 10.3)、3.42(1H, d, J 2.9)、3.22(1H, s)、2.24(3H, d, J 0.8); δ_C (CDCl_3) 162.7、159.5、159.4、136.2、136.1、130.3、130.2、129.7、129.6、129.5、129.4、129.1、126.1、126.0、115.1、114.8、114.0、113.9、113.8、89.3、84.5、81.8、75.3、74.0、73.5、71.7、69.2、55.4、55.3、14.7(d, J 3.9); m/z (FAB) 535[M+Na]⁺、511[M-H]⁺、493[M-H-H₂O]⁺。

20

30

【0206】

(実施例11c)

(2S,3R,4S)-4-ヒドロキシ-2-[(R)-ヒドロキシ(1-ナフチル)メチル]-4-(p-メトキシベンジルオキシ)-3-(p-メトキシベンジルオキシメチル)-テトラヒドロフラン[スキーム2の化合物12c]の合成

1-ブロモナフタレン(1.55g、7.5mモル)をTHF(10cm^3)中マグネシウム切削屑(182mg、7.5mモル)およびヨウ素(10mg)の攪拌混合物に加えた。混合物を40℃で1時間攪拌した後、室温に冷却した。THF(10cm^3)中アルデヒド1(603mg、1.5mモル)を徐々に加え、反応物を12時間攪拌した。粗生成物をカラムクロマトグラフィー[CH_2Cl_2 中4~5%(容量/容量)MeOH]により精製して、テトラヒドロフラン12c(756mg、95%)を無色油状物として得た。 R_f 0.35(CH_2Cl_2 /MeOH 95:5, v/v); δ_H (CDCl_3) 8.08(1H, m)、7.86(1H, m)、7.79(1H, d, J 8.2)、7.72(1H, d, J 7.2)、7.49~7.44(3H, m)、7.18(2H, d, J 8.4)、6.84(2H, d, J 8.6)、6.74(2H, d, J 8.7)、6.68(2H, d, J 8.8)、5.52(1H, dd, J 3.7および5.6)、4.45(2H, s)、4.34(1H, dd, J 2.5および5.9)、4.03(1H, d, J 11.0)、3.96(1H, d, J 11.0)、3.93(1H, d, J 9.5)、3.80(1H, d, J 9.3)、3.77(3H, s)、3.75(1H, d, J 2.6)、3.72(3H, s)、3.68(1H, d, J 9.3)、3.56(1H, d, J 3.7)、

40

50

3.49(1H,d,J 9.3)、3.34(1H,s); δ_c (CDCl₃)159.5、159.3、136.3、134.0、131.0、129.7、129.6、129.5、129.4、129.0、128.6、128.2、125.6、125.5、123.5、114.0、113.8、113.7、88.7、84.7、81.9、75.5、73.5、71.7、71.3、69.3、55.4、55.3;m/z(FAB)553[M+Na]⁺、529[M-H]⁺、511[M-H-H₂O]⁺。

【0207】

(実施例11d)

(2S,3R,4S)-4-ヒドロキシ-2-[(R)-ヒドロキシ(1-フェニル)メチル]-4-(p-メトキシベンジルオキシ)-3-(p-メトキシベンジルオキシメチル)-テトラヒドロフラン[スキーム2の化合物12d]の合成

化合物12cの合成について述べた手順に従って、アルデヒド11(515mg、1.28mmol)、1-ブromoピレン(1.0g、3.56mmol)、マグネシウム切削屑(155mg、6.4mmol)、ヨウ素(10mg)およびTHF(20cm³)からテトラヒドロフラン12dを合成した。粗生成物をカラムクロマトグラフィー[CH₂Cl₂中3~4%(容量/容量)MeOH]により精製して、テトラヒドロフラン12d(690mg、89%)を淡黄色固体として得た。R_f 0.35(CH₂Cl₂/MeOH 95:5,v/v); δ_H (CDCl₃)8.23(2H,d,J 8.4および9.2)、8.19~8.13(3H,m)、8.05~7.99(4H,m)、7.14(2H,d,J 8.8)、6.82(2H,d,J 9.0)、6.30(2H,d,J 8.7)、6.20(2H,d,J 8.6)、5.87(1H,d,J 7.2)、4.43(2H,s)、4.41(1H,m)、4.01(1H,d,J 9.4)、3.91(1H,d,J 11.8)、3.86(1H,d,J 9.2)、3.77(1H,d,J 1.9)、3.76(3H,s)、3.70~3.64(3H,m)、3.52~3.45(1H,m)、3.44(3H,s); δ_c (CDCl₃)159.5、158.9、133.9、131.4、131.1、130.7、129.7、129.5、129.2、128.9、128.5、127.8、127.7、127.5、126.0、125.5、125.3、125.2、125.1、125.0、124.9、122.9、113.9、113.3、89.5、83.5、82.0、75.7、73.4、71.3、71.0、69.3、55.3、55.0;m/z(MALDI)627[M+Na]⁺、609[M⁺+Na-H₂O]⁺。

【0208】

(実施例11e)

(2S,3R,4S)-4-ヒドロキシ-2-[(R)-ヒドロキシ(2,4,5-トリメチルフェニル)メチル]-4-(p-メトキシベンジルオキシ)-3-(p-メトキシベンジルオキシメチル)-テトラヒドロフラン[スキーム2の化合物12e]の合成

化合物12cの合成について述べた手順に従って、アルデヒド11(515mg、1.28mmol)、1-ブromo-2,4,5-トリメチルベンゼン(1.28g、6.4mmol)、マグネシウム切削屑(155mg、6.4mmol)、ヨウ素(10mg)およびTHF(20cm³)からテトラヒドロフラン12eを合成した。粗生成物をカラムクロマトグラフィー[CH₂Cl₂中3~4%(容量/容量)MeOH]により精製して、テトラヒドロフラン12e(589mg、85%)を無色油状物として得た。R_f 0.34(CH₂Cl₂/MeOH 95:5,v/v); δ_H (CDCl₃)7.25(2H,d,J 8.7)、7.21(2H,d,J 8.9)、6.90(1H,s)、6.87(1H,s)、6.85(2H,d,J 8.9)、6.76(2H,d,J 8.7)、4.95(1H,dd,J 3.6および5.9)、4.48(2H,s)、4.18~4.08(3H,m)、3.89(1H,d,J 9.6)、3.80(1H,m)、3.79(3H,s)、3.77(3H,s)、3.71(1H,d,J 9.2)、3.64(1H,d,J 2.6)、3.51(1H,d,J 9.4)、3.24(1H,s)、3.18(1H,d,J 3.4)、2.25(3H,s)、2.22(3H,s)、2.21(3H,s); δ_c (CDCl₃)159.5、159.3、136.0、135.8、134.2、132.5、132.0、129.8、129.7、129.6、129.5、128.5、113.9、113.8、88.6、84.7、81.7、75.4、73.5、71.7、70.9、69.4、55.3、19.5、19.4、19.0;m/z(FAB)545[M+Na]⁺、521[M-H]⁺、503[M-H-H₂O]⁺。

【0209】

(実施例12)

スキーム2に示した化合物13a~eを得るための環化の一般的手順

N,N,N',N'-テトラメチルアゾジカルボキサミド(TMAD)を0℃のベンゼン中スキーム2に示した化合物12a~eおよびトリブチルホスフィンの攪拌溶液に1回で加えた。混合物を室温で12時間攪拌した後、ジエチルエーテル(50cm³)で希釈した。有機相をNH₄Cl飽和水溶液(2×20cm³)と塩水(25cm³)で連続的に洗浄し、乾燥して(Na₂SO₄)、ろ過し、減圧下で蒸発乾固した。得られた粗生成物をカラムクロマトグラフィー[CH₂Cl₂中1.5~2%(容量/容量)MeOH]により精製してスキーム2に示した化合物13a~eを得た。

【0210】

10

20

30

40

50

(実施例12a)

(1S,3S,4R,7S)-7-(p-メトキシベンジルオキシ)-1-(p-メトキシベンジルオキシメチル)-3-フェニル-2,5-ジオキサビシクロ[2.2.1]ヘプタン[スキーム2の化合物13a]

TMAD(310mg、1.8mモル)、PBU₃(364mg、1.8mモル)およびベンゼン(10cm³)の存在下での化合物12a(540mg、1.13mモル)の環化の後の一般的処理とカラムクロマトグラフィーにより化合物13aを無色油状物(400mg、77%)として得た。R_f 0.51(CH₂Cl₂/MeOH 98:2,v/v); δ_H (CDCl₃) 7.36~7.33(7H,m)、7.10(2H,d,J 8.3)、6.88(2H,d,J 8.7)、6.78(2H,d,J 8.7)、5.17(1H,s,H-3)、4.59(2H,br s,-CH₂(MPM))、4.43(1H,d,J 11.3,-CH₂(MPM))、4.34(1H,d,J 11.3,-CH₂(MPM))、4.19(1H,s,H-4)、4.09(1H,d,J 7.7,H-6)、4.06(1H,d,J 7.7,H-6)、4.01(1H,s,H-7)、3.82~3.77(5H,m,-C₁-CH₂-O-,OCH₃), 3.76(3H,s,-OCH₃); δ_c (CDCl₃) 159.4、159.3、139.4(C-1'), 130.3、129.7、129.5、129.3、128.5、127.5、125.4、113.9、113.8、85.9(C-1)、84.1(C-3)、81.1(C-4)、77.4(C-7)、73.7(-CH₂(MPM))、73.4(C-6)、71.8(-CH₂(MPM))、66.3(-C₁-CH₂-O-)、55.4(-OCH₃)、55.3(-OCH₃); m/z(FAB) 467[M+Na-H₂O]⁺、461[M-H]⁺。

【0211】

(実施例12b)

(1S,3S,4R,7S)-3-(4-フルオロ-3-メチルフェニル)-7-(p-メトキシベンジルオキシ)-1-(p-メトキシベンジルオキシメチル)-2,5-ジオキサビシクロ[2.2.1]ヘプタン[スキーム2の化合物13b]

TMAD(275mg、1.6mモル)、PBU₃(325mg、1.6mモル)およびベンゼン(10cm³)の存在下での化合物12b(540mg、1.13mモル)の環化の後の一般的処理とカラムクロマトグラフィーにより化合物13bを無色油状物(445mg、84%)として得た。R_f 0.52(CH₂Cl₂/MeOH 98:2,v/v); δ_H (CDCl₃) 7.28(2H,d,J 8.7)、7.11(2H,d,J 8.6)、7.08~7.09(2H,m,H-2'およびH-6')、6.94(1H,dd,J 8.5および9.2,H-5')、6.88(2H,d,J 8.6)、6.79(2H,d,J 8.4)、5.08(1H,s,H-3)、4.62~4.55(2H,m,-CH₂(MPM))、4.45(1H,d,J 11.1,-CH₂(MPM))、4.36(1H,d,J 11.6,-CH₂(MPM))、4.13(1H,s,H-4)、4.07、4.03(各1H,2d,各J 7.6,H-6)、3.99(1H,s,H-7)、3.81(2H,m,-C₁-CH₂-O-)、3.80(3H,s,-OCH₃), 3.77(3H,s,-OCH₃)、2.23(3H,d,J 1.6,Ar-CH₃); δ_c (CDCl₃) 162.3(C-4'), 159.4、159.3、134.8、134.7、130.3、129.6、129.5、129.2、128.5、128.4、128.3、124.2、115.1、114.8、113.9、113.8、85.9(C-1)、83.5(C-3)、81.0(C-4)、77.1(C-7)、73.6(-CH₂(MPM))、73.4(C-6)、71.8(-CH₂(MPM))、66.2(-C₁-CH₂-O-)、55.4(-OCH₃)、55.3(-OCH₃)、14.7(d,J 3.3,Ar-CH₃); m/z(FAB) 494[M]⁺、493[M-H]⁺。

