(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2020年10月8日(08.10.2020)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2020/203896 A1

(51) 国際特許分類:
A61K 48/00 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07H 19/067 (2006.01)
C07H 19/167 (2006.01)
C07H 21/02 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)
C12Q 1/6844 (2018.01)
C12Q 1/6876 (2018.01)
A61K 31/7088 (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2020/014332

(22) 国際出願日： 2020年3月27日(27.03.2020)

(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 2019-067564 2019年3月29日(29.03.2019) JP

(71) 出願人: シスメックス株式会社 (**SYSMEX CORPORATION**) [JP/JP]; 〒6510073 兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通１丁目５番１号 Hyogo (JP).

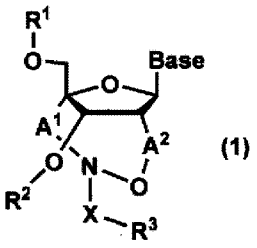
(72) 発明者: 伴 育哉(**BAN, Ikuya**); 〒5670085 大阪府茨木市彩都あさぎ７丁目７番２０号 株式会社ＢＮＡ内 Osaka (JP). 吉川 晴久(**YOSHIKAWA, Haruhisa**); 〒5670085 大阪府茨木市彩都あさぎ７丁目７番２０号 株式会社ＢＮＡ内 Osaka (JP). 折田 文子(**ORITA, Ayako**); 〒5670085 大阪府茨木市彩都あさぎ７丁目７番２０号 株式会社ＢＮＡ内 Osaka (JP). 今西 武(**IMANISHI, Takeshi**); 〒5670085 大阪府茨木市彩都あさぎ７丁目７番２０号 株式会社ＢＮＡ内 Osaka (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人三枝国際特許事務所(**SAEGUSA & PARTNERS**); 〒5410045 大阪府大阪市中央区道修町１－７－１ 北浜コニシビル Osaka (JP).

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

(54) **Title:** NEW ARTIFICIAL NUCLEIC ACID, PRODUCTION METHOD THEREFOR, AND USE THEREOF

(54) 発明の名称： 新規人工核酸、その製造方法及び用途



(1)

(57) **Abstract:** The present invention addresses the problem of providing a new artificial nucleic acid, a production method therefor, and a use thereof. The problem can be solved by an artificial nucleic acid having a unit derived from a compound represented by formula (1) or a salt thereof (in the formula, Base represents an aromatic heterocyclic ring group optionally having a substituent or an aromatic hydrocarbon ring group optionally having a substituent, A^1 represents a straight-chain alkylene group, A^2 represents a single bond or an alkylene group, X represents an alkylene group optionally having a substituent, R^1 and R^2 are the same or different from each other and each represent a hydrogen atom, an alkyl group optionally having a substituent, an alkenyl group optionally having a substituent, a cycloalkyl group optionally having a substituent, a cycloalkenyl group optionally having a substituent, an aryl group optionally having a substituent, a protecting group of a hydroxyl group, a phosphino group having a substituent, a dihydroxyphosphinyl group optionally having a substituent, or a hydroxymercaptophosphinyl group optionally having a substituent, or R^1 and R^2, together with two oxygen atoms respectively adjacent thereto and carbon atoms at positions 3-5 of a furanose, form a ring optionally having a substituent, and R^3 represents an amino group optionally having a substituent).

WO 2020/203896 A1

［続葉有］

ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告(条約第21条(3))

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト(規則5.2(a))

(57) 要約:新規人工核酸、その製造方法及び用途の提供を課題とする。下記式(1)で表される化合物又はその塩に由来する単位を有する人工核酸により課題を解決することができる(式中、Ｂａｓｅは、置換基を有していてもよい芳香族複素環基、又は置換基を有していてもよい芳香族炭化水素環基であり、A^1は、直鎖アルキレン基であり、A^2は、単結合又はアルキレン基であり、Ｘは、置換基を有していてもよいアルキレン基であり、R^1及びR^2は、同一又は異なって、水素原子、置換基を有していてもよいアルキル基、置換基を有していてもよいアルケニル基、置換基を有していてもよいシクロアルキル基、置換基を有していてもよいシクロアルケニル基、置換基を有していてもよいアリール基、ヒドロキシル基の保護基、置換基を有するホスフィノ基、置換基を有していてもよいジヒドロキシホスフィニル基、又は置換基を有していてもよいヒドロキシメルカプトホスフィニル基であるか、或いは、R^1及びR^2は、隣接する２個の酸素原子及びフラノースの３位～５位の炭素原子と共に、置換基を有していてもよい環を形成しており、R^3は、置換基を有していてもよいアミノ基である)。

明　細　書

発明の名称 ： 新規人工核酸、その製造方法及び用途

技術分野

[0001] 本発明は、新規人工核酸、その製造方法及び用途等に関する。

背景技術

[0002] オリゴヌクレオチドは、天然ＤＮＡ若しくは天然ＲＮＡ又は人工核酸の短い配列であり、様々な遺伝子の転写及び翻訳レベルにおいて遺伝子の発現を調節したり、遺伝子の配列状況を検査したりすることで特定の疾患を治療したり診断するために大変有用であることが明らかにされてきている。

遺伝子の発現を調節したり遺伝子情報を検査・診断したりする手法は、標的対象により二種類に大別できる。第一は、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）やマイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）のように標的対象が一本鎖ＲＮＡ又は一本鎖ＤＮＡの場合であり、第二は、標的対象が二重鎖ゲノムＤＮＡの場合である。

標的対象が一本鎖ＲＮＡ又は一本鎖ＤＮＡの場合、オリゴヌクレオチドが一本鎖ＲＮＡ又は一本鎖ＤＮＡと相補的に結合して二重鎖を形成するアンチセンス法により遺伝子の翻訳過程を阻害（あるいは遺伝子診断）することが可能である。また、オリゴヌクレオチドが二重鎖ＲＮＡ分子である場合、オリゴヌクレオチドの標的ｍＲＮＡとの相補的結合は、ＲＩＳＣ複合体の「スライサー」酵素により標的ｍＲＮＡの分解を引き起す（ＲＮＡ干渉法）。ＲＮＡ干渉法の場合、オリゴヌクレオチドは、標的ｍＲＮＡの３’ＵＴＲ領域（３’非翻訳領域）と結合して不完全な相補性の効力により標的ｍＲＮＡの翻訳を阻害することができる内因性マイクロＲＮＡと同等のオリゴヌクレオチドであり得る（マイクロＲＮＡミミックス）。

オリゴヌクレオチドは、例えば、長いアンチセンス非コーディングＲＮＡと相補的に結合することにより、あるいは相補的マイクロＲＮＡを阻害することにより、遺伝子の活性化又はこれの転写の増加を誘導し得、結果として

マイクロＲＮＡの標的ｍＲＮＡの翻訳を増加することもできる（アンチマイクロＲＮＡ）。

標的対象が二重鎖ゲノムＤＮＡの場合、オリゴヌクレオチドが二重鎖ゲノムＤＮＡと相互作用（結合）して遺伝子の発現を調節（制御）する手法がある。

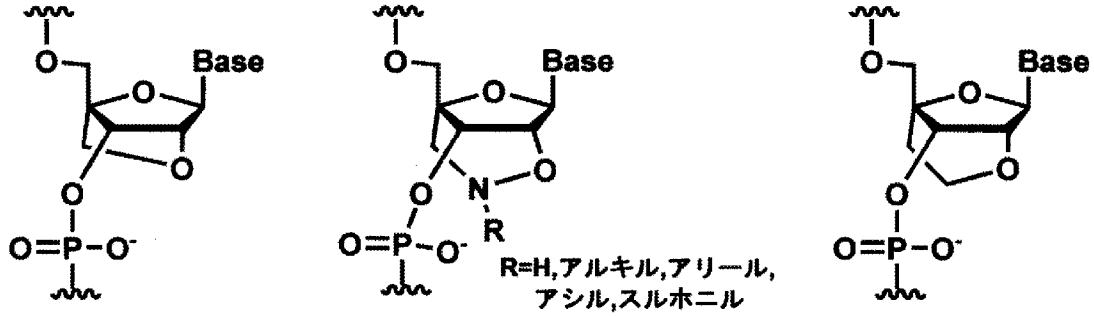
図１は、非特許文献１のFigure 5に対応する図面であり、オリゴヌクレオチドの二重鎖ゲノムＤＮＡへの結合様式が示されている。上記手法は、結合様式の違いにより二種類に分別できる。一つは、オリゴヌクレオチドが二重鎖ゲノムＤＮＡの「外側」にフーグスチーン（Hoogsteen）型水素結合又は逆フーグスチーン型水素結合を通じて結合して三重鎖を形成して遺伝子発現を調節するアンチジーン法である（図１のＡ）。他方は、オリゴヌクレオチドがゲノムＤＮＡの二重鎖を部分的に解き、オリゴヌクレオチドが鎖侵入（ストランドインベージョン）して一本鎖になったＤＮＡとワトソンクリック（Watson-Crick）型水素結合を再形成することで遺伝子発現を調節するストランドインベージョン法である（図１のＢ～Ｄ）。

遺伝子の発現を調節したり遺伝子情報を検査・診断したりする手法に用いられる機能性材料としてのオリゴヌクレオチドには、標的核酸との配列特異的で優れた結合親和性や分解酵素に対する強い抵抗性や生体内での安全性などの特性が求められる。天然素材のＤＮＡやＲＮＡは分解酵素への抵抗性に乏しく、結合親和性も十分でなく、機能性素材として不適である。そのため、これまでにオリゴヌクレオチドの高機能化を目指して数多くの人工核酸が開発されてきた。

その代表的なものとして、ペプチド核酸（ＰＮＡ）、架橋構造型核酸、モルフォリノ核酸（ＰＭＯ）とともに、核酸のリン酸ジエステル部の非結合酸素原子一つを硫黄原子で置換したホスホロチオアート型核酸（ＰＳオリゴ）等を挙げることができる。

前記架橋構造型核酸の代表例としては、ＬＮＡ（下記構造式１）、ＢＮＡ^{NC}（下記構造式２）、ＥＮＡ（下記構造式３）が挙げられる。

[化1]



構造式１　　構造式２　　構造式３

これらの架橋構造型核酸は、ワトソンクリック型水素結合を介して一本鎖ＲＮＡに対して配列高選択的に結合する能力に優れていることが実証されている（特許文献１～３）。　このように従来の人工核酸は特定遺伝子の発現を制御したり遺伝子配列を高感度高精度で検証・診断したりする機能性素材として利用されている。

しかしながら、オリゴヌクレオチドの用途の多様化が進む中で既開発の人工核酸の機能性にはまだまだ改善される余地が残されており、さらなる高機能化を目指した新規人工核酸の開発が求められている。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1：米国特許出願公開第２００３／１０５３０９号明細書

特許文献2：米国特許出願公開第２００７／１６７３８７号明細書

特許文献3：米国特許出願公開第２００３／２０７８４１号明細書

非特許文献

[0004] 非特許文献1：Acc. Chem. Res. 1999, 32, 624～630頁

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005]　本発明の目的は、様々なゲノムテクノロジーに有用な新規人工核酸、それらの製造方法及び用途等を提供することにある。

課題を解決するための手段

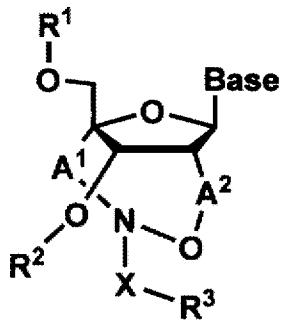
[0006] 本発明者らは、前記課題を達成するため鋭意検討した結果、前記構造式２で表されるＢＮＡ^{NC}の窒素原子上に、置換基を有していてもよいアミノ基を所定のリンカーを介して結合させた人工核酸は、一本鎖ＤＮＡに対する配列高選択的で強固な結合能、及び優れた分解酵素耐性能を併せ持つことを見出した。また、本発明者らは、前記人工核酸が、アンチセンス法、アンチジーン法（ストランドインベージョン法を含む）等、様々なゲノムテクノロジーに有用であることを見出した。本発明者らは、かかる知見に基づいて更に検討を重ねて本発明を完成した。

本発明は、以下の態様を包含する。

項１．

下記式（１）で表される化合物又はその塩：

[化2]



(1)

（式中、

Ｂａｓｅは、置換基を有していてもよい芳香族複素環基、又は置換基を有していてもよい芳香族炭化水素環基であり、

Ａ^{1}は、直鎖アルキレン基であり、

Ａ^{2}は、単結合又はアルキレン基であり、

Ｘは、置換基を有していてもよいアルキレン基、又はこのアルキレン基中の少なくとも１つのメチレン基が－Ｎ（Ｒ^{X}）－（式中、Ｒ^{X}は、水素原子又はアルキル基である）、－Ｏ－、又は－Ｓ（＝Ｏ）$_{k}$－（式中、ｋは０、１、又は２である）に置き換わった基であり、

Ｒ^{1}及びＲ^{2}は、同一又は異なって、水素原子、置換基を有していてもよいア

ルキル基、置換基を有していてもよいアルケニル基、置換基を有していてもよいシクロアルキル基、置換基を有していてもよいシクロアルケニル基、置換基を有していてもよいアリール基、ヒドロキシル基の保護基、置換基を有するホスフィノ基、置換基を有していてもよいジヒドロキシホスフィニル基、又は置換基を有していてもよいヒドロキシメルカプトホスフィニル基であるか、或いは、R^1及びR^2は、隣接する２個の酸素原子及びフラノースの３位～５位の炭素原子と共に、置換基を有していてもよい環を形成しており、R^3は、置換基を有していてもよいアミノ基である）。

項２．

A^1がメチレン基であり、且つ、A^2が単結合である、項１に記載の化合物又はその塩。

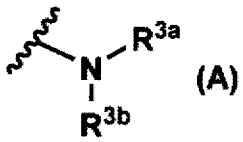
項３．

Ｘが、$-C_nH_{2n}-$（式中、ｎは１～１０の整数である）である、項１又は２に記載の化合物又はその塩。

項４．

R^3が、下記式（Ａ）：

[化3]

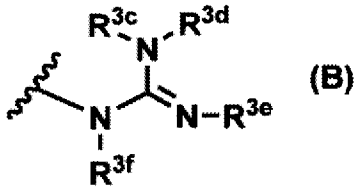


(A)

（式中、R^{3a}及びR^{3b}は、同一又は異なって、水素原子、置換基を有していてもよいアルキル基、置換基を有していてもよいアルケニル基、置換基を有していてもよいシクロアルキル基、置換基を有していてもよいシクロアルケニル基、置換基を有していてもよいアリール基、又はアミノ基の保護基であるか、或いは、R^{3a}及びR^{3b}は、隣接する窒素原子と共に、置換基を有していてもよい環を形成している）

で表される基であるか、或いは、下記式（Ｂ）：

[化4]



(B)

（式中、Ｒ^{3c}～Ｒ^{3f}は、同一又は異なって、水素原子、アルキル基、又はアミノ基の保護基である）

で表される基である、項１～３のいずれか一項に記載の化合物又はその塩。

項５．

式（Ａ）において、Ｒ^{3a}及びＲ^{3b}が、同一又は異なって、水素原子、アルキル基、アリール基、アラルキル基、又はアミノ基の保護基であるか、或いは、Ｒ^{3a}及びＲ^{3b}が、隣接する窒素原子と共に、置換基としてアルキル基を有していてもよい５～１０員の含窒素脂肪族複素環を形成しており、

式（Ｂ）において、Ｒ^{3c}～Ｒ^{3f}が、同一又は異なって、水素原子、又はアミノ基の保護基である、

項４に記載の化合物又はその塩。

項６．

Ｒ^{1}及びＲ^{2}が、同一又は異なって、水素原子、置換基としてアルコキシ基を有していてもよいアルキル基、置換基としてアルコキシ基を有していてもよいアリール基、置換基としてアルコキシ基を有していてもよいアラルキル基、アルキルカルボニル基、アリールカルボニル基、アルキルスルホニル基、アリールスルホニル基、式：－Ｓｉ（Ｒ^{4}）$_{3}$（式中、各Ｒ^{4}は、同一又は異なって、アルキル基又はアリール基である）で表される基、式：－Ｐ（Ｒ^{5}）（Ｒ^{6}）（式中、Ｒ^{5}及びＲ^{6}は、同一又は異なって、ヒドロキシル基、メルカプト基、アミノ基、アルコキシ基、ハロアルコキシ基、シアノアルコキシ基、アルキルチオ基、ハロアルキルチオ基、シアノアルキルチオ基、又はアルキルアミノ基である）で表される基、ジヒドロキシホスフィニル基、又はヒドロキシメルカプトホスフィニル基であるか、或いは、

Ｒ^{1}及びＲ^{2}が、隣接する２個の酸素原子及びフラノースの３位～５位の炭素

原子と共に、置換基としてアルキル基を有していてもよい６～１０員の脂肪族複素環を形成している、

項１～５のいずれか一項に記載の化合物又はその塩。

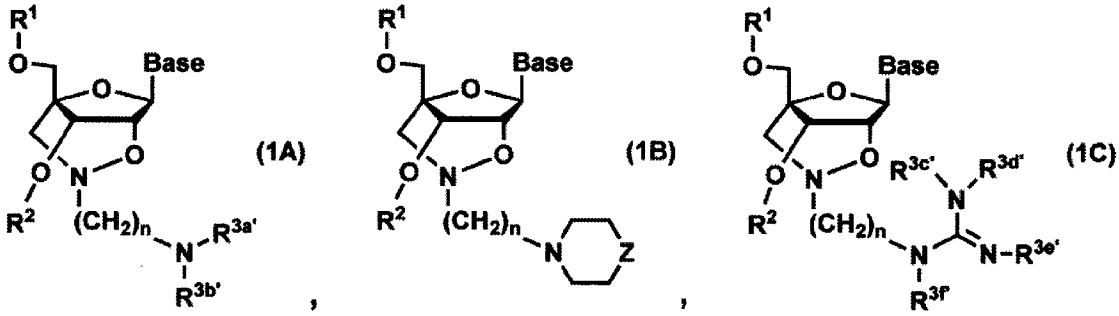
項７．

Ｂａｓｅが、置換基を有していてもよい２，４－ジオキソ－１，２，３，４－テトラヒドロピリミジン－１－イル基、置換基を有していてもよい２－オキソ－１，２－ジヒドロピリミジン－１－イル基、置換基を有していてもよいプリン－９－イル基、又は置換基を有していてもよい６－オキソ－１，６－ジヒドロ－９Ｈ－プリン－９－イル基である、項１～６のいずれか一項に記載の化合物又はその塩。

項８．

下記式（１Ａ）～（１Ｃ）のいずれかで表される、項１～７のいずれか一項に記載の化合物又はその塩：

[化5]



［式中、

$R^{3a'}$及び$R^{3b'}$は、同一又は異なって、水素原子、アルキル基、又はアミノ基の保護基であり、

Ｚは、単結合、酸素原子、$S(=O)_m$（式中、ｍは０、１、又は２である）、$C(R^{13})(R^{14})$（式中、R^{13}及びR^{14}は、同一又は異なって、水素原子又はアルキル基である）、又はNR^{15}（式中、R^{15}は、水素原子、アルキル基、又はアミノ基の保護基である）であり、

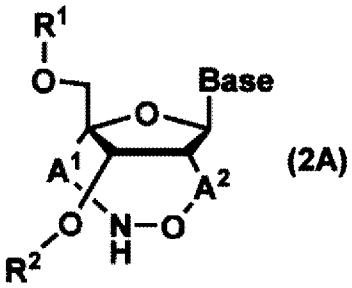
$R^{3c'}$～$R^{3f'}$は、同一又は異なって、水素原子、又はアミノ基の保護基であり、Ｂａｓｅ、R^{1}、及びR^{2}は、前記と同じである］。

項９．

項１に記載の式（１）で表される化合物又はその塩を製造する方法であって、

（Ｉ）下記式（２Ａ）：

[化6]



(2A)

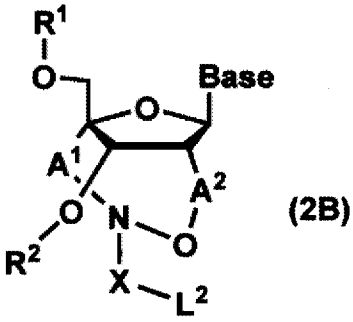
（式中、Ｂａｓｅ、Ａ^{1}、Ａ^{2}、Ｒ^{1}、及びＲ^{2}は、前記と同じである）

で表される化合物を、式（３Ａ）：Ｌ^{1}－Ｘ－Ｒ^{3}（式中、Ｌ^{1}は、脱離基であり、Ｘ及びＲ^{3}は、前記と同じである）で表される化合物と反応させる工程、

又は

（II）下記式（２Ｂ）：

[化7]



(2B)

（式中、Ｌ^{2}は、脱離基であり、Ｂａｓｅ、Ａ^{1}、Ａ^{2}、Ｘ、Ｒ^{1}、及びＲ^{2}は、前記と同じである）

で表される化合物を、式（３Ｂ）：Ｒ^{3}－Ｈ（式中、Ｒ^{3}は、前記と同じである）で表される化合物と反応させる工程

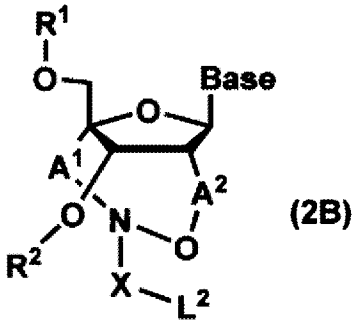
を含む、方法。

項１０．

項１に記載の式（１）で表される化合物又はその塩のうち、Ｒ^{3}がアミノ基の保護基で保護されていてもよいアミノ基である化合物又はその塩を製造する方法であって、

（IIIａ）下記式（２Ｂ）：

[化8]

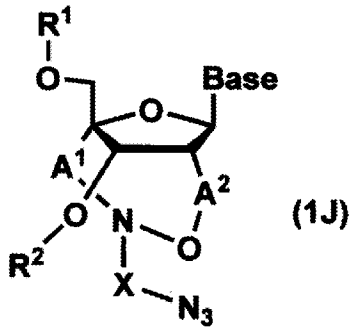


(2B)

（式中、Ｌ^{2}は、脱離基であり、Ｂａｓｅ、Ａ^{1}、Ａ^{2}、Ｘ、Ｒ^{1}、及びＲ^{2}は、前記と同じである）

で表される化合物を、アジ化物塩と反応させて、下記式（１Ｊ）：

[化9]



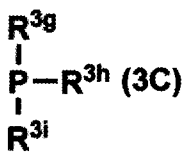
(1J)

（式中、Ｂａｓｅ、Ａ^{1}、Ａ^{2}、Ｘ、Ｒ^{1}、及びＲ^{2}は、前記と同じである）

で表される化合物を得る工程、

（IIIｂ）式（１Ｊ）で表される化合物を、下記式（３Ｃ）：

[化10]



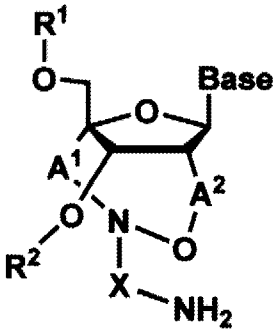
(3C)

（式中、Ｒ^{3g}～Ｒ^{3i}は、同一又は異なって、アルキル基又はアリール基であ

る）

で表される化合物と反応させた後、加水分解により下記式（１Ｌ）：

[化11]



(1L)

（式中、Ｂａｓｅ、Ａ[1]、Ａ[2]、Ｘ、Ｒ[1]、及びＲ[2]は、前記と同じである）

で表される化合物を得る工程、及び

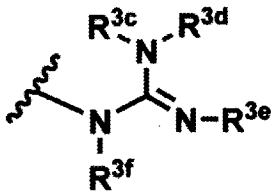
（IIIｃ）必要により、式（１Ｌ）で表される化合物のアミノ基を保護する工程

を含む、方法。

項１１．

項１に記載の式（１）で表される化合物又はその塩のうち、Ｒ[3]が下記式（Ｂ）：

[化12]



(B)

（式中、Ｒ[3c]～Ｒ[3f]は、同一又は異なって、水素原子、アルキル基、又はアミノ基の保護基である）

で表される基である化合物又はその塩の製造方法であって、

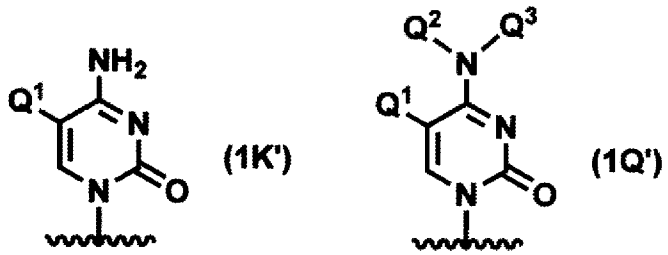
項１に記載の式（１）で表される化合物又はその塩のうち、Ｒ[3]がアミノ基である化合物をグアニジル化する工程を含む、方法。

項１２．

項１に記載の式（１）で表される化合物又はその塩のうち、Ｂａｓｅが下記

式（１Ｋ’）又は（１Ｑ’）：

[化13]

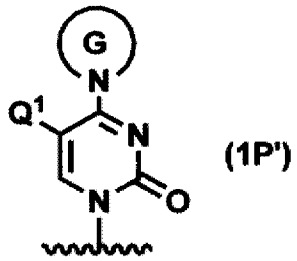


（式中、Ｑ^{1}は、水素原子又は置換基であり、Ｑ^{2}及びＱ^{3}は、同一又は異なって、水素原子又はアミノ基の保護基である(但し、Ｑ^{2}及びＱ^{3}は同時に水素原子ではない)）

で表される化合物又はその塩の製造方法であって、

（VIb）項１に記載の式（１）で表される化合物又はその塩のうち、Ｂａｓｅが下記式（１Ｐ’）：

[化14]



（式中、環Ｇは、５員又は６員の含窒素複素環であり、Ｑ^{1}は前記と同じである）

で表される化合物を、アンモニアと反応させる工程

を含む、方法。

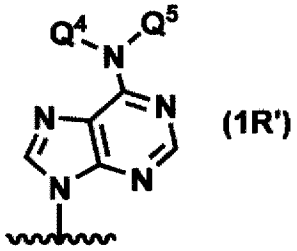
項１３．

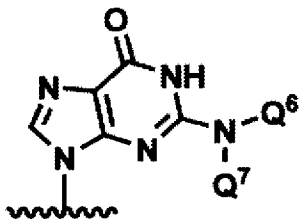
（VIc）工程（VIb）の反応により得られる化合物をアミノ基の保護基で保護する工程をさらに含む、項１２に記載の方法。

項１４．

項１に記載の式（１）で表される化合物又はその塩のうち、Ｂａｓｅが下記式（１Ｒ’）又は（１Ｓ’）：

[化15]


(1R')

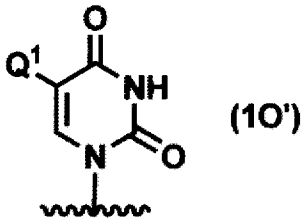

(1S')

（式中、Ｑ[4]～Ｑ[7]は、同一又は異なって、水素原子又はアミノ基の保護基である）

で表される化合物又はその塩の製造方法であって、

項１に記載の式（１）で表される化合物のうち、Ｂａｓｅが下記式（１Ｏ’）：

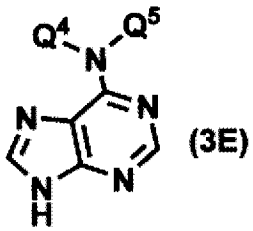
[化16]

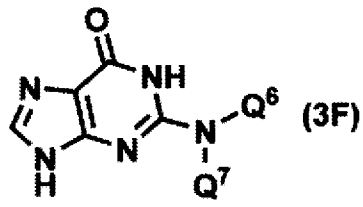

(1O')

（式中、Ｑ[1]は、水素原子又は置換基である）

で表される化合物又はその塩を、下記式（３Ｅ）又は（３Ｆ）：

[化17]


(3E)


(3F)

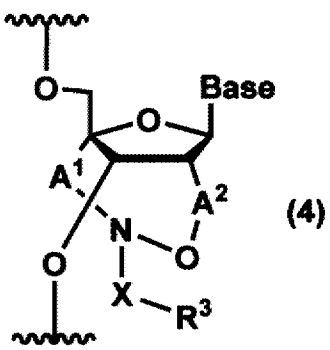
（式中、Ｑ[4]～Ｑ[7]は、前記と同じである）

で表される化合物と反応させる工程を含む、方法。

項１５.

下記式（４）：

[化18]



(4)

（式中、

Ｂａｓｅは、置換基を有していてもよい芳香族複素環基、又は置換基を有していてもよい芳香族炭化水素環基であり、

A^1は、直鎖アルキレン基であり、

A^2は、単結合又はアルキレン基であり、

Ｘは、置換基を有していてもよいアルキレン基、又はこのアルキレン基中の少なくとも１つのメチレン基が－Ｎ（R^X）－（式中、R^Xは、水素原子又はアルキル基である）、－Ｏ－、又は－Ｓ（＝Ｏ）$_k$－（式中、ｋは０、１、又は２である）に置き換わった基であり、

R^3は、置換基を有していてもよいアミノ基である）

で表される単位を有するオリゴヌクレオチド又はその塩。

項１６．

検査試料において標的核酸を検出する方法であって、

（Ｉ）前記標的核酸の標的部位を含む塩基配列を、クランプ核酸を用いる核酸増幅法によって、選択的に増幅させる工程であって、前記クランプ核酸が、項１５に記載のオリゴヌクレオチド又はその塩である工程、及び

（II）前記増幅された塩基配列を検出する工程

を含む、方法。

項１７．

検査試料における標的核酸を検出する、又は検査試料における標的核酸の標的部位を含む塩基配列を選択的に増幅するための組成物であって、

（ａ）前記組成物は、プライマー及びプローブを含み、該プライマー及びプローブのうち少なくともいずれかが、項１５に記載のオリゴヌクレオチド又はその塩である、

（ｂ）前記組成物は、フォワードプライマー、リバースプライマー及びプローブを含み、該フォワードプライマー、リバースプライマー及びプローブのうち少なくともいずれかが、項１５に記載のオリゴヌクレオチド又はその塩である、又は、

（ｃ）前記組成物は、クランプ核酸及びプライマーを含み、該クランプ核酸及びプライマーのうち少なくともいずれかが、項１５に記載のオリゴヌクレオチド又はその塩である、

組成物。

項１７Ａ．

検査試料における標的核酸をプライマー及びプローブを用いて検出するための、項１５に記載のオリゴヌクレオチド又はその塩の使用であって、前記オリゴヌクレオチド又はその塩が、前記プライマー及びプローブのうち少なくともいずれかである、使用。

項１７Ｂ．

検査試料における標的核酸をフォワードプライマー、リバースプライマー及びプローブを用いて検出するための、項１５に記載のオリゴヌクレオチド又はその塩の使用であって、前記オリゴヌクレオチド又はその塩が、前記フォワードプライマー、リバースプライマー及びプローブのうち少なくともいずれかである、使用。

項１７Ｃ．

検査試料における標的核酸の標的部位を含む塩基配列をクランプ核酸及びプライマーを用いて選択的に増幅するための、項１５に記載のオリゴヌクレオチド又はその塩の使用であって、前記オリゴヌクレオチド又はその塩が、前記クランプ核酸及びプライマーのうち少なくともいずれかである、使用。

項１８．

二重鎖ＤＮＡの標的部位にオリゴヌクレチドを鎖侵入させるための組成物であって、前記標的部位の塩基配列に対して相補的な塩基配列を有する、項１５に記載のオリゴヌクレオチド又はその塩を含有する組成物。

項１８Ａ．

二重鎖ＤＮＡの標的部位にオリゴヌクレチドを鎖侵入させるための、項１５に記載のオリゴヌクレオチド又はその塩の使用であって、前記オリゴヌクレオチド又はその塩が、前記標的部位の塩基配列に対して相補的な塩基配列を有する、使用。

項１９．

単離された二重鎖ＤＮＡの標的部位にオリゴヌクレオチドを鎖侵入させる方法であって、前記標的部位の塩基配列に対して相補的な塩基配列を有する、項１５に記載のオリゴヌクレオチド又はその塩と、前記二重鎖ＤＮＡとを混合する工程を含む、方法。

項２０．

前記工程は、（ｉ）前記オリゴヌクレオチド又はその塩と前記二重鎖ＤＮＡとを、一本鎖ＤＮＡ結合タンパク質の存在下で混合する工程であるか、（ｉｉ）前記オリゴヌクレオチド又はその塩と前記二重鎖ＤＮＡとを、一本鎖ＤＮＡ結合タンパク質の非存在下で混合する工程であり、

前記工程が（ｉｉ）であるとき、混合物を加熱する工程、又は混合物を２５～７５℃に維持する工程をさらに含む、

項１９に記載の方法。

項２１．

項１～８のいずれか一項に記載の化合物又はその塩、或いは、項１５に記載のオリゴヌクレオチド又はその塩を含有する医薬組成物。

なお、本明細書で引用される文献の開示は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

発明の効果

[0007] 本発明によれば、様々なゲノムテクノロジーに有用である新規人工核酸を

提供することができる。

図面の簡単な説明

[0008] [図1]図１は、非特許文献１のFigure 5に対応する図面であり、オリゴヌクレオチドの二重鎖ゲノムＤＮＡへの結合様式を示す。

[図2]図２は、消化酵素の反応時間と未消化オリゴヌクレオチドの残存率との関係を示すグラフである。

[図3]図３は、ＰＣＲのサイクル数とΔＲｎ（蛍光強度）との関係を示すグラフである。

[図4]図４は、ＰＮＡについてChem. Commun., 2009, 1225-1227に記載の条件でストランドインベージョンが生じることを確認した図である。

[図5]図５は、本発明のオリゴヌクレオチドについてChem. Commun., 2009, 1225-1227に記載の条件でストランドインベージョンが生じることを示す図である。

[図6]図６は、本発明のオリゴヌクレオチドについて所定の温度条件でストランドインベージョンが生じることを示す図である。

[図7]図７は、本発明のオリゴヌクレオチドについて１塩基の相違によりストランドインベージョンが阻害されることを示す図である。

[図8]図８は、本発明のオリゴヌクレオチドについて所定の温度条件でストランドインベージョンが生じることを示す図である。

[図9]図９は、本発明のオリゴヌクレオチドについて所定の温度条件でストランドインベージョンが生じることを示す図である。

[図10]図１０は、本発明のオリゴヌクレオチドを２種類以上用いることによりストランドインベージョンが増強されることを示す図である。

[図11]図１１は、本発明の検査試料における標的核酸を検出するためのキットの例を示す図である。

発明を実施するための形態

[0009] ＜＜用語の定義＞＞

本明細書において、「アルキル基」とは、直鎖又は分岐鎖状の飽和炭化水

素から１個の水素原子を除いた一価の基をいう。

アルキル基の炭素原子の数は、特に限定されるものではないが、例えば１～２０、好ましくは１～１０、更に好ましくは１～６、特に好ましくは１～４である。

アルキル基の例としては、メチル基、エチル基、プロピル基（例：ｎ－プロピル基、ｉ－プロピル基）、ブチル基（例：ｎ－ブチル基、ｉ－ブチル基、ｓ－ブチル基、ｔ－ブチル基）、ペンチル基（例：ｎ－ペンチル基、ｉ－ペンチル基、ネオペンチル基）、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基（例：ｎ－オクチル基、２－エチルヘキシル基）、ノニル基、デシル基が挙げられる。

[0010] 本明細書において、「アルキレン基」とは、直鎖又は分岐鎖状の飽和炭化水素から２個の水素原子を除いた二価の基をいう。

アルキレン基の炭素原子の数は、特に限定されるものではないが、例えば１～１０、好ましくは１～８、更に好ましくは１～６である。

アルキレン基の例としては、C_1アルキレン基（例：メチレン基）、C_2アルキレン基（例：メチルメチレン基、ジメチレン基）、C_3アルキレン基（例：トリメチレン基、ジメチルメチレン基）、C_4アルキレン基（例：テトラメチレン基）、C_5アルキレン基（例：ペンタメチレン基）、C_6アルキレン基（例：ヘキサメチレン基）が挙げられる。

[0011] 本明細書において、「アルケニル基」とは、直鎖又は分岐鎖状であり、炭素－炭素二重結合を含む不飽和炭化水素から１個の水素原子を除いた一価の基をいう。

アルケニル基の炭素原子の数は、特に限定されるものではないが、例えば２～２０、好ましくは２～１０、更に好ましくは２～６である。

アルケニル基の例としては、エテニル基（即ち、ビニル基）、プロペニル基（例：１－プロペニル基、アリル基）、ブテニル基、ペンテニル基、ヘキセニル基、ゲラニル基、ファルネシル基が挙げられる。

[0012] 本明細書において、「アルキニル基」とは、直鎖又は分岐鎖状であり、炭

素－炭素三重結合を含む不飽和炭化水素から１個の水素原子を除いた一価の基をいう。

アルキニル基の炭素原子の数は、特に限定されるものではないが、例えば２～２０、好ましくは２～１０、更に好ましくは２～６である。

アルキニル基の例としては、エチニル基、プロパルギル基、１－ブチニル基が挙げられる。

[0013] 本明細書において、「シクロアルキル基」とは、飽和脂肪族炭化水素環に由来する一価の基をいう。

シクロアルキル基の炭素原子の数は、特に限定されるものではないが、例えば３～２０、好ましくは５～１２、更に好ましくは５～１０である。

シクロアルキル基の例としては、シクロプロピル基、シクロブチル基、シクロペンチル基、シクロヘキシル基、シクロヘプチル基、シクロオクチル基、ノルボルニル基、アダマンチル基が挙げられる。

[0014] 本明細書において、「シクロアルケニル基」とは、炭素－炭素二重結合を含む不飽和脂肪族炭化水素環に由来する一価の基をいう。

シクロアルケニル基の炭素原子の数は、特に限定されるものではないが、例えば３～２０、好ましくは５～１２、更に好ましくは５～１０である。

シクロアルケニル基の例としては、シクロプロペニル基、シクロブテニル基、シクロペンテニル基、シクロヘキセニル基、ノルボルネニル基、アダマンテニル基が挙げられる。

[0015] 本明細書において、「芳香族炭化水素環基」とは、芳香族炭化水素環に由来する一価の基をいい、「アリール基」とも称する。

芳香族炭化水素環の構成原子の数は、特に限定されるものではないが、例えば６～２０、好ましくは６～１４、更に好ましくは６～１２、特に好ましくは６～１０である。

芳香族炭化水素環は、単環であってもよく、縮合環（例：二乃至三環式縮合環）であってもよい。

芳香族炭化水素環基の例としては、フェニル基、インデニル基、ナフチル

基、フルオレニル基、フェナントレニル基、アントラセニル基が挙げられる。

[0016] 本明細書において、「複素環」は、「脂肪族複素環」及び「芳香族複素環」を包含する意味で用いられる。

[0017] 本明細書において、「脂肪族複素環」とは、環の構成原子として、炭素原子、及び、窒素原子、酸素原子、硫黄原子、ケイ素原子等からなる群から選択される少なくとも一つのヘテロ原子を含む脂肪族環をいう。

脂肪族複素環の構成原子の数は、特に限定されるものではないが、例えば５～２０、好ましくは５～１２、更に好ましくは６～１０である。

脂肪族複素環の構成原子のうち、ヘテロ原子の数は、特に限定されるものではないが、例えば１～４である。

脂肪族複素環の例としては、含酸素脂肪族複素環（例：テトラヒドロフラン、ジオキソラン、ピラン、テトラヒドロピラン、ジオキサン）、含硫黄脂肪族複素環（例：テトラヒドロチオフェン、チオピラン、テトラヒドロチオピラン）、含窒素脂肪族複素環（例：ピロリジン、ピペリジン、アゼパン）、含窒素及び酸素脂肪族複素環（例：モルホリン）、含窒素及び硫黄脂肪族複素環（例：チオモルホリン）、シロキサン結合を含有する脂肪族複素環が挙げられる。

[0018] 本明細書において、「芳香族複素環」とは、環の構成原子として、炭素原子、及び、窒素原子、酸素原子、硫黄原子等からなる群から選択される少なくとも一つのヘテロ原子を含む芳香族環をいう。

芳香族複素環の構成原子の数は、特に限定されるものではないが、例えば５～２０、好ましくは５～１２、更に好ましくは６～１０である。

芳香族複素環の構成原子のうち、ヘテロ原子の数は、特に限定されるものではないが、例えば１～４である。

芳香族複素環は、単環であってもよく、縮合環（例：二乃至三環式縮合環）であってもよい。

芳香族複素環の例としては、含酸素芳香族複素環（例：フラン、ベンゾフ

ラン、イソベンゾフラン、クロメン、ベンゾピラン、キサンテン）、含硫黄芳香族複素環（例：チオフェン、チアントレン）、含窒素芳香族複素環（例：ピロール、イミダゾール、ピラゾール、トリアゾール、ピリジン、ピラジン、ピリミジン、ピリダジン、インドール、イソインドール、インドリジン、プリン、キノリン、イソキノリン、１，８－ナフチリジン、キノキサリン、キナゾリン、シンノリン、フタラジン、プテリジン、カルバゾール、フェナントリジン、アクリジン、ペリミジン、フェナジン）、含酸素及び硫黄芳香族複素環（例：フェノキサチイン）、含窒素及び酸素芳香族複素環（例：オキサゾール、イソオキサゾール、フラザン、フェノキサジン）、含窒素及び硫黄芳香族複素環（例：チアゾール、イソチアゾール、フェノチアジン）が挙げられる。

[0019] 本明細書において、「複素環基」とは、前記複素環から１個の水素原子を除いた一価の基をいう。

[0020] 本明細書において、「置換基を有していてもよい」又は「置換基で置換されていてもよい」とは、置換基を有しない場合、及び、任意の水素原子に代えて１個の置換基、又は２個以上の同種もしくは異種の置換基を有する場合の両方を含む意味で用いられる。なお、置換基を有する場合、置換基の数は、特に限定されるものではないが、例えば１～３、好ましくは１又は２である。

[0021] 本明細書において、「置換基」とは、水素原子に代わる原子又は原子団をいう。置換基の例としては、ハロゲン原子（例：フッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子）、オキソ基（＝Ｏ）、チオキソ基（＝Ｓ）、ヒドロキシル基、メルカプト基、アミノ基、カルボキシ基、アルキル基、アルケニル基、シクロアルキル基、シクロアルケニル基、アリール基、アルキニル基、アシル基、アルキルスルホニル基、アリールスルホニル基、シアノ基、複素環基、これら２種以上の組合せ（例：ハロアルキル基、シアノアルキル基、アラルキル基、アルコキシ基、アルキルアミノ基）が挙げられる。

なお、「２種以上の組合せ」は、各々の置換基として例示した基の任意の

組合せを包含する。

[0022] 本明細書において、「Ｃｘ－ｙ」とは、後続の基の炭素原子の数がｘ以上ｙ以下であることをいう。ｘ及びｙは正の整数であり、ｘ＜ｙである。

[0023] 本明細書において、「ハロアルキル基」は、１個又は２個以上の同種もしくは異種のハロゲン原子で置換されたアルキル基をいう。

ハロアルキル基の好適な例は、C_{1-6}ハロアルキル基であり、より好適な例は、C_{1-4}ハロアルキル基であり、更に好適な例は、トリフルオロメチル基、トリクロロメチル基、又は２，２，２－トリフルオロエチル基である。

[0024] 本明細書において、「シアノアルキル基」は、１個又は２個以上のシアノ基で置換されたアルキル基をいう。

シアノアルキル基の好適な例は、C_{1-6}シアノアルキル基であり、より好適な例は、C_{1-4}シアノアルキル基であり、更に好適な例は、シアノメチル基又は２－シアノエチル基が挙げられる。

[0025] 本明細書において、「アラルキル基」は、１個又は２個以上の同種もしくは異種のアリール基で置換されたアルキル基をいう。

アラルキル基の好適な例は、C_{6-14}アリールC_{1-4}アルキル基であり、より好適な例は、フェニルメチル基（即ち、ベンジル基）、フェニルエチル基（即ち、フェネチル基）、ナフチルメチル基、ナフチルエチル基、トリフェニルメチル基（即ち、トリチル基）、又はフルオレニルメチル基である。

[0026] 本明細書において、「アルコキシ基」は、式：－Ｏ－アルキルで表される基をいう。

アルコキシ基の好適な例は、C_{1-6}アルコキシ基であり、より好適な例は、メトキシ基、エトキシ基、プロポキシ基（例：ｎ－プロポキシ基、ｉ－プロポキシ基）、又はブトキシ基（例：ｔ－ブトキシ基）である。

