

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6730982号  
(P6730982)

(45) 発行日 令和2年7月29日(2020.7.29)

(24) 登録日 令和2年7月7日(2020.7.7)

(51) Int. Cl.

F 1

<b>C 0 9 B</b> 31/153 (2006.01)	C 0 9 B	31/153	
<b>C 0 7 D</b> 471/06 (2006.01)	C 0 7 D	471/06	C S P
<b>C 1 2 Q</b> 1/6806 (2018.01)	C 1 2 Q	1/6806	Z N A Z
<b>C 1 2 Q</b> 1/6816 (2018.01)	C 1 2 Q	1/6816	Z N A Z
<b>C 0 7 H</b> 19/073 (2006.01)	C 0 7 H	19/073	

請求項の数 16 (全 54 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-511571 (P2017-511571)  
 (86) (22) 出願日 平成27年5月11日 (2015.5.11)  
 (65) 公表番号 特表2017-524793 (P2017-524793A)  
 (43) 公表日 平成29年8月31日 (2017.8.31)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2015/030097  
 (87) 国際公開番号 W02015/172134  
 (87) 国際公開日 平成27年11月12日 (2015.11.12)  
 審査請求日 平成30年4月27日 (2018.4.27)  
 (31) 優先権主張番号 61/990, 913  
 (32) 優先日 平成26年5月9日 (2014.5.9)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関  
 米国 (US)

(73) 特許権者 516333997  
 バイオサーチ テクノロジーズ, インコー  
 ポレーテッド  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 949  
 54-6904, ペタルマ, 2199 サ  
 ウス マクダウェル プレバード  
 (74) 代理人 100091683  
 弁理士 ▲吉▼川 俊雄  
 (74) 代理人 100179316  
 弁理士 市川 寛奈  
 (72) 発明者 レディントン, マーク  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 941  
 18, サンフランシスコ, アパートメント  
 102, 395 ユークリッド アヴェ  
 ニュー

最終頁に続く

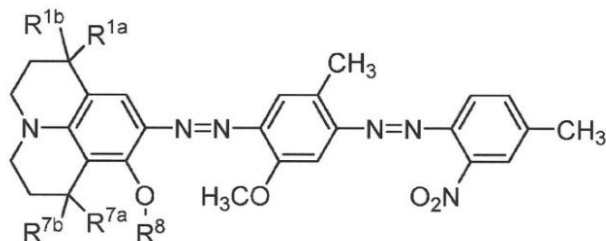
(54) 【発明の名称】 コスミッククエンチャー

(57) 【特許請求の範囲】

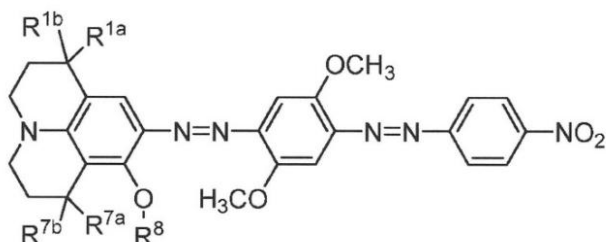
【請求項1】

式 I または II に従った構造を有する化合物であって：

【化1】



式 I



式 II

R<sup>1a</sup> と、R<sup>1b</sup> と、R<sup>7a</sup> と、R<sup>7b</sup> とは、H、置換または非置換のアルキル、置換

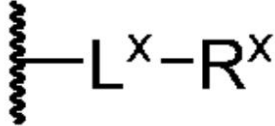
または非置換のシクロアルキル、置換または非置換のヘテロアルキル、及び、置換または非置換のヘテロシクロアルキルから、別々に選択され；

$R^{1a}$ と $R^{1b}$ とは、これらに結合される炭素原子と共に、任意に接合され、置換または非置換のC3～C7シクロアルキルと、置換または非置換の3～7員ヘテロシクロアルキルとから選択される部材である環を生成し；

$R^{7a}$ と $R^{7b}$ とは、これらに結合される炭素原子と共に、任意に接合され、置換または非置換のC3～C7シクロアルキルと、置換または非置換の3～7員ヘテロシクロアルキルとから選択される部材である環を生成し； $R^{1a}$ 、 $R^{1b}$ 、 $R^{7a}$ 及び $R^{7b}$ の少なくとも一つは、Hではなく、 $R^8$ は、H、

【化2】

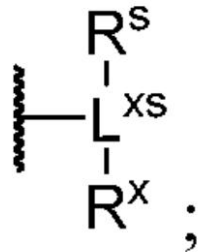
10



及び

【化3】

20



から選択され、

$L^X$ は、結合、置換または非置換のアルキル、置換または非置換のシクロアルキル、置換または非置換のヘテロアルキル、及び置換または非置換のヘテロシクロアルキルから選択され、

30

$L^{XS}$ は、置換または非置換のアルキル、置換または非置換のシクロアルキル、置換または非置換のヘテロアルキル、及び置換または非置換のヘテロシクロアルキルから選択され、

$R^S$ は、反応性官能基、結合部位、及び固体担持体から選択され、

$R^X$ は、反応性官能基、及び結合部位から選択され、それぞれの結合部位は、ヌクレオシド、ヌクレオシドへのリンカー、ヌクレオチド、ヌクレオチドへのリンカー、オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチドへのリンカー、核酸、核酸へのリンカー、キャリア分子、キャリア分子へのリンカー、固体担持体、及び固体担持体へのリンカーから、独立して選択される部材に共有結合される、前記化合物。

40

【請求項2】

$R^{1a}$ と、 $R^{1b}$ と、 $R^{7a}$ と、 $R^{7b}$ とが、独立して、非置換のC1、C2、C3、C4、C5及びC6アルキルから選択される、請求項1に記載の化合物。

【請求項3】

$R^{1a}$ と、 $R^{1b}$ と、 $R^{7a}$ と、 $R^{7b}$ とがそれぞれ、メチルである、請求項2に記載の化合物。

【請求項4】

$R^{7a}$ と $R^{7b}$ とがそれぞれ、Hである、請求項1に記載の化合物。

【請求項5】

$L^X$ が、非置換のC1、C2、C3、C4、C5、C6、C7、C8、C9及びC10

50

アルキルから選択される、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 6】

$L^{x5}$  が、置換ヘテロアルキルである、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 7】

$R^x$  が、ホスホラミダイトと、 $-OH$ と、 $-ODMT$ と、 $-COOH$ と、活性エステルと、 $-NH_2$ とから選択される、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 8】

$R^s$  が、 $-OH$ と、 $-ODMT$ と、固体担持体へのリンカーに共有結合的に結合する結合部位と、から選択される、請求項 1 ~ 4 及び 6 のいずれかに記載の化合物。

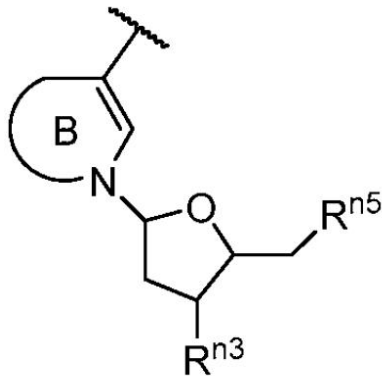
【請求項 9】

$R^x$  が、ホスホラミダイトと、 $-OH$ と、 $-ODMT$ と、 $-COOH$ と、活性エステルと、 $-NH_2$ とから選択される、請求項 8 に記載の化合物。

【請求項 10】

$R^x$  が、ヌクレオシドへのリンカーに共有結合される結合部位であり、前記ヌクレオシドが、以下の構造を有し：

【化 4】



環標識 B が、核酸塩基であり；

$R^{n3}$  が、 $-OH$ またはホスホラミダイトであり；

$R^{n5}$  が、 $-OH$ または $-ODMT$ である、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 11】

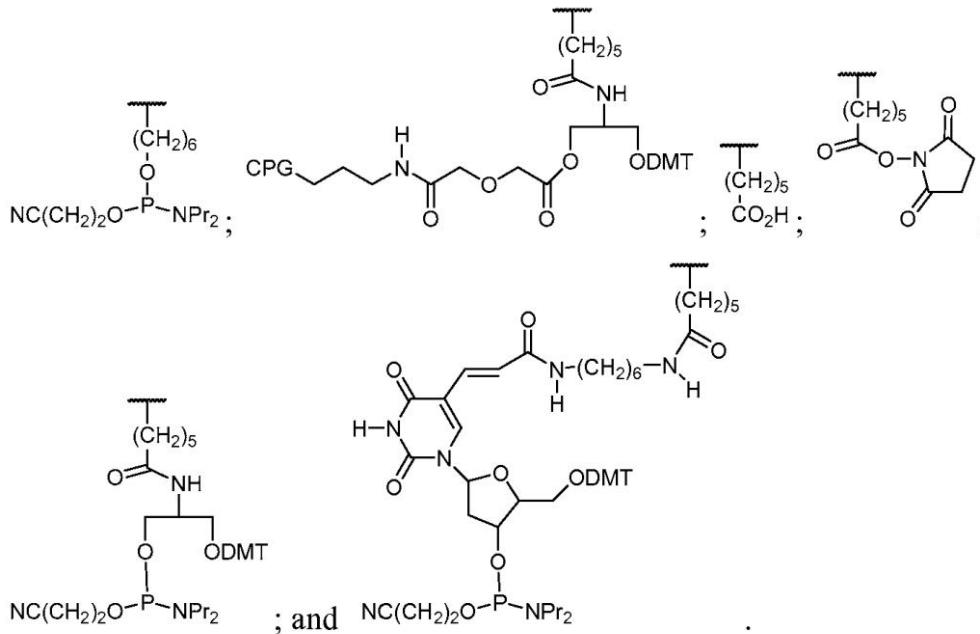
$R^8$  が、以下：

10

20

30

## 【化5】



10

から選択される、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の化合物。

## 【請求項 1 2】

20

核酸標的配列を検出する方法であって、前記方法は、以下を備える：

(a) 前記標的配列を検出部核酸に接触させることであって；

一本鎖ターゲット結合シーケンスを備え、前記検出部核酸は、これにリンクされた；

i) 蛍光体；及び

ii) 請求項 1 ~ 6 のいずれかに従った化合物であって、R<sup>8</sup> は、検出部核酸に（直接またはリンカーを通して）共有結合される結合部位を備える、前記化合物、を備え；

前記検出部核酸は、前記蛍光体が励起される際、前記蛍光体と前記化合物との間にドナー・アクセプターエネルギー移動ができるようにする立体構造である、前記標的配列を検出部核酸に接触させること；

(b) 前記ターゲット結合シーケンスを前記標的配列にハイブリダイズし、それにより検出部核酸の立体構造を改質し、蛍光パラメータを変化させること；及び、

30

(c) 前記蛍光パラメータの前記変化を検出し、それにより前記核酸標的配列を検出すること、

を備える、前記方法。

## 【請求項 1 3】

第 1 の核酸と第 2 の核酸とがハイブリダイズするか否かを確認する方法であって、

前記第 1 の核酸は、請求項 1 ~ 6 のいずれかに従った化合物を備え、

R<sup>8</sup> は、（直接またはリンカーを通して）前記第 1 の核酸に共有結合される結合部位を備え、前記方法は：

(a) 前記第 1 の核酸を前記第 2 の核酸に接触させること；及び

40

(b) 前記第 1 の核酸、前記第 2 の核酸及びその組合せから選択される部材の蛍光特性内で変更を検出し、それにより前記ハイブリダイゼーションが発生するか否かを確認すること、

を備える、前記方法。

## 【請求項 1 4】

核酸増幅反応を監視する方法であって、前記方法は：

(a) 検出部核酸を備える増幅反応混合物を調製することであって、それにリンクされた

i) 蛍光体；及び

ii) 請求項 1 ~ 6 のいずれかに従った化合物であって、R<sup>8</sup> は前記検出部核酸に

50

(直接またはリンカーを通して)共有結合で結合される結合部位を備える、前記化合物；を有する、前記増幅反応混合物を調製すること；

(b)増幅反応混合物を増幅条件に従わせること；

(c)検出部核酸からの蛍光信号のために反応混合物を監視して、アッセイ結果を得ること；及び

(d)核酸増幅反応をモニターするためにアッセイ結果を使用すること、を備える、前記方法。

【請求項15】

標的配列の増幅を検出する方法であって、前記方法は：

(a)標的配列の側面に位置したPCRプライマーを有する標的配列を備えるサンプル核酸をハイブリダイズすること； 10

(b)重合酵素でハイブリダイズされたプライマーを拡張してPCR製品を製作し、PCR製品の2鎖を分離して標的配列の知覚及びアンチセンス鎖を利用可能にすること；

(c)検出部核酸を、PCR製品内の標的配列の知覚またはアンチセンス鎖にハイブリダイズすること、ここで、検出部核酸は：

i)PCR製品内の標的配列の知覚またはアンチセンス鎖の少なくとも一部に相補的であり、かつ、PCRプライマーの間の領域にハイブリダイズする、一本鎖ターゲット結合シーケンス；

ii)蛍光体；及び

iii)請求項1～6のいずれかに従った化合物であって、R8は、前記検出部核酸に(直接またはリンカーを通して)共有結合で結合される結合部位を備える、前記化合物； 20  
を備え、

ここで、その標的配列へのハイブリダイゼーションの前に、検出部核酸は、蛍光体が励起される際、蛍光体と化合物との間にドナー・アクセプターエネルギー移動ができるようにする立体構造であり；

それにより、検出部核酸の立体構造を改質して、蛍光パラメータを変化させること；及び

(d)蛍光パラメータの変化を測定して、標的配列及びその増幅を検出すること、を備える、前記方法。 30

【請求項16】

前記活性エステルは、N-ヒドロキシスクシンイミドエステルと、N-ヒドロキシベンズトリアゾールエステルと、チオエステルと、p-ニトロフェニルエステルとから選択される、請求項7または9に記載の化合物。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2014年5月9日に出願の米国仮出願第61/990,913号の利点を、35USC119(e)により主張するものであり、その全体として全ての目的につき 40  
参照によりここに組み込まれる。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0002】

本発明は、励起状態エネルギーのクエンチャー、これらのクエンチャーを含むプローブ及び他の接合体、ならびに、それらの使用方法を提供する。本発明の他の対象、利点及び態様は、下記の詳細説明から明らかになる。

【図面の簡単な説明】

【0003】

【図1】本発明の例示的な化合物を示す図である。 50

【図2】本発明の例示的な化合物の合成を概説する模式図である。

【図3】実時間PCRアッセイにおける、クエーサー670コスミッククエンチャー、クエーサー670-BHQ2、及びクエーサー670-BBQの、プローブに対する増幅微量を示す図である。

【図4】実時間PCRアッセイにおける、クエーサー705コスミッククエンチャー及びクエーサー705-BHQ2の、プローブに対する増幅微量を示す図である。

【図5A】ヌクレアーゼ分解アッセイにおける、クエーサー670コスミッククエンチャー、クエーサー670-BHQ2、クエーサー670-BBQ、クエーサー705コスミッククエンチャー及びクエーサー705-BHQ2の、プローブに対する蛍光強度を示す図である。

10

【図5B】ヌクレアーゼ分解アッセイにおける、クエーサー670コスミッククエンチャー、クエーサー670-BHQ2、クエーサー670-BBQ、クエーサー705コスミッククエンチャー及びクエーサー705-BHQ2の、プローブに対するSN比を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0004】

略語

ここに用いられる「BHQ」とは、一般に、1つ以上のジアゾ結合、及び特に「ブラックホールクエンチャー（商標）」を含む、ダーククエンチャーのことを指す。

【0005】

例示的なBHQのこれらは、米国特許第7,019,129号に記載されている。

20

【0006】

ここに用いられる「FET」とは、「蛍光エネルギー移動」のことを指す。ここで用いられる「FRET」とは、「蛍光共鳴エネルギー移動」を指す。

【0007】

放射性及び非放射性エネルギー移動過程を指すために、これらの用語はここに用いられる。たとえば、光子を発するプロセス及び長距離電子移動に関与するそれらが、これらの用語に含まれる。

【0008】

本明細書を通して、これらの現象の両方ともに、「ドナー・アクセプターエネルギー移動」との一般用語の下に包括される。「SNP」は、「単一ヌクレオチド多型」を指す。

30

定義

【0009】

以下の定義は、以下に述べられる本発明の実施形態の各々に、広く適用することが、可能である。他の定義を行わない限り、この発明の属する当業者により共通して理解されるように、ここに用いられる全ての技術的及び科学的用語は、同じ意義を一般に有している。一般に、ここに用いられる命名法、及び、細胞培養、分子遺伝学、有機化学及び核酸化学の実験室手順、並びに、下記に記載されるハイブリダイゼーションは、周知のものであり、一般に、当該技術分野で使用される。標準的な技術が、核酸及びペプチド合成に用いられる。分子生物学的技術及び手順は一般に、当該技術分野及び様々な一般的な参考文献においては、従来方法により実行される(Sambrook et al. MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2d ed. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., を一般に参照されたい。これは参考文献によりここに組み込まれる)。ここに用いられる命名法及び分析化学の実験室手順、並びに有機合成は、非常に有名であり、一般に当該技術分野で使用される。標準技術またはその変形が、化学合成及び化学分析に用いられる。

40

【0010】

用語「アルキル」とは、それ自体によりまたは他の置換基の一部として、特に明記しない限り、直鎖もしくは分枝鎖、または環式炭化水素ラジカル、またはこれらの組み合わせ

50

、を指すものであり、これらの組み合わせは、完全飽和、単飽和もしくは多不飽和してもよく、かつ、指定される炭素原子数（すなわちC 1 ~ C 1 0は1 ~ 1 0個の炭素を意味する）を有する一価、二価、三価及び四価のラジカルを含むことが可能である。飽和炭化水素ラジカルの非限定的な実例としては、例えばn - ペンチル、n - ヘキシル、n - ヘプチル、n - オクチル等の、メチル、エチル、n - プロピル、イソプロピル、n - ブチル、t - ブチル、イソブチル、sec - ブチル、シクロヘキシル、（シクロヘキシル）メチル、シクロプロピルメチル、相同体及び異性体などの官能基を含んでいる。不飽和アルキル基とは、1つ以上の二重結合または三重結合を有する不飽和アルキル基である。不飽和アルキル基の非限定的な実例としては、ビニル、2 - プロペニル、クロチル、2 - イソペンテニル、2 - （ブタジエニル）、2 , 4 - ペンタジエニル、3 - （1 , 4 - ペンタジエニル）、エチニル、1 - 及び3 - プロピニル、3 - ブチニル、ならびに、高級相同体及び異性体を含んでいる。また、用語「アルキル」は、特に明記しない限り、「ヘテロアルキル」等、下記に更に詳細に定義されるアルキルのそれらの誘導体を任意に含んでいる。炭化水素基に限定されるアルキル基は、「ホモアルキル」と呼ばれる。ここに用いられる用語「アルキル」は、アルキル、アルケニル及びアルキニル部分を指し、これらそれぞれは、原子価要求を満たすために適切な一価、二価、または多価の種とすることが可能である。アルキル基は、例えば、ここでは「アルキル基置換基」と呼ぶ1つ以上の官能基で、任意に置換される。

#### 【0011】

用語「アルキレン」とは、それ自体によりまたは他の置換基の一部として、アルキル部分から誘導される二価のラジカルを意味するものであり、これは - C H <sub>2</sub> C H <sub>2</sub> C H <sub>2</sub> C H <sub>2</sub> - により非限定的に例証され、「ヘテロアルキレン」として下記に記載されるこれらの官能基を更に含んでいる。典型的に、アルキル（またはアルキレン）基は、1 ~ 2 4個の炭素原子を有することになっており、これらの官能基で炭素原子が10以下である場合が、本発明では好まれる。アルキレン及びヘテロアルキレンリンカー基については、リンカー基の化学式を記載した方向により定義されるリンカー基の配向がないことは、任意である。例えば、化学式 - C ( O ) <sub>2</sub> R ' は、 - C ( O ) <sub>2</sub> R ' を表すとともに、任意に - R ' C ( O ) <sub>2</sub> を表している。「低級アルキル」または「低級アルキレン」は、短い鎖状アルキルまたはアルキレン基であり、8個、7個、6個、5個またはこれより少ない炭素原子を、一般に有している。

#### 【0012】

用語「アルコキシ」、「アルキルアミノ」及び「アルキルチオ」（または、チオアルコキシ）は、これらの従来の意味で用いられ、これらのアルキル基がそれぞれ、酸素原子、アミノ基または硫黄原子を介して分子の残部に結合したものを指す。

#### 【0013】

用語「ヘテロアルキル」とは、それ自体によりまたは他の用語との併用により、特に明記しない限り、明示された炭素原子数、及び、B、O、N、S i及びSからなる群より選択された少なくとも1つのヘテロ原子からなる、安定な直鎖もしくは分枝鎖、または環式アルキル基を意味するものであり、このヘテロ原子は任意に酸化してもよく、この窒素原子は任意に四級化されてもよい。ヘテロ原子は、ヘテロアルキル基のいずれかの内部位置に、または鎖の末端、例えばアルキル基が分子の残部に結合する位置に、配置されてもよい。「ヘテロアルキル」基の実例は、 - C H <sub>2</sub> - C H <sub>2</sub> - O - C H <sub>3</sub>、 - C H <sub>2</sub> - C H <sub>2</sub> - N H - C H <sub>3</sub>、 - C H <sub>2</sub> - C H <sub>2</sub> - N ( C H <sub>3</sub> ) - C H <sub>3</sub>、 - C H <sub>2</sub> - S - C H <sub>2</sub> - C H <sub>3</sub>、 - C H <sub>2</sub> - C H <sub>2</sub> - S ( O ) - C H <sub>3</sub>、 - C H <sub>2</sub> - C H <sub>2</sub> - S ( O ) <sub>2</sub> - C H <sub>3</sub>、 - C H = C H - O - C H <sub>3</sub>、 - S i ( C H <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>、 - C H <sub>2</sub> - C H = N - O C H <sub>3</sub>、及び、 - C H = C H - N ( C H <sub>3</sub> ) - C H <sub>3</sub> を非限定的に含んでいる。2以上のヘテロ原子、例えば - C H <sub>2</sub> - N H - O C H <sub>3</sub> と - C H <sub>2</sub> - O - S i ( C H <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> とが、連続していてもよい。同様に、用語「ヘテロアルキレン」とは、それ自体によりまたは他の置換基の一部として、置換または非置換の二価ヘテロアルキルラジカルを指し、これは、 - C H <sub>2</sub> - C H <sub>2</sub> - S - C H <sub>2</sub> - C H <sub>2</sub> - 、及び、 - C H <sub>2</sub> - S - C H <sub>2</sub> - C H <sub>2</sub> - N H - C H <sub>2</sub> に

