

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2009年7月2日 (02.07.2009)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2009/082020 A1

(51) 国際特許分類:

C07C 279/14 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
C07C 279/18 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
G01N 33/58 (2006.01)

(21) 国際出願番号:

PCT/JP2008/073896

(22) 国際出願日:

2008年12月19日 (19.12.2008)

(25) 国際出願の言語:

日本語

(26) 国際公開の言語:

日本語

(30) 優先権データ:

特願 2007-330315

2007年12月21日 (21.12.2007) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人産業技術総合研究所 (NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒1008921 東京都千代田区霞が関一丁目3番1号 Tokyo (JP). 株式会社DNAチップ研究所 (DNA CHIP RESEARCH INC.) [JP/JP]; 〒2300045 神奈川県横浜市鶴見区末広町一丁目1番地43 Kanagawa (JP).

(72) 発明者; および

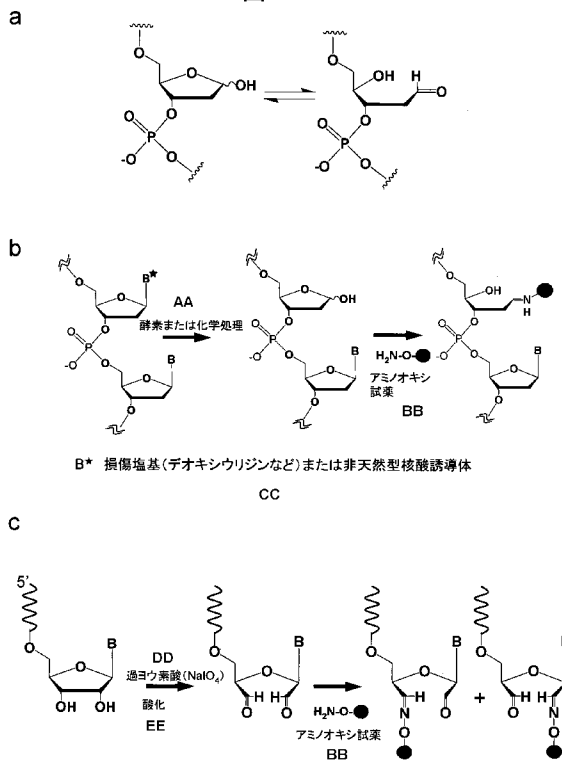
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 小松康雄 (KOMATSU, Yasuo) [JP/JP]; 〒0628517 北海道札幌市豊平区月寒東2条1丁目2番1号独立行政法人産業技術総合研究所北海道センター内 Hokkaido (JP). 小島直 (KOJIMA, Naoshi) [JP/JP]; 〒0628517 北海道札幌市 (JP).

[続葉有]

(54) Title: REACTIVE COMPOUND HAVING AMINOXY GROUP

(54) 発明の名称: アミノオキシ基を含有する反応性化合物

図 1



(57) Abstract: Disclosed is a compound having high reactivity with a functional group such as an aldehyde group. Specifically disclosed is a compound represented by the general formula (1) or a salt thereof. $R_1-NH-O-L_1-D-L_2-A$ (1) wherein R_1 represents a hydrogen atom, an alkyl group or a protective group for an amino group; D represents a bivalent aromatic group; L_1 represents a direct bond or a linker group; L_2 represents a direct bond or a linker group; and A represents an organic group having a hydrophilic group.

(57) 要約: 本発明は、アルデヒド基などの官能基に対して高い反応性を有する化合物を提供する。本発明は、一般式 1: $R_1-NH-O-L_1-D-L_2-A$ (1) (式中、 R_1 は、水素原子、アルキル基又はアミノ基の保護基であり、 D は、2価の芳香族基であり、 L_1 は、直接結合又はリンカー基であり、 L_2 は、直接結合又はリンカー基であり、 A は親水性基を含む有機基である)で表される化合物又はその塩に関する。

AA ENZYMATIC OR CHEMICAL TREATMENT
BB AMINOXY REAGENTCC B* DAMAGED BASE (E.G., DEOXYURIDINE) OR NON-NATURAL NUCLEIC
ACID DERIVATIVE
DD PERIODATE (NaIO₄)

EE OXIDATION



幌市豊平区月寒東2条17丁目2番1号独立行政法人産業技術総合研究所 北海道センター内 Hokkaido (JP). 野中謙 (NONAKA, Ken) [JP/JP]; 〒2300045 神奈川県横浜市鶴見区末広町一丁目1番地43株式会社DNAチップ研究所内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 平木祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.); 〒1050001 東京都港区虎ノ門4丁目3番20号 神谷町MTビル19階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,

NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

明 細 書

アミノオキシ基を含有する反応性化合物

5 技術分野

本発明は、アルデヒド基、ヘミアセタール基、カルボキシル基又はケト基を有する分子に対して高い反応性を有する化合物、該化合物を含む標識試薬、及び該化合物を用いた生体分子固定化用支持体に関する。

10 背景技術

アルデヒド基、ヘミアセタール基、カルボキシル基又はケト基に反応する構造として、一級アミノ基、アミノオキシ基などが知られている。一級アミノ基の場合は、不安定なシッフベースを形成するため、その結合を還元して安定化させる必要がある。一方、アミノオキシ基は高い反応性を有し、アミノ基のように還元剤を必要としない。このため、アルデヒド基を有する分子を効率的に検出する試薬として、アミノオキシ基をもった試薬がこれまで広く利用されてきた（非特許文献1、非特許文献2）。この試薬（ARP；Aldehyde Reactive Probe）は、アミノオキシ基とビオチンがリンカーを介して結合したシンプルな構造を有する。この試薬を、標的分子に反応させて結合させ、ビオチン-アビジン複合体形成を利用して、蛍光又は発光など分光学的な検出法により標的分子を検出することができる。

この試薬を用いて定量する代表的な分子として、RNA及びDNAなどの核酸がある。RNAには、遺伝子をコードしたmRNA、タンパク質合成に関与するrRNA、及びtRNAの他に、種々の機能性RNAが存在していることが近年明らかになってきた。これらの機能性RNAは、細胞内でタンパク質の発現などにおいて機能し、癌化にも関与していることが報告されている。そのため、mRNAとこれら機能性RNAの細胞内量を正確に定量することは、遺伝子相互作用の詳細な解明や疾病の診断にもつながる。また、DNAは種々の環境因子によって損傷を受け、その代表的な損傷に塩基部が失われたアベシックサイト（アプリニックサイト；APサイト）がある。アベシックサイトはヘミアセタール構造とアルデヒド構造の平衡状態で存在し、上記ARP試薬を作用させるとアルデヒド構造に反応するため、アベシックサイトを検出することが可能になっている。種々の化学物質、環境因子のDNAに対する損傷度を測定して見積もることで、食品に含まれる化学物質、紫外線等の遺伝子変異原性評価にも役立つ。

生体分子の中でも特にDNA及びRNAを正確に定量するには、標的分子に対して高い反応性を有する試薬が必要である。しかしながら、これまでに用いられてきた試薬はその反応効率が不十分で、多量の試薬を作用させる必要があった。そのため、多くの条件下で標的分子を定量する必要がある場合には、コスト高となり時間を要していた。この他、糖鎖などの反応にもアミノオキシ基が用いられているが、反応性が不十分であった。

そのため、生体分子のなかでも特にこれらRNA、DNAなどの分子に対し、少量でも迅速に反応する新規な試薬の開発が望まれていた。

非特許文献1：Biochemistry 31, 3703-3708 (1992)

非特許文献2：Biochemistry 32, 8276-8283 (1993)

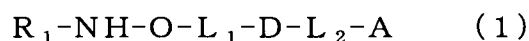
発明の開示

本発明の課題は、アルデヒド基などのアミノオキシ基と反応性の官能基を有する生体分子に対して高い反応性を有する化合物を提供することである。

本発明者らは、アミノオキシ基、芳香族基及び親水性基を有する化合物が、アルデヒド基などのアミノオキシ基と反応性の官能基を有する生体分子に対して高い反応性を有することを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は以下の発明を包含する。

(1) 一般式1：



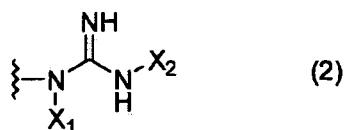
(式中、 R_1 は、水素原子、アルキル基又はアミノ基の保護基であり、 D は、2価の芳香族基であり、 L_1 は、直接結合又はリンカー基であり、 L_2 は、直接結合又はリンカー基であり、 A は親水性基を含む有機基である)

で表される化合物又はその塩。

(2) A が、親水性基として、置換又は無置換のグアニジノ基、置換又は無置換のポリエチレングリコール基、カルボキシル基、アミノオキシ基及びヒドロキシル基からなる群から選択される少なくとも1つの基を含む、(1)記載の化合物又はその塩。

(3) A が、親水性基として、置換又は無置換のグアニジノ基を含む、(2)記載の化合物又はその塩。

(4) A が、以下の一般式2：

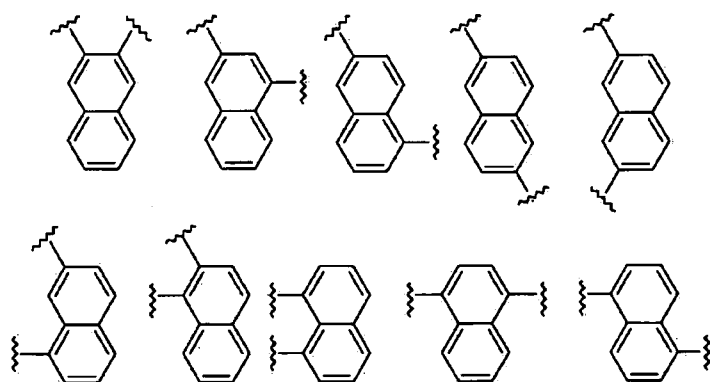


(式中、 X_1 及び X_2 は、水素原子又は有機基である)

で表される、(1) ~ (3) のいずれかに記載の化合物又はその塩。

- (5) Dが、置換若しくは無置換のフェニレン基、置換若しくは無置換のアントリレン基、置換若しくは無置換のナフチレン基、置換若しくは無置換のフェナントリレン基、置換若しくは無置換のアントラキノリレン、又は置換若しくは無置換のアクリジニレンである、(1) ~ (4) のいずれかに記載の化合物又はその塩。

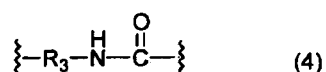
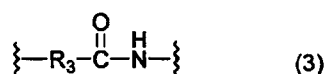
(6) Dが、以下の一般式：



- 10 (式中、一方の結合部位が L_1 又は O に結合し、他方の結合部位が L_2 又は A に結合する)

で表される 2 価の芳香族基、及びこれらの芳香族基において芳香環が 1 ~ 3 個の置換基を有する芳香族基から選択される、(5) 記載の化合物又はその塩。

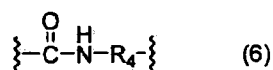
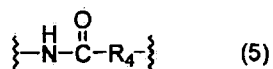
(7) L_1 が、以下の一般式 3 又は 4：



15

(式中、 R_3 は、置換若しくは無置換の C_{1-9} アルキレン基又は $-(\text{CH}_2)-$ 、 $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_p-$ 、 $-(\text{CH}_2)_q-$ であり、ここで、 $o \sim q$ は、それぞれ独立して 0 ~ 15 の整数であり、 $o + p + q$ は、1 ~ 15 である)

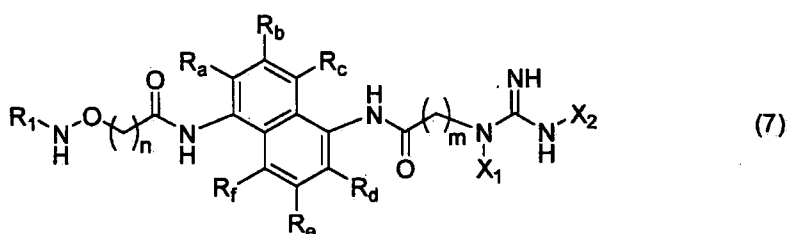
のいずれかで表される 2 価の基であり、 L_2 が、以下の一般式 5 又は 6：



(式中、 R_4 は、置換若しくは無置換の C_{1-9} アルキレン基又は $-(CH_2)_r-$
 $(OCH_2CH_2)_s-(CH_2)_t-$ であり、ここで、 $r \sim t$ は、それぞれ独立して
 0～15の整数であり、 $r+s+t$ は、1～15であるである)

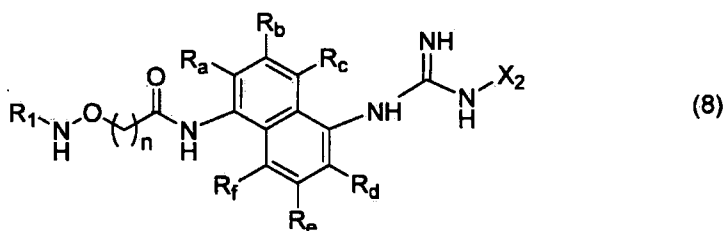
- 5 のいずれかで表される2価の基である、(1)～(6)のいずれかに記載の化合物
 又はその塩。

(8) 以下の一般式7：



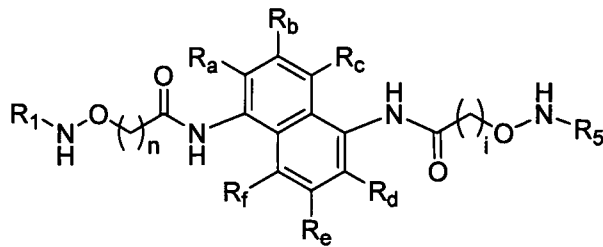
- 10 (式中、 R_1 は、水素原子又はアミノ基の保護基であり、 n は、1～5の整数であ
 り、 m は、1～5の整数であり、 $R_a \sim R_f$ は、それぞれ独立して、水素原子又は
 置換基であり、 X_1 及び X_2 は、水素原子又は有機基である)
 で表される、(1)記載の化合物又はその塩。

(9) 以下の一般式8：



- 15 (式中、 R_1 は、水素原子又はアミノ基の保護基であり、 n は、1～5の整数であ
 り、 $R_a \sim R_f$ は、それぞれ独立して、水素原子又は置換基であり、 X_2 は、水素原
 子又は有機基である)
 で表される、(1)記載の化合物又はその塩。

(10) 以下の一般式：



(式中、 R_1 及び R_5 は、それぞれ独立して、水素原子又はアミノ基の保護基であり、 n 及び i は、それぞれ独立して、1～5の整数であり、 $R_a \sim R_f$ は、それぞれ独立して、水素原子又は置換基である)

5 で表される、(1)記載の化合物又はその塩。

(11) Aが標識基をさらに含む、(1)～(9)のいずれかに記載の化合物又はその塩。

(12) X_1 及び X_2 の少なくとも一方が有機基であり、該有機基が標識基である、(4)、(8)、又は(9)記載の化合物又はその塩。

10 (13) アルデヒド基、ヘミアセタール基、カルボキシル基又はケト基を有する生体分子を標識するための試薬であって、(11)又は(12)記載の化合物又はその塩を含む前記試薬。

(14) (11)又は(12)記載の化合物と、アルデヒド基、ヘミアセタール基、カルボキシル基又はケト基を有する生体分子とが結合してなる標識化生体分子であって、該化合物のアミノオキシ基と該生体分子のアルデヒド基、ヘミアセタール基、カルボキシル基又はケト基とが反応して共有結合を形成している、前記標識化生体分子。

15 (15) アルデヒド基、ヘミアセタール基、カルボキシル基又はケト基を有する生体分子を固定化するための生体分子固定化用支持体であって、担体及び該担体表面に存在する(1)～(10)のいずれかに記載の化合物又はその塩の層を含む、前記支持体。

本発明により、アルデヒド基などのアミノオキシ基と反応性の官能基を有する生体分子に対して高い反応性を有する化合物が提供される。

25 図面の簡単な説明

図1 aはDNAのアペイシックサイトを表し、図1 bはDNAのアペイシックサイトへの反応を表し、図1 cはRNAの3'末端酸化反応を表す。

図2は、3'末端が酸化されたRNA ($F-Lr17Xox$) に対するARPと $aONg$ の結合反応を示す。ssは1本鎖を表し、括弧内に反応部位で形成される塩基対(XY)の組み合わせを示す。Gray bar, ARP; black

b a r, a o N g。

図3は、アペイシクサイトを有するDNAへのARPとa o N gの結合反応を示す。アペイシクサイトを有するDNAの一本鎖（s s）及び二本鎖（d s）に対し、37℃、42℃、47℃で反応を行ったときの速度定数のグラフを示す。

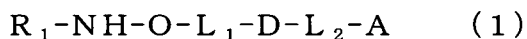
5 図4は、2'-デオキシウリジンを含むDNAに対するARP、a o N g、a o N g-b i oの結合反応を示す。2'-デオキシウリジンを含むDNA二本鎖をUDGで処理した後に、標識試薬（ARP、a o N g、a o N g-b i o）を添加し、各時間の反応産物の精製率を調べた。反応液のポリアクリルアミドゲルによる分析の結果と、各時間の反応率のグラフを示した。

10 図5は、アペイシクサイトを含む2本鎖DNA間の架橋反応の結果を示す。2'-デオキシウリジンを含むDNAをUDGで処理してアペイシクサイトを生成させた後にa o N a oを反応させた。反応液のポリアクリルアミドゲルによる分析の結果と、各時間の反応率のグラフを示した。

本明細書は、本願の優先権の基礎である特願2007-330315号の明細書、
15 特許請求の範囲、及び図面に記載された内容を包含する。

発明を実施するための最良の形態

一実施形態において本発明は、一般式1：



20 （式中、 R_1 は、水素原子、アルキル基（好ましくは C_{1-6} アルキル基）又はアミノ基の保護基であり、Dは、2価の芳香族基であり、 L_1 は、直接結合又はリンカー基であり、 L_2 は、直接結合又はリンカー基であり、Aは、親水性基を含む有機基である）で表される化合物又はその塩（以下、本発明の化合物と称する場合がある）に関する。