なお、ハロアルコキシ基、及び、シアノアルコキシ基は、それぞれ、式：－Ｏ－ハロアルキルで表される基、及び、式：－Ｏ－シアノアルキルで表される基をいう。

[0027] 本明細書において、「アルキルチオ基」は、式：－Ｓ－アルキルで表され

る基をいう。　アルキルチオ基の好適な例は、C_{1-6}アルキルチオ基であり、より好適な例は、メチルチオ基、エチルチオ基、プロピルチオ基（例：ｎ－プロピルチオ基、ｉ－プロピルチオ基）、又はブチルチオ基である。

なお、ハロアルキルチオ基、及び、シアノアルキルチオ基は、それぞれ、式：－Ｓ－ハロアルキルで表される基、及び、式：－Ｓ－シアノアルキルで表される基をいう。

[0028] 本明細書において、「アルキルアミノ基」は、１個又は２個の同種もしくは異種のアルキル基で置換されているアミノ基をいう。

アルキルアミノ基は、モノアルキルアミノ基及びジアルキルアミノ基を包含する。

モノアルキルアミノ基の好適な例は、モノC_{1-6}アルキルアミノ基であり、より好適な例は、モノメチルアミノ基、モノエチルアミノ基、モノプロピルアミノ基（例：モノ(ｎ－プロピル)アミノ基、モノ(ｉ－プロピル)アミノ基）、又はモノブチルアミノ基である。

ジアルキルアミノ基の好適な例は、ジC_{1-6}アルキルアミノ基であり、より好適な例は、ジメチルアミノ基、ジエチルアミノ基、ジプロピルアミノ基（例：ジ(ｎ－プロピル)アミノ基、ジ(ｉ－プロピル)アミノ基）、又はジブチルアミノ基である。

[0029] 本明細書において、「置換基を有するホスフィノ基」とは、ホスフィノ基（$-PH_2$）の少なくとも１個の水素原子が他の原子又は原子団で置換されている基をいう。

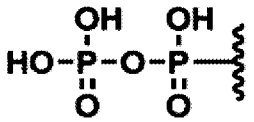
置換基を有するホスフィノ基の例としては、式：－Ｐ(Ｒ^5)(Ｒ^6)（式中、Ｒ^{5}及びＲ^{6}は、同一又は異なって、ヒドロキシル基、メルカプト基、アミノ基、アルコキシ基、ハロアルコキシ基、シアノアルコキシ基、アルキルチオ基、ハロアルキルチオ基、シアノアルキルチオ基、又はアルキルアミノ基である）で表される基が挙げられる。

[0030] 本明細書において、「置換基を有していてもよいジヒドロキシホスフィニル基」とは、ジヒドロキシホスフィニル基（即ち、ホスホノ基）（－Ｐ(＝Ｏ

)(ＯＨ)$_2$）、又は少なくとも１個の水素原子が他の原子又は原子団（例：ヒドロキシル基の保護基）で置換されているジヒドロキシホスフィニル基をいう。

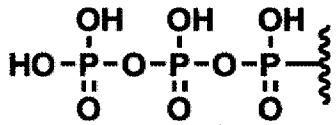
後者の基は、置換基を有していてもよい、下記式：

[化19]



で表される基（以下、「二リン酸基」と称する）、及び置換基を有していてもよい、下記式：

[化20]



で表される基（以下、「三リン酸基」と称する）を包含する。

[0031] 本明細書において、「置換基を有していてもよいヒドロキシメルカプトホスフィニル基」とは、ヒドロキシメルカプトホスフィニル基（－Ｐ(＝Ｏ)(ＯＨ)(ＳＨ)）、又は少なくとも１個の水素原子が他の原子又は原子団（例：ヒドロキシル基の保護基）で置換されているヒドロキシメルカプトホスフィニル基をいう。

[0032] 本明細書において、「ヒドロキシル基の保護基」とは、化合物又はその塩の合成、或いは、オリゴヌクレオチド又はその塩の合成においてヒドロキシル基が反応に関与しないようにするための一価の基をいう。

ヒドロキシル基の保護基は、例えば、酸性又は中性条件で安定であり、加水素分解、加水分解、電気分解、及び光分解のような方法により開裂し得る基が挙げられるが、これに限定されるものではない。

ヒドロキシル基の保護基の例は、置換基を有していてもよいアシル基、置換基を有するスルホニル基、及び置換基を有するシリル基を包含する。

[0033] 本明細書において、「アシル基」とは、式：－Ｃ(＝Ｏ)－Ｒ（式中、Ｒは

、炭化水素基である）で表される基をいう。Ｒで示される炭化水素基は、直鎖又は分岐鎖状炭化水素基（例：アルキル基）であってもよく、飽和又は不飽和炭化水素環基（例：シクロアルキル基、アリール基）、これらの組合せ（例：アラルキル基）であってもよい。

アシル基は、アルキルカルボニル基、アリールカルボニル基、及びアラルキルカルボニル基を包含する。

アルキルカルボニル基の好適な例は、（C_{1-10}アルキル）カルボニル基であり、より好適な例は、アセチル基、プロピオニル基、ブチリル基、イソブチリル基、ペンタノイル基、ピバロイル基、バレリル基、イソバレリル基、オクタノイル基、ノナノイル基、又はデカノイル基である。

アリールカルボニル基の好適な例は、（C_{6-14}アリール）カルボニル基であり、より好適な例は、ベンゾイル基、又はナフトイル基（即ち、α－ナフトイル基、β－ナフトイル基）である。

アラルキルカルボニル基の好適な例は、（C_{6-14}アリールC_{1-4}アルキル）カルボニル基であり、より好適な例は、ベンジルカルボニル基である。

なお、「アシルオキシ基」、「アシルチオ基」、及び「アシルアミノ基」におけるアシル基も、上記と同様の基が例示できる。

[0034] 本明細書において、「置換基を有するスルホニル基」とは、式：－Ｓ（＝Ｏ）$_2$Ｒ（式中、Ｒは、前記と同じである）で表される基をいう。

置換基を有するスルホニル基は、置換基を有していてもよいアルキル基を有するスルホニル基、及び置換基を有していてもよいアリール基を有するスルホニル基を包含する。

アルキル基を有するスルホニル基の好適な例は、C_{1-6}アルキルスルホニル基であり、より好適な例は、メタンスルホニル基又はエタンスルホニル基である。

アリール基を有するスルホニル基の好適な例は、C_{6-14}アリールスルホニル基であり、より好適な例は、ベンゼンスルホニル基又はｐ－トルエンスルホニル基である。

[0035] 本明細書において、「置換基を有するシリル基」とは、シリル基（－ＳｉＨ$_3$）の少なくとも１個の水素原子が他の原子又は原子団で置換されているシリル基をいう。

「置換基を有するシリル基」の典型的な例は、式：－Ｓｉ（Ｒ^4）$_3$（式中、各Ｒ^{4}は、同一又は異なって、アルキル基又はアリール基である）で表される基である。当該基の例としては、トリアルキルシリル基（例：トリメチルシリル基、トリエチルシリル基、トリイソプロピルシリル基、ｔ－ブチルジメチルシリル基等のトリＣ$_{1-6}$アルキルシリル基）、ジアルキルアリールシリル基（例：ジメチルフェニルシリル基等のジＣ$_{1-6}$アルキルＣ$_{6-14}$アリールシリル基）、アルキルジアリールシリル基（例：ｔ－ブチルジフェニルシリル基等のＣ$_{1-6}$アルキルジＣ$_{6-14}$アリールシリル基）、トリアリールシリル基（例：トリフェニルシリル基等のトリＣ$_{6-14}$アリールシリル基）が挙げられる。

[0036] 本明細書において、「アミノ基の保護基」とは、化合物又はその塩の合成、或いは、オリゴヌクレオチド又はその塩の合成においてアミノ基が反応に関与しないようにするための一価の基をいう。

アミノ基の保護基は、例えば、酸性又は中性条件で安定であり、加水素分解、加水分解、電気分解、及び光分解のような方法により開裂し得る基が挙げられるが、これに限定されるものではない。

アミノ基の保護基の例は、置換基を有していてもよいアシル基（例：置換基を有していてもよいアルキルカルボニル基、置換基を有していてもよいアリールカルボニル基、置換基を有していてもよいアラルキルカルボニル基）、置換基を有していてもよいＮ，Ｎ－ジアルキルホルムアミジル基、置換基を有していてもよいアルコキシカルボニル基、置換基を有していてもよいアルケニルオキシカルボニル基、置換基を有していてもよいアリールオキシカルボニル基、置換基を有していてもよいアラルキルオキシカルボニル基、及び置換基を有するスルホニル基を包含する。

[0037] 本明細書において、「ホルムアミジル基」とは、式：＝ＣＨ－ＮＨ$_2$で表さ

れる基をいう。Ｎ，Ｎ－ジアルキルホルムアミジル基の好適な例は、Ｎ，Ｎ－ジ（$Ｃ_{1-6}$アルキル）ホルムアミジル基であり、より好適な例は、Ｎ，Ｎ－ジ（$Ｃ_{1-4}$アルキル）ホルムアミジル基であり、さらに好適な例は、Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミジル基又はＮ，Ｎ－ジエチルホルムアミジル基である。

[0038] 本明細書において、「アルコキシカルボニル基」とは、式：－Ｃ（＝Ｏ）－Ｏ－アルキルで表される基をいう。

アルコキシカルボニル基の好適な例は、（$Ｃ_{1-6}$アルコキシ）カルボニル基であり、より好適な例は、メトキシカルボニル基、エトキシカルボニル基、プロポキシカルボニル基、又はブトキシカルボニル基（例：ｔ－ブトキシカルボニル基）である。

[0039] 本明細書において、「アルケニルオキシカルボニル基」とは、式：－Ｃ（＝Ｏ）－Ｏ－アルケニルで表される基をいう。

アルケニルオキシカルボニル基の好適な例は、（$Ｃ_{2-9}$アルケニルオキシ）カルボニル基であり、より好適な例は、アリルオキシカルボニル基である。

[0040] 本明細書において、「アリールオキシカルボニル基」とは、式：－Ｃ（＝Ｏ）－Ｏ－アリールで表される基をいう。

アリールオキシカルボニル基の好適な例は、（$Ｃ_{6-14}$アリールオキシ）カルボニル基であり、より好適な例は、フェノキシカルボニル基又はナフトキシカルボニル基である。

[0041] 本明細書において、「アラルキルオキシカルボニル基」とは、式：－Ｃ（＝Ｏ）－Ｏ－アラルキルで表される基をいう。

アラルキルオキシカルボニル基の好適な例は、（$Ｃ_{6-14}$アリール$Ｃ_{1-4}$アルコキシ）カルボニル基であり、より好適な例は、ベンジルオキシカルボニル基又はフルオレニルメチルオキシカルボニル基である。

[0042] 本明細書において、「ハイブリダイズする」とは、所定のポリヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドの全部又は一部分が、ストリンジェントな条件下で、別のポリヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドの全部又は一部分と水素結合を介して二重鎖を形成することをいう。「ストリンジェントな条件」は

、ポリヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションを行う際に当業者が一般的に用いる条件であればよい。例えば、２つのポリヌクレオチド分子またはオリゴヌクレオチド分子の間に少なくとも５０％、好ましくは少なくとも７５％、より好ましくは少なくとも９０％の配列同一性があるときに、一方のポリヌクレオチド分子又はオリゴヌクレオチド分子が他方のポリヌクレオチド分子又はオリゴヌクレオチド分子に特異的にハイブリダイズすることができる条件が挙げられる。ハイブリダイゼーションでのストリンジェンシーは、温度、塩濃度、ポリヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドの塩基長及びＧＣ含量、並びにハイブリダイゼーション緩衝液に含まれるカオトロピック剤の濃度の関数であることが知られている。ストリンジェントな条件として、例えば、Sambrook, J.ら, 1998, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第２編), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New Yorkに記載された条件などを用いることができる。

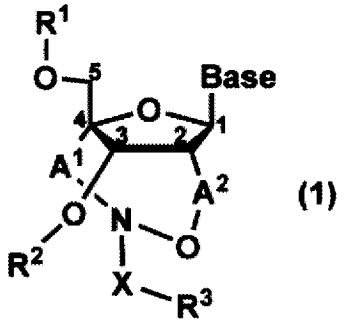
[0043] 本明細書において、「検査」とは、診断や研究などの目的で試料中の核酸等の被検物質を調べることをいう。「検査試料」とは、検査に供される試料をいう。

[0044] 本明細書において、各数値範囲の上限及び下限は任意に組み合わせることができる。

[0045] ＜＜化合物又はその塩＞＞

本発明の化合物又はその塩は、下記式（１）で表される化合物又はその塩である：

[化21]



(1)

（式中、Ｂａｓｅ、A^1、A^2、Ｘ、R^1、R^2、及びR^3は、前記と同じである。なお、フラノースの炭素原子には位置番号を付している。）

[0046] 以下、式（Ｎ）で表される化合物又はその塩を、「化合物（Ｎ）」と称する。

化合物（１）は、R^1又はR^2が、置換基を有していてもよいジヒドロキシホスフィニル基又は置換基を有していてもよいヒドロキシメルカプトホスフィニル基である場合、「ヌクレオチド」と称し、それ以外の基である場合、「ヌクレオシド」と称する。

[0047] Ｂａｓｅの好適な例は、置換基を有していてもよい芳香族複素環基である。

前記芳香族複素環基は、好ましくは含窒素芳香族複素環基である。

前記含窒素芳香族複素環基は、好ましくは６～１０員の含窒素芳香族複素環基である。 前記６～１０員の含窒素芳香族複素環基は、好ましくは２，４－ジオキソ－１，２，３，４－テトラヒドロピリミジン－１－イル基、２－オキソ－１，２－ジヒドロピリミジン－１－イル基、プリン－９－イル基、又は６－オキソ－１，６－ジヒドロ－９Ｈ－プリン－９－イル基である。

前記芳香族複素環基に置換する置換基の好適な例は、アルキル基、アシル基、及びアミノ基の保護基で置換されていてもよいアミノ基からなる群から選択される少なくとも一種である。前記置換基の数は、特に限定されるものではないが、例えば１～３である。

Ｂａｓｅのより好適な例は、置換基を有していてもよいチミニル基、置換基を有していてもよいシトシニル基、置換基を有していてもよいアデニル基、又は置換基を有していてもよいグアニル基である。前記置換基は、好ましくは、アルキル基、アシル基、及びＮ，Ｎ－ジアルキルホルムアミジル基からなる群から選択される少なくとも一種であり、より好ましくは、C_{1-4}アルキル基、（C_{1-4}アルキル）カルボニル基、（C_{6-14}アリール）カルボニル基、又はＮ，Ｎ－ジ（C_{1-4}アルキル）ホルムアミジル基である。前記置換基の数は、好ましくは１～３である。

Ｂａｓｅの更に好適な例は、下記：

２，４－ジオキソ－５－メチル－１，２，３，４－テトラヒドロピリミジン－１－イル基（例：チミン－１－イル基）、

２－オキソ－４－アミノ－１，２－ジヒドロピリミジン－１－イル基（即ち、シトシン－１－イル基）、

２－オキソ－４－アシルアミノ－１，２－ジヒドロピリミジン－１－イル基（即ち、Ｎ－アシル－シトシン－１－イル基）、

２－オキソ－４－アミノ－５－メチル－１，２－ジヒドロピリミジン－１－イル基（即ち、５－メチルシトシン－１－イル基）、

２－オキソ－４－アシルアミノ－５－メチル－１，２－ジヒドロピリミジン－１－イル基（即ち、Ｎ－アシル－５－メチルシトシン－１－イル基）、

６－アミノ－９Ｈ－プリン－９－イル基（即ち、アデニン－９－イル基）、

６－アシルアミノ－９Ｈ－プリン－９－イル基（即ち、Ｎ－アシル－アデニン－９－イル基）、

２－アミノ－６－オキソ－１，６－ジヒドロ－９Ｈ－プリン－９－イル基（例:グアニン－９－イル基）

２－アシルアミノ－６－オキソ－１，６－ジヒドロ－９Ｈ－プリン－９－イル基（例:Ｎ－アシル－グアニン－９－イル基）、及び

２－（Ｎ，Ｎ－ジアルキルホルムアミジル）アミノ－６－オキソ－１，６－ジヒドロ－９Ｈ－プリン－９－イル基（例：Ｎ－（Ｎ，Ｎ－ジアルキルホルムアミジル）－グアニン－９－イル基）

からなる群から選択される基である。

Ｂａｓｅの最も好適な例は、下記：

チミン－１－イル基、

５－メチルシトシン－１－イル基、

Ｎ－アセチル－５－メチルシトシン－１－イル基、

Ｎ－イソブチリル－５－メチルシトシン－１－イル基、

Ｎ－ベンゾイル－５－メチルシトシン－１－イル基、

アデニン－９－イル基、

Ｎ－アセチル－アデニン－９－イル基、

Ｎ－イソブチリル－アデニン－９－イル基、

Ｎ－ベンゾイル－アデニン－９－イル基、

グアニン－９－イル基、

Ｎ－アセチル－グアニン－９－イル基、

Ｎ－イソブチリル－グアニン－９－イル基、

Ｎ－ベンゾイル－グアニン－９－イル基、及び

Ｎ－（Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミジル）－グアニン－９－イル基

からなる群から選択される基である。

[0048] A^1は、直鎖アルキレン基（例：メチレン基、ジメチレン基、トリメチレン基、テトラメチレン基）である。

A^1の好適な例は、直鎖C_{1-4}アルキレン基である。

A^1のより好適な例は、直鎖C_{1-2}アルキレン基である。

A^1の最も好適な例は、メチレン基である。

[0049] A^2の好適な例は、単結合又は直鎖C_{1-2}アルキレン基（例:メチレン基、ジメチレン基）である。

A^2の更に好適な例は、単結合である。

[0050] Ｘの好適な例は、アルキレン基、又はこのアルキレン基中の窒素原子に結合するメチレン基及びR^3に結合するメチレン基以外のメチレン基のうち、少なくとも１つが－Ｎ（R^X）－（式中、R^Xは、水素原子又はアルキル基である）、－Ｏ－、又は－Ｓ（＝Ｏ）$_k$－（式中、ｋは０、１、又は２である）に置き換わった基である。或いは、Ｘの好適な例は、アルキレン基、又はこのアルキレン基中の隣接する２つの炭素原子間に－Ｎ（R^X）－（式中、R^Xは、前記と同じである）、－Ｏ－、又は－Ｓ（＝Ｏ）$_k$－（式中、ｋは０、１、又は２である）を有する基である。

Ｘの更に好適な例は、下記：

式：－C_nH_{2n}－（式中、ｎは１～１０の整数である）で表される基、

式：－$(CH_2)_{n1}$－$(N(R^{X1})$－$(CH_2)_{n2})_{n3}$－（式中、R^{X1}は水素原子又はC_{1-4}アルキル基であり、ｎ１は２～１０の整数であり、ｎ２は２～４の整数であり、ｎ３は１～５の整数であり、ｎ３が２以上の整数であるとき、各R^{X1}は、互いに同一であっても又は異なっていてもよく、各ｎ２は、互いに同一であっても又は異なっていてもよい）で表される基、

式：－$(CH_2)_{n4}$－$(O$－$(CH_2)_{n5})_{n6}$－（式中、ｎ４は２～１０の整数であり、ｎ５は２～４の整数であり、ｎ６は１～５の整数であり、ｎ６が２以上の整数であるとき、各ｎ５は、互いに同一であっても又は異なっていてもよい）で表される基、及び

式：－$(CH_2)_{n7}$－$(S$－$(CH_2)_{n8})_{n9}$－（式中、ｎ７は２～１０の整数であり、ｎ８は２～４の整数であり、ｎ９は１～５の整数であり、ｎ９が２以上の整数であるとき、各ｎ８は、互いに同一であっても又は異なっていてもよい）で表される基

からなる群から選択される基である。

Ｘの最も好適な例は、下記：

式：－$(CH_2)_{n10}$－（式中、ｎ１０は１～６の整数である）で表される基、

式：－C_2H_4－$(N(R^{X2})$－$C_2H_4)_{n11}$－（式中、R^{X2}は水素原子又はC_{1-4}アルキル基であり、ｎ１１は１～５の整数であり、ｎ１１が２以上の整数であるとき、各R^{X2}は、互いに同一であっても又は異なっていてもよい）で表される基、

式：－C_2H_4－$(O$－$C_2H_4)_{n12}$－（式中、ｎ１２は１～５の整数である）で表される基、及び

式：－C_2H_4－$(S$－$C_2H_4)_{n13}$－（式中、ｎ１３は１～５の整数である）で表される基

からなる群から選択される基である。

前記アルキレン基の炭素原子上に任意に置換し得る置換基は、好ましくは、ハロゲン原子、ヒドロキシル基、アルコキシ基、メルカプト基、アルキル

チオ基、アミノ基、モノアルキルアミノ基、ジアルキルアミノ基、アシルオキシ基、アシルアミノ基、アシルチオ基である。置換基の数は、アルキレン基の炭素原子の数にもよるが、例えば、１～３の整数であり、好ましくは、２又は３である。

[0051] Ｒ[1]の好適な例は、下記：

水素原子、

置換基を有していてもよいアルキル基、

置換基を有していてもよいアリール基、

ヒドロキシル基の保護基、

置換基を有するホスフィノ基、

置換基を有していてもよいジヒドロキシホスフィニル基、及び

置換基を有していてもよいヒドロキシメルカプトホスフィニル基

からなる群から選択される基である。

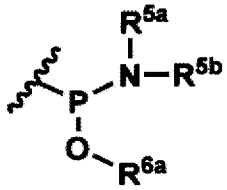
Ｒ[1]で示される「置換基を有していてもよいアルキル基」は、好ましくは、ハロゲン原子、アルコキシ基、及びアリール基からなる群から選択される少なくとも一種の置換基を有していてもよいアルキル基であり、より好ましくは、アルコキシ基で置換されていてもよいアルキル基、又はアルコキシ基で置換されていてもよいアラルキル基である。前記置換基の数は、好ましくは１～３である。

Ｒ[1]で示される「置換基を有していてもよいアリール基」は、好ましくは、ハロゲン原子、アルキル基、及びアルコキシ基からなる群から選択される少なくとも一種の置換基を有していてもよいアリール基であり、より好ましくは、アルコキシ基で置換されていてもよいアリール基である。前記置換基の数は、好ましくは１～３である。

Ｒ[1]で示される「ヒドロキシル基の保護基」は、好ましくは、アルキルカルボニル基、アリールカルボニル基、アルキルスルホニル基、アリールスルホニル基、又は式：－Ｓｉ（Ｒ[4]）$_3$（式中、各Ｒ[4]は、同一又は異なって、アルキル基又はアリール基である）で表される基である。

Ｒ[1]で示される「置換基を有するホスフィノ基」は、好ましくは、式：－Ｐ（Ｒ[5]）（Ｒ[6]）（式中、Ｒ[5]及びＲ[6]は、同一又は異なって、ヒドロキシル基、メルカプト基、アミノ基、アルコキシ基、ハロアルコキシ基、シアノアルコキシ基、アルキルチオ基、ハロアルキルチオ基、シアノアルキルチオ基、又はアルキルアミノ基である）で表される基である。当該基のより好適な例は、下記式：

[化22]



（式中、Ｒ[5a]及びＲ[5b]は、同一又は異なって、水素原子又はアルキル基であり、Ｒ[6a]は、水素原子、アルキル基、ハロアルキル基、又はシアノアルキル基である）

で表されるホスフィノ基である。

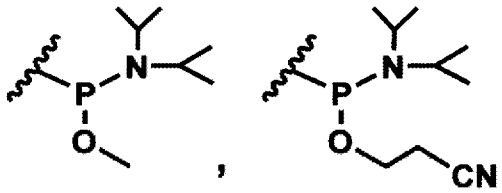
Ｒ[1]で示される「置換基を有していてもよいジヒドロキシホスフィニル基」は、好ましくは、ジヒドロキシホスフィニル基、二リン酸基、又は三リン酸基であり、より好ましくは、ジヒドロキシホスフィニル基である。これらは、置換基としてヒドロキシル基の保護基を有していてもよく、存在するヒドロキシル基の全部又は一部が、ヒドロキシル基の保護基で置換されていてもよい。

Ｒ[1]で示される「置換基を有していてもよいヒドロキシメルカプトホスフィニル基」は、好ましくはヒドロキシメルカプトホスフィニル基である。

Ｒ[1]の最も好適な例は、水素原子、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、アリル基、ベンジル基、トリチル基、メトキシメチル基、ｐ－メトキシベンジル基、モノメトキシトリチル基、ジメトキシトリチル基、アセチル基、イソブチリル基、ベンゾイル基、メタンスルホニル基、ｐ－トルエンスルホニル基、トリメチルシリル基、トリエチルシリル基、トリイソプロピル

シリル基、ｔ－ブチルジメチルシリル基、ｔ－ブチルジフェニルシリル基、下記式：

[化23]

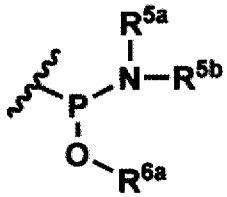


のいずれかで表されるホスフィノ基、ジヒドロキシホスフィニル基、又はヒドロキシメルカプトホスフィニル基である。

[0052] Ｒ^{2}の好適な例は、Ｒ^{1}の好適な例と同じである。

[0053] Ｒ^{1}とＲ^{2}の組合せの好適な例は、Ｒ^{1}が水素原子又はジメトキシトリチル基（例：４，４’－ジメトキシトリチル基）であり、Ｒ^{2}が、下記式：

[化24]



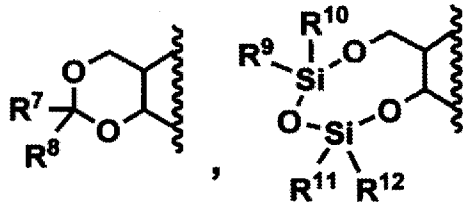
（式中、Ｒ^{5a}及びＲ^{5b}は、同一又は異なって、水素原子又はアルキル基であり、Ｒ^{6a}は、水素原子、アルキル基、ハロアルキル基、又はシアノアルキル基である）

で表されるホスフィノ基である組合せである。

[0054] Ｒ^{1}及びＲ^{2}が、隣接する２個の酸素原子及びフラノースの３位～５位の炭素原子と共に環を形成している場合、当該環の好適な例は、置換基を有していてもよい６～１０員の脂肪族複素環であり、当該置換基の好適な例は、アルキル基である。

当該環のより好適な例は、下記式：

[化25]

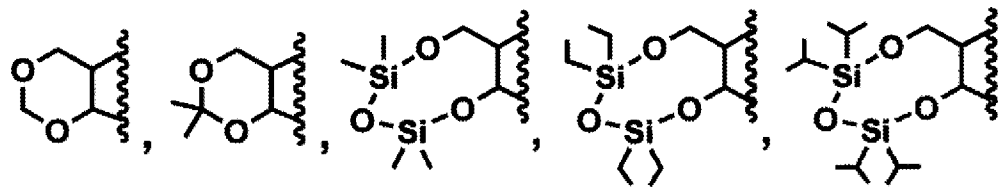


（式中、Ｒ７及びＲ８は、同一又は異なって、水素原子又はアルキル基であり、Ｒ９～Ｒ１２は、同一又は異なって、アルキル基である）

のいずれかで表される脂肪族複素環である。

当該環の更に好適な例は、下記式：

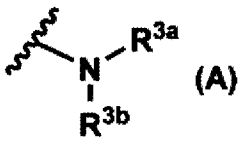
[化26]



のいずれかで表される環である。

[0055] Ｒ３の好適な例は、下記式（Ａ）：

[化27]



（式中、Ｒ３ａ及びＲ３ｂは、同一又は異なって、水素原子、置換基を有していてもよいアルキル基、置換基を有していてもよいアルケニル基、置換基を有していてもよいシクロアルキル基、置換基を有していてもよいシクロアルケニル基、置換基を有していてもよいアリール基、又はアミノ基の保護基であるか、或いは、Ｒ３ａ及びＲ３ｂは、隣接する窒素原子と共に、置換基を有していてもよい環を形成している）

で表される基である。

Ｒ３ａは、好ましくは、水素原子、アルキル基、アリール基、アラルキル基、又はアミノ基の保護基であり、より好ましくは、水素原子、アルキル基、

又はアミノ基の保護基である。

R^{3a}で示される「アミノ基の保護基」は、好ましくは(C_{1-4}アルキル)カルボニル基又は(C_{1-4}ハロアルキル)カルボニル基であり、より好ましくはアセチル基又はトリフルオロメチルカルボニル基である。

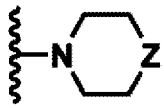
[0056] R^{3b}の好適な例は、R^{3a}の好適な例と同じである。

R^{3a}とR^{3b}の組合せの好適な例は、R^{3a}及びR^{3b}が共に水素原子である組合せ、R^{3a}が水素原子であり、R^{3b}がアセチル基又はトリフルオロメチルカルボニル基である組合せ、R^{3a}及びR^{3b}が共にメチル基である組合せ、或いは、R^{3a}及びR^{3b}が共にアセチル基又はトリフルオロメチルカルボニル基である組合せである。

[0057] R^{3a}及びR^{3b}が、隣接する窒素原子と共に環を形成している場合、当該環の好適な例は、置換基を有していてもよい５～１０員の含窒素脂肪族複素環であり、当該置換基の好適な例は、アルキル基又はアシル基である。

当該環のより好適な例は、下記式：

[化28]

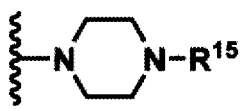


［式中、Ｚは、単結合、酸素原子、$S(=O)_m$（式中、ｍは０、１、又は２である）、$C(R^{13})(R^{14})$（式中、R^{13}及びR^{14}は、同一又は異なって、水素原子又はアルキル基である）、又はNR^{15}（式中、R^{15}は、水素原子、アルキル基、又はアシル基である）である］

で表される含窒素脂肪族複素環である。

当該環の更に好適な例は、下記式：

[化29]



［式中、R^{15}は、水素原子、直鎖又は分岐鎖状C_{1-4}アルキル基（例:メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基）、或いは、（直鎖又は分岐鎖状C_{1-4}

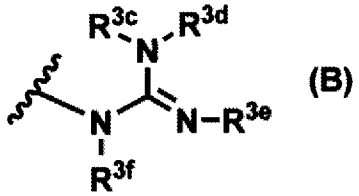
アルキル)カルボニル基（例:メチルカルボニル基、エチルカルボニル基、プロピルカルボニル基、ブチルカルボニル基）である］

で表される含窒素脂肪族複素環である。

当該環の最も好適な例は、４－メチルピペラジン－１－イル基である。

[0058] Ｒ^{3}の好適な他の例は、下記式（Ｂ）：

[化30]



(B)

（式中、Ｒ^{3c}～Ｒ^{3f}は、同一又は異なって、水素原子、アルキル基、又はアミノ基の保護基である）

で表される基である。

Ｒ^{3c}～Ｒ^{3f}の好適な例は、水素原子、又はアミノ基の保護基である。

Ｒ^{3c}は、好ましくは水素原子である。

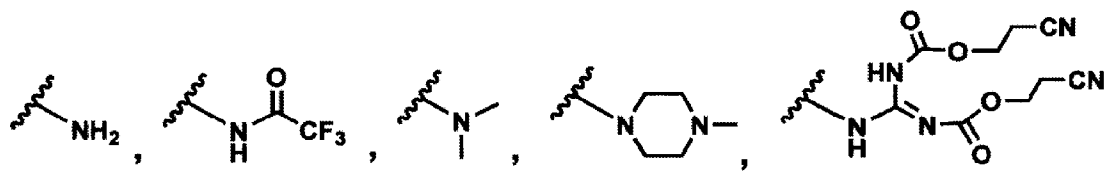
Ｒ^{3d}は、好ましくは、アミノ基の保護基であり、より好ましくは、アルコキシカルボニル基、ハロアルコキシカルボニル基、又はシアノアルコキシカルボニル基であり、特に好ましくは、（Ｃ$_{1-4}$アルコキシ)カルボニル基、（Ｃ$_{1-4}$ハロアルコキシ)カルボニル基、又は(Ｃ$_{1-4}$シアノアルコキシ)カルボニル基である。

Ｒ^{3e}は、好ましくは、アミノ基の保護基であり、より好ましくは、アルコキシカルボニル基、ハロアルコキシカルボニル基、又はシアノアルコキシカルボニル基であり、特に好ましくは、（Ｃ$_{1-4}$アルコキシ)カルボニル基、（Ｃ$_{1-4}$ハロアルコキシ)カルボニル基、又は(Ｃ$_{1-4}$シアノアルコキシ)カルボニル基である。

Ｒ^{3f}は、好ましくは水素原子である。

[0059] Ｒ^{3}の最も好適な例は、下記群：

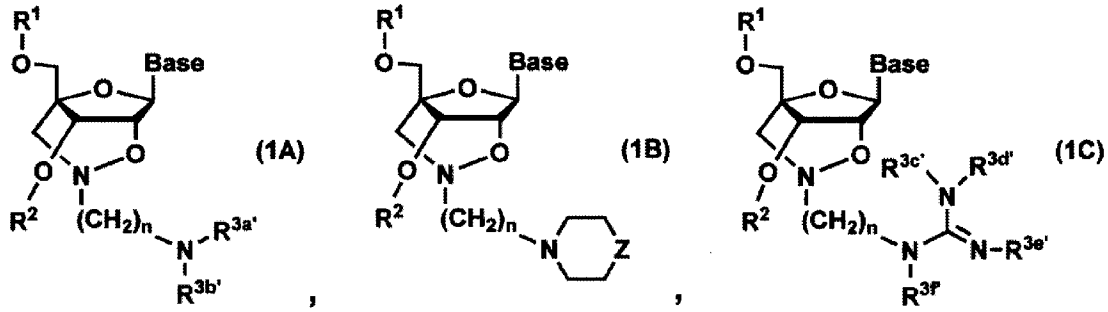
[化31]



から選択される基である。

[0060] 化合物（１）の好適な例は、下記化合物（１Ａ）～（１Ｃ）のいずれかである：

[化32]



［式中、

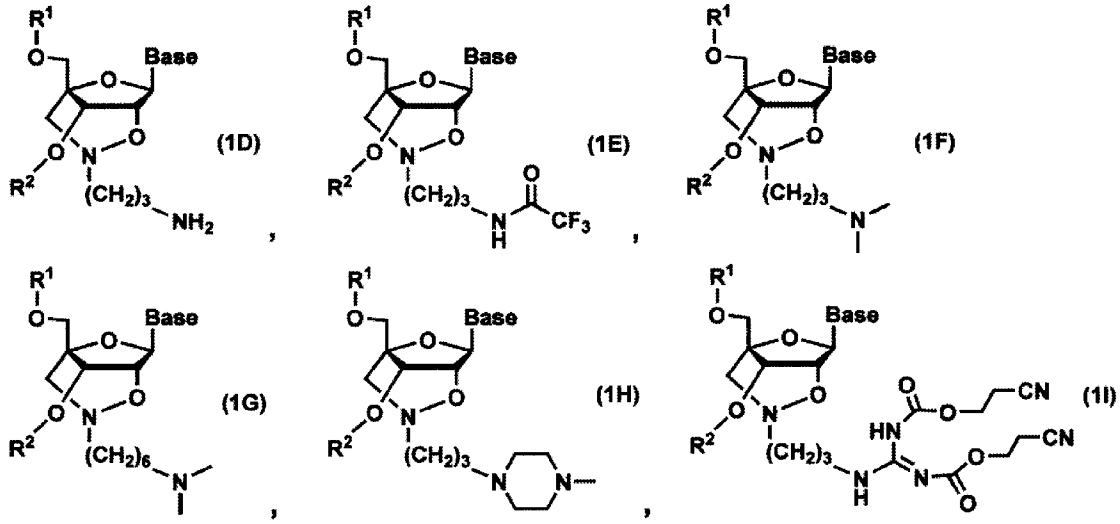
$R^{3a'}$及び$R^{3b'}$は、同一又は異なって、水素原子、アルキル基、又はアミノ基の保護基であり、

Ｚは、単結合、酸素原子、$S(=O)_m$（式中、ｍは０、１、又は２である）、$C(R^{13})(R^{14})$（式中、R^{13}及びR^{14}は、同一又は異なって、水素原子又はアルキル基である）、又はNR^{15}（式中、R^{15}は、水素原子、アルキル基、又はアミノ基の保護基である）であり、

$R^{3c'}$～$R^{3f'}$は、同一又は異なって、水素原子、又はアミノ基の保護基であり、Ｂａｓｅ、R^{1}、R^{2}、及びｎは、前記と同じである］。

[0061] 化合物（１）のより好適な例は、下記化合物（１Ｄ）～（１Ｉ）のいずれかである：

[化33]



（式中、Ｂａｓｅ、Ｒ[1]、及びＲ[2]は、前記と同じである）。

[0062] 前記塩は、薬学上許容される塩であってもよく、薬学上許容される塩でなくてもよい。 前記塩は、無機塩であってもよく、有機塩であってもよい。

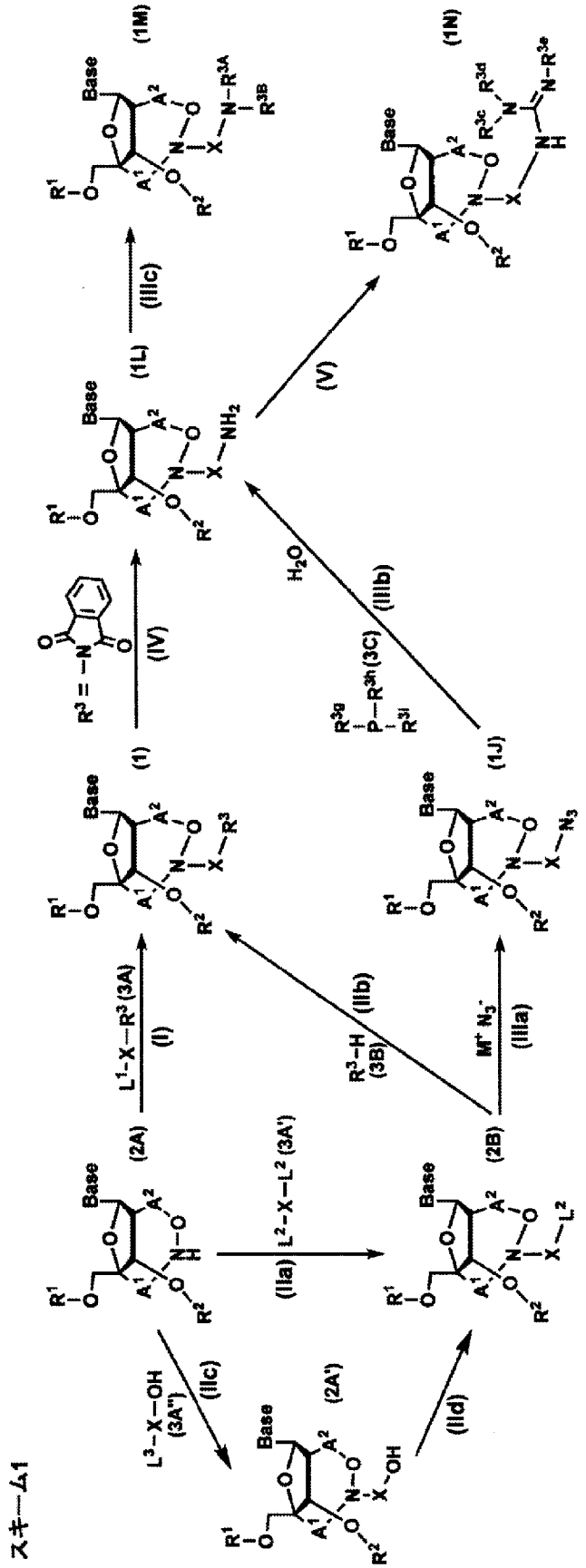
前記塩の例としては、アルカリ金属塩（例：ナトリウム塩、カリウム塩、リチウム塩）、アルカリ土類金属塩（例：カルシウム塩、マグネシウム塩）、他の金属塩（例：アルミニウム塩、鉄塩、亜鉛塩、銅塩、ニッケル塩、コバルト塩）、アンモニウム塩、テトラメチルアンモニウム塩、アミン塩（例：ｔ－オクチルアミン塩、ジベンジルアミン塩、モルホリン塩、グルコサミン塩、フェニルグリシンアルキルエステル塩、エチレンジアミン塩、Ｎ－メチルグルカミン塩、グアニジン塩、ジエチルアミン塩、トリエチルアミン塩、ジシクロヘキシルアミン塩、Ｎ，Ｎ’－ジベンジルエチレンジアミン塩、クロロプロカイン塩、プロカイン塩、ジエタノールアミン塩、Ｎ－ベンジル－フェネチルアミン塩、ピペラジン塩、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン塩）、無機酸塩（例：フッ化水素酸塩、塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩、硝酸塩、過塩素酸塩、硫酸塩、リン酸塩）、有機酸塩（例：メタンスルホン酸塩、トリフルオロメタンスルホン酸塩、エタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、ｐ－トルエンスルホン酸塩、酢酸塩、リンゴ酸塩、フマル酸塩、コハク酸塩、クエン酸塩、酒石酸塩、シュウ酸塩、マレイン

酸塩）、アミノ酸塩（例：グリシン塩、リジン塩、アルギニン塩、オルニチン塩、グルタミン酸塩、アスパラギン酸塩）が挙げられる。

[0063] ＜＜化合物（１）の製造方法＞＞

化合物（１）は、例えば、以下の反応スキーム１により得ることができる。

[化34]


スキーム1
(1M)
(1N)
(1L)
(1)
(1J)
(2A)
(2B)
(2A')
(IIIc)
(V)
(IV)
(IIIb)
(I)
(IIb)
(IIIa)
(IIa)
(IIc)
(IId)
Base
H_2O
L^1-X-R^3 (3A)
R^3-H (3B)
$M^+N_3^-$
L^2-X-L^2 (3A')
L^3-X-OH (3A")
R^3 = −N(C=O)C6H4(C=O)

（式中、L^1、各L^2、及びL^3は、同一又は異なって、脱離基であり、Ｍは、アルカリ金属又はアンモニウムであり、R^{3A}及びR^{3B}は、同一又は異なって、水素原子又はアミノ基の保護基であり（但し、R^{3A}及びR^{3B}は同時に水素原子ではない）、Ｂａｓｅ、A^1、A^2、Ｘ、R^1、R^2、R^3、R^{3c}～R^{3e}、及びR^{3g}～R^{3i}は、前記と同じである）

[0064] ［反応スキーム１］

＜工程（Ｉ）＞

工程（Ｉ）は、化合物（２Ａ）を、式（３Ａ）：L^1－Ｘ－R^3で表される化合物と反応させて、化合物（１）を得る工程である。

化合物（２Ａ）は、既知の方法、例えば米国特許出願公開第２００７／１６７３８７号明細書に記載される方法により得ることができる。

化合物（３Ａ）において、L^1で示される脱離基の例は、ハロゲン原子（例：塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子）、アルキルスルホニルオキシ基（例：メシルオキシ基）、ハロアルキルスルホニルオキシ基（例：トリフルオロメチルスルホニルオキシ基）、又はアリールスルホニルオキシ基（例：トシルオキシ基）である。

化合物（３Ａ）の使用量は、化合物（２Ａ）１モルに対して、通常、１～１０モル、好ましくは３～６モルである。

前記反応は、好適には、溶媒の存在下で行われる。

溶媒の例としては、エーテル系溶媒（例：テトラヒドロフラン）、ニトリル系溶媒（例：アセトニトリル）、芳香族炭化水素系溶媒（例：トルエン、キシレン）、これら二種以上の混合溶媒が挙げられる。これらのうち、芳香族炭化水素系溶媒が好ましく、トルエン及びキシレンからなる群から選択される少なくとも一種がより好ましい。

前記反応は、好適には、塩基の存在下で行われる。

塩基の例としては、無機塩基［例：アルカリ金属の炭酸塩（例：炭酸ナトリウム、炭酸セシウム）、アルカリ金属の炭酸水素塩（例：炭酸水素ナトリウム）、アルカリ土類金属の炭酸塩（例：炭酸カルシウム）、アルカリ金属

の水酸化物（例：水酸化ナトリウム、水酸化カリウム）、アルカリ土類金属の水酸化物（例：水酸化カルシウム）、金属アルコキシド（例：ナトリウムメトキシド、ナトリウムエトキシド）］、有機塩基［例：第３級アミン（例：トリアルキルアミン）、環状アミン（例：４－(ジメチルアミノ)ピリジン、ジアザビシクロウンデセン(ＤＢＵ)、ジアザビシクロノネン(ＤＢＮ)）］、これらの組合せが挙げられる。これらのうち、第３級アミンが好ましく、トリ$Ｃ_{1-4}$アルキルアミンがより好ましい。