【0212】

(実施例12c)

(1S,3S,4R,7S)-7-(p-メトキシベンジルオキシ)-1-(p-メトキシベンジルオキシメチル)-3-(1-ナフチル)-2,5-ジオキサビシクロ[2.2.1]ヘプタン[スキーム2の化合物13c]

TMAD(345mg、2.0mモル)、PBU₃(405mg、2.0mモル)およびベンゼン(15cm³)の存在下での化合物12c(700mg、1.32mモル)の環化の後の一般的処理とカラムクロマトグラフィーにより化合物13cを無色油状物(526mg、78%)として得た。R_f 0.53(CH₂Cl₂/MeOH 98:2,v/v); δ_H (CDCl₃) 7.91~7.86(2H,m)、7.78(1H,d,J 8.2)、7.73(1H,d,J 7.1)、7.53~7.46(3H,m)、7.32(2H,d,J 8.7)、7.04(2H,d,J 8.7)、6.90(2H,d,J 8.3)、6.71(2H,d,J 8.6)、5.79(1H,s,H-3)、4.67~4.61(2H,m,-CH₂(MPM))、4.43(1H,s,H-4)、4.38(1H,d,J 11.2,-CH₂(MPM))、4.27(1H,d,J 10.9,-CH₂(MPM))、4.16(2H,br s,H-6)、4.08(1H,s,H-7)、3.91、3.87(各1H,2d,各J 11.0,-C₁-CH₂-O-)、3.81(3H,s,-OCH₃)、3.72(3H,s,-OCH₃); δ_c (CDCl₃) 159.3、134.6(C-1'), 133.5、130.3、129.8、129.7、129.4、129.3、128.9、128.1、126.4、125.8、125.6、123.8、122.7、113.9、113.7、85.7(C-1)、82.3(C-3)、79.9(C-4)、78.2(C-7)、73.7(-OCH₂(MPM))、73.5(C-6)、71.8(-OCH₂(MPM))、66.3(-C₁-CH₂-O-)、55.4(-OCH₃)、55.3(-OCH₃); m/z(FAB) 512[M]⁺、511[M-H]⁺。

【0213】

(実施例12d)

(1S,3S,4R,7S)-7-(p-メトキシベンジルオキシ)-1-(p-メトキシベンジルオキシメチル)- 50

3-(1-ピレニル)-2,5-ジオキサビシクロ[2.2.1]ヘプタン[スキーム2の化合物13d]

TMAD(275mg、1.6mmol)、PBU₃(325mg、1.6mmol)およびベンゼン(10cm³)の存在下での化合物12d(650mg、1.08mmol)の環化の後の一般的処理とカラムクロマトグラフィーにより化合物13dを淡黄色固体(496mg、79%)として得た。R_f 0.53(CH₂Cl₂/MeOH 98:2, v/v); δ_H (CDCl₃) 8.29(1H, d, J 8.2)、8.18~8.12(5H, m)、8.08~8.01(2H, m)、7.96(1H, d, J 7.5)、7.35(2H, d, J 8.5)、6.97(2H, d, J 8.9)、6.92(2H, d, J 8.8)、6.60(2H, d, J 8.8)、6.09(1H, s, H-3)、4.71~4.65(2H, m, -CH₂(MPM))、4.49(1H, s, H-4)、4.34(1H, d, J 11.4, -CH₂(MPM))、4.23(1H, d, J 11.1, -CH₂(MPM))、4.25(1H, d, J 7.6, H-6)、4.21(1H, d, J 7.8, H-6)、4.16(1H, s, H-7)、3.95~3.94(2H, m, -C₁-CH₂-O-), 3.81(3H, s, -OCH₃)、3.59(3H, s, -OCH₃); δ_C (CDCl₃) 159.4、159.3、132.2(C-1'), 131.4、130.8、130.7、130.4、129.5、129.4、128.0、127.5、127.4、126.9、126.1、125.6、125.4、124.9、124.8、124.7、123.6、122.0、113.9、113.7、85.9(C-1)、82.7(C-3)、80.6(C-4)、77.9(C7)、73.9(-OCH₂(MPM))、73.5(C-6)、71.8(-OCH₂(MPM))、66.3(-C₁-CH₂-O-), 55.4(-OCH₃)、55.2(-OCH₃); m/z(FAB) 587[M+H]⁺、586[M]⁺。

【0214】

(実施例12e)

(1S,3S,4R,7S)-7-(p-メトキシベンジルオキシ)-1-(p-メトキシベンジルオキシメチル)-3-(2,4,5-トリメチルフェニル)-2,5-ジオキサビシクロ[2.2.1]ヘプタン[スキーム2の化合物13e]

TMAD(275mg、1.6mmol)、PBU₃(325mg、1.6mmol)およびベンゼン(10cm³)の存在下での化合物12e(550mg、1.05mmol)の環化の後の一般的処理とカラムクロマトグラフィーにより化合物13eを無色油状物(425mg、80%)として得た。R_f 0.52(CH₂Cl₂/MeOH 98:2, v/v); δ_H (CDCl₃) 7.30(2H, d, J 9.0)、7.24(1H, s, H-6'), 7.13(2H, d, J 8.9)、6.89(1H, s, H-3'), 6.88(2H, d, J 8.8)、6.79(2H, d, J 8.6)、5.18(1H, s, H-3)、4.64~4.57(2H, m, -CH₂(MPM))、4.46(1H, d, J 11.2, -CH₂(MPM))、4.36(1H, d, J 11.5, -CH₂(MPM))、4.18(1H, s, H-4)、4.14(1H, s, H-7)、4.09(1H, d, J 7.9, H-6)、4.04(1H, d, J 7.7, H-6)、3.86(2H, s, -C₁-CH₂-O-), 3.80(3H, s, -OCH₃)、3.76(3H, s, -OCH₃)、2.21(6H, s, 2 x Ar-CH₃)、2.17(3H, s, Ar-CH₃); δ_C (CDCl₃) 159.4、159.3、135.5(C-1'), 134.4、134.0、131.7、131.3、130.5、129.9、129.4、129.2、127.2、113.9、113.8、85.6(C-1)、82.4(C-3)、79.4(C-4)、77.6(C-7)、73.5(-OCH₂(MPM))、73.4(C-6)、71.8(-OCH₂(MPM))、66.3(-C₁-CH₂-O-), 55.4(-OCH₃)、55.3(-OCH₃)、19.5(-CH₃)、19.3(-CH₃)、18.4(-CH₃); m/z(FAB) 504[M]⁺、503[M-H]⁺。

【0215】

(実施例14)

スキーム2に示した化合物14a~eを得るためのp-メトキシベンジル基の酸化的除去の一般的手順

室温のCH₂Cl₂(少量のH₂Oを含む)中化合物13a~eの攪拌溶液に2,3-ジクロロ-5,6-ジシアノキノン(DDQ)を加えると、ただちに濃緑色~黒色を呈し、徐々に退色して淡褐色~黄色となった。反応混合物を室温で4時間激しく攪拌した。沈殿物をシリカゲルの薄いパッドに通してろ過により除去し、EtOAcで洗浄した。合わせたろ液をNaHCO₃飽和水溶液(2×25cm³)と塩水(25cm³)で連続的に洗浄した。分離した有機相を乾燥し(Na₂SO₄)、ろ過し、減圧下で蒸発乾固した。得られた粗生成物をカラムクロマトグラフィー[CH₂Cl₂中4~5%(容量/容量)MeOH]により精製して、化合物14a~eを得た。

【0216】

(実施例14a)

(1S,3S,4R,7S)-7-ヒドロキシ-1-ヒドロキシメチル-3-フェニル-2,5-ジオキサビシクロ[2.2.1]ヘプタン[スキーム2の化合物14a]

化合物13a(400mg、0.86mmol)をCH₂Cl₂(10cm³)とH₂O(0.5cm³)との混合物中DDQ(600mg、2.63mmol)で処理した。一般的処理とカラムクロマトグラフィーの後に化合物14aを白色固体物質(128mg、66%)として得た。R_f 0.30(CH₂Cl₂/MeOH 9:1、容積/容積)、δ_H ((CD₃)₂CO/CD₃OD、(CD₃)₂COを化合物に加えた後、溶液が透明になるまでCD₃ODを加えた) 7.40~7.22

(5H,m)、4.99(1H,s)、4.09(1H,s)、4.04(1H,s)、4.01(1H,d,7.7)、3.86(1H,d,J 7.7)、3.90(2H,br s)、3.77(2H,br s)、 $\delta_c((\text{CD}_3)_2\text{CO}/\text{CD}_3\text{OD})$ 、 $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ を化合物に加えた後、溶液が透明になるまで CD_3OD を加えた)140.0、128.2、127.2、125.4、87.2、83.7、83.5、72.3、70.2、58.4、 $m/z(\text{FAB})223[\text{M}+\text{H}]^+$

【0217】

(実施例14b)

(1S,3S,4R,7S)-3-(4-フルオロ-3-メチルフェニル)-7-ヒドロキシ-1-ヒドロキシメチル-2,5-ジオキサビシクロ[2.2.1]ヘプタン[スキーム2の化合物14b]

化合物13b(400mg、0.81mモル)を CH_2Cl_2 (10 cm^3)と H_2O (0.5 cm^3)との混合物中DDQ(570mg、2.5mモル)で処理した。一般的処理とカラムクロマトグラフィーの後に化合物14bを白色固体物質(137mg、67%)として得た。 R_f 0.31($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1,v/v); $\delta_H(\text{CD}_3\text{OD})$ 7.23(1H,d,J 8.1)、7.19(1H,m)、6.99(1H,dd,J 8.5および9.3)、4.99(1H,s)、4.09(1H,s)、4.06(1H,s)、4.03(1H,d,J 7.6)、3.93~3.91(3H,m)、2.25(3H,d,J 1.4); $\delta_c(\text{CD}_3\text{OD})$ 161.9(d,J 243.3)、136.4(d,J 3.4)、129.6(d,J 5.0)、126.1(d,J 22.8)、125.5(d,J 8.0)、115.7(d,J 22.9)、88.5、85.0、84.3、73.5、71.3、59.4、14.5(d,J 3.7); $m/z(\text{FAB})255[\text{M}+\text{H}]^+$ 。 10

【0218】

(実施例14c)

(1S,3S,4R,7S)-7-ヒドロキシ-1-ヒドロキシメチル-3-(1-ナフチル)-2,5-ジオキサビシクロ[2.2.1]ヘプタン[スキーム2の化合物14b]

化合物13c(475mg、0.93mモル)を CH_2Cl_2 (10 cm^3)と H_2O (0.5 cm^3)との混合物中DDQ(600mg、2.63mモル)で処理した。一般的処理とカラムクロマトグラフィーの後に化合物14cを白色固体物質(170mg、67%)として得た。 R_f 0.31($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1、容積/容積)、 $\delta_H(\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD})$ 、 CD_3OD を化合物に加えた後、溶液が透明になるまで CDCl_3 を加えた)7.94~7.86(2H,m)、7.80~7.74(2H,m)、7.55~7.46(3H,m)、5.74(1H,s)、4.56(2H,br s)、4.37(1H,s)、4.24(1H,s)、4.17~4.11(2H,m)、4.04(2H,br s)、 $\delta_c(\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD})$ 、 CD_3OD を化合物に加えた後、溶液が透明になるまで CDCl_3 を加えた)134.7、134.0、130.2、129.3、128.6、126.8、126.2、125.8、123.8、122.8、87.4、83.1、82.2、73.1、71.5、59.0、 $m/z(\text{FAB})273[\text{M}+\text{H}]^+$ 、272[M]⁺。 20