25 塩としては、例えば、無機酸との塩、有機酸との塩、及び塩基性又は酸性アミノ酸との塩などが挙げられる。無機酸との塩の好適な例としては、塩酸、臭化水素酸、硝酸、硫酸、リン酸などとの塩が挙げられる。有機酸との塩の好適な例としては、酢酸、トリフルオロ酢酸、フマル酸、シュウ酸、酒石酸、マレイン酸、クエン酸、コハク酸、リンゴ酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、p-トルエンスル
30 ホン酸などとの塩が挙げられる。塩基性アミノ酸との塩の好適な例としては、アルギニン、リジン、オルニチンなどとの塩が挙げられる。酸性アミノ酸との塩の好適な例としては、アスパラギン酸、グルタミン酸などとの塩が挙げられる。

本発明の化合物は、無水物であっても、溶媒和物であってもよい。一般式1の化合物又はその塩の溶媒和物もまた本発明の化合物に包含される。ここで溶媒は溶質

(一般式 1 の化合物又はその塩)の生物活性を妨げるものでなければ特に制限されない。適当な溶媒の具体例としては、水、メタノール、エタノール及び酢酸が含まれる。好ましくは、溶媒は水である。

5 一般式 1 の R_1 におけるアミノ基の保護基は、特に制限されないが、例えば、アシル基、カルバメート基、トリアルキシルシリル基、フタリル基、カルボキシアルキルカルボニル基、トシル基、トリフルオロアセチル基、トリチル基、及びモノ又はジ置換トリチル基が挙げられ、好ましくはアルキル基である。これらの基は置換されていてもよい。

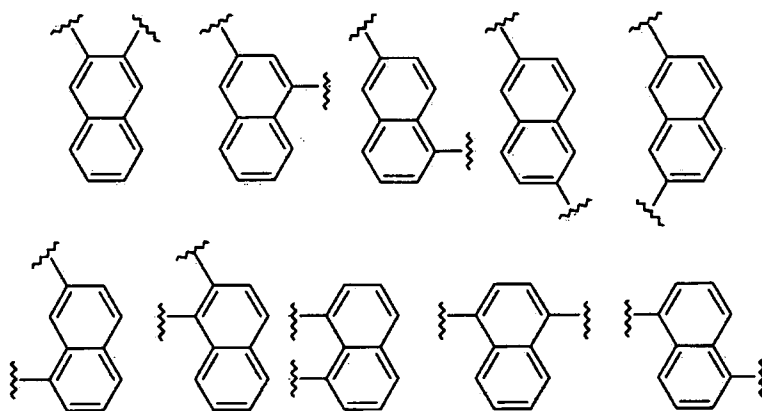
10 R_1 は、好ましくは炭素数 1 ~ 10、より好ましくは炭素数 1 ~ 6 の、置換若しくは無置換のアルキル基である。アルキル基は、直鎖でも分岐鎖でもよい。ここで、置換基としては、例えば、フッ素、塩素、臭素及びヨウ素から選ばれるハロゲン原子、ヒドロキシル基、メルカプト基、アミノ基、 C_{1-6} アルキル基、 C_{1-6} アルキルアミノ基、カルバモイル基、チオカルボキシ基、スルホ基、スルフィノ基、イソシアナト基、ニトロ基、シアノ基、 C_{2-6} アルケニル基、 C_{3-10} シクロアルキル
15 基、 C_{1-10} アルコキシ基、 C_{1-10} アシル基、 C_{1-10} アルコキシカルボニル基並びにカルボキシル基等を挙げることができる。置換基が複数存在する場合、各置換基は同一でも異なってもよい。置換基の数は、好ましくは 1 ~ 3 個である。

本明細書において「 C_{1-6} アルキル基」等の記載における「 C_{1-6} 」等の表現は、その基が 1 ~ 6 個の炭素原子を含むことをさす、該基は直鎖でも分岐鎖でもよい。

20 一般式 1 の D における 2 価の芳香族基は、ベンゼン環を有するものであればよく、縮合環中にベンゼン環を有するものでもよい。2 価の芳香族基としては、5 ~ 25 個の炭素原子、好ましくは 6 ~ 20 個の炭素原子を含む単環式又は多環式の 2 価の芳香族基が挙げられる。より具体的には、置換又は無置換のフェニレン基、置換又は無置換のピリジレン基、置換又は無置換のピリダジニル基、置換又は無置換のピリミジニレン基、置換又は無置換のピラジニレン基、置換又は無置換のフリレン基、置換又は無置換のチエニレン基、置換又は無置換のピロリレン基、置換又は無置換のイミダゾリレン基、置換又は無置換のチアゾリレン基、置換又は無置換のオキサ
25 ゾリレン基、置換又は無置換のナフチレン基、置換又は無置換のアントリレン基、置換又は無置換のピレニレン基、置換又は無置換のインダニレン基、置換又は無置換のテトラヒドロナフチレン基、置換又は無置換のキノリレン基、イソキノリレン
30 基、置換又は無置換のシンノリニレン基、置換又は無置換のキナゾリニレン基、置換又は無置換のキノキサリニレン基、置換又は無置換のナフチリジニレン基、置換又は無置換のフタラジニレン基、置換又は無置換のインドリレン基、置換又は無置換のイソインドリレン基、置換又は無置換のベンゾフリレン基、置換又は無置換の

- ベンゾチエニレン基、置換又は無置換のインダゾリレン基、置換又は無置換のベンゾイミダゾリレン基、置換又は無置換のベンゾチアゾリレン基、置換若しくは無置換のフェナントリレン基、置換若しくは無置換のアントラキノリレン、又は置換若しくは無置換のアクリジニレンが挙げられる。Dとしては、置換又は無置換のフェニレン基、置換又は無置換のアントリレン基、置換又は無置換のナフチレン基、及び置換若しくは無置換のフェナントリレン基、置換若しくは無置換のアントラキノリレン、又は置換若しくは無置換のアクリジニレンが好ましく、特に置換又は無置換のアントリレン基及び置換又は無置換のナフチレン基が好ましい。

より具体的には、Dは、以下の一般式：

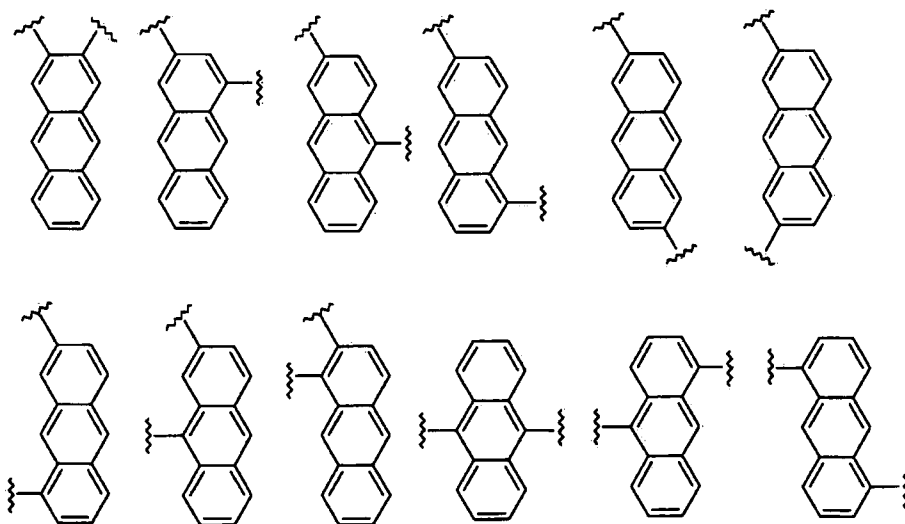


10

(式中、一方の結合部位が L_1 又は O に結合し、他方の結合部位が L_2 又は A に結合する)

で表される 2 価の芳香族基、及びこれらの芳香族基において芳香環が 1 ～ 3 個の置換基を有する芳香族基から選択される。

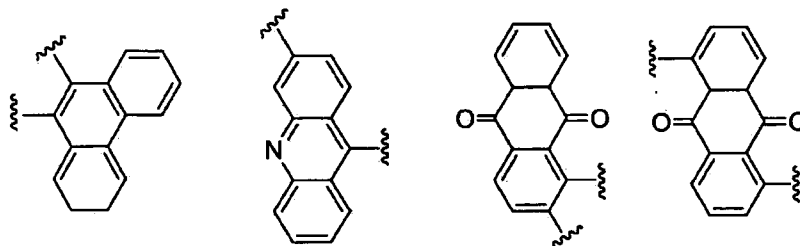
- 15 あるいは、Dは、以下の一般式：



(式中、一方の結合部位が L_1 又は O に結合し、他方の結合部位が L_2 又は A に結合する)

で表される 2 価の芳香族基、及びこれらの芳香族基において芳香環が 1 ～ 3 個の置換基を有する芳香族基から選択される。

5 あるいは、 D としては、以下の一般式：

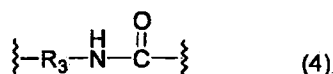
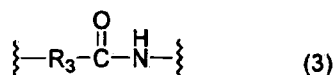


で表される 2 価の芳香族基、及びこれらの芳香族基において芳香環が 1 ～ 3 個の置換基を有する芳香族基もまた好ましい。

一般式 1 の D における芳香族基の置換基としては、例えば、フッ素、塩素、臭素
 10 及びヨウ素から選ばれるハロゲン原子、ヒドロキシ基、メルカプト基、アミノ基、
 オキソ基、 C_{1-6} アルキル基、 C_{1-6} アルキルアミノ基、カルバモイル基、チオカル
 ボキシ基、スルホ基、スルフィノ基、イソシアナト基、ニトロ基、シアノ基、 C
 $_{2-6}$ アルケニル基、 C_{3-10} シクロアルキル基、 C_{1-10} アルコキシ基、 C_{1-10} ア
 シル基、 C_{1-10} アルコキシカルボニル基並びにカルボキシ基等を挙げることが
 15 できる。置換基が複数存在する場合、各置換基は同一でも異なってもよい。置
 換基の数は、好ましくは 1 ～ 10 個、好ましくは 1 ～ 3 個である。

一般式 1 の L_1 におけるリンカー基は、アミノオキシ基の酸素原子と芳香族基 D
 を結合する基であって、式 1 の化合物の反応性を阻害しないものであれば特に制限
 されない。リンカー基は、通常、2 価の有機基、例えば主鎖に 1 ～ 15 個、好まし
 20 くは 1 ～ 12 個の炭素原子並びに／又は複素原子（酸素、窒素又は硫黄原子）を含
 む 2 価の有機基である。主鎖に含まれる原子の数は、リンカー基がつなぐ原子間
 において最短距離を形成する鎖に含まれる原子の数をさす。 L_1 としては、例えば、
 $-(CH_2)_o-$ 、 $-(OCH_2CH_2)_p-$ 、 $-(CH_2)_q-$ が挙げられる。ここで、 $o \sim$
 q は、それぞれ独立して 0 ～ 15 の整数であり、 $o + p + q$ は、1 ～ 15 である。

25 L_1 としては、例えば、以下の一般式 3 又は 4：



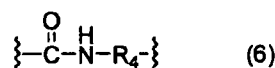
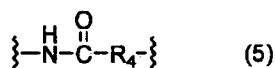
(式中、 R_3 は、置換若しくは無置換の C_{1-9} アルキレン基又は $-(CH_2)_o - (OCH_2CH_2)_p - (CH_2)_q -$ であり、ここで、 $o \sim q$ は、それぞれ独立して0～15の整数であり、 $o + p + q$ は、1～15である)

- 5 で表される2価の基も例示できる。一般式3においては、 R_3 がアミノオキシ基の酸素原子に結合し、 $-NH-$ の窒素原子が芳香族基Dに結合する。一般式4においては、 R_3 がアミノオキシ基の酸素原子に結合し、 $-(CO)-$ の炭素原子が芳香族基Dに結合する。

- ここで C_{1-9} アルキレン基の置換基としては、例えば、フッ素、塩素、臭素及び
 10 ヨウ素から選ばれるハロゲン原子、ヒドロキシル基、メルカプト基、アミノ基、 C_{1-6} アルキル基、 C_{1-6} アルキルアミノ基、カルバモイル基、チオカルボキシ基、スルホ基、スルフィノ基、イソシアナト基、ニトロ基、シアノ基、 C_{2-6} アルケニル基、 C_{3-10} シクロアルキル基、 C_{1-10} アルコキシ基、 C_{1-10} アシル基、 C_{1-10} アルコキシカルボニル基並びにカルボキシ基等を挙げることができる。置換
 15 基が複数存在する場合、各置換基は同一でも異なってもよい。置換基の数は、好ましくは1～3個である。

- 一般式1の L_2 におけるリンカー基は、芳香族基Dと親水性基を含む有機基Aとを結合する基であって、式1の化合物の反応性を阻害しないものであれば特に制限
 20 されない。リンカー基は、通常、2価の有機基、例えば主鎖に1～15個、好ましくは1～12個の炭素原子及び／又は複素原子(酸素、窒素又は硫黄原子)を含む2価の有機基である。 L_2 としては、例えば、 $-(CH_2)_r - (OCH_2CH_2)_s - (CH_2)_t -$ が挙げられる。ここで、 $r \sim t$ は、それぞれ独立して0～15の整数であり、 $r + s + t$ は、1～15である。

L_2 としては、例えば、以下の一般式5又は6：



(式中、 R_4 は、置換若しくは無置換の C_{1-9} アルキレン基又は $-(CH_2)_r-(OCH_2CH_2)_s-(CH_2)_t-$ であり、ここで、 $r \sim t$ は、それぞれ独立して0～15の整数であり、 $r+s+t$ は、1～15である)

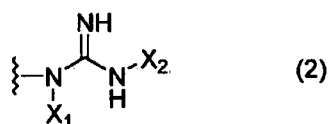
で表される2価の基も例示できる。一般式5においては、 $-NH-$ の窒素原子が芳香族基Dに結合し、 R_4 が親水性基を有する有機基Aに結合する。一般式6においては、 $-(CO)-$ の炭素原子が芳香族基Dに結合し、 R_4 が親水性基を有する有機基Aに結合する。 C_{1-9} アルキレン基の置換基は、一般式3又は4について記載したのと同様である。

一般式1のAにおける親水性基を含む有機基は、親水性基を少なくとも1つ含む有機基であれば特に制限されず、親水性基を複数、例えば、2～3個含んでもよい。Aが複数の親水性基を含む場合、それらは同一でも異なってもよい。本発明の化合物においてAが親水性基を含むことにより、化合物の水溶性が向上し、標的分子との相互作用を向上させることができる。その結果、アルデヒド基、ヘミアセタール基、カルボキシル基又はケト基を有する分子との反応性を向上させることができる。

有機基Aは、好ましくは親水性基として、置換又は無置換のグアニジノ基、置換又は無置換のポリエチレングリコール基、カルボキシル基、アミノオキシ基及びヒドロキシル基からなる群から選択される少なくとも1つの親水性基、より好ましくは置換又は無置換のグアニジノ基を含む。

グアニジノ基及びポリエチレングリコール基の置換基としては、例えば、フッ素、塩素、臭素及びヨウ素から選ばれるハロゲン原子、ヒドロキシル基、メルカプト基、アミノ基、 C_{1-6} アルキル基、 C_{1-6} アルキルアミノ基、カルバモイル基、チオカルボキシ基、スルホ基、スルフィノ基、イソシアナト基、ニトロ基、シアノ基、 C_{2-6} アルケニル基、 C_{3-10} シクロアルキル基、 C_{1-10} アルコキシ基、 C_{1-10} アシル基、 C_{1-10} アルコキシカルボニル基、カルボキシル基並びにグアニジノ基等を挙げるることができる。

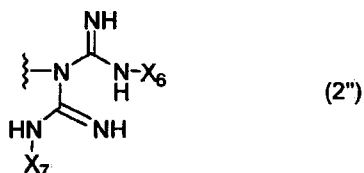
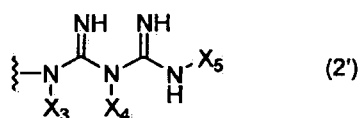
置換又は無置換のグアニジノ基は、例えば、以下の一般式2：



(式中、 X_1 及び X_2 は、水素原子又は有機基である)
で表される。ここで X_1 及び X_2 における有機基は、グアニジノ基の親水性を妨げるものでなければ特に制限されず、例えば、上記グアニジノ基の置換基が例示でき

る。

本発明において、置換又は無置換のグアニジノ基には、以下の一般式 2' 及び 2'' :



5 (式中、 $\text{X}_3 \sim \text{X}_7$ は、水素原子又は有機基である)

で表される基も包含される。ここで $\text{X}_3 \sim \text{X}_7$ における有機基は、グアニジノ基の親水性を妨げるものでなければ特に制限されず、例えば、上記グアニジノ基の置換基が例示できる。

本発明の化合物におけるアミノオキシ基は、アルデヒド基、ヘミアセタール基、
10 カルボキシル基又はケト基、特にアルデヒド基と高い反応性で共有結合を形成することから、本発明の化合物は、アミノオキシ基は、アルデヒド基、ヘミアセタール基、カルボキシル基又はケト基を有する化合物、例えば生体分子に、高い反応性で結合させることができる。親水性基として置換又は無置換のグアニジノ基を含む
15 本発明の化合物は、核酸、特に2本鎖の核酸に対し、高い反応性で結合させることができる。

有機基Aは、さらに標識基を有していてもよい。本発明の化合物は、アルデヒド基、ヘミアセタール基、カルボキシル基又はケト基を有する生体分子と高い反応性をもって結合しうることから、有機基Aが標識基を有する本発明の化合物をこのような生体分子と反応させることにより、該生体分子を効率的に標識することができる。
20 従って、一実施形態において本発明は、アルデヒド基、ヘミアセタール基、カルボキシル基又はケト基を有する生体分子を標識するための試薬であって、標識基を有する本発明の化合物を含む前記標識試薬に関する。本発明はまた、本発明の化合物と、アルデヒド基、ヘミアセタール基、カルボキシル基又はケト基を有する生体分子とが結合してなる標識化生体分子であって、該化合物のアミノオキシ基と該
25 生体分子のアルデヒド基、ヘミアセタール基、カルボキシル基又はケト基とが反応して共有結合を形成している、前記標識化生体分子に関する。