塩基の使用量は、化合物（２Ａ）１モルに対して、通常、２～１０モル、好ましくは５～８モルである。

前記反応の反応温度は、反応が進行する限り特に制限されるものではないが、例えば３０～１５０℃であり、好ましくは５０～１２０℃である。

前記反応の反応時間は、特に限定されるものではないが、例えば１～２４時間、好ましくは１～１２時間である。

[0065] ＜工程（IIａ）＞

工程（IIａ）は、化合物（２Ａ）を、式（３Ａ’）：$Ｌ^{2}$－Ｘ－$Ｌ^{2}$で表される化合物と反応させて、化合物（２Ｂ）を得る工程である。

化合物（３Ａ’）において、$Ｌ^{2}$で示される脱離基の例は、$Ｌ^{1}$と同様である。

化合物（３Ａ’）の使用量は、化合物（２Ａ）１モルに対して、通常、１～２０モル、好ましくは１～５モルである。

前記反応は、工程（Ｉ）と同様に、溶媒及び／又は塩基の存在下で行うことができる。

[0066] ＜工程（IIｂ）＞

工程（IIｂ）は、化合物（２Ｂ）を、式（３Ｂ）：$Ｒ^{3}$－Ｈで表される化合物と反応させて、化合物（１）を得る工程である。

化合物（３Ｂ）の使用量は、化合物（２Ｂ）１モルに対して、通常、１～２０モル、好ましくは１～５モルである。

前記反応は、工程（Ｉ）と同様に、溶媒及び／又は塩基の存在下で行うこ

とができる。

[0067] ＜工程（IIｃ）＞

工程（IIｃ）は、化合物（２Ａ）を、式（３Ａ’’）：L^3－Ｘ－ＯＨで表される化合物と反応させて、化合物（２Ａ’）を得る工程である。

化合物（３Ａ’’）の使用量は、化合物（２Ａ）１モルに対して、通常、１～２０モル、好ましくは１～５モルである。

前記反応は、工程（Ｉ）と同様に、溶媒及び／又は塩基の存在下で行うことができる。

[0068] ＜工程（IIｄ）＞

工程（IIｄ）は、化合物（２Ａ’）のヒドロキシル基を脱離基L^2に変換して化合物（２Ｂ）を得る工程である。

工程（IIｄ）の典型的な例は、化合物（２Ａ’）を、ハロゲン化スルホニル（例：アルカンスルホン酸ハライド、ハロアルカンスルホン酸ハライド、アレーンスルホン酸ハライド）と反応させる工程である。この工程により、化合物（２Ａ’）のヒドロキシル基をアルキルスルホニルオキシ基、ハロアルキルスルホニルオキシ基、又はアリールスルホニルオキシ基に変換することができる。

ハロゲン化スルホニルの使用量は、化合物（２Ａ’）１モルに対して、通常、０．５～５モル、好ましくは１～２モルである。

前記反応は、工程（Ｉ）と同様に、溶媒及び／又は塩基の存在下で行うことができる。

[0069] ＜工程（IIIａ）＞

工程（IIIａ）は、化合物（２Ｂ）を、式：$M^+N_3^-$で表されるアジ化物塩と反応させて、化合物（１Ｊ）を得る工程である。

アジ化物塩の例としては、アジ化ナトリウム、アジ化カリウム、アジ化アンモニウムが挙げられる。

アジ化物塩の使用量は、化合物（２Ｂ）１モルに対して、通常、１～５モル、好ましくは１～２モルである。

前記反応は、好適には、溶媒の存在下で行う。

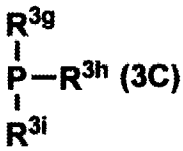
溶媒の例としては、ニトリル系溶媒（例：アセトニトリル）、エーテル系溶媒（例：テトラヒドロフラン）、アミド系溶媒（例：Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミド、Ｎ，Ｎ－ジメチルアセトアミド、Ｎ－メチルピロリドン）、これら二種以上の混合溶媒が挙げられる。これらのうち、アミド系溶媒が好ましく、Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミドがより好ましい。

前記反応の反応温度は、反応が進行する限り特に制限されないが、例えば３０～１５０℃、好ましくは５０～１２０℃である。

[0070] ＜工程（IIIｂ）＞

工程（IIIｂ）は、化合物（１Ｊ）を、下記式（３Ｃ）：

[化35]



で表される化合物と反応させた後、加水分解により化合物（１Ｌ）を得る工程である。

化合物（３Ｃ）において、R^{3g}～R^{3i}は、好ましくはアリール基であり、より好ましくはC_{6-10}アリール基である。

化合物（３Ｃ）の使用量は、化合物（１Ｊ）１モルに対して、通常、１～１０モル、好ましくは１～３モルである。

前記反応は、好適には、溶媒の存在下で行う。

溶媒の例としては、ニトリル系溶媒（例：アセトニトリル）、エーテル系溶媒（例：テトラヒドロフラン、ジオキサンなどの環状エーテル）、これら二種以上の混合溶媒が挙げられる。これらのうち、エーテル系溶媒が好ましく、環状エーテルがより好ましく、テトラヒドロフラン及びジオキサンから選択される少なくとも一種が好ましい。

前記反応の反応温度は、反応が進行する限り特に制限されないが、例えば１５～３０℃である。

なお、工程（IIIｂ）は、代替的には、化合物（１Ｊ）を還元剤（例：水素化アルミニウムリチウム）で還元して化合物（１Ｌ）を得る工程であってもよい。

[0071] ＜工程（IIIｃ）＞

工程（IIIｃ）は、化合物（１Ｌ）のアミノ基をアミノ基の保護基で保護して化合物（１Ｍ）を得る工程である。

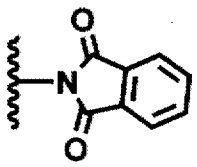
前記アミノ基をアミノ基の保護基で保護する方法は、公知又は慣用の方法を採用することができる。例えば、化合物（１Ｌ）のアミノ基の保護基として、トリフルオロメチルカルボニル基を導入する工程は、化合物（１Ｌ）をトリフルオロ酢酸又はその誘導体（例：無水トリフルオロ酢酸）と反応させる工程である。前記反応は、好適には、溶媒の存在下で行う。溶媒の好適な例は、環状アミン（例：ピリジン）である。

[0072] ＜工程（IV）＞

工程（IV）は、化合物（１）のうち、R^3がアミノ基である化合物（１Ｌ）を得る工程である。

工程（IV）は、化合物（１）のうち、R^3が、下記式：

[化36]



で表されるフタルイミド残基である化合物を、ヒドラジン化合物（例：ヒドラジン一水和物）と反応させる工程である。

ヒドラジン化合物の使用量は、化合物（１）のうち、R^3がフタルイミド残基である化合物１モルに対して、通常、１～１０モル、好ましくは１．１～３．５モルである。

前記反応は、好適には、溶媒の存在下で行う。

溶媒の例としては、水、アルコール系溶媒（例：メタノール、エタノール）、これら二種以上の混合溶媒が挙げられる。これらのうち、アルコール系

溶媒が好ましい。

なお、工程（IV）は、代替的には、化合物（１）のうち、R^3がフタルイミド残基である化合物を加水分解する工程であってもよい。

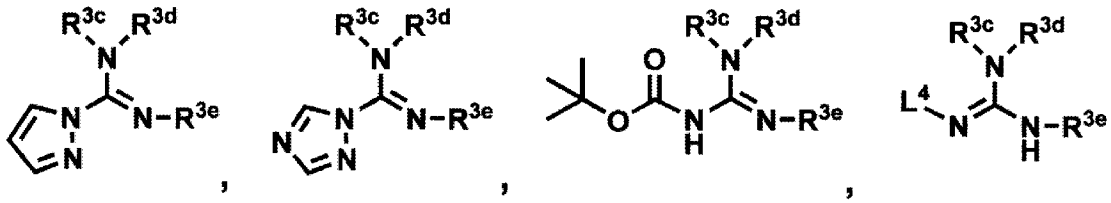
[0073] ＜工程（Ｖ）＞

工程（Ｖ）は、化合物（１Ｌ）をグアニジル化し、必要によりアミノ基を保護基で保護して化合物（１Ｎ）を得る工程である。

グアニジル化は、通常、グアニジル化剤との反応により行われる。グアニジル化剤の例としては、窒素系グアニジル化剤、硫黄系グアニジル化剤が挙げられる。

窒素系グアニジル化剤の例としては、下記式で表される化合物が挙げられる：

[化37]



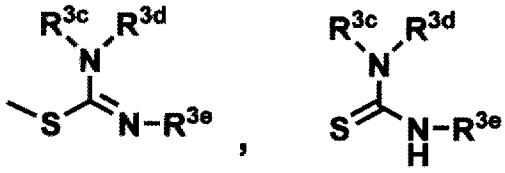
（式中、L^4は、脱離基であり、R^{3c}～R^{3e}は、前記と同じである）。

L^4で示される脱離基の例は、L^1と同様である。

窒素系グアニジル化剤は、好ましくは、１－アミジノピラゾール塩酸塩、１－カルバミミドイル－１，２，４－トリアゾール塩酸塩、１－（Ｎ－ｔ－ブトキシ－アミジノ）ピラゾール、１－（Ｎ－ベンジルオキシ－アミジノ）ピラゾール、１－［Ｎ，Ｎ’－（ジ－ｔ－ブトキシ）アミジノ］ピラゾール、１－［Ｎ，Ｎ’－（ジ－ベンジルオキシ）アミジノ］ピラゾール、１，２，３－トリス（ｔ－ブトキシカルボニル）グアニジン、又はグッドマン試薬である。

硫黄系グアニジル化剤の例としては、下記式で表される化合物が挙げられる：

[化38]



（式中、Ｒ^{3c}～Ｒ^{3e}は、前記と同じである）。

硫黄系グアニジル化剤は、好ましくは、Ｎ，Ｎ’－ジ－ｔ－ブトキシ－Ｓ－メチルイソチオウレア、又は１，３－ジ－ｔ－ブトキシチオウレアである。

グアニジル化剤の使用量は、化合物（１Ｌ）１モルに対して、通常、０．５～１０モル、好ましくは０．８～２．０モルである。

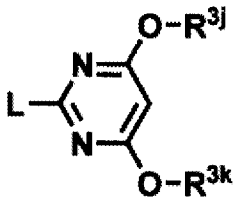
化合物（１Ｌ）とグアニジル化剤の反応は、好適には、溶媒の存在下で行う。

溶媒の例としては、ハロゲン化炭化水素系溶媒（例：ジクロロメタン）、アミド系溶媒（例：Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミド、Ｎ，Ｎ－ジメチルアセトアミド、Ｎ－メチルピロリドン）、これら二種以上の混合溶媒が挙げられる。これらのうち、アミド系溶媒が好ましく、Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミドがより好ましい。

前記反応の反応温度は、反応が進行する限り特に制限されないが、例えば１５～３０℃である。

[0074] なお、化合物（１Ｎ）のうち、Ｒ^{3c}～Ｒ^{3e}が水素原子である化合物又はその塩を製造する方法は、化合物（１Ｌ）を、下記式：

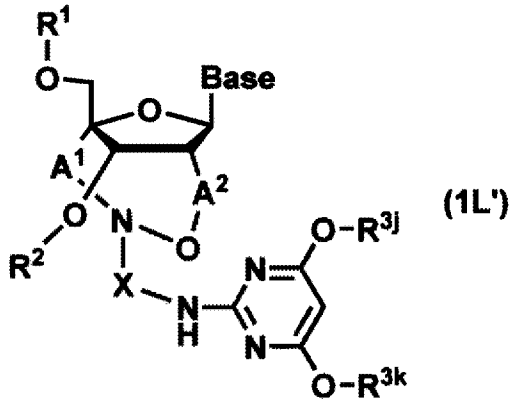
[化39]



（式中、Ｌは、ハロゲン原子であり、Ｒ^{3j}及びＲ^{3k}は、同一又は異なって、アルキル基である）

で表される２－ハロ－４，６－ジアルコキシピリミジンと反応させて、下記式（１Ｌ’）：

[化40]



(1L')

（式中、R^{3j}及びR^{3k}は、前記と同じである）

で表される化合物を得る工程、及び化合物（１Ｌ’）のピリミジン環を開裂する（又は加水分解する）工程を含む方法であってもよい。

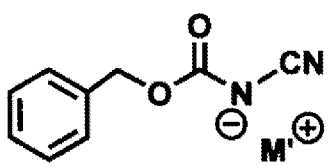
この方法の詳細は、例えば、Tetrahedron Letters, 56, 2015, 4990～4992頁を参照することができる。

[0075] また、化合物（１Ｎ）のうち、R^{3c}～R^{3e}が水素原子である化合物又はその塩を製造する方法は、化合物（１Ｌ）をＯ－メチルイソウレアと反応させる工程を含む方法であってもよい。

この方法の詳細は、例えば、Anal Chem., 85(18), 2013, 1～17頁を参照することができる。

[0076] さらに、化合物（１Ｎ）のうち、R^{3c}及びR^{3d}が水素原子であり、R^{3e}がベンジルオキシカルボニル基である化合物又はその塩の製造方法は、化合物（１Ｌ）を、下記式：

[化41]



（式中、Ｍ’は、アルカリ金属である）

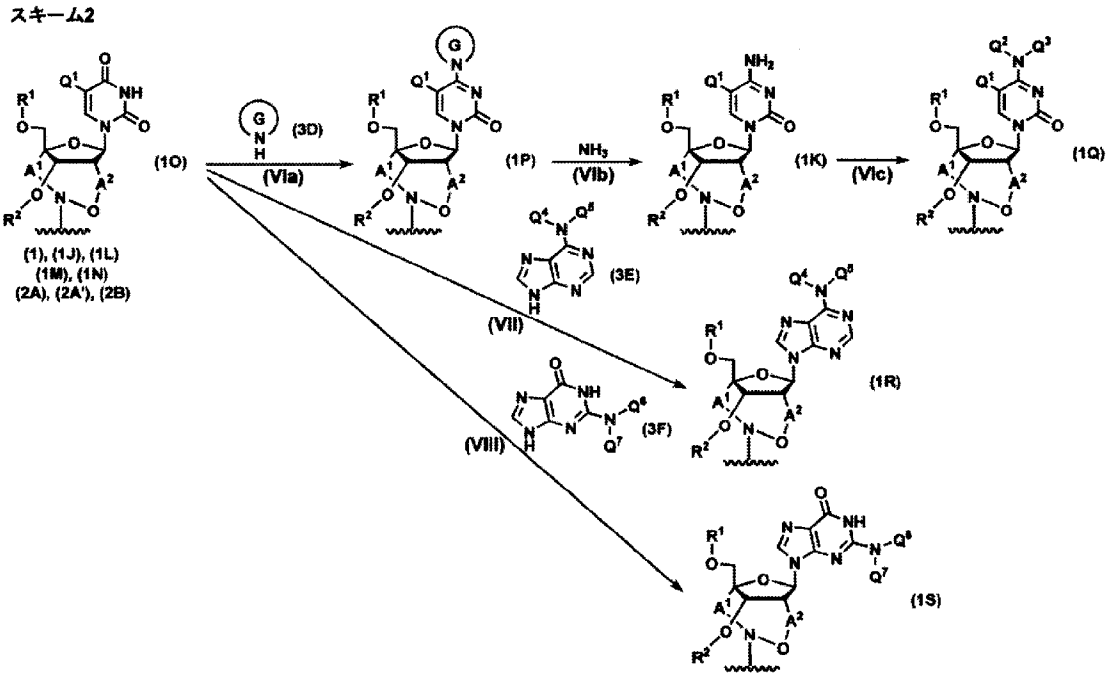
で表される化合物及びトリアルキルシリルクロリド（例：トリメチルシリルクロリド等のトリC_{1-4}アルキルシリルクロリド）と反応させる工程を含む方法であってもよい。

この方法の詳細は、例えば、J. Org. Chem., 76, 2011, 6967～6971頁を参照することができる。

なお、この方法により得られる、R^{3e}がベンジルオキシカルボニル基である化合物から、常法によりベンジルオキシカルボニル基を脱保護し、R^{3e}が水素原子である化合物を得ることができる。

[0077] 化合物（１）、（１Ｊ）、（１Ｌ）、（１Ｍ）、（１Ｎ）、（２Ａ）、（２Ａ’）、及び（２Ｂ）のＢａｓｅは、例えば、以下の反応スキーム２により変換することができる。

[化42]



（式中、Q^1は、水素原子又は置換基であり、Q^2及びQ^3は、同一又は異なって、水素原子又はアミノ基の保護基であり（但し、Q^2及びQ^3は同時に水素原子ではない）、Q^4～Q^7は、同一又は異なって、水素原子又はアミノ基の保護基であり、環Ｇは、５員又は６員の含窒素複素環であり、A^1、A^2、R^1、及びR^2は、前記と同じである）

[0078] ［反応スキーム２］

＜工程（VI）＞

工程（VI）は、化合物（１）、（１Ｊ）、（１Ｌ）、（１Ｍ）、（１Ｎ）、（２Ａ）、（２Ａ’）、及び（２Ｂ）において、Ｂａｓｅを「置換基を有していてもよい２，４－ジオキソ－１，２，３，４－テトラヒドロピリミジン－１－イル基」から「置換基を有していてもよい２－オキソ－１，２－ジヒドロピリミジン－１－イル基」に変換する工程であり、工程（VIａ）～工程（VIｃ）を含む。

＜工程（VIａ）＞

工程（VIａ）は、Ｂａｓｅが「置換基を有していてもよい２，４－ジオキソ－１，２，３，４－テトラヒドロピリミジン－１－イル基」である化合物（１Ｏ）を、式（３Ｄ）で表される化合物及びリン酸ハライドと反応させて、化合物（１Ｐ）を得る工程である。

化合物（１Ｏ）において、Q^1は、好ましくは水素原子又はアルキル基であり、さらに好ましくは水素原子又はC_{1-4}アルキル基である。

化合物（３Ｄ）は、好ましくは５員の含窒素複素環化合物であり、より好ましくはトリアゾールである。

化合物（３Ｄ）の使用量は、化合物（１Ｏ）１モルに対して、通常、５～２０モル、好ましくは７～９モルである。

リン酸ハライドは、好ましくはリン酸トリクロリドである。

リン酸ハライドの使用量は、化合物（１Ｏ）１モルに対して、通常、１～５モル、好ましくは１～３モルである。

前記反応は、好適には、溶媒の存在下で行う。

溶媒の例としては、ニトリル系溶媒（例：アセトニトリル）、エーテル系溶媒（例：テトラヒドロフラン）、ハロゲン系溶媒（例：ハロアルカン）、これら二種以上の混合溶媒が挙げられる。これらのうち、ニトリル系溶媒（例：アセトニトリル）が好ましい。

前記反応は、好適には、塩基の存在下で行う。

塩基の例としては、無機塩基［例：アルカリ金属の炭酸塩（例：炭酸ナトリウム、炭酸セシウム）、アルカリ金属の炭酸水素塩（例：炭酸水素ナトリウム）、アルカリ土類金属の炭酸塩（例：炭酸カルシウム）、アルカリ金属の水酸化物（例：水酸化ナトリウム、水酸化カリウム）、アルカリ土類金属の水酸化物（例：水酸化カルシウム）、金属アルコキシド（例：ナトリウムメトキシド、ナトリウムエトキシド）］、有機塩基［例：第３級アミン（例：トリアルキルアミン）、環状アミン（例：４－(ジメチルアミノ)ピリジン、ジアザビシクロウンデセン(ＤＢＵ)、ジアザビシクロノネン(ＤＢＮ)）］、これらの組合せが挙げられる。これらのうち、第３級アミンが好ましく、トリ$Ｃ_{1-4}$アルキルアミンがより好ましい。

塩基の使用量は、化合物（１Ｏ）１モルに対して、通常、５～２０モル、好ましくは１０～１５モルである。

前記反応の反応温度は、反応が進行する限り特に限定されるものではないが、例えば－５℃～１０℃である。

前記反応は、例えば、米国特許第５３５９０６７号明細書に記載された方法を採用することもできる。

[0079] ＜工程（VIｂ）＞

工程（VIｂ）は、化合物（１Ｐ）を、アンモニアと反応させて、化合物（１Ｋ）を得る工程である。

アンモニアの使用量は、化合物（１Ｐ）１モルに対して、通常、５～１００モル、好ましくは２０～５０モルである。

前記反応は、好適には、溶媒の存在下で行う。

溶媒の例としては、アミド系溶媒（例：Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミド、Ｎ，Ｎ－ジメチルアセトアミド、Ｎ－メチルピロリドン）、エーテル系溶媒（例：テトラヒドロフラン、ジオキサンなどの環状エーテル）、これら二種以上の混合溶媒が挙げられる。これらのうち、エーテル系溶媒が好ましく、環状エーテルがより好ましく、テトラヒドロフラン及びジオキサンから選択される少なくとも一種がさらに好ましい。

前記反応の反応温度は、反応が進行する限り特に限定されるものではないが、例えば１５～３０℃である。

[0080] ＜工程（ＶＩｃ）＞

工程（ＶＩｃ）は、化合物（１Ｋ）のアミノ基を保護基で保護して、化合物（１Ｑ）を得る工程である。前記アミノ基を保護基で保護する方法は、公知（例えば、米国特許出願公開第２００７／１６７３８７号明細書）又は慣用の方法を採用することができる。

[0081] ＜工程（ＶＩＩ）＞

工程（ＶＩＩ）は、化合物（１）、（１Ｊ）、（１Ｌ）、（１Ｍ）、（１Ｎ）、（２Ａ）、（２Ａ’）、及び（２Ｂ）において、Ｂａｓｅを「置換基を有していてもよい２，４－ジオキソ－１，２，３，４－テトラヒドロピリミジン－１－イル基」から「置換基を有していてもよいプリン－９－イル基」に変換する工程である。

工程（ＶＩＩ）は、具体的には、Ｂａｓｅが「置換基を有していてもよい２，４－ジオキソ－１，２，３，４－テトラヒドロピリミジン－１－イル基」である化合物（１Ｏ）を、式（３Ｅ）で表される化合物と反応させて、化合物（１Ｒ）を得る工程である。

化合物（３Ｅ）の使用量は、化合物（１Ｏ）１モルに対して、通常、１～５モル、好ましくは１～３モルである。

前記反応は、好適には、ルイス酸の存在下で行う。

ルイス酸の例としては、トリフルオロメタンスルホン酸トリメチルシリルが挙げられる。

ルイス酸の使用量は、化合物（１Ｏ）１モルに対して、通常、０．５～５モル、好ましくは１～３モルである。

前記反応は、好適には、シリル化剤の存在下で行う。

シリル化剤の例としては、Ｎ，Ｏ－ビス－トリメチルシリルアセトアミド（ＢＳＡ）、Ｎ，Ｏ－ビス－シリルトリフルオロアセトアミド（ＢＳＴＦＡ）、ヘキサメチルジシラザン（ＨＭＤ）、Ｎ，Ｏ－ビス－ターシャリーブチ

ルジメチルシリルアセトアミド、Ｎ－（トリメチルシリル）ジエチルアミン、Ｎ－（トリメチルシリル）ジメチルアミン、Ｎ－メトキシ－Ｎ，Ｏ－ビス（トリメチルシリル）カルバマート、Ｎ－メチル－Ｎ－トリメチルシリルアセトアミド、Ｎ－メチル－Ｎ－トリメチルシリルヘプタフルオロブチルアミド、Ｎ－メチル－Ｎ－トリメチルシリルトリフルオロアセトアミド、Ｎ－トリメチルシリルアセトアミド、これら二種以上の組合せが挙げられる。これらのうち、Ｎ，Ｏ－ビス－トリメチルシリルアセトアミド（ＢＳＡ）が好ましい。

シリル化剤の使用量は、化合物（１０）１モルに対して、通常、１～２０モル、好ましくは３～８モルである。

前記反応の反応温度は、反応が進行する限り特に制限されないが、例えば３０～１５０℃、好ましくは５０～１２０℃である。

前記反応は、例えば米国特許出願公開第２０１２／０７１６４６号明細書に記載された方法を採用することもできる。

[0082] ＜工程（VIII）＞

工程（VIII）は、化合物（１）、（１Ｊ）、（１Ｌ）、（１Ｍ）、（１Ｎ）、（２Ａ）、（２Ａ’）、及び（２Ｂ）において、Ｂａｓｅを「置換基を有していてもよい２，４－ジオキソ－１，２，３，４－テトラヒドロピリミジン－１－イル基」から「置換基を有していてもよい６－オキソ－１，６－ジヒドロ－９Ｈ－プリン－９－イル基」に変換する工程である。

工程（VIII）は、具体的には、Ｂａｓｅが「置換基を有していてもよい２，４－ジオキソ－１，２，３，４－テトラヒドロピリミジン－１－イル基」である化合物を、式（３Ｆ）で表される化合物と反応させて、化合物（１Ｓ）を得る工程である。

前記反応は、工程（VII）と同様の条件で行うことができる。

[0083] 化合物（１）の製造方法は、さらに必要であれば、中間生成物及び最終生成物を、常法、例えば、濃縮、再結晶、シリカゲルカラムクロマトグラフィー等により精製する工程を含んでもよい。

[0084] ＜＜化合物（１）を含む組成物＞＞

本発明の組成物は、上で述べた化合物（１）を含有する。

組成物は、化合物（１）を１種類のみ含有してもよく、２種類以上を含有してもよい。例えば、組成物は、

Ｂａｓｅがチミン－１－イル基である化合物（１）；

Ｂａｓｅが５－メチルシトシン－１－イル基、Ｎ－アセチル－５－メチルシトシン－１－イル基、Ｎ－イソブチリル－５－メチルシトシン－１－イル基、又はＮ－ベンゾイル－５－メチルシトシン－１－イル基である化合物（１）；

Ｂａｓｅがアデニン－９－イル基、Ｎ－アセチル－アデニン－９－イル基、Ｎ－イソブチリル－アデニン－９－イル基、又はＮ－ベンゾイル－アデニン－９－イル基である化合物（１）；及び

Ｂａｓｅがグアニン－９－イル基、Ｎ－アセチル－グアニン－９－イル基、Ｎ－イソブチリル－グアニン－９－イル基、Ｎ－ベンゾイル－グアニン－９－イル基、又はＮ－（Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミジル）－グアニン－９－イル基である化合物（１）

からなる群より選択される、１種類、２種類、３種類、又は４種類の化合物を含有してもよい。

組成物の形態としては、液体が挙げられる。

組成物の形態が液体の場合、組成物は、通常、溶媒を含んでいる。溶媒としては、公知の溶媒を使用でき、好ましくは、ハロゲン化炭化水素系溶媒（例：ジクロロメタン）、ニトリル系溶媒（例：アセトニトリル）、芳香族炭化水素系溶媒（例：トルエン、キシレン）、水、ＴＥバッファーなどが挙げられる。これらのうち、ジクロロメタン、トルエン、アセトニトリルがより好ましい。

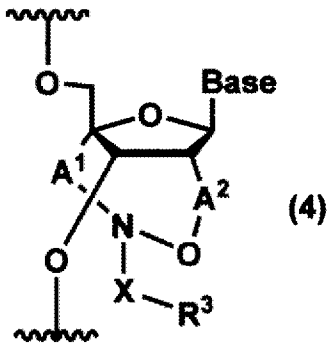
組成物は、通常は容器に収容されてユーザに提供される。

組成物は、後述のオリゴヌクレオチド又はその塩の合成に使用され得る。また、組成物は、医薬組成物として用いられ得る。

[0085] <<オリゴヌクレオチド又はその塩>>

本発明のオリゴヌクレオチド又はその塩は、下記式（４）：

[化43]

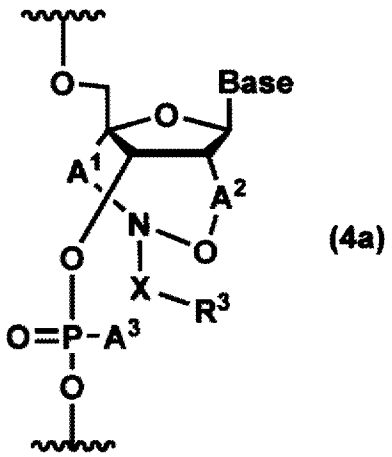


（式中、Ｂａｓｅ、A^1、A^2、Ｘ、及びR^3は、前記と同じである）

で表される単位を有する。

前記単位は、好ましくは、下記式（４ａ）：

[化44]



（式中、A^3は、ＯＨ又はＳＨであり、Ｂａｓｅ、A^1、A^2、Ｘ、及びR^3は、前記と同じである）

で表される単位である。

以下、式（４）又は（４ａ）で表される単位を有するオリゴヌクレオチド又はその塩を、「オリゴヌクレオチド（４）」と称する。

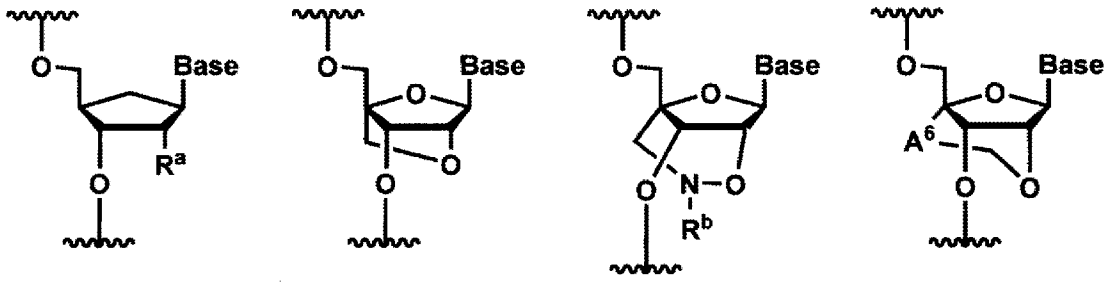
オリゴヌクレオチド（４）が、式（４）又は（４ａ）で表される単位を２以上有する場合、各単位の構造は、同一であってもよく、異なっていてもよ

い。

[0086] オリゴヌクレオチド（４）は、式（４）又は（４ａ）で表される単位に加えて、他の単位を含んでいてもよい。

他の単位の例としては、下記式（５）～（８）：

[化45]



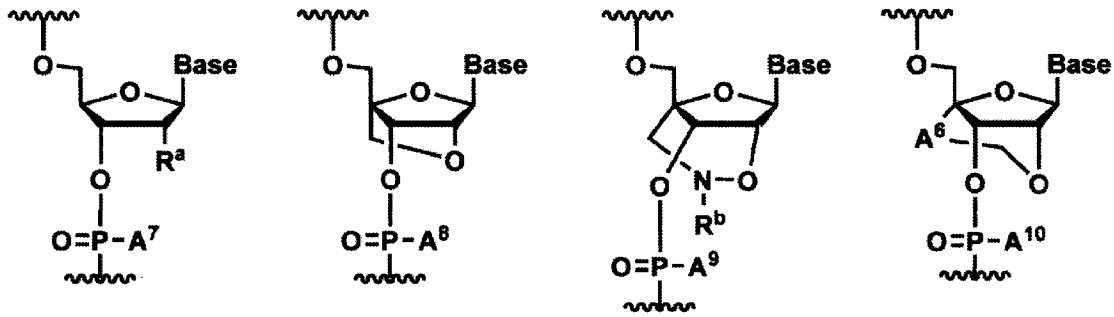
(5) , (6) , (7) , (8)

（式中、Ａ^{6}は、同一又は異なって、単結合又は置換基を有していてもよいアルキレン基であり、Ｒ^{a}は、水素原子又はヒドロキシル基であり、Ｒ^{b}は、水素原子、置換基を有していてもよいアルキル基、置換基を有していてもよいアルケニル基、置換基を有していてもよいシクロアルキル基、置換基を有していてもよいシクロアルケニル基、置換基を有していてもよいアリール基、又はアミノ基の保護基であり、Ｂａｓｅは、前記と同じである）

で表される単位から選択される少なくとも一種が挙げられる。

前記他の単位は、好ましくは、下記式（５ａ）～（８ａ）：

[化46]



(5a) , (6a) , (7a) , (8a)

（式中、Ａ^{7}～Ａ^{10}は、同一又は異なって、ＯＨ又はＳＨであり、Ｂａｓｅ及びＡ^{6}は、前記と同じである。）

で表される単位から選択される少なくとも一種が挙げられる。

なお、他の単位は、例えば、米国特許出願公開第２００３／１０５３０９号明細書、米国特許出願公開第２０１７／０４４５２８号明細書、米国特許出願公開第２００６／１６６９０８号明細書、米国特許出願公開第２０１２／２０８９９１号明細書、米国特許出願公開第２０１５／２６６９１７号明細書、米国特許出願公開第２００３／２０７８４１号明細書に記載されているヌクレオチドに由来する単位であってもよい。

[0087] オリゴヌクレオチド（４）の塩基配列は、標的ＤＮＡ又は標的ＲＮＡの塩基配列（全長又はその一部）に対して相補的である限り、特に制限されない。

オリゴヌクレオチド（４）の長さは、特に限定されるものではなく、標的の塩基配列の長さに応じて選択することができる。オリゴヌクレオチド（４）の長さの下限は、例えば５ｍｅｒ、好ましくは１０ｍｅｒ、さらに好ましくは１５ｍｅｒであり、オリゴヌクレオチド（４）の長さの上限は、例えば２００ｍｅｒ、好ましくは１００ｍｅｒ、より好ましくは５０ｍｅｒ、さらに好ましくは３０ｍｅｒである。オリゴヌクレオチド（４）の長さは、例えば、５～２００ｍｅｒ、好ましくは５～５０ｍｅｒ、より好ましくは１０～４０ｍｅｒ、更に好ましくは１５～３０ｍｅｒである。オリゴヌクレオチド（４）の長さが長くなるほど、標的の塩基配列への結合力は強くなる。

[0088] オリゴヌクレオチド（４）において、ヌクレオチド単位の総数に対して、式（４）で表される単位の数の割合は、特に限定されるものではなく、使用目的（プライマー、プローブ、クランプ核酸、医薬等）に応じて適宜設計することができる。

[0089] オリゴヌクレオチド（４）は、塩の形態であってもよい。すなわち、オリゴヌクレオチド（４）を構成するヌクレオチド単位のうち、少なくとも１つのヌクレオチド単位が、塩の形態であってもよい。前記塩は、薬学上許容される塩であってもよく、薬学上許容される塩でなくてもよい。前記塩は、無機塩であってもよく、有機塩であってもよい。前記塩の例としては、化合物

（１）で例示した塩と同様、アルカリ金属塩、アルカリ土類金属塩、他の金属塩、アンモニウム塩、テトラメチルアンモニウム塩、アミン塩、無機酸塩、有機酸塩、アミノ酸塩が挙げられる。

[0090] オリゴヌクレオチド（４）は、標識物質により修飾されていてもよい。標識物質としては、特に限定されるものではないが、蛍光物質、ハプテン（例えば、ビオチン、ジゴキシゲニン、ＤＮＰなど）、放射性同位体など、核酸に付与する標識として当業界において公知の物質であり得る。

[0091] オリゴヌクレオチド（４）は、配列特異性が高い。

オリゴヌクレオチド（４）は、一本鎖ＲＮＡに対する二重鎖形成能を表すＴｍ値が、同じＢａｓｅのＤＮＡ（式（５）R^a＝Ｈ）と比べて高い。

オリゴヌクレオチド（４）は、一本鎖ＤＮＡに対する二重鎖形成能を表すＴｍ値も、同じＢａｓｅのＤＮＡ（式（５）R^a＝Ｈ）と比べて高い。

オリゴヌクレオチド（４）は、一本鎖ＲＮＡのみならず、一本鎖ＤＮＡに対しても高い二重鎖形成能を有することができ、かかる点において従来のオリゴヌクレオチドよりも優れている。オリゴヌクレオチド（４）は、一本鎖ＲＮＡ又は一本鎖ＤＮＡの塩基配列を検査したり、配列高選択的に検出するプローブとして好適に利用することができる。

[0092] オリゴヌクレオチド（４）は、ヌクレアーゼに対して分解されにくく、生体への投与後、長く生体内に存在することができる。オリゴヌクレオチド（４）は、例えば、センスＲＮＡと二重鎖を形成して病因となる生体内成分（タンパク質）のｍＲＮＡの転写を阻害することができる。また、オリゴヌクレオチド（４）は、感染したウイルスの増殖を阻害することもできる。

オリゴヌクレオチド（４）は、抗腫瘍剤、抗ウイルス剤などの遺伝子の働きを阻害して疾病を治療する医薬として有用である。

また、オリゴヌクレオチド（４）は、安定で優れたアンチセンスもしくはアンチジーン又はアプタマーとしての活性を有し、又は特定遺伝子の検出薬もしくは増幅開始のためのプライマーとして優れた活性を有する。

オリゴヌクレオチド（４）は、各種の生理・生物活性物質、医薬品の材料

、ＲＮＡ干渉法やデコイ法用などの二重鎖オリゴヌクレオチドの機能性材料、ｃＤＮＡなどの一本鎖核酸を標的とするＤＮＡチップ、モレキュラービーコン（molecular beacon）などの機能性素材、様々なアンチセンス法（リボザイム、ＤＮＡザイムを含む）、アンチジーン法や遺伝子相同組み換え法用途への機能性素材、蛍光や発光物質との組合せによる生体微量成分の高感度分析用材料や遺伝子機能解明等の研究用試薬の開発素材として有用である。

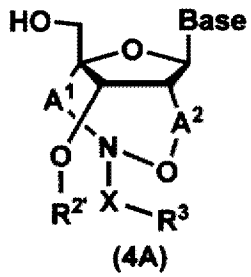
[0093] ＜＜オリゴヌクレオチド（４）の製造方法＞＞

オリゴヌクレオチド（４）は、慣用の方法、例えば、ホスホロアミダイトプロトコールに従って合成することができる。

例えば、オリゴヌクレオチド（４）の製造方法は、

（Ｉ）下記式（４Ａ）：

[化47]

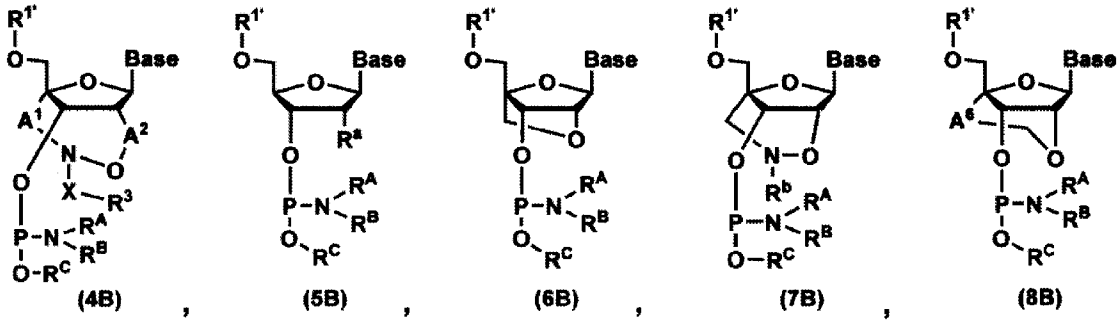


(4A)

（式中、Ｒ$^{2'}$は、置換基を有していてもよいアルキル基、置換基を有していてもよいアルケニル基、置換基を有していてもよいシクロアルキル基、置換基を有していてもよいシクロアルケニル基、置換基を有していてもよいアリール基、ヒドロキシル基の保護基、置換基を有するホスフィノ基、置換基を有していてもよいジヒドロキシホスフィニル基、又は置換基を有していてもよいヒドロキシメルカプトホスフィニル基であり、Ｂａｓｅ、Ａ^{1}、Ａ^{2}、Ｘ、及びＲ^{3}は、前記と同じである）

で表される化合物又はその塩を、下記式（４Ｂ）～（８Ｂ）：

[化48]



（式中、

$R^{1'}$は、水素原子、置換基を有していてもよいアルキル基、置換基を有していてもよいアルケニル基、置換基を有していてもよいシクロアルキル基、置換基を有していてもよいシクロアルケニル基、置換基を有していてもよいアリール基、ヒドロキシル基の保護基、置換基を有するホスフィノ基、置換基を有していてもよいジヒドロキシホスフィニル基、又は置換基を有していてもよいヒドロキシメルカプトホスフィニル基であり、

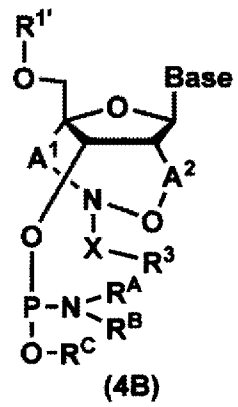
R^A及びR^Bは、同一又は異なって、水素原子又はアルキル基であり、

R^Cは、水素原子、アルキル基、ハロアルキル基、又はシアノアルキル基であり、

Ｂａｓｅ、A^1、A^2、A^6、Ｘ、R^3、R^a、及びR^bは、前記と同じである）で表される化合物又はその塩から選択される少なくとも一種と反応させる工程、及び／又は、

（II）下記式（４Ｂ）：

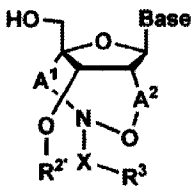
[化49]



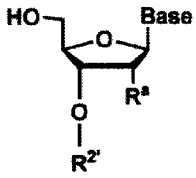
（式中、Ｂａｓｅ、A^1、A^2、Ｘ、$R^{1'}$、R^3、R^A、R^B、及びR^Cは、前記と同じである）

で表される化合物又はその塩を、下記式（４Ａ）～（８Ａ）：

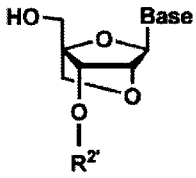
[化50]


(4A)

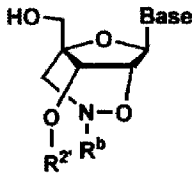
，


(5A)

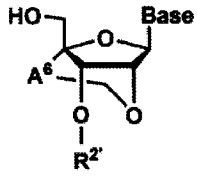
，


(6A)

，


(7A)

，


(8A)

（式中、Ｂａｓｅ、A^1、A^2、A^6、Ｘ、$R^{2'}$、R^3、R^a、及びR^bは、前記と同じである）

で表される化合物又はその塩から選択される少なくとも一種と反応させる工程、並びに（III）工程（Ｉ）及び／又は工程（II）で得られた化合物を酸化する（特に、リン原子を酸化する）工程

を含む。

オリゴヌクレオチド（４）の製造方法は、さらに必要であれば、中間生成物及び最終生成物を、常法、例えば、濃縮、再結晶、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、ゲル濾過、エタノール沈殿、分取ＨＰＬＣ等により精製する工程を含む。

[0094] ＜＜オリゴヌクレオチド（４）を含む組成物＞＞

本発明の組成物は、上で述べたオリゴヌクレオチド（４）を含有する。

組成物は、オリゴヌクレオチド（４）を１種類のみ含有してもよく、２種類以上を含有してもよい。

組成物の形態としては、液体、固体が挙げられる。

組成物の形態が液体の場合、組成物は、通常、溶媒を含んでいる。溶媒としては、公知の溶媒を使用でき、好ましくは、ハロゲン化炭化水素系溶媒（例：ジクロロメタン）、ニトリル系溶媒（例：アセトニトリル）、芳香族炭化水素系溶媒（例：トルエン、キシレン）、水が挙げられる。これらのうち、水がより好ましく、バッファーを含有する水（緩衝液）がより好ましい。

バッファーの例としては、トリスヒドロキシメチルアミノメタン（Ｔｒｉｓ緩衝液）、トリスヒドロキシメチルアミノメタン－塩酸（Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ緩衝液）、トリスヒドロキシメチルアミノメタン－ＥＤＴＡ（ＴＥ緩衝液）、リン酸ナトリウム、２－モルホリノエタンスルホン酸（ＭＥＳ）、Ｎ－（２－アセトアミド）イミノ二酢酸（ＡＤＡ）、ピペラジン－１，４－ビス（２－エタンスルホン酸）、Ｎ－（２－アセトアミド）－２－アミノエタンスルホン酸（ＡＣＥＳ）、コラミン塩酸、Ｎ，Ｎ－ビス（２－ヒドロキシエチル）－２－アミノエタンスルホン酸（ＢＥＳ）、Ｎ－トリス（ヒドロキシメチル）メチル－２－メタンスルホン酸（ＴＥＳ）、２－［４－（２－ヒドロキシエチル）－１－ピペラジニル］エタンスルホン酸（ＨＥＰＥＳ）、アセトアミドグリシン、トリシン、グリシンアミド、ビシンが挙げられる。

