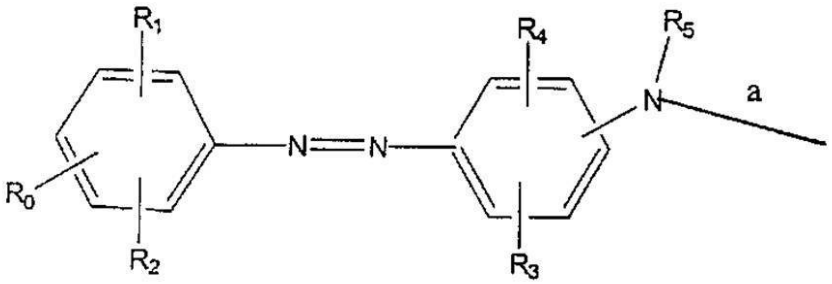
【公報種別】特許法第１７条の２の規定による補正の掲載
【部門区分】第１部門第１区分
【発行日】平成20年2月7日(2008.2.7)

【公表番号】特表2003-516163(P2003-516163A)
【公表日】平成15年5月13日(2003.5.13)
【出願番号】特願2001-544376(P2001-544376)
【国際特許分類】
Ｃ１２Ｎ　15/09　(2006.01)
Ｃ０７Ｈ　21/04　(2006.01)
Ｃ１２Ｑ　 1/68　(2006.01)
【ＦＩ】
Ｃ１２Ｎ　15/00　A
Ｃ０７Ｈ　21/04　B
Ｃ１２Ｑ　 1/68　A

【手続補正書】
【提出日】平成19年12月6日(2007.12.6)
【手続補正１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】特許請求の範囲
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】　次の式を有するオリゴヌクレオチド接合体、
ＦＬ－ＯＤＮ－Ｑ
ここで、ＯＤＮはオリゴヌクレオチド又は核酸、
ＦＬは、０～約３０原子の長さを有するリンカを介して前記ＯＤＮに共有結合付着されたフルオロフォア部分、そして
Ｑは、０～約３０原子の長さを有するリンカを介して前記ＯＤＮに共有結合付着されたクエンチャ部分であり、当該クエンチャ部分は下記の構造を有する、
【化１】

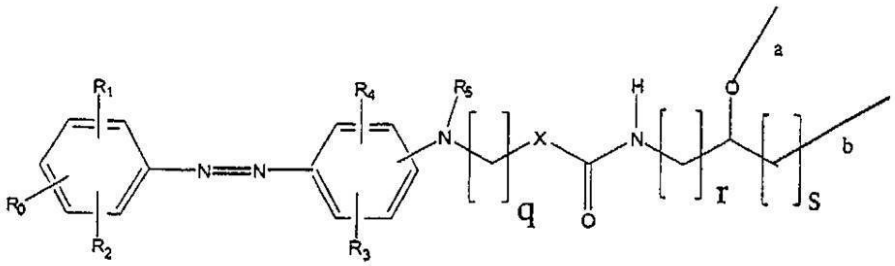


ここで、R_0，R_1，R_2，R_3及びR_4は、それぞれ独立的に、－Ｈ、ハロゲン、ｎ＝０～５である－Ｏ（CH_2）$_n$$CH_3$，－（$CH_2$）$_n$$CH_3$、－$NO_2$，－$SO_3$，ｎ′＝０～５である－Ｎ［（$CH_2$）$_n$′$CH_3$］$_2$、又は－ＣＮ、及び$R_5$＝－Ｈ、ｎ＊＝１～２０であり、$X_2$はＨ、ジメトキシトリチル、メトキシトリチル、トリチル、酸不安定性ブロッキング基である－（CH_2）$_{n*}$－OX_2、又はｎ′′＝０～５である－（CH_2）$_n$′′CH_3、そして、前記クエンチャ部分は、ａによって表わされる原子価結合を介して前記リンカに付着している。

【請求項２】　請求項１のオリゴヌクレオチド接合体であって、R_0はＨ，R_1はベンゼン核の４位のNO_2、R_2はベンゼン核の２位のＨ又はＣｌ，そしてR_3及びR_4は水素であり、R_5はエチルである。

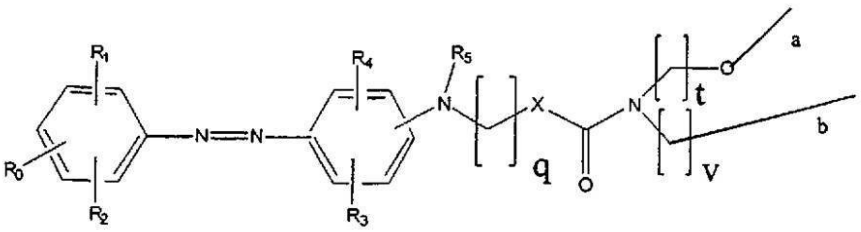
【請求項３】　請求項１のオリゴヌクレオチド接合体であって、前記クエンチャ部分と、それを前記ＯＤＮに付着する前記リンカとは、下記の式Ｑ－１，Ｑ－２，Ｑ－３及びＱ３ａに図示された部分から選択される構造を有する、