【0219】

(実施例14d)

(1S,3S,4R,7S)-7-ヒドロキシ-1-ヒドロキシメチル-3-(1-ピレニル)-2,5-ジオキサビシクロ[2.2.1]ヘプタン[スキーム2の化合物14d]

化合物13d(411mg、0.7mモル)を CH_2Cl_2 (10 cm^3)と H_2O (0.5 cm^3)との混合物中DDQ(570mg、2.5mモル)で処理した。一般的処理とカラムクロマトグラフィーの後に化合物14dを白色固体物質(182mg、75%)として得た。 R_f 0.32($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1、容積/容積)、 $\delta_H(\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD})$ 、 CD_3OD を化合物に加えた後、溶液が透明になるまで CDCl_3 を加えた)8.32(1H,d,J 7.8)、8.23~8.18(5H,m)、8.06(2H,br s)、8.01(1H,d,J 7.6)、6.06(1H,s)、4.47(1H,s)、4.36(1H,s)、4.27~4.18(2H,m)、4.10(2H,br s)、 $\delta_c(\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD})$ 132.2、131.0、128.5、127.8、127.3、126.5、125.9、125.7、125.1、123.6、122.1、87.7、83.7、82.6、73.1、71.4、58.9、 $m/z(\text{FAB})347[\text{M}+\text{H}]^+$ 、346[M]⁺。 40

【0220】

(実施例14e)

(1S,3S,4R,7S)-7-ヒドロキシ-1-ヒドロキシメチル-3-(2,4,5-トリメチルフェニル)-2,5-ジオキサビシクロ[2.2.1]ヘプタン[スキーム2の化合物14e]

化合物13e(355mg、0.7mモル)を CH_2Cl_2 (10 cm^3)と H_2O (0.5 cm^3)との混合物中DDQ(570mg、2.5mモル)で処理した。一般的処理とカラムクロマトグラフィーの後に化合物14eを白色固体物質(120mg、65%)として得た。 R_f 0.31($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1、容積/容積)、 $\delta_H(\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD})$ 、 CD_3OD を化合物に加えた後、溶液が透明になるまで CDCl_3 を加えた)7.23(1H,s)、6.92(1H,s)、5.14(1H,s)、4.26(1H,s)、4.10(1H,s)、4.08(1H,d,J 7.7)、4.00~3.95(3H,m)、2.23(6H,s)、2.21(1H,s)、 $\delta_c(\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD})$ 、 CD_3OD を化合物に加えた後、溶液が透明になる 50

までCDCl₃を加えた)135.6、133.9、133.8、131.7、131.2、126.6、86.6、82.1、81.9、72.3、70.6、58.5、19.2、19.0、18.1、m/z(FAB)265[M+H]⁺、264[M]⁺

【0221】

(実施例15)

化合物14aからeをジメトキシトリチル化して、スキーム2に示す化合物15aからeを得る一般的な手順

塩化4,4'-ジメトキシトリチル(DMTCl)を化合物14aからeの無水ピリジン中の攪拌溶液に一度に加えた。混合物を室温で4時間攪拌した後、メタノール(0.2cm³)を加え、生じた混合物を減圧下で蒸発乾固した。残留物を無水CH₃CN(2×5cm³)および無水トルエン(2×5cm³)で共蒸発し、その後CH₂Cl₂(20cm³、微量の酸は塩基性アルミナの短いパッドでろ過することによって除去した)に溶解した。生じた溶液をNaHCO₃飽和水溶液(2×10cm³)および塩水(10cm³)で連続的に洗浄した。分離された有機相を乾燥し(Na₂SO₄)、ろ過し、減圧下で蒸発乾固した。得られた粗生成物をカラムクロマトグラフィー[CH₂Cl₂中の0.25から0.50%(v/v)MeOH、0.5%のEt₃Nを含む]により精製して化合物15aからeを得た。

【0222】

(実施例15a)

(1R,3S,4R,7S)-1-(4,4'-ジメトキシトリチルオキシメチル)-7-ヒドロキシ-3-フェニル-2,5-ジオキサビシクロ[2.2.1]ヘプタン[スキーム2の化合物15a]

無水ピリジン(2cm³)中のDMTCl(214mg、0.63mmol)を使用した化合物14a(108mg、0.49mmol)のジメトキシトリチル化、次いで一般的な後処理手順およびカラムクロマトグラフィーにより、化合物15aを白色固体物質(180mg、71%)として得た。R_f 0.31(CH₂Cl₂/MeOH 98:2, v/v); δ_H (CDCl₃) 7.66~7.21(14H, m)、6.84(4H, d, J 8.8)、5.19(1H, s)、4.29(1H, s)、4.13(1H, s)、4.07(1H, d, J 8.4)、4.01(1H, d, J 8.3)、3.78(6H, s)、3.55(1H, d, J 10.2)、3.50(1H, d, J 10.7)、2.73(1H, br s); δ_C (CDCl₃) 158.6、149.8、144.9、139.4、136.2、135.9、135.8、130.3、130.2、128.5、128.3、128.0、127.6、126.9、125.4、123.9、113.3、86.4、86.0、83.8、83.4、73.0、71.6、60.2、55.3; m/z(FAB) 525[M+H]⁺、524[M]⁺。

【0223】

(実施例15b)

(1R,3S,4R,7S)-1-(4,4'-ジメトキシトリチルオキシメチル)-3-(4-フルオロ-3-メチルフェニル)-7-ヒドロキシ-2,5-ジオキサビシクロ[2.2.1]ヘプタン[スキーム2の化合物15b]

無水ピリジン(2cm³)中のDMTCl(129mg、0.42mmol)を使用した化合物14b(95mg、0.38mmol)のジメトキシトリチル化、次いで一般的な後処理手順およびカラムクロマトグラフィーにより、化合物15bを白色固体物質(126mg、61%)として得た。R_f 0.32(CH₂Cl₂/MeOH 98:2, v/v); δ_H (CDCl₃) 7.53~7.15(11H, m)、6.97(1H, dd, J 8.7および8.9)、6.84(4H, d, J 8.8)、5.11(1H, s)、4.26(1H, d, J 3.9)、4.08(1H, s)、4.03(1H, d, J 8.0)、3.95(1H, d, J 8.0)、3.78(6H, s)、3.54(1H, d, J 10.5)、3.47(1H, d, J 10.1)、2.26(3H, d, J 1.5)、2.08(1H, br s); δ_C (CDCl₃) 160.8(d, J 244.1)、158.7、144.9、135.9、134.7、134.6、130.3、130.2、130.1、128.5、128.4、128.3、128.0、127.0、125.2、124.9、124.4、124.3、115.2、114.9、113.4、86.5、86.0、83.7、83.0、72.9、71.7、60.1、55.3、14.8(d, J 3.1); m/z(FAB) 556[M]⁺。

【0224】

(実施例15c)

1R,3S,4R,7S)-1-(4,4'-ジメトキシトリチルオキシメチル)-7-ヒドロキシ-3-(1-ナフチル)-2,5-ジオキサビシクロ[2.2.1]ヘプタン[スキーム2の化合物15c]

無水ピリジン(2cm³)中のDMTCl(170mg、0.5mmol)を使用した化合物14c(125mg、0.46mmol)のジメトキシトリチル化、次いで一般的な後処理手順およびカラムクロマトグラフィーにより、化合物15c(158mg、60%)を白色固体物質として得た。R_f 0.35(CH₂Cl₂/MeOH 98:2, v/v); δ_H (CDCl₃) 7.95~7.86(3H, m)、7.79(1H, d, J 8.3)、7.58~7.41(9H, m)、7.35~7.23(3H, m)、6.86(4H, d, J 8.8)、5.80(1H, s)、4.36(1H, s)、4.32(1H, d, J 6.5)、4.17(1H, d, J 8.3)、4.06(1H, d, J 8.0)、3.78(6H, s)、3.62~3.56(2H, m)、2.00(1H, d, J 6.6); δ_C (CDCl₃) 1

58.7、144.9、136.0、135.9、134.5、133.6、130.3、129.8、129.0、128.3、128.2、128.1、127.0、126.5、125.9、125.6、123.9、122.6、113.4、86.6、85.7、82.5、81.7、73.1、72.6、60.2、55.3; m/z (FAB)575[M+H]⁺、574[M]⁺。

【0225】

(実施例15d)

(1R,3S,4R,7S)-1-(4,4'-ジメトキシトリチルオキシメチル)-7-ヒドロキシ-3-(1-ピレニル)-2,5-ジオキサビシクロ[2.2.1]ヘプタン[スキーム2の化合物15d]

無水ピリジン(2cm³)中のDMTCl(140mg、0.42mmol)を使用した化合物14d(130mg、0.38mmol)のジメトキシトリチル化、次いで一般的な後処理手順およびカラムクロマトグラフィーにより、化合物15dを白色固体物質(147mg、61%)として得た。R_f 0.37(CH₂Cl₂/MeOH 98:2, v/v); δ_H (CDCl₃) 8.46(1H, d, J 8.0)、8.19~8.00(7H, m)、7.61(2H, dd, J 1.6および7.4)、7.48(4H, d, J 8.3)、7.35(2H, dd, J 7.2および7.5)、7.25(1H, m)、7.15(1H, m)、6.88(4H, d, J 9.0)、6.10(1H, s)、4.46(1H, s)、4.43(1H, br s)、4.25(1H, d, J 8.1)、4.12(1H, d, J 8.1)、3.79(6H, s)、3.71~3.63(2H, m)、2.22(1H, br s); δ_C (CDCl₃) 158.7、149.8、144.9、136.1、136.0、135.9、132.1、131.4、130.9、130.6、130.3、130.2、129.2、129.1、128.4、128.3、128.2、128.1、127.5、127.4、127.0、126.9、126.2、125.5、125.4、124.9、124.8、124.7、123.8、123.7、121.9、113.4、86.6、86.1、83.2、82.2、73.2、72.4、60.3、55.3; m/z (FAB)649[M+H]⁺、648[M]⁺。

【0226】

(実施例15e)

(1R,3S,4R,7S)-1-(4,4'-ジメトキシトリチルオキシメチル)-7-ヒドロキシ-3-(2,4,5-トリメチルフェニル)-2,5-ジオキサビシクロ[2.2.1]ヘプタン[スキーム2の化合物15e]

無水ピリジン(2cm³)中のDMTCl(113mg、0.33mmol)を使用した化合物14e(80mg、0.3mmol)のジメトキシトリチル化、次いで一般的な後処理手順およびカラムクロマトグラフィーにより、化合物15eを白色固体物質(134mg、78%)として得た。R_f 0.32(CH₂Cl₂/MeOH 98:2, v/v); δ_H (CDCl₃) 7.55(2H, d, J 7.9)、7.45~7.42(4H, m)、7.32~7.21(4H, m)、6.93(1H, s)、6.84(4H, d, J 8.2)、5.20(1H, s)、4.40(1H, s)、4.08(1H, s)、4.04(1H, d, J 8.3)、3.95(1H, d, J 8.2)、3.78(6H, s)、3.56(1H, d, J 10.5)、3.47(1H, d, J 10.2)、2.24(3H, s)、2.22(3H, s)、2.19(3H, s); δ_C (CDCl₃) 158.6、145.0、136.0、135.7、134.4、134.2、131.8、131.3、130.3、130.2、128.3、128.0、127.2、126.9、113.3、86.4、85.7、82.1、81.8、73.0、71.8、60.2、55.3、19.6、19.3、18.4; m/z (FAB)567[M+H]⁺、566[M]⁺。