、非制限に例証される。ヘテロアルキレン基については、ヘテロ原子は、鎖末端のいずれかまたは両方を占拠する（例えば、アルキレンオキシ、アルキレンジオキシ、アルキレンアミノ、アルキレンジアミノ等）ことも可能である。

【0014】

それら自身によりまたは他の用語との併用により、特に明記しない限り、用語「シクロアルキル」とは「アルキル」の環式バージョンを、「ヘテロシクロアルキル」とは「ヘテロアルキル」の環式バージョンを、それぞれ代表する。さらに、ヘテロシクロアルキルについては、ヘテロ原子は、ヘテロ環が分子の残部に結合する位置を占拠することができる。シクロアルキルの実例は、シクロペンチル、シクロヘキシル、1-シクロヘキセニル、3-シクロヘキセニル、シクロヘプチル、等を含むが、これに限定されるものではない。ヘテロシクロアルキルの実例は、1-(1,2,5,6-テトラヒドロピリジル)、1-ピペリジニル、2-ピペリジニル、3-ピペリジニル、4-モルホリニル、3-モルホリニル、テトラヒドロフラン-2-イル、テトラヒドロフラン-3-イル、テトラヒドロチエノ-2-イル、テトラヒドロチエノ-3-イル、1-ピペラジニル、2-ピペラジニル、等を含むが、これに限定されるものではない。

10

【0015】

用語「ハロ」または「ハロゲン」とは、それら自身によりまたは他の置換基の一部として、特に明記しない限り、フッ素、塩素、臭素またはヨウ素の原子を含む。さらに、「ハロアルキル」等の用語は、モノハロアルキル及びポリハロアルキルを含むことを意味している。例えば、用語「ハロ(C1~C4)アルキル」は、トリフルオロメチル、2,2,2-トリフルオロエチル、4-クロロブチル、3-臭化プロピル、等を非限定的に含んでいることを意味している。

20

【0016】

用語「アリール」とは、特に明記しない限り、単一環または複数環とすることが可能な多不飽和性、芳香性の置換基（好ましくは1環~3環、この1つ以上が任意にシクロアルキルまたはヘテロシクロアルキルである）であり、これらは一緒に融合するか、または共有結合により結合する。用語「ヘテロアリール」は、N、O及びSから選択されるヘテロ原子を1~4個含有するアリール基（または環）を指すものであり、窒素及び硫黄原子は任意に酸化し、窒素原子は任意に四級化される。ヘテロアリール基は、ヘテロ原子を介して分子の残部に結合することが可能である。アリール及びヘテロアリール基の非限定的な実例としては、フェニル、1-ナフチル、2-ナフチル、4-ビフェニル、1-ピロリル、2-ピロリル、3-ピロリル、3-ピラゾリル、2-イミダゾリル、4-イミダゾリル、ピラジニル、2-オキサゾリル、4-オキサゾリル、2-フェニル-4-オキサゾリル、5-オキサゾリル、3-イソオキサゾリル、4-イソオキサゾリル、5-イソオキサゾリル、2-チアゾリル、4-チアゾリル、5-チアゾリル、2-フリル、3-フリル、2-チエニル、3-チエニル、2-ピリジル、3-ピリジル、4-ピリジル、2-ピリミジル、4-ピリミジル、5-ベンゾチアゾリル、プリニル、2-ベンズイミダゾリル、5-インドリル、1-イソキノリル、5-イソキノリル、2-キノキサリニル、5-キノキサリニル、3-キノリル及び6-キノリルが含まれる。上記に示されるアリール及びヘテロアリール環構造の各々に対する置換基は、下記に記載される「アリール基置換基」の基から選択される。

30

40

【0017】

簡潔さのため、用語「アリール」は、他の用語（例えば、アリールオキシ、アリールチオキシ、アリールアルキル）との併用で用いられる場合は、上記に定義されたホモアリール及びヘテロアリール環を任意に含んでいる。したがって、用語「アリールアルキル」は、アリール基がアルキル基に結合する種類のラジカルを任意に含んでおり（例えばベンジル、フェネチル、ピリジルメチル等）、これは炭素原子（例えばメチレン基）が例えば酸素原子により置換される種類のアルキル基（例えばフェノキシメチル、2-ピリジルオキシメチル、3-(1-ナフチルオキシ)プロピル等）を含んでいる。

【0018】

50

アルキル及びヘテロアルキルラジカルに対する置換基（アルキレン、アルケニル、ヘテロアルキレン、ヘテロアルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、シクロアルケニル及びヘテロシクロアルケニルとしばしば指される基を含む）は、一般に「アルキル基置換基」を指し、これは以下の各種の基から1つ以上非限定的に選択することが可能である： $-OR'$ 、 $=O$ 、 $=NR'$ 、 $=N-OR'$ 、 $-NR'R''$ 、 $-SR'$ 、 $-ハロゲン$ 、 $-SiR'R''R'''$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)R'$ 、 $-CO_2R'$ 、 $-CONR'R''$ 、 $-OC(O)NR'R''$ 、 $-NR''C(O)R'$ 、 $-NR'-C(O)NR'R''$ 、 $-NR''C(O)_2R'$ 、 $-NR-C(NR'R''R''')=NR''''$ 、 $-NR-C(NR'R'')=NR''''$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-S(O)_2R'$ 、 $-S(O)_2NR'R''$ 、 $-NRSO_2R'$ 、 $-CN$ 及び  
 $-NO_2$ であり、これらはゼロ～ $(2m'+1)$ で変化する数であり、ここで $m'$ は、このラジカルの全炭素原子数である。 $R'$ 、 $R''$ 、 $R'''$ 及び $R''''$ はそれぞれ、好ましく独立に、水素、置換または非置換ヘテロアルキル、置換または非置換アリール、例えば1～3のハロゲンで置換されるアリール、置換または非置換アルキル、アルコキシ又はチオアルコキシ基、または、アリールアルキル基を指す。本発明の化合物が複数のR基を含むとき、例えば、これらの基の1つ以上が存在する場合、R基のそれぞれは、 $R'$ 、 $R''$ 、 $R'''$ 及び $R''''$ 基のそれぞれとして独立に選択される。 $R'$ 及び $R''$ が同じ窒素原子に結合する場合は、窒素原子に結合して5員環、6員環または7員環を生成することが可能である。例えば、 $-NR'R''$ は、非限定的に、1-ピロリジニル及び4-モルホリニルを含む筈である。置換基に関する上記の議論より、用語「アルキル」が、炭素原子が水素以外の基に結合する基を含むことを、当業者は理解するものであり、例えば、ハロアルキル（例えば $-CF_3$ 及び $-CH_2CF_3$ ）及びアシル（例えば $-C(O)CH_3$ 、 $-C(O)CF_3$ 、 $-C(O)CH_2OCH_3$ である等）である。例示的なアルキル基置換基は、ここに「反応性官能基」及び「結合部位」と称する基を含んでいる。様々な実施形態において、アルキル基置換基は、リン含有部分であり、例えば、燐酸ジエステル又はここに記載される等の燐酸ジエステル改良品である。

#### 【0019】

アルキル基について記載する置換基と同様に、アリール基及びヘテロアリール基のための置換基は、「アリール基置換基」と一般的に呼ばれる。例示的な置換基は、アルキル基置換基及びその他のリストから選択され、例えば、ハロゲン、 $-OR'$ 、 $=O$ 、 $=NR'$ 、 $=N-OR'$ 、 $-NR'R''$ 、 $-SR'$ 、 $-SiR'R''R'''$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)R'$ 、 $-CO_2R'$ 、 $-CONR'R''$ 、 $-OC(O)NR'R''$ 、 $-NR''C(O)R'$ 、 $-NR'-C(O)NR'R''$ 、 $-NR''C(O)_2R'$ 、 $-NR-C(NR'R''R''')=NR''''$ 、 $-NR-C(NR'R'')=NR''''$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-S(O)_2R'$ 、 $-S(O)_2NR'R''$ 、 $-NRSO_2R'$ 、 $-CN$ 及び $-NO_2$ 、 $R'$ 、 $-N_3$ 、 $-CH(Ph)_2$ 、フルオロ(C1～C4)アルコキシ、ならびに、フルオロ(C1～C4)アルキルを挙げることができ、これらはゼロから芳香族環構造上の開放結合価の全数までの数であり、そして、 $R'$ 、 $R''$ 、 $R'''$ 、及び $R''''$ は、水素、置換または非置換のアルキル、置換または非置換のヘテロアルキル、置換または非置換のアリール及び置換または非置換のヘテロアリールから、好ましく独立して選択される。本発明の化合物が一つ以上のR基を含む場合は、たとえば、R基の各々は、 $R'$ 、 $R''$ 、 $R'''$ 、及び $R''''$ 基として、これらの基の1つ以上が存在する場合に、独立して選択される。

#### 【0020】

アリールまたはヘテロアリール環の隣接原子の置換基の2つが、式 $-T-C(O)-(CRR')$ <sub>q</sub>-U-の置換基で任意に交換されてもよく、ここで、T及びUは、独立して $-NR-$ 、 $-O-$ 、 $-CRR'$ 、または単結合であり、qは0～3の整数である。代替的に、アリールまたはヘテロアリール環の隣接原子の置換基2つが、式 $-A-(CH_2)$ <sub>r</sub>-B-の置換基で任意に交換されてもよく、ここで、A及びBは、独立して $-CRR'$ 、 $-O-$ 、 $-NR-$ 、 $-S-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)_2NR'$ 、

10

20

30

40

50

- または単結合であり、 $r$  は 1 ~ 4 の整数である。このように形成される新しい環の単結合の 1 つが、二重化学結合で任意に交換されてもよい。代替的に、アリールまたはヘテロアリール環の隣接原子の置換基 2 つが、式  $-(CRR')_s-X-(CR''R''')$  の置換基と任意に交換してもよく、ここで、 $s$  及び  $d$  は、独立して 0 ~ 3 の整数であり、 $X$  は  $-O-$ 、 $-NR'$ 、 $-S-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、または  $-S(O)_2NR'$  である。置換基  $R$ 、 $R'$ 、 $R''$  及び  $R'''$  は、水素または置換または非置換の (C1 ~ C16) アルキルから独立して選択されることが好ましい。例示的なアリール基置換基は、ここで「反応性官能基」及び「結合部位」と称する基を含んでいる。

【0021】

ここに用いられる場合において、語「異種原子」は、酸素 (O)、窒素 (N)、硫黄 (S) 及びシリコン (Si) を含んでいる。

10

【0022】

記号「R」は、H、置換または非置換のアルキル基、置換または非置換のヘテロアルキル基、置換または非置換のアリール基、置換または非置換のヘテロアリール基、及び、置換または非置換のヘテロシクリル基から選択される置換基を表す一般的な省略形である。R は、アルキル基置換基及びアリール基置換基を参照することも可能である。

【0023】

語「塩 (複数も)」は、比較的無毒性の酸または塩基で調製される化合物の塩を含むものであり、ここに記載される化合物に見出される特定の置換基に左右される。本発明の化合物が比較的酸性の官能基性を含有する場合、このような化合物の中性形態を、ストレートで、または適切な不活性溶媒内で、十分な量の所望の塩基に接触させることにより、塩基付加塩を得ることが可能である。塩基付加塩の例は、ナトリウム、カリウム、カルシウム、アンモニウム、有機アミノもしくはマグネシウム塩、または同様の塩、を含んでいる。本発明の化合物が比較的塩基性の官能基性を含有する場合、このような化合物の中性形態を、ストレートで、または適切な不活性溶媒内で、十分な量の所望の酸に接触させることにより、酸付加塩を得られることが可能である。酸付加塩の例としては、塩化水素酸、臭化水素酸、窒素酸、炭酸、一水素炭酸、リン酸、一水素リン酸、二水素リン酸、硫酸、一水素硫酸、ヨウ水素酸、又は亜リン酸など、無機酸から誘導される物質を含むとともに、酢酸、プロピオン酸、イソ酪酸、酪酸、マレイン酸、リンゴ酸、マロン酸、安息香酸、コハク酸、コルク酸、フマル酸、乳酸、マンデル酸、フタル酸、ベンゼンスルホン酸、p

20

30

【0024】

ここに用いられる場合において、「核酸」は、例えば DNA、RNA のような、ヌクレオシド、ヌクレオシド、ヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドを意味するものであり、これは一本鎖、二本鎖、またはこれより凝集性の高いハイブリダイゼーションモチーフ、及びそのあらゆる化学修飾であってもよい。修飾は、核酸リガンド核酸塩基に対する又は総じて核酸リガンドに対する、追加電荷、分極率、水素結合、静電的相互作用、及び、反応性を取り入れる化学基を提供する化合物を、非限定的に含んでいる。このような修飾は、リン酸ジエステル基修飾 (例えば、ホスホロチオネート、メチルホスホネート)、糖修飾、5 - 位置ピリミジン修飾、8 - 位置プリン修飾、環外アミンにおける修飾、4 - チオウリジン、5 - プロモまたは 5 - ヨード - ウラシル等の非標準または非自然の核酸塩基による代用; ペプチド核酸 (PNA)、グリコール核酸 (GNA)、モルホリノ等の主鎖修飾; 2' - O - メチルヌクレオシド、5 - メチル - 2' - デオキシチジン等のメチル化; イソ塩基、イソシチジン及びイソグアニジン等の通常でない塩基対合の組合せを、非限定

40

50

的に含んでいる。「ヌクレオモノマー」は、ヌクレオシド、ヌクレオチドまたはこれらの修飾とし得る、単一核酸ユニットを指す。

【0025】

ここで用いられる「核酸塩基」は、既知のプリン及びピリミジンヘテロ環及び本発明ピリミジンのみならず、ヘテロ環類似体及びそれらの互変異性体も含有する部分を含んでいる。プリン、アデニン及びグアニンを含んでおり、例示的なプリン類似体は、8-オキソ-N6-メチルアデニン及び7-デアザキサンチンを含んでいる。ピリミジンは、チミン、ウラシルならびにシトシン、及び、これらの類似体、例えば5-メチルシトシン、5-メチルウラシル及び4,4-エタノシトシン、を含んでいる。また、この語は、非自然の核酸塩基を含んでいる。代表的な非自然の核酸塩基としては、5-フルオロウラシル、5-ブロムウラシル、5-クロロウラシル、5-ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4-アセチルシトシン、5-(カルボキシヒドロキシルメチル)ウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、ベータ-D-ガラクトシルキューオシン、イノシン、N6-イソペンテニルアデニン、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N6-アデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル、ベータ-D-マンノシルキューオシン、5'-メトキシカルボキシメチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-N6-ソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸(v)、ワイプトキソシン、プソイドウラシル、キューオシン、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸(v)、5-メチル-2-チオウラシル、3-(3-アミノ-3-N-2-カルボキシプロピル)ウラシル、(acp3)w、ニトロインドール及び2,6-ジアミノプリン、が含まれる。

【0026】

様々な実施形態において、本発明の化合物は、5-位置で誘導体化されるピリミジンを含んでいる。この誘導体は、1-アルケニル-、1-アルキニル-、複素環式芳香系-、及び1-アルキニル-複素環式芳香系修飾である。「1-アルケニル」とは、オレフィンの不飽和(二重結合含有)非環式基であることを意味する。「1-アルキニル」は、アセチレン的-不飽和(三重結合含有)非環式基であることを意味する。

【0027】

ここに用いられる場合において、「ヌクレオシド」は、核酸のサブセットを意味し、この核酸のサブセットでは、核酸塩基が糖または糖類似体に共有結合するとともに、亜リン酸エステル、ホスホラミダイトまたはホスフィンを任意に含んでいる。ヌクレオシドとの語は、リボヌクレオシド、デオキシリボヌクレオシド、または、核酸塩基のN-グリコシドまたはC-グリコシドである他のいずれかのヌクレオシドを含んでいる。糖炭素の立体化学は、D-リボースのそれ以外とすることが可能である。また、ヌクレオシドは、例えば糖部分の修飾を含む種を含み、水酸基の一つ以上は、ハロゲン、ヘテロ原子、脂肪族基と置換され、または、エーテル、アミン、チオール等として機能される。ペントース部分は、ヘキソースで、または、シクロペンタン環、6員モルホリノ環等の代替構造で、置換することが可能である。また、ここに定義したヌクレオシドは、遊離カルボキシル基および/または遊離アミノ基を有するアミノ酸および/またはアミノ酸類似体に、および/または、これらの保護形態に、結合される核酸塩基を含んでいる。また、ヌクレオシドは、一つ以上の核酸塩基修飾、を任意に含んでおり、例えば、フルオロカルビル、アルケニルまたはアルキニル部分で修飾されている。リン酸ジエステルまたはリン酸ジエステル修飾を含むヌクレオシドを、ここではヌクレオチドと称する。また、ここに定義されるヌクレオシドは、遊離カルボキシル基および/または遊離アミノ基を有するアミノ酸および/またはアミノ酸類似体に、および/またはこれらの保護形態に、結合される核酸塩基を含むことを意図している。

10

20

30

40

50

## 【0028】

ここに用いられる「糖修飾」は、2'-デオキシリボース以外のあらゆるペントースまたはヘキソース部分を意味している。修飾糖は、例えば、D-リボース、(2'-O-アルキル、2'-アミノ、2'-ハロゲン官能性ペントース、ヘキソース等を含んでいる。例示的な糖修飾は、水酸基の一つ以上がハロゲン、ヘテロ原子、アルキル部分で置換される糖を含むか、または、エーテル、エステル等として官能化される。ペントース部分は、ヘキソースで、またはシクロペンタン環、6員モルホリノ環等の代替構造で、置換することが可能である。また、D-リボースのそれ以外の立体化学を有する糖も含まれる。

## 【0029】

「リン酸ジエステル・グループ修飾」は、隣接したヌクレオモノマーを共有結合して結合させる本来のリン酸ジエステル・グループのあらゆる類似物を意味する。代替結合は、ホスホロチオネート及びメチルホスホン酸塩等のリン酸ジエステル類似体、及び、アセタール及びアミド等の非リン含有結合を含んでいる。

## 【0030】

また、核酸修飾は、冷却器(例えば、BHQ)、蛍光体、挿入剤、副溝バインダー、フッ化炭素、安定化基、またはその他の部分とのラベリング等の、3'、5'及びベースの修飾を含んでいる。様々な実施例では、修飾または標識が、リンカー基を介してオリゴマーに共有結合で接合する。

## 【0031】

オリゴマーは、リン酸ジエステルまたは接合リン酸ジエステル部分により、共有結合により互いに結合する二つ以上のヌクレオモノマーとここに定義される。したがって、オリゴマーが有することができるのは、わずか2個のヌクレオモノマー(二量体)であり、ヌクレオモノマーの上限は本質的に有していない。オリゴマーは、有能に結合することが可能であり、したがって、同族の一本鎖または二本鎖(または集積度がこれより高度な)核酸配列とのペアに基づくことができる。ここに記載されるように、オリゴマーはより長いオリゴマーのためのシントンのとしても有効である。また、オリゴマーは、無塩基サイト及び偽ヌクレオシドを含有することも可能である。さまざまな実施例において、本発明のオリゴマーは、官能化される。オリゴマーを官能化する部分を、以下に述べる。特定の実施例を記載する際、用語「オリゴマー」を交互に用いて、オリゴマーの核酸配列、本発明のプローブを提供する接合核酸配列、または本発明の固体担持体を提供する変性核酸一次構造を参照する。

## 【0032】

「ペプチド」とは、オリゴマーのことをいい、ここでは、モノマーは、アミノ酸であり、これらは代替的にポリペプチドとしていわれるアミド結合を介して結合する。アミノ酸がα-アミノ酸である場合、L-光学異性体またはD-光学異性体の何れか一方を用いることが可能である。さらに、非天然アミノ酸、例えば、D-アラニン、フェニルグリシン及びホモアルギニンも、含まれる。遺伝子コードされない一般に遭遇するアミノ酸が、本発明に用いられてもよい。本発明で用いられるアミノ酸の全てが、D-異性体またはL-異性体のいずれかであってもよい。L-異性体が、一般に推奨される。さらに、他のペプチド模倣薬も、本発明に有用である。一般的なレビューのため、CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY OF AMINO ACIDS, PEPTIDES AND PROTEINSのSpatola, A.F., B. Weinstein, 編集 Marcel Dekker, New York, 267ページ(1983)を参照のこと。

## 【0033】

「固体担体」とは、分子、化合物、細胞またはその他の実体の結合のために表面を有する固体物質、または、上記化学種がその表面に付着する固体物質、である。固体担体の表面は、平坦とすることができ、または別段に構成することができる。固体担体は多孔性とすることができ、または非多孔性とするすることができる。固体担体は、表面を備えるチップまたはアレイであることができ、これは、ガラス、シリコン、ナイロン、ポリマー、プラスチック、陶器または金属を備えていてもよい。固体担体は、ナイロン、ニトロセルロー

10

20

30

40

50

ス、または高分子膜等の膜、もしくはプレートまたは皿としてもよく、また、例えば、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリカーボネートまたはポリアロマーでできた96穴プレート等、ガラス、陶器、金属またはプラスチックで成っていてもよい。固体担体は、任意の形状のビーズまたは粒子としてもよく、好ましくは球状またはほぼ球状であり、好ましくはビーズまたは粒子は、1ミリメートル以下、さらに好ましくは0.1~100マイクロン間の、の直径または最大幅を有している。このような粒子またはビーズは、任意の適切な物質、例えば、ガラスまたは陶器、及び/または1つ以上のポリマー、例えばナイロン、ポリ四フッ化エチレン、テフロン(商標)、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、セファロース、アガロース、セルロース、セルロース誘導体またはデキストラン、から成ることができ、及び/または、金属、特に常磁性金属、例えば鉄、を備えることができる。