組成物は、さらに塩を含有していてもよい。塩は、金属塩化物を包含し、その例としては、ＮａＣｌ、$MgCl_2$、ＫＣｌが挙げられる。

組成物は、さらに添加物及び共溶媒を含有していてもよい。その例としては、ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）、グリセロール、ホルムアミド、ウシ血清アルブミン、硫酸アンモニウム、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、ゼラチン、非イオン性界面活性剤を含有していてもよい。非イオン性界面活性剤の例としては、Ｔｗｅｅｎ２０（登録商標）、Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ-１００（登録商標）が挙げられる。

組成物の形態が固体の場合、組成物は、例えば、オリゴヌクレオチド（４）を固相担体に担持させたものであってもよい。固相担体には、生体高分子を担持させることのできる無機材料や有機材料が挙げられる。好ましくはガラス（例：多孔質ガラス(CPG)）、シリカゲル、樹脂（例：架橋した非膨潤性のポリスチレン樹脂(HPS)）が挙げられる。これらのうち、HPSやCPGがより好ましい。

組成物は、通常は容器に収容されてユーザに提供される。

組成物は、後述の標的核酸の検出、ストランドインベージョンなどに使用され得る。また、組成物は、医薬組成物として用いられ得る。

[0095] ＜＜検査試料における標的核酸を検出する方法＞＞

本発明は、検査試料において標的核酸を検出する方法を含む。この方法は、

（Ｉ）前記標的核酸の標的部位を含む塩基配列（標的核酸の全長の塩基配列を含む）を、クランプ核酸を用いる核酸増幅法によって、選択的に増幅させる工程であって、前記クランプ核酸がオリゴヌクレオチド（４）である工程、及び

（II）前記増幅された塩基配列を検出する工程

を含む。

[0096] 検査試料は、核酸を含むものであれば、特に限定されない。検査試料は、典型的には、生体から採取された試料である。通常は、生体から採取された試料から夾雑物の除去、核酸の抽出・精製、プレアンプリフィケーションなどの前処理により得られる試料が用いられる。具体的には、血液、血漿、血清、胸水、気管支洗浄液、骨髄液、リンパ液、尿、糞便、腸管洗浄液、切除組織などを用いることができる。またこれらに上記の前処理を行った試料を用いることもできる。本発明の方法は、非常に高感度で核酸の変異を検出し得るため、例えば、病変部位から試料が直接採取される固体試料（例：癌）を用いることも、検査対象試料が微量しか含まれない液体試料（例：血液）を用いることも可能である。検査試料は標的核酸を含む溶液であることが好ましい。血液や切除組織に含まれる細胞内の標的核酸を検出する場合は、公知の方法により細胞の可溶化を行ってもよい。

[0097] 標的核酸は、ＤＮＡであってもＲＮＡであってもよいが、好ましくはＤＮＡである。標的核酸は、遺伝子、遺伝子のプロモータ領域などゲノムＤＮＡ上の特定の領域であり得る。本発明の検出方法は、標的部位における変異、多型等の検出に用いられ得る。また、本発明の検出方法は対立遺伝子の決定に用いられ得る。検査試料にどのような型の対立遺伝子が含まれるかを検出することができる。また、本発明の検出方法は、メチル化の検出にも用いられ得る。標的核酸をバイサルファイト処理した後、本発明の検出方法を適用

することにより、標的核酸におけるメチル化シトシンの存否を検出することができる。

変異を含む遺伝子（以下、変異型遺伝子）は、野生型遺伝子の塩基配列との相違、即ち変異を有する。当該相違は、置換、挿入、欠失、逆位、重複、及び転座からなる群から選択される１つ以上の変異又はそれらの組合せに起因するものである。

当該相違は、通常、特定の疾患の発症及び／又は治療感受性に関連する場合がある。ここで、「発症」とは、疾患の実際の発症のみならず、発症リスクなども含む。また、「治療感受性」とは、薬物などによる治療の奏効率のみならず、副作用の強弱なども含む。上記疾患としては、例えば、癌、骨髄異形成症候群、感染症などが挙げられるが、これらに限定されない。上記疾患の好適な例は、癌である。

前記遺伝子の好適な例は、ＡＢＬ／ＢＣＲ融合遺伝子、ＨＥＲ２遺伝子、ＥＧＦＲ遺伝子、ｃ－ＫＩＴ遺伝子、ＫＲＡＳ遺伝子、ＢＲＡＦ遺伝子、ＰＩＫ３ＣＡ遺伝子、ＦＬＴ３遺伝子、ＭＹＣ遺伝子、ＭＹＣＮ遺伝子、ＭＥＴ遺伝子、ＢＣＬ２遺伝子、又はＥＭＬ４／ＡＬＫ融合遺伝子である。

[0098] クランプ核酸は、通常、標的核酸（例：変異型遺伝子）に比べて、検査試料中の非標的核酸（例：野生型遺伝子）をより強くクランプする。クランプ核酸が非標的核酸に強く結合し、非標的核酸の増幅が阻害されることによって、標的核酸を選択的に増幅することができる。例えば、特定の遺伝子の変異を検出する場合、野生型の遺伝子配列に完全に相補的な塩基配列を有するクランプ核酸の存在下で核酸増幅を行うことにより、野生型の核酸の増幅が阻害され、変異型の核酸が選択的に増幅される。

具体的には、例えば、標的核酸の標的部位を変異型遺伝子の変異箇所とし、この変異箇所（標的核酸の標的部位）を含む塩基配列を「配列Ａ」とするとき、クランプ核酸は、非標的核酸である野生型遺伝子における配列Ａに相応する塩基配列に対して完全に相補的である。

オリゴヌクレオチド（４）は、配列高選択性を有する。したがって、クラ

ンプ核酸は、１塩基でも相違する塩基配列に対する結合能は極めて弱く、完全に相補的な塩基配列には特異的に結合し得る。また、オリゴヌクレオチド（４）は、Ｔｍ値が高く、安定した二重鎖を形成する。すなわち、クランプ核酸は、非標的核酸と特異的に強く結合し、高いクランプ能力を発揮する。

クランプ核酸の長さは、特に限定されるものではないが、例えば５～３０ｍｅｒである。

[0099] 核酸増幅法としては、標的部位を増幅でき、かつクランプ核酸の結合により前記増幅を選択的に阻害できるものである限り、特に制限されない。核酸増幅法の例としては、ＰＣＲ法（ホットスタートＰＣＲ法、マルチプレックスＰＣＲ法、ネステッドＰＣＲ法、ＲＴ－ＰＣＲ法、リアルタイムＰＣＲ法、デジタルＰＣＲ法などを含む）、ＮＡＳＢＡ法（米国特許第５１３０２３８号明細書参照）、ＴＭＡ法（米国特許第５３９９４９１号明細書参照）、ＴＲＣ法（米国特許出願公開第２００１／００５３５１８号明細書参照）、ＬＡＭＰ法（米国特許第６４１０２７８号明細書参照）、ＩＣＡＮ法（米国特許出願公開第２００３／０７３０８１号明細書参照）、ＬＣＲ法（欧州特許出願番号３２０３２８号参照）、ＳＤＡ法（米国特許第５４５５１６６号明細書参照）が挙げられる。

[0100] 増幅された標的核酸を検出する方法としては、任意の方法を用いることができる。

検出方法の好適な例は、標的核酸の標的部位（例えば、変異型遺伝子の変異箇所）を含む塩基配列に相補的な塩基配列を有する一本鎖核酸である検出用プローブを用いる方法である。具体的な方法としては、例えばサザンハイブリダイゼーション法、ＴａｑＭａｎ™プローブ法、サイクリングプローブ法が挙げられる。

検出用プローブの好適な例は、一方の末端（通常、５’末端）を蛍光基（レポーター）で、他方の末端（通常、３’末端）を消光基で標識した加水分解プローブである。このプローブを用いると、ＰＣＲにおいてＤＮＡポリメラーゼによる伸長反応が進むと、そのエキソヌクレアーゼ活性により蛍光プ

ローブが加水分解され、レポーター色素が遊離し、蛍光を発する。この蛍光強度をモニタリングすることにより、核酸を定量することができる。

また、増幅された標的核酸を検出する方法として、塩基配列解析法が例示される。増幅された標的核酸の塩基配列を公知の配列解析装置（シーケンサー）を用いて解析することにより、標的核酸を検出することができる。

[0101] なお、検査試料における標的核酸を検出する方法は、例えば米国特許出願公開第２０１５／２４０２９９号明細書に記載の方法を採用することもできる。

[0102] このように、オリゴヌクレオチド（４）を用いれば、検査試料において標的核酸を配列高選択的に検出することが可能である。

[0103] ＜＜検査試料における標的核酸を検出する、又は検査試料における標的核酸の標的部位を含む塩基配列を選択的に増幅するための組成物及びキット＞＞

検査試料における標的核酸を検出する、又は検査試料における標的核酸の標的部位を含む塩基配列を選択的に増幅するための組成物（以下、「検査用組成物」と称する）は、オリゴヌクレオチド（４）を含む。オリゴヌクレオチド（４）は、通常、組成物の形態でキットに含まれる。

検査用組成物において、オリゴヌクレオチド（４）は、上で述べたとおり、標的核酸検出におけるプライマー、プローブ、及び／又はクランプ核酸として用いられ得る。プライマー、プローブ、及び／又はクランプ核酸は、標的核酸や非標的核酸の塩基配列に応じて適宜設計することができる。

一実施形態の検査用組成物は、プライマー及びプローブを含む。これらのうち少なくともいずれかが、オリゴヌクレオチド（４）である。プライマー及びプローブは同じ容器に収容されていてもよいし、別々の容器に収容されていてもよい。

図１１（Ａ）は、検査用組成物であるプライマー及びプローブが同じ容器に収容されたキットの一例の模式図である。キット１１は、外装箱１２と、外装箱１２内に設けられ、表面に凹部が形成された容器支持体と、凹部に装着され、プライマー及びプローブが収容された容器１３と、添付文書１４と

を含む。添付文書１４には、キット１１の取り扱い方法、保管条件、使用期限などを記載しておくことができる。

図１１（Ｂ）は、検査用組成物であるプライマー及びプローブが別々の容器に収容されたキットの一例の模式図である。キット２１は、外装箱２２と、外装箱２２内に設けられ、表面に長手方向に沿って間隔をおいて第１の凹部及び第２の凹部が形成された容器支持体と、第１の凹部に装着され、プライマーが収容された容器２３ａと、第２の凹部に装着され、プローブが収容された容器２３ｂと、添付文書２４とを含む。

別の実施形態の検査用組成物は、フォワードプライマー、リバースプライマー及びプローブを含む。これらのうち少なくともいずれかが、オリゴヌクレオチド（４）である。フォワードプライマー、リバースプライマー及びプローブは、３種類全てが同じ容器に収容されていてもよいし（例：図１１（Ａ）に示されるようなキット）、いずれか２種類が同じ容器に収容されていてもよいし（例：図１１（Ｂ）に示されるようなキット）、３種類全てが別々の容器に収容されていてもよい。

図１１（Ｃ）は、フォワードプライマー、リバースプライマー及びプローブの全てが別々の容器に収容されたキットの一例の模式図である。キット３１は、外装箱３２と、外装箱３２内に設けられ、表面に長手方向に沿って間隔をおいて第１～第３の凹部が形成された容器支持体と、第１の凹部に装着され、フォワードプライマーが収容された容器３３ａと、第２の凹部に装着され、リバースプライマーが収容された容器３３ｂと、第３の凹部に装着され、プローブが収容された容器３３ｃと、添付文書３４とを含む。

また別の実施態様の検査用組成物は、クランプ核酸及びプライマーを含む。これらのうち少なくともいずれかが、オリゴヌクレオチド（４）である。この検査用組成物は、標的核酸のみを増幅するための検査用組成物であり得る。クランプ核酸及びプライマーは、同じ容器に収容されていてもよいし（例：図１１（Ａ）に示されるようなキット）、別々の容器に収容されていてもよい（例：図１１（Ｂ）に示されるようなキット）。

さらに別の実施形態の検査用組成物は、クランプ核酸、プライマー及びプローブを含む。これらのうち少なくともいずれかが、オリゴヌクレオチド（４）である。クランプ核酸、プライマー及びプローブは、３種類全てが同じ容器に収容されていてもよいし（例：図１１（Ａ）に示されるようなキット）、いずれか２種類が同じ容器に収容されていてもよいし（例：図１１（Ｂ）に示されるようなキット）、３種類全てが別々の容器に収容されていてもよい（例：図１１（Ｃ）に示されるようなキット）。

キットには、ＤＮＡポリメラーゼ、デオキシヌクレオシド三リン酸（ｄＮＴＰｓ）、リアクションバッファー、塩、制限酵素等が含まれていてもよい。

本発明は、検査試料における標的核酸を検出する、又は検査試料における標的核酸の標的部位を含む塩基配列を選択的に増幅するための、オリゴヌクレオチド（４）の使用を含む。ここで使用されるオリゴヌクレオチド（４）は、例えば、検査用組成物に含有されるオリゴヌクレオチド（４）と同じ特徴を有する。

[0104] ＜＜二重鎖ＤＮＡの標的部位にオリゴヌクレオチドを鎖侵入させるための組成物＞＞

本発明は、二重鎖ＤＮＡの標的部位にオリゴヌクレチドを鎖侵入させるための組成物（以下、「ストランドインベージョン用組成物」と称する）を含む。

ストランドインベージョン用組成物は、前記標的部位の塩基配列に対して相補的な塩基配列を有するオリゴヌクレオチド（４）を含有する。

ストランドインベージョン用組成物は、オリゴヌクレオチド（４）を１種類のみ含有してもよく、２種類以上を含有してもよい。一実施形態では、２種類以上のオリゴヌクレオチド（４）は、いずれも、二重鎖ＤＮＡの一方の鎖にハイブリダイズする。別の実施形態では、２種類以上のオリゴヌクレオチド（４）は、二重鎖ＤＮＡの一方の鎖にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドと、二重鎖ＤＮＡの他方の鎖にハイブリダイズするオリゴヌクレオチ

ドとを含む。オリゴヌクレオチド（４）を２種類以上用いることにより、ストランドインベージョンをより一層増強させることができる。

ストランドインベージョン用組成物は、さらに一本鎖ＤＮＡ結合タンパク質を含有してもよい。しかし、本発明のオリゴヌクレオチド（４）を使用すれば、一本鎖ＤＮＡ結合タンパク質を含有しなくても、ストランドインベージョンを起こすことが、後述の実験により初めて見出された。したがって、ストランドインベージョン用組成物が、一本鎖ＤＮＡ結合タンパク質を含有しない態様も好ましい。

ストランドインベージョン用組成物は、バッファーを含有する水（又は緩衝液）、塩、添加物、及び共溶媒から選択される少なくとも一種を含有していてもよい。これらの各成分は、「オリゴヌクレオチド（４）を含む組成物」で例示したものを使用することができる。

ストランドインベージョン用組成物において、オリゴヌクレオチド（４）の濃度は、オリゴヌクレオチド（４）や標的の二重鎖ＤＮＡの配列やヌクレオチド長を考慮し、当業者が適宜調整することができる。さらにインビトロでストランドインベージョン反応を行う場合は、サンプル中の標的二重鎖ＤＮＡの濃度等を考慮し得る。インビボでストランドインベージョン反応を行う場合は、生体内におけるオリゴヌクレオチド（４）の動態（具体的には、血中濃度、血中半減期など）を考慮し得る。ストランドインベージョン用組成物におけるオリゴヌクレオチド（４）の濃度の下限は、例えば５０ｎＭ、好ましくは１００ｎＭであり、オリゴヌクレオチド（４）の濃度の上限は、例えば３０００ｎＭ、好ましくは２５００ｎＭ、より好ましくは２０００ｎＭ、さらに好ましくは１５００ｎＭ、特に好ましくは１０００ｎｍである。オリゴヌクレオチド（４）の濃度は、例えば５０～２０００ｎＭであり、好ましくは１００～１０００ｎＭである。

オリゴヌクレオチド（４）は、配列高選択性を有する。したがって、ストランドインベージョン用組成物は、相補的な塩基配列を有する標的部位の塩基配列にのみ特異的に結合し得る。また、オリゴヌクレオチド（４）は、Ｔ

ｍ値が高く、標的部位の塩基配列と強く結合して安定したストランドインベージョンを形成する。さらに、オリゴヌクレオチド（４）は、ヌクレアーゼに対して分解されにくい。したがって、オリゴヌクレオチド（４）は、ストランドインベージョン用組成物に好適に利用することができる。

本発明は、二重鎖ＤＮＡの標的部位にオリゴヌクレチドを鎖侵入させるための、オリゴヌクレオチド（４）の使用を含む。ここで使用されるオリゴヌクレオチド（４）は、例えば、前記ストランドインベージョン用組成物に含有されるオリゴヌクレオチド（４）と同じ特徴を有する。

[0105] ＜＜二重鎖ＤＮＡの標的部位にオリゴヌクレオチドを鎖侵入させる方法＞＞

本発明は、単離された二重鎖ＤＮＡの標的部位にオリゴヌクレオチドを鎖侵入させる方法（以下、「ストランドインベージョン法」と称する）を含む。

ストランドインベージョン法は、二重鎖ＤＮＡの標的部位の塩基配列に対して相補的な塩基配列を有するオリゴヌクレオチド（４）と二重鎖ＤＮＡとを混合する工程を含む。

前記混合工程は、一実施態様において、オリゴヌクレオチド（４）と二重鎖ＤＮＡとを、一本鎖ＤＮＡ結合タンパク質の存在下で混合する工程である。

この工程は、バッファー及び／又は塩の存在下で行ってもよい。前記バッファー及び塩は、例えば、「オリゴヌクレオチド（４）を含む組成物」で記載したものから選択することができる。

[0106] 前記混合工程は、一本鎖ＤＮＡ結合タンパク質の非存在下で実施することもできる。すなわち、ストランドインベージョン法は、他の実施態様において、オリゴヌクレオチド（４）と二重鎖ＤＮＡとを、一本鎖ＤＮＡ結合タンパク質の非存在下で混合して混合物を調製する工程、及び前記混合物を加熱する工程を含む。

一本鎖ＤＮＡ結合タンパク質の非存在下での混合工程は、バッファー及び／又は塩の存在下で行ってもよい。前記バッファー及び塩は、例えば、スト

ランドインベージョン用組成物で記載したものから選択することができる。

混合物の加熱工程において、加熱温度は、例えば、７５℃を超える範囲から選択できる。加熱温度の下限は、好ましくは８０℃、より好ましくは８５℃、さらに好ましくは９０℃であり、加熱温度の上限は、好ましくは１００℃である。加熱温度は、好ましくは８０～１００℃、さらに好ましくは８５～１００℃、特に好ましくは９０～１００℃である。加熱時間は、特に限定されるものではない。加熱時間の下限は、例えば７分、好ましくは８分、さらに好ましくは９分、特に好ましくは１０分であり、加熱時間の上限は、例えば１２時間、好ましくは６時間、より好ましくは３時間、さらに好ましくは１時間、特に好ましくは３０分である。加熱温度は、例えば７分～１２時間、好ましくは８分～６時間、さらに好ましくは９分～１時間、特に好ましくは１０分～３０分である。

この方法は、さらに加熱された混合物を冷却する工程を含んでいてもよい。前記冷却において、冷却到達温度の下限は、例えば３０℃、好ましくは３５℃、より好ましくは４０℃、さらに好ましくは４５℃であり、冷却到達温度の上限は、好ましくは６０℃である。冷却到達温度は、例えば、３０～６０℃、好ましくは４０～６０℃、更に好ましくは４５～６０℃である。冷却速度は、特に限定されるものではない。冷却速度の下限は、例えば１℃／分、好ましくは２℃／分であり、冷却速度の上限は、例えば１０℃／分、好ましくは９℃／分、さらに好ましくは８℃／分である。冷却速度は、例えば１～１０℃／分、好ましくは２～８℃／分である。

[0107] ストランドインベージョン法は、別の実施態様において、オリゴヌクレオチド（４）と二重鎖ＤＮＡとを、一本鎖ＤＮＡ結合タンパク質の非存在下で混合して混合物を調製する工程、及び前記混合物を２５～７５℃に維持する工程を含む。

一本鎖ＤＮＡ結合タンパク質の非存在下での混合工程は、前記と同様、バッファー及び／又は塩の存在下で行ってもよい。前記バッファー及び塩は、例えば、ストランドインベージョン用組成物で記載したものから選択するこ

とができる。

混合物を所定の温度範囲に維持する工程において、維持時間は、特に限定されるものではない。維持時間の下限は、例えば２時間、好ましくは４時間、さらに好ましくは６時間であり、維持時間の上限は、例えば６０時間、好ましくは４８時間、さらに好ましくは２４時間である。維持時間は、例えば２～６０時間、好ましくは４～４８時間、更に好ましくは６～２４時間である。

このように、オリゴヌクレオチド（４）を用いれば、一本鎖ＤＮＡ結合タンパク質が存在するか否かにかかわらず幅広い温度範囲においてストランドインベージョンを生じさせることが可能である。

[0108] ＜医薬組成物（又は製剤）＞

本発明の医薬組成物（又は製剤）は、化合物（１）又はオリゴヌクレオチド（４）を含んでいる。化合物（１）を含む医薬組成物（又は製剤）としては、例えば、核酸系逆転写酵素阻害剤（Nucleoside Analogue Reversetranscriptase Inhibitor：ＮＲＴＩ）であるＡＺＴ（azidothymidine）などの低分子医薬品が挙げられる。オリゴヌクレオチド（４）を含む医薬組成物（又は製剤）としては、例えば、アンチセンス、ｓｉＲＮＡ（small interfering RNA）、アプタマー、デコイ核酸、ＣｐＧオリゴなどの中分子、あるいは高分子の核酸医薬品が挙げられる。

医薬組成物は、液状製剤（例：注射剤、点眼剤、点鼻剤、懸濁剤）、固形製剤（例：錠剤、顆粒剤、散剤）、半固形製剤（例：軟膏剤、坐剤）、その他当業者に公知の製剤形態のいずれであってもよい。

医薬組成物の好適な例は、非経口投与製剤（例：皮下投与剤、静脈内投与剤、経鼻腔投与剤、髄腔内投与剤、脳室内投与剤、硝子体投与剤）である。

医薬組成物の他の好適な例は、局所用製剤である。

医薬組成物は、通常、さらに薬学上許容される担体又は添加剤を含んでいる。

担体は、固体担体及び液体担体を包含する。固体担体の例としては、デン

プン、ラクトース、硫酸カルシウム二水和物、ショ糖、タルク、ゼラチン、寒天、ペクチン、アラビアガム、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸が挙げられる。液体担体の例としては、水（生理食塩水を含む）が挙げられる。

添加剤は、安定剤を包含し、その例としては、メチルパラベン、プロピルパラベン等のパラオキシ安息香酸エステル類；ベンジルアルコール等のアルコール類；塩化ベンザルコニウム；フェノール、クレゾール等のフェノール類）が挙げられる。

オリゴヌクレオチド（４）は、配列高選択性を有し、Ｔｍ値が高く、ヌクレアーゼに対して分解されにくい。したがって、化合物（１）又はオリゴヌクレオチド（４）を含んだ医薬組成物（又は製剤）は、体内においてターゲット（例:標的遺伝子）を配列高選択的に捉えて作用し得る。

実施例

[0109] 以下に、実施例に基づいて本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

[0110] ＜＜化合物（１）の合成例＞＞

合成例における記号及び略号は、以下のとおりである。

Ｂｚ：ベンゾイル

ＤＭＴｒ：ジメトキシトリチル

Ｐｈ：フェニル

ｉ－Ｐｒ：イソプロピル

Ｔｓ：トシル

ＢＳＡ：Ｎ，Ｏ－ビス（トリメチルシリル）アセトアミド

ＤＩＰＥＡ：ジイソプロピルエチルアミン

ＤＭＡＰ：ジメチルアミノピリジン

ＤＭＦ：ジメチルホルムアミド

PPh_3：トリフェニルホスフィン

Et_3N：トリエチルアミン

ＭｅＯＨ：メタノール

ＴＢＡＦ：フッ化テトラ－ｎ－ブチルアンモニウム

ＴＦＡ：トリフルオロメチルカルボニル

ＴＦＡＡ：無水トリフルオロ酢酸

ＴＨＦ：テトラヒドロフラン

ＴＭＳＯＴｆ：トリフルオロメタンスルホン酸トリメチルシリル

ｒｔ：室温

ｄ：日

ｈ：時間

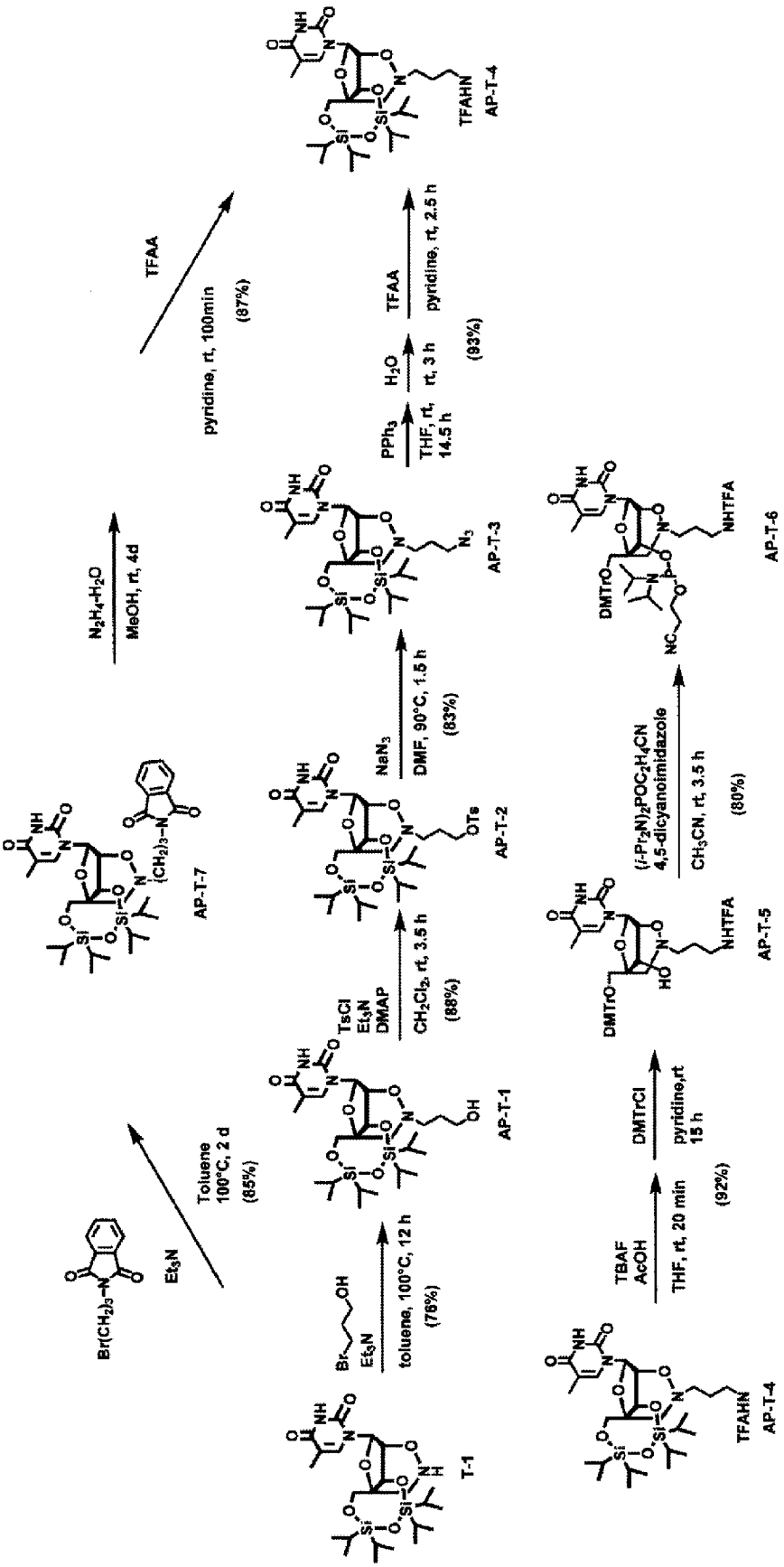
ｍｉｎ：分

[0111] ［合成例１］

Ｂａｓｅがチミン－１－イル基であり、Ａ[1]がメチレン基であり、Ａ[2]が単結合であり、Ｘがｎ－プロピレン基であり、Ｒ[1]がＤＭＴｒであり、Ｒ[2]が－Ｐ(Ｎ(ｉ－Ｐｒ)$_2$)(ＯＣ$_2$Ｈ$_4$ＣＮ)であり、Ｒ[3]がトリフルオロメチルカルボニルアミノ基である化合物（１）（以下、「化合物AP-T-6」と称する）は、下記反応スキームに従って合成した。

[0112]

[化51]


Br(CH2)3–N
Et3N
Toluene
100°C, 2 d
(85%)
T-1
Br
OH
Et3N
toluene, 100°C, 12 h
(78%)
AP-T-1
TsCl
Et3N
DMAP
CH2Cl2, rt, 3.5 h
(88%)
AP-T-2
NaN3
DMF, 90°C, 1.5 h
(83%)
AP-T-3
PPh3
THF, rt,
14.5 h
H2O
rt, 3 h
TFAA
pyridine, rt, 2.5 h
(93%)
AP-T-4
TFAA
pyridine, rt, 100min
(87%)
N2H4–H2O
MeOH, rt, 4d
AP-T-7
TBAF
AcOH
THF, rt, 20 min
DMTrCl
pyridine,rt
15 h
(92%)
AP-T-5
(i-Pr2N)2POC2H4CN
4,5-dicyanoimidazole
CH3CN, rt, 3.5 h
(80%)
AP-T-6

[0113] （化合物AP-T-1の合成）

窒素気流下、化合物T-1（4.72 g, 8.93 mmol）をトルエン（80 mL）に溶解し、トリエチルアミン（7.5 mL, 53.58 mmol）、3-ブロモ-1-プロパノール（3.5 mL, 40.19 mmol）を室温で順次加え、100°Cで12時間攪拌した。反応液を冷却し飽和重曹水で反応を停止させた後、酢酸エチル、水で希釈をおこない、有機層と水層にそれぞれ分画した。水層は酢酸エチルで逆抽出をおこなった。最初の分画で得られた有機層と逆抽出で得られた有機層を合わせて、飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥させ減圧留去した。得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン：酢酸エチル＝1：1～1：3）によって精製し、化合物AP-T-1（4.15 g, 収率76%）を白色固体として得た。^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 0.94-1.12 (28H, m), 1.79-1.87, 1.96-2.03 (2H, m), 1.92(3H, d, J=1 Hz), 2.37 (1H, t, J=5 Hz), 2.65, 2.97 (2H, ABq, J=11 Hz), 2.86-2.93, 3.05-3.12 (2H, m), 3.67, 4.04 (2H, ABq, J=13 Hz), 3.76-3.83 (2H, m), 3.97 (1H, d, J=3 Hz), 4.35 (1H, d, J=3 Hz), 6.21 (1H, s), 7.70 (1H, d, J=2 Hz), 8.70 (1H, s).

[0114] （化合物AP-T-2の合成）

窒素気流下、化合物AP-T-1（4.13 g, 7.05 mmol）を塩化メチレン（43 mL）に溶解し、p-トルエンスルホニルクロリド（1.59 g, 8.36 mmol）、トリエチルアミン（1.7 mL, 12.36 mmol）、4-ジメチルアミノピリジン（0.177 g, 1.45 mmol）を氷冷下で順次加え、室温で4時間攪拌した。反応液を冷却し飽和重曹水で反応を停止させた後、塩化メチレン、水で希釈をおこない有機層と水層にそれぞれ分画した。水層は酢酸エチルで逆抽出をおこなった。最初の分画で得られた有機層、逆抽出で得られた有機層それぞれを飽和食塩水で洗浄した後、有機層を合わせて無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥させ減圧留去した。得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン：酢酸エチル＝1：1～1：2）によって精製し、化合物AP-T-2（4.65 g, 88%）を白色泡状固体として得た。^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 0.94-1.12 (28H, m), 1.92 (3H, d, J=1 Hz), 1.95-1.99, 2.06-2.15 (2H, m), 2.42 (3H, s), 2.48,

2.93 (2H, ABq, J=11 Hz), 2.77-2.84, 2.86-2.91 (2H, m), 3.65, 4.02 (2H, ABq, J=13 Hz), 3.93 (1H, d, J=3 Hz), 4.10-4.15, 4.18-4.24 (2H, m), 4.25 (1H, d, J=3 Hz), 5.97 (1H, s), 7.32-7.34 (2H, m), 7.78-7.80(2H, m), 7.70 (1H, d, J=1 Hz), 8.30 (1H, s).

[0115] (化合物AP-T-3の合成)

窒素気流下、化合物AP-T-2 (4.65 g, 6.28 mmol) をN,N-ジメチルホルムアミド (49 mL) に溶解し、アジ化ナトリウム (0.52 g, 7.94 mmol) を室温で加え、90°Cで2時間攪拌した。反応液を冷却し、飽和重曹水で反応を停止させた後、酢酸エチル、水で希釈をおこない有機層を分画した。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ減圧留去した。得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン：酢酸エチル＝3：1～2：1) によって精製し、化合物AP-T-3 (3.38 g, 83%) を白色泡状固体として得た。

^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 0.91-1.12 (28H, m), 1.80-1.93, 1.99-2.09 (2H, m), 1.89(3H, d, J=2 Hz), 2.59, 2.97 (2H, ABq, J=11 Hz), 2.76-2.83, 2.92-2.99 (2H, m), 3.35-3.49 (2H, m), 3.64, 4.02 (2H, ABq, J=13 Hz), 3.96 (1H, d, J=3 Hz), 4.32 (1H, d, J=3 Hz), 6.20 (1H, s), 7.68 (1H, d, J=1 Hz), 8.33 (1H, s).

[0116] (化合物AP-T-4の合成)

窒素気流下、化合物AP-T-3 (3.40 g, 5.57 mmol) をテトラヒドロフラン (48 mL) に溶解し、トリフェニルホスフィン (3.74 g, 14.26 mmol) を加え、室温で14.5時間攪拌をおこなった。続いて反応液に水 (3 mL) を室温で加えてさらに3時間攪拌した。得られた反応液の減圧留去をおこなうことにより中間体を得た。得られた中間体をピリジン：トルエン＝1：1の混合溶液、ピリジンで順次共沸脱水をおこなった後、窒素気流下、ピリジン (48 mL) に溶解し、無水トリフルオロ酢酸 (2.1 mL, 14.90 mmol) を氷冷下で加え、室温で2.5時間攪拌した。反応液を冷却し、飽和重曹水で反応を停止させた後、酢酸エチル、水で希釈をおこない有機層、水層をそれぞれ分画した。水層は酢酸

エチルで逆抽出をおこない、最初の分画で得られた有機層、逆抽出で得られた有機層それぞれを飽和食塩水で洗浄した後、有機層を合わせて無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥させ減圧留去した。得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン：酢酸エチル＝2：1～3：2）によって精製し、化合物AP-T-4（3.53 g, 93%）を淡黄色固体として得た。^{1}H NMR（$CDCl_3$）δ 0.94-1.12 (28H, m), 1.83-1.89, 2.01-2.12 (2H, m), 1.92 (3H, d, J=1 Hz), 2.60, 2.98 (2H, ABq, J=11 Hz), 2.73-2.82, 3.02-3.08 (2H, m), 3.48-3.55 (2H, m), 3.67, 4.04 (2H, ABq, J=13 Hz), 3.97 (1H, d, J=3 Hz), 4.33 (1H, d, J=3 Hz), 6.22 (1H, s), 7.40 (1H, m), 7.69 (1H, d, J=1 Hz), 9.24 (1H, s).

[0117] （化合物AP-T-5の合成）

化合物AP-T-4（3.53 g, 5.17 mmol）をテトラヒドロフラン（47 mL）に溶解し、酢酸（0.49 mL, 8.54 mmol）、フッ化テトラ－ｎ－ブチルアンモニウム（１Ｍテトラヒドロフラン溶液, 12.0 mL, 12.0 mmol）を順次加え、室温で20分間攪拌した。得られた反応液の減圧留去をおこない、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（酢酸エチル：メタノール＝20：1～10：1）により反応残渣を取り除き、中間体を得た。得られた中間体をピリジンで共沸乾燥をおこない、窒素気流下、ピリジン（30 mL）に溶解させた。4,4’-ジメトキシトリチルクロリド（2.50 g, 7.40 mmol）を加え、室温で15時間攪拌した。反応液を冷却し、冷水で反応を停止させた後、酢酸エチルで希釈をおこない有機層を分画した。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ減圧留去した。得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン：酢酸エチル＝1：1～1：3）によって精製し、化合物AP-T-5（3.91 g, 92%）を黄色泡状固体として得た。^{1}H NMR（$CDCl_3$）δ 1.47 (3H, s), 1.82-1.91, 1.99-2.08 (2H, m), 2.62 (1H, d, J=8 Hz), 2.70-2.78, 2.94-3.02 (2H, m), 2.76, 2.86 (2H, ABq, J=12 Hz), 3.33, 3.39 (2H, ABq, J=11 Hz), 3.46-3.51 (2H, m), 4.26 (1H, d, J=8 Hz), 4.38 (1H, br), 6.09 (6H, s), 6.33 (1H, s), 6.85 (4H, d, J=8 Hz), 7.22-7.46 (1

0H, m), 7.74 (1H, s), 9.22 (1H, s).

[0118] (化合物AP-T-6の合成)

窒素気流下、化合物AP-T-5 (3.90 g, 5.26 mmol) をアセトニトリルで共沸乾燥をおこない、アセトニトリル (47 mL) に溶解させた。4,5-ジシアノイミダゾール (0.69 g, 5.85 mmol) 、2-シアノエチルN,N,N',N'-テトライソプロピルホスホロジアミダイト (2.5 mL, 7.45 mmol) を氷冷下で順次加え、室温で3.5時間攪拌した。反応液を冷却し、飽和重曹水で反応を停止させた後、酢酸エチル、水で希釈をおこない有機層を分画した。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ減圧留去した。得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン：酢酸エチル＝3：2～1：2) によって精製し、化合物AP-T-6 (4.02 g, 80%) を白色泡状固体として得た。^{31}P NMR ($CDCl_3$) δ 149.4, 150.1.

HRMS(MALDI): calcd for $C_{46}H_{56}F_3N_6NaO_{10}P$ [M+Na$^+$] 963.3640, found 963.3656

[0119] (化合物AP-T-7の合成)

化合物T-1 (6.70 g, 12.7 mmol) のトルエン溶液 (80 mL) にN-(3-ブロモプロピル)フタルイミド (15.3 g, 57.0 mmol) 、トリエチルアミン (12.4 mL, 89.2 mmol) を室温で加え、100℃に昇温し、２日間撹拌した。氷冷下で水を加えた後、酢酸エチルにて抽出し、得られた有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。無水硫酸ナトリウムを濾去後、濾液を減圧留去し得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン：酢酸エチル＝4：1～2：1) により精製し、化合物AP-T-7 (7.68 g, 85%) を白色固体として得た。

^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 0.95-1.11 (28H, m), 1.91(3H, s), 1.95-2.16 (2H, m), 2.58 (1H, d, J = 11 Hz), 2.68-2.75 (1H, m), 2.93 (1H, d, J = 11 Hz), 2.99-3.05 (1H, m), 3.65 (1H, d, J = 13 Hz), 3.77-3.87 (2H, m), 3.94 (1H, d, J = 3 Hz), 4.03 (1H, d, J = 13 Hz), 4.32 (1H, d, J = 3 Hz), 6.16(1H, s), 7.68-7.71 (3H, m), 7.81-7.86 (2H, m), 8.25 (1H, brs).

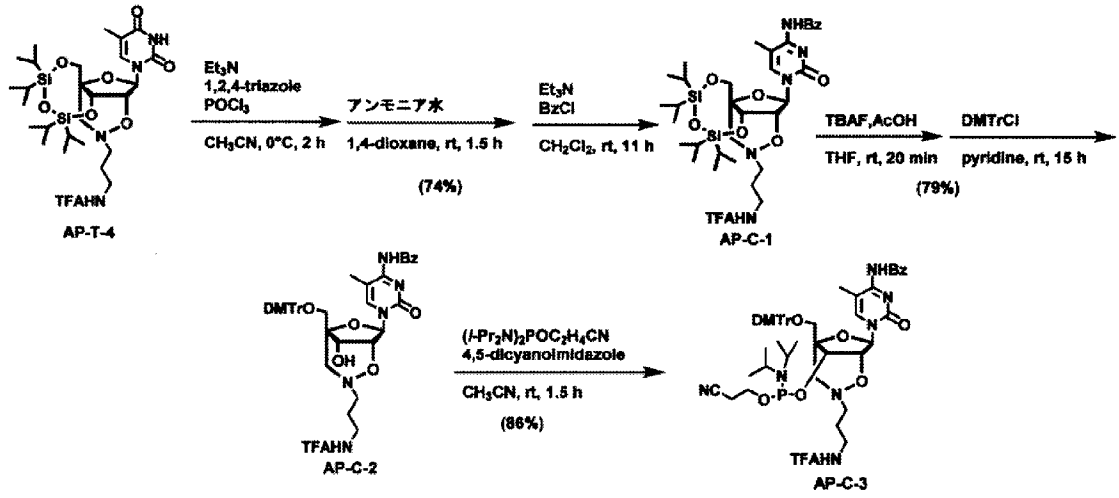
[0120] (化合物AP-T-4の合成 (化合物AP-T-7経由))

化合物AP-T-7（100 mg, 0.14 mmol）のメタノール溶液（2 mL）にヒドラジン一水和物（0.016 mL, 0.33 mmol）を加えて、室温で一晩撹拌した。その後、ヒドラジン一水和物（0.008 mL, 0.16 mmol）を加えて、室温で３日間撹拌した。溶媒を減圧留去し得られた残渣にジクロロメタンを加え、不溶物を濾別した。濾液を減圧留去した後の残渣をピリジン（3 mL）に溶解し、トリフルオロ酢酸無水物（0.045 mL, 0.32 mmol）を氷冷下で加えて、室温で1時間40分撹拌した。その後、氷冷とし飽和重曹水を加え、水で希釈した後、酢酸エチルにて抽出した。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。無水硫酸ナトリウムを濾去後、濾液を減圧留去し得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン：酢酸エチル＝2：1～3：2）により精製し、化合物AP-T-4（82.9 mg, 87%）を白色固体として得た。

[0121] ［合成例２］

ＢａｓｅがＮ－ベンゾイル－５－メチルシトシン－１－イル基であり、A^1がメチレン基であり、A^2が単結合であり、Ｘがｎ－プロピレン基であり、R^1がＤＭＴｒであり、R^2が－Ｐ(Ｎ(ｉ－Ｐｒ)$_2$)(ＯＣ$_2$Ｈ$_4$ＣＮ)であり、R^3がトリフルオロメチルカルボニルアミノ基である化合物（１）（以下、「化合物AP-C-3」と称する）は、下記反応スキームに従って合成した。

[化52]



[0122] （化合物AP-C-1の合成）

窒素気流下、化合物AP-T-4（0.34 g, 0.50 mmol）をアセトニトリル（4.3 mL）に溶解し、トリエチルアミン（0.88 mL, 6.34 mmol）、1,2,4-トリアゾール（0.29 g, 4.22 mmol）、塩化ホスホリル（99 μL, 1.06 mmol）を氷冷下で順次加え、氷冷下で2時間攪拌した。反応液を飽和重曹水で反応を停止させた後、酢酸エチル、水で希釈をおこない有機層と水層にそれぞれ分画した。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ減圧留去することにより中間体を得た。得られた中間体を1,4-ジオキサン（4.4 mL）に溶解し、28%アンモニア水（1.1 mL）を加え、室温下で1.5時間攪拌した。得られた反応液の減圧留去をおこなうことにより中間体を得た。得られた中間体をトルエンで共沸脱水をおこなった後、窒素気流下、塩化メチレン（4.3 mL）に溶解し、トリエチルアミン（0.14 mL, 1.06 mmol）、塩化ベンゾイル（0.11 mL, 0.95 mmol）を氷冷下で順次加え、室温下で11時間攪拌をおこなった。反応液を飽和重曹水で反応を停止させた後、塩化メチレン、水で希釈をおこない有機層と水層にそれぞれ分画した。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ減圧留去した。得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン：酢酸エチル＝7：1～3：3）によって精製し、化合物AP-C-1（0.29 g, 74%）を黄色泡状固体として得た。

^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 0.95-1.12 (28H, m), 1.84-1.95, 2.00-2.09 (2H, m), 2.13 (3H, d, J=1 Hz), 2.61, 2.99 (2H, ABq, J=11 Hz), 2.74-2.83, 3.00-3.09 (2H, m), 3.49-3.56 (2H, m), 3.68, 4.07 (2H, ABq, J=13 Hz), 3.99 (1H, d, J=3 Hz), 4.39 (1H, d, J=3 Hz), 6.20 (1H, s), 7.01 (1H, m), 7.42-7.47 (2H, m), 7.51-7.57 (1H, m), 7.90 (1H, d, J=1 Hz), 8.30-8.33 (2H, m), 13.46 (1H, s).