【化２】



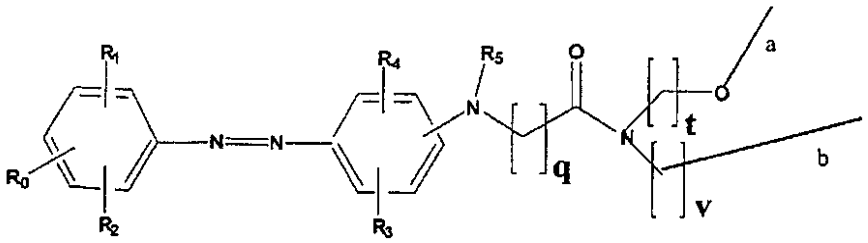
Q-1

【化３】



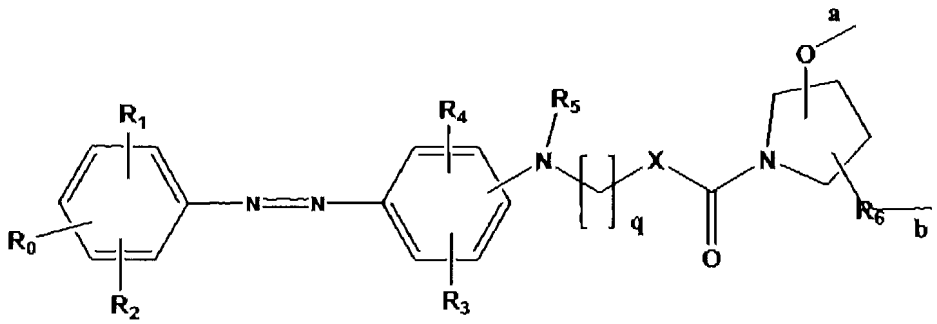
Q-2

【化４】



Q-3

【化８５】



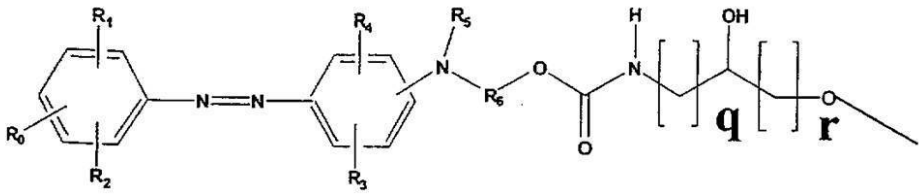
Q3a

ここで、R_6はn^*が１～２０である－（CH_2）$_{n*}$であり，ｑは１～２０，Ｘは－Ｏ－，－ＯＣH_2－又は－CH_2－であり、ｔとｖとは、独立的に、１～２０、ｒとｓは、独立的に１～２０、そして前記接合クエンチャとリンカ部分は、ａ又はｂによって示される原子価結合の一つを介して前記ＯＤＮに付着されている。

【請求項４】　請求項３のオリゴヌクレオチド接合体であって、更に、ａ又はｂによって示される原子価結合の一つを介して前記クエンチャ－リンカ接合体に付着する小溝バインダ部分を有する。

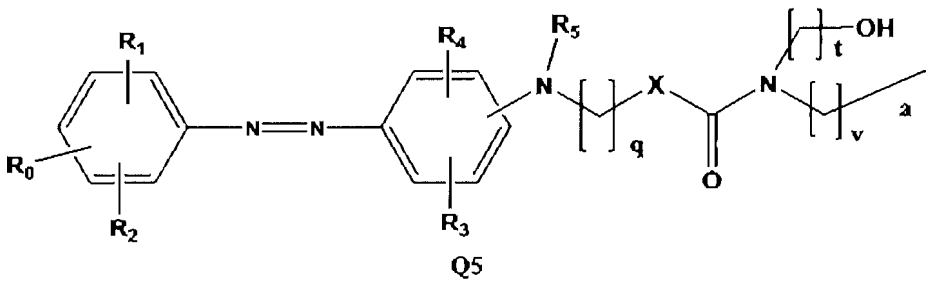
【請求項５】　請求項１のオリゴヌクレオチド接合体であって、前記クエンチャ部分と、それを前記ＯＤＮに付着するリンカとは、下記の式Ｑ－４及びＱ－５に図示された部分から選択される構造を有する、

【化５】



Q-4

【化６】

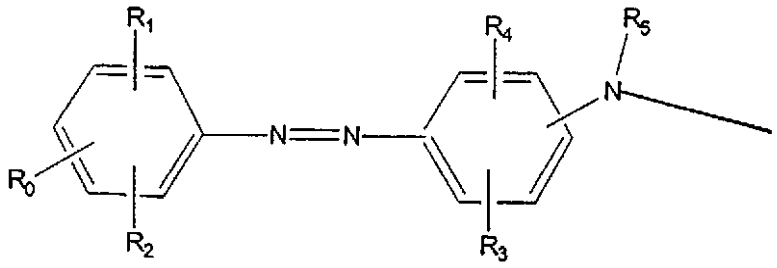


Q5

ここで、R_6はn^*は１～２０である－（CH_2）$_{n*}$であり、ｑ,ｒ,ｔおよびｖは、独立的に、１～２０、そして前記クエンチャ部分は、ａによって示される原子価結合を介して前記ＯＤＮに付着されている。

【請求項６】　オリゴヌクレオチド－フルオロフォア－クエンチャ接合体を作成するためのホスホルアミダイト試薬であって、当該試薬は下記の部分

【化７】

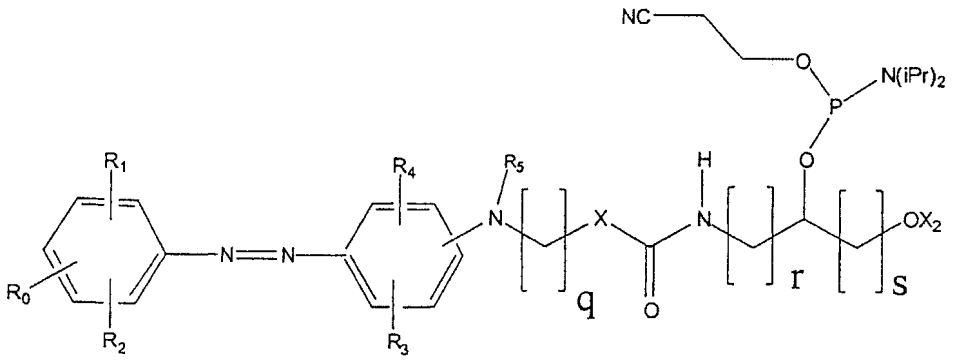


ここで、R_O，R_1，R_2，R_3及びR_4は、それぞれ独立的に、－Ｈ、ハロゲン、ｎ＝０～５である－Ｏ（CH_2）$_n$$CH_3$，－（$CH_2$）$_n$$CH_3$、－$NO_2$，－$SO_3$，ｎ′＝０～５である－Ｎ［（$CH_2$）$_{n'}$$CH_3$］$_2$，又は－ＣＮ、及び$R_5$＝－Ｈ又はｎ′′＝０～５である－（$CH_2$）$_{n''}$$CH_3$、そして、