10

## 【0034】

固相合成のための担体は、当該技術分野で既知であり、これは、高架橋剤ポリスチレン(McCollum, et al, Tetrahedron Lett. 32: 4069-4072 (1991)), ポリスチレン/PEG共重合体(Gao, et al, Tetrahedron Lett. 32: 5477-5480 (1991)), シリカゲル(Chow, et al, Nucl. Acids Res. 9: 2807-2817 (1981)), ポリアミド結合シリカゲル(Gait, et al, Nucl. Acids Res. 10: 6243-6254 (1982)), セルロース(Crea, et al, Nucl. Acids Res. 8: 2331-2348 (1980)), 及び制御細孔ガラス(CPG)(Koster, et al., Tetrahedron Lett. 24: 747-750 (1983)), を非限定的に含んでいる。例示的な固体担体は、CPGビーズである。CPGビードは、さまざまな方法でヌクレオモナーまたはオリゴマーの結合のために誘導体化することが可能である。例えば、CPGビーズは、3-アミノプロピルトリエトキシシランと処理して、オリゴヌクレオチド類似体モノマーまたはダイマーの結合のために、アミンのプロピルリンカーハンドルを加えることができ(Koster, et al, Tetrahedron Lett. 24: 747-750 (1983)), 又は好ましくは長鎖アルキルアミン基、最も好ましくは末端ヌクレオチドを含むものを、CPGに取り付けることが可能である(Adams, et al, J. AM. Chem. Soc. 105: 661-663 (1983))。オリゴヌクレオチド合成またはペプチド合成のための担体、例えばdT-LCAA-CPG(Applied Biosystems社)は、市販である。

20

30

## 【0035】

「インターカレータ」とは、隣接し合う核酸塩基同士の間の部分間挿及び重層ができる、平坦な芳香族または複素環式芳香族化合物部分のことをいう。これらの部分は、小型分子又は大型実体の部分、例えばタンパク質であってもよい。インターカレータの非限定的な例としては、アクリジン、アントラセン、アンスラサイクリン、アントラサイクリノン、メチレンブルー、インドール、アントラキノ、キノリン、イソキノリン、ジヒドロキノ、テトラサイクリン、ソラレン、クマリン、ハロゲン化エチジウム、エチジウムホモダイマー、オキサゾールイエロー2量体(YOYO)、チアゾールオレンジ(TOTO)、ダイネミシン、1,10-フェナントロリン-銅、カリケアミシン、ポルフィリン、ジスタマイシン、ネトロプシン及びピオローゲンを含んでいる。

40

## 【0036】

「副溝バインダー」とは、典型的には、約150~約2000ダルトンの分子量を有する部分のことをいう。この部分は、二本鎖(またはより高い凝集の)DNA、RNAまたはこれらの混成の副溝非挿入方法で、好ましくは約 $10^3 M^{-1}$ を超える結合定数により、結合する。副溝結合化合物は、広く様々な化学構造を有するが、例示的な副溝バインダーは、三日月形の三次元構造を有している。その例としては、所定の自然発生的な化合物を含み、例えばネトロプシン、ジスタマイシン及びレキシトロプシン、ミトラマイシン、クロモマイシンA3、オリボマイシン、アントラマイシン、シビロマイシン、ならびに、さらに関連した抗生物質及び合成誘導体を含んでいる。所定のビスクォーターンに属する

50

アンモニウム複素環化合物、ジアリールアミジン、例えばペンタミジン、スチルバミジン及びベレニル、CC-1065ならびに関連したピロロインドール及びインドールポリペチド、ヘキスト33258、4'-6-ジアミジノ-2-フェニルインドール(DAPI)ならびに自然発生的なまたは合成アミノ酸からなる多くのオリゴペプチドは、副溝バインダー化合物である。例示的な副溝バインダーは、米国特許第6,084,102号に記載される。このタイプの結合は、例えば紫外線(u.v.)及びNMR(NMR)分光学等良好に確立した分光光度計法により、またゲル電気泳動により、検出することが可能である。副溝バインダー分子の結合に対するu.v.スペクトルの変動、及び、「細胞核のオーバーハウザー」(NOSEY)効果を利用したNMR分光法は、この目的のための特に周知であり、かつ、有用な技術である。ゲル電気泳動は、副溝バインダーの二本鎖DNAまたはその断片への結合を検出するが、その理由は、この二本鎖DNAの機動性の結合が変化するためである。

10

**【0037】**

副溝バインダーは典型的には、約20、約15原子、約10または約5原子の鎖を備えるリンカーを介して、オリゴマーまたは固体担体に結合する。

**【0038】**

副溝バインダーが「三日月形の形状」またはこれに類似の形状であることに対して、挿入剤は平坦な芳香族(好ましくは多環式)の分子である事実に基づき、挿入部分または挿入剤は、副溝バインダーを容易に区別する。また、核オーバーハウザー効果を利用したNMR分光法により、実験的に区別することも可能である。

20

**【0039】**

ここで用いられる語と「リンカー」または「L」とは、本発明の安定剤、クエンチャー、ヌクレオモノマーまたはオリゴマーに本発明の化合物の構成要素を共有結合で結びつける、例えば固体担体を結合するための、C、N、O、S、Si及びPから成る群より選択された1~30の非水素原子に結合した単一共有結合(「ゼロ次」)または一連の安定共有結合のことをいい;または、本発明のアミダイトの核酸塩基に対して、クエンチャーを結合することまたは部分を安定させることをいう。例示的なリンカーは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29または30の非水素原子を含む。特に明記しない限り、「結合する」、「結合した」、「結合」、「接合する」、「接合される」及び結合に関する類似した語は、リンカーを利用する技術及びリンカーを結合する化学種のことをいう。ここに定義されるように、例示的なリンカーは、結合サイトを含む。さらに、リンカーは、オリゴマーまたは初期のオリゴマー(オリゴマー合成間)を、本発明の固体担体に結合させることに有用である。従って、本発明はまた、リンカーを介して共有結合により固体担体(例えば本発明の固体担体)に結合する本発明のオリゴマーを提供する。本発明の固体担体及びオリゴマーは、固体担体とオリゴマーという、2つの構成要素間の切断可能リンカーを任意に含んでいる(例えば、オリゴマーと固体担体との間、蛍光体とオリゴマーとの間、クエンチャーとオリゴマーとの間、蛍光体とクエンチャーとの間、等)。様々な実施形態において、オリゴマーに固体担体を接合するリンカーは、開裂可能リンカーである。

30

40

**【0040】**

「開裂可能リンカー」とは、反応または条件の結果により切断可能な1つ以上の開裂可能基を有するリンカーである。例示的な開裂可能リンカーは、式IまたはIIのR<sup>8</sup>の中に位置し、合成した固体担体からの本発明の合成オリゴマーの便宜的な分離を実現するようにする。語「開裂可能基」とは、放出された部分を接合体の残りに結合する化学結合を切断することにより、本発明の固体担体またはオリゴマーの構成要素の放出を実現する部分のことをいう。本発明のオリゴマー及び固体担体の調製及び使用における、両方に有用な例示的な開裂機構は、酵素によりまたはその他化学により、実現される。

**【0041】**

酵素開裂可能基に加えて、酵素以外の薬剤の動作により切断される1つ以上のサイトを

50

含むことが、本発明の範囲内である。例示的な非酵素的開裂薬剤は、非限定的には、酸、塩基、光（例えばニトロベンジル誘導体、フェナシル基、オルト-ヒドロキシ桂皮酸エステル、ベンゾインエステル）、及び熱を含んでいる。多くの開裂可能基が、当該技術分野で知られている。例えば、Jung et al, Biochem. Biophys. Acta, 761: 152-162 (1983); Joshi et al, J. Biol. Chem., 265: 14518-14525 (1990); Zarling et al., J. Immunol, 124: 913-920 (1980); Bouizar et al, Eur. J. Biochem., 155: 141-147 (1986); Park et al, J. Biol. Chem., 261: 205-210 (1986); Browning et al, J. Immunol, 143: 1859-1867 (1989)を参照されたい。さらに、広い範囲の開裂可能、二機能性（ホモ及びヘテロ二機能性）スペーサーアームが市販されている。

10

## 【0042】

例示的な開裂可能基は、例えば水酸化ナトリウム、アンモニアまたはその他のアミン等の試薬により開裂可能である。様々な実施形態において、開裂可能リンカーは、室温で、または熱の下で、容易に切断される。一実施形態では、式IまたはIIのR<sup>8</sup>は、例えば有機溶媒内のアンモニアまたは本質的無水アミン等のアミンによる治療により切断される開裂可能リンカーを備えている。

## 【0043】

「結合サイト」とは、2つ以上の構成要素（例えば機能的構成要素、固体担体、オリゴヌクレオチドまたはリンカー）を接続する部分である。この語は、相補的な反応パートナーの反応により形成される共有結合のことをいい、それぞれ、このパートナーのそれに対する相補的な反応性の官能基を有している。本発明の固体担体及びオリゴマーにおける結合サイトが、独立して選択される。例示的な結合サイトは、S、Sc(O)NH、HNC(O)S、Sc(O)O、O、NH、NHC(O)、(O)CNH及びNHC(O)O、ならびにOC(O)NH、CH<sub>2</sub>S、CH<sub>2</sub>O、CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O、CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S、(CH<sub>2</sub>)OO、(CH<sub>2</sub>)OS、又は(CH<sub>2</sub>)OY<sub>x</sub>-PEGを非限定的に含んでおり、ここでY<sub>x</sub>は、S、NH、NHC(O)、C(O)NH、NHC(O)O、OC(O)NHまたはOであり、Oは、1~50の整数である。これらの例示的な結合サイトの各々において、NHはNR<sub>1</sub>'であってもよく、R<sub>1</sub>は、置換もしくは非置換のアルキルまたは置換もしくは非置換のヘテロアルキルである。結合サイトは、燐酸ジエステル基であってもよい。様々な実施形態において、結合サイトは、リンカーと蛍光体との間、リンカーとクエンチャーとの間、リンカーと安定化部分との間、又はリンカーと固体担体との間にある。本発明のオリゴマー及び固体担体の例示的な実施形態では、各結合サイトは異なっている。

20

30

## 【0044】

ここで用いられる語「蛍光体」とは、本質的に蛍光性である部分のことをいい、又は、生体化合物または金属イオンとの結合、または酵素による代謝、すなわち蛍光発生における蛍光の変化を示す。蛍光体を置換して、蛍光体の溶解性、分光特性または物性を改質してもよい。多数の蛍光体が当業者に知られており、その非限定的な例としては、クマリン、アクリジン、フラン、ダンシル、シアニン、ピレン、ナフタレン、ベンゾフラン、キノリン、キナゾリノン、インドール、ベンズアゾール、ポラポリアザインダセン、オキサジン及びキサンテンを含んでおり、この後者には、フルオレセイン、ローダミン、ローザミン及びロードールを含んでいる。本発明において有用なこれら及びその他の蛍光体は、ハウグランド(Haugland)の蛍光プローブ及び研究化学の分子プローブハンドブック(MOLECULAR PROBES HANDBOOK OF FLUORESCENT PROBES AND RESEARCH CHEMICALS)に記載されている。さらに有用な蛍光体は、一般に所有された米国の特許出願公報第2005/0214833号及び第2005/0170363号ならびにこれ以下に記載されている。

40

## 【0045】

50

ここに用いられる場合、「クエンチャー」とは、蛍光体により発光される光の少なくとも一部分を減衰させることが可能な、本発明の任意の蛍光変更部分のことをいう。この減衰は、ここでは「クエンチング」と称する。従って、様々な実施形態において、クエンチング基の存在下での蛍光体の励起により、エミッション信号が予想されるより弱くなり、または完全に不在になる。クエンチングは典型的には、活発な蛍光体とクエンチング基との間でのエネルギー転移を通して発生する。

【0046】

蛍光体またはクエンチャーは、置換基を含んでいてもよく、これにより、このような置換基がない場合「親」化合物と関連して、所望の特性、例えば水への溶解度、細胞透過性、または変化吸収及び発光スペクトル、が高められる。このように、本発明に有用な蛍光体またはクエンチャーは、改善置換基がない場合に、同一の親化合物と関連する所望の特性を高める置換基を含んでいる。

【0047】

「機能的構成要素」とは、クエンチャー、蛍光体または安定化部分から選択される構造を有している本発明の化合物の部分のための総称である（非限定的に、インターカレータ、副溝結合性部分、安定化部分により改質される核酸塩基（例えばアルキニル部分及びフルオロアルキル部分）、及び、配座安定化部分、例えば一般に所有された米国特許出願公開番号第2007/0059752号に記載される配座安定化部分、を含んでいる）。

【0048】

表現「ポリヌクレオチドの増幅」とは、非限定的に、PCR法（PCR）等の方法、結紮増幅（または合成酵素鎖反応、LCR）及びQ-ベータレプリカーゼの使用に基づく増幅方法を含んでいる。これらの方法は周知であり、当該技術分野で広く行われる。米国特許第4,683,195号及び第4,683,202号ならびにInnisら、1990（PCR用）；及びWuら、1989a（LCR用）を参照されたい。PCRを実行するための試薬及びハードウェアは、市販されている。特定の遺伝子領域からシーケンスを増幅するために有用なプライマーは、ターゲット領域のシーケンスにまたはそのランキング領域に対して、好ましくは相補的であり、かつ、特異的にハイブリダイズする。増幅により発生される核酸一次構造が、直接配列されてもよい。代替的に、増幅されたシーケンスが、シーケンス解析の前にクローン化されてもよい。酵素で増幅されたゲノム分節の直接のクローン化及びシーケンス解析のための方法が、Scharfにより記載された（1986）。本発明は、増幅過程に有用なオリゴマープライマーを提供する。さらに、このプライマーを合成する際に有用な固体担体が提供される。プライマーに加えて、本発明は、プローブ及びこのようなプローブを使用して、増幅の製品を検出し、特性化し、および/または定量化する方法を提供し；また、これらのオリゴマープローブを総合するために有用な固体担体を提供する。

【0049】

語「塩基-重層摂動」とは、塩基-重層での摂動、例えば塩基-ペアミスマッチ、その認識部位へのタンパク質結合、又はオリゴヌクレオチド付加生成物を形成する他のあらゆる実体、を生じさせる任意の現象のことをいう。本発明の様々なプローブは、このような塩基-重層摂動を、検出し、特性化し、及び/または定量化することができる。さらに、本発明は、このような塩基-重層摂動を検出し、特性化し、及び/または、定量化することが可能な統合的なプローブにおける有用な固体担体を提供する。

【0050】

語「ハイブリッドされる」とは、完全にベース対であってもなくてもよい互いに関連し合う2つの核酸鎖をいい；一般に、この用語は、本発明のオリゴマーを含む結合をいい、固体担体に密接に結びつくか否かまたは溶液内か否かにかかわらない。

【0051】

語「変性する」とは、核酸二本鎖（またはより高いレベルの集合体）の鎖が水素結合によってはベース対にされず、一本鎖分子から分離される、プロセスのことをいう。変性の方法は、当業者には周知であり、熱変性及びアルカリ性変性を含んでいる。この用語は一

10

20

30

40

50

般に、そのターゲット核酸からの本発明のプロープの分離のことをいう。

【0052】

語「ミスマッチ」とは、100%相補的でないハイブリッドされた核酸二本鎖（またはより高いレベルの集合体）内での核酸塩基のことをいう。ミスマッチは、例えばA:TまたはG:Cのようなワトソン-クリック塩基対でない核酸の相補鎖上に配置される2つの核酸塩基の核酸塩基の間におけるあらゆる不適当な組合せを含んでいる。削除、挿入、逆転、代用またはフレームシフト突然変異に起因して、全てのホモロジーが欠如する場合がある。さまざまな実施例では、本発明のオリゴマーは、そのターゲット核酸と比較したミスマッチを含んでおり、そのターゲット内での対応するミスマッチの、発見、及び/または特性評価、及び/または定量化を認めることが望ましい。特定の実施例では、ミスマッチは、単量のヌクレオチドのミスマッチである。

10

【0053】

ここに用いられるように、語「多型」とは、遺伝子におけるシーケンス変化をいい、「突然変異」とは、表現型に関係して関連または信用される遺伝子におけるシーケンス変化をいう。「遺伝子」という用語とは、機能的な製品タンパク質支配部位に対するゲノムコーディングの部分を用いる。従属識別のために本発明に従って用いられる多形マーカが、ゲノムのコーディングまたは非コーディング部位に位置してもよく、本発明のさまざまなプロープが、これらのマーカを含む部位を核酸にハイブリッドするように設計される。ここに用いられる「対象」という用語とは、遺伝子試験の目的でターゲット核酸がそこから得られる試験検体を提供するための対象のことをいう。本発明のオリゴマーは、多型性及び突然変異を検出、及び/または特性化、及び/または定量化するために、有用である。更に、発明の固体担体は、多型性及び突然変異を検出、及び/または特性化、及び/または定量化するために使用するオリゴマーを合成するために、有用である。

20

【0054】

ここに用いられる語「プロープ」とは、本発明の固体担体またはアミダイトを用いて準備される核酸オリゴマーのことをいう。さまざまな実施例では、プロープは、結合パートナーとの相互作用に関する検出可能な反応をもたらす。プロープは、結合パートナーとの相互作用に応じたプロープ状態の変化に検出可能なエネルギー移動ペアを形成する少なくとも1つの検出可能部分または一対部分を、含んでいる。本発明は、プロープを総合するために有用なプロープ及びアミダイトならびに固体担体を提供する。本発明の例示的なプロープは、多型性を見つけるには有用である。さまざまな実施例では、多型性とは、単一ヌクレオチド多型(SNP)である。

30

【0055】

ここに用いられる語「検出可能な応答」とは、観察または計装のいずれかによる直接または間接的に検出可能な信号内におけるまたはこの信号の発生における変化のこと、ならびに、試験検体内のプロープのためのターゲット結合パートナーの存在に応じた変化のこのことをいい、又は好ましくはこの変化の大きさがこの機能の存在である。典型的には、検出可能な応答は、波長分散パターン、または、吸光度もしくは蛍光発光の強さ、または、光散乱、蛍光量子収率、蛍光寿命、蛍光偏光法、励起もしくは放出波長の変動の変化、または、上記のパラメータの組合せが、変化を起こす、蛍光体からの光学応答である。所定の分光特性の検出可能な変化は一般に、蛍光強度の増加または減少である。しかしながら、蛍光発光または励起の波長変動をもたらす分光変化も有用である。イオン結合上の蛍光の変化は通常、インジケータの配座または電子変化によるものであり、これは、イオン結合部の電子密度の変化による、結合したターゲット金属イオンによる蛍光クエンチングによる、または様々な影響の組み合わせによる、蛍光体の励起または基底状態により、生じてよい。代替的に、検出可能な応答は、蛍光体が本質的に蛍光性であり金属イオンまたは生体化合物に結合した際に信号を変化させないような、信号の発生である。本発明は、検出可能な応答及び有用な固体担体を提供してこのようなプロープを合成するような、プロープを提供する。

40

【0056】

50

ここに用いられる語「キャリア分子」とは、本発明の任意の化合物が結合される分子をいう。代表的なキャリア分子は、タンパク質（例えば酵素、抗体）、グリコプロテイン、ペプチド、サッカライド（例えば単糖、オリゴ糖及び多糖類）、ホルモン、レセプター、抗原、基板、メタボライト、遷移状態類似体、共同因子、阻止因子、ドラッグ、色素、栄養分、成育因子等を、非限定的に含む。また、「キャリア分子」とは、「分子」、例えば固体担持体（例えば合成担持体、クロマトグラフィ固定相、膜）、ウイルス及び微生物等の「分子」の古典的な定義に含まれることが、考慮されないかも知れない化学種のことをいう。

【0057】

記号---は、化学結合に対して直交に示されており、示された部分が分子の残部に結合される点を示唆している。

10

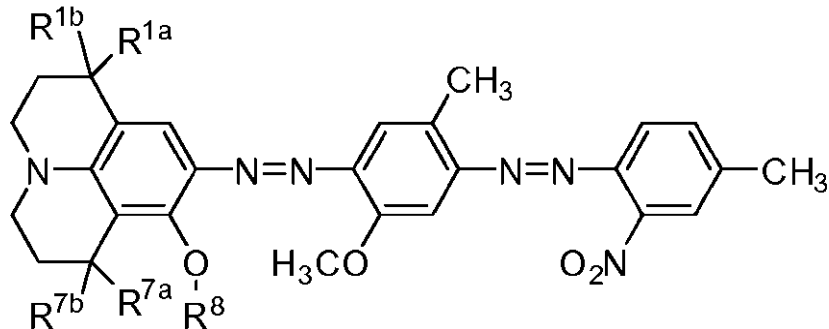
【0058】

ある実施形態では、ここに使用される語の定義は、IUPACに従う。

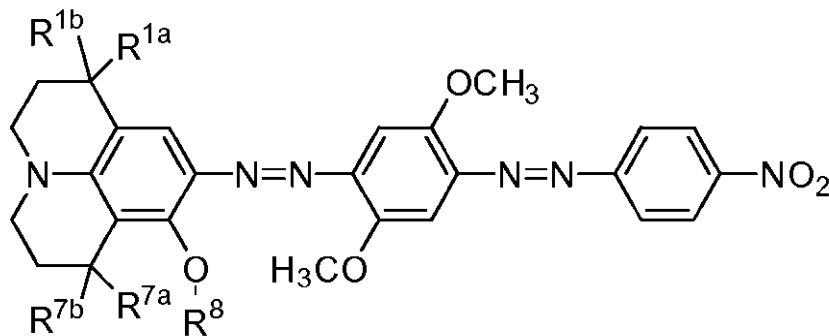
コスミックエンチャー

【0059】

一つの態様では、本発明は、式Iまたは式IIにより構造を有する化合物（クエンチャー）を提供する：



20

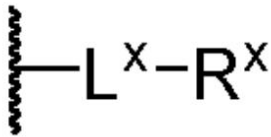


30

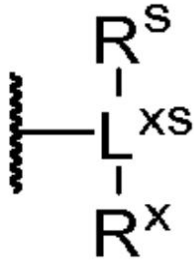
。【0060】

R<sup>1a</sup>、R<sup>1b</sup>、R<sup>7a</sup>及びR<sup>7b</sup>は、Hから独立して選択され、置換または非置換のアルキル、置換または非置換のシクロアルキル、置換または非置換のヘテロアルキル、及び、置換または非置換のヘテロシクロアルキルである。R<sup>1a</sup>及びR<sup>1b</sup>は、これらに結合される炭素原子と共に、任意に接合され、置換または非置換のC<sub>3</sub>~C<sub>7</sub>シクロアルキルと、置換または非置換の3~7員ヘテロシクロアルキルとから選択される部材である環を形成する。R<sup>7a</sup>及びR<sup>7b</sup>は、これらに結合される炭素原子と共に、任意に接合され、置換または非置換のC<sub>3</sub>~C<sub>7</sub>シクロアルキル及び置換または非置換の3~7員ヘテロシクロアルキルから選択される部材である環を形成する。R<sup>1a</sup>、R<sup>1b</sup>、R<sup>7a</sup>及びR<sup>7b</sup>の少なくとも一つは、Hではない。R<sup>8</sup>は、H、