[0123] （化合物AP-C-2の合成）

化合物AP-C-1（1.98 g, 2.47 mmol）をテトラヒドロフラン（20 mL）に溶解し、酢酸（0.20 mL, 3.57 mmol）、フッ化テトラ－ｎ－ブチルアンモニウム（１Ｍテトラヒドロフラン溶液, 5.4 mL, 5.4 mmol）を順次加え、室温で2

0分間攪拌した。得られた反応液の減圧留去をおこない、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（酢酸エチル：メタノール＝80：1～60：1）により反応残渣を取り除き、中間体を得た。得られた中間体をピリジンで共沸乾燥をおこない、窒素気流下、ピリジン（25 mL）に溶解させた。4,4'-ジメトキシトリチルクロリド（1.21 g, 3.57 mmol）を加え、室温で15時間攪拌した。反応液を冷却し、飽和重曹水で反応を停止させた後、水、酢酸エチルで希釈をおこない有機層を分画した。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ減圧留去した。得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン：酢酸エチル＝2：1～1：1）によって精製し、化合物AP-C-2（1.64 g, 79%）を黄色泡状固体として得た。

^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 1.64 (3H, s), 1.81-1.91, 1.98-2.08 (2H, m), 2.51 (1H, d, J=9 Hz), 2.70-2.77, 2.94-3.02 (2H, m), 2.77, 2.86 (2H, ABq, J=12 Hz), 3.34, 3.42 (2H, ABq, J=11 Hz), 3.47-3.56 (2H, m), 3.80 (6H, d=1 Hz), 4.28 (1H, dd, J=3,9 Hz), 4.43 (1H, d, J=3 Hz), 6.33 (1H, s), 6.84-6.88 (5H, m), 7.23-7.48 (11H, m), 7.50-7.56 (1H, m), 7.95 (1H, s), 8.28-8.30 (2H, m), 13.45 (1H, brs).

[0124] （化合物AP-C-3の合成）

窒素気流下、化合物AP-C-2（8.49 g, 5.26 mmol）をアセトニトリルで共沸乾燥をおこない、アセトニトリル（95 mL）に溶解させた。4,5-ジシアノイミダゾール（1.32 g, 11.17 mmol）、2-シアノエチルN,N,N',N'-テトライソプロピルホスホロジアミダイト（4.0 mL, 12.18 mmol）を順次加え、室温で1.5時間攪拌した。反応液を冷却し、水で反応を停止させた後、酢酸エチルで希釈をおこない有機層を分画した。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ減圧留去した。得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製し、化合物AP-C-3（8.31 g, 86%）を黄色泡状固体として得た。

^{31}P NMR ($CDCl_3$) δ 148.9, 149.6.

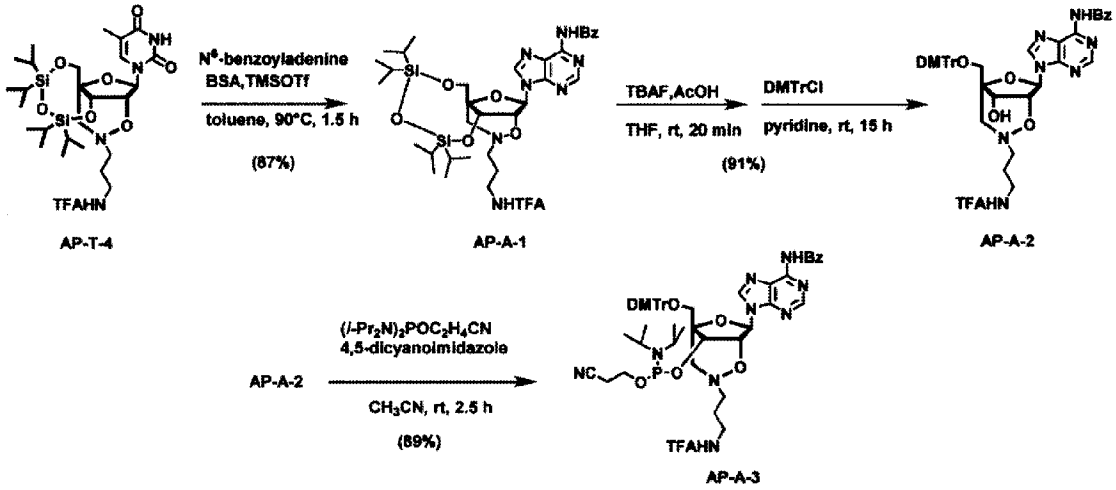
HRMS(MALDI): calcd for $C_{53}H_{61}F_3N_7NaO_{10}P$ [M+Na$^+$] 1066.4062, found 1066.403

7

[0125] ［合成例３］

ＢａｓｅがＮ－ベンゾイル－アデニン－９－イル基であり、Ａ^{1}がメチレン基であり、Ａ^{2}が単結合であり、Ｘがｎ－プロピレン基であり、Ｒ^{1}がＤＭＴｒであり、Ｒ^{2}が－Ｐ(Ｎ(ｉ－Ｐｒ)$_2$)(ＯＣ$_2$Ｈ$_4$ＣＮ)であり、Ｒ^{3}がトリフルオロメチルカルボニルアミノ基である化合物（１）（以下、「化合物AP-A-3」と称する）は、下記反応スキームに従って合成した。

[化53]



[0126] （化合物AP-A-1の合成）

窒素気流下、化合物AP-T-4（4.80 g, 7.05 mmol）をトルエン（75 mL）に溶解し、Ｎ^{6}-ベンゾイルアデニン（2.78 g, 11.63 mmol）、N,O-ビストリメチルシリルアセトアミド（9.0 mL, 36.35 mmol）を順次加え、90°Cで0.5時間攪拌した。続いてトリフルオロメタンスルホン酸トリメチルシリル（2.0 mL, 11.63 mmol）を加えて90°Cで1時間攪拌した。反応液を冷却し飽和重曹水で反応を停止させた後、酢酸エチル、水で希釈をおこない、反応液をセライト濾過して濾液を回収した。回収した濾液を有機層と水層にそれぞれ分画し、得られた有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥させ減圧留去した。得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン：酢酸エチル＝1：1～1：2）によって精製し、化合物AP-A-1（5.06 g, 87%）を黄色泡状固体として得た。

^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 0.99-1.13 (28H, m), 1.90-1.98, 2.05-2.16 (2H, m), 2.68, 3.07 (2H, ABq, J=11 Hz), 2.81-2.90, 3.05-3.16 (2H, m), 3.51-3.63 (2H, m), 3.72, 4.04 (2H, ABq, J=13 Hz), 4.50 (1H, d, J=3 Hz), 4.82 (1H, d, J=3 Hz), 6.67 (1H, s), 7.09 (1H, m), 7.51-7.57 (2H, m), 7.60 (1H, m), 8.02-8.05 (2H, m), 8.36 (1H, s), 8.81 (1H, s), 9.10 (1H, s).

[0127] （化合物AP-A-2の合成）

化合物AP-A-1（5.05 g, 6.36 mmol）をテトラヒドロフラン（60 mL）に溶解し、酢酸（0.48 mL, 8.44 mmol）、フッ化テトラ－ｎ－ブチルアンモニウム（１Ｍテトラヒドロフラン溶液, 13.7 mL, 13.7 mmol）を順次加え、室温で20分間攪拌した。得られた反応液の減圧留去をおこない、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（酢酸エチル：メタノール＝30：1～10：1）により反応残渣を取り除き、中間体を得た。得られた中間体をピリジンで共沸乾燥をおこない、窒素気流下、ピリジン（40 mL）に溶解させた。4,4’-ジメトキシトリチルクロリド（2.86 g, 8.44 mmol）を加え、室温で14時間攪拌した。反応液を冷却し、飽和重曹水で反応を停止させた後、水、酢酸エチルで希釈をおこない有機層を分画した。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ減圧留去した。得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（クロロホルム：メタノール＝60：1）によって精製し、化合物AP-A-2（5.05 g, 91%）を白色泡状固体として得た。

^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ1.88-1.97, 2.07-2.13 (2H, m), 2.63 (1H, d, J=9 Hz), 2.79-2.88, 3.03-3.09 (2H, m), 2.94, 3.00 (2H, ABq, J=12 Hz), 3.38, 3.42 (2H, ABq, J=11 Hz), 3.50-3.63 (2H, m), 3.79 (6H, s), 4.46 (1H, dd, J=3,8 Hz), 4.73 (1H, d, J=3 Hz), 6.75 (1H, s), 6.81-6.86 (4H, m), 7.00 (1H, m), 7.20-7.46 (9H, m), 7.50-7.55 (2H, m), 7.59-7.64 (1H, m), 8.00-8.03 (2H, m), 8.36 (1H, s), 8.81 (1H, s), 9.14 (1H, s).

[0128] （化合物AP-A-3の合成）

窒素気流下、化合物AP-A-2（5.05 g, 5.91 mmol）をアセトニトリルで共沸乾燥をおこない、アセトニトリル（67 mL）に溶解させた。4,5-ジシアノイミ

ダゾール（0.77 g, 6.50 mmol）、2-シアノエチルN,N,N’,N’-テトライソプロピルホスホロジアミダイト（2.4 mL, 7.33 mmol）を順次加え、室温で2.5時間攪拌した。飽和重曹水で反応を停止させた後、水、酢酸エチルで希釈をおこない有機層を分画した。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ減圧留去した。得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン：酢酸エチル＝45：55～20：80）によって精製し、化合物AP-A-3（5.57 g, 89%）を白色泡状固体として得た。

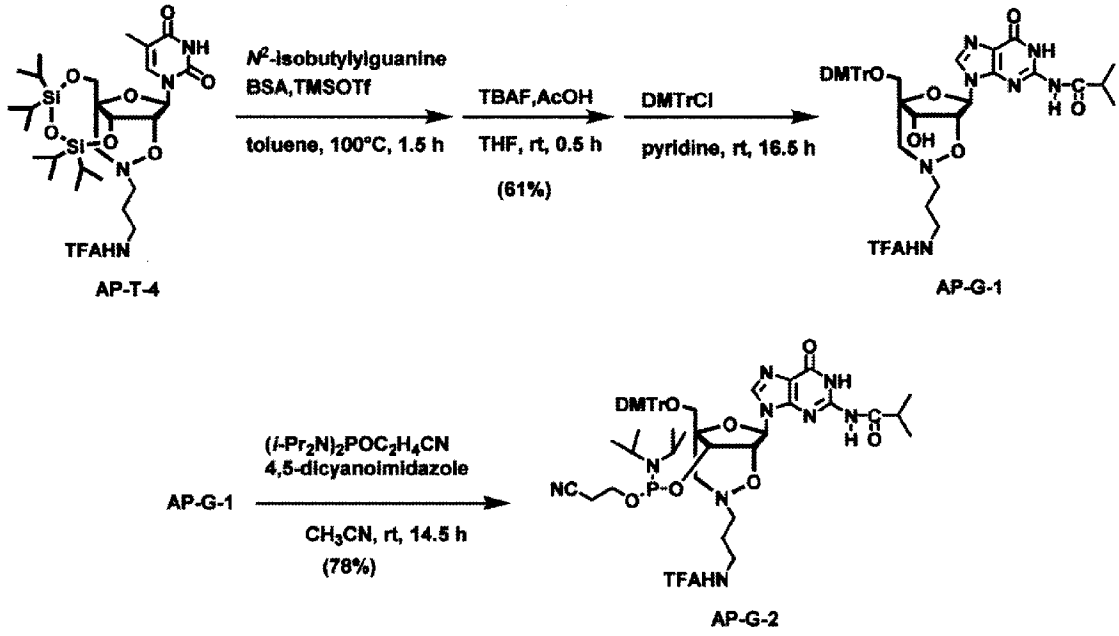
^{31}P NMR ($CDCl_3$) δ 149.1, 149.4.

HRMS(MALDI): calcd for $C_{53}H_{59}F_3N_9NaO_9P$ [M+Na$^+$] 1076.4018, found 1076.4013

[0129] ［合成例４］

ＢａｓｅがＮ－イソブチリル－グアニン－９－イル基であり、Ａ^{1}がメチレン基であり、Ａ^{2}が単結合であり、Ｘがｎ－プロピレン基であり、Ｒ^{1}がＤＭＴｒであり、Ｒ^{2}が－Ｐ(Ｎ(ｉ－Ｐｒ)$_2$)(ＯＣ$_2$Ｈ$_4$ＣＮ)であり、Ｒ^{3}がトリフルオロメチルカルボニルアミノ基である化合物（１）（以下、「化合物AP-G-2」と称する）は、下記反応スキームに従って合成した。

[化54]



[0130] （化合物AP-G-1の合成）

窒素気流下、化合物AP-T-4（9.31 g, 13.67 mmol）をトルエン（154 mL）

に60°Cで溶解し、N^2-イソブチリルグアニン（4.66 g, 21.06 mmol）、N,O-ビストリメチルシリルアセトアミド（22.3 mL, 90.24 mmol）を順次加え、100°Cで0.5時間攪拌した。続いてトリフルオロメタンスルホン酸トリメチルシリル（3.8 mL, 21.06 mmol）を加えて100°Cで1時間攪拌した。反応液を冷却し飽和重曹水で反応を停止させた後、酢酸エチル、水で希釈をおこない、反応液をセライト濾過して濾液を回収した。回収した濾液を有機層と水層にそれぞれ分画し、得られた有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥させ減圧留去した。得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン：酢酸エチル＝1：1～1：2）により反応残渣を取り除き、中間体を得た。得られた中間体をテトラヒドロフラン（150 mL）に溶解し、酢酸（1.1 mL, 19.89 mmol）、フッ化テトラ－ｎ－ブチルアンモニウム（１Ｍテトラヒドロフラン溶液, 27.8 mL, 27.8 mmol）を順次加え、室温で30分間攪拌した。得られた反応液の減圧留去をおこない、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（酢酸エチル：メタノール＝15：1～7：1）により反応残渣を取り除き、中間体を得た。得られた中間体をピリジンで共沸乾燥をおこない、窒素気流下、ピリジン（120 mL）に溶解させた。4,4'-ジメトキシトリチルクロリド（6.29 g, 18.56 mmol）を加え、室温で16.5時間攪拌した。反応液を冷却し、メタノールで反応を停止させた後、水、酢酸エチルで希釈をおこない有機層を分画した。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ減圧留去した。得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン：酢酸エチル＝4：1～酢酸エチル：メタノール～100：1、クロロホルム：メタノール＝98：2～96：4）によって精製し、化合物AP-G-1（7.69 g, 61%）を白色泡状固体として得た。

^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ1.23 (6H, dd, J=2,7 Hz), 1.76-1.82, 2.18-2.22 (2H, m), 2.69-2.76 (1H, m), 2.78-2.87, 3.03-3.07 (2H, m), 2.97, 3.02 (2H, ABq, J=12 Hz), 3.20 (1H, d, J=8 Hz), 3.36-3.48, 4.07-4.18 (2H, m), 3.41, 3.46 (2H, ABq, J=11 Hz), 3.77 (6H, s), 4.22 (1H, d, J=3 Hz), 4.36

(1H, dd, J=3,7 Hz), 6.80-6.84 (5H, m), 6.97 (1H, m), 7.16-7.50 (9H, m), 7.83 (1H, s), 9.82 (1H, s), 12.14 (1H, s).

[0131] (化合物AP-G-2の合成)

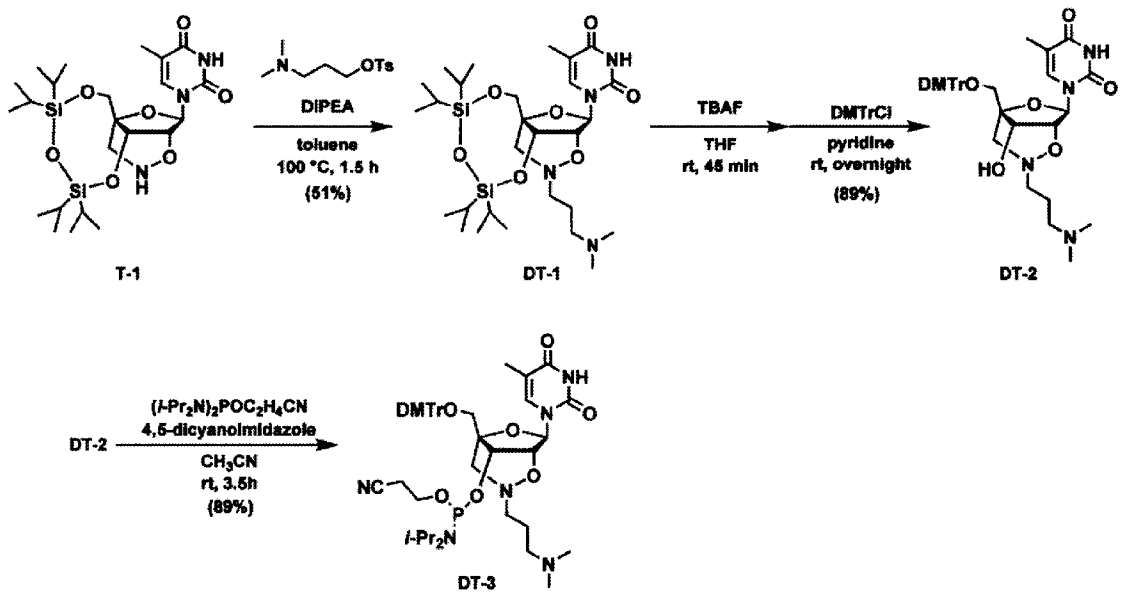
窒素気流下、化合物AP-G-1 (7.52 g, 9.00 mmol) をアセトニトリルで共沸乾燥をおこない、アセトニトリル (91 mL) に溶解させた。4,5-ジシアノイミダゾール (1.18 g, 10.0 mmol) 、2-シアノエチルN,N,N',N'-テトライソプロピルホスホロジアミダイト (3.5 mL, 10.91 mmol) を順次加え、室温で14.5時間攪拌した。反応液を冷却し、飽和重曹水で反応を停止させた後、水、酢酸エチルで希釈をおこない有機層を分画した。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ減圧留去した。得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン：酢酸エチル＝45：55～20：80) によって精製し、化合物AP-G-2 (7.27 g, 78%) を白色泡状固体として得た。^{31}P NMR ($CDCl_3$) δ 149.1, 149.2.

HRMS(MALDI): calcd for $C_{50}H_{61}F_3N_9NaO_{10}P$ [M+Na^+] 1058.4123, found 1058.4139

[0132] [合成例５]

Ｂａｓｅがチミン－１－イル基であり、Ａ^{1}がメチレン基であり、Ａ^{2}が単結合であり、Ｘがｎ－プロピレン基であり、Ｒ^{1}がＤＭＴｒであり、Ｒ^{2}が－Ｐ(Ｎ(ｉ－Ｐｒ)$_2$)(ＯＣ$_2$Ｈ$_4$ＣＮ)であり、Ｒ^{3}がジメチルアミノ基である化合物（１）（以下、「化合物DT-3」と称する）は、下記反応スキームに従って合成した。

[化55]



[0133] （化合物DT-1の合成）

窒素気流下、水素化ナトリウム（60% in oil, 4.58 g, 11.45 mmol）のトルエン懸濁液（200 mL）に氷冷下、3-(ジメチルアミノ)-1-プロパノール（15.9 mL, 136.2 mmol）をゆっくり滴下し、氷冷下のまま30分間撹拌した。その後、p-トルエンスルホニルクロリド（21.67 g, 113.7 mmol）を3回に分けて加えた後、氷浴を外し、室温にて2時間30分撹拌した。次いで、氷冷とし、3-(ジメチルアミノ)-1-プロパノール（3.0 mL, 25.7 mmol）をゆっくり滴下し、室温で35分間撹拌した。その後再度氷冷とし、3-(ジメチルアミノ)-1-プロパノール（1.0 mL, 8.6 mmol）をゆっくり滴下し、室温で30分間撹拌した。氷冷下で水を加えてトルエンで抽出し、得られた有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。無水硫酸ナトリウムを濾去後、濾液が僅かに白濁するまで減圧留去し、得られたp-トルエンスルホン酸3-(ジメチルアミノ)-1-プロピルのトルエン溶液をそのまま次の反応に用いた。

化合物T-1（40 g, 75.8 mmol）のトルエン溶液（240 mL）にN,N-ジイソプロピルエチルアミン（30 mL, 175 mmol）を室温で加え、反応溶液を100℃に加温した。先に調製したp-トルエンスルホン酸3-(ジメチルアミノ)-1-プロピルのトルエン溶液を1時間10分かけて滴下し、100℃のままさらに30分撹拌し

た。その後反応溶液を室温にし、溶媒を減圧留去し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（酢酸エチル：トリエチルアミン：メタノール＝20：1：0～20：1：2）により精製し、化合物DT-1（23.47 g, 51%）を白色泡状固体として得た。

^{1}HNMR (DMSO-d_6) δ 0.90-1.12(28H, m), 1.61-1.83 (2H, m) , 1.74 (3H, s) , 2.11 (6H, s), 2.19-2.34 (2H, m), 2.69-2.81 (4H, m), 3.64 (1H, d, J = 13 Hz), 3.92 (1H, d, J = 3 Hz), 4.04 (1H, d, J = 13 Hz), 4.36 (1H, d, J = 3 Hz), 6.11 (1H, s), 7.49 (1H, s), 11.40 (1H, brs).

[0134] （化合物DT-2の合成）

窒素気流下、化合物DT-1（3.00 g, 4.90 mmol）のテトラヒドロフラン溶液（60 mL）にフッ化テトラ－ｎ－ブチルアンモニウム（１Ｍテトラヒドロフラン溶液, 10.3 mL, 10.3 mmol）を氷冷下で加えて、室温で45分間撹拌した。溶媒を減圧留去し得られた残渣をアルミナカラムクロマトグラフィー（クロロホルム：メタノール＝7：1～6：1）でショートカラムすることにより反応残渣を取り除き中間体を得た。得られた中間体をピリジンで、次にピリジン：トルエン（＝1：1）混合溶液にて共沸した後に、ピリジン（60 mL）に中間体を溶解し、４，４’－ジメトキシトリチルクロリド（4.31 g, 12.72 mmol）を氷冷下で加えて、氷浴を外して一晩室温で撹拌した。翌朝、氷冷下飽和重曹水を加え、次いで水で希釈した後、酢酸エチルにて抽出した。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。無水硫酸ナトリウムを濾去後、濾液を減圧留去し得られた粗成績体をアルミナカラムクロマトグラフィー（クロロホルム：メタノール＝1:0～10：1）、次いでシリカゲルカラムクロマトグラフィー（酢酸エチル：メタノール：トリエチルアミン＝20：1：1～20：2：1）により精製し、化合物DT-2（2.92 g, 89%）を白色泡状固体（一部淡黄色泡状固体）として得た。

^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 1.44 (3H, s), 1.63-1.90 (2H, m), 2.22 (6H, s), 2.29-2.46 (2H, m), 2.78-2.96 (2H, m), 2.73 (1H, d, J = 12 Hz), 2.85 (1H, d, J = 12 Hz), 3.33 (1H, d, J = 11 Hz), 3.37 (1H, d, J = 12 Hz), 3.79

(6H, s), 4.24 (1H, d, J = 3 Hz), 4.36 (1H, d, J = 3 Hz), 6.33(1H, s), 6.83-6.86 (4H, m), 7.21-7.46 (9H, m), 7.76 (1H, s).

[0135] (化合物DT-3の合成)

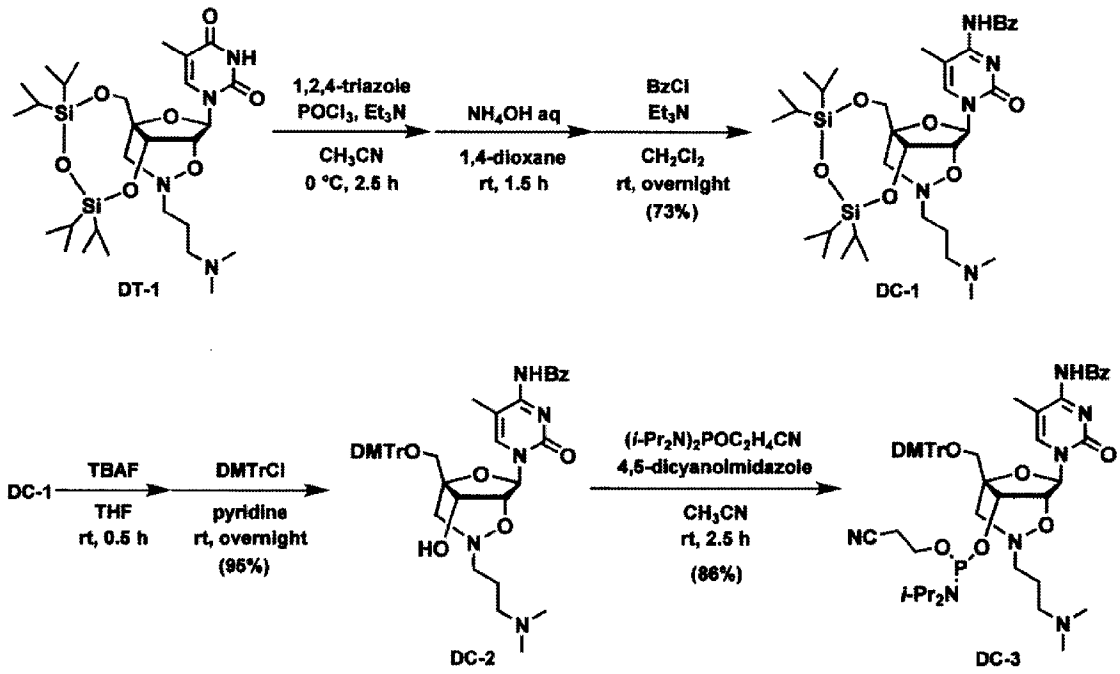
窒素気流下、化合物DT-2 (1.68 g, 2.50 mmol) のアセトニトリル溶液 (40 mL) に、４，５－ジシアノイミダゾール (0.354 g, 3.00 mmol) 、２－シアノエチルN,N,N',N'-テトライソプロピルホスホロジアミダイト (1.20 mL, 3.78 mmol) を氷冷下で加え、室温で3時間30分撹拌した。氷冷下飽和重曹水を加え、次いで水で希釈した後、酢酸エチルにて抽出した。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。無水硫酸ナトリウムを濾去後、濾液を減圧留去して得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル：メタノール：トリエチルアミン＝20：0：1～20：2：1) により精製し、化合物DT-3 (1.95 g, 89%) を白色泡状固体として得た。^{31}P NMR (DMSO-d_6) δ 148.62, 147.25.

HRMS(MALDI): calcd for $C_{46}H_{61}N_6NaO_9P$ [M+Na$^+$] 895.4130, found 895.4117

[0136] [合成例６]

ＢａｓｅがＮ－ベンゾイル－５－メチルシトシン－１－イル基であり、A^1がメチレン基であり、A^2が単結合であり、Ｘがｎ－プロピレン基であり、R^1がＤＭＴｒであり、R^2が－Ｐ(Ｎ(ｉ－Ｐｒ)$_2$)(ＯＣ$_2$Ｈ$_4$ＣＮ)であり、R^3がジメチルアミノ基である化合物（１）（以下、「化合物DC-3」と称する）は、下記反応スキームに従って合成した。

[化56]



[0137] （化合物DC-1の合成）

窒素気流下、化合物DT-1（4.0 g, 6.53 mmol）のアセトニトリル溶液（60 mL）に氷冷下、トリエチルアミン（10.9 ml, 78.4 mmol）、１，２，４－トリアゾール（3.61 g, 52.2 mmol）を加えた後に、塩化ホスホリル（1.25 ml, 13.41 mmol）をゆっくり滴下し、氷冷のまま2時間30分撹拌した。その後、氷冷のまま飽和重曹水を加え、水で希釈した後、酢酸エチルにて抽出した。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。無水硫酸ナトリウムを濾去後、濾液を減圧留去し、白色固体（4.94 g）を得た。続いて得られた白色固体を１，４－ジオキサン（60 mL）に溶解し、28％アンモニア水（15 ml）を加え、室温のまま1時間30分撹拌を続けた。溶媒を減圧留去し、得られた残渣をピリジンで1回、ピリジン：トルエン＝1：1の混合溶媒で1回共沸させた後にジクロロメタン（60 mL）に溶かし、氷冷下でトリエチルアミン（1.72 ml, 12.37 mmol）、塩化ベンゾイル（1.14 ml, 9.89 mmol）を加え、室温で一晩撹拌した。氷冷下飽和重曹水を加え、水で希釈した後、酢酸エチルにて抽出した。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。無水硫酸ナトリウムを濾去後、濾液を

減圧留去して得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（酢酸エチル：メタノール：トリエチルアミン＝100：0：1～80：1：1）により精製し、化合物DC-1（3.42 g, 73%）を白色泡状固体として得た。

^{1}H NMR (DMSO-d_6) δ 0.92-1.12 (28H, m), 1.62-1.75 (2H, m), 1.99 (3H, d, J = 1 Hz), 2.11 (6H, s), 2.19-2.32 (2H, m), 2.67-2.83 (2H, m), 2.73 (1H, d, J = 11Hz), 2.81 (1H, d, J = 12 Hz), 3.65 (1H, d, J = 13 Hz), 3.91 (1H, d, J = 3 Hz), 4.07 (1H, d, J = 13 Hz), 4.43 (1H, d, J = 3 Hz), 6.13 (1H, s), 7.46-7.51 (2H, m), 7.56-7.61 (1H, m), 7.78 (1H, d, J= 1 Hz), 8.14-8.17 (2H, m), 12.8 (1H, brs).

[0138] （化合物DC-2の合成）

窒素気流下、化合物DC-1（1.21 g, 1.69 mmol）のテトラヒドロフラン溶液（25 mL）にフッ化テトラ－ｎ－ブチルアンモニウム（１Ｍテトラヒドロフラン溶液, 3.55 mL, 3.55 mmol）を氷冷下で加えて、室温で30分間撹拌した。溶媒を減圧留去し得られた残渣をアルミナカラムクロマトグラフィー（クロロホルム：メタノール＝15：1）でショートカラムすることにより反応残渣を取り除き中間体を得た。得られた中間体をピリジンにて1回、次にピリジン：トルエン（＝1：1）混合溶液にて1回共沸した後に、中間体をピリジン（32 mL）に溶解し、４，４’－ジメトキシトリチルクロリド（1.26 g, 3.72 mmol）を氷冷下で加えて、氷浴を外して一晩室温で撹拌した。翌朝４，４’－ジメトキシトリチルクロリド（0.23 g, 0.68 mmol）を氷冷下で加えて、室温で3時間撹拌した。氷冷下飽和重曹水を加え、水で希釈した後、酢酸エチルにて抽出した。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。無水硫酸ナトリウムを濾去後、濾液を減圧留去し得られた粗成績体をアルミナカラムクロマトグラフィー（クロロホルム：メタノール＝100：1～30：1）により精製し、化合物DC-2（1.25 g, 95%）を黄色泡状固体として得た。

^{1}H NMR (DMSO-d_6) δ 1.54 (3H,s), 1.60-1.76 (2H, m), 2.12 (6H, s), 2.19-2.34 (2H, m), 2.63-2.87 (4H, m), 3.23 (1H, d, J = 11 Hz), 3.27 (1H,

d, J = 11 Hz), 3.75 (6H, s), 4.08-4.11 (1H, m), 4.33 (1H, d, J = 3 Hz), 5.63 (1H, d, J = 5 Hz), 6.16 (1H, s), 6.91-6.95 (4H, m), 7.24-7.52 (11H, m), 7.57-7.62 (1H, m), 7.93 (1H, s), 8.13-8.16 (2H, m), 12.8 (1H, brs).

[0139] (化合物DC-3の合成)

窒素気流下、化合物DC-2 (2.28 g, 2.94 mmol) のアセトニトリル溶液 (47 mL) に、氷冷下で４，５－ジシアノイミダゾール (0.417 g, 3.53 mmol)、２－シアノエチルN,N,N',N'-テトライソプロピルホスホロジアミダイト (1.40 mL, 4.41 mmol) を加えて、室温で2時間30分撹拌した。その後、氷冷下飽和重曹水を加え、水で希釈した後、酢酸エチルにて抽出した。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。無水硫酸ナトリウムを濾去後、濾液を減圧留去し得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル：トリエチルアミン＝30：1～20：1) により精製し、化合物DC-3 (2.46 g, 86%) を白色泡状固体として得た。

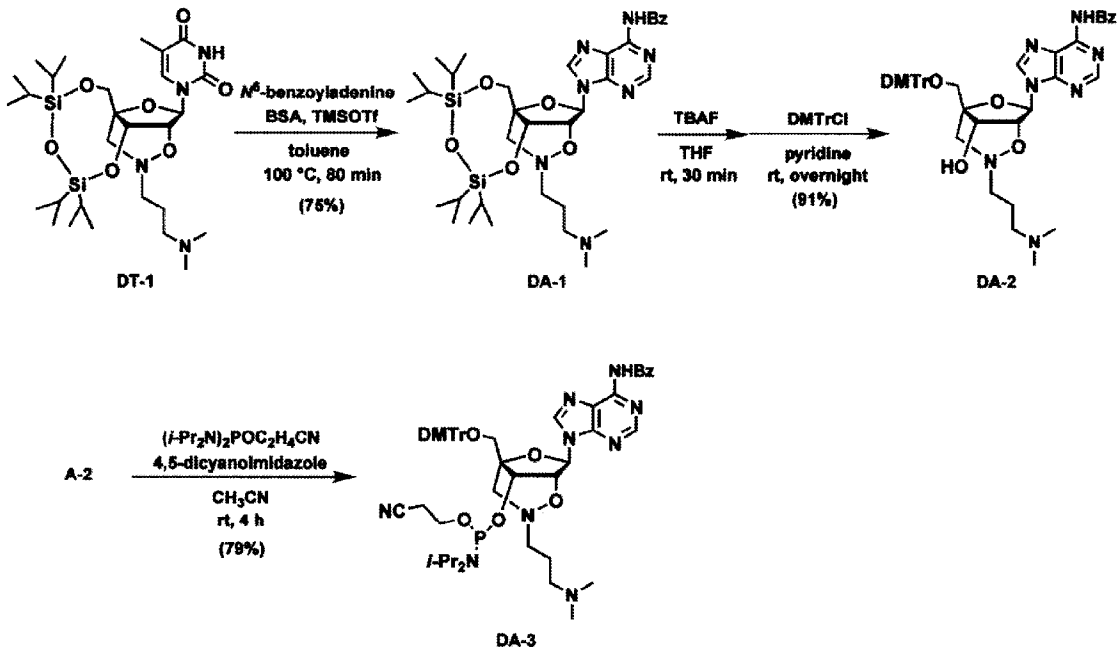
^{31}P NMR (DMSO-d_6) δ 148.89, 147.22.

HRMS(MALDI): calcd for $C_{53}H_{66}N_7NaO_9P$[M+Na$^+$] 998.4552, found 998.4556

[0140] [合成例７]

ＢａｓｅがＮ－ベンゾイル－アデニン－９－イル基であり、Ａ^{1}がメチレン基であり、Ａ^{2}が単結合であり、Ｘがｎ－プロピレン基であり、Ｒ^{1}がＤＭＴｒであり、Ｒ^{2}が－Ｐ(Ｎ(ｉ－Ｐｒ)$_2$)(ＯＣ$_2$Ｈ$_4$ＣＮ)であり、Ｒ^{3}がジメチルアミノ基である化合物（１）（以下、「化合物DA-3」と称する）は、下記反応スキームに従って合成した。

[化57]



[0141] （化合物DA-1の合成）

窒素気流下、化合物DT-1（2.00 g, 3.26 mmol）のトルエン溶液（35 mL）にN^6-ベンゾイルアデニン（0.820 g, 3.43 mmol）、N,O-ビス(トリメチルシリル)アセトアミド（3.25 mL, 13.2 mmol）を順次加えて、100°Cまで昇温し、そのまま100℃で20分間撹拌した。その後、室温下で5分間撹拌した後にトリフルオロメタンスルホン酸トリメチルシリル（0.620 mL, 3.43 mmol）を滴下し、100°Cまで加温し、そのまま100℃で1時間20分撹拌した。その後、氷冷とし飽和重曹水を加え、次いで水と酢酸エチルで希釈した後、セライト濾過をおこなった。濾液を酢酸エチルにて抽出し、得られた有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。無水硫酸ナトリウムを濾去後、濾液を減圧留去し得られた粗成績体をアルミナカラムクロマトグラフィー（クロロホルム：メタノール＝50：1）により精製し、化合物DA-1（1.78 g, 75 %）を黄色泡状固体として得た。^{1}H NMR (DMSO) 0.93-1.17 (28H, m), 1.71 - 1.78 (2H, m) , 2.15 (6H, s), 2.25-2.38 (2H, m), 2.77-2.92 (4H, m) , 3.68 (1H, d, J = 13 Hz), 4.00 (1H, d, J = 13 Hz), 4.62 (1H, d, J = 3 Hz), 4.98 (1H, d, J = 3 Hz), 6.71 (1H, s), 7.54-7.57 (2H, m), 7.63-

7.67 (1H, m), 8.03-8.06 (2H, m), 8.44 (1H,s), 8.69 (1H, s), 11.3 (1H, brs).

[0142] (化合物DA-2の合成)

窒素気流下、化合物DA-1 (1.26 g, 1.74 mmol) のテトラヒドロフラン溶液 (32 mL) にフッ化テトラ－ｎ－ブチルアンモニウム（１Ｍテトラヒドロフラン溶液, 3.65 mL, 3.65 mmol) を氷冷下で加えて、室温で30分間撹拌した。溶媒を減圧留去し得られた残渣をアルミナカラムクロマトグラフィー（クロロホルム：メタノール＝10：1）でショートカラムすることにより反応残渣を取り除き中間体を得た。得られた中間体をピリジンで、次にピリジン：トルエン（＝1：1）混合溶液にて共沸した後に、中間体をピリジン (32 mL) に溶解し、４, ４’－ジメトキシトリチルクロリド (1.18 g, 3.48 mmol) を氷冷下で加えて、氷浴を外して一晩室温で撹拌した。その後、氷冷とし飽和重曹水を加え、水で希釈した後、酢酸エチルにて抽出した。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。無水硫酸ナトリウムを濾去後、濾液を減圧留去し、得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（酢酸エチル：メタノール：トリエチルアミン＝20：0：1～20：4：1）により精製し、化合物DA-2 (1.24 g, 91%) を白色泡状固体として得た。

^{1}H NMR (DMSO) δ1.69-1.79 (2H, m), 2.15 (6H, s), 2.24-2.40 (2H, m), 2.73-2.98 (4H, m), 3.18 (1H, d, J = 11 Hz), 3.27-3.32 (1H, m), 3.72 (6H, s), 4.40-4.43 (1H, m), 4.68 (1H, d, J = 3 Hz), 5.52 (1H, d, J = 6 Hz), 6.73 (1H, s), 6.84-6.87 (4H, m), 7.19-7.41 (9H, m), 7.52-7.58 (2H, m), 7.62-7.68 (1H, m), 8.03-8.06 (2H, m), 8.52 (1H,s), 8.78 (1H, s), 11.2 (1H, brs).

[0143] (化合物DA-3の合成)

窒素気流下、化合物DA-2 (191.3 mg, 0.24 mmol) のアセトニトリル溶液 (5 mL) に、氷冷下４, ５－ジシアノイミダゾール (34.5 mg, 0.29 mmol)、２－シアノエチルN,N,N’,N’-テトライソプロピルホスホロジアミダイト (0.1

16 mL, 0.37 mmol）を加えて室温で4時間撹拌した。その後、氷冷とし飽和重曹水を加え、次いで水で希釈した後、酢酸エチルにて抽出した。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。無水硫酸ナトリウムを濾去後、濾液を減圧留去し、得られた粗成績体をアルミナカラムクロマトグラフィー（クロロホルム：メタノール＝80：1）により精製し、化合物DA-3（189.8 mg, 79%）を淡黄色泡状固体（一部白色泡状固体）として得た。

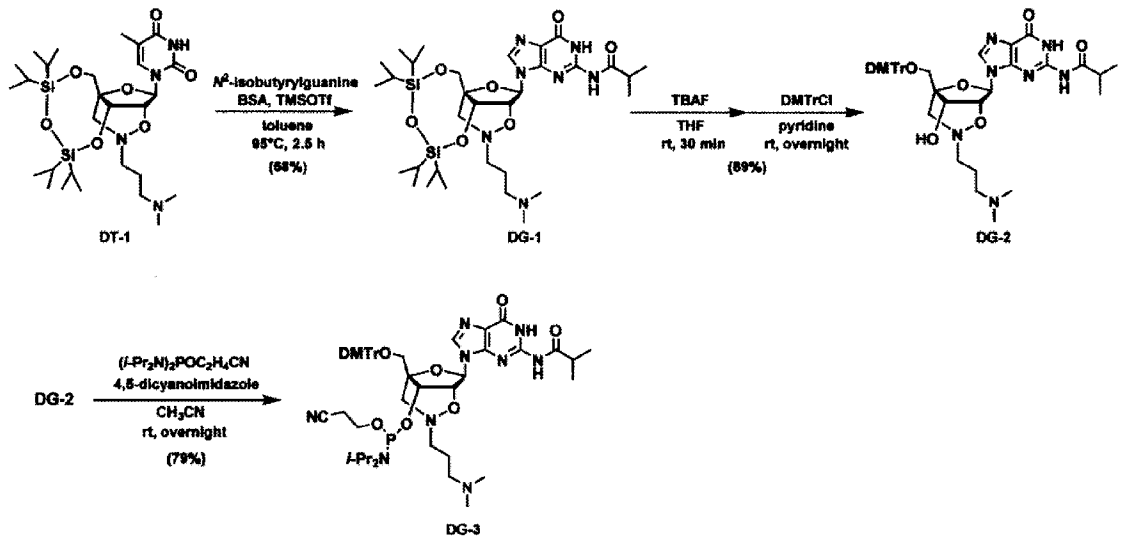
^{31}P NMR (DMSO-d_6) δ148.76, 148.06.

HRMS(MALDI): calcd for $C_{53}H_{64}N_9NaO_8P$ [M+Na$^+$] 1008.4508, found 1008.4513

[0144] ［合成例８］

ＢａｓｅがＮ－イソブチリル－グアニン－９－イル基であり、Ａ^{1}がメチレン基であり、Ａ^{2}が単結合であり、Ｘがｎ－プロピレン基であり、Ｒ^{1}がＤＭＴｒであり、Ｒ^{2}が－Ｐ(Ｎ(ｉ－Ｐｒ)$_2$)(ＯＣ$_2$Ｈ$_4$ＣＮ)であり、Ｒ^{3}がジメチルアミノ基である化合物（１）（以下、「化合物DG-3」と称する）は、下記反応スキームに従って合成した。

[化58]



[0145] （化合物DG-1の合成）

窒素気流下、化合物DT-1（113.1 mg, 0.18 mmol）のトルエン溶液（2.0 mL）にN^2-イソブチリルグアニン（65.3 mg, 0.30 mmol）、N,O-ビス(トリメチル

シリル)アセトアミド（0.275 ml, 1.113 mmol）を順次加えて、95°Cまで昇温し、そのまま95℃で50分間撹拌した。その後、室温下5分間撹拌した後にトリフルオロメタンスルホン酸トリメチルシリル（0.052 mL, 0.29 mmol）を滴下し、95℃で2時間30分撹拌した。その後、氷冷とし飽和重曹水を加え、次いで水と酢酸エチルで希釈した後、セライト濾過をおこなった。得られた濾液を酢酸エチルにて抽出し、得られた有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。無水硫酸ナトリウムを濾去後、濾液を減圧留去し得られた粗成績体をアルミナカラムクロマトグラフィー（クロロホルム：メタノール＝30：1～20：1）により精製し、化合物DG-1（88.8 mg, 68%）を黄色泡状固体として得た。

^{1}HNMR (DMSO-d_6) δ 0.93-1.09 (28H, m), 1.12 (6H, d, J = 7 Hz), 1.67-1.71 (2H, m), 2.13 (6H, s), 2.20-2.37 (2H, m), 2.73-2.89 (5H, m), 3.68 (1H, d, J = 13 Hz), 4.03 (1H, d, J = 13 Hz), 4.21 (1H, d, J = 3 Hz), 4.70 (1H, d, J = 3 Hz), 6.40 (1H, s), 7.91 (1H, s), 12.2 (1H, brs).