【0227】

(実施例16)

スキーム2に示すホスホルアミダイト誘導体16aからeの一般的な合成手順

2-シアノエチルN,N'-ジイソプロピルホスホルアミドクロリダイトを無水CH₂Cl₂中のヌクレオシド15aからeとN,N'-ジイソプロピルエチルアミン(DIPEA)の攪拌溶液に室温で1滴ずつ加えた。混合物を室温で6時間攪拌した後、メタノール(0.2cm³)を加え、生じた混合物をEtOAc(20cm³、0.5%のEt₃N、v/vを含む)で希釈した。有機相をNaHCO₃飽和水溶液(2×10cm³)および塩水(10cm³)で連続的に洗浄した。分離された有機相を乾燥し(Na₂SO₄)、ろ過し、減圧下で蒸発乾固した。得られた残留物をカラムクロマトグラフィー[n-ヘキサン中の25から30%(v/v)EtOAc、0.5%のEt₃Nを含む]により精製してアミダイト16aからeを得た。

【0228】

(実施例16a)

(1R,3S,4R,7S)-7-[2-シアノエトキシ(ジイソプロピルアミノ)ホスフィンオキシ]-1-(4,4'-ジメトキシトリチルオキシメチル)-3-フェニル-2,5-ジオキサビシクロ[2.2.1]ヘプタン[スキーム2の化合物16a]の合成

DIPEA(0.4cm³)および無水CH₂Cl₂(2.0cm³)の存在下における、2-シアノエチルN,N'-ジイソプロピルホスホルアミドクロリダイト(85mg、0.36mmol)を用いた化合物15a(170mg、0.32mmol)の処理、次いで一般的な後処理手順およびカラムクロマトグラフィーにより、ホスホルアミダイト16aを白色固体物質(155mg、66%)として得た。R_f 0.45、0.41(CH₂Cl₂/MeOH

98:2, v/v); δ_p (CDCl₃) 149.3, 148.9。

【0229】

(実施例16b)

(1R,3S,4R,7S)-7-[2-シアノエトキシ(ジイソプロピルアミノ)ホスフィンオキシ]-1-(4,4'-ジメトキシトリチルオキシメチル)-3-(4-フルオロ-3-メチルフェニル)-2,5-ジオキサビシクロ[2.2.1]ヘプタン[スキーム2の化合物16b]の合成

DIPEA(0.3cm³)および無水CH₂Cl₂(2.0cm³)の存在下における、2-シアノエチルN,N'-ジイソプロピルホスホルアミドクロリダイト(53mg、0.22mmol)を用いた化合物15b(95mg、0.17mmol)の処理、次いで一般的な後処理手順およびカラムクロマトグラフィーにより、ホスホルアミダイト16bを白色固体物質(85mg、66%)として得た。R_f 0.45、0.41(CH₂Cl₂/MeOH 9 10
8:2, v/v); δ_p (CDCl₃) 149.3, 148.8。

【0230】

(実施例16c)

(1R,3S,4R,7S)-7-[2-シアノエトキシ(ジイソプロピルアミノ)ホスフィンオキシ]-1-(4,4'-ジメトキシトリチルオキシメチル)-3-(1-ナフチル)-2,5-ジオキサビシクロ[2.2.1]ヘプタン[スキーム2の化合物16c]の合成

DIPEA(0.4cm³)および無水CH₂Cl₂(2.0cm³)の存在下における、2-シアノエチルN,N'-ジイソプロピルホスホルアミドクロリダイト(75.7mg、0.32mmol)を用いた化合物5c(158mg、0.28mmol)の処理、次いで一般的な後処理手順およびカラムクロマトグラフィーにより、ホスホルアミダイト16cを白色固体物質(127mg、60%)として得た。R_f 0.47、0.44(CH₂Cl₂/MeOH 20
H 98:2, v/v); δ_p (CDCl₃) 149.2, 149.1。

【0231】

(実施例16d)

(1R,3S,4R,7S)-7-[2-シアノエトキシ(ジイソプロピルアミノ)ホスフィンオキシ]-1-(4,4'-ジメトキシトリチルオキシメチル)-3-(1-ピレニル)-2,5-ジオキサビシクロ[2.2.1]ヘプタン[スキーム2の化合物16d]の合成

DIPEA(0.3cm³)および無水CH₂Cl₂(2.0cm³)の存在下における、2-シアノエチルN,N'-ジイソプロピルホスホルアミドクロリダイト(64mg、0.27mmol)を用いた化合物15d(140mg、0.22mmol)の処理、次いで一般的な後処理手順およびカラムクロマトグラフィーにより、ホスホルアミダイト16dを白色固体物質(124mg、68%)として得た。R_f 0.51、0.47(CH₂Cl₂/MeOH 30
98:2, v/v); δ_p (CDCl₃) 149.4, 149.1。

【0232】

(実施例16e)

(1R,3S,4R,7S)-7-[2-シアノエトキシ(ジイソプロピルアミノ)ホスフィンオキシ]-1-(4,4'-ジメトキシトリチルオキシメチル)-3-(2,4,5-トリメチルフェニル)-2,5-ジオキサビシクロ[2.2.1]ヘプタン[スキーム2の化合物16e]の合成

DIPEA(0.3cm³)および無水CH₂Cl₂(2.0cm³)の存在下における、2-シアノエチルN,N'-ジイソプロピルホスホルアミドクロリダイト(64mg、0.27mmol)を用いた化合物15e(130mg、0.23mmol)の処理、次いで一般的な後処理手順およびカラムクロマトグラフィーにより、ホスホルアミダイト16eを白色固体物質(111mg、63%)として得た。R_f 0.44、0.42(CH₂Cl₂/MeOH 40
98:2, v/v); δ_p (CDCl₃) 149.0。

【0233】

(実施例17)

オリゴヌクレオチドの合成、脱保護および精製

すべてのオリゴマーは、CPG固体支持体(BioGenex)上、0.2molスケールで、Biosearch 8750 DNA合成機でホスホルアミダイト手法を使用して調製した。ホスホルアミダイト16aからc(カップリング時間10分)およびホスホルアミダイト16dと16e(カップリング時間20分)の段階的なカップリング効率は>96%であり、非修飾デオキシヌクレオシドおよびリボヌクレオシドホスホルアミダイト(標準のカップリング時間)では一般に>99%であり、すべての場合で1Hテトラゾールを活性剤として使用した。32%のアンモニア水溶液を使用して(12時 50

間、55℃)標準の脱保護および固体支持体からの切断を行った後、オリゴマーをエタノール沈殿により精製した。オリゴマーの組成をMALDI-MS分析で、純度を(>80%)をキャピラリーゲル電気泳動によって確認した。選択したMALDI-MSデータ([M-H]⁻;実測/計算:ON3 2731/2733、ON4 2857/2857、ON6 3094/3093)。

【0234】

(実施例18)

熱変性の調査

熱変性実験は、PTP-6ペルチエ温度プログラミング素子を取り付けたPerkin-Elmer UV/VIS分光光度計で、塩緩衝液(10mMのリン酸ナトリウム、100mMの塩化ナトリウム、0.1mMのEDTA、pH7.0)の媒体を使用して行った。修飾および非修飾オリゴヌクレオチドの吸光係数が同一であると仮定して、2本の相補的な鎖の濃度1.5mMを使用した。温度を1℃/分の速度で上昇させながら、吸光度を260nmでモニターした。2重鎖の融解温度(T_m値)は、得られた融解曲線の1次導関数の最大値として決定した。

【0235】

(実施例19)

化合物16aから16eおよびモノマー17aから17eを含むオリゴマーの合成

誘導体17aから17e(図1、表1、スキーム1、スキーム2)を含むLNAを合成し、これらはすべて、locked C3'-エンドRNA様フラノースの立体配座をとることで知られているLNA型2'-O,4'-C-メチレン-β-D-リボフラノシル部分に基づいている[S.Obika、D.Nanbu、Y.Hari、K.Morio、Y.In、T.Ishida、およびT.Imanishi、Tetrahedron Lett.、1997、38、8735;S.K.Singh、P.Nielsen、A.A.KoshkinおよびJ.Wengel、Chem.Commun.、1998、455;A.A.Koshkin、S.K.Singh、P.Nielsen、V.K.Rajwanshi、R.Kumar、M.Meldgaard、C.E.OlsenおよびJ.Wengel、Tetrahedron、1998、54、3607;S.Obika、D.Nanbu、Y.Hari、J.Andoh、K.Morio、T.DoiおよびT.Imanishi、Tetrahedron Lett.、1998、39、5401]。LNA型アリールC-グリコシド17aから17eの取り込みに適しているホスホルアミダイト構築ブロック16aから16eの合成は、スキーム1およびスキーム2に示されており、実験セクションで詳述されている。適切な合成経路の設計において、最近文献に記載された反応に類似の反応を利用することに決めた。したがって、アルデヒド11(スキーム2)の2つのp-メトキシベンジル基ではなく、2つのO-ベンジル基を有する、アルデヒド11(スキーム2)に対応するアルデヒドのカルボニル基に対する様々な複素環のグリニャール試薬の立体選択的な攻撃により、locked-C-ヌクレオシドが供給されることが報告されている[S.Obika、Y.Hari、K.MorioおよびT.Imanishi、Tetrahedron Lett.、2000、41、215;S.Obika、Y.Hari、K.MorioおよびT.Imanishi、Tetrahedron Lett.、2000、41、221]。本発明で選択した合成経路の主要な中間体、すなわち新規アルデヒド11は、2つの異なる経路に従って、既知のフラノシド1から合成した[R.Yamaguchi、T.Imanishi、S.Kohgo、H.HorieおよびH.Ohrui、Biosci.Biotechnol.Biochem.、1999、63、736]。一般に、その後の段階(すなわち13→14)でのベンジル保護の除去によっても、例えば化合物13および14(スキーム2)内に存在するベンジルのO-C結合の切断が生じる可能性があるため、O-ベンジル保護ではなくO-(p-メトキシ)ベンジル保護が望ましい。アルデヒド11を得る一経路では、フラノシド1の位置選択的なp-メトキシベンジル化、次いでメシル化およびメタノリシスにより、メチルフラノシド9のアノマー混合物が得られた。塩基で誘起した環状化、次いでアセチル加水分解により、1(スキーム1およびスキーム2)から約24%の全収率でアルデヒド11が得られた。この収率は、異なる戦略に従った場合に比べて向上していた。したがって、1のジ-O-メシル化、次いでメタノリシスおよび塩基で誘起した2-OH基からの分子内求核攻撃により、環状化したメチルフラノシド4のアノマー混合物が得られた。4の残りのメシルオキシ基を酢酸基で置換し、次いで脱アセチル化、p-メトキシベンジル化、その後アセチル加水分解することにより、所要のアルデヒド11(スキーム1)が得られた。

【0236】

アルデヒド11を様々なアリールグリニャール試薬とカップリングすることにより、化合物12aからeのそれぞれの1種のエピマーが良好な収率で選択的に得られた(これのさらなる

10

20

30

40

50

詳細および他の合成工程については、実験項を参照のこと)。ジオール12aからeのそれぞれをMitsunobu条件下(TMAD、PBU₃)で環状化して、2環式のβ-C-ヌクレオシド誘導体13aからeを得た。p-メトキシベンジル保護の酸化的除去は、DDQを使用して十分な収率で達成された。続いて、選択的な4,4'-ジメトキシトリチル化(化合物15aからeを得る)、次いでリン酸化により、ホスホルアミダイト構築ブロック16aからeが十分な収率で得られた。化合物13の立体配置、ならびにこれにより化合物11、12および14から17の立体配置は、NOE実験を含めた¹H NMR分光法に基づいて割り当てた。