40



及び、



10

20

から選択される。L<sup>x</sup>、L<sup>x s</sup>、R<sup>s</sup>及びR<sup>x</sup>は、ここに定義されている。

【0061】

R<sup>1 a</sup>、R<sup>1 b</sup>、R<sup>7 a</sup>、R<sup>7 b</sup>及びR<sup>8</sup>の組合せのいずれかは、この開示に含まれており、本発明により具体的に提供される。

【0062】

ある実施形態では、R<sup>1 a</sup>及びR<sup>1 b</sup>は、それぞれHである。ある実施形態では、R<sup>1 a</sup>及びR<sup>1 b</sup>は、非置換のC1、C2、C3、C4、C5及びC6アルキルから独立して選択される。ある実施形態では、R<sup>1 a</sup>及びR<sup>1 b</sup>は、それぞれメチルである。

【0063】

ある実施形態では、R<sup>7 a</sup>及びR<sup>7 b</sup>は、それぞれHである。ある実施形態では、R<sup>7 a</sup>及びR<sup>7 b</sup>は、非置換のC1、C2、C3、C4、C5及びC6アルキルから独立して選択される。ある実施形態では、R<sup>7 a</sup>及びR<sup>7 b</sup>は、それぞれメチルである。

30

【0064】

ある実施形態では、R<sup>1 a</sup>及びR<sup>1 b</sup>は非置換のC1、C2、C3、C4、C5及びC6アルキルから独立して選択され、R<sup>7 a</sup>及びR<sup>7 b</sup>はそれぞれHである。ある実施形態では、R<sup>1 a</sup>及びR<sup>1 b</sup>はそれぞれメチルであり、R<sup>7 a</sup>及びR<sup>7 b</sup>はそれぞれHである。ある実施形態では、R<sup>1 a</sup>及びR<sup>1 b</sup>は、それぞれHであり、R<sup>7 a</sup>及びR<sup>7 b</sup>は、非置換のC1、C2、C3、C4、C5及びC6アルキルから独立して選択される。ある実施形態では、R<sup>1 a</sup>及びR<sup>1 b</sup>は、それぞれHであり、R<sup>7 a</sup>及びR<sup>7 b</sup>は、それぞれメチルである。ある実施形態では、R<sup>1 a</sup>、R<sup>1 b</sup>、R<sup>7 a</sup>及びR<sup>7 b</sup>は、非置換のC1、C2、C3、C4、C5及びC6アルキルから独立して選択される。ある実施形態では、R<sup>1 a</sup>、R<sup>1 b</sup>、R<sup>7 a</sup>及びR<sup>7 b</sup>は、それぞれメチルである。

40

【0065】

ある実施形態では、L<sup>x</sup>は、化学結合、置換または非置換のアルキル、置換または非置換のシクロアルキル、置換または非置換のヘテロアルキル、及び、置換または非置換のヘテロシクロアルキル、から選択される。ある実施形態では、L<sup>x</sup>は、非置換のC1、C2、C3、C4、C5、C6、C7、C8、C9及びC10アルキルから選択される。

【0066】

ある実施形態では、L<sup>x s</sup>は、置換または非置換のアルキル、置換または非置換のシクロアルキル、置換または非置換のヘテロアルキル、及び、置換または非置換のヘテロシク

50

ロアルキルから選択される。ある実施形態では、 $L^{x5}$  は、置換されたヘテロアルキルである。

【0067】

ある実施形態では、 $R^5$  は、保護または非保護の反応性官能基、結合サイト、及び固体担持体から選択される。ある実施形態では、 $R^5$  は -OH、-ODMT、及び、固体担持体へのリンカーに共有結合で結合される結合サイトから選択される。「DMT」とは、4,4'-ジメトキシトリチルのことをいう。ある実施形態では、固体担持体は、多孔質ガラス(CPG)である。

【0068】

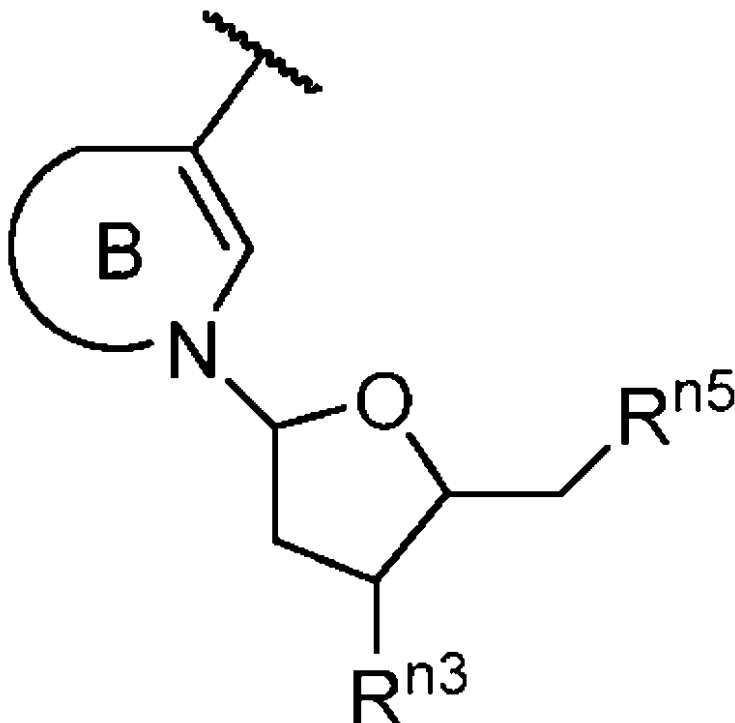
ある実施形態では、 $R^x$  は、保護または非保護の反応性官能基及び結合サイトから選択される。ある実施形態では、 $R^x$  は、ホスホラミダイト、-OH、-ODMT、-COOH、活性エステル(例えばN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)エステル)、及び、-NH<sub>2</sub>から選択される。「DMT」とは、4,4'-ジメトキシトリチルのことをいう。

【0069】

ある実施形態では、結合サイトは、ヌクレオシド、ヌクレオシドへのリンカー、ヌクレオチド、ヌクレオチドへのリンカー、オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチドへのリンカー、核酸、核酸へのリンカー、キャリア分子、キャリア分子へのリンカー、固体担持体、及び、固体担持体へのリンカーから、独立して選択される部材に共有結合している。

【0070】

ある実施形態では、 $R^x$  は、前記ヌクレオシドへのリンカーに共有結合する結合サイトであり、以下の構造を有し：



ここで、環標識 B は、核酸塩基であり； $R^{n3}$  は -OH または ホスホラミダイトであり； $R^{n5}$  は -OH または -ODMT である。「DMT」は、4,4'-ジメトキシトリチルのことをいう。

【0071】

ある実施形態では、 $R^8$  は以下から選択される：

10

20

30

40



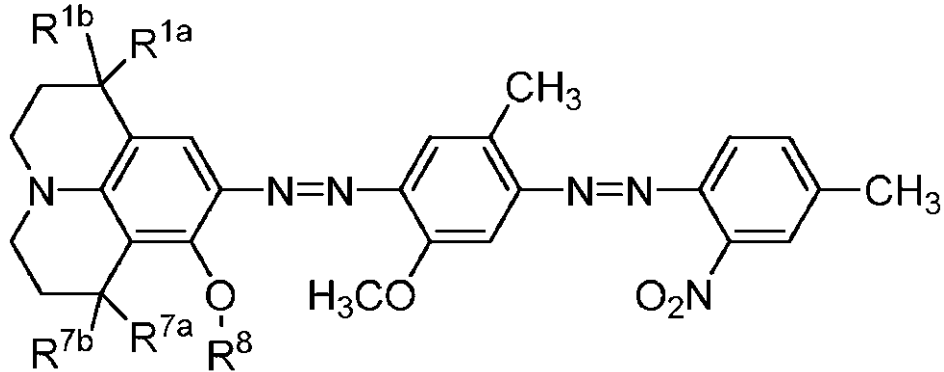
$R^{n3}$  は -OH または ホスホラミダイト であり ;

$R^{n5}$  は -OH または -ODMT である。

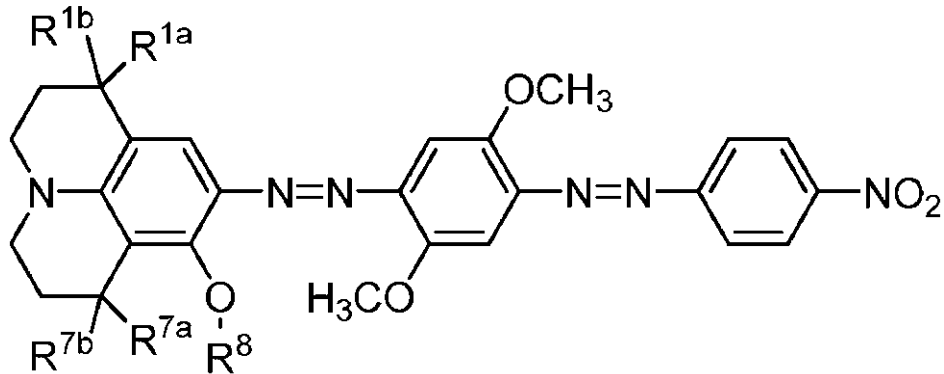
「DMT」は、4,4'-ジメトキシトリチルのことをいう。

【0073】

ある実施形態では、クエンチャー部分(Q)は、以下の式IまたはIIによって構造を有し :



10



20

ここで、 $R^{1a}$ 、 $R^{1b}$ 、 $R^{7a}$ 、 $R^{7b}$  及び  $R^8$  は、ここに定義ものとしてあり ;  $R^8$  は、 $L^n$  に共有結合で結合される結合サイトを備える。

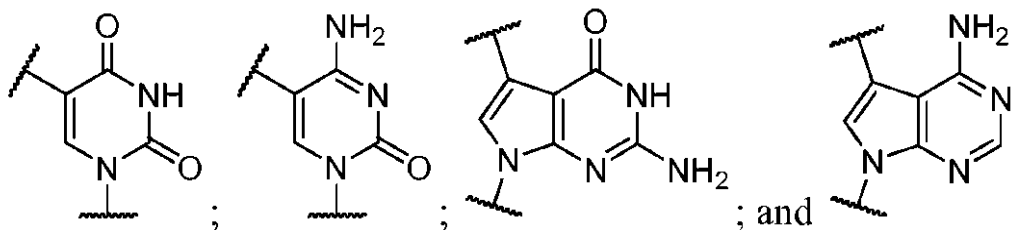
30

【0074】

ある実施形態では、Lは、化学結合、置換または非置換のアルキル、置換または非置換のシクロアルキル、置換または非置換のヘテロアルキル及び置換または非置換のヘテロシクロアルキルから選択される。

【0075】

例示的な核酸塩基は、以下を含む :



40

オリゴマー

【0076】

また、本発明のモノマーを使用しかつ合成されるモノマーの構成要素を含んで調製される、核酸オリゴマー、例えばプローブが、提供される。

【0077】

例示的なオリゴマーは、オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオシド、オリゴデオキシリ

50

ボヌクレオチド(2'-デオキシ-D-リボースまたはその変性形状を含む)、すなわち、DNA、オリゴリボヌクレオチド(D-リボースまたはその変性形状を含む)、すなわち、RNA、ならびに、プリンまたはピリミジン核酸塩基、もしくは、修正プリンまたはピリミジン核酸塩基のN-グリコシドまたはC-グリコシドである他のいずれかの種類のポリヌクレオチド、を含んでいる。また、ここに用いられるオリゴマーは、化合物を含んでおり、ここでは、隣接ヌクレオモノマーは、前述のとおり、アミド結合を介して結合される(Nielsen et al, Science (1991) 254: 1497-1500)。通常オリゴマー内に見出される要素、例えばフラノース環及び/またはホスホジエステル結合を、任意の適切な機能的同等の要素に交換することが可能である。従って、「オリゴマー」は、核酸塩基の骨格または担持体として役目を果たす任意の構造を含むことを意図し、この骨格は、シーケンス依存法でターゲット核酸に結合できるようにする。

10

## 【0078】

本発明のオリゴマー内でヌクレオモノマーを結合する例示的な官能基は、(i) 磷酸ジエステル及び磷酸ジエステル修飾(ホスホロチオネート、メチルホスホネート等)、(ii) 非リン同配体を含む代替結合(フォルムアセタール、リポアセタール、カルバメート等)、(iii) モルホリノ残留物、炭素環式の残留物またはその他のフラノース糖、例えばアラビノース、または、リボースまたはデオキシリボースの代わりにヘキソース、及び、(iv) アミド結合を介して結合するヌクレオモノマー、または、いずれかの適切な代替結合を介して結合する非環式ヌクレオモノマー、を含んでいる。

20

## 【0079】

本発明のオリゴマーは、変性の及び従来のヌクレオモノマーを使用して形成が可能であり、また、現在市販の標準固相(または溶液相)オリゴマー合成法を用いた合成が可能である。一般に、オリゴマーは、以下のステップを備える方法により合成が可能であるが、それは：保護基ならびに核酸塩基、及びヌクレオモノマーまたはオリゴマーへの結合が可能な結合官能基を有する、ヌクレオモノマーまたはオリゴマーシントンを合成すること；ヌクレオモノマーまたはオリゴマーシントンを、アクセプターヌクレオモノマーまたはアクセプターオリゴマーに結合させること；保護基を除去すること；及び、所望のオリゴマーが合成するまで必要に応じてサイクルを反復すること、である。

30

## 【0080】

本発明のオリゴマーは、40、50または、100のヌクレオモノマーを超えるヌクレオモノマーを含む任意の長にすることが可能である。様々な実施形態では、オリゴマーは、2~100のヌクレオモノマーを含んでいる。約10~40以上またはこれと同等のヌクレオモノマーの長さは、治療または診断用途に有用である。2、3、4または、5のヌクレオモノマーを含む短いオリゴマーが、本発明で具体的には含まれており、例えば、シントンとして有用である。

## 【0081】

ランダム化シーケンスを有し、かつ、20未満、15未満または10未満のヌクレオモノマーを含むオリゴマーは、プライマーにおいて、例えば、重合酵素または逆転写酵素のためのプライマーとして用いることが可能なオリゴマーが残留物を含む場合に限った、ランダムなシーケンスプライマーを使用するクローン化または増幅プロトコルにおいて、有用である。

40

## 【0082】

オリゴマーは従来のホスホジエステル結合を含むことができるまたは磷酸ジエステル修飾(例えばアミド亜リン酸エステル結合)を含むことができる。これらの代替結合は、非限定的に、以下の実施形態を含んでいる：

式の部分-O-P(O)(S)-O-(「ホスホロチオネート」)、-OP(S)-O-(「ホスホロジチオエート」)、-O-P(O)-(R<sup>o</sup><sub>2</sub>)-X--O-P(O)(R<sup>o</sup>)-O-O-P(S)(R<sup>o</sup>)-O-(「チオノーアルキルホスホネート」)、-P(O)(OR<sup>p</sup>)-X-、-O-C(O)-X-、又は、-O-C(O)(NR<sup>p</sup><sub>2</sub>)-X

50

- であり、ここで、R<sup>o</sup>は、H（または、塩）またはアルキル（1～12C）であり、R<sup>p</sup>はアルキル（1～9C）であり、結合は、ヌクレオモノマーの炭素に結合される-O-または-S-を通して隣接ヌクレオモノマーに接合される。様々な実施形態において、本発明のオリゴマーに用いられる代替結合は、燐酸ジエステル、ホスホロチオネート、メチルホスホナート及びチオノメチルホスホネート結合を含んでいる。ホスホロチオネート及びメチルホスホナート結合は、生理的環境においてオリゴマーに添加安定性を与える。同じオリゴマーにおいてこれらの結合全てが等しいことが必要だというわけではが、本発明の特に好ましいオリゴマーは、ホスホロチオネート結合を一様に、またはメチルホスホナート結合を一様に、含んでいる。

#### 【0083】

オリゴマーまたはそのセグメントは、従来方式で合成され、本発明の化合物を使用して調製することが可能である。当該技術分野に既知でかつここに記載される合成方法を使用して、本発明の化合物を含むオリゴマーを合成することが可能であり、同様に、適切に保護されたヌクレオモノマーを使用して、当該技術分野に既知のその他の核酸塩基を合成することが可能である。オリゴマーの合成のための方法は、例えば、Froehler, B., et al, *Nucleic Acids Res.* (1986) 14:5399-5467; *Nucleic Acids Res.* (1988) 16:4831-4839; *Nucleosides and Nucleotides* (1987) 6:287-291; Froehler, B., *Tetrahedron Lett.* (1986) 27:5575-5578; Caruthers, M. H., in *Oligodeoxynucleotides - Antisense Inhibitions of Gene Expression* (1989), J. S. Cohen, editor, Crc Press, Boca Raton, p7-24; Reese, C. B. et al, *Tetrahedron Lett.* (1985) 26:2245-2248、に見出される。また、メチルホスホニアミダイト化学介してメチルホスホナートにリンクされたオリゴマーの合成が記載された(Agrawal, S. et al, *Tetrahedron Lett.* (1987) 28:3539-3542; Klem, R. E., et al, *International Publication Number WO 92/07864*)。

#### 【0084】

ここに開示されるように、本発明は、オリゴマーの「接合体」を提供する。たとえば、オリゴマーは、安定化部分、蛍光体、クエンチャー、インターカレータ及び、DNA二重螺旋（副溝バインダー、「MGB」）の副溝と具体的に相互作用する物質等、様々な機能的要素に共有結合することが可能である。その他の選択された接合部分は、放射性、蛍光性、酵素性、または、開裂リンカー等を使用している細胞結合を促進する部分等の標識とすることが可能である。適切な放射標識は、<sup>32</sup>P、<sup>35</sup>S、<sup>3</sup>H及び<sup>14</sup>Cを含み；適切な蛍光標識は、フルオレセイン、レゾルフィン、ローダミン、BODIPY（分子プローブ）及びテキサスレッドを含み；適切な酵素は、アルカリホスファターゼ及びワサビペルオキシダーゼを含む。追加的な蛍光体はここに述べられており、当該技術分野で一般に認識される。その他の共有結合した部分は、ビオチン、抗体または抗体フラグメント及びタンパク質、例えばトランスフェリン及びHIV Tatタンパク質、を含んでいる。

#### 【0085】

ここに議論され当該技術分野で認識されるように、オリゴマーは、任意の便利な結合を通して、誘導体化が可能である。例えば、副溝バインダー、蛍光体、クエンチャー、及びアクリジンまたはソラレン等のインターカレータは、例えば、オリゴマーの末端5'-位置、RNAの2'-位置、または、OH、H<sub>2</sub>、COOHまたはピリミジンの5-位置に取り込まれるSH等、任意の利用可能な-OHまたは-SHを介して本発明のオリゴマーに結合することが可能である。例えば5-位置での-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH、又は-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SHを含む誘導体化された形態が、本発明に有用である。ポリリジンまたはリシンを含む接合体は、記載されるように合成することが

10

20

30

40

50

可能であり、そのターゲット核酸一次構造へのオリゴマーの結合親和力をさらに高めることが可能である (Lemaitre, M. et al, Proc Natl Acad Sci (1987) 84:648-652; Lemaitre, M. et al, Nucleosides and Nucleotides (1987) 6:311-315)。

【0086】

結合または代替結合を介して結合する置換基を含む多種多様な置換基を、結合することが可能である。オリゴマーのホスホジエステル結合における -OH 部分を、標準保護基または結合基により保護されるホスファート官能基により交換して、他のヌクレオモノマーへの追加的な結合を調製することが可能であり、または複合置換基に結合することが可能である。5'-ターミナルOHを燐酸化されることが可能であり；3'-末端での2'-OHまたはOH置換基を、燐酸化されることも可能である。またヒドロキシルを、標準保護基に誘導体化することも可能である。

10

【0087】

本発明のオリゴマーは、開裂可能リンカーを使用する細胞結合を促進する部分に、共有結合的に誘導体化することが可能である。このような接合体に用いられるリンカーは、オリゴマー輸送薬剤接合体が細胞に侵入した後に減少されたジスルフィド結合を含むことが可能である。このタイプのジスルフィドを含むリンカーは、制御可能な半減期を有している。このリンカーは、ジスルフィド結合のレドックス電位が原因で細胞内の条件に関連する細胞外条件下で安定である。

20

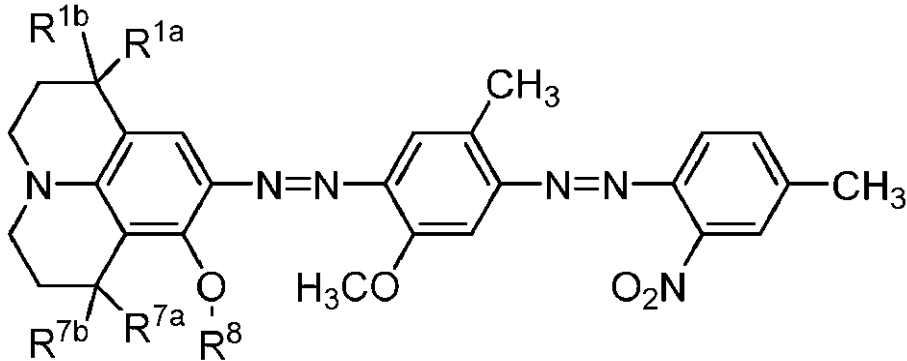
ドナー及びアクセプター部分

クエンチャー

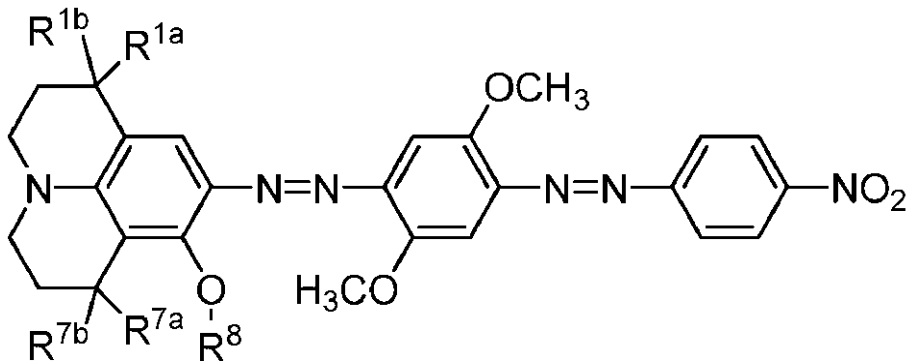
【0088】

本発明の例示的な固体担体及びオリゴマーは、任意にリンカーを介して、それに共有結合するクエンチャーを含んでいる。様々な実施形態では、クエンチャーは、式IまたはIIに従った構造を有する部分であり：