それに共有結合されたビス（メチルエチル）アミノ］（２－シアノエトキシ）ホスフィノオキシ部分、を有する。

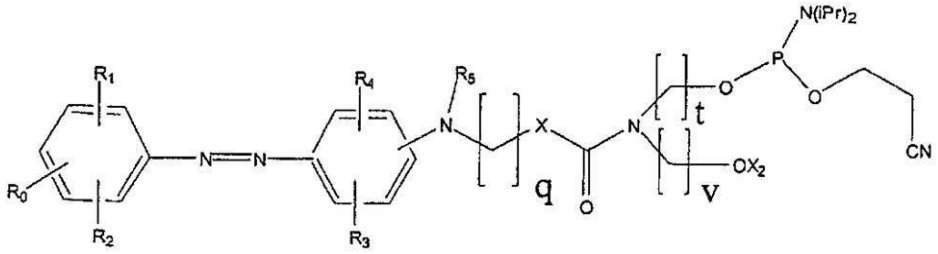
【請求項７】　請求項６のホスホルアミダイト試薬であつて、ＰＡ－１，ＰＡ－２及びＰＡ－３として示された式から成るグループから選択される式を有する、

【化８】



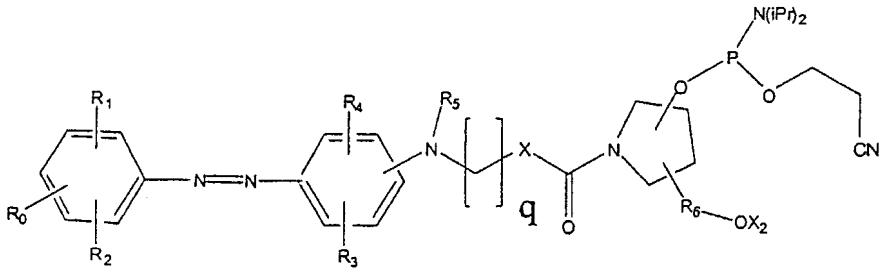
PA-1

【化９】



PA-2

【化１０】



PA-3

ここで、R_O，R_1，R_2，R_3及びR_4は、それぞれ独立的に、－Ｈ、ハロゲン、ｎ＝０～５である－Ｏ（CH_2）$_n$$CH_3$，－（$CH_2$）$_n$$CH_3$、－$NO_2$，－$SO_3$，ｎ′＝０～５である－Ｎ［（$CH_2$）$_n$′$CH_3$］$_2$，又は－ＣＮ、及び$R_5$＝－Ｈ又はｎ′′＝０～５である－（$CH_2$）$_n$′′$CH_3$，$R_6$はｎ*が１～２０である－（$CH_2$）$_{n^*}$であり、ｑは１～２０，Ｘは－Ｏ－又は－$CH_2$－、ｔ，ｖ，ｒ及びｓは、独立的に、１～２０であり、そして、X_2は、Ｈ又はジメトキシトリチル、メトキシトリチル、トリチル又は酸不安定ブロック基である。

【請求項８】　請求項７のホスホルアミダイト試薬であって、ＰＡ－１として示された式を有する。

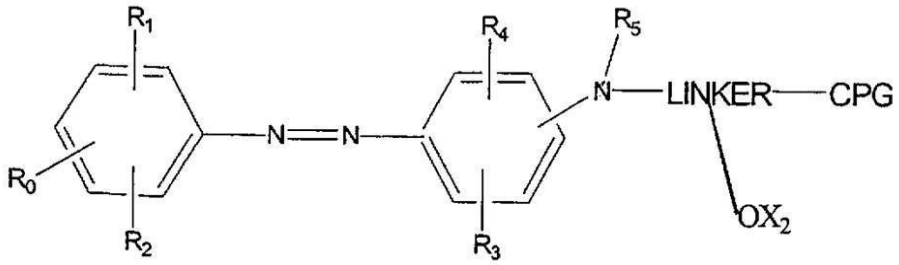
【請求項９】　請求項７のホスホルアミダイト試薬であって、ＰＡ－２として示された式を有する。

【請求項１０】　請求項７のホスホルアミダイト試薬であって、ＰＡ－３として示された式を有する。

【請求項１１】　請求項７のホスホルアミダイト試薬であって、R_0はＨ，R_1はベンゼン核の４位のNO_2、R_2はベンゼン核の２位のＣｌ，そしてR_3及びR_4は水素であり、R_5はエチルである。