[0146] （化合物DG-2の合成）

窒素気流下、化合物DG-1（2.56 g, 3.61 mmol）のテトラヒドロフラン溶液（58 mL）にフッ化テトラ－ｎ－ブチルアンモニウム（１Ｍテトラヒドロフラン溶液, 7.6 mL, 7.6 mmol）を氷冷下で加えて、室温で30分間撹拌した。その後、溶媒を減圧留去し得られた残渣をアルミナカラムクロマトグラフィー（クロロホルム：メタノール＝8：1～5：1）でショートカラムすることにより反応残渣を取り除き中間体を得た。得られた中間体をピリジンで、次にピリジン：トルエン（＝1：1）混合溶液にて共沸した後に、中間体をピリジン（60 mL）に溶解し、４，４’－ジメトキシトリチルクロリド（3.18 g, 9.40 mmol）を氷冷下で加えて、氷浴を外して一晩室温で撹拌した。その後、氷冷とし飽和重曹水を加え、水で希釈した後、酢酸エチルにて抽出した。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。無水硫酸ナトリウムを濾去後、濾液を減圧留去し、得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（クロロホルム：メタノール＝50：1～7：1）、

次いでシリカゲルカラムクロマトグラフィー（クロロホルム：メタノール＝15：1～5：1）により精製し、化合物DG-2（2.47 g, 89%）を白色泡状固体として得た。

^{1}H NMR (DMSO-d6) δ1.12 (6H, dd, J = 1.2 Hz, J = 6.8 Hz), 1.78-1.86 (2H, m), 2.43 (6H, brs), 2.67 (1H, brs), 2.77-2.94 (4H, m), 3.14-3.22 (5H, m), 3.73 (6H, s), 4.25 (1H, brs), 4.62 (1H, d, J = 2.8 Hz), 5.57 (1H, brs), 6.45 (1H, s), 6.84-6.88 (4H, m), 7.20-7.38 (9H, m), 8.08 (1H, s), 12.15 (1H, brs).

[0147] （化合物DG-3の合成）

窒素気流下、化合物DG-2（1.11 g, 1.45 mmol）のアセトニトリル溶液（50 mL）に、氷冷下４，５－ジシアノイミダゾール（0.21 g, 1.75 mmol）、２－シアノエチルN,N,N',N'-テトライソプロピルホスホロジアミダイト（0.69 mL, 2.18 mmol）を加えて室温で一晩撹拌した。その後、氷冷とし飽和重曹水を加え、水で希釈した後、酢酸エチルにて抽出した。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。無水硫酸ナトリウムを濾去後、濾液を減圧留去し、得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（酢酸エチル：メタノール：トリエチルアミン＝20：0：1～20：2：1）により精製し、化合物DG-3（1.11 g, 79%）を白色泡状固体として得た。

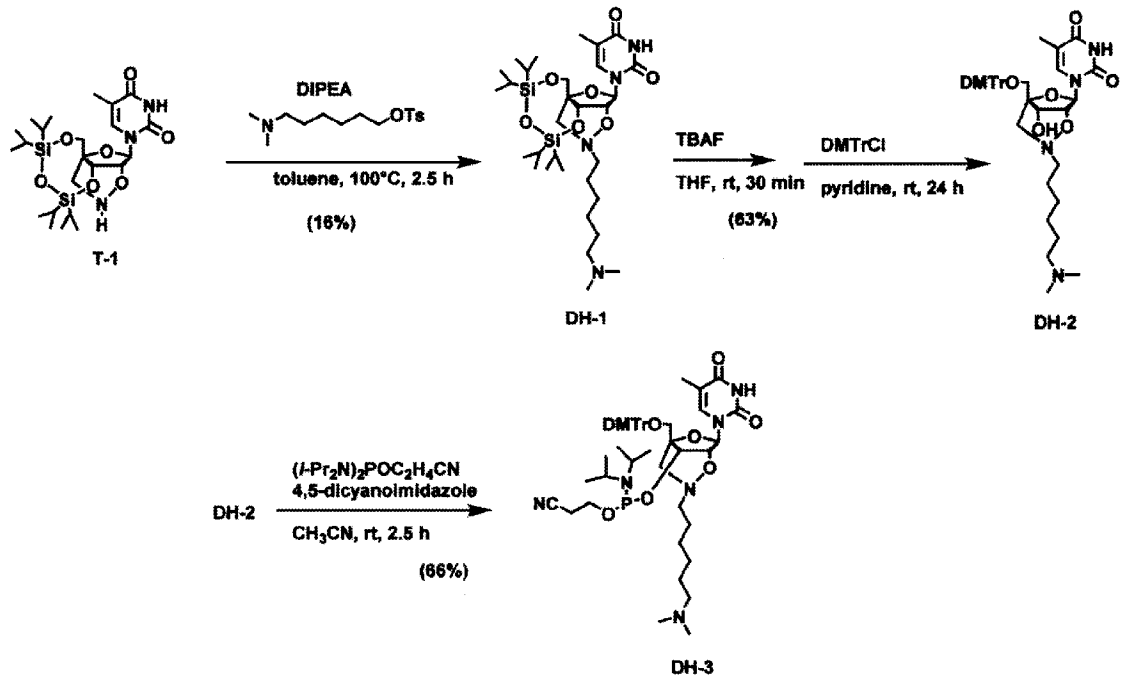
^{31}P NMR (DMSO-d_6) δ 148.97, 147.81.

HRMS(MALDI): calcd for $C_{50}H_{66}N_9NaO_9P$ [M+Na$^+$] 990.4613, found 990.4604

[0148] ［合成例９］

Ｂａｓｅがチミン－１－イル基であり、Ａ^{1}がメチレン基であり、Ａ^{2}が単結合であり、Ｘがｎ－ヘキシレン基であり、Ｒ^{1}がＤＭＴｒであり、Ｒ^{2}が－Ｐ(Ｎ(ｉ－Ｐｒ)$_2$)(ＯＣ$_2$Ｈ$_4$ＣＮ)であり、Ｒ^{3}がジメチルアミノ基である化合物（１）（以下、「化合物DH-3」と称する）は、下記反応スキームに従って合成した。

[化59]



[0149] （化合物DH-1の合成）

窒素気流下、水素化ナトリウム（2.27 g, 56.82 mmol）をトルエン（86 mL）に懸濁させ、6-ジメチルアミノ-1-ヘキサノール（8.6 mL, 51.65 mmol）を加えて氷冷下で30分攪拌した。続いてp-トルエンスルホニルクロリド（10.83 g, 56.82 mmol）を加えた後、室温下で6-ジメチルアミノ-1-ヘキサノール（7.38 mL, 44.44 mmol）を3回に分けて加えながら4時間攪拌した。反応液を冷却し水で反応を停止させた後、トルエンで希釈をおこない有機層と水層にそれぞれ分画した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、有機層を合わせて無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥させ減圧留去することによりp-トルエンスルホン酸3-(ジメチルアミノ)-1-ヘキシルのトルエン溶液を90mL得た。

窒素気流下、化合物T-1（5.0 g, 9.47 mmol）をトルエン（35 mL）に溶解させ、N,N-ジイソプロピルアミン（13.1 mL, 75.76 mmol）を加えた後、100 °Cで先に調製したp-トルエンスルホン酸3-(ジメチルアミノ)-1-ヘキシルのトルエン溶液を1.5時間かけて滴下し、そのまま1時間攪拌した。反応液を室温まで冷却後、濾過して濾液を回収した。回収した濾液を減圧留去し、得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン：酢酸エチ

ル：トリエチルアミン＝16：4：1～20：1：1）によって精製し、化合物DH-1（1.02 g, 16%）を淡黄色泡状固体として得た。

^{1}H NMR (DMSO-d6) δ 0.95-1.14 (28H, m), 1.29-1.54 (8H, m), 1.74 (3H, d, J=1 Hz), 2.09 (6H, s), 2.16 (3H, t, J=7 Hz), 2.70, 2.78 (2H, ABq, J=11 Hz), 2.61-2.83 (2H, m), 3.64, 4.04 (2H, ABq, J=13 Hz), 3.92 (1H, d, J=3 Hz), 4.35 (1H, d, J=3 Hz), 6.10 (1H, s), 7.49 (1H, d, J=1 Hz), 11.34 (1H, s).

[0150] （化合物DH-2の合成）

化合物DH-1（1.02 g, 1.55 mmol）をテトラヒドロフラン（10 mL）に溶解し、フッ化テトラ－ｎ－ブチルアンモニウム（１Ｍテトラヒドロフラン溶液, 3.3 mL, 3.3 mmol）を順次加え、室温で30分間攪拌した。得られた反応液の減圧留去をおこない、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（クロロホルム：メタノール＝10：1～8：1）により反応残渣を取り除き、中間体を得た。得られた中間体をピリジンで共沸乾燥をおこない、窒素気流下、ピリジン（20 mL）に溶解させた。4,4’-ジメトキシトリチルクロリド（1.05 g, 3.10 mmol）を加え、室温で14.5時間攪拌した。4,4’-ジメトキシトリチルクロリド（1.05 g, 3.10 mmol）を追加し室温で9時間攪拌した後、4,4’-ジメトキシトリチルクロリド（0.54 g, 1.59 mmol）を追加し室温で15時間攪拌した。反応液を冷却し、メタノールで反応を停止させた後、水、酢酸エチルで希釈をおこない有機層を分画した。得られた有機層を飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ減圧留去した。得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（酢酸エチル：メタノール：トリエチルアミン＝20：1：1～20：3：1）によって精製し、化合物DH-2（0.70 g, 63%）を淡黄色泡状固体として得た。

^{1}H NMR (DMSO-d6) δ 1.27-1.50 (8H, m), 1.31 (3H, s), 2.08 (6H, s), 2.15 (2H, t, J=7 Hz), 2.57-2.68, 2.72-2.84 (2H, m), 2.72 (2H, s), 3.20 (2H, s), 3.74 (6H, s), 4.04-4.06 (1H, m), 4.21 (2H, d, J=3 Hz), 5.54 (1H, d, J=5 Hz), 6.11 (1H, s), 7.22-7.44 (9H, m), 7.62 (1H, d, J=1 Hz)

, 11.25 (1H, s).

[0151] (化合物DH-3の合成)

窒素気流下、化合物DH-2 (294 mg, 0.41 mmol) をアセトニトリルで共沸乾燥をおこない、アセトニトリル (4.5 mL) に溶解させた。4,5-ジシアノイミダゾール (54 mg, 0.46 mmol) 、2-シアノエチルN,N,N',N'-テトライソプロピルホスホロジアミダイト (164 μL, 0.50 mmol) を順次加え、室温で2.5時間攪拌した。反応液を冷却し、飽和重曹水で反応を停止させた後、酢酸エチル、水で希釈をおこない有機層を分画した。得られた有機層を水と飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ濃縮した。得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン：酢酸エチル：トリエチルアミン＝20：1：1～20：2：1、酢酸エチル：ヘキサン＝4：1～6：1) によって精製し、化合物DH-3 (255 mg, 66%) を白色泡状固体として得た。

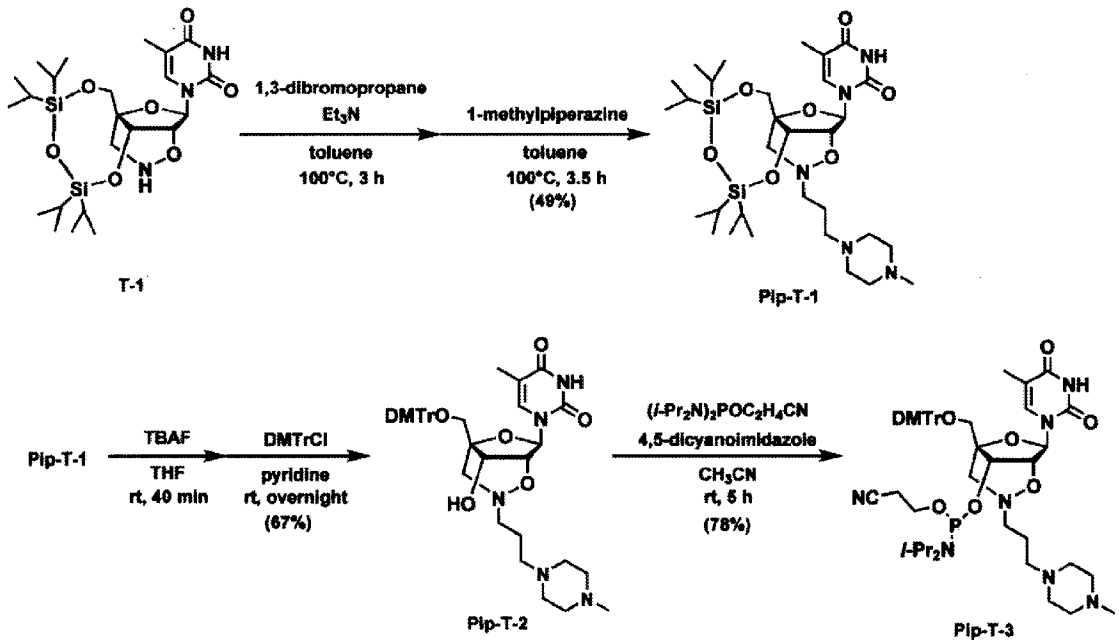
^{31}P NMR ($CDCl_3$) δ 148.7, 148.9.

HRMS(MALDI): calcd for $C_{49}H_{67}N_6NaO_9P$ [M+Na$^+$] 937.4599, found 937.4611

[0152] [合成例１０]

Ｂａｓｅがチミン－１－イル基であり、Ａ^{1}がメチレン基であり、Ａ^{2}が単結合であり、Ｘがｎ－プロピレン基であり、Ｒ^{1}がＤＭＴｒであり、Ｒ^{2}が－Ｐ(Ｎ(ｉ－Ｐｒ)$_2$)(ＯＣ$_2$Ｈ$_4$ＣＮ)であり、Ｒ^{3}が４－メチルピペラジン－１－イル基である化合物（１）（以下、「化合物Pip-T-3」と称する）は、下記反応スキームに従って合成した。

[化60]



[0153] （化合物Pip-T-1の合成）

化合物T-1（4.0 g、7.58 mmol）のトルエン溶液（100 mL）に1,3-ジブロモプロパン（3.45 mL, 33.8 mmol）、トリエチルアミン（7.4 mL, 53.2 mmol）を室温で加え、100℃に昇温し、3時間撹拌した。反応溶液を室温とし、1-メチルピペラジン（3.8 mL, 34.1 mmol）を加え、再び100℃に昇温し、3時間30分撹拌した。その後、反応溶液を室温としてから、セライト濾過を行い、濾液を減圧留去して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（酢酸エチル：メタノール：トリエチルアミン：ジクロロメタン＝22：2：1：75）により精製し、化合物Pip-T-1（2.46 g, 49%）を白色固体として得た。^{1}H NMR (DMSO-d_6) δ 0.90-1.04(28H, m), 1.67-1.80 (5H, m), 2.20-2.58 (13H, m), 2.67-2.80 (4H, m), 3.64(1H, d, J = 14 Hz), 3.92 (1H, d, J = 3 Hz), 4.04(1H, d, J = 14 Hz), 4.37 (1H, d, J = 3 Hz), 6.11(1H, s), 7.49(1H, d, J = 1 Hz), 11.41 (1H, s).

[0154] （化合物Pip-T-2の合成）

窒素気流下、化合物Pip-T-1（0.894 g, 1.34 mmol）のテトラヒドロフラン溶液（24 mL）にフッ化テトラ－ｎ－ブチルアンモニウム（１Ｍテトラヒドロフラン溶液, 2.80 mL, 2.80 mmol）を氷冷下で加えて、室温で40分間撹拌し

た。溶媒を減圧留去し得られた残渣をアルミナカラムクロマトグラフィー（クロロホルム：メタノール＝10：1）でショートカラムすることにより反応残渣を取り除き中間体を得た。続いて得られた中間体をピリジンで、次にピリジン：トルエン（＝1：1）混合溶液にて共沸した後に、中間体をピリジン（22 mL）に溶解し、４，４’－ジメトキシトリチルクロリド（1.179 g，3.48 mmol）を氷冷下で加えて、氷浴を外して一晩室温で撹拌した。翌朝氷冷とし４，４’－ジメトキシトリチルクロリド（0.181 g，0.534 mmol）を追加し、室温で2時間30分撹拌した。その後氷冷下で飽和重曹水を加え、水で希釈し、酢酸エチルにて抽出した。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。無水硫酸ナトリウムを濾去後、濾液を減圧留去し得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（酢酸エチル：メタノール：トリエチルアミン＝20：0：1～20：1：1）にて精製することにより化合物Pip-T-2（0.656 g，67%）を白色固体として得た。

^{1}H NMR (DMSO-d_6) δ 1.31(3H,s), 1.60-1.71 (2H, m), 2.07-2.56 (13H, m), 2.61-2.83 (4H, m), 3.16-3.23 (2H, m), 4.05-4.07 (1H, m), 4.21-4.22 (1H, m),5.54 (1H, d, J = 6 Hz), 6.11(1H, s), 6.90-6.92 (4H, m), 7.23-7.44 (9H, m), 7.62 (1H, s), 11.36 (1H, s).

[0155] （化合物Pip-T-3の合成）

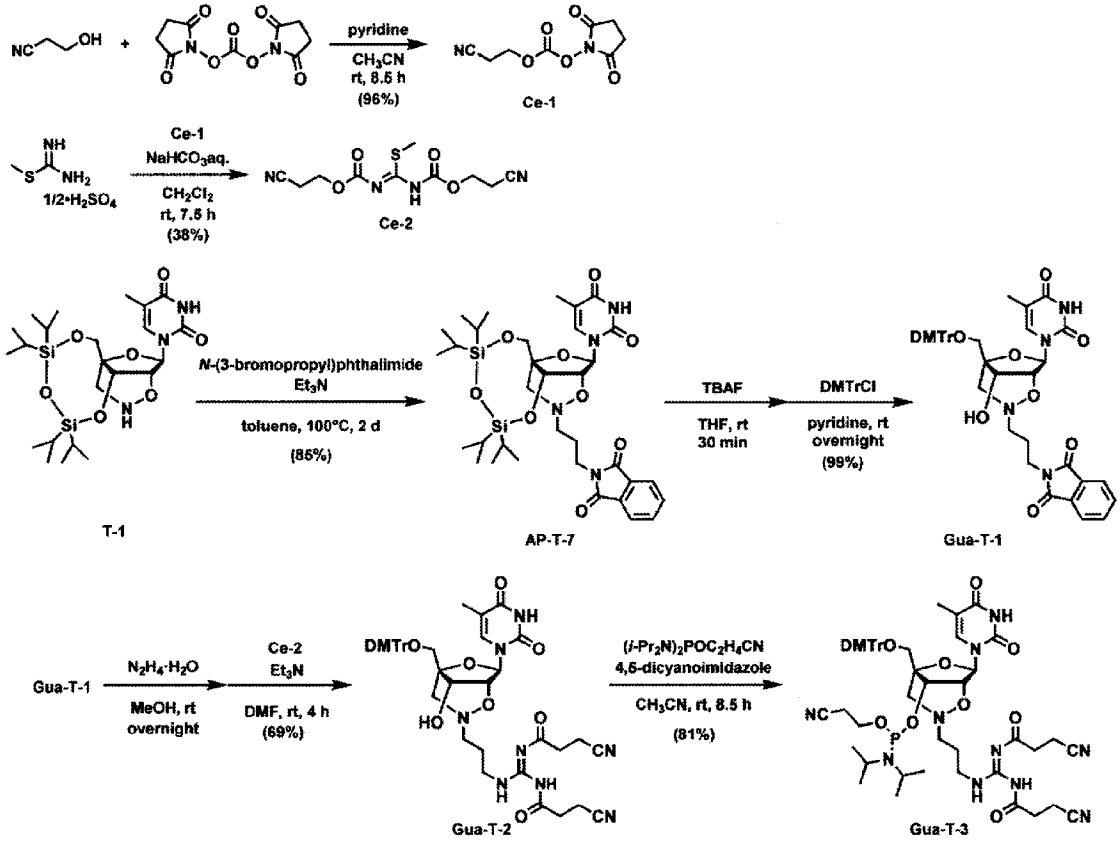
窒素気流下、化合物Pip-T-2（0.496 g，0.68 mmol）のアセトニトリル溶液（25 mL）に、４，５－ジシアノイミダゾール（0.121 g，1.02 mmol）、２－シアノエチルN,N,N’,N’-テトライソプロピルホスホロジアミダイト（0.390 mL，1.23 mmol）を氷冷下で加え、室温で5時間撹拌した。氷冷下に飽和重曹水を加え、次いで水で希釈した後、酢酸エチルにて抽出した。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。無水硫酸ナトリウムを濾去後、濾液を減圧留去し得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（酢酸エチル：メタノール：トリエチルアミン＝20：0：1～20：1：1）にて精製することにより化合物Pip-T-3（0.490 g，78%）を白色泡状固体として得た。^{31}P NMR (DMSO-d_6) δ 148.62, 147.22.

HRMS(MALDI): calcd for $C_{49}H_{66}N_7NaO_9P$ [M+Na$^+$] 950.4552, found 950.4546

[0156] ［合成例１１］

Ｂａｓｅがチミン－１－イル基であり、Ａ^{1}がメチレン基であり、Ａ^{2}が単結合であり、Ｘがｎ－プロピレン基であり、Ｒ^{1}がＤＭＴｒであり、Ｒ^{2}が－Ｐ(Ｎ(ｉ－Ｐｒ)$_2$)(ＯＣ$_2$Ｈ$_4$ＣＮ)であり、Ｒ^{3}がＮＨＣ(＝ＮＣＯＣ$_2$Ｈ$_4$ＣＮ)(ＮＨＣＯＣ$_2$Ｈ$_4$ＣＮ)である化合物（１）（以下、「化合物Gua-T-3」と称する）は、下記反応スキームに従って合成した。

[化61]



[0157] （化合物Ce-1の合成）

2-シアノエタノール（1.85 ml, 27.3 mmol）のアセトニトリル溶液（160 mL）に炭酸N,N'-ジスクシンイミジル（8.0 g, 31.2 mmol）、ピリジン（2.7 mL, 33.5 mmol）を氷冷下で加え、室温で8時間30分撹拌した。反応溶液を減圧留去し、得られた残渣にジクロロメタンと飽和重曹水を加え、ジクロロメタンにて抽出した。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナト

リウムで乾燥した。無水硫酸ナトリウムを濾去後、濾液を減圧留去し得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ジクロロメタン：アセトニトリル＝1：0～4：1）により精製し、化合物Ce-1（5.58 g，96%）を白色固体として得た。

^{1}HNMR（$CDCl_3$）δ 2.86（2H，t，J = 6 Hz），2.87（4H，s），4.53（2H，t，J = 7 Hz）.

[0158]（化合物Ce-2の合成）

化合物Ce-1（2.5 g，11.8 mmol）のジクロロメタン溶液（50 mL）にS-メチルイソチオ尿素硫酸塩（0.78 g，5.6 mmol）、１．０ Ｍ炭酸水素ナトリウム水溶液（22.4 ml，22.4 mmol）を加え、室温で7時間30分激しく撹拌した。その後飽和重曹水を加え、ジクロロメタンにて抽出し、得られた有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した。無水硫酸ナトリウムを濾去後、濾液を減圧留去し得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ジクロロメタン：酢酸エチル＝1：0～10：1）により精製し、化合物Ce-2（0.60 g，38%）を淡黄色油状物質として得た。

^{1}HNMR（$CDCl_3$）δ 2.46（3H，s），2.80（4H，t，J = 6 Hz），4.37-4.42（4H，m），11.81（1H，brs）.

[0159]（化合物Gua-T-1の合成）

窒素気流下、化合物AP-T-7（1.40 g、1.96 mmol）のテトラヒドロフラン溶液（30 mL）にフッ化テトラ－ｎ－ブチルアンモニウム（１Ｍテトラヒドロフラン溶液，4.1 mL，4.1 mmol）を氷冷下で加えて、室温で30分間撹拌した。溶媒を減圧留去し得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（酢酸エチル：メタノール＝20：1～6：1）でショートカラムすることにより反応残渣を取り除き中間体を得た。得られた中間体をピリジンで、次にピリジン：トルエン（＝1：1）混合溶液にて共沸した後に、中間体をピリジン（30 mL）に溶解し、４，４’－ジメトキシトリチルクロリド（1.00 g，2.95 mmol）を氷冷下で加えて、氷浴を外して一晩室温で撹拌した。翌朝、氷冷とし飽和重曹水を加え、水で希釈した後、酢酸エチルにて抽出した。得られた有機層

を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。無水硫酸ナトリウムを濾去後、濾液を減圧留去し得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（酢酸エチル：ヘキサン＝1：1～1：0）により精製し、化合物Gua-T-1（1.51 g, 99%）を白色泡状固体として得た。^{1}HNMR（$CDCl_3$）δ 1.45 (3H, d , J = 1 Hz), 1.95-2.12 (2H, m), 2.57 (1H, d, J = 9 Hz), 2.70-2.83 (3H, m), 2.90-3.00 (1H, m), 3.31 (1H, d, J = 10 Hz), 3.37 (1H, d, J = 10 Hz), 3.76-3.87 (8H, m), 4.23 (1H,dd ,J = 3 Hz , J = 9 Hz), 4.36 (1H, d , J = 3 Hz), 6.30 (1H, s), 6.82-6.87 (4H, m), 7.22-7.45 (9H, m), 7.66-7.71 (2H, m), 7.73 (1H, d, J = 1 Hz), 7.80-7.85 (2H, m), 8.23 (1H, s).

[0160] （化合物Gua-T-2の合成）

化合物Gua-T-1（1.01 g, 1.30 mmol）のメタノール溶液（22 mL）にヒドラジン一水和物（0.19 mL, 3.91 mmol）を加えて、室温で8時間40分撹拌した。その後、ヒドラジン一水和物（0.075 mL, 1.54 mmol）を追加し、室温で一晩撹拌した。溶媒を減圧留去し得られた残渣をアミノシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ジクロロメタン：メタノール＝5：1～4：1）でショートカラムすることにより反応残渣を取り除き中間体を得た。続いて得られた中間体をジメチルホルムアミド（7.5 ml）に溶解し、化合物Ce-2（0.38 g, 1.34 mmol）、トリエチルアミン（0.182 ml, 1.31 mmol）を加えて、室温で4時間撹拌した。その後、氷冷とし飽和重曹水を加え、水で希釈した後、酢酸エチルにて抽出した。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。無水硫酸ナトリウムを濾去後、濾液を減圧留去し得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ジクロロメタン：酢酸エチル：ヘキサン＝1：2：2～0：1：0）により精製し、化合物Gua-T-2（0.79 g, 69%）を白色泡状固体として得た。

^{1}HNMR（$CDCl_3$）δ1.45 (3H, s), 1.88-2.05 (2H, m), 2.61 (1H, d, J = 9 Hz), 2.72-2.87 (7H, m), 2.91-2.98 (1H, m), 3.33 (1H, d, J = 10 Hz), 3.38 (1H, d, J = 11 Hz), 3.54-3.61 (2H, m), 3.80 (6H, s), 4.24-4.31 (3H

,m), 4.35-4.42 (3H, m), 6.32 (1H, s), 6.86-6.84 (4H, m), 7.23-7.45 (9H, m), 7.75 (1H, s), 8.36 (1H, t, J = 6 Hz), 8.39 (1H, s), 11.73 (1H, s).

[0161] (化合物Gua-T-3の合成)

窒素気流下、化合物Gua-T-2 (0.50 g, 0.57 mmol) のアセトニトリル溶液 (25 mL) に、４，５－ジシアノイミダゾール (81.2 mg, 0.69 mmol) 、２－シアノエチルN,N,N',N'-テトライソプロピルホスホロジアミダイト (0.275 mL, 0.87 mmol) を氷冷下で加え、室温で5時間30分撹拌した。再び氷冷とし、４，５－ジシアノイミダゾール (67.6 mg、0.57 mmol) 、２－シアノエチルN,N,N',N'-テトライソプロピルホスホロジアミダイト (0.220 mL、0.69 mmol) を追加し、室温で更に3時間撹拌した。その後、氷冷とし飽和重曹水を加え、水で希釈した後、酢酸エチルにて抽出した。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。無水硫酸ナトリウムを濾去後、濾液を減圧留去し得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルム：メタノール＝50：1) 、次いでシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル：ヘキサン＝4：1～10：1) により精製し、化合物Gua-T-3 (0.50 g, 81%) を白色泡状固体として得た。^{31}P NMR ($CDCl_3$) δ 149.27, 148.76.

HRMS(FAB): calcd for $C_{53}H_{66}N_{10}O_{13}P[M+H^+]$ 1081.4548, found 1081.4551

[0162] <u>＜＜オリゴヌクレオチドの合成例＞＞</u>

オリゴヌクレオチドは、前記合成例で得られた化合物 (AP-T-6、DT-3、DH-3、Pip-T-3、Gua-T-3) を用いて、標準的なホスホロアミダイトプロトコールに従って、核酸自動合成機（Ｅｘｐｅｄｉｔｅ（商標）　８９０９／ＡＢＩ社製）により合成した。得られた５種類のオリゴヌクレオチドは、式（４）で表される単位を有しており、Ｘ及びＲ^{3}はそれぞれ以下のとおりである。

Ｘ＝（ＣＨ$_2$）$_3$、Ｒ^3＝ＮＨ$_2$（以下、（ＣＨ$_2$）$_3$ＮＨ$_2$という。）

Ｘ＝（ＣＨ$_2$）$_3$、Ｒ^3＝ＮＭｅ$_2$（以下、（ＣＨ$_2$）$_3$ＮＭｅ$_2$という。）

Ｘ＝（ＣＨ$_2$）$_6$、Ｒ^3＝ＮＭｅ$_2$（以下、（ＣＨ$_2$）$_6$ＮＭｅ$_2$という。）

Ｘ＝（ＣＨ$_2$）$_3$、Ｒ^3＝４－メチルピペラジン－１－イル基（以下、（ＣＨ$_2$）$_3$Ｐｉｐ－Ｍｅという。）

Ｘ＝（ＣＨ$_2$）$_3$、Ｒ^3＝ＮＨＣ（＝ＮＨ）ＮＨ$_2$（以下、（ＣＨ$_2$）$_3$Ｇｕａという。）

５’－末端がジメトキシトリチル基で保護され、固相に支持された状態のオリゴヌクレオチドに対し、それぞれ、２８％アンモニア水によるカラムからの切り出し（１．５時間）を行い、切り出したオリゴヌクレオチドを２８％アンモニア水中、１６時間、６０℃で反応させ、すべての保護基の脱保護を行った。なお、（ＣＨ$_2$）$_3$Ｇｕａに関しては、５０％ピペリジン水溶液、２４時間室温でカラムからの切り出しを行った。

ＮＡＰ－１０カラムによる簡易精製を行い、逆相ＨＰＬＣ［ＷａｋｏＰａｋ（商標） ＷＳ－ＤＮＡカラム、１０．０ｍｍ×２５０ｍｍ）により精製した［条件：０．１Ｍトリエチルアンモニウム酢酸バッファー（ｐＨ７．０）中、３ｍｌ／分で３０分の８－１６％アセトニトリルのグラジエント、カラム温度５０℃］。

合成されたオリゴヌクレオチドの純度は、逆相ＨＰＬＣ［ＷａｋｏＰａｋ（商標） ＷＳ－ＤＮＡカラム、４．６ｍｍ×２５０ｍｍ）により確認した［条件：０．１Ｍトリエチルアンモニウム酢酸バッファー（ｐＨ７．０）中、１ｍｌ／分で３０分の８－１６％アセトニトリルのグラジエント、カラム温度５０℃、検出波長２５４ｎｍ］。なお、合成されたオリゴヌクレオチドは、全て純度が９０％以上であった。

また、合成されたオリゴヌクレオチドの分子量は、ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＡＳＳ測定により決定した。分子量の計算値及び実測値（測定結果）を下表に示す。なお、式（４）で表される単位は、下表中のアンチセンス鎖（配列番号１～４）のＸの位置に組み込まれており、Ｂａｓｅはチミンである。Ｘ以外の塩基配列はすべてＤＮＡ（式（５）Ｒ^a＝Ｈ）で構成されている。また、対照として、Ｘの位置に２’，４’－ＢＮＡ^{NC}（Ｎ－Ｍｅ）（式（７）Ｒ^b＝Ｍｅ）を組み込んだオリゴヌクレオチド（以下、表中ではＭｅという。

）及び2’，4’－ＢＮＡ^{NC}（Ｎ－Ｈ）（式（７）Ｒ^{b}＝Ｈを組み込んだオリゴヌクレオチド（以下、表中ではＨという。）の分子量の計算値及び実測値も示す。

[表1]

MALDI-TOF-MASS	計算値[M-H]$^-$/実測値[M-H]$^-$						
アンチセンス鎖	Me	H	$(CH_2)_3NH_2$	$(CH_2)_3NMe_2$	$(CH_2)_6NMe_2$	$(CH_2)_3$Pip-Me	$(CH_2)_3$Gua
5'-d(GCGTTXTTTGCT)-3'	3689.47/3687.54	-	3732.53/3733.64	3760.59/3761.97	3802.67/3802.05	3815.67/3815.54	3774.58/3774.69
5'-d(GCGXTXTXTGCT)-3'	3803.57/3804.88	3761.48/3760.11	3932.75/3932.84	4016.93/4017.32	4143.17/4144.01	4182.17/4180.25	4058.90/4056.97
5'-d(GCGXXXXXXGCT)-3'	3974.72/3973.40	3890.54/3889.73	4233.08/4232.82	4401.44/4401.50	4653.92/4654.40	4731.92/4730.22	4485.38/4484.50
5'-d(TTTTTTTTXT)-3'	3036.08/3036.65	3022.05/3023.60	3079.14/3079.17	3107.20/3109.16	3149.28/3150.33	3162.28/3160.82	3121.19/3121.19

[0163] ＜＜試験例＞＞

［試験例１］オリゴヌクレオチドの融解温度（Ｔｍ）測定（二重鎖形成能評価）

前記合成例で得られた化合物（AP-T-6、DT-3、DH-3、Pip-T-3、Gua-T3）を配列番号５に示される配列の一部に組み込んで合成した本発明の５種類のオリゴヌクレオチド（４）（（CH_2）$_3NH_2$、（CH_2）$_3NMe_2$、（CH_2）$_6NMe_2$、（CH_2）$_3$Ｐｉｐ－Ｍｅ、（CH_2）$_3$Ｇｕａ）（アンチセンス鎖）と、一本鎖ＤＮＡ（５’－ｄ（ＡＧＣＡＡＡＡＡＡＣＧＣ）－３’；配列番号６）又は一本鎖ＲＮＡ（５’－ｒ（ＡＧＣＡＡＡＡＡＡＣＧＣ）－３’；配列番号７）（センス鎖）との融解温度（Ｔｍ）を測定することにより、アンチセンス鎖の二重鎖形成能を調べた。また、対照として、ＬＮＡ（式（６））、２’，４’－ＢＮＡ^{NC}（Ｎ－Ｍｅ）（式（７）Ｒ＝Ｍｅ）及び２’，４’－ＢＮＡ^{NC}（Ｎ－Ｈ）（式（７）Ｒ＝Ｈ）を配列番号５に示される配列の一部に組み込んで合成したオリゴヌクレオチドをアンチセンス鎖として用意した。

終濃度をそれぞれ塩化ナトリウム１００ｍＭ、リン酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ７．２）１０ｍＭ、アンチセンス鎖４μＭ、センス鎖４μＭとしたサンプル溶液（１２０μｌ）を調製し、１５℃から１１０℃まで０．５℃／分にて昇温し、０．５℃間隔で２６０ｎｍにおける吸光度を分光光度計（株式会社島津製作所製ＵＶ－１８００）により測定した。

得られた測定値から微分法によりＴｍ値を算出し、独立した少なくとも２回以上の測定結果の平均値をＴｍ値とした。結果を下表に示す。

[0164] 一本鎖ＤＮＡに対する二重鎖形成能（Ｔｍ値）

[表2]

	Tm (°C)							
アンチセンス鎖	LNA-T	Me	H	$(CH_2)_3NH_2$	$(CH_2)_3NMe_2$	$(CH_2)_6NMe_2$	$(CH_2)_3$Pip-Me	$(CH_2)_3$Gua
5'-d(GCGTTTTTTGCT)-3'	52	52	52	52	52	52	52	52
5'-d(GCGTTXTTTGCT)-3'	-	50	-	55	55	52	52	57
5'-d(GCGXTXTXTGCT)-3'	57	52	56	62	62	55	56	62
5'-d(GCGXXXXXXGCT)-3'	-	63	73	75	77	69	68	83

センス鎖＝ 5'-d(AGCAAAAAACGC)-3'

条件: 100mM NaCl, 10 mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.2), 4 μMの各鎖を含む; スキャンレート: 0.5°C/分 (15°C～110 °C).

[0165] 一本鎖ＲＮＡに対する二重鎖形成能（Ｔｍ値）

[表3]

	Tm (°C)							
アンチセンス鎖	LNA-T	Me	H	$(CH_2)_3NH_2$	$(CH_2)_3NMe_2$	$(CH_2)_6NMe_2$	$(CH_2)_3$Pip-Me	$(CH_2)_3$Gua
5'-d(GCGTTTTTTGCT)-3'	48	48	48	48	48	48	48	52
5'-d(GCGTTXTTTGCT)-3'	-	51	-	51	52	50	51	52
5'-d(GCGXTXTXTGCT)-3'	65	64	65	64	65	61	63	63
5'-d(GCGXXXXXXGCT)-3'	-	80	83	79	82	79	81	83

センス鎖＝ 5'-r(AGCAAAAAACGC)-3'

条件: 100mM NaCl, 10 mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.2), 4 μMの各鎖を含む; スキャンレート: 0.5°C/分 (15°C～110 °C).

[0166] 一本鎖ＤＮＡ又は一本鎖ＲＮＡのいずれのターゲットに対しても、本発明のオリゴヌクレオチド（４）は、式（４）又は（４ａ）で表される単位の増加に従いＴｍ値が高まり、優れた二重鎖形成能を有することが明らかとなった。したがって、本発明のオリゴヌクレオチド（４）は、優れた二重鎖形成能が求められるＤＮＡやＲＮＡをターゲットとした核酸医薬や遺伝子診断の使用に適する。

[0167] ［試験例２］オリゴヌクレオチドの酵素耐性能測定

１）酵素耐性能測定用オリゴヌクレオチドの調製

前記オリゴヌクレオチドの合成例と同様に、配列番号８に示される配列又はその一部が修飾された配列を有する下表のオリゴヌクレオチドを調製した。

[表4]

No.	オリゴ名	配列（5'→3'）	長さ (mer)
1	DNAオリゴ	TTTTTTTTTT	10
2	NH_2オリゴ	TTTTTTTTt^{α}T	10
3	NMe_2オリゴ	TTTTTTTTt^{β}T	10
4	Sオリゴ	TTTTTTTTT^T	10
5	NHオリゴ	TTTTTTTTt^{α}T	10
6	LNAオリゴ	TTTTTTTTtT	10

T = DNA-T

t^{α} = 2',4'-BNA^{NC}(N-$(CH_2)_3NH_2$)-T

t^{β} = 2',4'-BNA^{NC}(N-$(CH_2)_3NMe_2$)-T

t^{α} = 2',4'-BNA^{NC}(N-H)-T

t = LNA-T

^ = ホスホロチオエート結合

[0168] 2）サンプル溶液の調製

サンプル溶液は、下表のとおり調製した。

[表5]

試薬	終濃度
Tris HCl pH8.0	50 mM
$MgCl_2$	10 mM
オリゴヌクレオチド	7.5 μM

[0169] 3）酵素反応

装置（Major Science社製、MD-MINI）を用いて、温度３７℃で下記操作を行った。

(1) サンプル溶液をインキュベーション（５分）した。

(2) 酵素ＣＡＶＰ（Crotalus adamanteus Venom ホスホジエステラーゼＩ）を０．６２５μｇ／ｍＬとなるように添加し、反応を開始した。

(3) 反応時間終了時に反応液の濃度が５．０ｍＭとなるようにＥＤＴＡを添加し、反応を停止した。

(4) 反応時間は０分、５分、１０分、４０分、８０分とした。

[0170] ４）酵素耐性能の評価

酵素反応の終了したサンプル溶液について、下記条件でＨＰＬＣ分析を行った。

（条件）

装置　：LC-2010A HT（島津製作所社製）

カラム：XBridge Oligonucleoties BEH C18 カラム 130Å, 2.5μm, 4.6mm×50mm移動相

・A液：　０．１Ｍトリエチルアンモニウム酢酸バッファー(pH7.0)

・B液：　０．１Ｍトリエチルアンモニウム酢酸バッファー(pH7.0):アセトニトリル=1:1(v/v)グラジエント：5～30%（(v/v)B液）、15分）

流速　　：0.8mL/分

カラム温度：50℃

検出波長　：268nm

注入量　　：15μL(101.2pmol)

ＨＰＬＣ分析結果から酵素未消化オリゴヌクレオチドの量を測定し、各反応時間の未消化オリゴの残存率(%)を、次式により算出した。

[数1]

$$\text{各反応時間の未消化オリゴヌクレオチドの残存率(\%)} = \frac{\text{各反応時間の未消化オリゴヌクレオチドの面積}}{\text{反応時間0分の未消化オリゴヌクレオチドの面積}} \times 100$$

[0171] ５）結果

結果を下表及び図２に示す。

[表6]

No.	オリゴ名	各反応時間の未消化オリゴヌクレオチドの残存率(%)				
		0分	5分	10分	40分	80分
1	DNAオリゴ	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0
2	NH_2オリゴ	100.0	97.1	96.8	91.6	87.4
3	NMe_2オリゴ	100.0	98.5	98.8	87.3	83.0
4	Sオリゴ	100.0	98.2	96.6	88.6	84.6
5	NHオリゴ	100.0	96.5	95.4	73.0	57.0
6	LNAオリゴ	100.0	74.2	48.8	1.3	1.1

[0172] 上記結果から明らかなように、本発明のオリゴヌクレオチド（４）は、天然型及びその他の非天然型のオリゴヌクレオチドに比較して優れた酵素耐性を有している。

[0173] ［試験例３］オリゴヌクレオチドのクランプ能

１）クランプ能測定用オリゴヌクレオチドの調製

前記オリゴヌクレオチドの合成例と同様に、下表のオリゴヌクレオチドを調製した。なお、クランプ核酸１（配列番号１２）及びクランプ核酸３は、従来の２’，４’－ＢＮＡ^{NC}（Ｎ－Ｍｅ）（式（７）Ｒ＝Ｍｅ）に相当し、クランプ核酸２（配列番号１２）及びクランプ核酸４は、本発明のオリゴヌクレオチド（４）に相当する。

[表7]

Ｎｏ.	オリゴ名	配列（5’→3’）	長さ (mer)
1	Forward プライマー	ACTGAATATAAACTTGTGGTAG	22
2	Reverse プライマー	ATTGTTGGATCATATTCGTC	20
3	増幅確認用プローブ	j-CTTGACGATACAGCTAATTCAGAATCAT-R	28
4	クランプ核酸１	GCCt$^{\beta}$Ac$^{\beta}$Gc$^{\beta}$c$^{\beta}$Ac$^{\beta}$c$^{\beta}$AGc$^{\beta}$TCC-P	18
5	クランプ核酸２	GCCt$^{\alpha}$Ac$^{\alpha}$Gc$^{\alpha}$c$^{\alpha}$Ac$^{\alpha}$c$^{\alpha}$AGc$^{\alpha}$TCC-P	18
6	クランプ核酸３	c$^{\beta}$c$^{\beta}$a$^{\beta}$c$^{\beta}$c$^{\beta}$a$^{\beta}$g$^{\beta}$c$^{\beta}$-P	8
7	クランプ核酸４	c$^{\alpha}$c$^{\alpha}$a$^{\alpha}$c$^{\alpha}$c$^{\alpha}$a$^{\alpha}$g$^{\alpha}$c$^{\alpha}$-P	8

A,C,G,T = DNA-A,-C,-G,-T

a$^{\beta}$,c$^{\beta}$,g$^{\beta}$,t$^{\beta}$ = 2’,4’-BNA^{NC}[N-Me]-A,^{m}C,G,T

a$^{\alpha}$,c$^{\alpha}$,g$^{\alpha}$,t$^{\alpha}$ = 2',4'-BNA^{NC}(N-(CH$_2$)$_3$NH$_2$)-A,-^{m}C,-G,-T

G = 2’-OMe-RNA-G; j = JOE; R = TAMRA; P = モノリン酸化

[0174] ２）検査試料の作製

ＫＲＡＳ遺伝子の野生型遺伝子試料として市販のＨｕｍａｎ ｇｅｎｏｍｉｃ ＤＮＡ（プロメガ社）を、またＧ１２Ｖ変異型遺伝子試料としてＳＷ４８０培養細胞から抽出したＤＮＡ（ＤＳファーマ社）をテンプレートとして用いた。