(I), (II)



30



40

R<sup>1a</sup>、R<sup>1b</sup>、R<sup>7a</sup>、R<sup>7b</sup>及びR<sup>8</sup>は、ここに定義され；Rは、(直接またはリンカーを通して)固体担持体に共有結合的に結合される結合サイト、(直接またはリンカー

50

を通して)オリゴマーに共有結合的に結合される結合サイト、または、これら両方を備えている。

【0089】

本発明の化合物の利点の一つとしては、クエンチャー官能化固体担体及びオリゴマーと併用して、エネルギードナー分子の広範囲を使用することが可能である。無数の蛍光体が、当業者に知られている。例えば、Cardullo et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 8790 - 8794 (1988); Dexter, D.L., J. of Chemical Physics 21: 836 - 850 (1953); HOCHSTRASSER et al, Biophysical Chemistry 45: 133 - 141 (1992); Selvin, P., Methods in Enzymology 246: 300 - 334 (1995); Steinberg, I. Ann. Rev. Biochem., 40: 83 - 114 (1971); Stryer, L. Ann. Rev. Biochem., 47: 819 - 846 (1978); Wang et al, Tetrahedron Letters 31: 6493 - 6496 (1990); Wang et al, Anal. Chem. 67: 1197 - 1203 (1995)、を参照されたい。

10

【0090】

本発明のクエンチャーと併用して使用可能な例示的なドナーの非限定的なリストが、表1に提供される。

20

【0091】

表1

ドナー - アクセプターエネルギー移動対のドナーまたはアクセプターとして選択されることが可能な適切な部分

4 - アセトアミド - 4' - イソチオシアナトスチルベン - 2, 2' - ジスルホン酸

アクリジン及び誘導体:

アクリジン

アクリジンイソチオシアネート

5 - (2' - アミノエチル)アミノナフタレン - 1 - スルホン酸 (EDANS)

4 - アミノ N - [3 - ビニルスルホニル)フェニル]ナフトアーリムキタノウグイ -

3, 5ジスルホン酸エステル

30

N - (4 - アニリノ - 1 - ナフチル)マレイミド

アントラニルアミド

BODIPY

ブリリアントイエロー

クマリン及び誘導体:

クマリン

7 - アミノ - 4 - メチルクマリン (AMC、クマリン120)

7 - アミノ - 4 - トリフルオロメチルクマリン (クマラン151)

シアニン色素

シアノシン

40

4', 6 - ジアミニジノ - 2 - フェニルインドール (DAPI)

5', 5'' - ジプロモピロガロール - スルホンフタレイン (プロモピロガロールレッド)

7 - ジエチルアミノ - 3 - (4' - イソチオシアナトフェニル) - 4 - メチルクマリン

ジエチレントリアミンペンタアセテート

4, 4' - ジイソチオシアナトジヒドロ - スチルベン - 2, 2' - ジスルホン酸

4, 4' - ジイソチオシアナトスチルベン - 2, 2' - ジスルホン酸

5 - [ジメチルアミノ]ナフタレン - 1 - 塩化スルホニル (DNS、塩化ダンシル)

4 - (4' - ジメチルアミノフェニルアゾ)安息香酸 (DABCYL)

4 - ジメチルアミノフェニルアゾフェニル - 4' - イソチオシアネート (DABITC

)

50

エオシン及び誘導体：	
エオシン	
エオシンイソチオシアネート	
エリトロシン及び誘導体：	
エリトロシン B	
エリトロシンイソチオシアネート	
エチジウム	
フルオレセイン及び誘導体：	
5 - カルボキシフルオレセイン ( F A M )	
5 - ( 4 , 6 - ジクロロトリアジン - 2 - イル ) アミノフルオレセイン ( D T A F )	10
2 ' , 7 ' - ジメトキシ - 4 ' 5 ' - ジクロロ - 6 - カルボキシフルオレセイン ( J O E )	
フルオレセイン	
フルオレセインイソチオシアネート	
Q F I T C ( X R I T C )	
フルオレサミン	
I R 1 4 4	
I R 1 4 4 6	
マラカイトグリーンイソチオシアネート	20
4 - メチルウンベリフェロン	
オルトクレゾールフタレイン	
ニトロチロシン	
パラローザニリン	

## 表 1 ( 続き )

<u>ドナー - アクセプターエネルギー移動対のドナーまたはアクセプターとして選択されることが可能な適切な部分</u>	
フェノールレッド	
B - フィコエリトリン	30
o - フタルジアルデヒド	
ピレン及び誘導体：	
ピレン	
ピレン酪酸塩	
スクシンイミジル 1 - ピレン酪酸塩	
量子ドット	
反応性赤色 4 ( C i b a c r o n ( 商標 )   プリリアントレッド 3 B - A )	
ローダミン及び誘導体：	
6 - カルボキシ - X - ローダミン ( R O X )	
6 - カルボキシローダミン ( R 6 G )	40
リサミンローダミン B 塩化スルホニルローダミン ( R h o d )	
ローダミン B	
ローダミン 1 2 3	
ローダミン X イソチオシアネート	
スルホローダミン B	
スルホローダミン 1 0 1	
スルホローダミン 1 0 1 ( テキサスレッド ) の塩化スルホニル派生物	
N , N , N ' , N ' - テトラメチル - 6 - カルボキシローダミン ( T A M R A )	
テトラメチルローダミン	
テトラメチルローダミン   イソチオシアネート ( T R I T C )	50

リボフラビン

ロゾール酸

金属キレート、例えばランタニドキレート（例えばユウロピウムテルビウムキレート）、ルテニウムキレート。

【0092】

ここでは、Pesce et al, Eds., FLUORESCENCE SPECTROSCOPY (Marcel Dekker, New York, 1971); White et al, FLUORESCENCE ANALYSIS: A PRACTICAL APPROACH (Marcel Dekker, New York, 1970); などの参照により例証されるように、特定のプローブのために適切なドナー・アクセプター対を選択するための文献に利用可能な、相当量の実用的ガイダンスが存在する。また、文献では、蛍光及び発色分子の網羅的なリストを提供する基準、及び、リポーター-クエンチャー対を選択するためのそれらの関連した光学的性質を、含んでいる（例えば、Berlman, HANDBOOK OF FLUORESCENCE SPECTRA OF AROMATIC MOLECULES, 2nd Edition (Academic Press, New York, 1971); Griffiths, COLOUR AND CONSTITUTION OF ORGANIC MOLECULES (Academic Press, New York, 1976); Bishop, Ed., INDICATORS (Pergamon Press, Oxford, 1972); Haugland, HANDBOOK OF FLUORESCENT PROBES AND RESEARCH CHEMICALS (Molecular Probes, Eugene, 1992) Pringsheim, FLUORESCENCE AND PHOSPHORESCENCE (Interscience Publishers, New York, 1949); など。)。さらに、以下の基準により例証されるように、核酸に加えられることが可能な共通反応基を介した共有結合性結合のために、リポーター及びクエンチャー分子を誘導体化するために、広範なガイダンスが、文献に存在する：Haugland (上記); Ullmanら、米国特許第3,996,345号; Khannaら、米国特許第4,351,760号。従って、特定の用途のためにエネルギー交換対を選択することと、核酸、ペプチドまたは他のポリマー等のプローブ分子にこの対の部材を接合することとは、当業者の能力の範囲内である。

【0093】

一般に、クエンチャーの吸光度帯が、ドナーの蛍光発光帯に実質的に重なっていることが好ましい。ドナー（蛍光体）が、ドナー・アクセプターエネルギー移動を利用するプローブの要素である場合、ドナー部分が励起している際に、ドナー及びアクセプター部分がドナー・アクセプターエネルギー移動を示すように、本発明のドナー蛍光部分及びクエンチャー（アクセプター）が選択されることが好ましい。蛍光体・クエンチャー対を選択する際に考慮される1つの要因は、これらの間でのドナー・アクセプターエネルギー移動の効率である。好ましくは、ドナー及びアクセプター部分との間のFRETの効率は、少なくとも10%であり、より好ましくは少なくとも50%であり、さらに好ましくは少なくとも80%である。FRETの効率は、ここに記載され当該技術分野で知られる両方の方法を使用して、実験により容易に試験を行うことが可能である。

【0094】

また、ドナー及びアクセプター基の能力を変化させて二量体化するまたは密接に結合することにより、ドナー・アクセプター対間のエネルギー移動の効率を調節することも可能である。ドナー及びアクセプター部分が密接に結合することが、既知でありまたは決定される場合、ドナーとアクセプターとの間で、リンカー部分の長さまたはプローブ自体の長さを調節することにより、結合の増加または減少を促進することが可能である。疎水性もしくはイオン相互作用、またはプローブ構造物の立体反発を、調整することにより、ドナー・アクセプター対が結合する能力を増減されることが可能である。従って、ドナー・アクセプター対の結合の原因となる分子内相互作用を、増強することができ、または減衰す

10

20

30

40

50

ることができる。従って、例えば、全体のネガティブ電荷を支えているドナー及び総合正電荷を有するアクセプターを利用することにより、例えばドナー・アクセプター対間の結合を、増加させることが可能である。

【0095】

また、直接プローブに結合される蛍光体に加えて、間接的な手段により蛍光体を結合させられることも可能である。この実施形態では、リガンド分子（例えばビオチン）は一般に、プローブ化学種に共有結合される。リガンドはその後、本質的に検出可能な、または信号システムに共有結合的に結合する、他の分子（例えばストレプトアビジン）に結合するものであり、これは例えば蛍光化合物、又は非蛍光性化合物の変換により蛍光化合物を発生する酵素である。標識としての関心の有用な酵素は、例えば、ヒドロラーゼ、特にホスファターゼ、エステラーゼ及びグリコシダーゼ、ヒドロラーゼ、ペプチダーゼ、または、オキシダーゼ、特にペルオキシダーゼ、及びその他を含んでいる。蛍光化合物は、上記のように、フルオレセイン及びその誘導体、ローダミン及びその誘導体、ダンシル、ウンベリフェロンなどを含んでいる。使用可能なシステムを製作する様々な標識または信号のレビューとして、米国特許第4,391,904号を参照されたい。

10

【0096】

本発明のクエンチャーと併用して有用なドナーは、例えば、キサントレン色素を含んでおり、これは、フルオレセイン、シアニン色素及びローダミン色素を含んでいる。これらの化合物の多くの適切な形状が、核酸に対する接着の場所としてまたは結合のための接着機能として使用可能なこれらのフェニル部分上で、置換基と共に商業的に広く利用可能である。本発明のクエンチャーとともに有用な蛍光化合物の他の基は、アルファまたはベータ位でアミノ基を有するナフチルアミンである。1-ジメチルアミノナフチル-5-スルホン酸エステル、1-アニリノ-8-ナフタレンスルホン酸エステル及び2-p-トルイジニル-6-ナフタレンスルホン酸エステルが、このナフチルアミノ化合物の間に含まれる。他のドナーとしては、3-フェニル-7-イソシアナートクマリン、アクリジン、例えば9-イソチオシアナトアクリジン及びアクリジンオレンジ；N-(p-(2-ベンゾオキサゾリル)フェニル)マレイミド；ベンゾオキサジアゾール、スチルベン、ピレン、等が含まれる。

20

【0097】

例示の明瞭さのため、下記の議論は、クエンチャー及び蛍光体を核酸に結合させることに注目する。核酸プローブの上の焦点は、クエンチャーの取り付けが可能なプローブ分子の範囲を制限することを意図しない。当業者は、クエンチャーが、標準合成化学を使用して、小型分子、タンパク質、ペプチド、合成ポリマー、固体担持体などに結合可能でもある点を、評価するだろう。

30

【0098】

プローブが核酸プローブである例示的な実施形態では、蛍光体は、Quasar（商標）色素である（Biosearch Technologies Inc.）。蛍光体は、内部サイトも利用可能でありかつ選択された目的のために有用性を有しているものの、核酸の3'-または5'-末端のいずれかに結合されていることが好ましい。蛍光体が結合するどの末端でも、クエンチャーは一般に、その鏡像異性体に、または核酸鎖内部の位置に、結合される。ドナー基は、ドナーのアミダイト誘導体を使用して導入されることが好ましい。代替的に、反応性官能基を備えるドナー基（例えばイソチオシアネート、活性エステルなど）が、反応性官能基との反応を通して、核酸（例えば、ヘキシルアミン）に結合されるテザーまたはリンカーアーム上に導入することが可能である。

40

【0099】

さらに別の実施形態では、ドナー部分を、誘導体化合物担持体の使用により、核酸の3'-末端に取り付けることが可能である。例えば、TAMRA（テトラメチルローダミンカルボン酸）は、この蛍光体の類似体で誘導体化される固体担持体を使用して、核酸の3'-末端に結合される（Biosearch Technologies Inc.）。

【0100】

50

小型分子の核酸に対する接合に関する文献の充実した本文を考慮すれば、ドナー/アクセプター対を核酸に結合させる他の多くの方法が、当業者にとって明らかである。例えば、ローダミン及びフルオレセイン色素は、ホスホラミダイト部分により誘導体化される色素により、固相合成の終結の際、核酸の5'-ヒドロキシルに便宜に結合される(例えば、Wooらの米国特許第5,231,191号;及びHobbs, Jr.の米国特許第4,997,928号を参照のこと)。

#### 【0101】

すなわち、以下の基準により例証されるように、基を核酸の5'-または3'-末端に結合させるための多くのリンカー部分及び方法論が存在する: Eckstein, editor, *Nucleic acids and Analogues: A Practical APPROACH* (IRL Press, Oxford, 1991); Zuckerman et al, *Nucleic Acids Research*, 15: 5305-5321 (1987) (3'-thiol Group on nucleic acid); Sharma et al, *Nucleic Acids Research*, 19: 3019 (1991) (3'-sulfhydryl); Giusti et al, *PCR Methods and Applications*, 2: 223-227 (1993) ならびに、Fungら、米国特許第4,757,141号(P.E. Biosystems (カリフォルニア州)から利用可能なAminolink (商標) IIを介した5'-リン酸アミノ基。); Stabinsky、米国特許第4,739,044号(3-アミノアルキルホスホリル基); Agrawalら、*Tetrahedron Letters*, 31: 1543-1546 (1990) (アミド亜リン酸エステル結合を介した結合); Sproatら、*Nucleic Acids Research*, 15: 4837 (1987) (5-メルカプト基); Nelsonら、*Nucleic Acids Research*, 17: 7187-7194 (1989) (3'-アミノ基)、など。

#### 【0102】

蛍光標識を検出する手段は、当業者には周知である。従って、例えば、蛍光標識は、適切な波長の光で蛍光体を励起し、派生した蛍光を検出することにより、検出することが可能である。電荷結合素子(CCD)または光電子増倍管等の電子検出部の使用により、蛍光を、写真フィルムにより視覚的に検出することが可能である。同様に、酵素及び派生した反応生成物を検出するために、適切な基板を提供することにより、酵素の標識を検出してもよい。

反応性官能基

#### 【0103】

本発明の化合物の要素(例えばリンカー、ヌクレオシド、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、核酸、キャリア分子及び固体担持体)は、第1の反応性官能基及び第2の反応性官能基の反応により形成される結合サイトに、結合してもよい。反応性官能基は、相補的反応性であり、これらが、ここに結合サイトと呼ばれる化合物の2つの要素の間で反応して、共有結合性結合を形成する。例えば、RxまたはRsが反応性官能基である式(I)または(II)に従った化合物を、他の要素(例えばリンカー、ヌクレオシド、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、核酸、キャリア分子及び固体担持体)上で、相補的反応性の反応性官能基と反応させて、派生結合サイトを介して要素を共有結合させることが可能である。相補的反応性の反応性官能基を、他の要素(リンカー、ヌクレオシドその他)の任意の位置、例えば、アルキルもしくはヘテロアルキル、アリールもしくはヘテロアリール核、または、アリールもしくはヘテロアリール核上の置換基、に位置させることが可能である。様々な実施形態において、反応基を、アルキル(もしくはヘテロアルキル)または置換アルキル(もしくはヘテロアルキル)鎖に結合させる際、反応基をこの鎖の末端位置に位置させることが好ましい。

#### 【0104】

本発明を行うために有用な反応の反応基及び階層は一般に、生体共役反応化学における当該技術分野で周知である。本発明のオリゴマーの反応前駆体に対して利用可能な反応の

階層は、比較的穏やかな条件の下で進行することが好ましい。求核置換（例えばハロゲン化アシルによるアミン及びアルコールの反応、活性エステル）、求電子置換（例えばエナミン反応）及び炭素 - 炭素及び炭素 - 異種原子複合結合への付加（例えばミカエル反応、ディールス・アルダー付加）が、非限定的に含まれる。これら及び他の有用な反応は、例えば、March, ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY, 3rd Ed., John Wiley & Sons, New York, 1985; Hermanson, BIOCONJUGATE TECHNIQUES, Academic Press, San Diego, 1996; 及び、Feeney et al, MODIFICATION OF PROTEINS; Advances in Chemistry Series, Vol. 198, American Chemical Society, Washington, D.C., 1982で議論される、

10

## 【0105】

一例として、本発明における有用な反応性官能基は、非限定的に、オレフィン、アセチレン、アルコール、フェノール、エーテル、酸化物、ハロゲン化物、アルデヒド、ケトン、カルボン酸、エステル、アミド、シアネート、イソシアネート、チオシアン酸エステル、イソチオシアネート、アミン、ヒドラジン、ヒドラゾン、ヒドラジド、ジアゾ、ジアゾニウム、ニトロ、ニトリル、メルカプタン、スルフィド、ジスルフィド、スルホキシド、スルホン、スルホン酸、スルフィン酸、アセタール、ケタール、無水物、硫酸塩、スルフェン酸イソニトリル、アミジン、イミド、イミダート、ニロン、ヒドロキシルアミン、オキシム、ヒドロキサム酸チオヒドロキサム酸、アレン、オルトエステル、亜硫酸エステル、エナミン、イナミン、尿素、イソ尿素、セミカルバジド、カルボジイミド、カルバメート、イミン、アジド、アゾ化合物、アゾキシ化合物、及び、ニトロソ化合物を含む。また、反応性官能基は、例えばN - ヒドロキシスクシンイミドエステル、マレイミド等の生体共役反応を調製するために使用されるこれらを含んでいる。これらの官能基の各々を調製する方法は、当該技術分野で周知であり、これらの特定の目的の用途または修飾は、当業者の能力の範囲内である（例えば、Sandler and Karo, eds. ORGANIC FUNCTIONAL Group PREPARATIONS, Academic Press, San Diego, 1989を参照されたい）。

20

## 【0106】

有用な反応性官能基変換としては、例えば、以下を含んでいる：

30

(a) 非限定的な例として活性エステル（例えばN - ヒドロキシスクシンイミドエステル、N - ヒドロキシベンズトリアゾールエステル、チオエステル、p - ニトロフェニルエステル）、酸ハロゲン化物、アシルイミダゾール、アルキル、アルケニル、アルキニル及び芳香族エステルを含む、様々な誘導体に容易に変換されるカルボキシル基；

(b) エステル、エーテル、ハロゲン化物、アルデヒド等に変換可能な水酸基；

(c) 後にハロゲン化物をアミン、カルボキシレートアニオン、チオールアニオン、カルバニオンまたはアルコキシドイオン等の求核基に置換することにより、ハロゲン原子の部位で新しい基の共有結合性結合とすることが可能なハロアルキル基；

(d) マレイミド基等、ディールス アルダー反応に参加することが可能なジエノフィル基；

40

(e) 以降の誘導体化が、イミン、ヒドラゾン、セミカルバゾンまたはオキシム等のカルボニル誘導体の形成を通して可能であり、又はグリニヤール付加またはアルキルリチウム付加としての機構を通して可能である、アルデヒドまたはケトン基；

(f) 例えばスルホンアミドを形成するための、アミンによる後続反応を行う、スルホニルハロゲン化物基；

(g) 例えばジスルフィドに変換可能またはハロゲン化アシルと反応可能な、チオール基；

(h) 例えばアシル化が可能、アルキル化が可能、または酸化が可能な、アミンまたはスルフヒドリル基；

(i) 例えば付加環化、アシル化、マイケル付加等を経ることが可能な、アルケン；

50

(j) 例えばアミン及びヒドロキシル化合物と反応することが可能なエポキシド；及び、

(k) 核酸合成に有用なホスホラミダイト及び他の標準官能基。

【0107】

反応性官能基を選択して、これらが本発明のオリゴマーを組立てるのに必要な反応物に参加せず、またはそれに干渉しなくなるようにすることが、可能である。代替的に、反応性官能基を、保護基の存在により反応に関与することから保護することが可能である。選択した一組の反応条件は妨げないためには、どのように官能基を保護すればよいかを、当業者は理解する。有用な保護基の例としては、例えば、GreeneらによるPROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS, John Wiley & Sons, New York, 1991を参照されたい。

10

共有結合部分

【0108】

オリゴマーと標的配列との間に共有結合を少なくとも一つ生じさせることが可能な反応性官能基部分が、本発明のオリゴマーの一部に含まれる。また、これら多数の部分を提供することによっても、複合の共有結合を形成されることが可能である。共有結合は、ターゲット鎖内の核酸塩基残留物に存在していることが好ましいが、糖または燐酸ジエステルを含む、ターゲットの他の部分で作製することも可能である。架橋剤を生じるこの部分の反応性は、二重鎖内のターゲットの性質を決定する。架橋剤部分がアシル化薬剤及びアルキル化薬剤を含むことが好ましく、特に、鎖内のターゲット位置での反応を可能にするように、配列特異性をもたらす部分に関連して配置されることが好ましい。

20

【0109】

架橋剤部分が、オリゴマーのシーケンスにおいて、類似のピリミジンまたはプリン残留物として便宜に配置されることが可能である。この配置は、5'-及び/または3'-末端に、シーケンスの内部に、または、上記の組合せに、配置することが可能である。末端に配置して、柔軟性を上げることができることが、推奨される。また、類似した部分を、ペプチド主鎖に結合させることも可能である。

【0110】

本発明に有用なアルキル化部分の例としては、N<sup>4</sup>, N<sup>4</sup>-エタノシトシン及びN<sup>6</sup>, N<sup>6</sup>-エタノアデニンを含んでいる。