【0237】

すべてのオリゴマーは、0.2molスケールで、ホスホルアミダイト手法を使用して調製した。ホスホルアミダイト16aからc(カップリング時間10分)およびホスホルアミダイト16dと16e(カップリング時間20分)の段階的なカップリング効率は>96%であり、非修飾デオキシヌクレオシドおよびリボヌクレオシドホスホルアミダイト(標準のカップリング時間)では一般に>99%であり、すべての場合で1Hテトラゾールを活性剤として使用した。32%のアンモニア水溶液を使用して(12時間、55℃)標準の脱保護および固体支持体からの切断を行った後、オリゴマーをエタノール沈殿により精製した。オリゴマーの組成をMALDI-MS分析で、純度を(>80%)をキャピラリーゲル電気泳動によって確認した。

10

【0238】

(実施例20)

ハイブリダイゼーション特性を評価するための熱変性調査

中心塩基が4種の天然塩基のそれぞれである4種の9量体DNA標的に対する、オリゴヌクレオチドON1からON11(以下の表1)のハイブリダイゼーションを、熱変性実験によって調査した(T_mの測定;詳細は実験セクションを参照のこと)。参照DNAのON1と比較すると、1種の非塩基性LNAモノマーAb^Lの導入(ON2)によって、0℃より高い温度で安定な2重鎖の形成が阻止されることが、以前に報告されている(対向塩基としてアデニンのみでしか評価していない)[L.KvaernoおよびJ.Wengel、Chem.Commun.、1999、657]。フェニルモノマー17a(ON3)では、5から12℃の範囲のT_m値が観察された。このように、フェニル部分はAb^Lと比較して2重鎖を安定化させるが、相補性標的鎖内の中心アデニン塩基に対して優先度が示されていることから(表1)、万能的なハイブリダイゼーションは達成されていない。さらに、ON1:参照DNA2重鎖と比較して有意な不安定化が観察された。ON3と同配列であるが中心モノマーとして17aの代わりに17b、17cまたは17eを含むオリゴマー(表1、それぞれON7、ON8およびON9)では、ON3で得られた結果と類似の結果が得られた。

20

30

【0239】

【表 1】

表1 中央位置における4つの天然塩基のそれぞれを含むDNA相補配列に対するON1～ON11の熱変性実験(T_m 値を示す)^a

DNA標的:3'-d(CACTYTACG)		Y:	A	C	G	T
ON1	5'-d(GTGATATGC)		28	11	12	19
ON2	5'-d(GTGAAb ^L ATGC)		< 3	n.d.	n.d.	n.d.
ON3	5'-d(GTGA17aATGC)		12	5	6	7
ON4	5'-d(GTGA17dATGC)		18	17	18	19
ON5	5'-d[2'-OMe(GTGATATGC)]		35	14	19	21
ON6	5'-d[2'-OMe(GT ^L GA17dAT ^L GC)]		39	38	37	40
ON7	5'-d(GTGA17bATGC)		15	7	6	8
ON8	5'-d(GTGA17cATGC)		15	7	6	9
ON9	5'-d(GTGA17eATGC)		13	6	6	7
ON10	5'-d[2'-OMe(GT ^L GA17bAT ^L GC)]		31	25	26	27
ON11	5'-d[2'-OMe(GT ^L GA17cAT ^L GC)]		34	27	27	32

^a 濃度各1.5 μ M 2つの鎖を用いて培地塩類緩衝液(10mMリン酸ナトリウム、100mM塩化ナトリウム、0.1mM EDTA、pH7.0)中で記録された融解曲線(A_{260} 対温度)の一次導関数の最大値として測定した融解温度(T_m 値/°C);A=アデニンモノマー、C=シトシンモノマー、G=グアニンモノマー、T=チミンモノマー;T^L、Ab^Lおよび17a～17eの構造については図1および/またはスキーム2を参照のこと。DNA配列はd(配列)として、2'-OMe-RNA配列は2'-OMe((配列))として示す。「n.d.」は「測定されず」を意味する。ON1について報告したデータは以前に報告されたものである[A.A.Koshkin, S.K.Singh, P.Nielsen, V.K.Rajwanshi, R.Kumar, M.Meldgaard, C.E.Olsen, J.Wengel, Tetrahedron, 1998, 54, 3607頁]。ON2について報告したデータは以前に報告されたものである[L.Kvaerno, J.Wengel, Chem.Comm un., 1999, 657頁]。

【0240】

ピレンLNAヌクレオチド17d(ON4内)は、より優れた特性を示している(表1)。第1に、4種の相補体すべてに対する結合親和性がON3(17aを含む)と比較して増加している。第2に、4つの T_m 値がすべて17から19°Cの中にあることから示されるように、万能的なハイブリダイゼーションが観察される。万能的なハイブリダイゼーションに関しては、17dはこのようにピレンDNA誘導体Pyに類似しているが[T.J.MatrayおよびE.T.Kool, J.Am.Chem.Soc., 1998, 120, 6191]、ON1:参照DNAと比較した場合の熱安定性の低下は、Py(12量体のポリピリミジンDNA配列中で $\sim 5^\circ\text{C}$)で報告されているものよりも17d($\sim 10^\circ\text{C}$)でより顕著である[T.J.MatrayおよびE.T.Kool, J.Am.Chem.Soc., 1998, 120, 6191]。したがって、ピレン部分によるスタッキング(またはインターカレーション)は17dのフラノース環の立体配座的な制限に好ましくないと考えられるが、ON2、ON3およびON4の熱安定性を比較することにより、ヘリックス内のピレン部分の相互作用が強く示されている。

【0241】

RNA標的[3'-r(CACUAUACG)]に対して測定した場合、ON3の T_m 値(上述の実験と同一の実験条件を使用した)は11.9°Cであり、ON4の T_m 値は12.7°Cであった。オリゴマーON7、ON8およびON9(表1)では、対応する T_m 値はそれぞれ11.7、8.8および10.2°Cであった。

【0242】

(実施例21)

RNA様鎖におけるピレンLNAユニットの影響

ON5、ON6、ON10およびON11(上記表1参照)を合成した。前者は完全に2'-OMe-RNAモノマーからなっており、後者3つは6個の2'-OMe-RNAモノマー(図1参照)、2個のLNAチミンモノマーT^L(図1参照)、および1個の中心LNAピレンモノマー17d(オリゴマーON6)または1個の中

10

20

30

40

50

心モノマー17b(ON10)もしくは17c(ON11)からなっている。ON6に対応するが3個の T^L モノマーを有する配列が、非常に高い熱安定性の相補DNAと2重鎖を形成することが以前に示されている。したがってON6は、高親和性モノマーを万能塩基の周りに導入した際の影響を評価するのに適している。表1で見られるように、2'-OMe-RNAの参照ON5は、熱安定性がわずかに増加し、かつワトソン-クリックの識別が保存されて(参照DNAのON1と比較して)、DNA相補体と結合する。実際、LNA/2'-OMe-RNAキメラON6は、4つの T_m 値(37、38、39および40℃)から明らかになったように、万能的なハイブリダイゼーションの挙動を示す。ON6で得られた4つの T_m 値はすべて、2つの完全に相補的な参照2重鎖ON1:DNA(T_m =28℃)およびON5:DNA(T_m =35℃)で得られた T_m 値より高い。

【0243】

これら新規のデータは、ピレンLNAモノマー17dがDNA環境(context)(ON4)およびRNA様環境(ON6)のどちらでも万能的なハイブリダイゼーションの挙動を示し、また、万能的なハイブリダイゼーションプロープにおける親和性の低下の問題は、高親和性モノマー、例えば2'-OMeRNAおよび/またはLNAモノマーを導入することによって解決できることを実証している。ON10およびON11でそれぞれON7およびON8より増加した親和性が得られたが、相補性標的鎖内の中心アデニン塩基に対して優先度が示されていることから(上記表1)、万能的なハイブリダイゼーションは達成されていない。

【0244】

(実施例22)

ハイブリダイゼーションプロープにおける塩基対合の選択性

塩基対合の選択性を決定するために、ON6(表2)を用いた系統的な熱変性調査を行った。上記表1に示した調査で使用した4種のDNA相補体(DNA標的鎖、モノマーY=A、C、GまたはT)のそれぞれについて、中心ピレンLNAモノマー17dを含むON6を、ON6の3'末端側の隣接位置に4種の塩基の組合せがあるものすべて(DNA標的鎖、モノマーZ=A、C、GまたはT、モノマーX=T)、および同様にON6の5'末端側にあるもの(DNA標的鎖、モノマーX=A、C、GまたはT、モノマーZ=T)とハイブリダイズさせた。4つのデータポイントの8つのサブセットすべてで、一致したものと3つのミスマッチとの間で十分から優れたワトソン-クリック識別が観察された(以下の表2、 ΔT_m 値は5から25℃の範囲内である)。

【0245】

10

20

【表 2】

表2 2'-OMe-RNA/LNAキメラON6における万能的ピレンLNAモノマー17dに隣接する塩基の塩基対合選択性を評価するための熱変性実験(T_m 値を示す)。標的鎖[3'-d(CAC-XYZ-ACG)]においては、中央3塩基XYZは4天然塩基のそれぞれが異なっている^a。

5'-[2'-OMe(GT ^L G-A17dA-T ^L GC)] 3'-d(CAC-XYZ-ACG)							
XYZ	$T_m/^\circ\text{C}$	XYZ	$T_m/^\circ\text{C}$	XYZ	$T_m/^\circ\text{C}$	XYZ	$T_m/^\circ\text{C}$
TAA	26	TCA	22	TGA	22	TTA	29
TAC	26	TCC	29	TGC	26	TTG	31
TAG	24	TCG	24	TGG	30	TTC	32
TAT	39	TCT	38	TGT	37	TTT	40
AAT	18	ACT	27	AGT	22	ATT	28
CAT	30	CCT	31	CGT	27	CTT	35
GAT	14	GCT	28	GGT	16	GTT	27
TAT	39	TCT	38	TGT	37	TTT	40

^a 略語および用いた条件については表1の下の説明文を参照のこと。一致した隣接塩基(X=Z=T)のデータは太字で示す。

【0246】

本明細書中で報告する結果は、万能的なハイブリダイゼーション用のプローブの設計におけるいくつかの重要な意味合いを有する。(1)ピレンLNAユニットについて実証されたように、立体配座が制限されたユニットで万能的なハイブリダイゼーションが可能である。(2)万能的なハイブリダイゼーションの挙動は、RNA環境中で実現可能である。(3)高親和性モノマーを導入することによって、万能的なハイブリダイゼーションおよび万能塩基に隣接する塩基の塩基対合選択性を弱めることなく、万能的なハイブリダイゼーション用の

【0247】

本明細書中で報告した結果に基づいて、様々な主鎖に付着しているピレンおよび他の既知の万能塩基を含むキメラオリゴヌクレオチド(例えばLNA型ユニット、リボフラノースユニット、デオキシリボースユニット、または2'-OMe-RNA/LNAキメラオリゴ内のキシロースユニットなど他の糖ユニット)も同様に、万能的なハイブリダイゼーションの挙動に関して魅力的な特性を示すであろう。例は、2'-OMe-RNA/LNAオリゴON6と同一であるが、17dモノマーがピレニル-2'-OMe-リボヌクレオチドモノマーで置換されたオリゴマーである。

【0248】

(実施例23)