アルデヒド基、ヘミアセタール基、カルボキシル基、又はケトン基を有する生体分子としては、ポリペプチド、ポリヌクレオチド及び糖鎖などが挙げられる。ポリ

ペプチドには、ペプチド、オリゴペプチド及びタンパク質が包含される。ポリヌクレオチドには、DNA、RNA及び非天然型核酸等の核酸が包含され、これらは1本鎖でも2本鎖でもよく、又、ポリヌクレオチドにはオリゴヌクレオチドも包含される。本発明においてポリヌクレオチドの塩基長は、通常2～10000塩基、好ましくは2～1000塩基である。核酸の任意の位置に、アルデヒド基、ヘミアセタール基、カルボキシル基、又はケトン基を複数導入または生成させることが可能であり、こうして得られたアルデヒド基、ヘミアセタール基、カルボキシル基、又はケトン基を有する非天然型核酸も本発明においてポリヌクレオチドに包含される。また、ポリヌクレオチドには、DNA及びRNAの誘導体、例えば、3'末端のヒドロキシル基が酸化されたアルデヒド基を有するRNA、アベイシックサイトを有するDNA、及びそのヒドロキシル基が酸化されてアルデヒド基となったものも包含される。特に、核酸におけるこれらの基の導入、生成、及びそれらの基に対する標識に関して以下に記載する。

核酸におけるアルデヒド基の生成方法は幾つかの種類に分けることができる。その代表的な方法の一つに、アベイシックサイト（またはアプリニックサイト（APサイト））形成を通してのアルデヒド構造の形成がある。核酸のアベイシックサイトは、核酸の塩基部分が除去された糖部分の構造を示し（図1-a）、閉環と開環構造の平衡で存在している。アベイシックサイトは、閉環状態ではヘミアセタール構造であるが、開環型ではアルデヒド構造となっており、アミノオキシ基を作用させるとそのアルデヒド構造に反応する（図1-b）。

このアベイシックサイトは、天然の核酸や非天然型核酸を酸性条件で処理することによって生成させることができる。非天然型核酸としては、2-ピリミジドン体（Tetrahedron Letters, 31, 175-178 (1990)）、2'-デオキシーキサントシン体（Nucleic Acids Research, 31, 1045-1051 (2003)）、1-デアザ-2'-デオキシグアノシン体（Org Lett, 7, 709-712 (2005)）などが挙げられる。また、その他にも特別な反応条件でヘミアセタール構造の保護基を脱保護させてアベイシックサイトを形成する2'-デオキシーD-リボース誘導体（非特許文献6；非特許文献7）なども知られている。

また、上記のように誘導体を用いてアベイシックサイトを生成させる他に、損傷塩基をオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドに導入後、その損傷塩基を除去する酵素で処理し、アベイシックサイトを生成させる方法もある。この損傷塩基には、2'-デオキシウリジン、5-ヒドロキシメチル-2'-デオキシシチジンなどが挙げられ、2'-デオキシウリジンに対してはウラシルNグリコシラーゼを作用さ

せることによってアベシックサイトを生成させることができる。2'-デオキシウリジンは、化学合成によっても、またそのトリリン酸体(dUTP)を基質に用いてDNAポリメラーゼによる伸張反応を行うことによっても、オリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチド中に複数導入することが可能である。この2'-デオキシウリジンをDNA中に取り込ませてウラシルNグリコシラーゼを作用させて生成したアベシックサイトを標識後にDNAを断片化させ、その断片を化学的に標識するキット(Ribo-SPIA(登録商標))も市販されている(特表2005-534304)。この市販キット中に含まれる標識試薬と本発明の試薬の構造は異なり、本発明の試薬を用いることによって、より迅速、かつ高収率で標的核酸を標識することが可能となる。

アベシックサイトを經由せずにアルデヒド基を核酸中に生成させる方法もある。例えばあらかじめ非天然型核酸をオリゴヌクレオチドに導入し、その後酸化反応を行うことでアルデヒド基を生成させることが可能である(Tetrahedron Letters, 37, 9067-9070(1996))。また、RNAの場合には、天然型であってもアルデヒド基を形成可能である。例えばRNAの3'末端の2'位、3'位の水酸基を過ヨウ素酸等によって酸化させ、その3'末端にアルデヒド基を発生させることが可能である(図1-c)。この場合、2'位と3'位にアルデヒド基が生じるため、アミノオキシ基及び標識基を有する化合物を作用させると2'位または3'位においてRNAが標識される。

ケトン基を持つ非天然型核酸も報告されており(Org Lett, 3, 3983-3986(2001))、これらを導入した核酸に対し、本発明のアミノオキシ基を有する化合物を反応させることでケトン基に対して標識することも可能である。

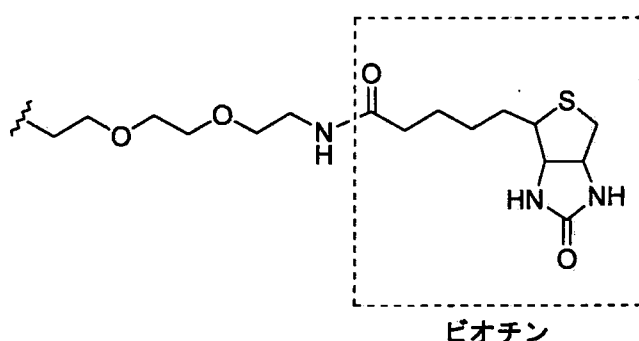
標識基は、標識物質を含む基をさす。標識物質としては、生体分子の標識に慣用される標識物質、例えば、放射性同位元素、色素(蛍光色素、発光色素)、ジゴキシゲニン(DIG)、ビオチン、メチレンブルー、フェロセンなどを例示できるがこれらに限定されない。

本発明の化合物が標識基を含む態様において、有機基Aが、上記一般式2のグアニジノ基を含むか、又は一般式2のグアニジノ基である場合は、X₁及びX₂のどちらかが有機基であり、該有機基が上記標識基であることが好ましい。有機基Aが、上記一般式2'又は2''のグアニジノ基であるかこれを含む場合も、X₃~X₅のいずれか、又はX₆若しくはX₇が標識基であることが好ましい。

その場合、標識物質は、グアニジノ基の窒素原子に直接結合していてもよいし、リンカーを介して結合していてもよい。リンカーとしては、特に制限されないが、通常、2価の有機基、例えば主鎖に1~15個、好ましくは1~12個の炭素原子

及び／又は複素原子（酸素、窒素又は硫黄原子）を含む２価の有機基である。例えば、 $-(CH_2)_v-(OCH_2CH_2)_w-(CH_2)_x-NH-$ が挙げられる。ここで、 v 、 w 及び x は、それぞれ独立して０～１５の整数であり、 $v+w+x$ は、１～１５である。好ましくは、 $-(CH_2)_2-(OCH_2CH_2)_2-NH-$ である。

標識物質としてビオチンを含む標識基（一般式２においては、 X_1 又は X_2 ）としては、以下の式：



で表される基を例示することができる。

- 10 有機基Aが、標識基が結合したグアニジノ基を含む有機基である本発明の化合物は、特に、核酸に標識を付すために好適に用いることができる。

本発明の標識試薬によって標識された生体分子は、様々な検出系によって定量可能である。そのため、本標識試薬は検出系、検出機器の影響を受けず、高い汎用性をもつため、広く利用される可能性を有する。

- 15 あるいは、有機基Aは、生体分子基を含んでもよい。生体分子基は、糖鎖、ポリヌクレオチド（オリゴヌクレオチドを含む）、ポリペプチド（例えば、酵素）などの生体分子を含む基をさす。Aがポリヌクレオチドを含む場合、PCRのプライマーとして用いることができる。例えば、本発明の化合物を標的分子に結合させた後、鋳型DNAと蛍光またはビオチンなどで標識された基質（dNTP）共存下でプライマーの伸長反応を行った場合、ポリヌクレオチドに蛍光物質（またはビオチンなど）が取り込まれ、それによって標的分子が標識される。
- 20

- 有機基Aが、上記一般式２のグアニジノ基を含むか、又は一般式２のグアニジノ基である場合は、 X_1 及び X_2 のどちらかが有機基であり、該有機基が上記生体分子基であることが好ましい。有機基Aが、上記一般式２'の基を含むか、又は一般式２'の基である場合は、 $X_3 \sim X_5$ のいずれかが有機基であり、該有機基が上記生体分子基であることが好ましい。上記一般式２''の基を含むか、又は一般式２''の基である場合は、 X_6 及び X_7 のどちらかが有機基であり、該有機基が上記生体
- 25

分子基であることが好ましい。その場合、生体分子は、グアニジノ基の窒素原子に直接結合していてもよいし、リンカーを介して結合していてもよい。リンカーは、上記標識基におけるリンカーと同様である。

5 本発明の化合物におけるアミノオキシ基は、アルデヒド基、ヘミアセタール基、カルボキシル基又はケト基を有する分子、例えば生体分子に、高い反応性で結合することから、担体の表面に本発明の化合物の層を形成し、本発明の化合物を介して生体分子を担体に固定化することができる。従って、一実施形態において本発明は、アルデヒド基、ヘミアセタール基、カルボキシル基又はケト基を有する生体分子を固定化するための生体分子固定化用支持体であって、担体及び該担体表面に存在す
10 る本発明の化合物の層を含む、前記支持体に関する。

本発明の化合物の層の形成は、単に本発明の化合物を担体上に塗布することにより実施してもよいし、担体上の官能基と共有結合を形成することにより実施してもよい。

担体上の官能基と共有結合を形成する場合、本発明の化合物における有機基Aは、
15 担体への結合に適した官能基を含むことが好ましい。そのような官能基としては、固定化しようとする担体上に存在する官能基と共有結合を形成しうる基が挙げられ、例えば、活性エステル基、エポキシ基、アルデヒド基、カルボジイミド基、イソチオシアネート基又はイソシアネート基と共有結合しうる基（例えば、アミノ基、アミノオキシ基など）、あるいはマレイミド基又はジスルフィド基と反応しうる基
20 （例えば、メルカプト基など）等が挙げられる。これらの官能基は保護された形態でもよい。保護された形態とは、官能基の水素原子が保護基で置換された形態を意味する。アミノ基、アミノオキシ基などの保護基としては、特に制限されないが、アルキル基、アシル基、カルバメート基、トリアルキルシリル基、フタリル基、カルボキシアルキルカルボニル基、トシル基、トリフルオロアセチル基、トリチル基、
25 及びモノ又はジ置換トリチル基が挙げられる。モノ置換トリチル基としては、例えば、モノアルコキシトリチル基、好ましくは炭素数1～4、より好ましくは炭素数1のアルコキシ基を有するモノアルコキシトリチル基、具体的には、モノメトキシトリチル基、モノエトキシトリチル基、モノプロポキシトリチル基、モノイソプロポキシトリチル基及びモノブトキシトリチル基が挙げられる。

30 本発明の化合物を結合させる担体の材料としては、例えば、石英ガラス、ホウ珪酸ガラス及びソーダライムガラスなどのガラス、シリコン、金属、繊維、木材、紙、セラミックス、プラスチック（例えば、ポリエステル樹脂、ポリエチレン樹脂、ポリプロピレン樹脂、ABS樹脂、ナイロン、アクリル樹脂、フッ素樹脂、ポリカーボネート樹脂、ポリウレタン樹脂、メチルペンテン樹脂、フェノール樹脂、メラミ

ン樹脂、エポキシ樹脂、塩化ビニル樹脂)が挙げられる。本発明においては、ガラス、シリコン、セラミックス又はプラスチックを使用するのが好ましい。上記担体の表面に本発明の化合物の層を形成する。担体に官能基を導入する場合、導入する官能基としては、例えば、活性エステル基、エポキシ基、アミノ基、クロロ基、ジスルフィド基、アルデヒド基、マレイイミド基、カルボジイミド基、イソチオシアナト基、イソシアナト基等が挙げられる。アミノ基またはアミノオキシ基を有する本発明の化合物を結合する場合は、活性エステル基、エポキシ基、アルデヒド基、カルボジイミド基、イソチオシアネート基、イソシアネート基が導入された担体を用いるのが好ましく、メルカプト基を有する本発明の化合物を結合する場合は、マレイミド基、ジスルフィド基が導入された担体を用いるのが好ましい。

担体の形状は、特に制限されず、基板状、糸状、球状、ビーズ状、多角形状、粉末状、多孔質状などが挙げられ、本発明においては基板状が好ましい。

置換又は無置換のグアニジノ基を含む有機基Aを有する本発明の化合物は、核酸に特異的に結合し得ることから、当該化合物を担体に結合させることにより、優れた核酸固定化用支持体を製造することができる。得られた核酸固定化用支持体にDNAなどの核酸を固定化することにより、効率的にマイクロアレイを製造することができる。

本発明の化合物により、特に、RNA及びDNAなどの核酸への標識反応を効率化することができ、遺伝子検出に要する時間を短縮することができる。さらに本発明の化合物の高い反応性によって、検出感度の向上、及び検出値の定量化が可能となり、遺伝子に関わるより詳細な情報を正確に得ることができる。また、担体上に本発明の化合物の層を形成し、その表面上で標的生体分子との結合反応を行う場合にも、担体上で効率的に標的生体分子の捕捉が行えるようになり、生体分子の同定に応用することができる。

以下、本発明を実施例により説明するが、本発明の範囲は実施例に限定されない。

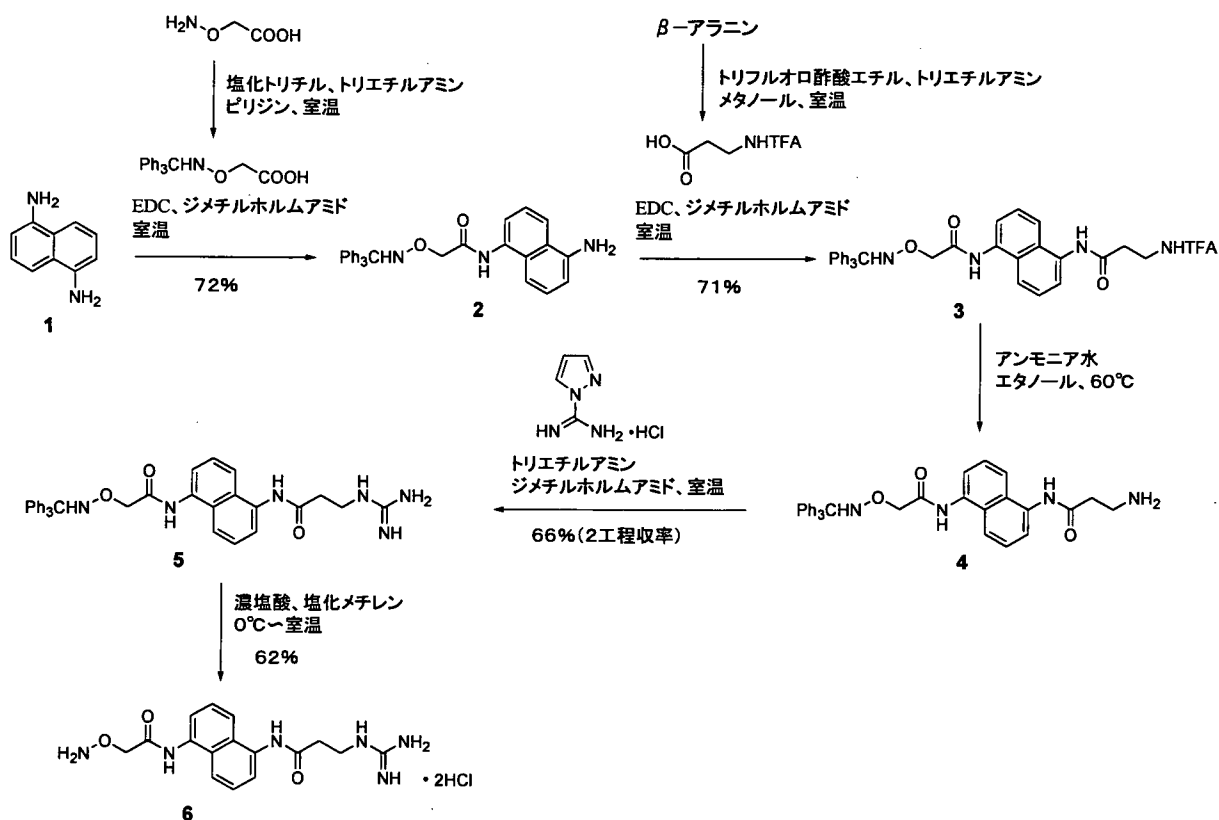
実施例

(実施例1) アミノオキシナフタレン試薬(a o N g、化合物6およびa o N g - b i o t i n、化合物10)の合成

薄層クロマトグラフィーはK i e s e l g e l 60F254プレート(M e r c k社)上で行った。カラムクロマトグラフィーにはW a k o g e l C-200(和光純薬工業)を用いた。¹H NMR及び¹³C NMRはテトラメチルシランを内部標準とし、J E O L J N M - E X 270を用いて測定した。

a o N g、化合物6の合成

スキーム 1



N¹-(トリチルアミノオキシアセチル)-1, 5-ジアミノナフタレン (化合物 2)

アルゴン雰囲気下、1, 5-ジアミノナフタレン (化合物 1) 440 mg (2.80 mmol) 及び N-トリチルアミノオキシ酢酸 1.00 g (3.00 mmol) をジメチルホルムアミド (DMF) 30 ml に溶解し、EDC [塩酸 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド] 590 mg (3.10 mmol) を加え、室温で 20 時間攪拌した。反応液に酢酸エチル 200 ml を加え、水 70 ml で 4 回洗浄した。溶液を減圧下濃縮した後、酢酸エチルで 3 回共沸し、生じた沈殿を酢酸エチル (20 ml) とヘキサン (120 ml) の混合溶液に懸濁させた。沈殿を吸引濾過により濾取して標記化合物 (化合物 2) 1.03 g (収率 72%) を淡茶色粉状物質として得た。

FAB-LRMS m/z 473.3 (M^+); FAB-HRMS 計算値: 473.2103 ($C_{31}H_{27}N_3O_2$ [M^+]), 実測値: 473.2093.

¹H NMR (270 MHz, DMSO- d_6) δ : 9.33 (br s, 1 H, NH), 8.38 (br s, 1 H, NH), 7.93 (d, 1 H, naph, $J = 8.6$ Hz), 7.64 (d, 1 H, naph, $J = 7.3$ Hz), 7.34-7.25 (m, 16 H, Tr and naph), 7.20 (t, 1 H, naph, $J = 8.2$ Hz), 6.99 (d, 1 H,

naph, $J = 8.2$ Hz), 6.70 (d, 1 H, naph, $J = 7.3$ Hz), 5.78 (br s, 2 H, NH_2), 4.20 (s, 2 H, CH_2).