30

【0111】

核酸塩基が必ずプリンまたはピリミジンとはならないことが明らかであり；実際、反応性機能を取り付ける部分は、核酸塩基である必要はなく、糖、リンカー、クエンチャー、安定化部分、蛍光体、または本発明のオリゴマーのこれらの要素の一部の組合せであってもよい。任意の反応基を結合させる手段は、位置決めが適切である限りにおいて、十分である。

合成

【0112】

本発明の化合物（例えば固体担持体、モノマー（例えばホスホラミダイト）、及び、本発明のオリゴマーまたはそのセグメント）は、一般に従来方式で合成される。例えば、米国特許第7,019,129号；米国特許第8,466,266号；及び米国特許第7,879,986号を参照されたい。当該技術分野で知られかつここに記載される合成方法を使用し、適切に保護されたヌクレオモノマーを用いて、本発明の化合物を含むオリゴマー、ならびに当該技術分野で知られる他の核酸塩基を、合成することが可能である。オリゴマーの合成のための方法は、例えば、Froehler, B., et al, Nucleic Acids Res. (1986) 14:5399-5467; Nucleic Acids Res. (1988) 16:4831-4839; Nucleosides and Nucleotides (1987) 6:287-291; Froehler, B., Tetrahedron Letters (1986) 27:5575-5578; Caruthers, M. H. in Oligodeoxynucleot

40

50

ides - Antisense Inhibitions of Gene Expression (1989), J. S. Cohen, editor, Crc Press, Boca Raton, p7 - 24; Reese, C. B. et al, Tetrahedron Letters (1985) 28:2245 - 2248、に見出される。メチルホスホンアミダイト化学を通じた、メチルホスホナートリンクオリゴマーの合成が、記載された (Agrawal, S. et al, Tetrahedron Letters (187) 28:3539 - 3542; Klem, R. E., et al, International Publication Number WO 92/07864)。

**【0113】**

本発明の様々な化合物の例示的な合成が、図2及び実施例1に記載される。

**【0114】**

例示的な実施形態では、ヌクレオモノマーは、標準合成条件及び試薬を用いて、オリゴマーまたはその利便なフラグメントに直接統合される。この方法により作製される例示的な結合は、磷酸ジエステル、ホスホロチオネート、リンアミダイト、メチルホスホナート、ホスホロジチオエート、炭酸塩、モルホリノカルバメート及びスルホン酸エステルを含んでいる。

**【0115】**

様々な実施形態において、合成は、適切な前駆体から開始するショートなシントンの(ダイマー、トリマー等)の合成を含んでいる。このアプローチは、N-メチルヒドロキシルアミン、ジメチルヒドラゾ、スルファミン酸塩、カルバメート、スルホン酸エステル、スルホンアミド、ギ酸アセタールチオギ酸アセタール及び炭酸塩を含む結合の合成には、適切である。

**【0116】**

本発明のオリゴマーは、アミダイト、トリエステルまたは水素ホスホナートの結合方法及び条件を含む任意の適切な化学により合成することが可能である。オリゴマーは、適切な開始シントンから合成されることが好ましく、これは、DMT、MMT、FMOC(9-フルオレニルメトキシカルボニル)、PACO(フェノキシアセチル)、TBDMS(t-ブチルジフェニルシリル)またはTMS(トリメチルシリル)等のシリルエーテルと、5'-位置で保護されていること、及び、エステル、H-ホスホナート、-シアノエチルホスホラミダイト等のアミダイト、TBDMSまたはTMS等のシリルエーテル、またはt-ブチルジフェニルと、3'-位置で活性化されることが、好ましい。代替的に、例えばブロックされた5-ヨード-2'-デオキシウリジン、5-ヨード-2'-O-アルキルウリジン、5-臭化-2'-デオキシウリジン、5-トリフルオロメタンスルホン酸塩-2'-デオキシウリジン、5-臭化-2'-O-アルキルウリジン、又は、ブロックされ保護された5-ヨード-2'-デオキシシチジン、5-ブロモ-2'-デオキシシチジン、5-トリフルオロメタンスルホン酸塩-2'-デオキシシチジン、5-ヨード-2'-O-アルキルシチジン、5-ブロモ-2'-O-アルキルシチジン等の、適切なウリジンまたはシチジン前駆体は、その後誘導体化されて適切なシントン及びロングのオリゴマーを産出するダイマー、トリマー、テトラマー、五量体またはロングのシントン等のショートなオリゴマーに、便宜に統合することが可能である。

**【0117】**

約4以上のヌクレオモノマー残留物を含んだオリゴマーの例示的な合成が、適切な結合基をアミダイト、H-ホスホナートまたはトリエステル化学の用途に輸送するモノマー、ダイマーまたはトリマー等のシントンを用いて、達成される。シントンを使用して、磷酸ジエステルまたは磷酸ジエステル以外の燐を含む結合(例えばホスホロチオネート、メチルホスホナート、チオノーメチルホスホナート、アミド亜リン酸エステル等)を通して、オリゴマーの要素を結合することが可能である。

**【0118】**

他の非燐含有置換結合の合成は、当該技術分野で知られる適切な前駆体を用いて達成す

10

20

30

40

50

ることが可能である。

【0119】

所望の核酸を合成した後、固体担持体上にこれを合成した及び処理した場合の固体担持体から、当該技術分野で知られる方法によりこれを切断して、存在する任意の保護基を除去する（例えば60、5時間、濃縮アンモニア）ことが好ましい。塩基感受性基を核酸（例えば、TAMRA）に結合させる実施形態において、脱保護は、より穏やかな条件（例えばブチルアミン：水が1：3、8時間、70）を使用することが好ましいだろう。これらの条件の下の脱保護は、高速脱保護アミダイト（例えばdc-アセチル、dg-dmf）の使用により促進される。

【0120】

担持体及び脱保護からの開裂の後、クロマトグラフィ、抽出及びゲル精製を含む当該技術分野で知られる任意の方法により、核酸は精製される。好ましい実施形態では、HPLCを使用して核酸を精製する。分光光度計により260nmで光学濃度を測定することにより、単離した核酸の濃度及び純度を決定することが好ましい。

本発明の分析及びオリゴマープローブ

【0121】

様々な実施形態において、本発明は、1つ以上のアッセイフォーマットで有用なオリゴマーを提供する。選択された実施形態では、オリゴマーは、そのターゲットとの結合またはそのターゲットからの分離に関する検出可能な信号の発生に関与する。本発明のオリゴマープローブは、任意の特定のアッセイフォーマットに使用中に限定されていない。したがって、以下の説明は、本発明のオリゴマーの使用を見出す典型的な分析フォーマットを例示することを意図するものであり、オリゴマーが有用な分析フォーマットは制限するという意図するものではない。

分析

【0122】

以下の議論は一般に、ここに記載される分析に関連する。この議論では、所定の好ましい実施形態への基準により本発明を例示することを意図するものであり、本発明の化合物が使用を見出すプローブ及び分析タイプの範囲を制限することと解釈されてはならない。本発明の化合物を利用する他のアッセイフォーマットは、当業者にとって明らかである。

【0123】

一般に、例えば未知数の核酸等、標的分子の濃度を決定するため、一定量のプローブが、既知量の範囲に亘った核酸標準で接触する参考データを入手することが好ましい。それぞれの基準混合物からの蛍光発光の強さを用いて、グラフまたは標準曲線を誘導し、ここでは、未知の濃度を、既知の標準の強さと比較する。例えば、プローブは以下である：a)は、ターゲット核酸の内部でシーケンスにハイブリダイズする；b)は、標識の部位である5'及び3'末端で、蛍光体及びクエンチャー修飾を有している；及び、c)は、未結合の立体構造内でクエンチした後に、ターゲット核酸に結合する際に信号をリリースする、蛍光発生特性を有しており、この参考データを得るために使用することが可能である。このようなプローブは、特性蛍光発光を与え、ここでは、ターゲット核酸の濃度が増加すれば、信号が増加する。その後、未知量のターゲットを有するサンプルがプローブと接触し、混合物からの蛍光強度が決定される。その後、蛍光発光の強度を参照標準と比較して、試験混合物内のターゲットの濃度を得る。

複合解析

【0124】

他の実施形態では、混合物内で1つ以上の化学種を検出するために複合分析で用いるプローブまたは1つ以上のプローブの構成要素として、本発明の固体担体及びオリゴマーを利用する。

【0125】

本発明の固体担体またはオリゴマーに基づくプローブは、複合型の解析及び分析を実行する際に、特に有用である。典型的な複合解析においては、2つ以上のプローブを用いて

10

20

30

40

50

、2つ以上の異なった化学種（または1つ以上の化学種の領域）を検出するが、そこでは、プローブのそれぞれには、別々の蛍光体についてのラベルがついている。ドナー・アクセプターのエネルギー移動に頼った複合解析において用いられる好ましい化学種は、少なくとも2つの基準を満たす：蛍光化学種は明瞭であり、良好にスペクトルで分割されること；及び、蛍光化学種とクエンチャーとの間のエネルギー移動は、効率的であること、である。

**【0126】**

本発明の固体担体及びオリゴマーは、多重化分析のデザインを可能とし、そこでは、2以上の蛍光リポーターを、1つ以上のクエンチャー構造と組み合わせる。発明の固体担体またはオリゴマーを用いた多くの別々の多重化分析は、当該技術分野の1つには明らかになるだろう。1つの例示的な分析では、少なくとも2の異なった蛍光リポーターのそれぞれを、それらの各オリゴマー上の同じタイプのクエンチャー構造と組み合わせて、FRETまたは接触クエンチングのいずれかを介して信号を調整する。代替的に、少なくとも2の異なる蛍光リポーターのクエンチャー構造が異なるように組み込まれる分析を行うことが可能であり、そこでは、これら蛍光特性がより適切に「マッチング」する。蛍光体は、クエンチャーとしての同じ分子に、または、別々の分子に密接に結びついてよい。さらに、クエンチャー及び蛍光体に同様に、例えば蛍光体とクエンチャーとを共有結合により鎖で結びつけるオリゴシケンス等、特定の分析システムに有用なキャリア分子は、同じ又は別々のいずれかとすることが可能である。

**【0127】**

上述の混合物に加えて、本発明はまた、特定の分子化学種の存在を検出するための質的方法を提供する。この方法は、以下を含む：(a)化学種を、本発明の固体担体またはオリゴマーを含有する混合物に接触させること；及び(b)生じる混合物の1つ以上の構成要素の蛍光特性における変化を検出して、分子化学種の存在を検出すること。

**【0128】**

ドナー・アクセプターのエネルギー移動を用いた2つ以上のプローブの同時使用は、従来技術で知られている。例えば、シケンス選択性の異なる核酸プローブを用いる複合分析が、記載されていた。蛍光プローブは、個体が、特定の変異に対して同型接合性野生体か、同型接合性変異体か、または異型かにつき、決定するために用いられてきた。例えば、一方の野生型シケンスを認識するクエンチされたフルオレセイン分子ビーコン及び他方の突然変異対立遺伝子を認識するローダミンをクエンチされた分子ビーコンを用いて、*ケモカインレセプターのための遺伝子型個体が可能である (Kostrikis et al. Science 279: 1228 - 1229 (1998))*。フルオレセイン信号のみの存在は、個体が野生型であることを示すものであり、ローダミン信号のみの存在は、個体がホモ接合の変異体であることを示すものである。ローダミン及びフルオレセイン信号の存在は、ヘテロ接合体診断である。*Tyagi et al. Nature Biotechnology 16: 49 - 53 (1998)*は、対立遺伝子識別のための4つの標識の異なる分子ビーコンの同時使用を記載し、*Lee et al, BioTechniques 27: 342 - 349 (1999)*は、6つのPCR製品の7色の同種検出を記載した。

**【0129】**

本発明のクエンチャーは、実質的に任意の種を検出および/または定量化するように設計された複合的な分析に使用することが可能であり、この任意の種は例えば、細胞全体、ウイルス、タンパク質（例えば酵素、抗体、レセプター）、グリコプロテイン、リポタンパク質、細胞小器官粒子、生物体（例えばサルモネラ）、核酸（例えばDNA、RNA及びその類似体）、多糖類、リボポリサッカリド、脂質、脂肪酸、非生物重合体、及び、小型分子（例えば毒素、ドラッグ、農薬、メタボライト、ホルモン類、アルカロイド、ステロイド）を含んでいる。

核酸プローブ

**【0130】**

本発明の固体担持体及びオリゴマーは、有効な核酸プローブであり、これらは、例えば、5'-ヌクレアーゼアッセイ、鎖置換増幅(SDA)、核酸一次構造ベース増幅(NASBA)、ローリングサークル増幅(RCA)を含んだ、様々なDNA増幅/数量化戦略の検出薬剤の要素として用いることができ、ならびに、溶液相または固相(例えばアレイ)分析におけるターゲットの直接検出のために用いることができる。更に、固体担持体及びオリゴマーは、実質的にいずれかのフォーマットのプローブで用いることが可能であり、例えば、分子ビーコンから選択されるフォーマット、スコピオンプローブ(商標)、サンライズプローブ(商標)、配座アシストプローブ、着火プローブ、インベーター検出プローブ及びタックマン(商標)プローブが含まれる。例えば、Cardullo, R., et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 8790-8794 (1988); Dexter, D.L., J. Chem. Physics, 21: 836-850 (1953); Hochstrasser, R.A., et al, Biophysical Chemistry, 45: 133-141 (1992); Selvin, P., Methods in Enzymology, 246: 300-334 (1995); Steinberg, I., Ann. Rev. Biochem., 40: 83-114 (1971); Stryer, I., et al, Ann. Rev. Biochem., 47: 819-846 (1978); Wang, G., et al, Tetrahedron Letters, 31: 6493-6496 (1990); Wang, Y., et al, Anal. Chem., 67: 1197-1203 (1995); Debouck, C., et al, in supplement to nature genetics, 21: 48-50 (1999); Rehman, F.N., et al, Nucleic Acids Research, 27: 649-655 (1999); Cooper, J.P., et al, Biochemistry, 29: 9261-9268 (1990); Gibson, E.M., et al, Genome Methods, 6: 995-1001 (1996); HOCHSTRASSER, R.A., et al, Biophysical chemistry, 45: 133-141 (1992); Holland, P.M., et al, Proc Natl Acad. Sci US A, 88: 7276-7289 (1991); Lee, L.G., et al, Nucleic Acids Resck, 21: 3761-3766 (1993); Livak, K.J., et al, PCR Methods and Applications, Cold Spring Harbor Press (1995); Vamosi, G., et al, Biophysical Journal, 71: 972-994 (1996); Wittwer, C.T., et al, Biotechniques, 22: 176-181 (1997); Wittwer, C.T., et al, Biotechniques, 22: 130-38 (1997); Giesendorf, B.A.J., et al, Clinical Chemistry, 44: 482-486 (1998); Kostrikis, L.G., et al, Science, 279: 1228-1229 (1998); Matsuo, T., Biochemica et Biophysica Acta, 1379: 178-184 (1998); Piatek, A.S., et al, Nature Biotechnology, 16: 359-363 (1998); Schofield, P., et al, Appl. Environ. Microbiology, 63: 1143-1147 (1997); Tyagi S., et al, Nature Biotechnology, 16: 49-53 (1998); Tyagi S., et al, Nature Biotechnology, 14: 303-308 (1996); Nazarenko, L.A., et al, Nucleic Acids Research, 25: 2516-2521 (1997); Uehara, H., et al, Biotechniques, 26: 552-558 (1999); D. Whitcombe, et al, Nature Biotechnology, 17: 804-

807 (1999); Lyamichev, V., et al, Nature Biotechnology, 17:292 (1999); Daubendiek, et al, Nature Biotechnology, 15:273-277 (1997); Lizardi, P.M., et al, Nature Genetics, 19:225-232 (1998); Walker, G., et al, Nucleic Acids Res., 20:1691-1696 (1992); Walker, G.T., et al, Clinical chemistry, 42:9-13 (1996); 及び、Compton, J., Nature, 350:91-92 (1991)、を参照されたい。

【0131】

従って、本発明は、核酸標的配列を検出するための方法を提供する。本方法は、以下を含む：(a) 標的配列を検出部核酸（例えば本発明のオリゴマー）に接触させること；(b) ターゲット結合シーケンスを標的配列にハイブリダイズし、それにより検出部核酸の立体構造を改質し、蛍光パラメータを変化させること；及び、(c) 蛍光パラメータの変化を検出し、それにより核酸標的配列を検出すること。

【0132】

ここに記載される方法では、特に明記しない限り、好ましい検出部核酸は、一本鎖ターゲット結合シーケンスを含んでいる。結合配列は：i) 蛍光体；及び ii) クエンチャーを、それに結合した。結合配列は、任意にさらに、安定化部分をそれに結合した。さらに、その相補配列へのハイブリダイゼーションに先立ち、検出部核酸は、蛍光体が励起される際に、蛍光体とクエンチャーとの間へのドナー・アクセプターエネルギー移動ができるようにする立体構造であることが好ましい。更に、このセクションに記載される方法のそれぞれにおいて、蛍光の変化は、標的配列の存在の徴候として検出される。蛍光の変化は、実時間での検出であることが好ましい。

【0133】

現在好ましい核酸プローブは、官能基に対するプローブのための二次構造を採用する核酸を、必要とはしていない。この方法では、そして、このセクションに記載される他の方法を特に明記しない限り、検出部核酸は、いずれかの分子内に結合された二次構造を引き受けることが実質的に可能であるが、この構造は、ヘアピン、ステム-ループ構造、プソイドノット、三重螺旋及び配座的にアシストされた構造から選択される部材であることが好ましい。さらに、分子内塩基対の二次構造は、ターゲット結合シーケンスの部分を備えていることが好ましい。

【0134】

別の態様では、本発明は、標的配列の増幅を検出するための方法を提供する。この方法は、増幅反応（例えばPCR）の使用を含んでいる。例示的な増幅反応は、以下のステップの一つ以上を含んでいる：

(a) 標的配列の側面に位置するPCRプライマーを有する対象とする標的配列を備えるサンプル核酸を、ハイブリダイズすること；

(b) 重合酵素でハイブリダイズされたプライマーを拡張して、PCR製品を製作すること、及び、PCR製品の二鎖を分離して、標的配列の知覚及びアンチセンス鎖を利用可能にすること；

(c) 検出部核酸を、PCR製品内の標的配列の知覚またはアンチセンス鎖にハイブリダイズすること、

ここで、検出部核酸は：

i) PCR製品内の標的配列の知覚またはアンチセンス鎖の少なくとも一部に相補的であり、かつ、PCRプライマーの間の領域にハイブリダイズする、一本鎖ターゲット結合シーケンス；

ii) 蛍光体；及び

iii) 本発明のクエンチャー；を含み、

ここで、その標的配列へのハイブリダイゼーションの前に、検出部核酸は、蛍光体が

10

20

30

40

50

励起される際、蛍光体とクエンチャーとの間にドナー・アクセプターエネルギー移動ができるようにする立体構造であり；

それにより、検出部核酸の立体構造を改質（例えば、クエンチング能率に貢献する任意の二次構造またはランダムコイル立体構造を線形化）して、蛍光パラメータ（例えば信号強度）を変化させること；及び

（d）蛍光パラメータの変化を測定して、標的配列及びその増幅を検出すること。任意に、重合酵素が、プライマー伸長（上記のステップ（b））の間にハイブリダイズ検出部核酸に遭遇し、かつ、重合酵素の二次ヌクレアーゼ活性を経由する等により蛍光体及びクエンチャーを結合するオリゴマーを加水分解する場合に、蛍光パラメータの変化を、永続的とすることが可能となる。

10

#### 【0135】

その上更なる実施形態では、本発明は、第1の核酸及び第2の核酸がハイブリダイズするか否かを確認する方法を提供する。この方法では、第1の核酸は、本発明に従ったオリゴマー（溶液内のまたは固体担持体に結合する）である。方法は、以下を含む：（a）第1の核酸を第2の核酸に接触させること；（b）第1の核酸、第2の核酸及びその組合せから選択される部材の蛍光特性内で変更を検出して、それによりハイブリダイゼーションが発生するか否かを確認すること。

#### 【0136】

様々な実施形態において、本発明は、核酸標的配列内で多型を検出する際に有用なプローブ及び方法を提供する。多型は、ある集団内で2以上の遺伝的が与えられた選択すべきシーケンスまたは対立遺伝子の発生のことをいう。多型マーカーまたは部位は、発散が生じる場所である。好ましいマーカーは、少なくとも2つの対立遺伝子を有しており、そのそれぞれは1%を超える頻度で生じ、より好ましくは選択された集団の10%を超えるまたは20%で生じている。多型場所は、1つの塩基対と同程度に小さくてもよい。多型マーカーは、制限断片長多形性、タンデムリピート（VNTRの）変数、高度変異部、ミニサテライト、ジヌクレオチド反復、トリヌクレオチド反復、テトラヌクレオチド反復、単純なシーケンス反復、及び、Alu等の挿入配列、を含んでいる。第1の識別された対立遺伝子の形態は、基準形態に任意に指定され、他の対立遺伝子の形態は、選択すべきまたは変形の対立遺伝子に指定される。選択された集団内で最も高い頻度で生じる対立遺伝子の形態は、野生型形態と時折いわれる。2倍体生物は、対立遺伝子の形態に対する同種接合または異種接合体であってもよい。2対立遺伝子の多型は、2つの形態を有する。3対立遺伝子の多型は、3つの形態を有する。

20

30

#### 【0137】

例示的な実施形態では、本発明のプローブは、単一ヌクレオチド多型を検出するために利用される。単一ヌクレオチド多型は、単一ヌクレオチドにより占められる多型部位で生じ、これは対立遺伝子のシーケンス間での変形物の部位である。部位は通常、対立遺伝子が高度に保存されたシーケンスにより先行され、それにより追従される（例えば、集団の1/100または1/1000未満の部材で変化するシーケンス）。単一ヌクレオチド多型は通常、多型部位における他のものに対する1つのヌクレオチドの置換が原因で、発生する。移行は、他のプリンによる1つのプリンの置換、または、他のピリミジンによる1つのピリミジンの置換である。転換は、ピリミジンによるプリンの置換、またはその逆である。単一ヌクレオチド多型は、基準対立遺伝子に関連した、ヌクレオチドの削除、またはヌクレオチドの間挿から生じることも可能である。