【請求項１２】　オリゴヌクレオチド合成に適した、共有結合した固体支持体とクエンチャとの接合体であって、下記の構造を有する、

【化１１】



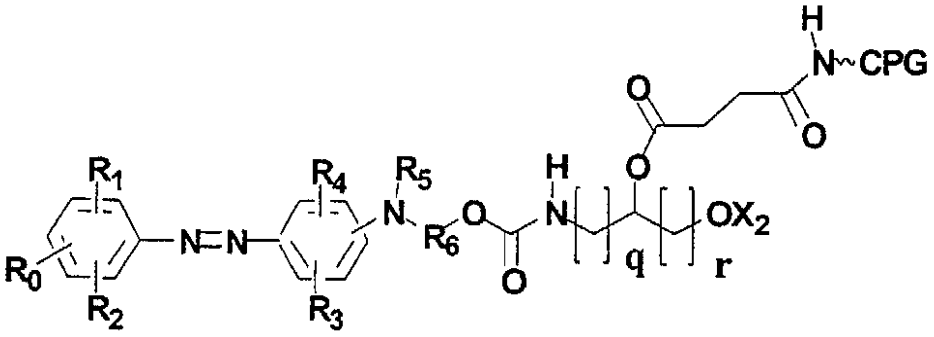
ここで、ＣＰＧは、ポリマ固体支持体を示し、

リンカは、１～約３０原子の長さを有し、ジフェニルアゾ部分を前記ＣＰＧに結合する部分、

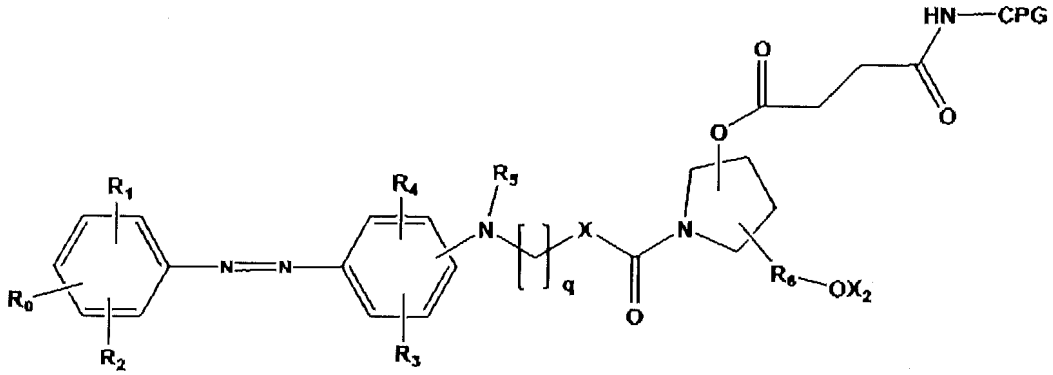
X_2は、ＯＨ又はジメトキシトリチル、メトキシトリチル、トリチル又は酸不安定ブロック基、　R_O，R_1，R_2，R_3及びR_4は、それぞれ独立的に、－Ｈ、ハロゲン、ｎ＝０～５である－Ｏ（CH_2）$_n$$CH_3$，－（$CH_2$）$_n$$CH_3$、－$NO_2$，－$SO_3$，ｎ′＝０～５である－Ｎ［（$CH_2$）$_n$′$CH_3$］$_2$又は－ＣＮであり、$R_5$＝－Ｈ又はｎ′′＝０～５である－（$CH_2$）$_n$′′$CH_3$である。

【請求項１３】　請求項１２の共有結合した固体支持体とクエンチャとの接合体であって、下記の構造から選択される構造を有する、

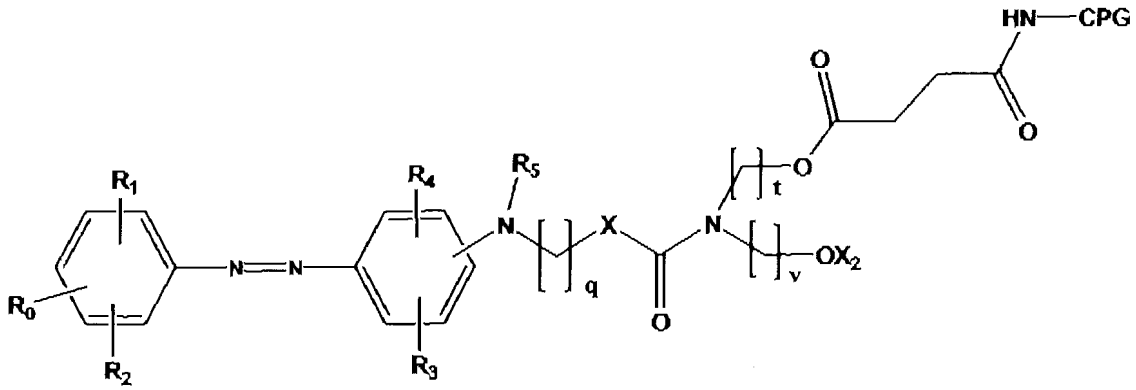
【化１２】



【化８６】



【化１３】



ここで、R_6はn^*が１～２０である－（CH_2）$_{n^*}$であり、そしてｑ，ｒ，ｔ及びｖは、独立的に、１～２０である。

【請求項１４】　請求項１３の共有結合した固体支持体とクエンチャとの接合体であって、R_0はＨ，R_1はベンゼン核の４位のNO_2、R_2はベンゼン核の２位のＣｌ，そしてR_5はエチルである。