^{13}C NMR (67.8 MHz, DMSO-d_6) δ : 168.26 (C), 144.96 (C), 144.01 (C), 132.13 (C), 128.70 (CH), 127.57 (CH), 126.68 (CH), 123.05 (C), 122.76 (CH),
 5 121.06 (CH), 119.88 (CH), 109.15 (CH), 107.58 (CH), 73.64 (C), 73.31 (CH_2).
 N^1 - [2 - (トリフルオロアセチルアミノ) エチルカルボニル] - N^5 - (トリチルアミノオキシアセチル) - 1, 5 - ジアミノナフタレン (化合物 3)

アルゴン雰囲気下、 N^1 - (トリチルアミノオキシアセチル) - 1, 5 - ジアミノナフタレン (化合物 2) 1.00 g (2.11 mmol) 及び N -トリフルオロアセチル- β -アラニン 780 mg (4.22 mmol) をジメチルホルムアミド 25 ml に溶解し、EDC [塩酸 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド] 810 mg (4.22 mmol) を加え、室温で 17 時間攪拌した。反応液に酢酸エチル 220 ml を加え、水 80 ml で 4 回洗浄した。溶液を減圧下濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒: 酢酸エチル-ヘキサン) により精製して標記化合物 (化合物 3) 961 mg (収率 71%) を白色固体状物質として得た。

FAB-LRMS m/z 640.3 (M^+); FAB-HRMS 計算値: 640.2297 ($\text{C}_{36}\text{H}_{31}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_4$ [M^+]), 実測値: 640.2308.

^1H NMR (270 MHz, DMSO-d_6) δ : 10.04 (s, 1 H, NH), 9.61 (s, 2 H, NH and NH),
 20 8.36 (s, 1 H, NH), 7.94 (d, 1 H, naph, $J = 8.6$ Hz), 7.74-7.69 (m, 3 H, naph), 7.55-7.48 (m, 2 H, naph), 7.35-7.25 (m, 15 H, Tr), 4.23 (s, 2 H, CH_2), 3.56 (br t, 2 H, CH_2 , $J = 6.8$ Hz), 2.78 (t, 2 H, CH_2 , $J = 6.8$ Hz).

^{13}C NMR (67.8 MHz, DMSO-d_6) δ : 169.27 (C), 168.76 (C), 156.12 (C, q, $J = 35.8$ Hz), 144.01 (C), 133.57 (C), 132.73 (C), 128.73 (CH), 128.46 (C),
 25 128.41 (C), 127.58 (CH), 126.70 (CH), 125.36 (CH), 125.11 (CH), 122.04 (CH), 120.52 (CH), 119.67 (CH), 115.80 (C, q, $J = 287.9$ Hz), 73.67 (C), 73.33 (CH_2), 36.04 (CH_2), 34.80 (CH_2).

N^1 - (2-アミノエチルカルボニル) - N^5 - (トリチルアミノオキシアセチル) - 1, 5 - ジアミノナフタレン (化合物 4)

30 N^1 - [2 - (トリフルオロアセチルアミノ) エチルカルボニル] - N^5 - (トリチルアミノオキシアセチル) - 1, 5 - ジアミノナフタレン (化合物 3) 950 mg (1.48 mmol) にエタノール 40 ml 及び濃アンモニア水 20 ml を加えて耐圧ガラス容器に密封し、60°C で 4 時間加熱した。溶液を室温に戻した後、減圧下濃縮し、残渣をアセトニトリルで 3 回共沸して標記化合物 (化合物 4) を淡

黄色泡状物質として得た。本化合物はこれ以上の精製を行わず、次の反応に用いた。
FAB-LRMS m/z 545.4 (MH^+); FAB-HRMS 計算値: 545.2553 ($C_{34}H_{33}N_4O_3 [MH^+]$), 実測
値: 545.2573.

^1H NMR (270 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.19 (s, 1 H, NH), 9.62 (s, 1 H, NH), 8.34
5 (s, 1 H, NH), 7.98 (d, 1 H, naph, $J = 8.2$ Hz), 7.80 (br s, 2 H, NH_2),
7.75-7.70 (m, 3 H, naph), 7.58-7.49 (m, 2 H, naph), 7.38-7.25 (m, 15 H,
Tr), 4.23 (s, 2 H, CH_2), 3.16 (t, 2 H, CH_2 , $J = 6.6$ Hz), 2.89 (t, 2 H, CH_2 ,
 $J = 6.6$ Hz).

^{13}C NMR (67.8 MHz, DMSO- d_6) δ : 168.89 (C), 168.78 (C), 143.98 (C), 133.29
10 (C), 132.77 (C), 128.70 (CH), 128.49 (C), 128.29 (C), 127.56 (CH), 126.70
(CH), 125.32 (CH), 125.19 (CH), 122.13 (CH), 121.94 (CH), 120.49 (CH),
119.82 (CH), 73.64 (C), 73.30 (CH_2), 35.11 (CH_2), 32.82 (CH_2).

$N^1 - (2\text{-グアニジノエチルカルボニル}) - N^5 - (\text{トリチルアミノオキシアセチル}) - 1, 5\text{-ジアミノナフタレン (化合物5)}$

15 アルゴン雰囲気下、前反応により合成した $N^1 - (2\text{-アミノエチルカルボニル}) - N^5 - (\text{トリチルアミノオキシアセチル}) - 1, 5\text{-ジアミノナフタレン}$
(化合物4) 全量 (1.48 mmol) をジメチルホルムアミド 15 ml に溶解し、
塩酸 1H-ピラゾール-1-カルボキシアミジン 320 mg (2.20 mmol)
及びトリエチルアミン 0.61 ml (4.40 mmol) を加え、室温で6時間攪
20 拌した。反応液に酢酸エチル 150 ml を加え、水 50 ml で4回洗浄した。溶液
を減圧下濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒: エタノール-
クロロホルム) により精製して標記化合物 (化合物5) 567 mg (収率66%)
を淡茶色泡状物質として得た。

FAB-LRMS m/z 587.3 (MH^+); FAB-HRMS 計算値: 587.2771 ($C_{35}H_{35}N_6O_3 [MH^+]$), 実測
25 値: 587.2772.

^1H NMR (270 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.11 (s, 1 H, NH), 9.61 (s, 1 H, NH), 8.34
(s, 1 H, NH), 7.96 (m, 1 H, naph), 7.75-7.70 (m, 3 H, naph), 7.67 (br s, 1
H, NH), 7.57-7.48 (m, 2 H, naph), 7.38-7.26 (m, 15 H, Tr), 7.25 (br s, 3 H,
 NH_2 and NH), 4.23 (s, 2 H, CH_2), 3.49 (dt, 2 H, CH_2 , $J = 5.6, 6.3$ Hz), 2.79
30 (t, 2 H, CH_2 , $J = 6.3$ Hz).

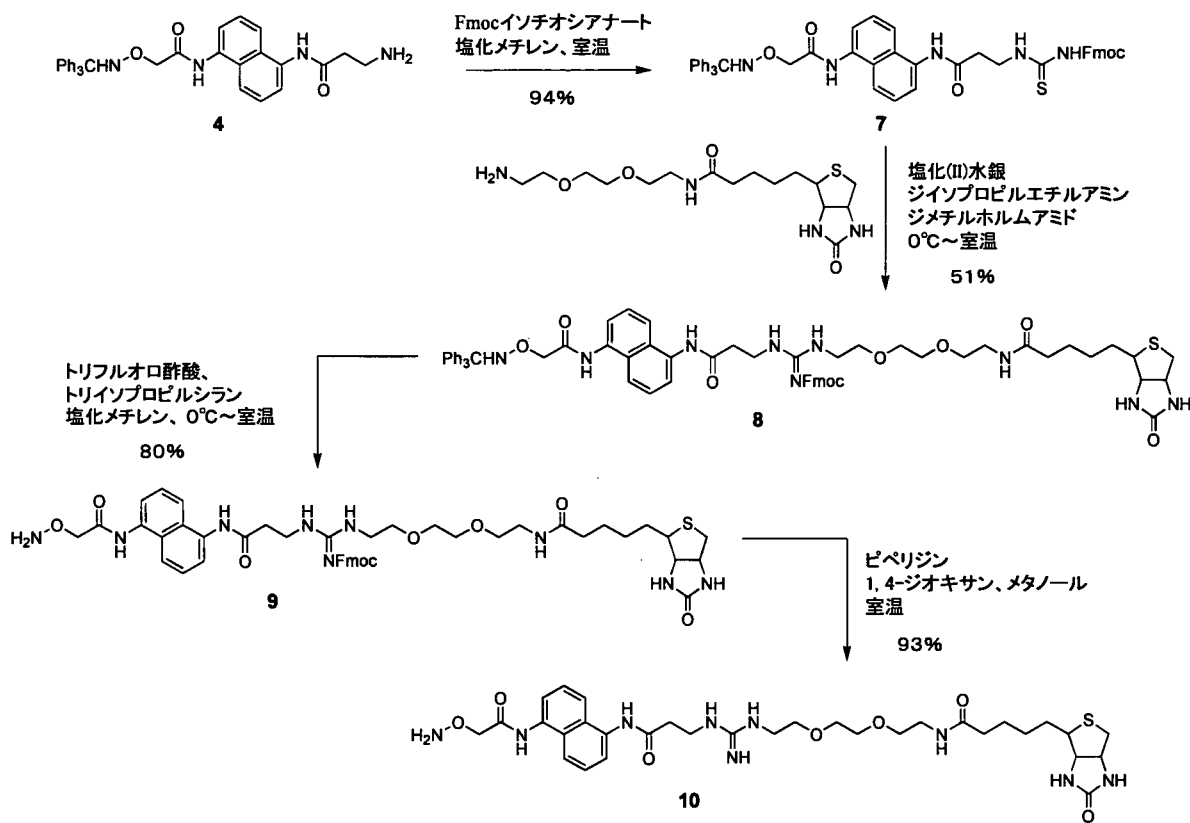
^{13}C NMR (67.8 MHz, DMSO- d_6) δ : 169.39 (C), 168.60 (C), 156.52 (C), 143.83
(C), 133.30 (C), 132.60 (C), 128.55 (CH), 128.33 (C), 128.22 (C), 127.40
(CH), 126.53 (CH), 125.17 (CH), 125.02 (CH), 121.93 (CH), 121.79 (CH),
120.36 (CH), 119.62 (CH), 73.49 (C), 73.14 (CH_2), 36.97 (CH_2), 34.88 (CH_2).

N⁵ - (アミノオキシアセチル) - N¹ - (2-グアニジノエチルカルボニル) - 1, 5-ジアミノナフタレン・2塩酸塩 (化合物6)

- アルゴン雰囲気下、N¹ - (2-グアニジノエチルカルボニル) - N⁵ - (トリ
チルアミノオキシアセチル) - 1, 5-ジアミノナフタレン (化合物5) 59 mg
5 (0.10 mmol) を塩化メチレン 4.0 ml に溶解し、濃塩酸 60 μ l を加え、
室温で 2.5 時間攪拌した。反応液中に生じた白色の沈殿物質を塩化メチレンで洗
浄した後に、エタノール (2 ml) とジエチルエーテル (3 ml) の混合溶液に懸
濁させ、沈殿を吸引濾過により濾取して標記化合物 (化合物6) 26 mg (収率 6
2%) を白色粉状物質として得た。
- 10 FAB-LRMS m/z 345.2 (MH⁺); FAB-HRMS 計算値: 345.1675 (C₁₆H₂₁N₆O₃ [MH⁺]), 実測
値: 345.1687.
- ¹H NMR (270 MHz, DMSO-d₆) δ : 11.01 (br s, 1 H, NH), 10.40 (s, 1 H, NHCO),
10.24 (s, 1 H, NHCO), 7.99 (t, 2 H, naph, J = 8.1 Hz), 7.78 (br t, 1 H, NH,
J = 5.8 Hz), 7.73-7.69 (m, 2 H, naph), 7.56 (dd, 1 H, naph, J = 4.0, 8.3
15 Hz), 7.53 (dd, 1 H, naph, J = 4.0, 7.9 Hz), 7.28 (br s, 4 H), 4.92 (s, 2 H,
CH₂), 3.50 (dt, 2 H, CH₂, J = 5.8, 6.3 Hz), 2.80 (t, 2 H, CH₂, J = 6.3 Hz)。
¹³C NMR (67.8 MHz, DMSO-d₆) δ : 169.50 (C), 166.87 (C), 156.81 (C), 133.43
(C), 132.58 (C), 128.53 (C), 128.47 (C), 125.25 (CH), 125.11 (CH), 122.13
(CH), 122.06 (CH), 120.76 (CH), 120.19 (CH), 72.15 (CH₂), 37.17 (CH₂),
20 35.18 (CH₂)。

a o N g - b i o t i n 試薬 (以下 a o N g - b i o ; 化合物 10) の合成

スキーム 2



5 N¹-[2-(N³-フルオレニルメチルオキシカルボニルチオウレイド)エチルカルボニル]-N⁵-(トリチルアミノオキシアセチル)-1,5-ジアミノナフタレン (化合物 7)

アルゴン雰囲気下、N¹-(2-アミノエチルカルボニル)-N⁵-(トリチルアミノオキシアセチル)-1,5-ジアミノナフタレン (化合物 4) (化合物 3 より前述の方法により合成、1.00 mmol) を塩化メチレン-アセトニトリルの混合溶液 (1 : 2) 15 ml に溶解した。別のガラス容器にフルオレニルメチルオキシカルボニルイソチオシアナート 310 mg (1.10 mmol) およびジイソプロピルエチルアミン 0.19 ml (1.10 mmol) を塩化メチレン 20 ml に溶解し、ここに上記化合物 4 の溶液をゆっくりと滴下して加え、さらに室温で 1 時間攪拌した。反応液を減圧下濃縮した後、生じた沈殿を酢酸エチル (15 ml) とヘキサン (30 ml) の混合溶液に懸濁させた。沈殿を吸引濾過により濾取して標記化合物 (化合物 7) 780 mg (収率 94%) を淡茶色粉状物質として得た。

FAB-LRMS m/z 825.2 (M⁺); FAB-HRMS 計算値 : 825.2985 (C₅₀H₄₃N₅O₅S [M⁺]), 実測値 : 825.2985.

¹H NMR (270 MHz, DMSO-d₆) δ : 11.42 (br s, 1 H, NH), 10.16 (br t, 1 H, NH),

J = 5.5 Hz), 10.07 (br s, 1 H, NH), 9.58 (br s, 1 H, NH), 8.35 (br s, 1 H, NH), 7.93 (m, 1 H, naph), 7.91-7.82 (m, 4 H, Fmoc), 7.73-7.67 (m, 3 H, naph), 7.52-7.38 (m, 4 H, naph and Fmoc), 7.36-7.24 (m, 17 H, Fmoc and Tr), 4.36-4.33 (m, 2 H, Fmoc-CH₂), 4.29-4.25 (m, 1 H, Fmoc-CH), 4.23 (s, 2 H, CH₂), 3.95 (dd, 2 H, CH₂, J = 5.5, 6.1 Hz), 2.89 (t, 2 H, CH₂, J = 6.1 Hz).
¹³C NMR (67.8 MHz, DMSO-d₆) δ: 179.14 (C), 169.96 (C), 168.71 (C), 153.10 (C), 143.98 (C), 143.10 (C), 140.50 (C), 133.47 (C), 132.71 (C), 128.70 (CH), 128.41 (C), 128.31 (C), 127.64 (CH), 127.56 (CH), 126.95 (CH), 126.69 (CH), 125.42 (CH), 125.34 (CH), 125.10 (CH), 121.93 (CH), 120.44 (CH), 119.97 (CH), 119.63 (CH), 73.64 (C), 73.31 (CH₂), 67.14 (CH₂), 45.99 (CH), 40.93 (CH₂), 34.19 (CH₂).

N¹-[2-(N³-{2-[2-(2-ビオチニルアミノエトキシ)エトキシ]エチル}-N²-フルオレニルメチルオキシカルボニルグアニジノ)エチルカルボニル]-N⁵-(トリチルアミノオキシアセチル)-1, 5-ジアミノナフタレン (化合物 8)

アルゴン雰囲気下、N¹-[2-(N³-フルオレニルメチルオキシカルボニルチオウレイド)エチルカルボニル]-N⁵-(トリチルアミノオキシアセチル)-1, 5-ジアミノナフタレン (化合物 7) 410 mg (0.50 mmol) をジメチルホルムアミド 15 ml に溶解し、0℃に冷却した。この溶液にジイソプロピルエチルアミン 0.26 ml (1.50 mmol) を加えた後、(+)-ビオチニル-3, 6-ジオキサオクタンジアミン・2/3 酢酸塩 310 mg (0.75 mmol) および塩化第二水銀 205 mg (0.75 mmol) のジメチルホルムアミド溶液 (7 ml) をゆっくりと滴下して加え、さらに 0℃で 1 時間攪拌した。反応液に酢酸エチル 80 ml を加えた後、セライト濾過により沈殿物を除去した。ろ液に酢酸エチルを加えて全量を 150 ml とし、水 50 ml で 4 回洗浄した。溶液を減圧下濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒: エタノール-クロロホルム) により精製して標記化合物 (化合物 8) 300 mg (収率 51%) を白色泡状物質として得た。

FAB-LRMS m/z 1166.6 (MH⁺); FAB-HRMS 計算値: 1166.5174 (C₆₆H₇₂N₉O₉S [MH⁺]), 実測値: 1166.5165。

¹H NMR (270 MHz, DMSO-d₆) δ: 10.05 (br s, 1 H, NH), 9.58 (br s, 1 H, NH), 8.35 (br s, 1 H, NH), 7.95-7.87 (m, 3 H, naph and Fmoc), 7.81 (br t, 1 H, NH, J = 5.6 Hz), 7.72-7.63 (m, 5 H, naph and Fmoc), 7.52-7.37 (m, 4 H, naph and Fmoc), 7.34-7.24 (m, 17 H, Fmoc and Tr), 6.40 (br s, 1 H, NH),

6.35 (br s, 1 H, NH), 4.30-4.23 (m, 6 H), 4.09 (m, 1 H), 3.51 (m, 8 H), 3.40-3.36 (m, 4 H), 3.18 (m, 2 H), 3.05 (m, 1 H), 2.82-2.76 (m, 3 H), 2.56 (d, 1 H, J = 12.2 Hz), 2.05 (t, 2 H, J = 7.3 Hz), 1.62-1.37 (m, 4 H), 1.33-1.27 (m, 2 H)。

- 5 N¹-[2-(N³-{2-[2-(2-ビオチニルアミノエトキシ)エトキシ]エチル}-N²-フルオレニルメチルオキシカルボニルグアニジノ)エチルカルボニル]-N⁵-(アミノオキシアセチル)-1, 5-ジアミノナフタレン (化合物9)

アルゴン雰囲気下、N¹-[2-(N³-{2-[2-(2-ビオチニルアミノエトキシ)エトキシ]エチル}-N²-フルオレニルメチルオキシカルボニルグアニジノ)エチルカルボニル]-N⁵-(トリチルアミノオキシアセチル)-1, 5-ジアミノナフタレン (化合物8) 292 mg (0.25 mmol) を塩化メチレン 10 ml に溶解し、トリフルオロ酢酸 280 μ l (3.8 mmol) およびトリイソプロピルシラン 510 μ l (2.5 mmol) を加えて室温で 30 分撹拌した。反応液にクロロホルム 60 ml を加え、飽和炭酸水素ナトリウム溶液 30 ml で 2 回、水 30 ml で 1 回、飽和食塩水 30 ml で 1 回洗浄し、硫酸ナトリウムにより乾燥した。有機層を減圧下濃縮した後、生じた沈殿をクロロホルム 2.5 ml とエタノール 2.5 ml の混合溶媒に溶解し、この溶液を撹拌させたジエチルエーテル 25 ml に滴下した。生じた白色の沈殿物質を吸引濾過により濾取して標記化合物 (化合物9) 184 mg (収率 80%) を白色粉状物質として得た。

- 20 FAB-LRMS m/z 924.4 (MH⁺); FAB-HRMS 計算値: 924.4078 (C₄₇H₅₈N₉O₉S [MH⁺]), 実測値: 924.4053.