40

#### 【0138】

クエンチャー及び蛍光体を支持する本発明のオリゴマーを用いることが可能であり、または代替的には、1つ以上の核酸を単独でエネルギー移動対（例えばクエンチャーまたは蛍光体）の単一部材で標識することが可能である。単独でクエンチャーで標識される核酸がプローブである場合、クエンチャーと核酸との間で相互作用を観察することにより、またはより好ましくは、第2の核酸に結合される蛍光体の蛍光のクエンチャーによりクエンチングを行うことにより、第1核酸と第2の核酸との間の相互作用を検出することが可能

50

である。

【0139】

ある実施形態では、本発明のクエンチャーと蛍光体との間の基底状態複合体が形成される。例示的な実施形態では、クエンチャー及び蛍光体が、同じ核酸オリゴマーに接合される。

【0140】

核酸の増幅、多型、及び、検出ならびに数量化を研究するように設計されたプローブのそれらの一般的な有用性に加えて、本発明の固体担持体及びオリゴマーは、ここで知らるまたは後に発見される実質的にいずれかの核酸プローブフォーマットで用いられることが可能である。例えば、本発明の固体担持体及びオリゴマーを、プローブモチーフに統合することが可能であり、例えばタックマン(商標)プローブ(Held et al., Genome Res. 6: 986-994 (1996), Holland et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 88: 7276-7280 (1991), Lee et al., Nucleic Acids Res. 21: 3761-3766 (1993)), 分子ビーコン(Tyagi et al., Nature Biotechnology 14: 303-308 (1996), Jayasenaらの1999年11月23日出願の米国特許第5,989,823号)、スコーピオンプローブ(Whitcomb et al., Nature Biotechnology 17: 804-807 (1999)), サンライズプローブ(Nazarenko et al., Nucleic Acids Res. 25: 2516-2521 (1997)), 配座的にアシストされたプローブ(Cook, R.の出願中の及び同一出願人による1999年6月9日出願の米国特許出願第2007/0059752号)、ペプチド核酸(PNA)-ベースのライトアッププローブ(Kubista et al., WO 97/45539, December 1997), 二本鎖特異的DNA色素(Higuchi et al., Bio/Technology 10: 413-417 (1992), Wittwer et al., BioTechniques 22: 130-138 (1997)), 等である。本発明のクエンチャーを用いることが可能な、これら及び他のプローブモチーフが、NONISOTOPIC DNA PROBE TECHNIQUES, Academic Press, Inc. 1992により検討されている。

【0141】

本発明のプローブに用いられるオリゴマーは、任意の適切なサイズとすることができ、好ましくは約2~約100のヌクレオチドの範囲であり、さらに好ましくは約10~約80のヌクレオチド、なお好ましくは約10~約40のヌクレオチドである。二重標識(蛍光体-クエンチャー)されたプローブでは、ドナー部分は、少なくとも約6、好ましくは少なくとも8、好ましくは少なくとも10のヌクレオチド、さらに好ましくは少なくとも約15のヌクレオチドで、クエンチャーから分離されることが好ましい。様々な実施形態において、ドナー部分は、プローブの3'-または5'-ターミナルヌクレオチドのいずれかに、結合されることが好ましい。また、クエンチャー部分は、プローブの3'-または5'-ターミナルヌクレオチドのいずれかに、結合されることが好ましい。より好ましくは、ドナー及びアクセプター部分は、プローブの3'-または5'-又は5'-または3'-ターミナルヌクレオチドにそれぞれ結合されるが、内部配置も有効である。

【0142】

本発明の核酸プローブの正確なシーケンス及び長さは、それが結合するターゲットポリヌクレオチドの性質に、ある程度左右される。結合位置及び長さを変化させて、特定の実施形態のために適切なアニーリング及び溶融特性を実現してもよい。このデザイン選択を作製するためのガイダンスを、多くの芸術認識基準に見出すことが可能である。

【0143】

ある実施形態では、核酸プローブの3'末端ヌクレオチドは、核酸重合酵素により、ブロックされまたは伸張ができなくなる。このブロッキングは、直接によるか、またはリンカー部分によるかのいずれか一方による、核酸プローブの末端3'-位置へのドナーまた

10

20

30

40

50

はアクセプター部分の付着により、便宜に遂行される。

【0144】

核酸は、DNA、RNA、もしくはキメラ型混合物、または、誘導体またはその変性バージョンを備えることが可能である。プローブ及びターゲット核酸は、一本鎖、二重鎖、三本鎖その他として存在することができる。さらに、核酸は、核酸塩基部分、糖部分、または、例えば放射性標識、副溝バインダー、挿入剤、アセチレン化不飽和炭化水素、蛍光アルキル基、ドナー及び/またはアクセプター部分等の他の基によるホスファート主鎖により、改質することが可能である。

【0145】

本発明のオリゴマーは、別々のシーケンスであるプライマーとして、またはランダムなシーケンスによるプライマーとして、有効である。ランダムなシーケンスプライマーは、一般に長さが約6または7のヌクレオモノマーである。このプライマーは、様々な核酸増幅プロトコル（PCR、合成酵素鎖反応その他）に、またはクローン化プロトコルに用いることが可能である。本発明の5'末端上の置換は、プライマーとして機能するオリゴマーのキャパシティを、一般に妨げない。3'末端残留物以外の部位に2'-修飾を有する本発明のオリゴマー、オリゴマーRNAアーゼHを不能にする他の修飾、又は、別の面で安定なヌクレアーゼは、細胞抽出物内またはヌクレアーゼ含有他の溶液内で、RNAまたはDNAの塩基配列のためのプローブまたはプライマーとして有利に用いることが可能である。従って、ターゲット核酸を含むサンプルに、オリゴマーを混合し、その後ターゲット核酸にオリゴマーのハイブリダイゼーションを行い、PCR、LCRまたは他の適切な方法によりターゲット核酸を増幅することにより、サンプル内で核酸を増幅するために、オリゴマーをプロトコルに用いることが可能である。

【0146】

EDTA、DTPAまたは1、2-ジアミノシクロヘキサン酢酸類似体等のキレート薬剤で誘導体化されるオリゴマーは、記載される（米国特許第4,772,548号、第4,707,440号及び第4,707,352号）ように、様々な試験管内での診断分析に利用することが可能である。代替的に、本発明のオリゴマーは、例えば5-(3-ヨードアセトアミドプロブ-1-イル)-2'-デオキシウリジン、又は、5-(3-(4-ブロモブチルアミド)プロブ-1-イル)-2'-デオキシウリジン等の架橋剤薬剤で、誘導体化することが可能であり、記載される（国際特許公開第WO90/14353号）ように、様々なアッセイ方法またはキットで用いられる。

【0147】

前述の用途に加えて、遺伝子形質発現を妨げるオリゴマーの能力は、対象細胞内または組換え型システム内での発現のレベルを任意の適切な方法で測定することにより、試験管内のシステムで実証されることが可能である（Graessmann, M., et al, Nucleic Acids Res. (1991) 19:53-59）。

【0148】

本発明のオリゴマーとターゲット核酸分子との間のハイブリダイゼーションを支持する条件は、当業者による実験で決定することが可能であり、オリゴヌクレオチド類似体プローブの最適な培養温度、塩濃度、長さ、及び核酸塩基組成物、ならびに、サンプルのオリゴマー及び核酸分子の濃度を含むことができる。好ましくは、ハイブリダイゼーションは、少なくとも1ミリモルのマグネシウムの存在下及び6.0を超えるpHで実行される。ある実施形態では、ハイブリダイゼーションの前に、サンプルの核酸分子を一本鎖にするためにサンプルを処理することが、必要でもよく、または望ましくてもよい。この治療の例は、非限定的に、塩基による処理（好ましくは中和により追従される）、高温のインキュベーション、または、ヌクレアーゼによる処理が、含まれる。

【0149】

さらに、核酸へのハイブリダイゼーションの塩依存が、ハイブリダイズオリゴヌクレオチド類似体の主鎖の電荷密度により主として決定されるため、非標準ヌクレオチド類似体を本発明のオリゴマーに結合すれば、ハイブリダイゼーションの塩依存を増減することが

10

20

30

40

50

できる。この調整は、本発明の方法の利点に用いることが可能であり、ここで、例えば塩条件を変化させることにより、ハイブリダイゼーションの厳密性を増大できること、または、塩濃度を低減することにより、ハイブリダイズ核酸をリリースできることを、ある意味では望ましくさせることが可能となる。本発明のさらに他の態様では、極めて少量の塩で、本発明のオリゴヌクレオチド類似体の核酸への結合が高親和性となることを望ましくすることが可能である。この場合、非荷電主鎖部分を有するヌクレオチドモノマーを本発明のオリゴヌクレオチド内に配置することが有利である。

#### 【0150】

ターゲット核酸分子と結合する際の本発明のオリゴマーの選択性の程度が高くなれば、実務家が、1つ以上のオリゴマーの少なくとも一部に対して完全相補的なシーケンスの範囲を備える核酸配列と、実質的補完シーケンス内に少数の非相補的核酸塩基を備えるシーケンスの範囲を備えるターゲット核酸分子との間での識別を支持することが可能な、ハイブリダイゼーション状態を選択することが可能になる。例えば、ハイブリダイゼーションまたは洗浄温度を選択することが可能であり、この選択により、本発明のオリゴマーとターゲット核酸分子との間の安定したハイブリッドを容認するものであり、これはシーケンスの範囲に沿って完全に相補的になるが、他方では、本発明のオリゴマーとターゲット核酸分子との間でのハイブリッドの分離を促進し、これはさほど完全に相補的でなく、補完的なシーケンスの範囲に沿って1または2の核酸塩基のミスマッチを備えていることを含んでいる。他の状態に関して、ハイブリダイゼーション及び洗浄のための温度の選択に、少なくともある程度依存することができ、この状態は例えば、塩濃度、オリゴマー及びターゲット核酸分子の濃度、オリゴマーのターゲット核酸分子に対する相対比率、ハイブリッドされるオリゴマーの長さ、オリゴマーとターゲット核酸分子との核酸塩基組成物、オリゴヌクレオチドの類似体分子のモノマー組成物、等である。さらに、完全相補分子の安定したハイブリッドを支持する状態、及び、1つ以上の核酸塩基により不適當ミスマッチしたオリゴマーとターゲット核酸分子との間で安定したハイブリッドを支持しない状態を、選択する場合、追加的な状態を考慮することが可能となり、そして、望ましい場合、変化した場合は、非限定的に、ハイブリッドされるオリゴヌクレオチド類似体の長さ、オリゴマーとターゲット核酸分子との間の相補性のシーケンスの範囲の長さ、相補性のシーケンスの範囲内での非相補的核酸塩基の数、ミスマッチの核酸塩基の素性、ミスマッチの核酸塩基の近くの核酸塩基の素性、及び、相補性の範囲に沿った任意のミスマッチの核酸塩基の相対的な位置、が含まれる。核酸ハイブリダイゼーションの当業者は、本発明のオリゴマーを用いる際に、特定の用途に依存して、ターゲット核酸分子へのハイブリダイゼーションに対して、好ましいハイブリダイゼーション及び洗浄条件を決定することが可能である。「好ましい状態」は、オリゴマーとターゲット核酸分子との間での安定したハイブリッドを支持する状態とすることができ、これは、少なくとも一部は実質的に相補的であり、1つ以上のミスマッチを備えるものが含まれる。

#### 【0151】

「好ましい状態」は、少なくとも一部が、完全に相補的であるものの、完全に相補的でない分子間の不人気または不安定化のハイブリッドである、オリゴマーとターゲット核酸分子との間で、安定したハイブリッドを支持状態とすることができる。

#### 【0152】

ここに開示される方法等の方法を用い、異なるシーケンスのターゲット核酸分子にハイブリッドされる本発明のオリゴマーの溶解温度を、決定することが可能であり、及び、所定の用途の好ましい状態を決定する際に用いることが可能である。また、例えばターゲット核酸分子を固体担体に取付けられたオリゴマーにハイブリッドし、かつ、ハイブリッドされた複合体を検出することにより、実験的に好ましいハイブリダイゼーション状態を決定することが可能である。

#### 【0153】

本発明の固体担体またはオリゴマープローブに密接に結びつくターゲット核酸分子を、検討個体群が結合しない核酸分子から、固体担体へのオリゴマープローブの直接的または

10

20

30

40

50

間接的な接続品により、便宜かつ効率的に分離することができる。オリゴマープローブに結合しない核酸分子を取り除くため、固体担体を、高い厳密性で洗浄することが可能である。しかしながら、オリゴマープローブの固体担体への接続品は、本発明の必要条件ではない。例えば、一部の用途では、マトリックスによる遠心分離により、または相分離により、または分離の他の形式の一部（たとえば差動沈降）により、結合核酸分子及び不結合核酸分子を分離することが可能であり、これはオリゴマープローブ内に取り込まれる化学基によって任意に援助されてもよい（Nieらによる2000年5月9日に出願の米国特許第6,060,242号を参照されたい）。

#### 核酸キャプチャーのプローブ

##### 【0154】

1つの実施形態では、クエンチャーを備える固定化核酸は、キャプチャープローブとして用いられる。固定化核酸は、安定化部分を任意に更に含んでいる。例えば、プローブの固体担体への3'-または5'-末端ヌクレオチドの接続品により、核酸プローブを固体担体に直接取付けることができる。しかしながら、より好ましくは、プローブはリンカー（上記）により、固体担体に接続されている。リンカーは、プローブを固体担体から遠ざける役目を果たす。リンカーは、最も望ましくは長さで約5～約30原子であり、望ましくは長さで約10～約50原子である。

##### 【0155】

様々な実施形態において、固体担持体はまた、オリゴマー（プローブ）を調製する際の合成担持体として用いられる。固体担持体と第1の核酸の3'-ユニットとの間でのリンカーの長さ及び化学的安定性は、サポート結合した核酸の効率的な合成及びハイブリダイゼーションに、重要な役割を果たす。オートメーション化した合成の間に、高収率（>97%）を実現できるよう、リンカーアームは十分に長いことが好ましい。リンカーの必須の長さは、用いられる特有の固体担持体に左右される。例えば、6原子のリンカーは、高度の架橋ポリスチレンを固体担持体として用いる際の核酸の自動合成において、>97%の収率を実現するには、一般に十分である。固体担持体としてCPGを用いる際の自動合成中に高度な収率（>97%）を達成するためには、リンカーアームは、少なくとも20原子の長さであることが好ましい。

##### 【0156】

固体担持体上で固定されるプローブのハイブリダイゼーションは、プローブが、少なくとも30原子、より好ましくは少なくとも50原子により固体担持体から分離されることが一般に必要である。この分離を実現するため、リンカーは、リンカーと3'-末端との間に配置されるスペーサーを一般に含んでいる。核酸合成のために、リンカーアームは通常、エステル結合により3'-末端の3'-OHに結合されるが、このエステル結合を塩基性の試薬で切断して核酸を固体担持体から解放することが可能である。

##### 【0157】

多種多様なリンカーは、当該技術分野で知られており、これを用いて、核酸プローブを固体担持体に結合させてもよい。リンカーは、固体担持体に結合されるプローブへの標的配列のハイブリダイゼーションを大きく妨げない任意の化合物を、形成してもよい。リンカーは、例えば、自動合成によりリンカーに容易に添加が可能なホモポリマーの核酸を形成してもよい。代替的に、官能化ポリエチレングリコールのようなポリマーを、リンカーとして用いることが可能である。このポリマーは、ホモポリマーの核酸であることが、現在好ましいが、何故なら、これがプローブのターゲット核酸へのハイブリダイゼーションを著しく妨げないからである。ポリエチレングリコールは特に推奨されるものであり、何故なら、それは、商業的に利用可能であり、有機及び水性媒体に可溶であり、官能化が容易であり、かつ、核酸合成及びポスト合成条件で完全に安定だからである。

##### 【0158】

固体担持体と、リンカーと、プローブとの間の結合部位は、核酸塩基保護基の合成中または除去中、塩基性の条件下、高温では、切断されないことが好ましい。これらの結合は、しかしながら、様々な条件下で、開裂可能である基から選択することが可能である。現

10

20

30

40

50

在好ましい結合の例としては、カルバメート、エステル及びアミド結合が含まれる。

サンプル内の核酸の検出

【0159】

本発明の固体担持体及びオリゴマーは、核酸の検出に用いることが可能である。この検査法は、以下を含む：サンプルを提供すること、核酸分子へのオリゴマーのハイブリダイゼーションを可能にする条件下で、サンプルに対する本発明の少なくとも1つのオリゴヌクレオチド類似体を接触させること、及び、本発明の1つ以上のオリゴマーにハイブリダイズしたサンプルの1つ以上の核酸分子を検出すること。

【0160】

サンプルは、任意のソースからとすることができ、また、生体サンプル、例えば生物体からのサンプルまたは同一または相異なる種からの生物体の基、であることができる。生体サンプルは、例えば、血液サンプル、血清サンプル、リンパサンプル、骨髄サンプル、腹水液、胸膜液、骨盤洗浄液、眼液、尿、精液、痰または唾液等の、身体上の流体のサンプルとすることが可能である。生体サンプルは、皮膚、鼻、咽喉、または生殖スワブ、または糞便物質の抽出液からの抽出物とすることもできる。生体サンプルは、腫瘍を含む器官または組織のサンプルとすることもできる。生体サンプルは、原核生物の及び真核生物細胞の細胞株及び一次培養を含む、細胞培養のサンプルであることも可能である。

10

【0161】

サンプルは、環境からとすることができ、例えば、水の本体からまたは土から、または食物、飲料から、または水源、工業発生源、職場領域、公共の場または居室面積、とすることが可能である。サンプルは、抽出物、例えば土の液体抽出物または食物サンプルとすることが可能である。サンプルは、洗浄または浸漬から作製される溶液とすること、または、ツール、衣類の物品、人工品または他の物質等の物質から、スワブを懸濁することが可能である。

20

【0162】

サンプルは、未処理のまたは処理のサンプルとすることが可能であり；処理とは、サンプルの要素の純度、濃度またはアクセスしやすさを増大して、サンプルの解析を容易にするステップを含むことが可能である。非限定的な例として、処理は、サンプル量を低減する、サンプルの要素を除去するまたは分離する、サンプルまたは1つ以上のサンプル要素を可溶化する、または、サンプルの要素を破壊する、改質する、露出する、放出するまたは絶縁するための、各ステップを、含むことが可能である。この手順の非限定的な例としては、遠心、沈降、濾過、ホモジナイゼーション、溶菌、抗体の結合、菌体分離等である。

30

例えば、本発明の一部の好ましい実施形態では、サンプルは、例えば、赤血球の除去により、濃度により、1つ以上の細胞またはウイルス型（たとえば、白血球または病原性細胞）の選択により、又は細胞の細胞溶解等により、少なくとも部分的に処理される血液サンプルである。

【0163】

例示化合物は、少なくとも部分的に精製された核酸分子の溶液を含んでいる。核酸分子は、単一ソースまたは複合のソースからとすることができ、DNA、RNAまたはこれら両者を備えることができる。例えば、核酸分子の溶液は、溶菌、濃度、抽出、沈降、核酸選択（例えばポリA RNAの選択、またはAlu要素を備えたDNAの塩基配列の選択）、または1つ以上の酵素による処理、におけるステップのいずれかに従ったサンプルとすることが可能である。また、サンプルは、合成核酸分子を備える溶液とすることも可能である。

40

【0164】

本発明のオリゴマーまたは固体担持体は、ここに開示されるいずれかのオリゴマーフォーマットとすることができ、または、ここに開示されるモノマー、ダイマーまたは非核酸要素（例えばリンカー、蛍光体、クエンチャー、安定化部分）を備えているいずれかのオリゴマーとすることが可能である。本発明の方法で用いられるオリゴヌクレオチド類似体は、

50

任意の長さ及び任意の核酸塩基組成物とすることができ、部分、ペプチド、タンパク質脂質、炭水化物、ステロイド、ならびに他の生化学及び化学部分を、1つ以上の核酸に備えることができる。本発明のオリゴヌクレオチド類似体は、溶液に提供すること、または固体担持体に結合することが、可能である。本発明の一部の好ましい実施形態では、オリゴマーは、非標準ヌクレオチド類似体を備えている。

【0165】

結合核酸のための検査法は、当該技術分野では周知であり、調査集団の核酸分子に結合されるまたは統合される、または、ハイブリダイズターゲット核酸分子もしくはハイブリダイズターゲット核酸分子複合体に結合されるまたは統合される、検出可能標識の使用を含むことが可能である。核酸分子の検出可能な標識は周知の技術であり、蛍光体（ここに述べられるそれらを含む）、ラジオアイソトープ、質量変化化学基、信号発生分子により検出が可能なビオチン等の特異的結合部材、等の蛍光分子を備えている。また、検出可能な標識は、例えば、信号オリゴマーを用いたサンドイッチハイブリダイゼーションを検出に用いる場合、又は、オリゴマー/ターゲット核酸分子複合体を認識する抗体等の特異的結合部材を用いて検出を実行する場合に、本発明のオリゴマーに統合されるまたは結合されることも可能である。固体担持体を、スキャンでき、膜に露出でき、視覚的に検査できる等により、検出可能な標識の存在を決定し、それにより、固体担持体上に、例えば本発明のそれら上に固定されるオリゴマーへの、ターゲット核酸分子の結合を確定する。

キット

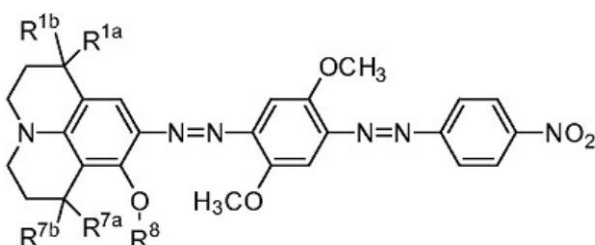
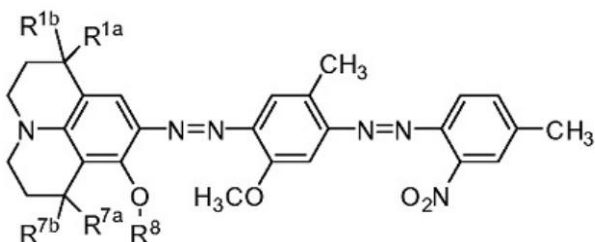
【0166】