【請求項１５】　次の式を有するオリゴヌクレオチド接合体、

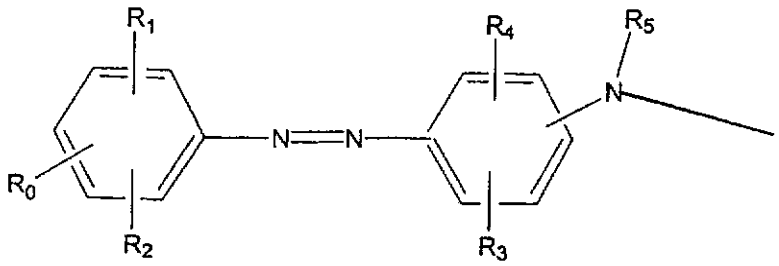
ＦＬ－ＯＤＮ－Ｑ－ＭＧＢ

ここで、ＯＤＮはオリゴヌクレオチド又は核酸、

ＦＬは、０～約３０原子の長さを有するリンカを介して前記ＯＤＮに共有結合付着されたフルオロフォア、そして

Ｑは、０～約３０原子の長さを有するリンカを介して前記ＯＤＮに共有結合付着されたクエンチャ部分であり、当該クエンチャ部分は下記の構造を有する、

【化１４】

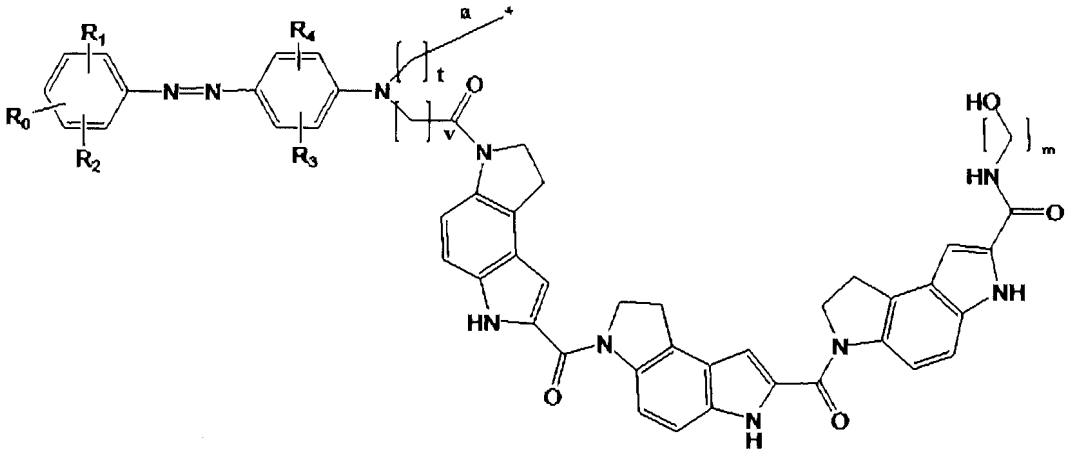


ここで、R_0，R_1，R_2，R_3及びR_4は、それぞれ独立的に、－Ｈ、ハロゲン、ｎ＝０～５である－Ｏ（CH_2）$_n$$CH_3$，－（$CH_2$）$_n$$CH_3$、－$NO_2$，－$SO_3$，ｎ′＝０～５である－Ｎ［（$CH_2$）$_n$′$CH_3$］$_2$又は－ＣＮであり、$R_5$＝－Ｈ又はｎ′′＝０～５である－（$CH_2$）$_n$′′$CH_3$であり、そして、

ＭＧＢは、０～約３０原子の長さを有するリンカを介して、前記ＯＤＮ部分又は前記クエンチャ部分に共有結合付着された小溝バインダ部分である。

【請求項１６】　請求項１５のオリゴヌクレオチド接合体であって、前記ＭＧＢ部分は前記クエンチャ部分に付着し、前記共有結合ＭＧＢ－Ｑ部分は以下の構造を有する、

【化１５】

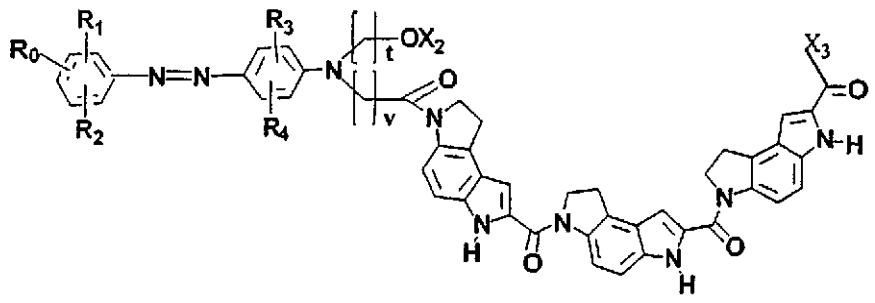


ここで、ｔとｖとは、独立的に１～２０であって、ａによって示される原子価結合が前記ＭＧＢ－Ｑ部分を前記ＯＤＮ部分に付着させている。

【請求項１７】　請求項１６のオリゴヌクレオチド接合体であって、R_0はＨ，R_1はベンゼン核の４位のNO_2、R_2はベンゼン核の２位のＨ又はＣｌ，そしてR_3及びR_4は水素である。

【請求項１８】　オリゴヌクレオチド合成用の、共有結合した小溝バインダ・クエンチャ試薬であって、以下の構造を有する、

【化１６】



ここで、R_0，R_1，R_2，R_3及びR_4は、それぞれ独立的に、－Ｈ、ハロゲン、ｎ＝０～５である－Ｏ（CH_2）$_n$$CH_3$，－（$CH_2$）$_n$$CH_3$－$NO_2$，－$SO_3$，ｎ′＝０～５である－Ｎ［（$CH_2$）$_{n'}$$CH_3$］$_2$又は－ＣＮであり、そしてｔとｖとは、独立的に１～２０である、

X_2は、Ｈ又はジメトキシトリチル、メトキシトリチル、トリチル又は酸不安定ブロック基、そして

X_3は、ペンタフルオロフェニルオキシ、又はＮＨ－ＬＩＮＫＥＲ－ＣＰＧ又はＯ－ＬＩＮＫＥＲ－ＣＰＧであり、ここで、ＣＰＧはポリマ固体支持体であり、リンカは約０～３０原子の長さを有し前記三環性部分を前記ＣＰＧに結合する結合部分である。