¹H NMR (270 MHz, DMSO-d₆) δ : 10.17 (br s, 1 H, NH), 9.95 (br s, 1 H, NH), 7.97-7.89 (m, 4 H, naph and Fmoc), 7.82 (br t, 1 H, NH, J = 5.5 Hz), 7.71-7.66 (m, 4 H), 7.53 (t, 2 H, J = 7.6 Hz), 7.42 (t, 2 H, J = 7.3 Hz), 7.31 (m, 2 H), 6.41 (br s, 1 H, NH), 6.37 (br s, 1 H, NH), 4.46 (m, 2 H), 4.37 (s, 2 H, CH₂), 4.34-4.26 (m, 2 H), 4.10 (m, 1 H), 3.55-3.47 (m, 8 H), 3.39-3.34 (m, 4 H), 3.17 (m, 2 H), 3.05 (m, 1 H), 2.87 (m, 2 H), 2.79 (dd, 1 H, J = 5.3, 12.2 Hz), 2.56 (d, 1 H, J = 12.2 Hz), 2.04 (t, 2 H, J = 7.4 Hz), 1.62-1.37 (m, 4 H), 1.27 (m, 2 H).

30 ¹³C NMR (67.8 MHz, DMSO-d₆) δ : 172.05 (C), 169.16 (C), 162.59 (C), 143.41 (C), 140.64 (C), 133.36 (C), 133.16 (C), 128.92 (C), 128.54 (C), 127.65 (CH), 127.03 (CH), 125.31 (CH), 125.23 (CH), 125.04 (CH), 122.50 (CH), 122.17 (CH), 120.56 (CH), 120.38 (CH), 120.10 (CH), 73.88 (CH₂), 69.57 (CH₂), 69.29 (CH₂), 69.01 (CH₂), 67.02 (CH₂), 60.91 (CH), 59.06 (CH), 55.31

(CH), 46.22 (CH), 39.72 (CH₂), 38.26 (CH₂), 34.97 (CH₂), 28.08 (CH₂), 27.92 (CH₂), 25.14 (CH₂).

N¹-[2-(N³-{2-[2-(2-ビオチニルアミノエトキシ)エトキシ]エチル}グアニジノ)エチルカルボニル]-N⁵-(アミノオキシアセチル)-1, 5-ジ

5 アミノナフタレン (化合物 10)

アルゴン雰囲気下、N¹-[2-(N³-{2-[2-(2-ビオチニルアミノエトキシ)エトキシ]エチル}-N²-フルオレニルメチルオキシカルボニルグアニジノ)エチルカルボニル]-N⁵-(アミノオキシアセチル)-1, 5-ジアミノナフタレン (化合物 9) 50 mg (0.054 mmol) を 1, 4-ジオキササン 3 ml とメタノール 3 ml の混合溶媒に溶解し、ピペリジン 220 μl (2.2 mmol) を加えて室温で 20 時間攪拌した。反応液を減圧下濃縮した後、残渣を水 30 ml に溶解し、クロロホルム 20 ml で 6 回洗浄した。水層を減圧下濃縮後、凍結乾燥して標記化合物 (化合物 10) 35 mg (収率 93%) を白色綿状物質として得た。

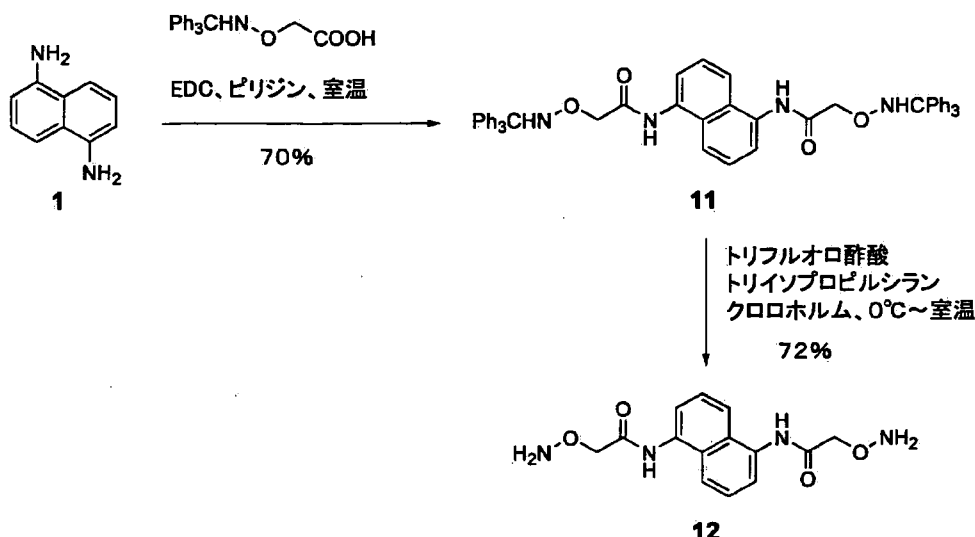
10 FAB-LRMS m/z 702.4 (MH⁺); FAB-HRMS 計算値: 702.3397 (C₃₂H₄₈N₉O₇S [MH⁺]), 実測値: 702.3405.

¹H NMR (270 MHz, DMSO-d₆) δ: 10.11 (br s, 1 H, NH), 9.88 (br s, 1 H, NH), 7.96 (d, 1 H, naph, J = 8.6 Hz), 7.90 (d, 1 H, naph, J = 8.3 Hz), 7.84 (t, 1 H, NH, J = 5.3 Hz), 7.71-7.65 (m, 2 H, naph), 7.58-7.50 (m, 2 H, naph), 6.57 (br s, 2 H, NH₂O), 6.41 (br s, 1 H, NH), 6.37 (br s, 1 H, NH), 4.30 (m, 1 H, bio), 4.27 (s, 2 H, CH₂), 4.11 (m, 1 H), 3.52 (m, 8 H), 3.39 (t, 2 H, J = 5.8 Hz), 3.31 (m, 2 H), 3.19 (m, 2 H), 3.07 (m, 1 H), 2.84-2.78 (m, 3 H), 2.57 (d, 1 H, J = 12.2 Hz), 2.06 (t, 2 H, J = 7.3 Hz), 1.64-1.41 (m, 4 H), 1.29 (m, 2 H).

25 ¹³C NMR (67.8 MHz, DMSO-d₆) δ: 172.10 (C), 169.73 (C), 169.69 (C), 162.59 (C), 155.86 (C), 133.39 (C), 133.30 (C), 129.03 (C), 128.47 (C), 125.31 (CH), 125.23 (CH), 122.63 (CH), 122.00 (CH), 120.53 (CH), 120.37 (CH), 74.30 (CH₂), 69.57 (CH₂), 69.31 (CH₂), 69.01 (CH₂), 68.46 (CH₂), 60.91 (CH), 59.06 (CH), 55.31 (CH), 40.96 (CH₂), 39.83 (CH₂), 38.25 (CH₂), 37.28 (CH₂), 34.98 (CH₂), 34.91 (CH₂), 28.08 (CH₂), 27.93 (CH₂), 25.15 (CH₂).

30 (実施例 2) Bis アミノオキシナフタレン試薬 (以下 a o N a o ; 化合物 12) の合成

スキーム 3



N¹, N⁵-ビス (トリチルアミノオキシアセチル) -1, 5-ジアミノナフタレン (化合物 11)

アルゴン雰囲気下、1, 5-ジアミノナフタレン (化合物 1) 158 mg (1.00 mmol) をピリジン 30 ml に溶解し、N-トリチルアミノオキシ酢酸 333 mg (1.00 mmol) および EDC [塩酸 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド] 230 mg (1.20 mmol) を加え、室温で攪拌した。反応開始 3 時間後、6 時間後にそれぞれ N-トリチルアミノオキシ酢酸 333 mg (1.00 mmol) および EDC 230 mg (1.20 mmol) を追加して、さらに室温で 16 時間攪拌した。反応液を減圧下濃縮した後、沈殿を水 20 ml に懸濁し、酢酸エチル 50 ml で 1 回、クロロホルム 20 ml で 3 回洗浄した。水層の白色沈殿物質を吸引濾過により濾取し、さらにエタノールおよびエーテルで洗浄して標記化合物 (化合物 11) 550 mg (収率 70%) を白色粉状物質として得た。

FAB-LRMS m/z (+NaI) 789.3 (MH^+), 811.3 ($[\text{M}^+\text{Na}]^+$); FAB-HRMS 計算値: 811.3260 ($\text{C}_{52}\text{H}_{44}\text{N}_4\text{O}_4\text{Na}$ $[\text{M}^+\text{Na}]^+$), 実測値: 811.3274。

^1H NMR (270 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 9.62 (br s, 2 H, NH), 8.36 (br s, 2 H, NH), 7.77-7.71 (m, 4 H, naph), 7.52 (t, 2 H, naph, $J = 7.9$ Hz), 7.41-7.25 (m, 30 H, Tr), 4.23 (s, 4 H, CH_2)。

^{13}C NMR (67.8 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 168.89 (C), 144.07 (C), 132.90 (C), 128.78 (CH), 127.63 (CH), 126.76 (CH), 125.43 (CH), 123.80 (C), 122.15 (CH), 120.11 (CH), 73.61 (C), 73.27 (CH_2)。

N¹, N⁵-ビス (アミノオキシアセチル) -1, 5-ジアミノナフタレン (化合物 1

2)

アルゴン雰囲気下、N¹, N⁵-ビス (トリチルアミノオキシアセチル) -1, 5-ジアミノナフタレン (化合物 11) 394 mg (0.50 mmol) をクロロホルム 20 ml に懸濁して氷冷し、トリフルオロ酢酸 0.94 ml (10.0 mmol) およびトリイソプロピルシラン 1.02 ml (5.0 mmol) を加えた。反応液を室温に戻して 3.5 時間攪拌した。反応液に水 40 ml およびクロロホルム 10 ml を加えて沈殿物を溶解した後に分液し、さらに水層をクロロホルム 30 ml で 2 回、酢酸エチル 30 ml で 1 回洗浄した。続いて、水層にアセトニトリル 60 ml を加えた後、DOWEW (1×4-100 (OH⁻フォーム) により中和した。DOWEW (1×4-100 を濾過して除き、さらに 80% のアセトニトリル水溶液で DOWEW (1×4-100 を洗浄した。溶液を合わせて減圧下濃縮した後、残渣を水 30 ml に溶解して C-18 カラムカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒: 水-アセトニトリル) により精製することで、標記化合物 (化合物 12) 109 mg (収率 72%) を白色粉状物質として得た。

FAB-LRMS m/z 305.2 (MH⁺); FAB-HRMS 計算値: 305.1250 (C₁₄H₁₇N₄O₄ [MH⁺]), 実測値: 305.1259.

¹H NMR (270 MHz, DMSO-d₆) δ: 9.88 (s, 2 H, NH), 7.93 (d, 2 H, naph, J = 8.6 Hz), 7.66 (d, 2 H, naph, J = 7.2 Hz), 7.54 (dd, 2 H, naph, J = 7.2, 8.6 Hz), 6.57 (s, 4 H, NH₂), 4.28 (s, 4 H, CH₂).

¹³C NMR (67.8 MHz, DMSO-d₆) δ: 169.75 (C), 133.35 (C), 129.11 (C), 125.41 (CH), 122.66 (CH), 120.75 (CH), 74.42 (CH₂).

(実施例 3) オリゴヌクレオチドの合成と精製

オリゴヌクレオチドの合成は Applied Biosystems 394 型 DNA/RNA シンセサイザー上で行った。0.2 又は 1 μmol スケールで合成した。HPLC には Gilson の装置を用い、分析は Waters 996 フォトダイオードアレイ検出器を用いて行った。

表 1

オリゴヌクレオチド (F-Lr17X)	逆相 HPLC 条件	保持時間 (分)
F-Lr17A	条件 1	14.0
F-Lr17G	条件 1	14.2
F-Lr17C	条件 1	10.7
F-Lr17U	条件 1	11.3

表 2

オリゴヌクレオチド (F-Lr17X)	イオン交換 HPLC 条件	保持時間 (分)
F-Lr17A	条件 2	16.9
F-Lr17G	条件 2	16.6
F-Lr17C	条件 2	15.8
F-Lr17U	条件 2	16.0

表 3

オリゴヌクレオチド (AS32Y)	HPLC 条件	保持時間 (分)
AS32A	条件 1	9.9
AS32G	条件 1	11.8
AS32C	条件 1	10.1
AS32T	条件 1	11.7

5 逆相 HPLC 溶液

A 溶液 5% アセトニトリル / 0.1M TEAA (pH 7.0)

B 溶液 25% アセトニトリル / 0.1M TEAA (pH 7.0)

カラム温度: 50°C

10 カラムは、 μ -ボンドスフィア (C-18) カラム $\Phi 3.9 \times 150$ mm (ウォーターズ製) を使用した。

イオン交換 HPLC 溶液

A 溶液 20% アセトニトリル

B 溶液 20% アセトニトリル、2M ギ酸アンモニウム

カラム温度: 50°C

15 カラムは、TSK-GEL DEAE-2SW $\Phi 4.6 \times 250$ mm (東ソー社) を使用した。

HPLC 条件

条件 1 B 溶液の% 20 → 40% / 20 分

条件 2 B 溶液の% 35 → 55% / 20 分

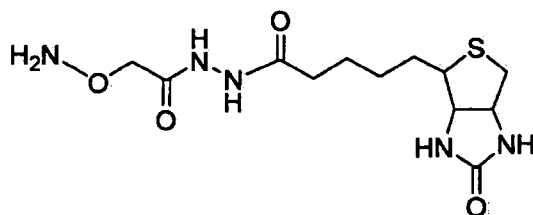
20 (実施例 4) オリゴヌクレオチド (RNA) の酸化反応

オリゴヌクレオチド (F-Lr17X: X=A, G, C, U) (1.6 nmol) を、100 mM リン酸バッファー (pH 7) 及び 800 μ M 過ヨウ素酸ナトリウムに溶解し (反応液総量 200 μ l)、37°C、90 分で酸化反応を行った。反応後、NAP10 カラム (GEヘルスケア) で脱塩し、得られた酸化オリゴヌクレ

オチド (F-L r 1 7 X o x) をUV定量した。

(実施例5) 酸化オリゴヌクレオチド (RNA) へのARP、a o N gの標識反応
一本鎖への反応

酸化オリゴヌクレオチド (F-L r 1 7 X o x ; X=A, G, C, U) (1 2 p
5 m o l) を1Mリン酸バッファー (pH7) 3 μ l 及び滅菌水21 μ l に溶解した
後、あらかじめ滅菌水に溶解させた2 mM 標識試薬 (ARP又は実施例1で調製
したa o N g) 6 μ l を加え、37℃で反応を開始した。ARP (A l d e h y d
e R e a c t i v e P r o b e ; D O J I N D O 社) は、以下の構造を有する。



10 一定時間後に2. 5 μ l をサンプリングしてl o a d i n g s o l u t i o n
m i x 5 μ l (50 mM EDTA, 10 M 尿素, 0. 1% BPB ; 4 μ l、
40 mM グルタルアルデヒド ; 1 μ l を混合して調製) に加えて反応を止めた。
その後、変性20%ポリアクリルアミドゲル (19 : 1) で解析した。各バンドの
フルオレセインの蛍光強度を測定し、反応効率を算出した。反応の結果を図2に示
15 した。

二本鎖での反応

二本鎖で反応を行う場合は、酸化オリゴヌクレオチド (F-L r 1 7 X o x)
(1 2 p m o l) に相補鎖AS 3 2 Y (2 4 p m o l) を加えて、その他の反応条
件は一本鎖の反応と同様に行った。

20 F-L r 1 7 X o x の一本鎖 (s s F-L r 1 7 X o x) 、及び相補鎖 (AS
3 2 Y) の2本鎖について、ARP又はa o N g との結合率を測定し、見かけの反
応速度定数を算出した。RNAの3' 末端の塩基の種類がいずれの場合でも、a o
N g はARPよりも高い反応性を示した。また、一本鎖よりも二本鎖を形成した場
合に、反応効率が上がることが明らかになった。