キメラオリゴヌクレオチド

これらのキメラオリゴヌクレオチドは、様々な主鎖に付着しているピレンおよび他の既知の万能塩基(例えばLNA型ユニット、リボフラノースユニット、またはデオキシリボースユニット、あるいは2'-OMe-RNA/LNAオリゴ内のキシロースユニットなど他の糖ユニット)からなっている。これらキメラオリゴヌクレオチドを用いた実験は、Py^Lをピレニル-2'-OMe-リボヌクレオチドモノマーで置換することによって2'-OMe-RNA/LNAオリゴON6に類似の結果が得られることの可能性を評価するためである。

【0249】

(実施例24)

ピレン-LNA-アンカーオリゴ(T)プライミング(T-20VNアンカープライマー)を使用した、

改良した逆転写

真核細胞由来の無処置のmRNAを単離し、次いでポリ(A)+mRNAを2本鎖の相補DNA(cDNA)に変換することは、例えばノーザンブロット分析または発現マイクロアッセイを使用したRT-PCR、完全長cDNAのクローニングおよび配列決定、発現クローニング、EST配列決定、ならびに発現プロファイル作成を含めたいくつかの分子生物学的な用途に重要な手段である。ほとんどの真核細胞mRNAは、その3'末端にいわゆるポリ(A)テールを形成するポリアデニル酸ユニット域(tract)を有する。mRNAの単離は、ポリ(A)テールが高塩基濃度条件下で、オリゴ(dT)セルロースなどの基質上に結合されたオリゴ-dTと安定なdT-A塩基対を形成する能力に依存している。ポリアデニル化されたmRNAは、オリゴ(dT)セルロースを充填したカラムでのアフィニティークロマトグラフィーで、バッチ結合および溶出によって、またはオリゴ(dT)をコーティングした磁気粒子に結合させることによって、全RNA調製物から選択することができる。基質または粒子の洗浄に次いで、TE緩衝液またはジエチルピロカルボネートで処理した水を用いてポリ(A)+RNAを溶出させる。第1鎖cDNAは、RNA依存性DNAポリメラーゼ、いわゆる逆転写酵素(RT)によって、ポリ(A)+RNAを鋳型として使用し、典型的にはオリゴ(dT)オリゴヌクレオチドをプライマーとして使用して合成する。

10

20

30

40

50

【0250】

本方法は、第1鎖cDNAの合成にピレン-LNAアンカーオリゴ(T)オリゴヌクレオチドプライマーを使用して、真核細胞mRNAの改良された逆転写をもたらすことを記載している。この方法は、逆転写で標準のDNAオリゴ(dT)プライマーを使用する際に観察される3つの問題に対処している。それらは、(i)短いポリ(A)テールを有する真核細胞mRNAでの効率的なプライマー処理、(ii)改良されたT20-VNアンカープライマーをもたらし、したがって長いポリ(A)域の逆転写が回避される、ピレン-LNAおよびLNA-C/G/Tユニットによるオリゴ(T)プライマーの効率的なアンカリング、ならびに(iii)特異性の増大による、全RNA抽出物から直接の、真核細胞ポリ(A)+RNAの改良された逆転写である。

【0251】

(実施例24a)

第1鎖cDNAの合成における、ピレン-LNA-アンカーオリゴ(T)₂₀(T-20-VNアンカープライマー)を使用した、改良した逆転写

【0252】

【表3】

表3.ポリ(A)+RNAの逆転写用のピレンアンカーオリゴ(T)プライマー(「17d」は化合物17dを指す)

オリゴ名:	配列
ON12	5'-T ^L TT ^L TT ^L TT ^L TT ^L TT ^L TT ^L TT ^L TT ^L TT ^L TV ^L 17d-3'
ON13	5'-TT ^L TTT ^L TTT ^L TTT ^L TTT ^L TTT ^L TTT ^L TTV ^L 17d-3'
ON14	5'-d[2'-OMe(T ^L TT ^L TT ^L TT ^L TT ^L TT ^L TT ^L TT ^L TT ^L TT ^L TV ^L 17d)]-3'
ON15	5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTV ^L 17d-3'

V=AまたはCまたはG

【0253】

RNaseを含まない微量遠心管で以下を混合する。

A. 全RNA鋳型

10から20mgの全RNA

5mgの本発明のアンカーオリゴ(T)プライマー(ON12またはON13またはON14またはON15、

表3)

DEPC水、最終体積12mlまで

あるいは

B. ポリ(A)+RNA鋳型

1から5mgのポリ(A)+RNA

5mgの本発明のアンカーオリゴ(dT)プライマー(ON12またはON13またはON14またはON15、表3)

DEPC水、最終体積12mlまで

【0254】

反応混合物を70℃で10分間加熱し、氷上で2から5分間急冷し、20秒間スピンし(Picofuge)、1mlのSuperscript(RNase阻害剤、20U/ml、Ambion、米国)、4mlの5×RTase緩衝液(Invitrogen、米国)、2mlの0.1M DTT(Invitrogen、米国)、1mlのdNTP(10mMのdATP、dGTP、dTTP、dCTP、Pharmacia)を加える。

【0255】

1mlのSuperscript II RTase(Invitrogen、米国、200U/ml)を加え、よく混合する(気泡が生じないように)。45℃で1時間インキュベートする。さらに1mlのSuperscript II RTaseを加え、45℃でさらに1時間インキュベーションを続け、70℃で5分間加熱し、氷上で2分間急冷する。

【0256】

第1鎖cDNA試料は、使用時まで-20℃で保存することができる。

【0257】

微量遠心管を氷上に2分間置き、その後、以下のように、MicroSpin S-400 HRカラムを使用したゲルろ過によってcDNA調製物を精製する。カラムを1.5mlの遠心管(Ole Dichエッペンドルフ微量遠心プログラム#30)中で1分間、735×gでプレスピンし、カラムを新しい1.5mlの遠心管に入れ、mRNA::cDNA試料を樹脂の上部中心にゆっくりと載せ、735×gで2分間スピンし、溶出物を回収し、体積を確認する。すぐに第2鎖の合成を続ける。

【0258】

(実施例24b)

逆転写における、ピレン-LNA-アンカーオリゴ(T)20プライマーを使用した、トレハロースで刺激する第1鎖cDNAの改良した合成

【0259】

【表4】

オリゴ名:	配列
ON12	5'-T ^L TT ^L TT ^L TT ^L TT ^L TT ^L TT ^L TT ^L TT ^L TV ^L 17d-3'
ON13	5'-TT ^L TTT ^L TTT ^L TTT ^L TTT ^L TTT ^L TTV ^L 17d-3'
ON14	5'-d[2'-OMe(T ^L TT ^L TT ^L TT ^L TT ^L TT ^L TT ^L TT ^L TV ^L 17d)]-3'
ON15	5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTV ^L 17d-3'

V=AまたはCまたはG

【0260】

RNaseを含まない、事前にシリコン処理した0.5mlのPCR管(Ambion)で以下を混合する。

A. 全RNA鋳型

10から20mgの全RNA

5mgの本発明のオリゴ(T)プライマー(ON12またはON13またはON14またはON15、表3)

DEPC水、最終体積9mlまで

あるいは

B. ポリ(A)+RNA鋳型

1から5mgのポリ(A)+RNA

5mgの本発明のアンカーオリゴ(dT)プライマー(ON12またはON13またはON14またはON15、表3)

DEPC水、最終体積9mlまで。

【0261】

反応混合物を+70℃で10分間加熱し、氷上で5分間急冷し、20秒間スピンし(Picofuge)、1mlのSuperscript(RNase阻害剤、20U/ml、Ambion、米国)、10mlの5×RTase緩衝液(Invitrogen、米国)、5mlの0.1M DTT(Invitrogen、米国)、5mlの10mM dNTP(Pharmacia、DEPC-DDIW中)、15mlの80%トレハロース(DEPC-DDIW中、使用前に加熱して溶かす)を加える。

【0262】

5mlのSuperscript II RTase(BRL、200U/ml)を加え、よく混合し(気泡が生じないように)、その後すぐに管を高温用蓋を備えたサーマルサイクラー(例えばMJ Research DNA Engine)上に置く。あるいは、同時に第1鎖の反応混合物からトレハロースを省くことによって、Tthポリメラーゼ(Roche、米国)やTflポリメラーゼ(Promega、米国)など耐熱性の逆転写酵素を製造者の指示に従って使用する。以下のプログラムを使用して第1鎖cDNAを合成する。

10

【0263】

ステップ1:+45℃、2分間(ホットスタート)
 ステップ2:降温:1分間で35℃まで下げる(勾配アニーリング)
 ステップ3:35℃、2分間(完全なアニーリング)
 ステップ4:45℃、5分間
 ステップ5:昇温:+0.1℃/秒で+15℃(60℃まで)
 ステップ6:55℃、2分間
 ステップ7:60℃、2分間
 ステップ8:さらに10回ステップ6へ進む
 ステップ9:+4℃、同様

20

【0264】

PCR管を氷上に2分間置き、その後、以下のように、MicroSpin S-400 HRカラム(Pharmacia、米国)を使用したゲルろ過によって取り込まれなかったdNTPを除去する。カラムを1.5mlの遠心管中で1分間、735×gでプレスピンし、カラムを新しい1.5mlの遠心管に入れ、mRNA::cDNA試料を樹脂の上部中心にゆっくりと載せ、735×gで2分間スピンし、溶出物を回収し、体積を確認する。すぐに第2鎖の合成、PCR、または他の処理を続ける。

【0265】

(実施例24c)

ピレン-LNA-アンカーオリゴ(T)20プライマーを使用した、第1鎖cDNAの改良した蛍光色素標識化

30

【0266】

【表5】

表4.第1鎖cDNAを蛍光色素標識するためのピレンアンカーオリゴ(T)プライマー

オリゴ名:	配列
ON12	5'-T ^L T ^L T ^L T ^L T ^L T ^L T ^L T ^L T ^L T ^L T ^L T ^L T ^L T ^L T ^L T ^L T ^L T ^L T ^L T ^L T ^L TV ^L 17d-3'
ON13	5'-T ^L T ^L T ^L T ^L T ^L T ^L T ^L T ^L T ^L T ^L T ^L T ^L T ^L T ^L T ^L T ^L T ^L T ^L T ^L T ^L T ^L TV ^L 17d-3'
ON14	5'-d[2'-OMe(T ^L T ^L T ^L T ^L T ^L T ^L T ^L T ^L T ^L T ^L T ^L T ^L T ^L T ^L T ^L T ^L T ^L T ^L T ^L TV ^L 17d)]-3'
ON15	5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTV ^L 17d-3'

40

V=AまたはCまたはG

【0267】

RNaseを含まない微量遠心管で以下を混合する。

A.全RNA鋳型

10から20mgの全RNA

5mgの本発明のアンカーオリゴ(T)プライマー(ON12またはON13またはON14またはON15、表4)

DEPC水、最終体積8mlまで

50

あるいは

B. ポリ (A)+RNA 鋳型

1mgのポリ (A)+RNA

5mgの本発明のアンカーオリゴ (T) プライマー (ON12またはON13またはON14またはON15、表4)

DEPC水、最終体積8mlまで。

【0268】

反応混合物を70℃で10分間加熱し、氷上で2から5分間急冷し、20秒間スピンし (Picofuge)、1mlのSupersasin (RNase阻害剤、20U/ml、Ambion、米国)、4mlの5×RTase緩衝液 (Invitrogen、米国)、2mlの0.1M DTT (Invitrogen、米国)、1mlのdNTP (20mMのdATP、dGTP、dTTP、4mMのdCTP、Pharmacia)、3mlのCy3-dCTPまたはCy5-dCTP (Amersham、米国)を加える。 10