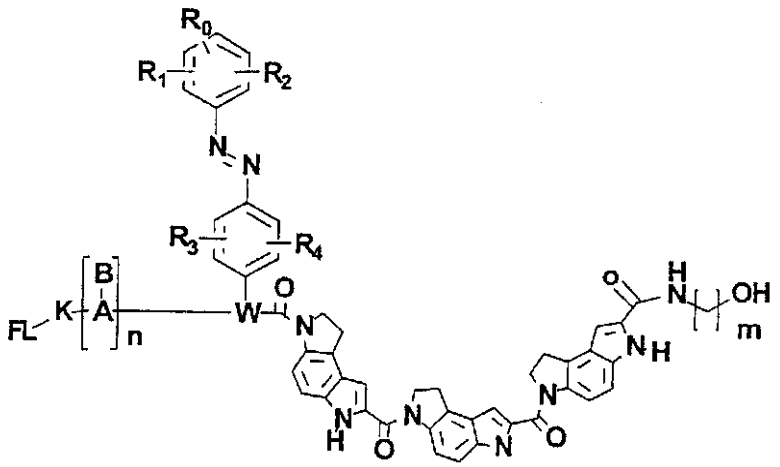
【請求項１９】　請求項１８の共有結合した小溝バインダ・クエンチャ試薬であって、X_3はペンタフルオロフェニルオキシである。

【請求項２０】　請求項１８の共有結合した小溝バインダ・クエンチャ試薬であって、X_3は、ＮＨ－ＬＩＮＫＥＲ－ＣＰＧ又はＯ－ＬＩＮＫＥＲ－ＣＰＧである。

【請求項２１】　請求項１８の共有結合した小溝バインダ・クエンチャ試薬であって、R_0はＨ，R_1はベンゼン核の４位のNO_2、R_2はベンゼン核の２位のＨ又はＣｌ，そしてR_3及びR_4は水素であり、ｖ＝ｔ＝３である。

【請求項２２】　下記の式のオリゴヌクレオチド接合体、

【化２１】



ここで、R_0，R_1，R_2，R_3及びR_4は、それぞれ独立的に、－Ｈ、ハロゲン、n^*＝０～５である－Ｏ（CH_2）$_{n^*}$$CH_3$，－（$CH_2$）$_{n^*}$$CH_3$、－$NO_2$，－$SO_3$，ｎ′＝０～５である－Ｎ［（$CH_2$）$_{n'}$$CH_3$］$_2$、又は－ＣＮ、　ＦＬは、約３００～約８００ｎｍの帯域の発光波長を有するフルオロフォア部分、

Ｋは、Ｃ，Ｏ，Ｎ，Ｓ，Ｐ及びＨから成るグループから選択される１～約３０原子を含むリンカ、

［Ａ－Ｂ］$_n$は、ＯＤＮ，ＤＮＡ，ＲＮＡ又はＰＮＡ或いはそれらの組み合わせを示し、ここで、Ａは、糖とリン酸とが独立的に修飾され得る糖リン酸骨格鎖、Ｂは、複素環塩基、ここで、Ｂは、独立的に、プリン、ピリミジン、ピラゾロ［３，４－ｄ］ピリミジン、７－置換ピラゾロ［３，４－ｄ］ピリミジン－，７－デアザプリン、７－置換　７－デアザプリン、及び修飾プリン－及びピリミジン－塩基であり、ＤＮＡ，ＲＮＡ，ＰＮＡ又はＯＤＮは、これらの塩基のすべての組み合わせを含むことができる、そして

ｎは、前記ＤＮＡ，ＲＮＡ，ＰＮＡ又はＯＤＮのヌクレオチド単位の数、

Ｗは、Ｃ，Ｏ，Ｎ，Ｓ，Ｐ及びＨから成るグループから選択される０～約３０原子の長さのリンカ、そして

ｍは、１～２０の値を有する整数である。

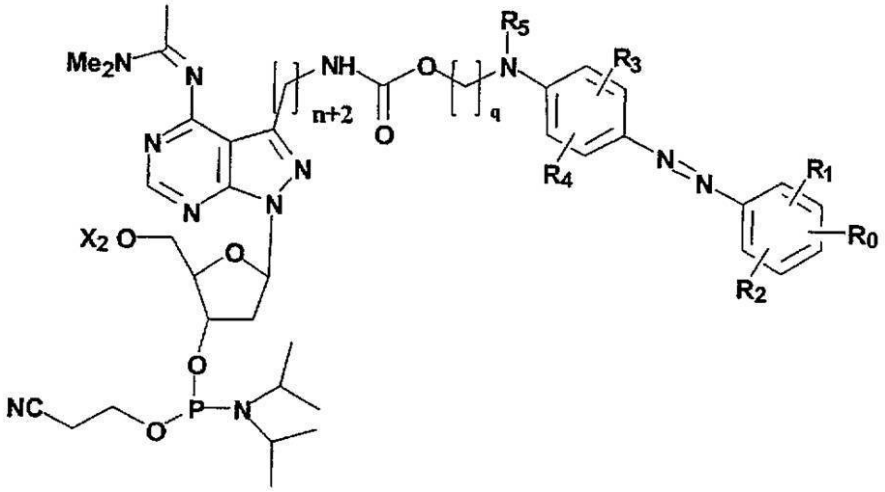
【請求項２３】　請求項２２のオリゴヌクレオチド接合体であって、R_0はＨ，R_1は

ベンゼン核の４位のNO_2、R_2はベンゼン核の２位のＨ又はＣｌ，そしてR_3及びR_4は水素である。

【請求項２４】 請求項２２のオリゴヌクレオチド接合体であって、前記フルオロフォア部分は約３００～約８００ｎｍの発光波長を有する、

【請求項２５】 オリゴヌクレオチド－フルオロフォア－クエンチャ接合体を作成するためのホスホルアミダイト試薬であって、当該試薬は下記の式を有する、

【化２８】



ここで、R_0，R_1，R_2，R_3及びR_4は、それぞれ独立的に、－Ｈ、ハロゲン、$n^*=0$～５である－Ｏ（CH_2）$_{n^*}CH_3$，－（CH_2）$_{n^*}CH_3$、－NO_2，－SO_3，$n'=0$～５である－Ｎ［（CH_2）$_{n'}CH_3$］$_2$、又は－ＣＮ、そして