25 (実施例6) RNAの、酸化から標識の連続反応

実施例4、5では、あらかじめRNAを酸化して精製した後に標識反応を行った。
次にRNAの酸化から標識までを連続して行うことが可能であることを確かめる実験
を行った。RNA (F-L r 1 7 X ; X=A, G, C, U) (1 2 p m o l) を、
1 5 0 mMリン酸バッファー (pH7) 及び1 5 0 μ M過ヨウ素酸ナトリウムに溶
30 解し (反応液総量20 μ l) 、37℃、60分で酸化反応を行った。続いて2 mM

- DTT 5 μ l を添加して 37℃、30 分加温し、240 μ M a o N g (又は a o N g - b i o) 5 μ l を加えて 37℃ で標識反応を行った (反応液総量 30 μ l)。実施例 5 と同様に一定時間後にサンプリングして解析した。反応の結果、酸化に用いた過剰の過ヨウ素酸ナトリウムを還元することで、酸化から標識反応まで
- 5 連続して行えることを確認した。

(実施例 7) アベシックサイトを含むオリゴヌクレオチドの合成

- アベシックホスホロアミダイト試薬 (G l e n R e s . 社) を用いて、アベシックサイト (Z) を含むオリゴヌクレオチド (F-20Z) を合成した。F-20Z は、5' F-GAATTGCTTGGAAGAZGTTT 3' を表す。
- 10 合成したオリゴヌクレオチドは、通常の方法に従い濃アンモニア水で脱保護反応を行った後、40%酢酸 4 mL を加えて室温で 4 時間攪拌し TBDMS 基の脱保護を行った。反応後、減圧下酢酸を留去し、さらに水を加えて減圧下で溶媒を留去した。この操作を数回繰り返して酢酸を取り除いた。その後、滅菌水にオリゴヌクレオチドを溶解し、逆相 HPLC、イオン交換 HPLC によって精製した。F-20Z の
- 15 相補鎖となる S p 3 5 も同様に合成し精製した (表 4、表 5)。S p 3 5 C は、3' CGAAAGTAACCTTAACGAACCTTCTCCAAAGAAC GA 5' を表す。各 HPLC の条件は、F-L r 1 7 X 及び A S 3 2 Y の精製と同様とした。

表 4

オリゴヌクレオチド	逆相 HPLC 条件	保持時間 (分)
F-20Z	条件 1	17.8
Sp35C	条件 1	13.1

20

表 5

オリゴヌクレオチド	イオン交換 HPLC 条件	保持時間 (分)
F-20Z	条件 3	18.8
Sp35C	条件 2	11.3

HPLC 条件

- 条件 1 B 溶液の% 20→40%/20 分
- 25 条件 2 B 溶液の% 35→55%/20 分
- 条件 3 B 溶液の% 30→50%/20 分

(実施例 8) アベシックサイトを含むオリゴヌクレオチドの酸化

実施例 7 で調製したアベシックサイトを含むオリゴヌクレオチド F-20Z

(2.6 nmol) を、100 mM リン酸バッファー (pH 7) 及び 10 mM 過ヨウ素酸ナトリウムに溶解し、37℃、60分で酸化反応を行った。反応後、NAP5 カラム (GEヘルスケア) で脱塩し、濃縮後、変性20%ポリアクリルアミドゲル (19:1) によって精製した。ゲル片からは YMC カートリッジ (100 mg/1 ml) を用いて脱塩した。得られた酸化オリゴヌクレオチド (F-20Zox) を UV で定量し、反応に供した。

(実施例 9) アペイシックサイトへの ARP、aonNg の標識反応

一本鎖への反応

酸化された F-20Zox (12 pmol) を 1 M リン酸緩衝液 (pH 7) 3 μ l 及び滅菌水 15 μ l に溶解し、90℃で1分加熱し氷冷した。10秒後に室温で5分放置して37℃で5分間プレインキュベーションした。続いて、あらかじめ滅菌水に溶解しておいた標識試薬 (5 mM ARP 又は aonNg) 12 μ l を加えて37℃、42℃又は47℃で標識反応を開始した。一定時間後に2.5 μ l をサンプリングして loading solution mix 5 μ l (50 mM EDTA, 10 M 尿素, 0.1% BPB; 4 μ l、200 mM グルタルアルデヒド; 1 μ l を混合して調製) に加えて反応を止めた。その後、変性20%ポリアクリルアミドゲル (19:1) で解析した。各バンドのフルオレセインの蛍光強度を測定し、反応効率を算出した。反応の結果を図3に示す。

二本鎖での反応

二本鎖で反応を行う場合は、酸化オリゴヌクレオチド (F-20Zox) (12 pmol) に相補鎖 Sp35C (14.4 pmol) を加え、その他の反応条件は一本鎖の反応と同様に行った。反応の結果を図3に示す。

F-20Z 中のアペイシックサイト Z に対して試薬が反応した。DNA に対しても、aonNg の方が高い反応性を示した。特に二本鎖に対しては ARP の反応効率は一本鎖と同じであったが、aonNg では反応効率が大きく向上した。

(実施例 10) 2'-デオキシウリジン (dU) を含むオリゴヌクレオチドの合成と精製

5' 末端がフルオレセインで標識され、dU を鎖内にもったオリゴヌクレオチド (F-20dU) およびその相補鎖 (Sp20dU) は、2'-デオキシウリジンホスホロアミダイト試薬 (Glen Res. 社) を用いて DNA 自動合成機によって合成した。F-20dU は、5' F-GAATTGCTdUGGAAGAGGTTT 3' を、Sp20dU は、3' CTTAACGAdUCCTTCTCCAAA 5' を表す。合成オリゴヌクレオチドは通常の方法に従って脱保護した後、逆相 HPLC で分取、精製した (表6)。HPLC の条件などを以下に示す。

表 6

オリゴヌクレオチド	逆相 HPLC 条件	保持時間 (分)
F - 20 d U	条件 4	15.3
S p 20 d U	条件 1	10.2

逆相 HPLC 溶液

A 溶液 5% アセトニトリル / 0.1 M TEAA (pH 7.0) ;

5 B 溶液 25% アセトニトリル / 0.1 M TEAA (pH 7.0)

カラム温度 : 室温

カラムは、Inertsil ODS-3 (C-18) カラム $\Phi 3.0 \times 300$ mm (GL Science 社) を使用した。

HPLC 条件

10 条件 4 B 溶液の% 40 → 60% / 20 分

(実施例 11) 2' - デオキシウリジンを含む DNA への ARP、a o N g、a o N g - b i o の標識反応

本発明の化合物が 2' - デオキシウリジン (d U) とウラシル DNA グリコシラーゼ (UDG) から生成したアベシックサイトに反応するかどうかを評価する実験を行った。

d U を含む DNA、F - 20 d U (12 p m o l) と、その相補鎖 (S p 35 C ; 24 p m o l) を、UDG バッファー (x 10, 3 μ l) を含む溶液 (総量 29.5 μ l) に溶解させた。S p 35 C は、3' CGAAAGTAACCTTAACGAACCTTCTCCAAAGAACGA 5' を表す。反応液を 90℃ で 1 分加熱し氷冷した後、37℃ で 5 分間プレインキュベーションし、そこに UDG (1 u n i t, 0.5 μ l) を加え、総量 30 μ l で 37℃、60 分間反応を行った。その後、90℃ で 1 分加熱して酵素を失活させ、氷冷で 10 分、室温で 5 分放置した。この反応液にあらかじめ溶解させた 10 mM に調整した標識試薬 (ARP、a o N g、a o N g - b i o) 6 μ l を加えて 37℃ で標識反応を開始した。一定時間後に 2.5 μ l をサンプリングして loading solution mix 5 μ l (50 mM EDTA, 10 M 尿素, 0.1% BPB ; 4 μ l、200 mM グルタルアルデヒド ; 1 μ l を混合して調製) に加えて反応を止めた。その後、変性 20% ポリアクリルアミドゲル (19 : 1) で解析した (図 4)。各バンドのフルオレセインの蛍光強度を測定し、反応効率を算出した (図 4)。

30 a o N g、ARP、a o N g - b i o の反応速度定数は、それぞれ 0.51 min⁻¹、0.03 min⁻¹、0.17 min⁻¹ であったことから、a o N g および

a o N g - b i oの方が高い反応効率を示すことが明らかとなった。

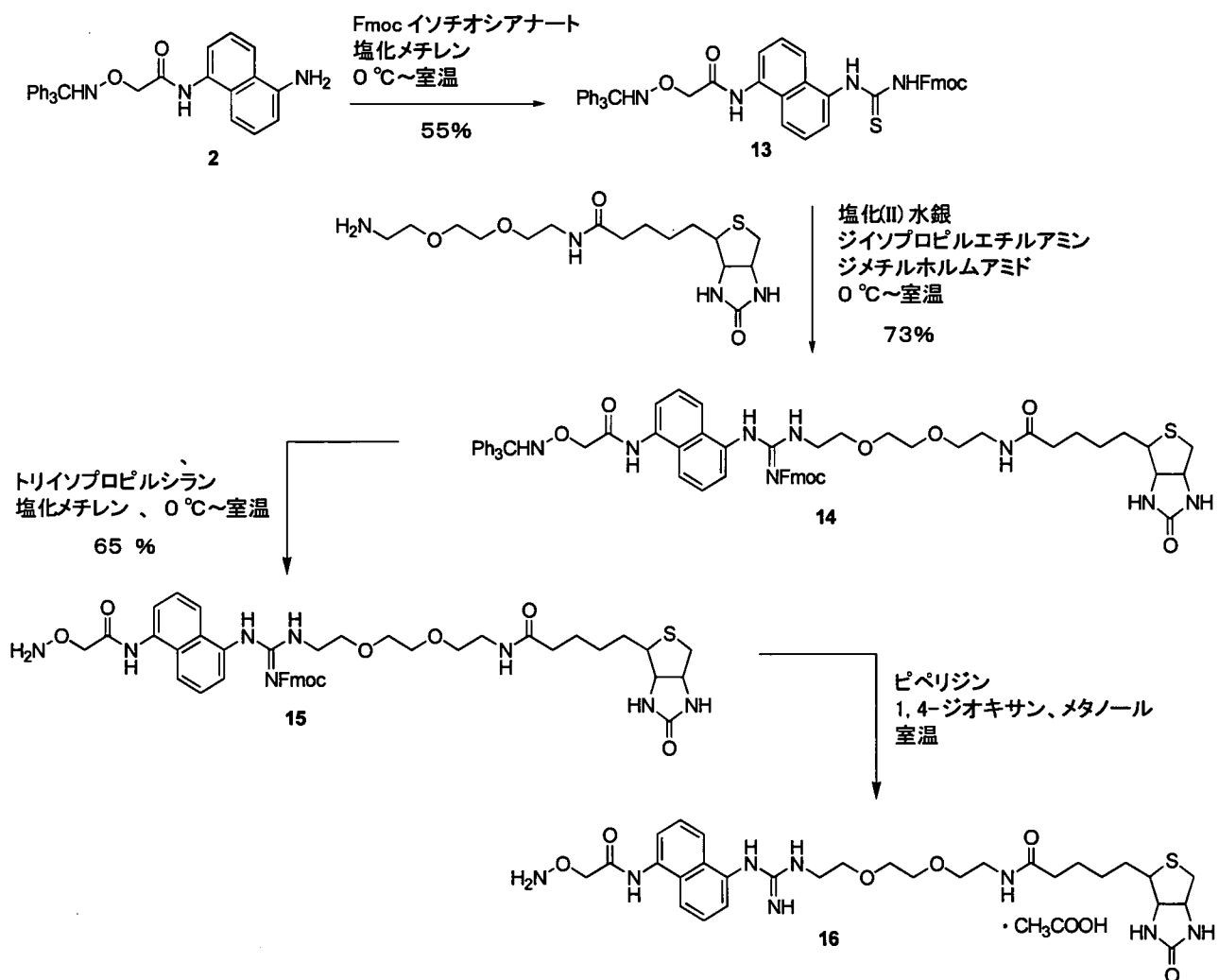
(実施例12) a o N a oのDNAへの反応

d Uを含むDNA、F-20 d U (12 p m o l) と、その相補鎖 (S p 20 d U ; 13. 2 p m o l) を、UDGバッファー (x 10, 3 μ l) を含む溶液 (総
5 量29. 5 μ l) に溶解させた。S p 20 d Uは、3' C T T A A C G A d U C
C T T C T C C A A A 5' を表す。反応液を90℃で1分加熱し氷冷した後、3
7℃で5分間プレインキュベーションし、そこにUDG (1 u n i t, 0. 5 μ
l) を加え、総量30 μ lで37℃、60分間反応を行った。その後、90℃で1
分加熱して酵素を失活させ、氷冷で10分、室温で5分放置した。この反応液にあ
10 らかじめ溶解させた2 mM a o N a o 6 μ lを加えて37℃で標識反応を開始
した。同様の反応をF-20 d U、1本鎖のみでも行った。一定時間後に3 μ lを
サンプリングしてl o a d i n g s o l u t i o n m i x 5 μ l (50 mM
E D T A, 10 M 尿素, 0. 1% B P B ; 4 μ l、200 mM グルタルアル
デヒド ; 1 μ lを混合して調製) に加えて反応を止めた。その後、変性20%ポリ
15 アクリルアミドゲル (19 : 1) で解析した (図5)。各バンドのフルオレセイン
の蛍光強度を測定し、反応効率を算出した (図5)。a o N a oは2本鎖間を架橋
するように反応できることを確認した。

(実施例 13) a o N d g - b i o t i n 試薬 (以下 a o N d g - b i o ; 化合物

16) の合成

スキーム 4



5 1- (N³-フルオレニルメチルオキシカルボニルチオウレイド) - N⁵- (トリ
チルアミノオキシアセチル) - 5- アミノナフタレン (化合物 13)

- アルゴン雰囲気下、フルオレニルメチルオキシカルボニルイソチオシアナート 8
 50 mg (3.01 mmol) およびジイソプロピルエチルアミン 0.52 ml
 (3.01 mmol) を塩化メチレン 30 ml に溶解し、0℃に冷却した。ここに
 10 N¹- (トリチルアミノオキシアセチル) - 1, 5- ジアミノナフタレン (化合物
 2) 1.19 g (2.51 mmol) の塩化メチレン溶液 (30 ml) をゆっくり
 と滴下して加え、さらに室温に戻して 1.5 時間攪拌した。反応液を減圧下濃縮後、
 シリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒: 酢酸エチル-ヘキサン) により
 精製して標記化合物 (化合物 13) 1.04 g (収率 55%) を白色固体状物質と

して得た。

FAB-LRMS m/z 755.3 (MH^+), 777.2 ($[M+Na]^+$); FAB-HRMS 計算値: 777.2511 ($C_{47}H_{38}N_4O_4SNa [M+Na]^+$), 実測値: 777.2486.

^1H NMR (270 MHz, DMSO- d_6) δ : 11.81 (s, 1 H, NH), 11.60 (s, 1 H, NH), 9.66 (s, 1 H, NH),

8.37 (s, 1 H, NH), 7.94–7.85 (m, 6 H), 7.78–7.68 (m, 3 H), 7.61–7.53 (m, 1 H), 7.49–7.41 (m, 2 H), 7.38–7.27 (m, 17 H), 4.49 (d, 2 H, Fmoc- CH_2 , $J = 7.3$ Hz), 4.37 (t, 1 H, Fmoc-CH, $J = 7.3$ Hz), 4.23 (s, 2 H, CH_2).

^{13}C NMR (67.8 MHz, DMSO- d_6) δ : 180.59 (C), 168.96 (C), 153.56 (C), 144.08 (C), 143.23 (C), 140.65 (C), 134.68 (C), 133.14 (C), 129.79 (C), 128.79 (CH), 128.61 (C), 127.77 (CH), 127.64 (CH), 127.07 (CH), 126.77 (CH), 126.10 (CH), 125.58 (CH), 125.43 (CH), 125.31 (CH), 122.34 (CH), 121.98 (CH), 121.28 (CH), 120.08 (CH), 119.93 (CH), 73.62 (C), 73.30 (CH_2), 67.42 (CH_2), 45.99 (CH).

15 1- (N³- { 2- [2- (2-ビオチニルアミノエトキシ) エトキシ] エチル} -N²-フルオレニルメチルオキシカルボニルグアニジノ) -N⁵- (トリチルアミノオキシアセチル) -5-アミノナフタレン (化合物14)

アルゴン雰囲気下、1- (N³- フルオレニルメチルオキシカルボニルチオウレイド) - N⁵- (トリチルアミノオキシアセチル) - 5- アミノナフタレン (化合物13) 910 mg (1.20 mmol) をジメチルホルムアミド20 ml に溶解して0℃に冷却した。この溶液に (+) - ビオチニル- 3, 6- ジオキサオクタンジアミン540 mg (1.44 mmol)、塩化第二水銀360 mg (1.32 mmol) およびジイソプロピルエチルアミン0.50 ml (2.88 mmol) のジメチルホルムアミド溶液 (15 ml) をゆっくりと滴下して加え、さらに0℃で1.5時間攪拌した。反応液に酢酸エチル150 mlを加えた後、セライト濾過により沈殿物を除去した。ろ液に酢酸エチルを加えて全量を350 mlとし、水120 mlで4回、飽和食塩水120 mlで1回洗浄し、硫酸ナトリウムにより乾燥した。溶液を減圧下濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒: エタノール-クロロホルム) により精製して標記化合物 (化合物14) 963 mg (収率73%) を白色泡状物質として得た。

FAB-LRMS m/z 1095.5 (MH^+); FAB-HRMS 計算値: 1095.4803 ($C_{63}H_{67}N_8O_8S [MH^+]$), 実測値: 1095.4796.