各ＤＮＡ量は、各試料のＵＶスペクトルと、ｆｏｒｗａｒｄプライマー（配列番号９）、ｒｅｖｅｒｓｅプライマー（配列番号１０）及び増幅確認用

プローブ（配列番号１１）を用いたリアルタイムＰＣＲで得られたＣｔ値により求めた。

当該ＤＮＡ量に基づき、変異型が１０％、１．０％、０．１％、０．０１％、及び０％となるモデル検査試料を作製し、それぞれのモデル検査試料を実験あたり各５０ｎｇの量で用いた。

[0175] ３）核酸増幅装置及び核酸増幅用試薬

ＳｔｅｐＯｎｅＰｌｕｓ（ＡＢＩ社製）をリアルタイムＰＣＲ装置に、ＴａｑＭａｎ™Ｆａｓｔ Ａｄｖａｎｃｅｄ Ｍａｓｔｅｒ Ｍｉｘ（ＡＢＩ社製）を核酸増幅用試薬に用いた。本試薬の使用量は、添付マニュアルに準じた。

[0176] ４）プライマー、増幅確認用プローブ、クランプ核酸

Ｆｏｒｗａｒｄ及びｒｅｖｅｒｓｅプライマーを実験あたり各１０ｐｍｏｌ使用し、増幅確認用プローブを実験あたり２．５ｐｍｏｌ使用した。クランプ核酸として、ＫＲＡＳ遺伝子野生型の配列を有するクランプ核酸１～４をそれぞれ実験あたり１０ｐｍｏｌ又は１．０ｐｍｏｌ使用した。

[0177] ５）核酸増幅操作及び結果

検査試料、核酸増幅用試薬、プライマー、増幅確認用プローブ、及びクランプ核酸の混合液を核酸増幅装置にて、（ｉ）５０℃で２分間、（ｉｉ）９５℃で２０秒間、（ｉｉｉ）９５℃で１０秒間、（ｉｖ）５７℃で６０秒間、その後（ｖ）（ｉｉｉ）～（ｉｖ）の操作を５５回繰り返した。それぞれの検査試料、それぞれのクランプ核酸による増幅確認用プローブでの核酸増幅過程（５５サイクルまで）をモニターした。

[0178] ６）結果

クランプ核酸を１０ｐｍｏｌ使用した場合の核酸増幅曲線を図３－１に示す。Ｃｔ値データを下表に示す。表中、Ｍは変異型を、Ｗは野生型を示す。なお、Ｃｔ値とは、ＰＣＲ増幅産物がある一定量に達したときのサイクル数を意味しており、ΔＣｔ値とは、変異型が０％の試料と各検査試料との間のＣｔ値の差を意味している。

[0179] クランプ核酸１～４を用いたリアルタイムＰＣＲにおけるＣｔ値データ（クランプ核酸の使用量：１０ｐｍｏｌ）

[表8]

クランプ核酸		X = M/(M+W)				
		10%	1%	0.10%	0.01%	0%
クランプ無し	Ct値	24.88	24.9	24.83	24.88	24.89
	$\Delta Ct_{0\%-X\%}$値	0.02	0	0.07	0.02	
クランプ核酸１	Ct値	29.59	33.33	36.51	37.96	37.96
	$\Delta Ct_{0\%-X\%}$値	8.37	4.63	1.46	0.01	
クランプ核酸２	Ct値	31.54	35.4	37.69	39	38.96
	$\Delta Ct_{0\%-X\%}$値	7.41	3.56	1.27	-0.05	
クランプ核酸３	Ct値	26.96	27.67	27.72	27.59	27.69
	$\Delta Ct_{0\%-X\%}$値	0.74	0.02	-0.03	0.11	
クランプ核酸４	Ct値	28.3	31.44	33.66	34.37	34.6
	$\Delta Ct_{0\%-X\%}$値	6.31	3.16	0.94	0.23	

[0180] クランプ核酸を用いない場合、いずれのテンプレートを用いたＰＣＲも増幅に差異が認められないが、１８ｍｅｒのクランプ核酸１及び２を用いると、テンプレート中の野生型遺伝子の割合が増加することに伴いＣｔ値が大きくなるなど増幅に差異が認められた。これらの結果は、クランプ核酸１及び２のいずれのオリゴヌクレオチドもクランプ能を有していることを示している。

８ｍｅｒのクランプ核酸３及び４を使用した場合、クランプ核酸３（従来技術）ではクランプ能がほぼ認められなかった一方で、クランプ核酸４（本発明）では８ｍｅｒの短いクランプ核酸であってもクランプ能を発揮した。これらの結果から、本発明のオリゴヌクレオチド（４）は短いクランプ核酸としても使用可能であり、遺伝子の短い領域で変異が集中している癌やウィルスなどの遺伝子領域をターゲットとした場合においても、クランプ核酸として用いることができることが明らかとなった。

[0181] クランプ核酸を１．０ｐｍｏｌ使用した場合の核酸増幅曲線を図３－２に示す。Ｃｔ値データを下表に示す。

クランプ核酸１及び２に利用したリアルタイムＰＣＲにおけるＣｔ値データ（クランプ核酸の使用量：１．０ｐｍｏｌ）

[表9]

クランプ核酸		X = M/(M+W)				
		10%	1%	0.10%	0.01%	0%
クランプ核酸１	Ct値	28.13	29.81	30.06	30.12	30.07
	$\Delta Ct_{0\%-X\%}$値	1.94	0.25	0	-0.05	
クランプ核酸２	Ct値	30.64	34.59	37.31	38.97	38.96
	$\Delta Ct_{0\%-X\%}$値	8.32	4.37	1.65	-0.01	

[0182] クランプ核酸の使用量を１０ｐｍｏｌから１．０ｐｍｏｌと１／１０に減らした場合、クランプ核酸１（従来技術）では、クランプ効果が大幅に減少した。一方、クランプ核酸２（本発明）では、クランプ効果に変化が見られなかった。したがって、本発明のオリゴヌクレオチド（４）は使用量をより少なくした場合でも、高感度なクランプＰＣＲを実現可能であることが明らかとなった。

[0183] ［試験例４］オリゴヌクレオチドのストランドインベージョン測定

１）ストランドインベージョン用オリゴヌクレオチドの調製

前記オリゴヌクレオチドの合成例と同様に、下表のオリゴヌクレオチドを調製した。

[表10]

No.	オリゴ名	配列（5'→3'）	長さ (mer)
1	PNA20	H-(Lys)ggcatgttcatcatcagtaa(Lys)-NH_2	20
2	LSI-1	5'-ggcatGttcatcAtcagtaA-3'	20
3	BSI-4	5'-$c^{\alpha}a^{\beta}t^{\alpha}Gt^{\alpha}t^{\alpha}Ca^{\beta}t^{\alpha}c^{\alpha}a^{\beta}t^{\alpha}c^{\alpha}a^{\beta}Gt^{\alpha}$-3'	16
4	BSI-5	5'-$g^{\alpha}g^{\alpha}c^{\alpha}a^{\alpha}t^{\beta}Gt^{\beta}t^{\beta}c^{\alpha}a^{\alpha}t^{\beta}c^{\alpha}At^{\beta}c^{\alpha}a^{\alpha}g^{\alpha}t^{\beta}a^{\alpha}A$-3'	20
5	BSI-6	5'-$g^{\beta}g^{\beta}c^{\alpha}a^{\beta}t^{\beta}Gt^{\beta}t^{\beta}c^{\alpha}a^{\beta}t^{\beta}c^{\alpha}At^{\beta}c^{\alpha}a^{\beta}g^{\beta}t^{\beta}a^{\beta}A$-3'	20
6	BSI-11	5'-$g^{\alpha}g^{\alpha}c^{\alpha}a^{\alpha}t^{\alpha}Gt^{\alpha}t^{\alpha}c^{\alpha}a^{\alpha}t^{\alpha}c^{\alpha}At^{\alpha}c^{\alpha}a^{\alpha}g^{\alpha}t^{\alpha}a^{\alpha}A$-3'	20
7	BSI-12	5'-$g^{\beta}g^{\beta}c^{\beta}a^{\beta}t^{\beta}Gt^{\beta}t^{\beta}c^{\beta}a^{\beta}t^{\beta}c^{\beta}At^{\beta}c^{\beta}a^{\beta}g^{\beta}t^{\beta}a^{\beta}A$-3'	20
8	BSI-18	5'-$ggc^{\alpha}at^{\alpha}Gt^{\alpha}t^{\alpha}c^{\alpha}at^{\alpha}c^{\alpha}At^{\alpha}c^{\alpha}agt^{\alpha}aA$-3'	20
9	BSI-19	5'-$ggc^{\beta}at^{\beta}Gt^{\beta}t^{\beta}c^{\beta}at^{\beta}c^{\beta}At^{\beta}c^{\beta}agt^{\beta}aA$-3'	20
10	BSI-21	5'-$a^{\beta}c^{\alpha}Ga^{\beta}t^{\beta}a^{\beta}c^{\alpha}Gg^{\beta}Gt^{\beta}t^{\beta}a^{\beta}c^{\alpha}t^{\beta}$-3'	15
11	BSI-22	5'-$c^{\alpha}g^{\alpha}t^{\beta}g^{\alpha}a^{\beta}Gc^{\alpha}a^{\alpha}t^{\beta}c^{\alpha}Ct^{\beta}c^{\alpha}t^{\beta}c^{\alpha}t^{\beta}c^{\alpha}Gt^{\beta}t^{\alpha}$-3'	20

A,C,G,T = DNA-A,C,G,T
a,c,g,t = PNA-A,C,G,T
a,c,g,t = LNA-A,^{m}C,G,T
c^{α},t^{α} = 2',4'-BNA^{NC}[N-$(CH_2)_3NH_2$]- ^{m}C, T
a^{β},c^{β},t^{β} = 2',4'-BNA^{NC}[N-$(CH_2)_3NMe_2$]- A,^{m}C,T
a^{α},c^{α},g^{α},t^{α} = 2',4'-BNA^{NC}[N-H]-A,^{m}C,G,T
a^{β},c^{β},g^{β},t^{β} = 2',4'-BNA^{NC}[N-Me]-A,^{m}C,G,T

なお、ＬＳＩ－１及びＢＳＩ－５、６、１１、１２、１８、１９は、配列番号１３に示される配列を有し、ＢＳＩ－４は、配列番号１４に示される配列を有し、ＢＳＩ－２１は、配列番号２５に示される配列を有し、ＢＳＩ－２２は、配列番号２６に示される配列を有する。

[0184] ２）標的の二重鎖ＤＮＡ［Chem. Commun., 2009, 1225-1227に準拠］

標的の二重鎖ＤＮＡは、以下のとおりである。

(DNA-1) pBR322 plasmid（市販品）をテンプレートとした203 bpのPCR産物（配列番号２３及び２４）

(DNA-2) pBR322 plasmidをベースとした人工遺伝子T1825G（市販品）をテンプレートとした203 bpのPCR産物

(DNA-3) pBR322 plasmidをベースとした人工遺伝子T1825C（市販品）をテンプレートとした203 bpのPCR産物

(DNA-4) pBR322 plasmidをベースとした人工遺伝子T1825A（市販品）をテンプレートとした203 bpのPCR産物

[表11]

No.	標的の二重鎖DNA名	変異型	サイズ (bp)	標的部位の配列（↓の位置が変異箇所）
1	DNA-1	野生型	203	5′------GGCATGTTCATCATCAGTAA-----3′ 3′------CCGTACAAGTAGTAGTCATT-----5′
2	DNA-2	T1825G	203	5′------GGCATGTTCAGCATCAGTAA-----3′ 3′------CCGTACAAGTCGTAGTCATT-----5′
3	DNA-3	T1825C	203	5′------GGCATGTTCACCATCAGTAA-----3′ 3′------CCGTACAAGTGGTAGTCATT-----5′
4	DNA-4	T1825A	203	5′------GGCATGTTCAACATCAGTAA-----3′ 3′------CCGTACAAGTTGTAGTCATT-----5′

なお、ＤＮＡ－１の標的部位の配列は、配列番号１５及び１６に示される配列であり、ＤＮＡ－２の標的部位の配列は、配列番号１７及び１８に示される配列であり、ＤＮＡ－３の標的部位の配列は、配列番号１９及び２０に示される配列であり、ＤＮＡ－４の標的部位の配列は、配列番号２１及び２２に示される配列である。

[0185] ３）Chem. Commun., 2009, 1225-1227に準じる方法

（1）サンプル溶液の調製

サンプル溶液は、下表のとおり調製した。

[表12]

試薬	終濃度	割合
HEPES pH 7.0 (緩衝液)	5 mM	
NaCl	20 mM	
SSB (Single-Stranded DNA Binding Protein)	6 μM	200
標的の二重鎖DNA (DNA-1)	30 nM	1
ストランドインベージョン用オリゴヌクレオチド (PNA20, BSI-4～6)	200 nM	6.7

[0186] （2）反応

サーマルサイクラー（StepOnePlus, Applied Biosystems社）を使用し、サンプル溶液を３７℃で１２０分、６０分、又は３０分反応させた。

[0187] （3）ゲルシフトアッセイと染色

反応終了後サンプル溶液をアプライしたゲルを２枚作製し、下記の条件にて同時にＰＡＧＥ（Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis）を行った。電気

泳動装置pageRun AE-6531（アトー株式会社製）を用い、泳動条件は装置の添付マニュアルに従った。

（条件）

ゲル：15% ポリアクリルアミドゲル

ランニングバッファー　：トリス-グリシンバッファー

(25mM トリス, 0.192M グリシン pH 8.4, Davis法用)

サンプルアプライ量　　：12 μL（ サンプル10 μL + ローディングバッファー2 μL ）

電気泳動終了後、一方のゲルは、核酸を染色するため蛍光染色（GelGreen Nucleic Acid Stain 10,000 ×、Biotium 社）を実施し、他方のゲルには、核酸とタンパク質を同時染色するため銀染色（EzStain Silver, ATTO社）を実施した。染色方法はそれぞれの添付マニュアルに従った。

[0188] （4）結果

結果を図４～図５に示す。

一本鎖ＤＮＡ結合タンパク質（ＳＳＢ：Single-Stranded DNA Binding Protein)存在下で、標的の二重鎖ＤＮＡに対するＰＮＡオリゴヌクレオチドのストランドインベージョンが認められた。すなわち、文献条件下で結果が再現できた。

本発明のオリゴヌクレオチド（４）に相当するＢＳＩ－４～６についてもＰＮＡオリゴヌクレオチドと同様、ＳＳＢ存在下でストランドインベージョンを認めた。

[0189] ４）ＳＳＢ非存在下でのオリゴヌクレオチドによるストランドインベージョン

（1）サンプル溶液の調製

サンプル溶液は、下表のとおり調製した。

[表13]

試薬	終濃度	割合
HEPES pH 7.0（緩衝液）	5 mM	
NaCl	20 mM	
標的の二重鎖DNA（DNA-1）	30 nM	1
ストランドインベージョン用オリゴヌクレオチド（PNA20, BSI-5, 6）	100 nM	3.3

[0190] （2）反応

サーマルサイクラー（StepOnePlus, Applied Biosystems社）を使用し、サンプル溶液を９４℃から５４℃まで３０秒間に２℃ずつ冷却するか、又は３７℃で一定（２４時間、４８時間）にして反応させた。

なお、９４℃から５４℃まで３０秒間に２℃ずつ冷却する条件は、ＳＳＢ非存在下で、熱エネルギーで標的の二重鎖ＤＮＡ（この場合は２０３ｂｐのＰＣＲ産物）を一本鎖にし、徐々に冷却することでストランドインベージョンを起こさせる条件であり、遺伝子解析技術での使用を想定している。

また、３７℃で一定にする条件は、in vivoでの反応を想定した条件であり、核酸医薬やゲノム編集での使用を想定している。

[0191] （3）ゲルシフトアッセイと染色

３）と同様に実施した。なお、染色はＧｅｌＧｒｅｅｎ（蛍光染色）のみとした。

[0192] （4）結果

結果を図６に示す。

本発明のオリゴヌクレオチド（４）に相当するＢＳＩ－５及び６は、使用量を３）の半量（標的ｄｓＤＮＡに対して３．３当量）にしても９４℃から５４℃に冷却する又は３７℃で放置する条件下でストランドインベージョンが確認できた。一方、この条件下ではＰＮＡオリゴヌクレオチドによるストランドインベージョンは確認できなかった。

[0193] ５）１塩基ミスマッチ配列に対するオリゴヌレクオチドのストランドインベージョン塩基認識能

（1）サンプル溶液

サンプル溶液は、下表のとおり調製した。

[表14]

試薬	終濃度	割合
HEPES pH 7.0（緩衝液）	5 mM	
NaCl	20 mM	
標的の二重鎖DNA（DNA-1～4）	15 nM	1
ストランドインベージョン用オリゴヌクレオチド（PNA20, BSI-5, 6）	200 nM	13.3

[0194] （2）反応

サーマルサイクラー（StepOnePlus, Applied Biosystems社）を使用し、サンプル溶液を９４℃から５４℃まで３０秒間に２℃ずつ冷却するか、又は３７℃で一定（２４時間、４８時間）にして反応させた。

[0195] （3）ゲルシフトアッセイと染色

３）と同様に実施した。なお、染色はＧｅｌＧｒｅｅｎ（蛍光染色）のみとした。

[0196] （4）結果

結果を図７に示す。

ＢＳＩ－５及び６の野生型の配列に対するストランドインベージョンは認められたが、１塩基ミスマッチ配列に対しては、ストランドインベージョンが認められなかった。すなわち、本発明のオリゴヌクレオチド（４）を用いたストランドインベージョン用オリゴヌクレオチドは、配列特異性が高いことが認められた。

なお、本条件下では、ＰＮＡオリゴヌクレオチドは、野生型配列に対してもストランドインベージョンを生じなかった

[0197] ６）オリゴヌクレオチドのストランドインベージョン機能性比較

（1）サンプル溶液

サンプル溶液は、下表のとおり調製した。

[表15]

試薬	終濃度	割合
HEPES pH 7.0 (緩衝液)	5 mM	
NaCl	20 mM	
標的の二重鎖 DNA (DNA-1)	30 nM	1
ストランドインベージョン用オリゴヌクレオチド (PNA20, LSI-1, BSI-5, 6, 11, 12)	100 nM	3.3

[0198] (2) 反応

サーマルサイクラー (StepOnePlus, Applied Biosystems社) を使用し、サンプル溶液を９４℃から５４℃まで３０秒間に２℃ずつ冷却するか、又は３７℃で一定（２時間、２４時間）にして反応させた。

[0199] (3) ゲルシフトアッセイと染色

３）と同様に実施した。なお、染色はＧｅｌＧｒｅｅｎ（蛍光染色）のみとした。

[0200] (4) 結果

結果を図８に示す。

いずれの条件下においても、ＰＮＡ２０及びＬＳＩ－１はストランドインベージョンを認めることはできなかった。従来発明のオリゴヌクレオチドを用いたＢＳＩ－１１と１２については、ＢＳＩ－１１はＢＳＩ－５及び６ほどではないが、ストランドインベージョンが認められたが、ＢＳＩ－１２は認められなかった。

一方、本発明のオリゴヌクレオチド（４）に相当するＢＳＩ－５及び６は、３７℃一定で２時間経過後であっても、ストランドインベージョンが認められた。

つまり、本発明のオリゴヌクレオチド（４）に相当するＢＳＩ－５及び６のストランドインベージョン能が最も優れている。

[0201] ７）ＢＳＩ－５及び６の一部の塩基としてＬＮＡを用いたオリゴヌクレオチドＢＳＩ－１８及び１９のストランドインベージョン

(1) サンプル溶液

サンプル溶液は、下表のとおり調製した。

[表16]

試薬	終濃度	割合
HEPES pH 7.0（緩衝液）	5 mM	
NaCl	20 mM	
標的の二重鎖DNA（DNA-1）	30 nM	1
ストランドインベージョン用オリゴヌクレオチド（PNA20, LSI-1, BSI-5, 6, 18, 19）	200 nM	6.7

[0202] （2）反応

サーマルサイクラー（StepOnePlus, Applied Biosystems社）を使用し、サンプル溶液を９４℃から５４℃まで３０秒間に２℃ずつ冷却するか、又は３７℃で一定（２４時間、４８時間）にして反応させた。

[0203] （3）ゲルシフトアッセイと染色

３）と同様に実施した。なお、染色はＧｅｌＧｒｅｅｎ（蛍光染色）のみとした。

[0204] （4）結果

結果を図９に示す。

ＢＳＩ－５及び６の一部の塩基としてＬＮＡを用いたオリゴヌクレオチドＢＳＩ－１８及び１９においてもストランドインベージョンが認められた。

[0205] ８）２種類以上のオリゴヌクレオチドを用いたストランドインベージョン

（1）サンプル溶液

サンプル溶液は、下表のとおり調製した。

[表17]

サンプル溶液		A		B		C		D		E	
試薬		終濃度	割合	終濃度	割合	終濃度	割合	終濃度	割合	終濃度	割合
HEPES pH 7.0（緩衝液）		5 mM	－	5 mM	－	5 mM	－	5 mM	－	5 mM	－
NaCl		20 mM	－	20 mM	－	20 mM	－	20 mM	－	20 mM	－
標的の二重鎖DNA（DNA-1）		30 nM	1	30 nM	1	30 nM	1	30 nM	1	30 nM	1
ストランドインベージョン用オリゴヌクレオチド	BSI-22	－	－	1000 nM	33	1000 nM	33	1000 nM	33	1000 nM	33
	BSI-5	－	－	－	－	1000 nM	33	－	－	1000 nM	33
	BSI-21	－	－	－	－	－	－	1000 nM	33	1000 nM	33

[0206] (2) 反応

サーマルサイクラー（StepOnePlus, Applied Biosystems社）を使用し、サンプル溶液を９４℃から５４℃まで３０秒間に２℃ずつ冷却して反応させた。

[0207] (3) ゲルシフトアッセイと染色

３）と同様に実施した。なお、染色はＧｅｌＧｒｅｅｎ（蛍光染色）のみとした。

[0208] (4) 結果

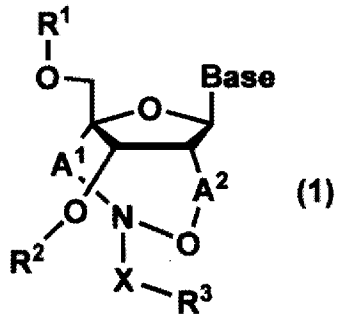
結果を図１０に示す。

ＢＳＩ－２２単独で用いた場合、ネガティブコントロールと比較して、異なるバンドパターンが観察されたが、一部にテンプレートＤＮＡ（DNA-1）のバンドが残っていることも確認できた。このことから、ＢＳＩ－２２単独であってもストランドインベージョンが生じていることが示唆された。ＢＳＩ－２２及びＢＳＩ－５（同じストランドにハイブリダイゼーション＝シス型）を組み合わせて用いた場合、或いは、ＢＳＩ－２２及びＢＳＩ－２１（異なるストランドにハイブリダイゼーション＝トランス型）を組み合わせて用いた場合には、ネガティブコントロールと比較して、異なるバンドパターンが観察され、また、テンプレートＤＮＡのバンドは確認されず、ストランドインベージョンがより効率的に起こっていることが確認できた。ＢＳＩ－２２、ＢＳＩ－２１、及びＢＳＩ－５を組み合わせて用いた場合も、ストランドインベージョンが増強されることが判明した。

請求の範囲

[請求項1] 下記式（１）で表される化合物又はその塩：

[化1]



(1)

（式中、

Ｂａｓｅは、置換基を有していてもよい芳香族複素環基、又は置換基を有していてもよい芳香族炭化水素環基であり、

A^1は、直鎖アルキレン基であり、

A^2は、単結合又はアルキレン基であり、

Ｘは、置換基を有していてもよいアルキレン基、又はこのアルキレン基中の少なくとも１つのメチレン基が－Ｎ（R^X）－（式中、R^Xは、水素原子又はアルキル基である）、－Ｏ－、又は－Ｓ（＝Ｏ）$_k$－（式中、ｋは０、１、又は２である）に置き換わった基であり、

R^1及びR^2は、同一又は異なって、水素原子、置換基を有していてもよいアルキル基、置換基を有していてもよいアルケニル基、置換基を有していてもよいシクロアルキル基、置換基を有していてもよいシクロアルケニル基、置換基を有していてもよいアリール基、ヒドロキシル基の保護基、置換基を有するホスフィノ基、置換基を有していてもよいジヒドロキシホスフィニル基、又は置換基を有していてもよいヒドロキシメルカプトホスフィニル基であるか、或いは、R^1及びR^2は、隣接する２個の酸素原子及びフラノースの３位～５位の炭素原子と共に、置換基を有していてもよい環を形成しており、

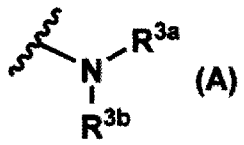
R^3は、置換基を有していてもよいアミノ基である）。

[請求項2] A^1がメチレン基であり、且つ、A^2が単結合である、請求項１に記載の化合物又はその塩。

[請求項3] Ｘが、$-C_nH_{2n}-$（式中、ｎは１～１０の整数である）である、請求項１又は２に記載の化合物又はその塩。

[請求項4] R^3が、下記式（Ａ）：

[化2]

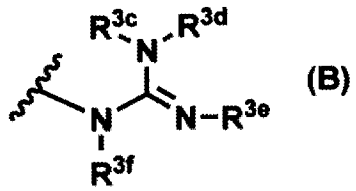


(A)

（式中、R^{3a}及びR^{3b}は、同一又は異なって、水素原子、置換基を有していてもよいアルキル基、置換基を有していてもよいアルケニル基、置換基を有していてもよいシクロアルキル基、置換基を有していてもよいシクロアルケニル基、置換基を有していてもよいアリール基、又はアミノ基の保護基であるか、或いは、R^{3a}及びR^{3b}は、隣接する窒素原子と共に、置換基を有していてもよい環を形成している）

で表される基であるか、或いは、下記式（Ｂ）：

[化3]



(B)

（式中、R^{3c}～R^{3f}は、同一又は異なって、水素原子、アルキル基、又はアミノ基の保護基である）

で表される基である、請求項１～３のいずれか一項に記載の化合物又はその塩。

[請求項5] 式（Ａ）において、R^{3a}及びR^{3b}が、同一又は異なって、水素原子、アルキル基、アリール基、アラルキル基、又はアミノ基の保護基であるか、或いは、R^{3a}及びR^{3b}が、隣接する窒素原子と共に、置換基としてアルキル基を有していてもよい５～１０員の含窒素脂肪族複

素環を形成しており、

式（Ｂ）において、R^{3c}～R^{3f}が、同一又は異なって、水素原子、又はアミノ基の保護基である、

請求項４に記載の化合物又はその塩。

[請求項6] R^1及びR^2が、同一又は異なって、水素原子、置換基としてアルコキシ基を有していてもよいアルキル基、置換基としてアルコキシ基を有していてもよいアリール基、置換基としてアルコキシ基を有していてもよいアラルキル基、アルキルカルボニル基、アリールカルボニル基、アルキルスルホニル基、アリールスルホニル基、式：－Ｓｉ(R^4)$_3$（式中、各R^4は、同一又は異なって、アルキル基又はアリール基である）で表される基、式：－Ｐ(R^5)(R^6)（式中、R^5及びR^6は、同一又は異なって、ヒドロキシル基、メルカプト基、アミノ基、アルコキシ基、ハロアルコキシ基、シアノアルコキシ基、アルキルチオ基、ハロアルキルチオ基、シアノアルキルチオ基、又はアルキルアミノ基である）で表される基、ジヒドロキシホスフィニル基、又はヒドロキシメルカプトホスフィニル基であるか、或いは、

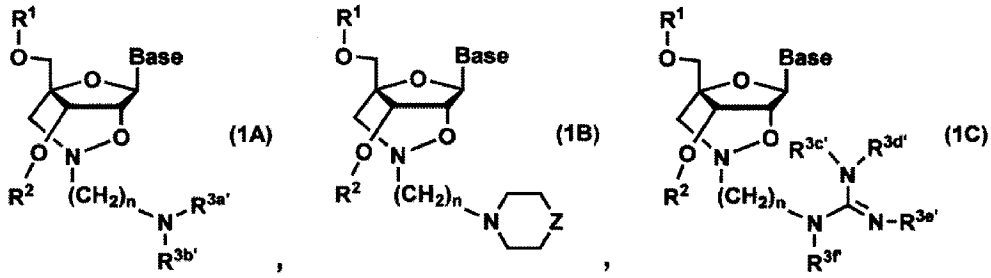
R^1及びR^2が、隣接する２個の酸素原子及びフラノースの３位～５位の炭素原子と共に、置換基としてアルキル基を有していてもよい６～１０員の脂肪族複素環を形成している、

請求項１～５のいずれか一項に記載の化合物又はその塩。

[請求項7] Ｂａｓｅが、置換基を有していてもよい２，４－ジオキソ－１，２，３，４－テトラヒドロピリミジン－１－イル基、置換基を有していてもよい２－オキソ－１，２－ジヒドロピリミジン－１－イル基、置換基を有していてもよいプリン－９－イル基、又は置換基を有していてもよい６－オキソ－１，６－ジヒドロ－９Ｈ－プリン－９－イル基である、請求項１～６のいずれか一項に記載の化合物又はその塩。

[請求項8] 下記式（１Ａ）～（１Ｃ）のいずれかで表される、請求項１～７のいずれか一項に記載の化合物又はその塩：

[化4]



(1A) (1B) (1C)

[式中、

$R^{3a'}$及び$R^{3b'}$は、同一又は異なって、水素原子、アルキル基、又はアミノ基の保護基であり、

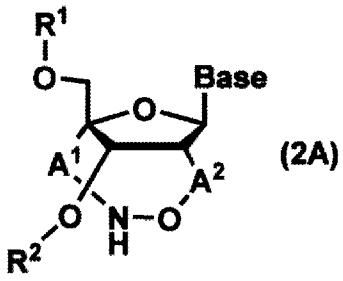
Ｚは、単結合、酸素原子、$S(=O)_m$（式中、ｍは０、１、又は２である）、$C(R^{13})(R^{14})$（式中、R^{13}及びR^{14}は、同一又は異なって、水素原子又はアルキル基である）、又はNR^{15}（式中、R^{15}は、水素原子、アルキル基、又はアミノ基の保護基である）であり、

$R^{3c'}$～$R^{3f'}$は、同一又は異なって、水素原子、又はアミノ基の保護基であり、Ｂａｓｅ、R^{1}、及びR^{2}は、前記と同じである]。

[請求項9] 請求項１に記載の式（１）で表される化合物又はその塩を製造する方法であって、

（Ｉ）下記式（２Ａ）：

[化5]



(2A)

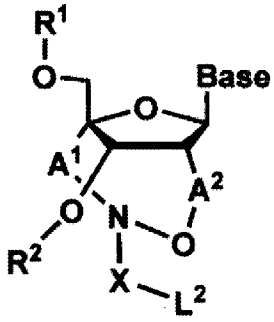
（式中、Ｂａｓｅ、A^{1}、A^{2}、R^{1}、及びR^{2}は、前記と同じである）

で表される化合物を、式（３Ａ）：$L^{1}-X-R^{3}$（式中、L^{1}は、脱離基であり、Ｘ及びR^{3}は、前記と同じである）で表される化合物と

反応させる工程、又は

（II）下記式（２Ｂ）：

[化6]



(2B)

（式中、Ｌ^{2}は、脱離基であり、Ｂａｓｅ、Ａ^{1}、Ａ^{2}、Ｘ、Ｒ^{1}、及びＲ^{2}は、前記と同じである）

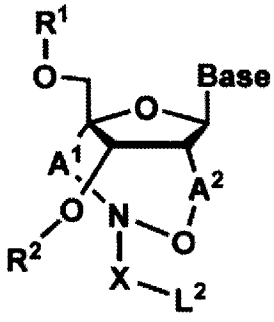
で表される化合物を、式（３Ｂ）：Ｒ^{3}－Ｈ（式中、Ｒ^{3}は、前記と同じである）で表される化合物と反応させる工程

を含む、方法。

[請求項10] 請求項１に記載の式（１）で表される化合物又はその塩のうち、Ｒ^{3}がアミノ基の保護基で保護されていてもよいアミノ基である化合物又はその塩を製造する方法であって、

（IIIａ）下記式（２Ｂ）：

[化7]

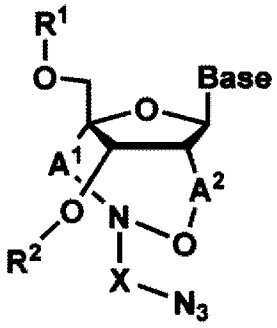


(2B)

（式中、Ｌ^{2}は、脱離基であり、Ｂａｓｅ、Ａ^{1}、Ａ^{2}、Ｘ、Ｒ^{1}、及びＲ^{2}は、前記と同じである）

で表される化合物を、アジ化物塩と反応させて、下記式（１Ｊ）：

[化8]



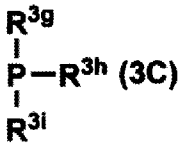
(1J)

（式中、Ｂａｓｅ、Ａ^{1}、Ａ^{2}、Ｘ、Ｒ^{1}、及びＲ^{2}は、前記と同じである）

で表される化合物を得る工程、

（IIIｂ）式（１Ｊ）で表される化合物を、下記式（３Ｃ）：

[化9]

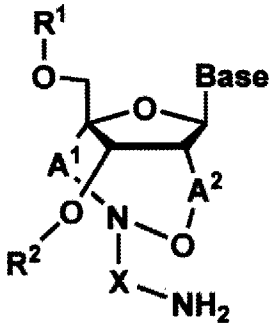


(3C)

（式中、Ｒ^{3g}～Ｒ^{3i}は、同一又は異なって、アルキル基又はアリール基である）

で表される化合物と反応させた後、加水分解により下記式（１Ｌ）：

[化10]



(1L)

（式中、Ｂａｓｅ、Ａ^{1}、Ａ^{2}、Ｘ、Ｒ^{1}、及びＲ^{2}は、前記と同じである）

で表される化合物を得る工程、及び

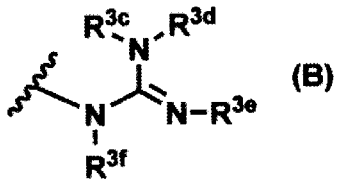
（IIIｃ）必要により、式（１Ｌ）で表される化合物のアミノ基を保

護する工程

を含む、方法。

[請求項11] 請求項１に記載の式（１）で表される化合物又はその塩のうち、R^3が下記式（Ｂ）：

[化11]



(B)

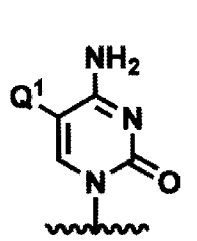
（式中、R^{3c}～R^{3f}は、同一又は異なって、水素原子、アルキル基、又はアミノ基の保護基である）

で表される基である化合物又はその塩の製造方法であって、

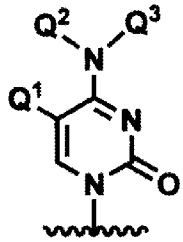
請求項１に記載の式（１）で表される化合物又はその塩のうち、R^3がアミノ基である化合物をグアニジル化する工程を含む、方法。

[請求項12] 請求項１に記載の式（１）で表される化合物又はその塩のうち、Ｂａｓｅが下記式（１Ｋ’）又は（１Ｑ’）：

[化12]



(1K')



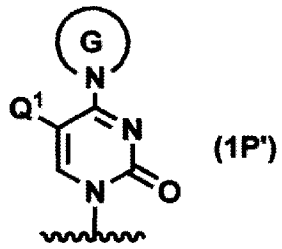
(1Q')

（式中、Q^1は、水素原子又は置換基であり、Q^2及びQ^3は、同一又は異なって、水素原子又はアミノ基の保護基である(但し、Q^2及びQ^3は同時に水素原子ではない)）

で表される化合物又はその塩の製造方法であって、

（VIb）請求項１に記載の式（１）で表される化合物又はその塩のうち、Ｂａｓｅが下記式（１Ｐ’）：

[化13]



(1P')

（式中、環Ｇは、５員又は６員の含窒素複素環であり、Q^1は前記と同じである）

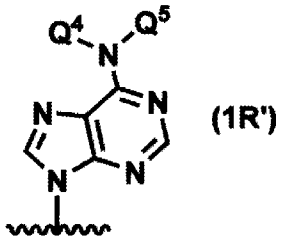
で表される化合物を、アンモニアと反応させる工程

を含む、方法。

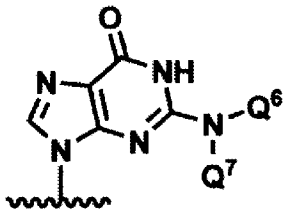
[請求項13] （VIc）工程（VIb）の反応により得られる化合物をアミノ基の保護基で保護する工程をさらに含む、請求項１２に記載の方法。

[請求項14] 請求項１に記載の式（１）で表される化合物又はその塩のうち、Ｂａｓｅが下記式（１Ｒ’）又は（１Ｓ’）：

[化14]



(1R')



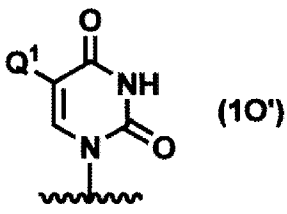
(1S')

（式中、Q^4～Q^7は、同一又は異なって、水素原子又はアミノ基の保護基である）

で表される化合物又はその塩の製造方法であって、

請求項１に記載の式（１）で表される化合物のうち、Ｂａｓｅが下記式（１Ｏ’）：

[化15]

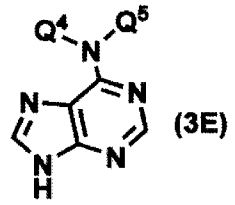


(1O')

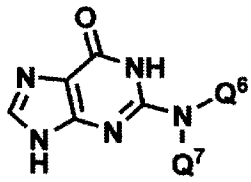
（式中、Ｑ[1]は、水素原子又は置換基である）

で表される化合物又はその塩を、下記式（３Ｅ）又は（３Ｆ）：

[化16]



(3E)



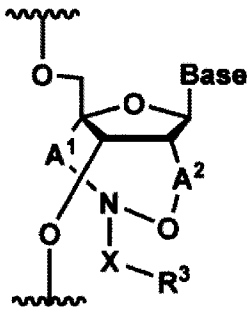
(3F)

（式中、Ｑ[4]～Ｑ[7]は、前記と同じである）

で表される化合物と反応させる工程を含む、方法。

[請求項15] 下記式（４）：

[化17]



(4)

（式中、

Ｂａｓｅは、置換基を有していてもよい芳香族複素環基、又は置換基を有していてもよい芳香族炭化水素環基であり、

Ａ[1]は、直鎖アルキレン基であり、

Ａ[2]は、単結合又はアルキレン基であり、

Ｘは、置換基を有していてもよいアルキレン基、又はこのアルキレン基中の少なくとも１つのメチレン基が－Ｎ（Ｒ[X]）－（式中、Ｒ[X]は、水素原子又はアルキル基である）、－Ｏ－、又は－Ｓ（＝Ｏ）$_k$－（式中、ｋは０、１、又は２である）に置き換わった基であり、

Ｒ[3]は、置換基を有していてもよいアミノ基である）

で表される単位を有するオリゴヌクレオチド又はその塩。

[請求項16] 検査試料において標的核酸を検出する方法であって、

（ｌ）前記標的核酸の標的部位を含む塩基配列を、クランプ核酸を用いる核酸増幅法によって、選択的に増幅させる工程であって、前記クランプ核酸が、請求項１５に記載のオリゴヌクレオチド又はその塩である工程、及び

（II）前記増幅された塩基配列を検出する工程

を含む、方法。

[請求項17] 検査試料における標的核酸を検出する、又は検査試料における標的核酸の標的部位を含む塩基配列を選択的に増幅するための組成物であって、

（ａ）前記組成物は、プライマー及びプローブを含み、該プライマー及びプローブのうち少なくともいずれかが、請求項１５に記載のオリゴヌクレオチド又はその塩である、

（ｂ）前記組成物は、フォワードプライマー、リバースプライマー及びプローブを含み、該フォワードプライマー、リバースプライマー及びプローブのうち少なくともいずれかが、請求項１５に記載のオリゴヌクレオチド又はその塩である、又は、

（ｃ）前記組成物は、クランプ核酸及びプライマーを含み、該クランプ核酸及びプライマーのうち少なくともいずれかが、請求項１５に記載のオリゴヌクレオチド又はその塩である、

組成物。

[請求項18] 二重鎖ＤＮＡの標的部位にオリゴヌクレチドを鎖侵入させるための組成物であって、前記標的部位の塩基配列に対して相補的な塩基配列を有する、請求項１５に記載のオリゴヌクレオチド又はその塩を含有する組成物。

[請求項19] 単離された二重鎖ＤＮＡの標的部位にオリゴヌクレオチドを鎖侵入させる方法であって、前記標的部位の塩基配列に対して相補的な塩基配列を有する、請求項１５に記載のオリゴヌクレオチド又はその塩と、前記二重鎖ＤＮＡとを混合する工程を含む、方法。

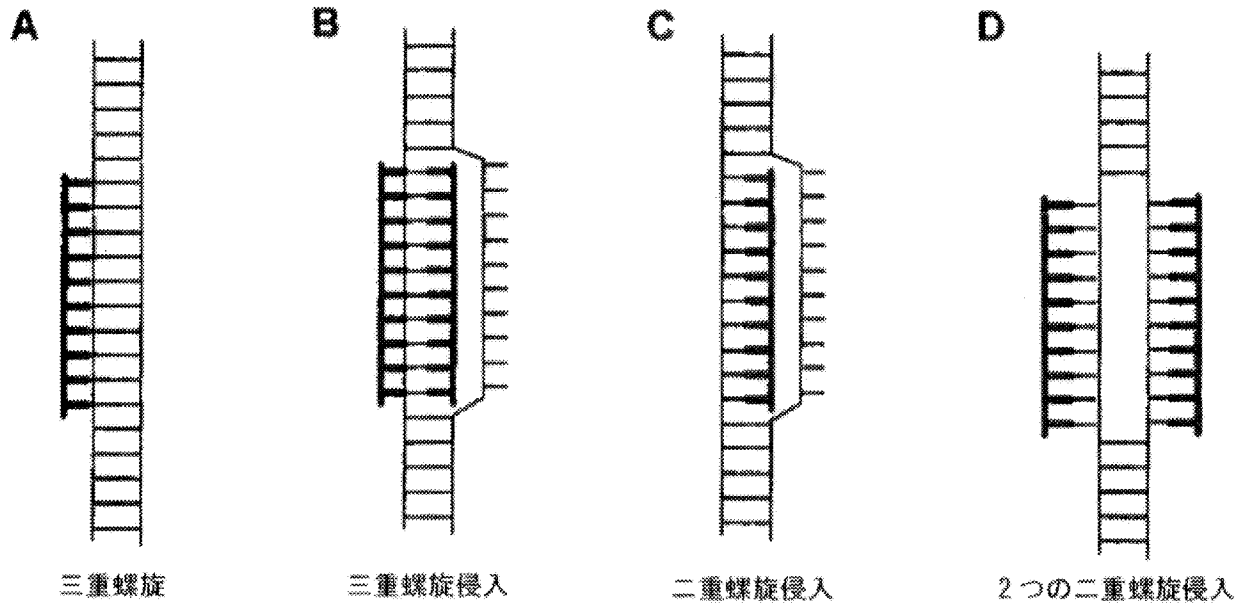
[請求項20] 前記工程は、（ｉ）前記オリゴヌクレオチド又はその塩と前記二重鎖ＤＮＡとを、一本鎖ＤＮＡ結合タンパク質の存在下で混合する工程であるか、（ii）前記オリゴヌクレオチド又はその塩と前記二重鎖ＤＮＡとを、一本鎖ＤＮＡ結合タンパク質の非存在下で混合する工程であり、