R_5＝－Ｈ又は$n''=0$～５である－（CH_2）$_{n''}CH_3$であり、

ｎは１～１０、

ｑは１～２０、そして

X_2は、Ｈ又はジメトキシトリチル、メトキシトリチル、トリチル又は酸不安定ブロック基である。

【請求項２６】 請求項２５のホスホルアミダイト試薬であって、R_0はＨ，R_1はベンゼン核の４位のNO_2、R_2はベンゼン核の２位のＣｌ，そしてR_3及びR_4は水素、R_5はエチル、ｎは１、そしてｑは２である。

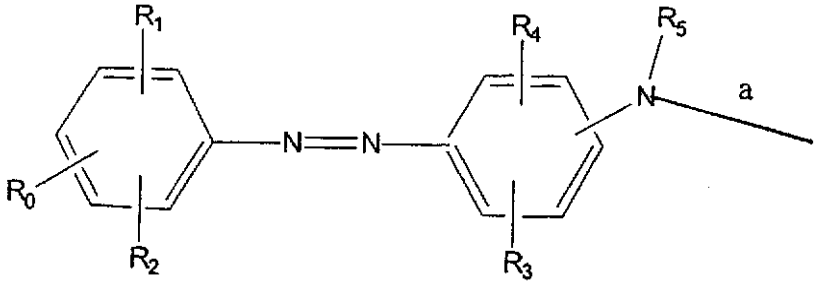
【請求項２７】 核酸をハイブリダイズする方法であって、以下の工程を有する、

（ａ）第１核酸と第２核酸を提供する、

（ｂ）前記両核酸をハイブリダイゼーション条件下でインキュベートする、そして

（ｃ）ハイブリダイズした核酸を同定する、ここで、前記核酸の少なくとも一つは、ＦＬ－核酸－Ｑ接合体を有し、ここでＦＬは、０～約３０原子の長さを有するリンカを介して前記核酸に共有結合付着されたフルオロフォア部分、そして、Ｑは、０～約３０原子の長さを有するリンカを介して前記核酸に共有結合付着されたクエンチャ部分であり、当該クエンチャ部分は下記の構造を有する、

【化３５】



ここで、R_O，R_1，R_2，R_3及びR_4は、それぞれ独立的に、－Ｈ、ハロゲン、ｎ＝０～５である－Ｏ（CH_2）$_n$$CH_3$，－（$CH_2$）$_n$$CH_3$、－$NO_2$，－$SO_3$，ｎ′＝０～５である－Ｎ［（$CH_2$）$_{n'}$$CH_3$］$_2$又は－ＣＮ、そして$R_5$＝－Ｈ又はｎ′′＝０～５である－（$CH_2$）$_{n''}$$CH_3$であり、そして、前記クエンチャ部分は、ａによって表わされる原子価結合を介して前記リンカに付着されている。

【請求項２８】　請求項２７の方法であって、前記クエンチャ部分の式Ｑにおいて、R_0はＨ，R_1はベンゼン核の４位のNO_2、R_2はベンゼン核の２位のＣｌ，そしてR_3及びR_4は水素であり、R_5はエチルである。

【請求項２９】　単一のヌクレオチドが異なるポリヌクレオチド間を識別する方法であって、当該方法は下記の工程を有する、

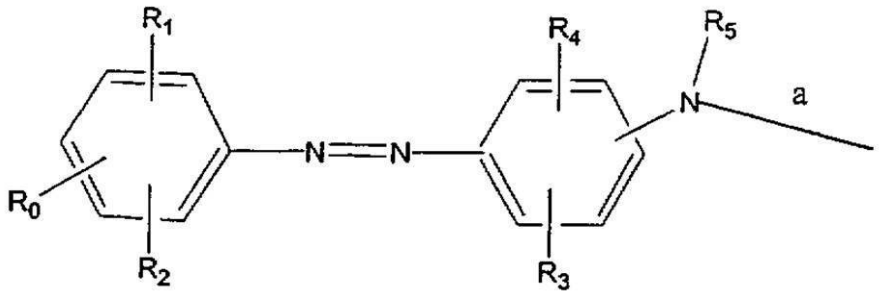
（ａ）標的配列を有するポリヌクレオチドを提供する、

（ｂ）少なくとも二つのＦＬ－ＯＤＮ－Ｑ接合体を提供する、ここで、ＯＤＮはオリゴヌクレオチド部分を示す、前記少なくとも二つのＦＬ－ＯＤＮ－Ｑ接合体の一方は、前記標的配列に対して完全に相補的な配列を有し、前記少なくとも二つのＦＬ－ＯＤＮ－Ｑ接合体の他方は、前記標的配列に対して単一のヌクレオチドミスマッチを有する、

（ｃ）ハイブリダイゼーション条件下で、前記ＦＬ－ＯＮＤ－Ｑ接合体のそれぞれを、別々に、前記ポリヌクレオチドとインキュベートする、そして

（ｄ）前記ＦＬ－ＯＤＮ－Ｑのそれぞれと前記ポリヌクレオチドとの間のハイブリダイゼーション強度を測定する、ここでＦＬは、０～約３０原子の長さを有するリンカを介して前記核酸に共有結合付着されたフルオロフォア部分であり、そしてＱは、０～約３０原子の長さを有するリンカを介して前記核酸に共有結合付着されたクエンチャ部分であり、当該クエンチャ部分は下記の構造を有する、

【化３９】



ここで、R_O，R_1，R_2，R_3及びR_4は、それぞれ独立的に、－Ｈ、ハロゲン、ｎ＝０～５である－Ｏ（CH_2）$_n$$CH_3$，－（$CH_2$）$_n$$CH_3$、－$NO_2$，－$SO_3$，ｎ′＝０～５である－Ｎ［（$CH_2$）$_{n'}$$CH_3$］$_2$又は－ＣＮ、及び$R_5$＝－Ｈ又はｎ′′＝０～５である－（$CH_2$）$_{n''}$$CH_3$であり、そして、前記クエンチャ部分は、ａによって表わされる原子価結合を介して前記リンカに付着されている。