^1H NMR (270 MHz, DMSO- d_6) δ : 9.61 (br s, 1 H, NH), 8.33 (br s, 1 H, NH), 7.89–7.75 (m, 6 H), 7.61–7.47 (m, 3 H), 7.42–7.25 (m, 20 H), 6.39 (br s, 1

H, NH), 6.33 (br s, 1 H, NH), 4.30-4.24 (m, 6 H), 4.10 (m, 1 H), 3.49 (m, 6 H), 3.38-3.33 (m, 4 H), 3.16 (m, 2 H), 3.06 (m, 1 H), 2.79 (dd, 1 H, J = 5.3, 12.2 Hz), 2.56 (d, 1 H, J = 12.2 Hz), 2.04 (t, 2 H, J = 7.3 Hz), 1.63-1.37 (m, 4 H), 1.32-1.23 (m, 2 H)。

- 5 1-(N³-{2-[2-(2-ビオチニルアミノエトキシ)エトキシ]エチル}-N²-フルオレニルメチルオキシカルボニルグアニジノ)-N⁵-(アミノオキシアセチル)-5-アミノナフタレン (化合物 15)

- アルゴン雰囲気下、1-(N³-{2-[2-(2-ビオチニルアミノエトキシ)エトキシ]エチル}-N²-フルオレニルメチルオキシカルボニルグアニジノ)-N⁵-(トリチルアミノオキシアセチル)-5-アミノナフタレン (化合物 14) 170 mg (0.16 mmol) を塩化メチレン 15 ml に溶解して 0℃ に冷却し、トリフルオロ酢酸 180 μl (2.4 mmol) およびトリイソプロピルシラン 330 μl (1.6 mmol) を加えた。反応液を室温に戻して 30 分攪拌した後、反応液にクロロホルム 65 ml を加え、飽和炭酸水素ナトリウム溶液 35 ml で 1 回、水 35 ml で 1 回、飽和食塩水 35 ml で 1 回洗浄し、硫酸ナトリウムにより乾燥した。溶液を減圧下濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒: メタノール-クロロホルム) により精製して標記化合物 (化合物 15) 86 mg (収率 65%) を白色泡状物質として得た。

- FAB-LRMS m/z 853.4 (MH⁺); FAB-HRMS 計算値: 853.3707 (C₄₄H₅₃N₈O₈S [MH⁺]), 実測値: 853.3713.

- ¹H NMR (270 MHz, DMSO-d₆) δ: 9.90 (br s, 1 H, NH), 8.02 (m, 1 H), 7.89-7.71 (m, 5 H), 7.78 (br s, 1 H, NH), 7.62-7.31 (m, 8 H), 6.56 (br s, 2 H, NH₂), 6.39 (br s, 1 H, NH), 6.33 (br s, 1 H, NH), 4.29-4.26 (m, 6 H), 4.10 (m, 1 H), 3.48 (m, 6 H), 3.36 (m, 4 H), 3.16 (m, 2 H), 3.06 (m, 1 H), 2.80 (dd, 1 H, J = 5.0, 12.5 Hz), 2.56 (d, 1 H, J = 12.5 Hz), 2.04 (t, 2 H, J = 7.3 Hz), 1.66-1.38 (m, 4 H), 1.28 (m, 2 H).

- ¹³C NMR (67.8 MHz, DMSO-d₆) δ: 172.07 (C), 169.68 (C), 162.64 (C), 144.15 (C), 140.63 (C), 127.45 (CH), 126.98 (CH), 125.04 (CH), 120.04 (CH), 74.37 (CH₂), 69.47 (CH₂), 69.14 (CH₂), 68.81 (CH₂), 66.04 (CH₂), 60.99 (CH), 59.15 (CH), 55.37 (CH), 46.67 (CH), 39.79 (CH₂), 38.37 (CH₂), 35.04 (CH₂), 28.14 (CH₂), 27.99 (CH₂), 25.21 (CH₂).

1-(N³-{2-[2-(2-ビオチニルアミノエトキシ)エトキシ]エチル}グアニジノ)-N⁵-(アミノオキシアセチル)-5-アミノナフタレン (化合物 16、酢酸塩)

アルゴン雰囲気下、1-(N³-{2-[2-(2-ビオチニルアミノエトキシ)エトキシ]エチル}-N²-フルオレニルメチルオキシカルボニルグアニジノ)-N⁵-(アミノオキシアセチル)-5-アミノナフタレン(化合物15) 85 mg (0.10 mmol)を1, 4-ジオキサン4 mlとメタノール4 mlの混合溶媒に溶解し、ピペリジン0.40 ml (4.0 mmol)を加えて室温で16時間撹拌した。反応液を減圧下濃縮した後、残渣を水35 mlに溶解し、酢酸エチル15 mlで3回洗浄した。水層を減圧下濃縮後、C18カートリッジカラムクロマトグラフィー(溶出溶媒: アセトニトリル-0.1M TEAA溶液)により精製して粗精製物(52 mg)を得た。この粗精製物の一部を2%酢酸水溶液5 mlに溶解して、再度C18カートリッジカラムクロマトグラフィー(溶出溶媒: アセトニトリル-水)により精製して標記化合物(化合物16、酢酸塩) 9.2 mgを白色綿状物質として得た。

FAB-LRMS m/z 631.3 (MH⁺); FAB-HRMS 計算値: 631.3026 (C₂₉H₄₃N₈O₆S [MH⁺]), 実測値: 631.3005.

¹H NMR (270 MHz, DMSO-d₆) δ: 9.94 (s, 1 H, NH), 9.64 (br s, 1 H, NH), 8.07 (m, 1 H, nap), 7.82 (m, 1 H), 7.81 (d, 1 H, J = 8.2 Hz, nap), 7.73 (d, 1 H, J = 6.9 Hz, nap), 7.62 (m, 2 H, nap), 7.55 (m, 2 H), 7.51 (m, 1 H, nap), 6.55 (s, 2 H, NH₂O), 6.39 (s, 1 H, NH), 6.35 (s, 1 H, NH), 4.31 (m, 1 H), 4.29 (s, 2 H, CH₂), 4.12 (br dd, 1 H, J = 4.3, 7.6 Hz), 3.58 (m, 6 H), 3.42 (m, 4 H), 3.21 (m, 2 H), 3.09 (m, 1 H), 2.81 (dd, 1 H, J = 5.0, 12.5 Hz), 2.57 (d, 1 H, J = 12.5 Hz), 2.07 (t, 2 H, J = 7.3 Hz), 1.64-1.42 (m, 4 H), 1.30 (m, 2 H).

¹³C NMR (67.8 MHz, DMSO-d₆) δ: 172.10 (C), 169.68 (C), 162.59 (C), 155.75 (C), 133.72 (C), 130.44 (C), 129.39 (C), 126.32 (CH), 125.81 (CH), 123.00 (CH), 119.87 (CH), 74.27 (CH₂), 69.66 (CH₂), 69.38 (CH₂), 69.06 (CH₂), 68.52 (CH₂), 60.92 (CH), 59.08 (C), 55.31 (CH), 41.22 (CH₂), 39.73 (CH₂), 38.27 (CH₂), 35.00 (CH₂), 28.08 (CH₂), 27.94 (CH₂), 25.16 (CH₂).

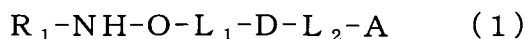
(実施例14)

実施例11と同様のオリゴヌクレオチドを用い、同じ条件でa o N d g - b i oの反応効率を調べた。反応の結果、a o N d g - b i oの反応速度定数は、0.23 min⁻¹であったことから、a o N g、a o N g - b i oと同様に、ARPよりもa o N d g - b i oの方が高い反応効率を示すことが明らかとなった。

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

請 求 の 範 囲

1. 一般式 1 :

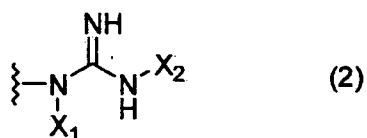


- 5 (式中、 R_1 は、水素原子、アルキル基又はアミノ基の保護基であり、 D は、2価の芳香族基であり、 L_1 は、直接結合又はリンカー基であり、 L_2 は、直接結合又はリンカー基であり、 A は親水性基を含む有機基である)
で表される化合物又はその塩。

- 10 2. A が、親水性基として、置換又は無置換のグアニジノ基、置換又は無置換のポリエチレングリコール基、カルボキシ基、アミノオキシ基及びヒドロキシ基からなる群から選択される少なくとも1つの基を含む、請求項1記載の化合物又はその塩。

- 15 3. A が、親水性基として、置換又は無置換のグアニジノ基を含む、請求項2記載の化合物又はその塩。

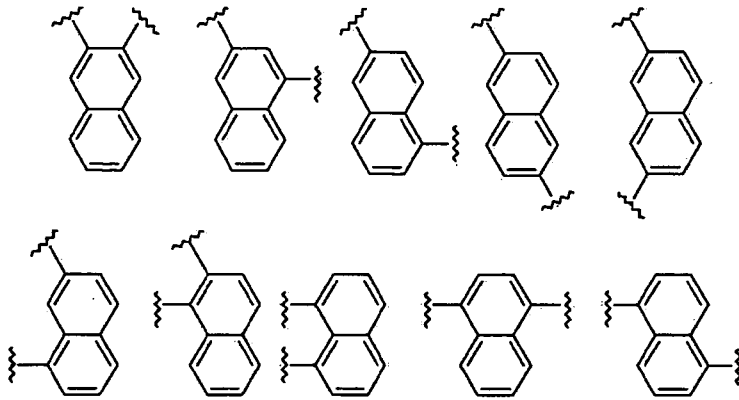
4. A が、以下の一般式 2 :



- 20 (式中、 X_1 及び X_2 は、水素原子又は有機基である)
で表される、請求項1～3のいずれか1項記載の化合物又はその塩。

5. D が、置換若しくは無置換のフェニレン基、置換若しくは無置換のアントリレン基、置換若しくは無置換のナフチレン基、置換若しくは無置換のフェナントリレン基、置換若しくは無置換のアントラキノリレン、又は置換若しくは無置換のアク
25 リジニレンである、請求項1～4のいずれか1項記載の化合物又はその塩。

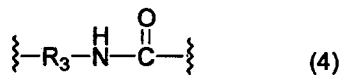
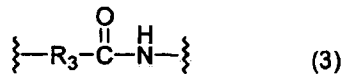
6. D が、以下の一般式 :



(式中、一方の結合部位が L_1 又は O に結合し、他方の結合部位が L_2 又は A に結合する)

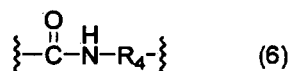
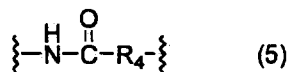
- 5 で表される 2 価の芳香族基、及びこれらの芳香族基において芳香環が 1 ～ 3 個の置換基を有する芳香族基から選択される、請求項 5 記載の化合物又はその塩。

7. L_1 が、以下の一般式 3 又は 4 :



- 10 (式中、 R_3 は、置換若しくは無置換の C_{1-9} アルキレン基又は $-(CH_2)_o-$ $(OCH_2CH_2)_p-(CH_2)_q-$ であり、ここで、 $o \sim q$ は、それぞれ独立して 0 ～ 15 の整数であり、 $o + p + q$ は、1 ～ 15 である)

のいずれかで表される 2 価の基であり、 L_2 が、以下の一般式 5 又は 6 :

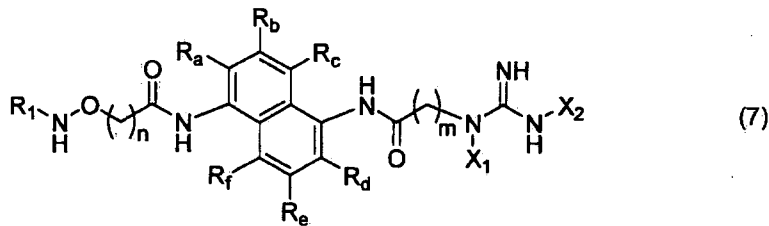


- 15 (式中、 R_4 は、置換若しくは無置換の C_{1-9} アルキレン基又は $-(CH_2)_r-$ $(OCH_2CH_2)_s-(CH_2)_t-$ であり、ここで、 $r \sim t$ は、それぞれ独立して 0 ～ 15 の整数であり、 $r + s + t$ は、1 ～ 15 であるである)

のいずれかで表される 2 価の基である、請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項記載の化合物

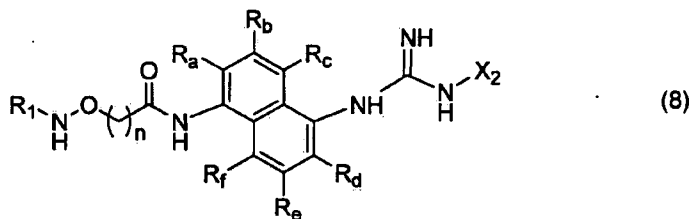
又はその塩。

8. 以下の一般式 7 :



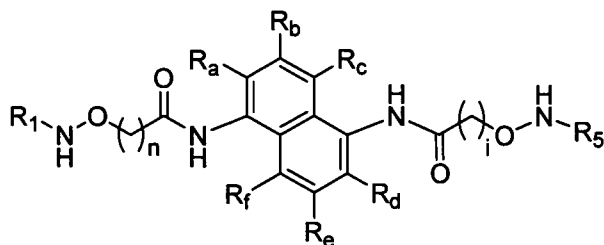
- 5 (式中、 R_1 は、水素原子又はアミノ基の保護基であり、 n は、1～5の整数であり、 m は、1～5の整数であり、 $R_a \sim R_f$ は、それぞれ独立して、水素原子又は置換基であり、 X_1 及び X_2 は、水素原子又は有機基である)
で表される、請求項1記載の化合物又はその塩。

10 9. 以下の一般式 8 :



- (式中、 R_1 は、水素原子又はアミノ基の保護基であり、 n は、1～5の整数であり、 $R_a \sim R_f$ は、それぞれ独立して、水素原子又は置換基であり、 X_2 は、水素原子又は有機基である)
15 で表される、請求項1記載の化合物又はその塩。

10. 以下の一般式 :

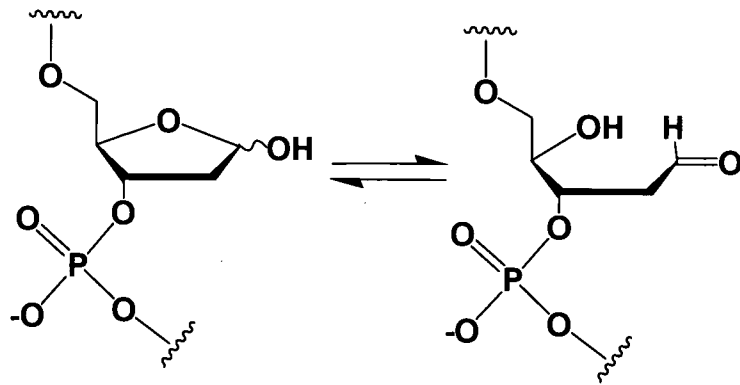


- (式中、 R_1 及び R_5 は、それぞれ独立して、水素原子又はアミノ基の保護基であり、 n 及び i は、それぞれ独立して、1～5の整数であり、 $R_a \sim R_f$ は、それぞれ独立して、水素原子又は置換基である)
20 で表される、請求項1記載の化合物又はその塩。

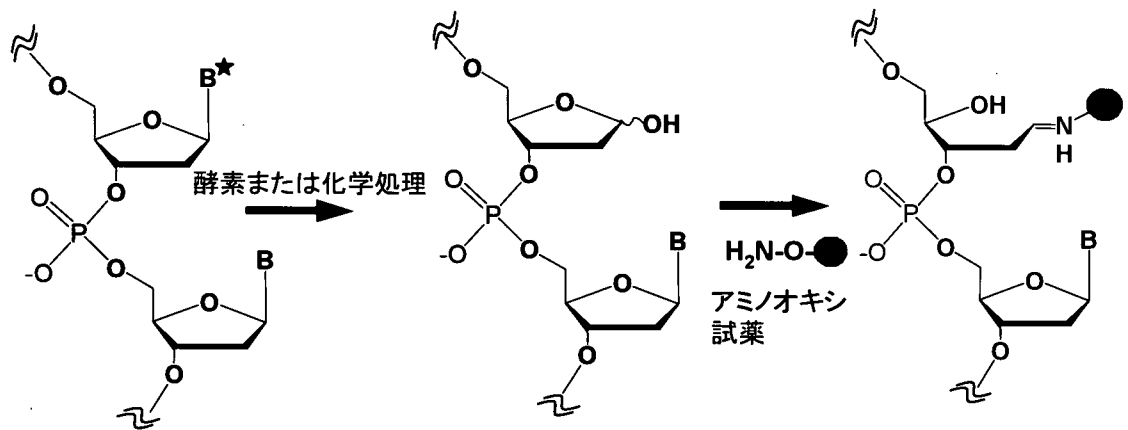
- 1 1. Aが標識基をさらに含む、請求項1～9のいずれか1項記載の化合物又はその塩。
- 5 1 2. X_1 及び X_2 の少なくとも一方が有機基であり、該有機基が標識基である、請求項4、8、又は9記載の化合物又はその塩。
- 1 3. アルデヒド基、ヘミアセタール基、カルボキシル基又はケト基を有する生体分子を標識するための試薬であって、請求項1 1又は1 2記載の化合物又はその塩
- 10 を含む前記試薬。
- 1 4. 請求項1 1又は1 2記載の化合物と、アルデヒド基、ヘミアセタール基、カルボキシル基又はケト基を有する生体分子とが結合してなる標識化生体分子であって、該化合物のアミノオキシ基と該生体分子のアルデヒド基、ヘミアセタール基、
- 15 カルボキシル基又はケト基とが反応して共有結合を形成している、前記標識化生体分子。
- 1 5. アルデヒド基、ヘミアセタール基、カルボキシル基又はケト基を有する生体分子を固定化するための生体分子固定化用支持体であって、担体及び該担体表面に
- 20 存在する請求項1～1 0のいずれか1項記載の化合物又はその塩の層を含む、前記支持体。