前記工程が（ii）であるとき、混合物を加熱する工程、又は混合物を２５～７５℃に維持する工程をさらに含む、

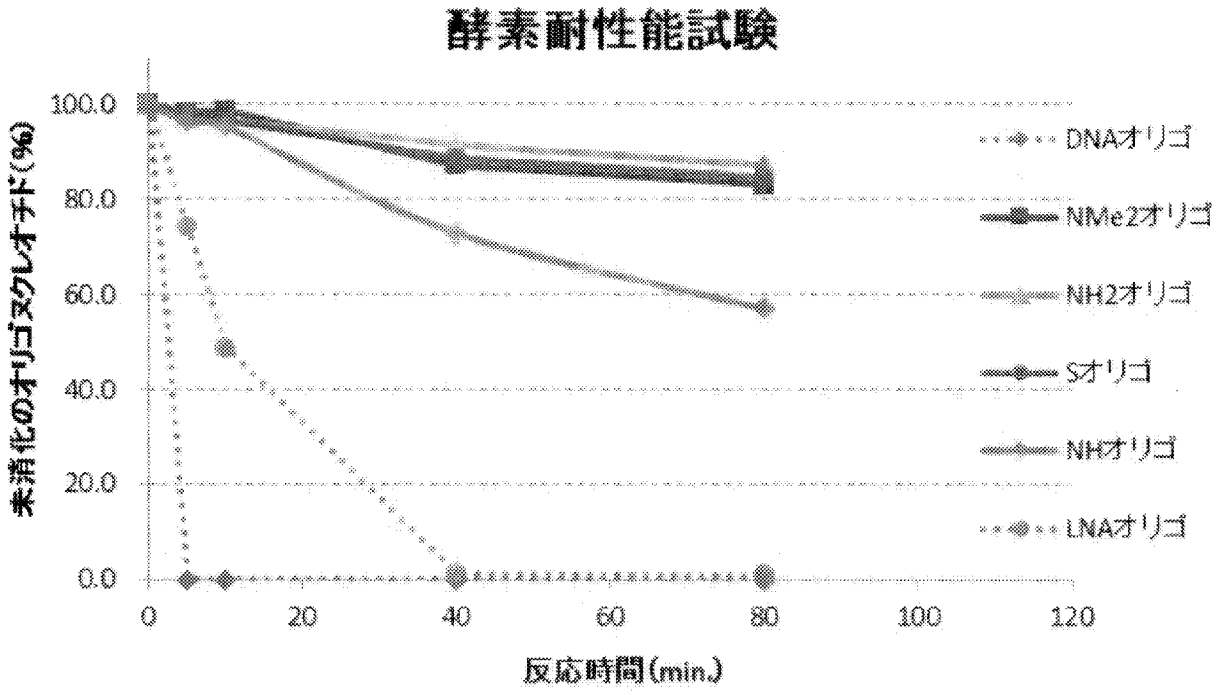
請求項１９に記載の方法。

[請求項21] 請求項１～８のいずれか一項に記載の化合物又はその塩、或いは、請求項１５に記載のオリゴヌクレオチド又はその塩を含有する医薬組成物。

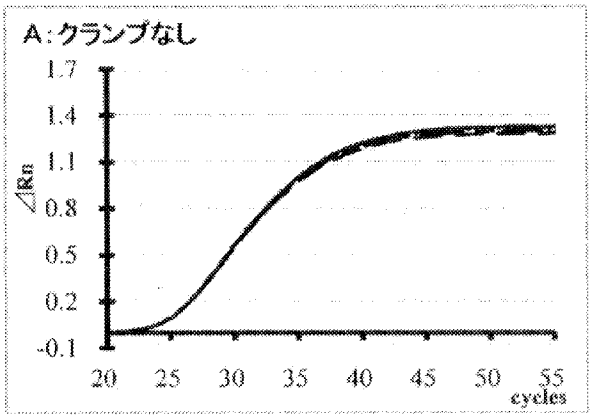
[図1]

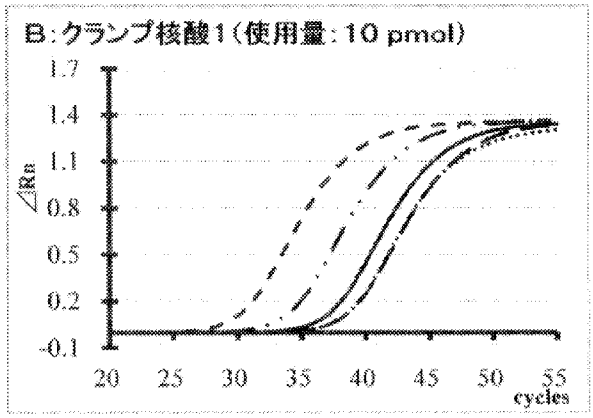

A
B
C
D
三重螺旋
三重螺旋侵入
二重螺旋侵入
2つの二重螺旋侵入
（アンチジーン法）
（ストランドインベージョン法）

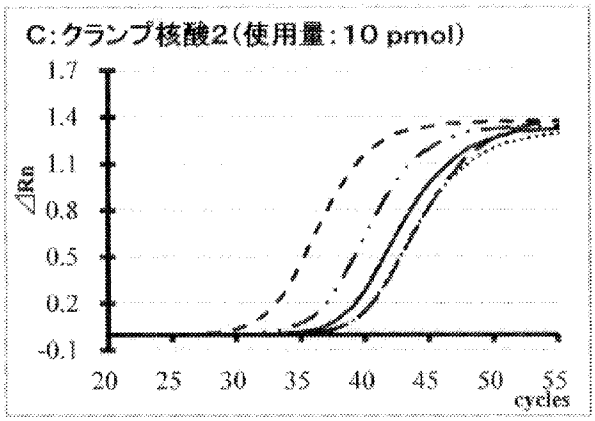
[図2]

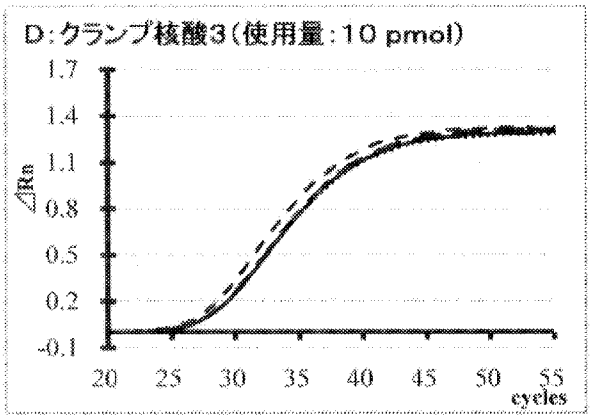

酵素耐性能試験
未消化のオリゴヌクレオチド(%)
100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
0.0
0
20
40
60
80
100
120
反応時間(min)
DNAオリゴ
NMe2オリゴ
NH2オリゴ
Sオリゴ
NHオリゴ
LNAオリゴ

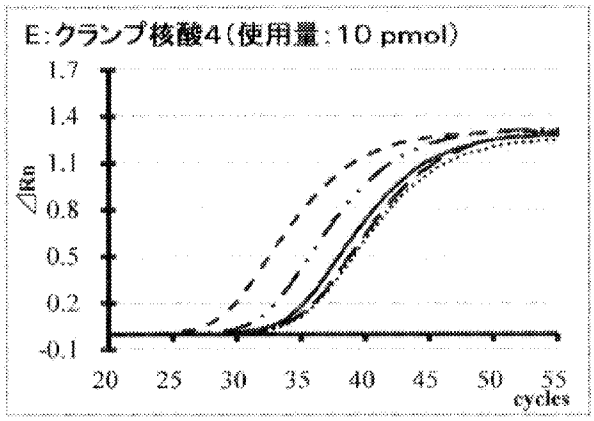
[図3-1]





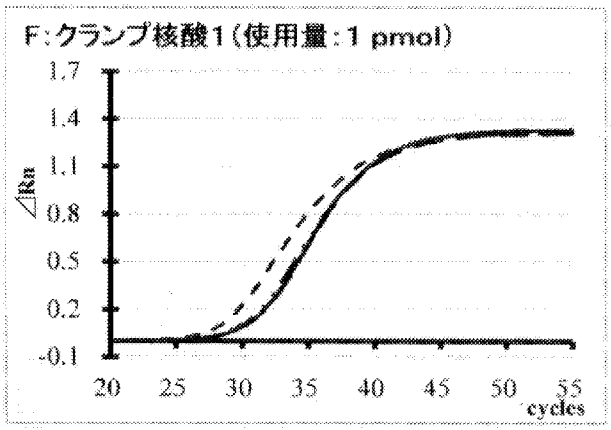


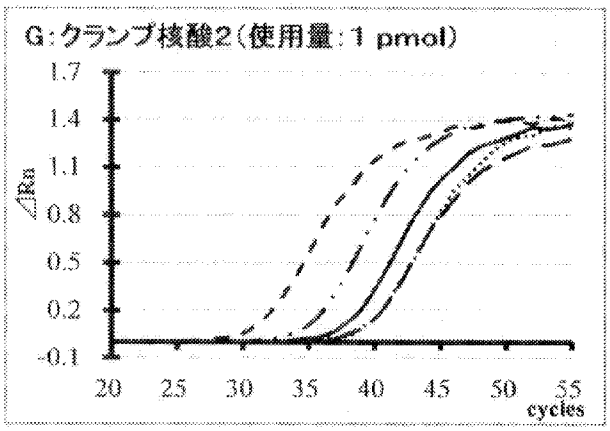




M(M+W)	10%	1%	0.10%	0.01%	0%
線	- - - - -	— · — ·	———	— — —	———

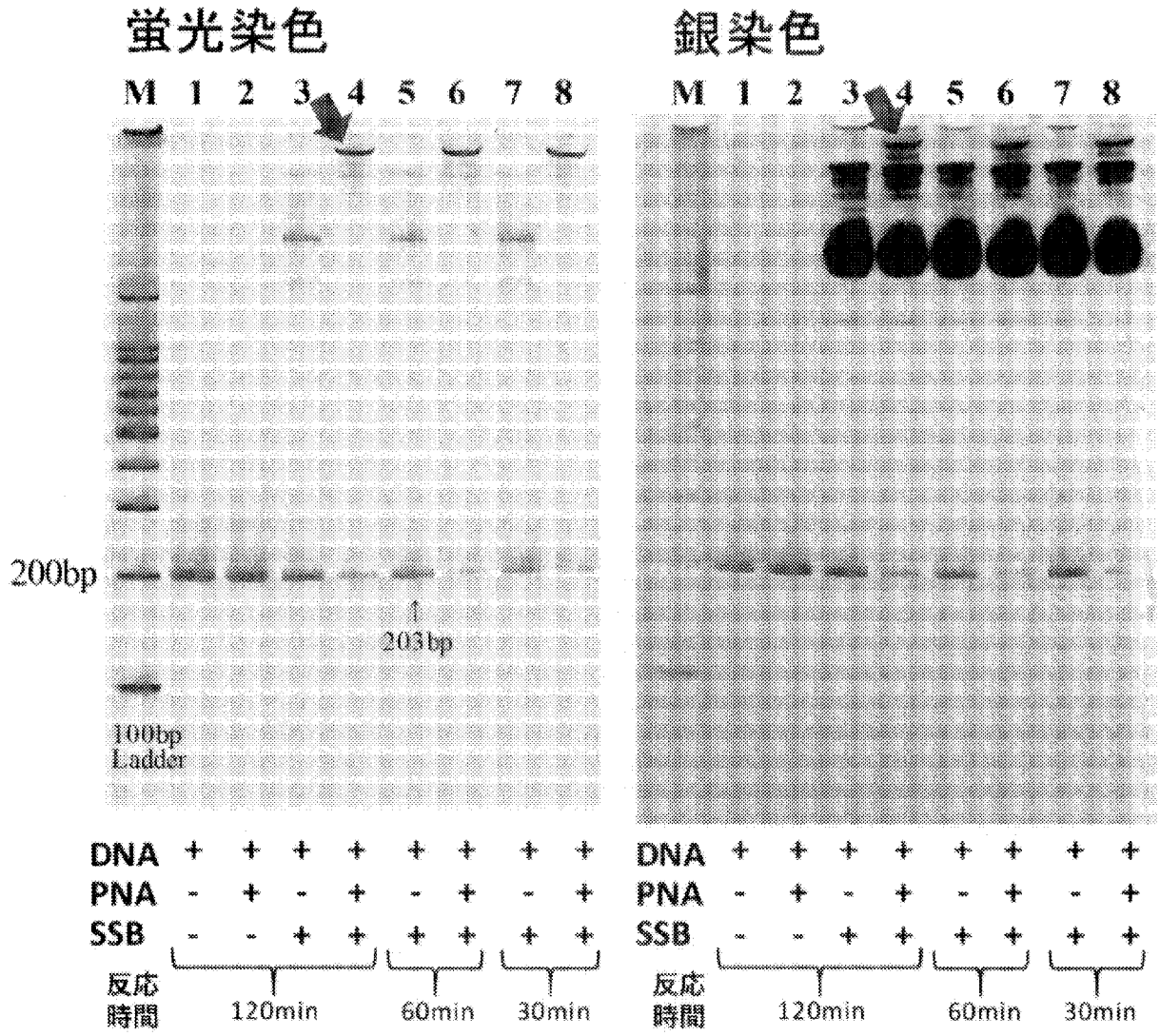
[図3-2]



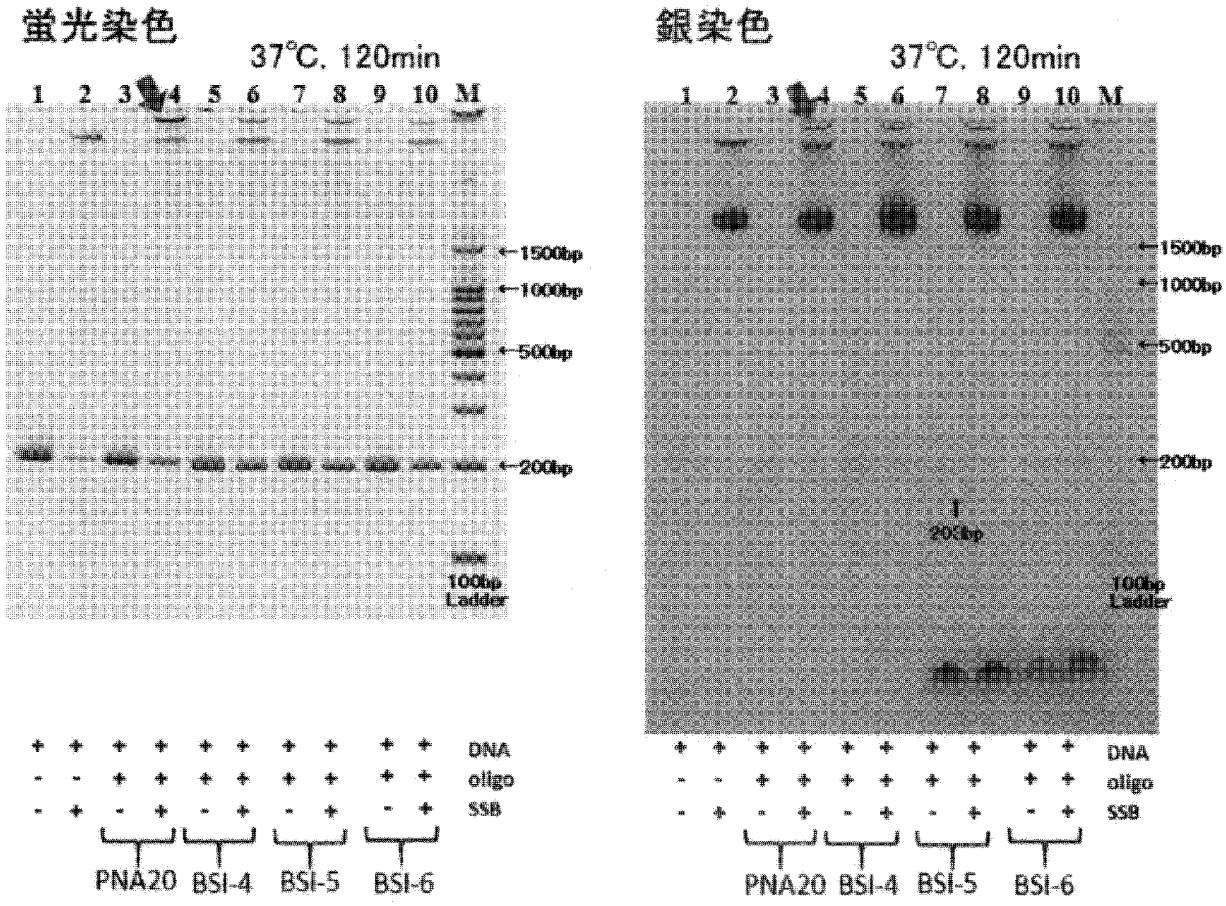


M(M+W)	10%	1%	0.10%	0.01%	0%
線	- - - - -	— · — ·	———	— — —	———

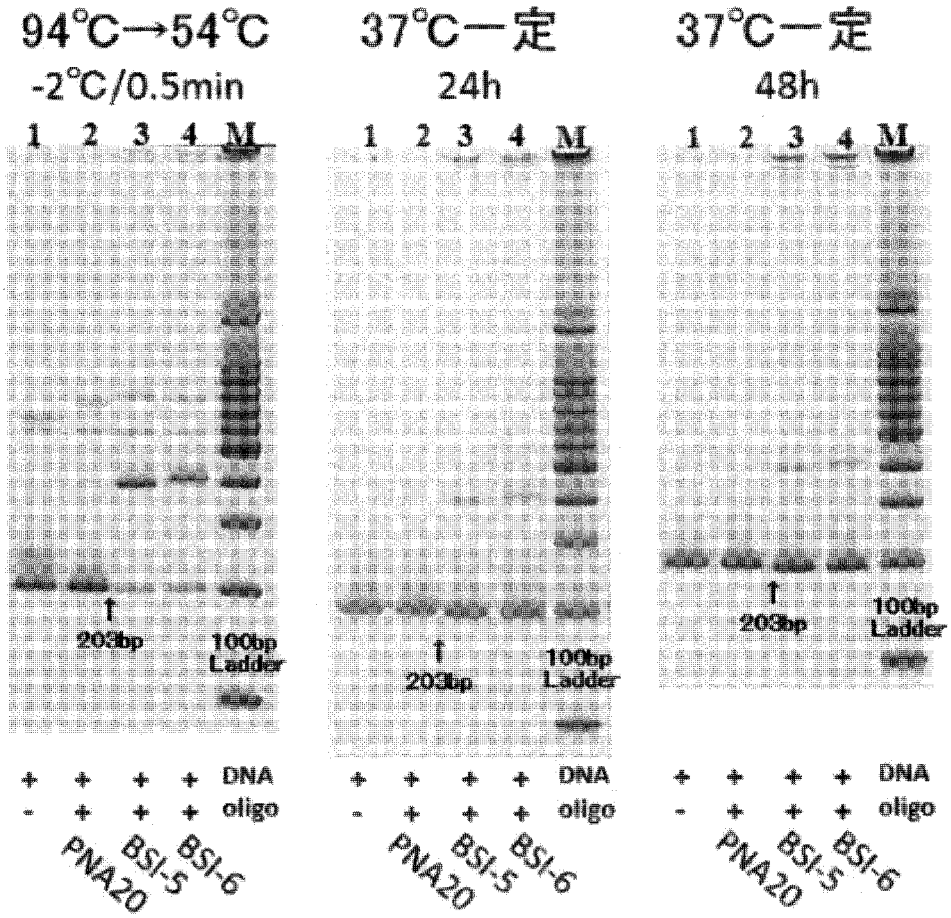
[図4]


蛍光染色
銀染色
M 1 2 3 4 5 6 7 8
200bp
203bp
100bp Ladder
DNA + + + + + + + +
PNA - + - + - + - +
SSB - - + + + + + +
反応時間
120min
60min
30min

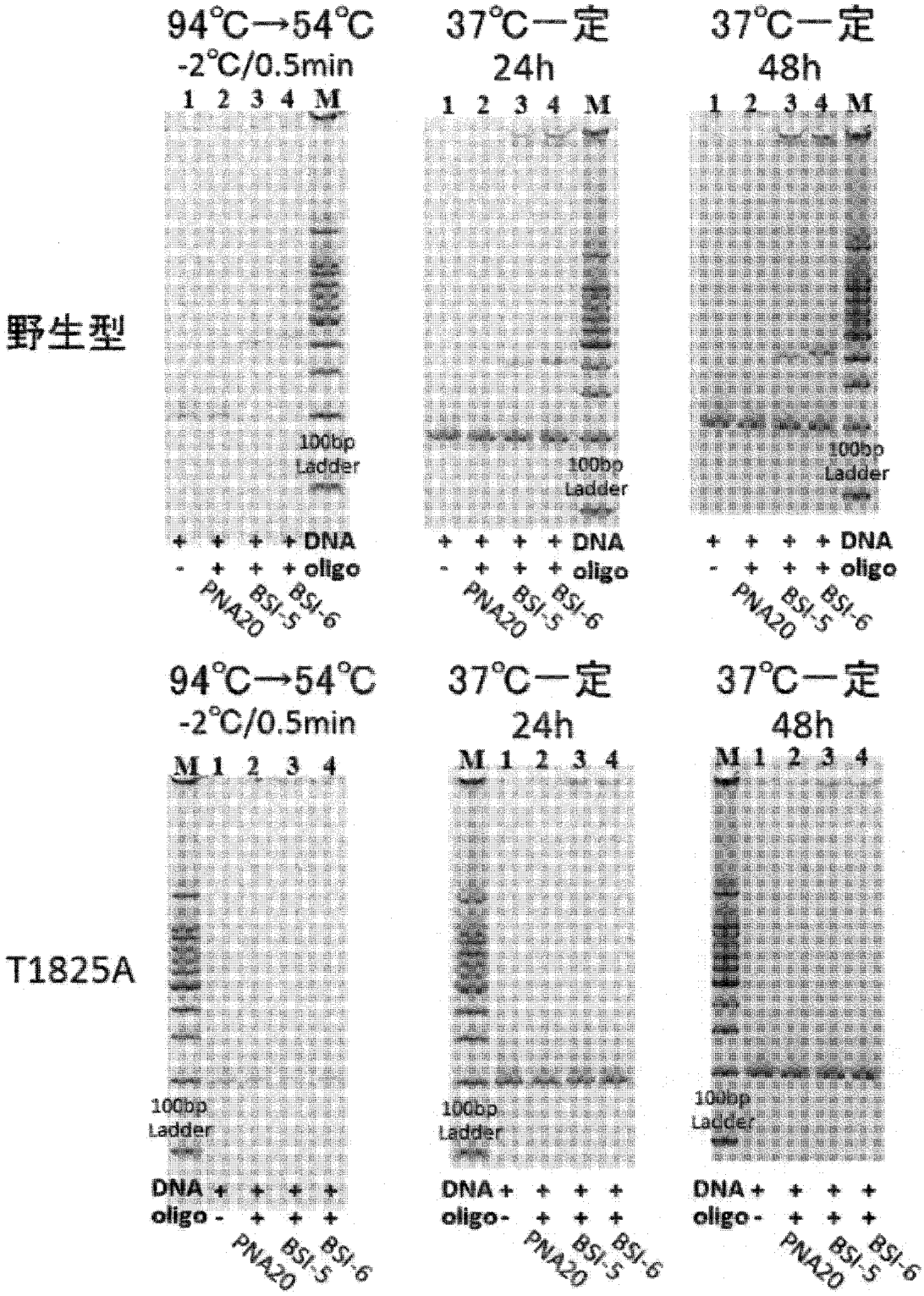
[図5]


蛍光染色
37°C, 120min
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 M
←1500bp
←1000bp
←500bp
←200bp
100bp Ladder
DNA
oligo
SSB
PNA20 BSI-4 BSI-5 BSI-6
銀染色
37°C, 120min
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 M
←1500bp
←1000bp
←500bp
←200bp
203bp
100bp Ladder
DNA
oligo
SSB
PNA20 BSI-4 BSI-5 BSI-6

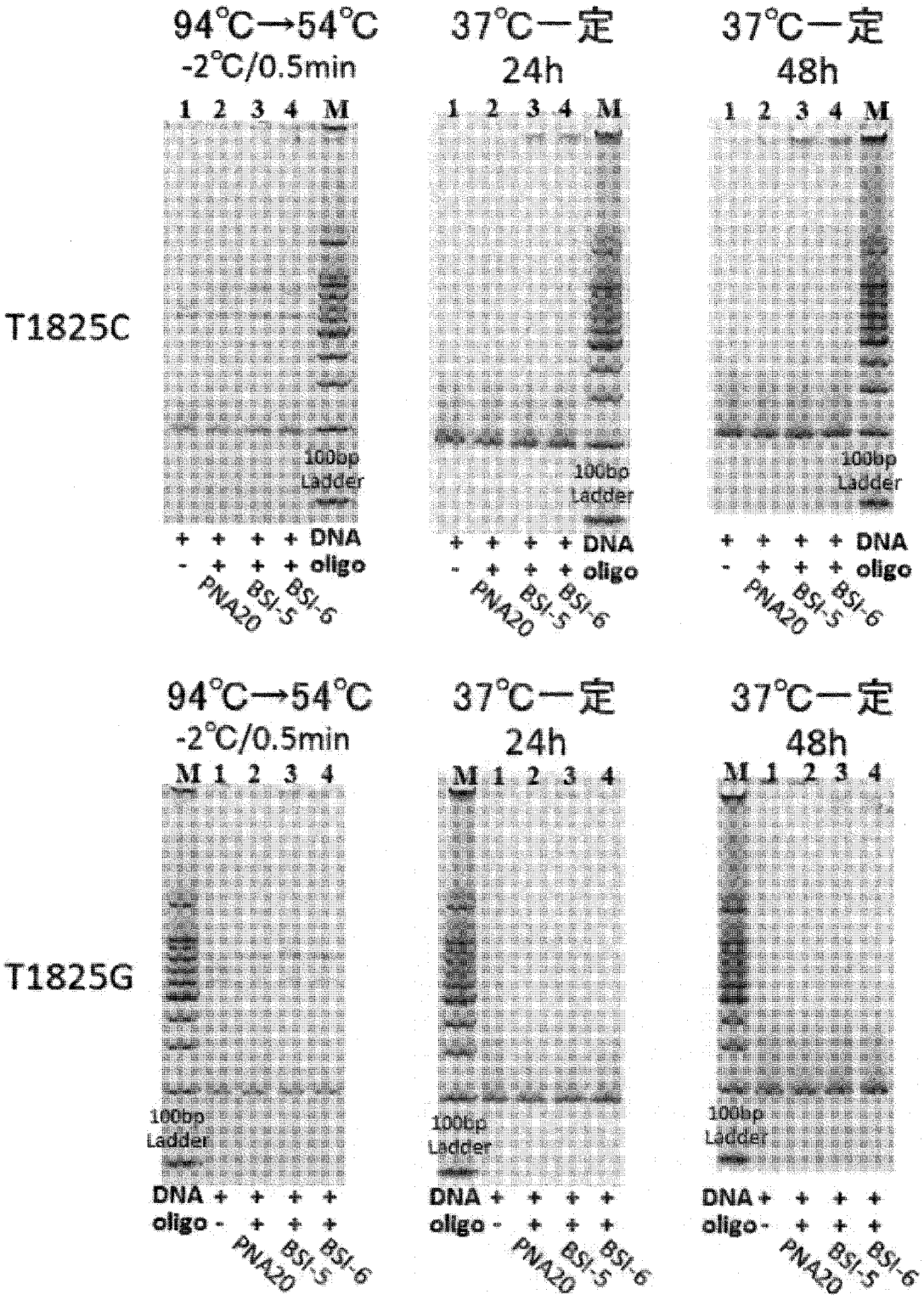
[図6]


94°C→54°C
-2°C/0.5min
37°C一定
24h
37°C一定
48h
1 2 3 4 M
203bp
100bp Ladder
DNA
oligo
PNA20 BSI-5 BSI-6

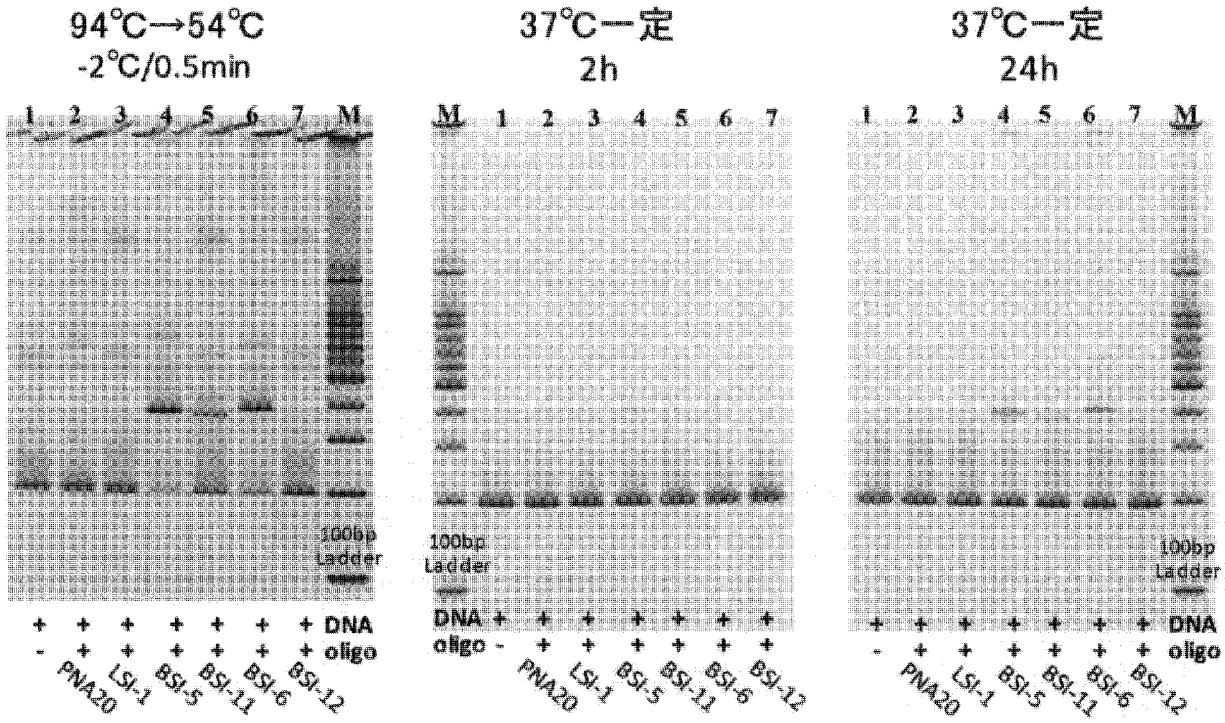
[図7-1]


94℃→54℃
-2℃/0.5min
37℃一定
24h
37℃一定
48h
野生型
T1825A
1 2 3 4 M
M 1 2 3 4
100bp
Ladder
DNA
oligo
PNA20
BSI-5
BSI-6

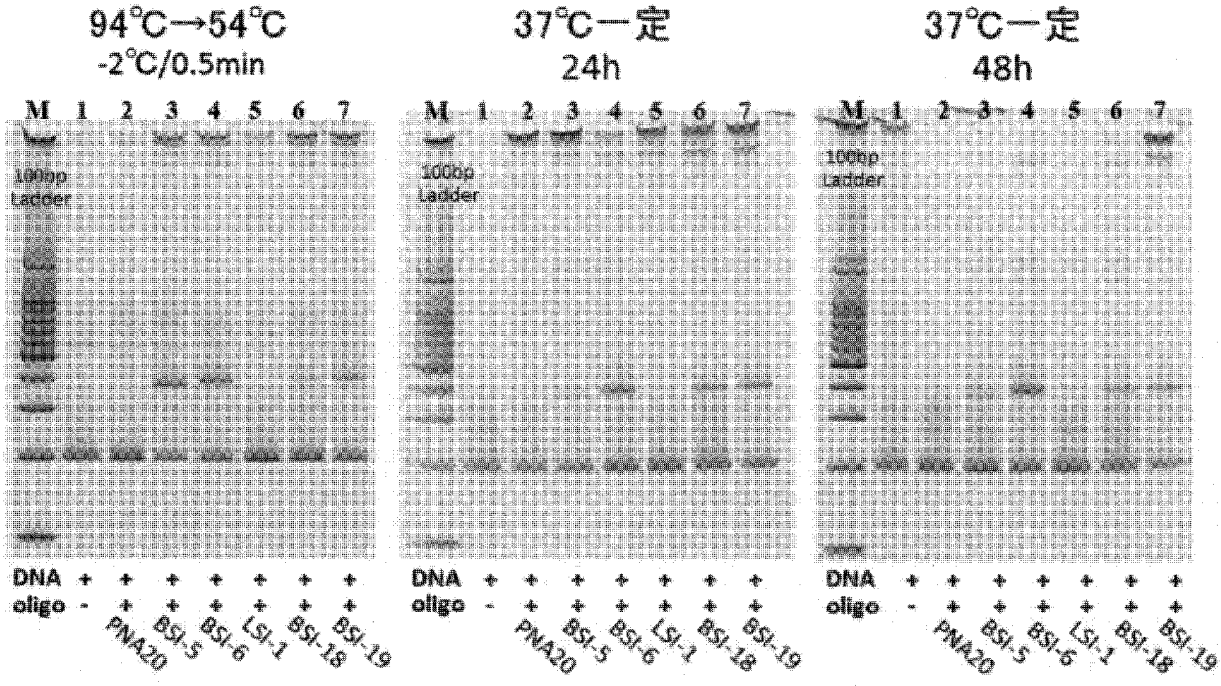
[図7-2]


94℃→54℃
-2℃/0.5min
37℃一定
24h
37℃一定
48h
T1825C
1 2 3 4 M
100bp Ladder
+ + + + DNA
- + + + oligo
PNA20
BSI-5
BSI-6
T1825G
M 1 2 3 4
100bp Ladder
DNA + + + +
oligo - + + +

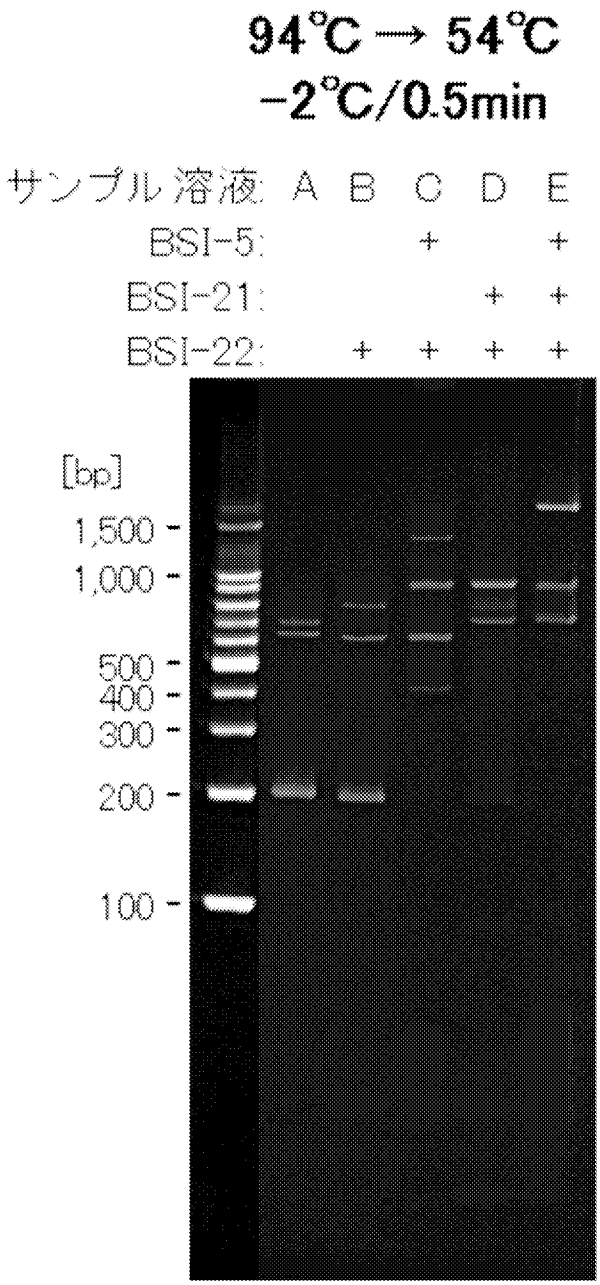
[図8]


94℃→54℃
-2℃/0.5min
37℃一定
2h
37℃一定
24h
1 2 3 4 5 6 7 M
M 1 2 3 4 5 6 7
100bp Ladder
DNA
oligo
PNA20
LSI-1
BSI-5
BSI-11
BSI-6
BSI-12

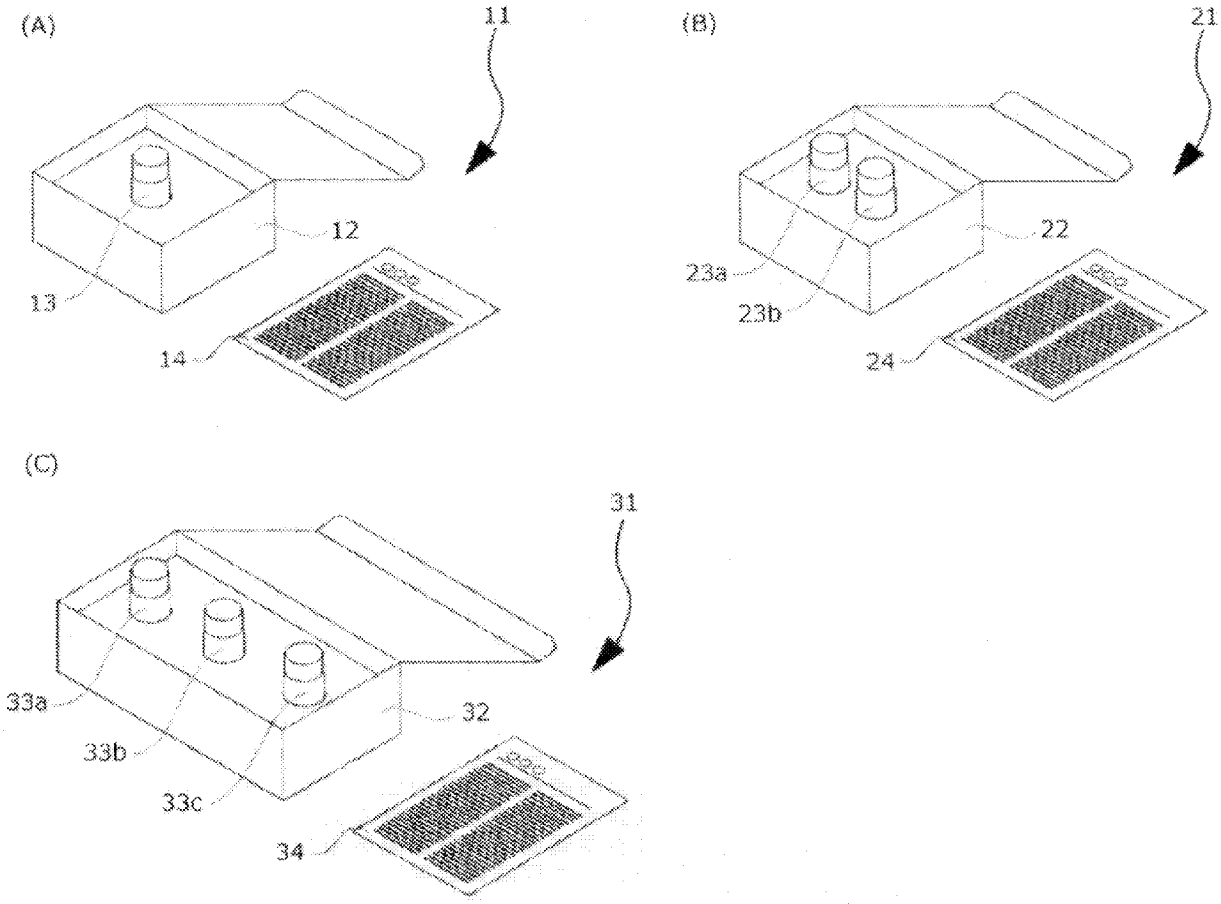
[図9]


94℃→54℃
-2℃/0.5min
37℃一定
24h
37℃一定
48h
M 1 2 3 4 5 6 7
100bp Ladder
DNA
oligo
PNA20
BSI-5
BSI-6
LSI-1
BSI-18
BSI-19

[図10]


94℃ → 54℃
-2℃/0.5min
サンプル溶液: A B C D E
BSI-5: + +
BSI-21: + +
BSI-22: + + + +
[bp]
1,500
1,000
500
400
300
200
100

[図11]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2020/014332

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl. A61K48/00(2006.01)i, A61P31/00(2006.01)i, A61P31/12(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C07H19/067(2006.01)i, C07H19/167(2006.01)i, C07H21/02(2006.01)i, C12N15/11(2006.01)i, C12N15/113(2010.01)i, C12Q1/6844(2018.01)i, C12Q1/6876(2018.01)i, A61K31/7088(2006.01)i

FI: C07H19/067 CSP, C07H19/167, A61K48/00, A61P35/00, A61P31/00, A61P31/12, C12N15/113 Z, C12Q1/6844 Z, C12Q1/6876 Z, C07H21/02, C12N15/11 Z, A61K31/7088 ZNA

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)

Int. Cl. A61K48/00, A61P31/00, A61P31/12, A61P35/00, C07H19/067, C07H19/167, C07H21/02, C12N15/11, C12N15/113, C12Q1/6844, C12Q1/6876, A61K31/7088

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

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2020
Registered utility model specifications of Japan	1996-2020
Published registered utility model applications of Japan	1994-2020

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2016-518826 A (MIRAGEN THERAPEUTICS, INC.) 30 June 2016, entire text	1-21
A	WO 2017/047097 A1 (THE UNIVERSITY OF TOKYO) 23 March 2017, entire text	1-21
A	RAHMAN, S. M. et al., Design, Synthesis, and Properties of 2', 4'-BNANC: A Bridged Nucleic Acid Analogue, Journal of the American Chemical Society, 2008, vol. 130, no. 14, pp. 4886-4896 fig. 1, scheme 1, 3	1-21

☐ 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	Date of mailing of the international search report
13.05.2020	26.05.2020

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2020/014332

Patent Documents referred to in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
JP 2016-518826 A	30.06.2016	US 2016/0010090 A1 WO 2014/145356 A1 EP 2970968 A1 KR 10-2015-0131365 A CN 105189751 A	
WO 2017/047097 A1	23.03.2017	US 2018/0223281 A1 EP 3351632 A1	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2020/014332

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

A61K 48/00(2006.01)i; A61P 31/00(2006.01)i; A61P 31/12(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; C07H 19/067(2006.01)i; C07H 19/167(2006.01)i; C07H 21/02(2006.01)i; C12N 15/11(2006.01)i; C12N 15/113(2010.01)i; C12Q 1/6844(2018.01)i; C12Q 1/6876(2018.01)i; A61K 31/7088(2006.01)i
FI: C07H19/067 CSP; C07H19/167; A61K48/00; A61P35/00; A61P31/00; A61P31/12; C12N15/113 Z; C12Q1/6844 Z; C12Q1/6876 Z; C07H21/02; C12N15/11 Z; A61K31/7088 ZNA

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（ＩＰＣ））

A61K48/00; A61P31/00; A61P31/12; A61P35/00; C07H19/067; C07H19/167; C07H21/02; C12N15/11; C12N15/113; C12Q1/6844; C12Q1/6876; A61K31/7088

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	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０２０年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２０年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２０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）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/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	関連する請求項の番号
A	JP 2016-518826 A（ミラゲン　セラピューティクス，　インコーポレイテッド）30.06.2016 (2016-06-30) 全文	1-21
A	WO 2017/047097 A1（国立大学法人　東京大学）23.03.2017 (2017-03-23) 全文	1-21
A	RAHMAN,S.M. et al, Design, Synthesis, and Properties of 2',4'-BNANC: A Bridged Nucleic Acid Analogue, Journal of the American Chemical Society, 2008, Vol.130, No.14, pp.4886-4896 Figure 1, Scheme 1,3	1-21

☐ 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抵触するものではなく、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	国際調査報告の発送日
13.05.2020	26.05.2020

名称及びあて先
日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

権限のある職員（特許庁審査官）
三上　晶子 4P 4042
電話番号 03-3581-1101 内線 3492

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2020/014332

第Ⅰ欄　　ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第１ページの１．ｃの続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

a. ☑ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
　☑ 附属書C/ST.25テキストファイル形式
　☐ 紙形式又はイメージファイル形式

b. ☐ 国際出願とともに、ＰＣＴ規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表

c. ☐ 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
　☐ 附属書C/ST.25テキストファイル形式(ＰＣＴ規則13の3.1(a))
　☐ 紙形式又はイメージファイル形式（ＰＣＴ規則13の3.1(b)及びＰＣＴ実施細則第713号）

2. ☐ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見:

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2020/014332

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2016-518826 A	30.06.2016	US 2016/0010090 A1	
		WO 2014/145356 A1	
		EP 2970968 A1	
		KR 10-2015-0131365 A	
		CN 105189751 A	
WO 2017/047097 A1	23.03.2017	US 2018/0223281 A1	
		EP 3351632 A1	