【請求項３０】　請求項２９の方法であって、前記クエンチャ部分の式Ｑにおいて、R_0はＨ，R_1はベンゼン核の４位のNO_2、R_2はベンゼン核の２位のＣｌ，そしてR_3及

びR$_4$は水素であり、R$_5$はエチルである。

【請求項３１】　核酸をハイブリダイズする方法であって、以下の工程を有する、

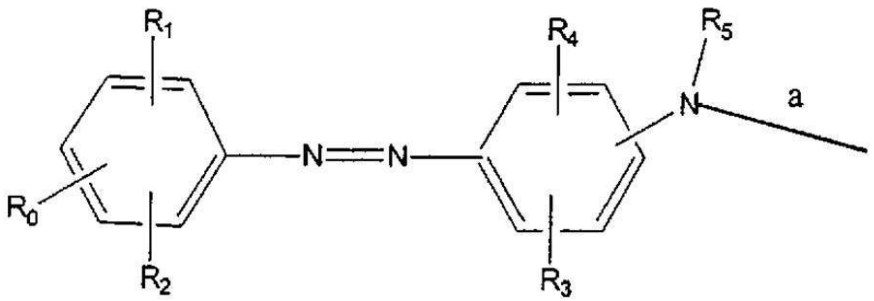
（ａ）第１核酸と第２核酸を提供する、

（ｂ）前記両核酸をハイブリダイゼーション条件下でインキュベートする、そして

（ｃ）ハイブリダイズした核酸を同定する、

ここで、前記核酸の少なくとも一つは、ＦＬ－核酸－Ｑ－ＭＧＢ接合体を有し、ＦＬは、０～約３０原子の長さを有するリンカを介して前記核酸に共有結合付着されたフルオロフォアであり、ＭＧＢは、０～約３０原子の長さを有するリンカを介して前記ＯＤＮ部分又はクエンチャ部分に共有結合付着された小溝バインダ部分であり、そして、Ｑは、０～約３０原子の長さを有するリンカを介して前記核酸に共有結合付着されたクエンチャ部分であり、当該クエンチャ部分は下記の構造を有する、

【化４３】



ここで、R$_O$，R$_1$，R$_2$，R$_3$及びR$_4$は、それぞれ独立的に、－Ｈ、ハロゲン、ｎ＝０～５である－Ｏ（ＣＨ$_2$）$_n$ＣＨ$_3$，－（ＣＨ$_2$）$_n$ＣＨ$_3$、－ＮＯ$_2$，－ＳＯ$_3$，ｎ′＝０～５である－Ｎ［（ＣＨ$_2$）$_{n'}$ＣＨ$_3$］$_2$又は－ＣＮ、及びR$_5$＝－Ｈ又はｎ′′＝０～５である－（ＣＨ$_2$）$_{n''}$ＣＨ$_3$であり、そして、前記クエンチャ部分は、ａによって表わされる原子価結合を介して前記リンカに付着されている。

【請求項３２】　核酸をハイブリダイズする方法であって、以下の工程を有する、

（ａ）第１核酸と第２核酸を提供する、

（ｂ）前記両核酸をハイブリダイゼーション条件下でインキュベートする、そして

（ｃ）ハイブリダイズした核酸を同定する、

ここで、前記核酸の少なくとも一つは、ＦＬ－核酸－Ｑ－ＭＧＢ接合体を有し、ここで、ＭＧＢは、０～約３０原子の長さを有するリンカを介して前記ＯＤＮ部分又は前記クエンチャ部分に共有結合付着された小溝バインダ部分、Ｑは、０～約３０原子の長さを有するリンカを介して前記核酸に共有結合付着されたクエンチャ部分、そしてＦＬは、０～約３０原子の長さを有するリンカを介して前記核酸に共有結合付着されたフルオロフォアであり、当該フルオロフォア部分は約３００～約８００ｎｍの発光波長を有する。

【請求項３３】　核酸をハイブリダイズする方法であって、以下の工程を有する、

（ａ）第１核酸と第２核酸を提供する、

（ｂ）前記両核酸をハイブリダイゼーション条件下でインキュベートする、そして

（ｃ）ハイブリダイズした核酸を同定する、

ここで、前記核酸の少なくとも一つは、ＦＬ－ＯＤＮ－Ｑ－ＭＧＢ接合体を有し、ここで、ＯＤＮは核酸又は修飾核酸であり、ＭＧＢは、０～約３０原子の長さを有するリンカを介して前記ＯＤＮ部分又はクエンチャ部分に共有結合付着された小溝バインダ部分、Ｑは、０～約３０原子の長さを有するリンカを介して前記ＯＤＮに共有結合付着されたクエンチャ部分、そしてＦＬは、０～約３０原子の長さを有するリンカを介して前記核酸に共有結合付着されたフルオロフォアであり、当該フルオロフォア部分は約３００～約８００ｎｍの発光波長を有する。

【請求項３４】　核酸をハイブリダイズする方法であって、以下の工程を有する、

（ａ）第１核酸と第２核酸を提供する、

（ｂ）前記両核酸をハイブリダイゼーション条件下でインキュベートする、そして

（ｃ）ハイブリダイズした核酸を同定する、　ここで、前記核酸の少なくとも一つは、ＦＬ－ＯＤＮ－Ｑ接合体を有し、ここで、ＯＤＮは核酸又は修飾核酸であり、Ｑは、０～約３０原子の長さを有するリンカを介して前記ＯＤＮに共有結合付着されたクエンチャ部分、そしてＦＬは、０～約３０原子の長さを有するリンカを介して前記核酸に共有結合付着されたフルオロフォア部分であり、当該フルオロフォア部分は約３００～約８００ｎｍの発光波長を有する。