図 1

a



b



B* 損傷塩基(デオキシウリジンなど)または非天然型核酸誘導体

c

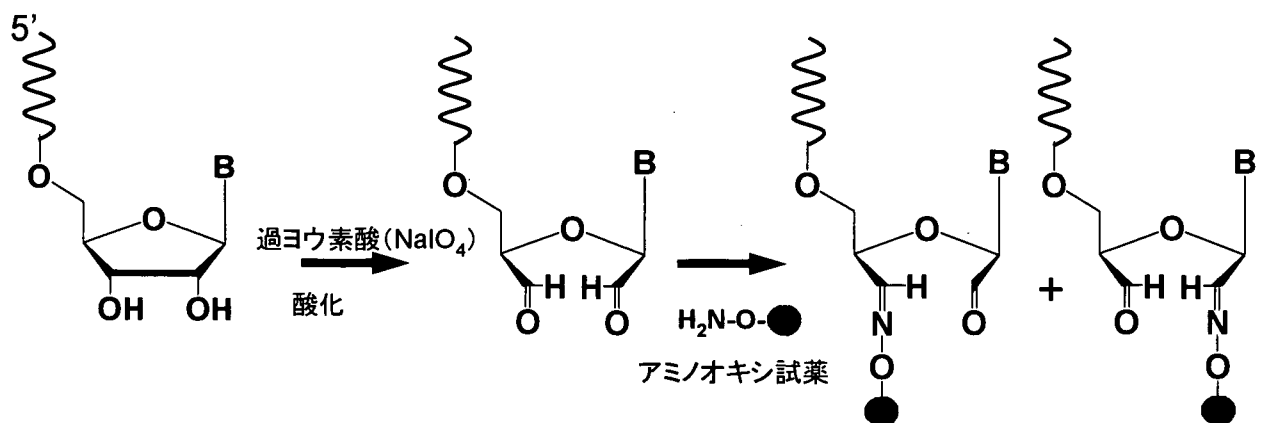


図 2

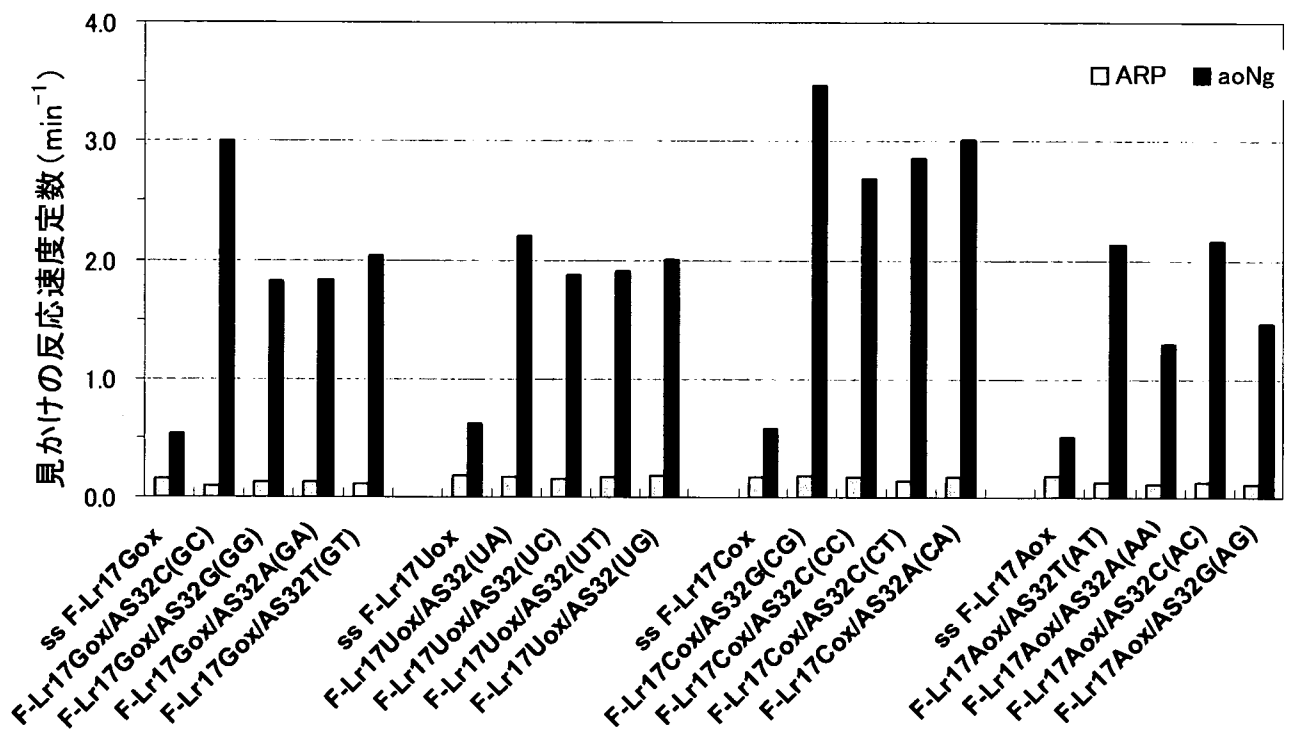


図 3

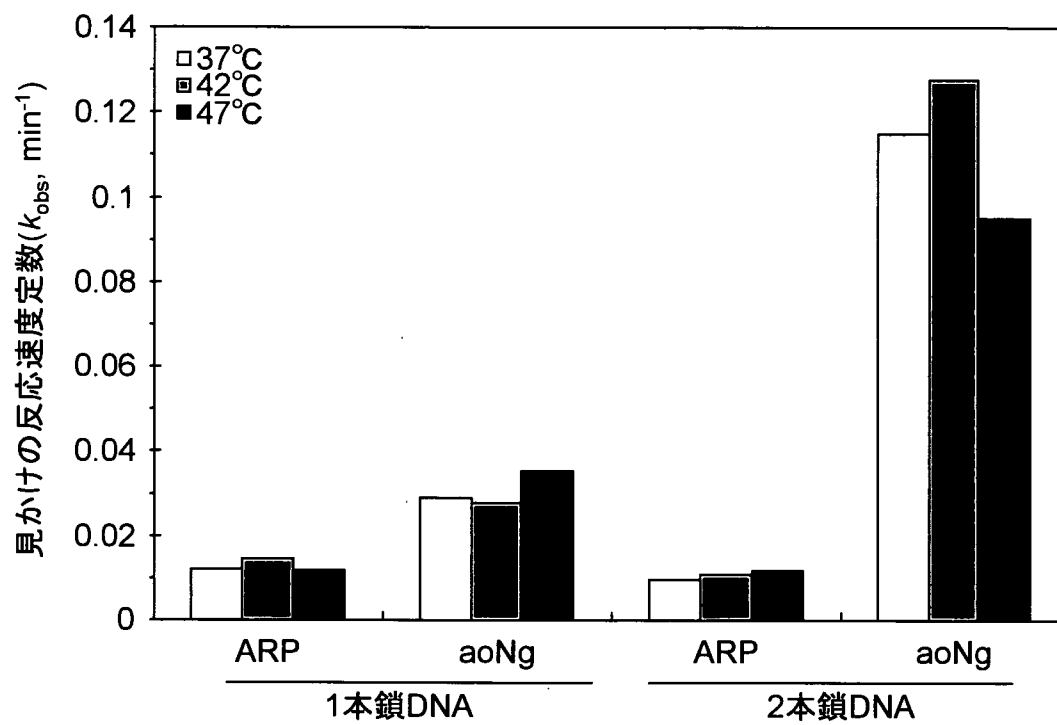


図 4

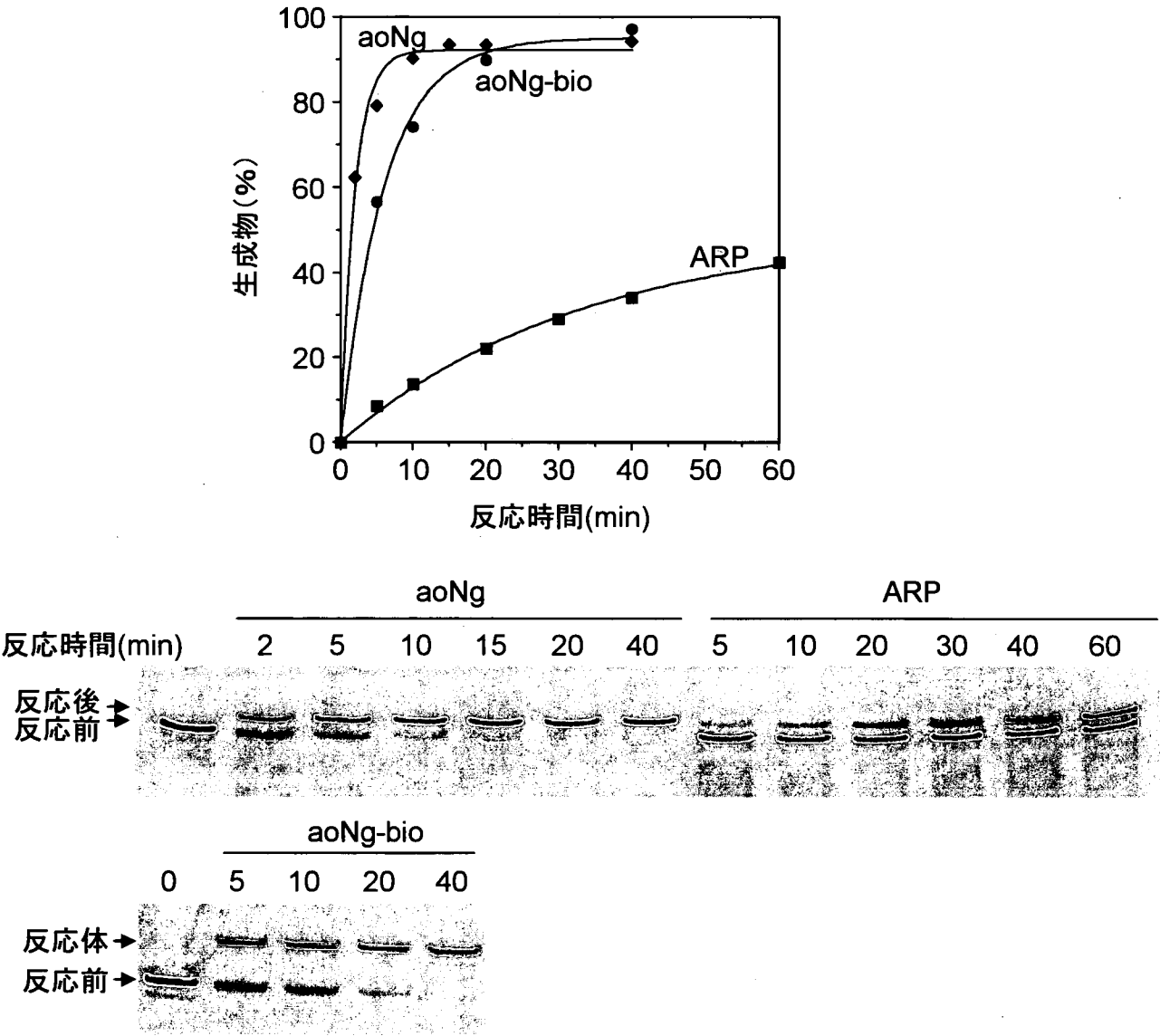
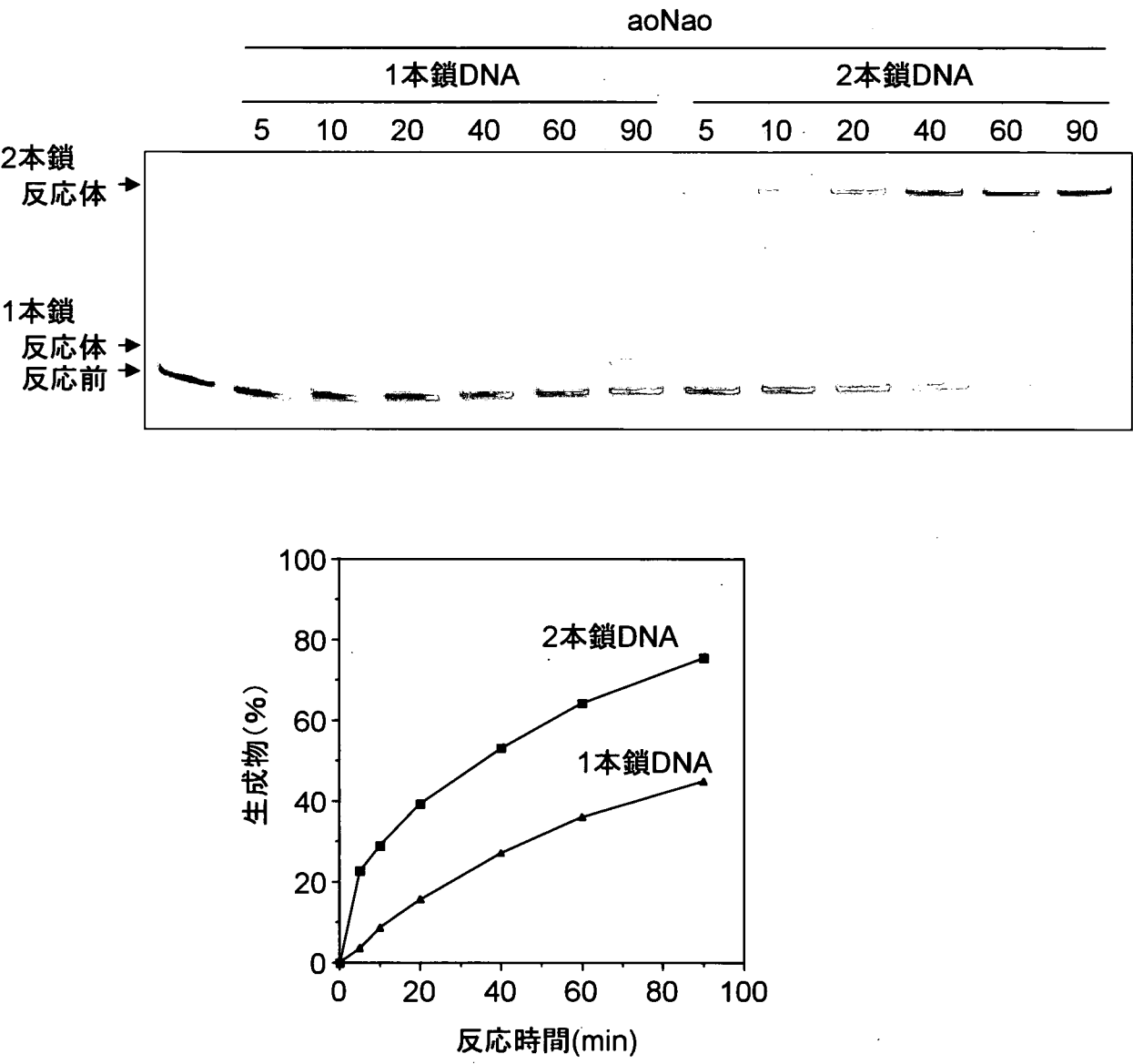


図 5



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/073896

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07C279/14(2006.01)i, C07C279/18(2006.01)i, G01N33/58(2006.01)i,
C12N15/09(2006.01)n, C12Q1/68(2006.01)n

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)

C07C279/00, G01N33/00, C12N15/00, C12Q1/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2009
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2009	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2009

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2003-535208 A (La Jolla Pharmaceutical Co.), 25 November, 2003 (25.11.03), Page 94; compounds 138, 139, 142, 143 & US 2002/0110535 A1 & EP 1292337 A1 & WO 2001/093914 A2	1-2, 5, 7
X	NAZARPACK-KANDLOUSY, Noureddin et al., Synthesis and Mass Spectrometry Studies of Branched Oxime Ether Libraries. Mapping the Substitution Motif via Linker Stability and Fragmentation Pattern, Journal of Organic Chemistry, 2002, 67(1), p.59-65	1-2, 5

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

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
17 February, 2009 (17.02.09)

Date of mailing of the international search report
03 March, 2009 (03.03.09)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/073896

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2006/086517 A2 (THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE), 17 August, 2006 (17.08.06), Fig. 2; Aryloxyamine 2, 3, 4 & US 2006/0178527 A1 & EP 1848688 A1	1-2, 5
X	JP 5-320117 A (Teijin Ltd.), 03 December, 1993 (03.12.93), Page 19; compounds 163B, 164B, 165B (Family: none)	1-2, 5
X	JP 59-163350 A (Roussel Uclaf), 14 September, 1984 (14.09.84), Page 9, example 6; page 10, example 14 & US 4801717 A & EP 119892 A1	1-2, 5
X	JP 49-28740 B1 (Richter Gedeon Vegyeszeti Gyar Rt), 29 July, 1974 (29.07.74), Page 12, example 18 & GB 1329590 A & DE 2064061 A	1-2, 5
A	WO 2004/058687 A1 (Shionogi & Co., Ltd.), 15 July, 2004 (15.07.04), & US 2006/0188996 A1 & EP 1577293 A1	1-15
A	JP 2002-195990 A (Sumika Chemical Analysis Service, Ltd.), 10 July, 2002 (10.07.02), (Family: none)	1-15

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C07C279/14(2006.01)i, C07C279/18(2006.01)i, G01N33/58(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n, C12Q1/68(2006.01)n

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C07C279/00, G01N33/00, C12N15/00, C12Q1/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 0 9 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 0 9 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 0 9 年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAplus (STN), REGISTRY (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 2003-535208 A (ラ ホヤ ファーマシューティカル カンパニー) 2003.11.25, 第94頁、化合物138, 139, 142, 143 & US 2002/0110535 A1 & EP 1292337 A1 & WO 2001/093914 A2	1-2, 5, 7
X	NAZARPACK-KANDLOUSY, Nouredin et al., Synthesis and Mass Spectrometry Studies of Branched Oxime Ether Libraries. Mapping the Substitution Motif via Linker Stability and Fragmentation Pattern, Journal of Organic Chemistry, 2002, 67(1), p.59-65	1-2, 5

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

1 7 . 0 2 . 2 0 0 9

国際調査報告の発送日

0 3 . 0 3 . 2 0 0 9

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

前田 憲彦

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 3

4 H

8 3 1 8

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 2006/086517 A2 (THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE) 2006.08.17, Figure 2, Aryloxyamine 2, 3, 4 & US 2006/0178527 A1 & EP 1848688 A1	1-2, 5
X	JP 5-320117 A (帝人株式会社) 1993.12.03, 第19頁、化合物163B, 164B, 165B (ファミリーなし)	1-2, 5
X	JP 59-163350 A (ルセルーユクラブ) 1984.09.14, 第9頁の例6、第10頁の例14 & US 4801717 A & EP 119892 A1	1-2, 5
X	JP 49-28740 B1 (リヒター・ゲデオン・ベギユエスゼチ・ギアル・ルト) 1974.07.29, 第12頁の実施例18 & GB 1329590 A & DE 2064061 A	1-2, 5
A	WO 2004/058687 A1 (塩野義製薬株式会社) 2004.07.15, & US 2006/0188996 A1 & EP 1577293 A1	1-15
A	JP 2002-195990 A (株式会社住化分析センター) 2002.07.10, (ファミリーなし)	1-15