【0269】

1mlのSuperscript II RTase (Invitrogen、米国、200U/ml)を加え、よく混合する (気泡が生じないように)。42℃で1時間インキュベートする。さらに1mlのSuperscript II RTaseを加え、42℃でさらに1時間インキュベーションを続け、70℃で5分間加熱し、氷上で2分間急冷する。標識した第1鎖cDNA試料は、使用時まで-20℃の暗所で保存することができる。

【0270】

以下のように、MicroSpin S-400 HRカラムを使用したゲルろ過によって取り込まれなかったCy-dCTPを除去する。カラムを1.5mlの遠心管中で1分間、1500×gでプレスピンし、カラムを新しい1.5mlの遠心管に入れ、標識したcDNA試料を樹脂の上部中心にゆっくりと載せ、1500×gで2分間スピンし、RNA加水分解を続ける。 20

【0271】

3mlの0.5M NaOHを加え、よく混合し、70℃で15分間インキュベートすることによってRNAを分解し、3mlの0.5M HClを加えてよく混合することによって中和する。中和した試料に450mlの1×TE、pH7.5を加え、Microcon-30濃縮器 (使用前に、残留グリセロールを除去するためにカラムに500mlの1×TEを通してスピンする) 上に移す。微量遠心機で試料を14000×gで、12から14分間スピンし、体積を確認する。体積が5mlに減るまで続ける。Microcon-30管を反転し、1000×gで3分間スピンすることによって標識したcDNAプローブを溶出させ、Microconフィルターを調べて適切に溶出されたことを確認する。Cy3/Cy5で標識したcDNA試料を1本の管 (容量10ml) に合わせ、その後、3.75mlの20×SSC (最終3×SSC、微粒子を除去するために使用前に0.22mのフィルターに通す) 酵母tRNA (最終1mg/ml) 0.625mlの1M HEPES、pH7.0 (最終25mM、微粒子を除去するために使用前に0.22mのフィルターに通す) 0.75mlの10% SDS (最終0.3%) 最終体積25mlまでのDEPC-DIWを加える。 30

【0272】

標識したcDNA標的試料をMilliporeの0.22ミクロンのスピンカラム (Ultrafree-MC、カタログ番号UFC30HV25) でろ過する。まず、DEPCで処理した水20ulでフィルターを湿らせ、1分間スピンし、プローブを加える前に水を除去する。反応を100℃で2から5分間インキュベートする。微量遠心機内で、最高速度でスピンすることによって2から5分間室温で冷ます。Lifter-Slip (Erie Scientific、米国) の下でこれを調製したマイクロアレイに載せる。20から30mlの3×SSCを、スライドチャンバの両端に加える。水密のハイブリダイゼーションチャンバ (例えばDieTech、米国) 内に密閉し、65℃で16から18時間インキュベートする。 40

【0273】

(実施例25)

縮重ピレン-LNA-修飾PCRプライマーを使用したタンパク質および酵素ファミリーのスクリーニングおよびクローニング

ほとんどのタンパク質および酵素は、その一次配列に基づいて、限られた数のファミリーに分類することができる。ある特定のファミリーに属するタンパク質またはタンパク質ドメインは、一般に機能性質を共有しており、共通の祖先から派生している。タンパク質 50

配列のファミリーを調査する際、進化の間に一部の領域が他の領域よりもよく保存されていることは明らかである。一般にこれらの領域は、タンパク質の機能および/またはその三次元構造の維持に重要である。このような類似配列群の定常および可変特性を分析することによって、所定のタンパク質ファミリーまたはドメインに、そのメンバーに関連しない他のすべてのタンパク質から識別するシグネチャーを導くことが可能である。新しく同定かつ配列決定されたタンパク質を特定のタンパク質または酵素ファミリーに割り当てるためにシグネチャー配列を使用することができるが、これらの保存されたシグネチャーはまた、原核生物、古細菌および真核生物の幅広い様々な種において関連するタンパク質または酵素についてスクリーニングするのに使用できる、縮重オリゴヌクレオチドプローブの設計において非常に有用な基礎を形成する。

10

【0274】

本方法は、タンパク質および酵素ファミリー内の保存されたシグネチャー配列のポリメラーゼ連鎖反応によるスクリーニングにおける、縮重ピレン-LNA修飾オリゴヌクレオチドプライマーの使用を記載する。本発明の同定されたPCR断片を使用して、完全なタンパク質および酵素の配列をコードしている、対応する完全長cDNAまたは遺伝子を得ることができる。細菌、古細菌、および真菌中のグリコヒドロラーゼファミリー45遺伝子をPCRスクリーニングするための本方法の使用例を以下に示す。本方法は、複数のアミノ酸配列アラインメントデータ(2つ以上の配列エントリー)が入手可能である、所定のタンパク質または酵素ファミリー内の任意の保存されたシグネチャー配列の検出に適用することができる。以下に、Wellcome Trust Sanger Institute、Wellcome Trust Genome Campus、Hinxton、Cambs、CB10 1SA、UK(ウェブアドレス:http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/browse/top_twenty.shtml)が公開しているPfam Protein family database of alignments and Hidden Markov Modelsにある入手可能な複数のアラインメントデータが、ピレン-LNA修飾縮重オリゴヌクレオチドプローブまたはPCRプライマーを設計するための保存されたシグネチャー配列の存在を実証する、9つの例を記載する。

20

- 1.レトロウイルスアスのパルチルプロテアーゼ(登録番号PF00077)
- 2.例えばラットmapキナーゼerk2など真核細胞タンパク質キナーゼ内のタンパク質キナーゼドメイン(登録番号PF00069)
- 3.C型肝炎ウイルスの非構造的なタンパク質キナーゼE2/NS1(登録番号PF01560)
- 4.古細菌のATPase(登録番号PF01637)
- 5.ホメオボックスに関連するロイシンジッパー(PF02183)
- 6.アポトーシス阻止タンパク質(PF02331)
- 7.DNA修復タンパク質キナーゼrad10(PF03834)
- 8.グリコヒドロラーゼファミリー11(PF00457)
- 9.グリコヒドロラーゼファミリー12(PF01670)

30

【0275】

(実施例25a)

ピレン-LNA修飾縮重オリゴヌクレオチドプライマーを使用した、細菌、古細菌および真菌由来のグリコヒドロラーゼファミリー45遺伝子のPCRスクリーニング

- 1A.グリコヒドロラーゼファミリー45中の保存されたシグネチャーアミノ酸配列に対応するピレン-LNA修飾縮重PCRプライマーの設計

40

グリコヒドロラーゼファミリー45に属する酵素配列を表す、Pfam Protein family database of alignments and Hidden Markov Models(ウェブアドレス:http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/browse/top_twenty.shtml)の30エントリーの複数の配列アラインメントを使用して、この酵素ファミリー内の2つの高度に保存されている領域を特定した。これらのシグネチャー配列を、細菌、古細菌および真菌などの生物試料でグリコヒドロラーゼファミリー45遺伝子をスクリーニングするためのオリゴヌクレオチドプライマーを含む2つの縮重ピレン-LNAの設計における基礎として使用した。

【0276】

シグネチャー配列Iおよび対応する縮重オリゴヌクレオチド配列(配列番号1から3)。

50

【0277】

【表6】

NH ₂ -Thr	Arg	Tyr	Trp	Asp	Cys	Cys	Lys-COOH
5'-ACN	CGN	TAC	TGG	GAC	TGC	TGC	AA-3'
	AGA	T		T	T	T	
	G						

【0278】

シグネチャー配列IIおよび対応する縮重オリゴヌクレオチド配列(配列番号4から9)。

10

【0279】

【表7】

NH ₂ -Cys	Tyr	Glu/Asp/Gln	Leu	Thr	Phe	Thr-COOH
5'-TGC	TAC	GAA	CTN	ACN	TTC	CAN-3'
T	T	G	TTA		T	
		C	G			
		T				
		CAA				
			G			

20

【0280】

【表8】

表5.グリコヒドロラーゼファミリー45中の保存されたシグネチャーアミノ酸配列に対応するピレン-LNA修飾縮重PCRプライマー

オリゴ名:	配列
ON16	5'-AC ^L 17d17dG17dTA ^L 17dTGGA ^L 17dTG ^L 17dTG ^L 17dAA-3'
ON17	5'-d[2'-OMe(AC ^L 17d17dG17dTA ^L 17dTGGA ^L 17dTG ^L 17dTG ^L 17dAA)]-3'
ON18	5'-AC17d17dG17dTA ^L 17dTGGA17dTG ^L 17dTG17dAA-3'
ON19REV	5'-GT ^L 17dAA ^L 17dGT ^L 17dA ^L 17d17dT ^L 17d17dTA ^L 17dCA-3'
ON20REV	5'-d[2'-OMe(GT ^L 17dAA ^L 17dGT ^L 17dA ^L 17d17dT ^L 17d17dTA ^L 17dCA)]-3'
ON21REV	5'-GT17dAA ^L 17dGT ^L 17dA ^L 17d17dT ^L 17d17dTA17dCA-3'

30

N=AまたはCまたはGまたはT

【0281】

1B.ゲノムDNAの単離

DNeasy Tissue KitまたはDNeasy Plant Kitを使用して製造者の指示に従って(Qiagen、米国)、あるいはFastDNA KitまたはFastDNA Kit for soilおよびFastPrep FP120装置を使用して製造者の指示に従って(Q-BIOgene、米国)、生物試料由来のゲノムDNAを単離した。

40

【0282】

1C.RT-PCRを使用した、真核細胞ポリ(A)+RNAからの第1鎖cDNAの作製

RNaseを含まない微量遠心管(Ambion、米国)で以下を混合する。

A.全RNA鋳型

0.1から1mgの全RNA

5mgのアンカーオリゴ(dT)プライマー(20TVN)

DEPC最終体積8mlまで、

あるいは

B.ポリ(A)+RNA鋳型

50

10から100ngのポリ(A)+RNA
5mgのアンカーオリゴ(dT)プライマー(20TVN)
5mgのランダムpd(N)6プライマー
DEPC最終体積8mlまで。

【0283】

70℃で10分間加熱し、氷上で2から5分間急冷し、最高速度で20秒間スピンする。

【0284】

所望する場合は、Invitrogenの「RT-PCR Primer and Control Set」(カタログ番号10929-016、Invitrogen、米国)からの10ngのHeLa全RNAを陽性対照として含めることができる。以下を反応混合物に加える。

10

1μLのSuperscript(RNase阻害剤、20U/μL、Ambion)
4μLの5×RT緩衝液(Invitrogen)
2μLの0.1M DTT(Invitrogen)
1μLのdNTP(20mMのdATP、dGTP、dTTP、dCTP、Pharmacia)
1μLのSuperscript II RT(Invitrogen、200U/ml)、よく混合する(気泡が生じないように)。

【0285】

45℃で1時間インキュベートする。さらに1mlのSuperscript II RTaseを加え、45℃でさらに1時間インキュベーションを続け、70℃で5分間加熱し、氷上で2分間急冷する。スピニングカラムを使用して製造者の指示に従って、取り込まれなかったヌクレオチド、プライマーなどを除去する。この目的にはSephacryl S-400(Qiagen、米国)を使用するとよい。カラムを1.5mlの遠心管中で1分間、735×gでプレスピンし、カラムを新しい1.5mlの遠心管に入れ、mRNA::cDNA試料を樹脂の上部中心にゆっくりと載せ、735×gで2分間スピンし、溶出物を回収し、体積を確認する。溶出物を開始体積×5まで希釈し、その1μLおよび5μLをその後のPCR増幅用の鋳型として使用する。第1鎖cDNA試料は、使用時まで-20℃で保存することができる。

20

【0286】

1D.ゲノムDNAおよび2本鎖cDNAのin vitro増幅

最適のDNAポリメラーゼを使用した標準的なPCR増幅を組み立てる(以下の例は、InvitrogenからのPfx DNAポリメラーゼで使用する)。

30

1から5μLの鋳型(上記RT-PCR反応から)または100から200ngのゲノムDNA
5μLの10×Pfx緩衝液
1μLのMgSO₄
5μLのdNTP混合物(それぞれ2mMのdATP、dCTP、dGTP、およびdTTP、Pharmacia、米国)
1μLの順方向プライマー(10から20μMのON16またはON17またはON18、表5)
1μLの逆方向プライマー(10から20μMのON19REVまたはON20REVまたはON21REV、表5)
0.5μLのPfx
H₂O→最終体積50μL

【0287】

室温での反応にHeLa RNAが含まれていた場合は、供給されたβ-アクチン対照プライマーを使用した個別のPCR反応を組み立てる。

40

【0288】

30から40サイクル稼動されるようにPCR装置を設定する。アニーリング温度および伸張温度は、プライマーおよび前記最適のポリメラーゼを反映する。PCR産物の推定される長さ(複数の配列アラインメントから推定する)に応じて伸張時間を調整する。

【0289】

以下のプロトコルを例として示し、これはInvitrogen(Invitrogen、米国)の「RT-PCR Primer Control Set」で用いるとよい。

94℃、5分間
(94℃/1分間、50℃/1分間、68℃/2分間)を40サイクル

50

10℃、無期限

【0290】

例えばHaeIIIで消化したφX174RF DNAをサイズマーカーとして使用して、各PCR反応からの試料(1から5μL)をアガロースゲルで分析する。目的のPCR断片をゲルから切り出し、TA Cloning Kitを使用して製造者の指示に従って(Invitrogen、米国)、pCRクローニングベクター内にクローニングする。

【0291】

1E.ヌクレオチド配列分析

クローニングしたPCR断片のヌクレオチド配列を、50から150ngのプラスミド鋳型、Taqデオキシターミナルサイクル配列決定キット(Perkin-Elmer、米国)、蛍光標識したターミネーター、および5pmolのM13順方向もしくは逆方向プライマー(Invitrogen、米国)または合成オリゴヌクレオチドプライマーを使用したジデオキシチェーンターミネーション法(Sanger、Nicklen、およびCoulson、1977、PNAS,USA、74:5463-5467)によって決定した。配列データの分析は、Devereux他(Devereux,J.、Haeberli,P.、およびSmithies,O.、(1984)、Nucleic Acids Res.、12、387-395)に従って行った。

【0292】

前述の本発明の説明はその例示にすぎず、添付の特許請求の範囲に示した本発明の範囲および精神から逸脱せずに、変形および改変を行うことができることを理解されたい。

【0293】

本明細書中で言及したすべての出版物は、それぞれの個別の出版物または特許出願を具体的かつ個別に参照として組み込むと指示した場合と同程度に、本明細書中に参照として組込まれる。

【図面の簡単な説明】

【0294】

【図1】選択されるヌクレオチド配列、DNA(T)、LNA(T^L)、ピレンDNA(Py)、2'-OMe-RNA[2'-OMe(T)]、非塩基性LNA(Ab^L)、フェニルLNA(17a)およびピレニルLNA(17d)の構造を示す図である。示した短縮表記法は表1および表2またはDNA、LNAおよび2'-OMe-RNAで用い、チミンモノマーを例として示す。

【図2】種々の核酸の融解温度の表である。

【図 1】

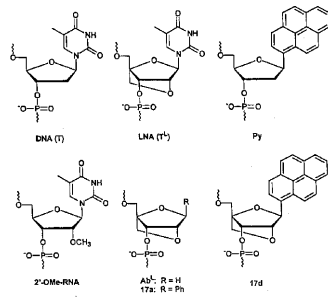


Figure 1

【図 2】

相補的なDNA-DNAおよびLNA-DNAの2重鎖の融解温度 (T_m)。修飾モノマー (LNAは大文字): I=イノシン、D=2,6-ジアミノプリン、X=2-アミノプリン。

エントリ	オリゴヌクレオチドの構成	相補デオキシヌクレオチドとの2重鎖の T_m ($\pm 0.5^\circ\text{C}$)			
		3'-ctgtatcc	3'-ctgaatcc	3'-ctggatcc	3'-ctgeatcc
1	5'-gacatagg	23.8	<10	<10	<10
2	5'-gacttagg	<10	22.6	<10	<10
3	5'-gacitagg	<10	<10	<10	25.0
4	5'-gacdtagg	23.3	<10	<10	<10
5	5'-gdcitagg	33.4	<10	<10	17.7
6	5'-gacitagg	<10	<10	<10	20.9
7	5'-gacttagg	<10	<10	<10	<10
8	5'-GACATAGG	61.6	38.2	43.4	40.6
9	5'-GACTTAGG	28.0	60.7	36.4	23.5
10	5'-GACGTAGG	55.0	32 ^b	41 ^b	70.9
11	5'-GACDTAGG	67.8	42.2	41.4	52.4
12	5'-GDCITDGG	78.3	55.9	54.7	63.8
13	5'-GACITAGG	53.1	48.2	43.0	59.9

^a融解温度 (T_m 値)は、対応する融解曲線 (温度に対する260nmでの吸光度)の1次導関数の最大値として得た。2重鎖の濃度: $2.5 \mu\text{M}$ 。緩衝液: 0.1M のNaCl、 10mM のNa-リン酸 (pH7.0)、 1mM のEDTA。

^b移行の協同性が低い (精度 $\pm 1^\circ\text{C}$)。

Figure 2

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern II Application No
PCT/IB 02/03911

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C07H19/00 C07H21/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C07H

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 practical, search terms used)

MEDLINE, EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	BABU B R ET AL: "Universal hybridization using LNA (locked nucleic acid) containing a novel pyrene LNA nucleotide monomer." CHEMICAL COMMUNICATIONS (CAMBRIDGE, ENGLAND) ENGLAND 21 OCT 2001, no. 20, 21 October 2001 (2001-10-21), pages 2114-2115, XP002227173 ISSN: 1359-7345 the whole document --- -/--	1-111

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in 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 document 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

17 May 2003

Date of mailing of the international search report

04 07. 2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

viveca norèn/ely

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Inte I Application No
 PCT/IB 02/03911

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LOAKES D: "Survey and summary: The applications of universal DNA base analogues." NUCLEIC ACIDS RESEARCH. ENGLAND 15 JUN 2001, vol. 29, no. 12, 15 June 2001 (2001-06-15), pages 2437-2447, XP002227174 ISSN: 1362-4962 the whole document ---	1-111
Y	ORUM H ET AL: "Locked nucleic acids: a promising molecular family for gene-function analysis and antisense drug development." CURRENT OPINION IN MOLECULAR THERAPEUTICS. ENGLAND JUN 2001, vol. 3, no. 3, June 2001 (2001-06), pages 239-243, XP002227175 ISSN: 1464-8431 the whole document ---	1-111
Y	WO 99 14226 A (WENGEL JESPER ; EXIQON A S (DK); NIELSEN POUL (DK)) 25 March 1999 (1999-03-25) the whole document ---	1-111
Y	WO 00 56748 A (WENGEL JESPER ; EXIQON A S (DK)) 28 September 2000 (2000-09-28) the whole document ---	1-111
Y	WO 00 66604 A (EXIQON AS ; WENGEL JESPER (DK)) 9 November 2000 (2000-11-09) the whole document ---	1-111
A	US 6 083 482 A (WANG GUANGYI) 4 July 2000 (2000-07-04) the whole document -----	1-111

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB 02/03911**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 86 partially, 87-93
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
2. ☒ Claims Nos.: 1-26, 31-111
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

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

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

Remark on Protest

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

International Application No. PCT/IB 02/03911

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Claims Nos.: 86 partially, 87-93

Claims 86 partially, 87-93 relate to methods of treatment of the human or animal body by surgery or by therapy/diagnostic methods practised on the human or animal body/Rule 39.1.(iv). Nevertheless, a search has been executed for these claims. The search has been based on the alleged effects of the compounds/compositions.

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 1-26,31-111

Present claims 1 and 42-43 relate to a nucleic acid partly defined by reference to a desirable characteristic or property, namely that it provides a certain maximal T_m differential. The claims cover all nucleic acids comprising an LNA unit and having a modified base providing this maximal T_m differential. The application however provides support within the meaning of Article 6 PCT and disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such nucleic acids. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the nucleic acids by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible.

Further claims 1-26 and 31-111 are extremely broad and unclear. They relate to an extremely large number of possible products and methods and there is experimental support only for very few of these. In fact, the claims contain so many possible products that a lack of clarity and conciseness within the meaning of Article 6 PCT arises to such an extent as to render a meaningful search of the claims impossible.

Consequently, the search has been carried out for those parts of the application, which appear to be clear and concise. The search has been focused on the nucleic acids as defined in claims 27-30. A limited search regarding the general idea of the invention i.e. locked nucleic acids having a modified, universal base that binds non-specifically to natural nucleobases and comprising one of the groups defined in claim 9, has also been performed.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a

International Application No. PCT/IB 02/03911

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Int Application No
 PCT/IB 02/03911

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9914226	A	25-03-1999	AU 9063398 A CA 2303299 A1 CN 1279687 T WO 9914226 A2 EP 1015469 A2 JP 2002521310 T NZ 503765 A US 2002068708 A1	05-04-1999 25-03-1999 10-01-2001 25-03-1999 05-07-2000 16-07-2002 26-04-2002 06-06-2002
WO 0056748	A	28-09-2000	AU 3274300 A CA 2368135 A1 CN 1350542 T WO 0056748 A1 EP 1161439 A1 JP 2002540118 T US 2003082807 A1	09-10-2000 28-09-2000 22-05-2002 28-09-2000 12-12-2001 26-11-2002 01-05-2003
WO 0066604	A	09-11-2000	AU 4391800 A CA 2372085 A1 CN 1349541 T WO 0066604 A2 EP 1178999 A2 JP 2002543214 T US 2003087230 A1	17-11-2000 09-11-2000 15-05-2002 09-11-2000 13-02-2002 17-12-2002 08-05-2003
US 6083482	A	04-07-2000	NONE	

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C O 7 H 21/00	C O 7 H 21/00	
C O 7 H 21/02	C O 7 H 21/02	
C O 7 H 21/04	C O 7 H 21/04	B
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	A
G O 1 N 33/53	G O 1 N 33/53	M
G O 1 N 33/566	G O 1 N 33/566	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,N O,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100110364

弁理士 実広 信哉

(72)発明者 ジェスパー・ウエンゲル

デンマーク・DK-5 2 6 0・オデンス・エス・ラグマーケン・4 8

(72)発明者 サカリ・カウピネン

デンマーク・DK-2 7 6 5・スモーラム・ノースクロゲン・1 2

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 AA20 BA80 CA01 CA05 CA06 CA09 CA10 CA11
HA08 HA12 HA17
4B063 QA01 QA18 QQ02 QQ04 QQ06 QQ07 QQ08 QQ09 QQ42 QQ52
QR08 QR32 QR42 QR43 QR50 QR55 QR62 QR66 QR72 QR73
QR74 QS03 QS25 QS28 QS32 QS34 QS36 QS39 QX01
4C057 BB02 DD03 MM05 MM09
4C084 AA02 AA07 BA35 CA59 NA13 NA14 ZB262 ZB322
4C086 AA01 AA02 AA03 EA07 EA16 MA01 MA04 NA13 NA14 ZB26
ZB32