本発明の1つの態様は、先に述べたように、本発明の化合物（例えば本発明の固体担持体または本発明のモノマー）を用いた合成の実行、及び、本発明のオリゴマーを用いたアッセイ、を促進する、キットの配合である。本発明のキットは典型的には、接合体を調製するために有効な化学的に反応種として存在する、又は、オリゴマーが特異的結合対部材である場合の完成されたオリゴマーとして存在する、のいずれか一方における、本発明の化合物（例えば本発明の固体担持体または本発明のオリゴマー）を備えている。キットは随意、1つ以上のバッファ剤（典型的に水溶液として存在する）をさらに備えている。本発明のキットは随意、追加的な検出試薬、生じた標識物質を精製するための精製媒体、発光標準、酵素、酵素阻害剤、有機溶媒、または、本発明のアッセイを遂行するための指示をさらに備えている。キットのための他の構成は、当業者にとって明らかになるであろうし、また、本発明の範囲内にある。

【0167】

一例として、例示化合物において、本発明は、式IまたはIIに従った構造を有する化合物：

(I), (II)



10

20

30

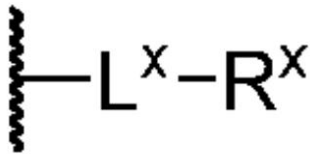
40

50

を有しており、ここで、 $R^{1a}$ 、 $R^{1b}$ 、 $R^{7a}$ 及び $R^{7b}$ は、H、置換または非置換のアルキル、置換または非置換のシクロアルキル、置換または非置換のヘテロアルキル、及び、置換または非置換のヘテロシクロアルキルから、別々に選択される。 $R^{1a}$ と $R^{1b}$ とは、これらに結合される炭素原子と共に、任意に接合され、置換または非置換のC3 - C7シクロアルキルと、置換または非置換の3 ~ 7員ヘテロシクロアルキルとから選択される部材である環を生成する。 $R^{7a}$ と $R^{7b}$ とは、それに結合される炭素原子と共に、随意に接合されて、置換または非置換のC3 - C7シクロアルキルと、置換または非置換の3 ~ 7員ヘテロシクロアルキルとから選択される部材である環を生成する。 $R^{1a}$ 、 $R^{1b}$ 、 $R^{7a}$ 及び $R^{7b}$ の少なくとも一つは、Hではない。

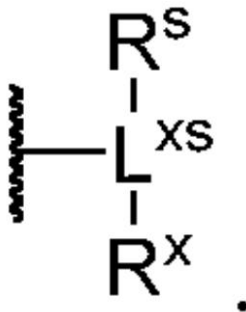
$R^8$ は、H、

10



及び

20



30

から選択される。 $L^X$ は、結合、置換または非置換のアルキル、置換または非置換のシクロアルキル、置換または非置換のヘテロアルキル、及び置換または非置換のヘテロシクロアルキルから選択される。 $L^{XS}$ は、置換または非置換のアルキル、置換または非置換のシクロアルキル、置換または非置換のヘテロアルキル、及び置換または非置換のヘテロシクロアルキルから選択される。 $R^S$ は、保護または非保護の反応性官能基、結合部位、及び固体担持体から選択される。 $R^X$ は、保護または非保護の反応性官能基、及び結合部位から選択される。それぞれの結合部位は、ヌクレオシド、ヌクレオシドへのリンカー、ヌクレオチド、ヌクレオチドへのリンカー、オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチドへのリンカー、核酸、核酸へのリンカー、キャリア分子、キャリア分子へのリンカー、固体担持体、及び固体担持体へのリンカーから、独立して選択される部材に共有結合されている。

40

【0168】

前項に従った化合物であって、 $R^{1a}$ 及び $R^{1b}$ は、独立して、非置換のC1、C2、C3、C4、C5及びC6アルキルから選択される。

【0169】

前項に従った化合物であって、 $R^{1a}$ 及び $R^{1b}$ は、それぞれメチルである。

【0170】

任意の前項に従った化合物であって、 $R^{7a}$ 及び $R^{7b}$ は、それぞれHである。

【0171】

50

任意の前項に従った化合物であって、 $R^{7a}$  及び  $R^{7b}$  は、独立して、非置換の C 1、C 2、C 3、C 4、C 5 及び C 6 アルキルから選択される。

【0172】

任意の前項に従った化合物であって、 $R^{7a}$  及び  $R^{7b}$  は、それぞれメチルである。

【0173】

任意の前項に従った化合物であって、 $R^{1a}$  及び  $R^{1b}$  は、それぞれ H である。

【0174】

任意の前項に従った化合物であって、 $R^{1a}$ 、 $R^{1b}$ 、 $R^{7a}$  及び  $R^{7b}$  は、独立して、非置換の C 1、C 2、C 3、C 4、C 5 及び C 6 アルキルから選択される。

【0175】

任意の前項に従った化合物であって、 $R^{1a}$ 、 $R^{1b}$ 、 $R^{7a}$  及び  $R^{7b}$  は、それぞれメチルである。

【0176】

任意の前項に従った化合物であって、 $L^x$  は、非置換の C 1、C 2、C 3、C 4、C 5、C 6、C 7、C 8、C 9 及び C 10 アルキルから選択される。

【0177】

任意の前項に従った化合物であって、 $L^{xs}$  は、置換ヘテロアルキルである。

【0178】

任意の前項に従った化合物であって、 $R^x$  は、ホスホラミダイト、 $-OH$ 、 $-ODMT$ 、 $-COOH$ 、活性エステル、及び  $-NH_2$  から選択される。

【0179】

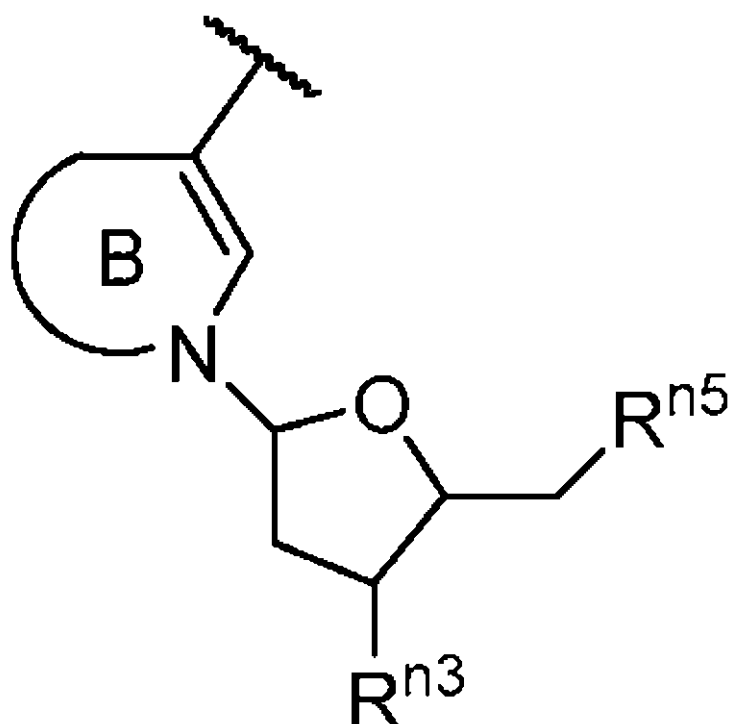
任意の前項に従った化合物であって、 $R^s$  は、 $-OH$ 、 $-ODMT$ 、及び、固体担持体へのリンカーに共有結合的に結合する結合部位から選択される。

【0180】

任意の前項に従った化合物であって、 $R^x$  は、ホスホラミダイト、 $-OH$ 、 $-ODMT$ 、 $-COOH$ 、活性エステル及び  $-NH_2$  から選択される。

【0181】

任意の前項に従った化合物であって、 $R^x$  は、ヌクレオシドへのリンカーに共有結合される結合部位であり、ヌクレオシドは、構造を有する：



10

20

30

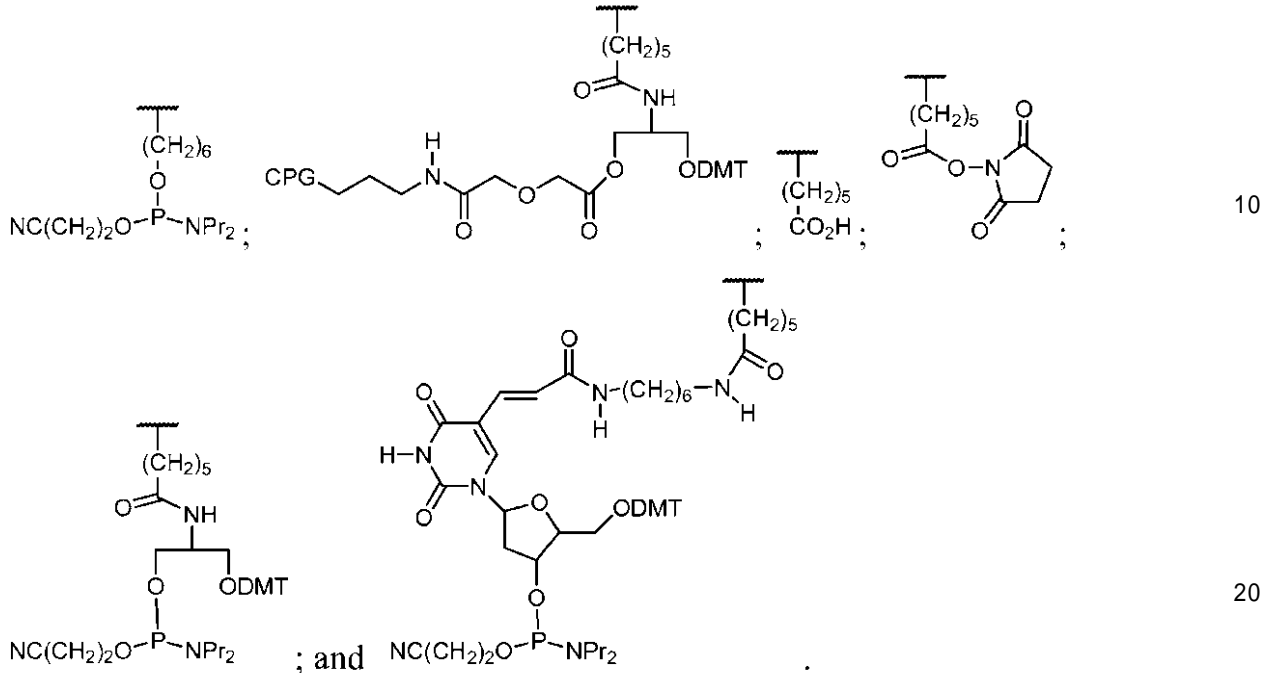
40

50

環標識 B は、核酸塩基である。R<sup>n 3</sup> は、-OH またはホスホラミダイトである。R<sup>n 5</sup> は、-OH または -ODMT である。

【0182】

任意の前項に従った化合物であって、R<sup>8</sup> は以下から選択される：



。

【0183】

核酸標的配列を検出する方法であって、該方法は、

(a) 標的配列を検出部核酸に接触させることであって；一本鎖ターゲット結合シーケンスを備え、この検出部核酸は、これにリンクされた；

i) 蛍光体；及び

ii) 任意の前項に従った化合物であって、R<sup>8</sup> は、検出部核酸に（直接またはリンカーを通して）共有結合される結合部位を備える、前記化合物、を備え；この検出部核酸は、蛍光体が励起される際、蛍光体と化合物との間にドナー・アクセプターエネルギー移動ができるようにする立体構造である、前記標的配列を検出部核酸に接触させること；

(b) ターゲット結合シーケンスを標的配列にハイブリダイズし、それにより検出部核酸の立体構造を改質し、蛍光パラメータを変化させること；及び、

(c) 蛍光パラメータの変化を検出し、それにより核酸標的配列を検出すること、を備えている。

【0184】

第1の核酸及び第2の核酸がハイブリダイズするか否かを確認する方法であって、第1の核酸は、任意の前項に従った化合物を備え、R<sup>8</sup> は、第1の核酸に（直接またはリンカーを通して）共有結合される結合部位を備え；この方法は、

(a) 第1の核酸を第2の核酸に接触させること；及び

(b) 第1の核酸、第2の核酸及びその組合せから選択される部材の蛍光特性内で変更を検出し、それによりハイブリダイゼーションが発生するか否かを確認すること、を備えている。

【0185】

核酸増幅反応を監視する方法であって、この方法は、

(a) 検出部核酸を備える増幅反応混合物を調製することであって、それにリンクされた

i) 蛍光体；及び

i i) 任意の前項に従った化合物であって、 $R^8$  は、検出部核酸に（直接またはリンカーを通して）共有結合で結合される結合部位を備える、前記化合物；  
を有する、前記増幅反応混合物を調製すること、

(b) 増幅反応混合物を増幅条件に従わせること；

(c) 検出部核酸からの蛍光信号のために反応混合物を監視して、アッセイ結果を得ること；及び

(d) 核酸増幅反応をモニターするためにアッセイ結果を使用すること、を備えている。

#### 【0186】

標的配列の増幅を検出する方法であって、この方法は、

(a) 標的配列の側面に位置したPCRプライマーを有する標的配列を備えるサンプル核酸をハイブリダイズすること；

(b) 重合酵素でハイブリダイズされたプライマーを拡張してPCR製品を製作し、PCR製品の2鎖を分離して標的配列の知覚及びアンチセンス鎖を利用可能にすること；

(c) 検出部核酸を、PCR製品内の標的配列の知覚またはアンチセンス鎖にハイブリダイズすること、ここで、検出部核酸は：

i) PCR製品内の標的配列の知覚またはアンチセンス鎖の少なくとも一部に相補的であり、かつ、PCRプライマーの間の領域にハイブリダイズする、一本鎖ターゲット結合シーケンス；

i i) 蛍光体；及び

i i i) 任意の前項に従った化合物であって、 $R^8$  は、検出部核酸に（直接またはリンカーを通して）共有結合で結合される結合部位を備える、前記化合物；  
を有し、

ここで、その標的配列へのハイブリダイゼーションの前に、検出部核酸は、蛍光体が励起される際、蛍光体と化合物との間にドナー・アクセプターエネルギー移動ができるようにする立体構造であり；

それにより、検出部核酸の立体構造を改質して、蛍光パラメータを変化させること；及び

(d) 蛍光パラメータの変化を測定して、標的配列及びその増幅を検出すること、を備えている。

#### 【実施例】

#### 【0187】

本発明の物質及び方法は、あとに続く実施例により、さらに示される。これらの実施例は、請求項に係る発明を例示するために提供されるが、これを制限するものではない。

#### 実施例

#### 実施例1：本発明の例示化合物の合成

#### 【0188】

本発明の様々な例示化合物の合成が、図2に概説される。

#### 【0189】

ヒドロキシテトラメチルユロリジン2は、クロマトグラフィの必要なしで、2つのステップ（色素及び顔料2003、59、63）に対して約50%の全収率で、ヒドロキシアニリン1を介して調製された。スケールアップにより、相対的な容易さで、2の95gを提供した。ファーストブラックK（FBK）塩による2のテスト反応により、濃いブルーダイ3を発生させた。無水条件下でのDMF内で過剰な塩化ヘキサノール及び炭酸カリウムを用いて、2のC6-ヒドロキシル化合物4への変換を生じた。乾燥DMF内で水素化ナトリウムを用いたアルキル化の文献方法を防止して、大量生産中の困難を最小にした。ファーストブラックK塩のメタノール水溶液の4をメタノール溶液に付加することにより、アゾ色素アルコール5を提供し、これをアミダイト6に変換した。スケールアップにより、アミダイト約13gを与えた。アミダイトを用いて、5'標識ポリTオリゴを作製し、これは二重HPLCであり、精製された後に用いられ、色素のための吸光係数を確定し

10

20

30

40

50

た。

【0190】

上記の2によるプロモヘキサ酸の反応では、所望の化合物7を提供しなかった。プロモヘキサ酸を、そのメチルエステル8に変換し、その後2に結合し、それぞれの単離していないC6-エステル化合物9を与えた。THF内で2Mの水性硫酸を用いてメチルエステルを開裂し、C6酸化合物7を与えた。FBK塩への結合により酸-アゾ色素10を与え、これを用いてDMT保護セリノール誘導体11を調製した。これは順次、グリコール酸12に、その後CPG13に変換した。CPGを用いて3'標識ポリTオリゴを作製し、これは二重HPLCであり、精製された後に用いられ、色素のための吸光係数を確定した。5'-標識されたオリゴヌクレオチドと同様に、塩基性の条件下の脱保護の後、天然オリゴヌクレオチドサンプル内のHPLCによる色素分解または副産物の顕著な痕跡は、見られなかった。酸性アゾ色素10は、活性エステル14に変換された。

10

実施例2：BHQ2、BBQ及びコスミックエンチャー性能比較

序論

【0191】

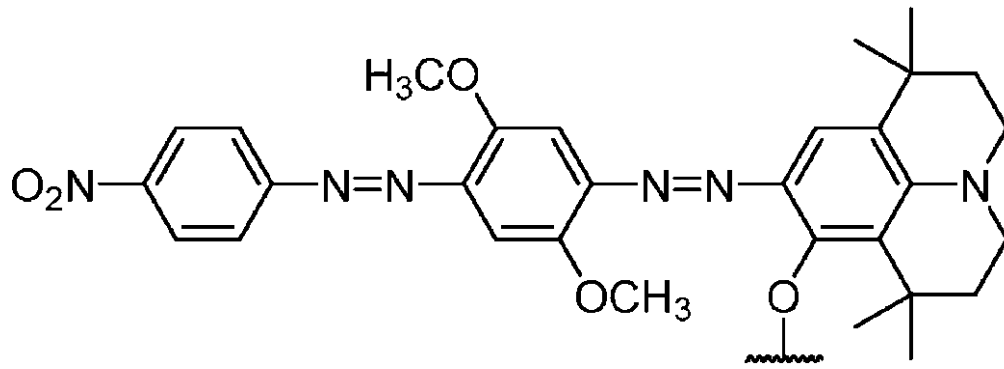
より長い波長でのクエンチ色素発光に対するコスミックエンチャー（下記に示す）性能が、評価された。具体的には、蛍光体クエーサー670及びクエーサー705からの信号を消すクエンチャーの能力が、検討された。基準として、BHQ2及びブラックベリークエンチャー（BBQ-650（商標）；Berry & Associates, Inc.；米国特許第7,879,986号に記載）の性能が、これら同一蛍光体と提携される際に、検討された。これらのクエンチャーのそれぞれを含むタックマンプローブが、リアルタイムPCR及びヌクレアーゼ分解アッセイにより評価された。

20

コスミックエンチャー

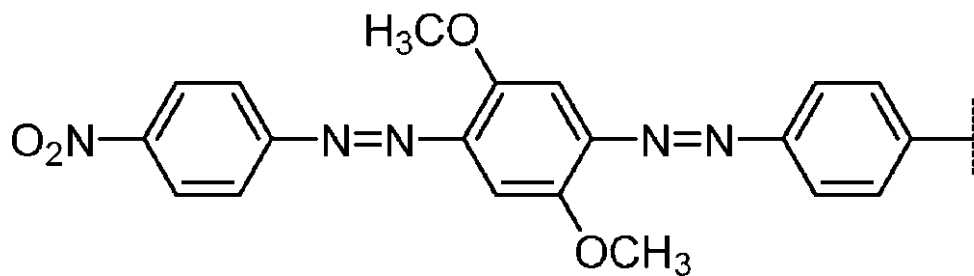
BHQ2

BBQ-650



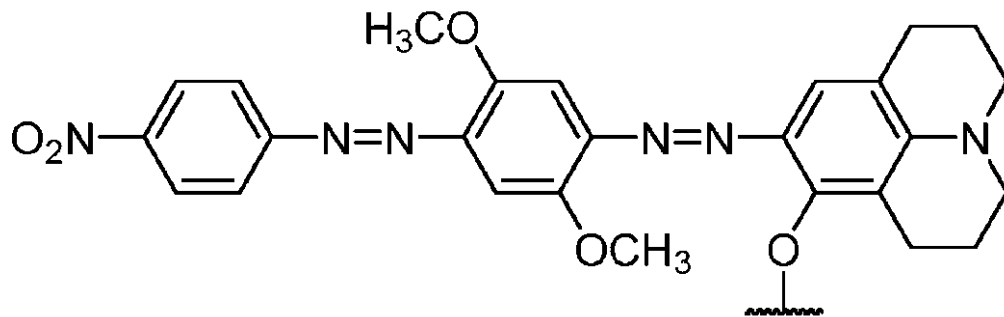
10

Cosmic Quencher



20

BHQ2



30

BBQ-650

スキーム。クエンチャー部分。

方法

【0192】

モデルタックマンアッセイは、この研究において全ての比較のために利用され、コリン受容体、ムスカリニック3に対する人間の遺伝子を検出するように設計された (Gene ID: CHRM3、受入れ番号 nm\_000740)。プローブ配列は、5' - [蛍光体] - TCCTTTGGGCTCCTGCCATCT - [クエンチャー] - 3' であり、PCRプライマー 5' - TTGGGTCATCTCCTTTG - 3' 及び 5' - GCACAGTCTCTTTTCCA - 3' の増幅製品を表示する。このプローブ配列を、5つの異なる蛍光体クエンチャー組合せ：クエーサー670コスミッククエンチャー、クエーサー670 - BHQ2、クエーサー670 - BBQ、クエーサー705コスミッククエンチャー、及び、クエーサー705 - BHQ2、のそれぞれで合成した。それぞれのプローブは、同一プライマーセットに提携され、それらのクエンチング能率は、ヒトゲノムDNA 25 n

40

50

gからのPCR増幅の3倍の反応で評価された。それぞれの反応の組成物は、以下の通りである：

成分（標準濃度）	体積	終濃度	
・ヌクレアーゼフリー水	10.25 $\mu$ L	/	
・プラチナタックPCRバッファ（10X）	5.00 $\mu$ L	1X	
・タックマンプローブ（10 $\mu$ ）	0.50 $\mu$ L	100n	
・MgCl <sub>2</sub> （50mM）	2.00 $\mu$ L	2.0mM	
・dNTP（それぞれ2.5mM）	4.00 $\mu$ L	それぞれ200 $\mu$	
・ヒトゲノムDNA（150pg/ $\mu$ L）	25.0 $\mu$ L	反応につき3.75ng	10
・プラチナタック重合酵素（1U/ $\mu$ ）	0.25 $\mu$ L	反応につき1.25ユニット	
・前プライマー（10 $\mu$ ）	1.50 $\mu$ L	300nm	
・逆プライマー（10 $\mu$ ）	1.50 $\mu$ L	300nm	

全体積：50.0  $\mu$ L。

「赤」チャンネルで検出されるクエーサー670（625nmのソース、660nmの検出部、ゲイン=5）、及び、「深紅」チャンネルで検出されるクエーサー705（680nmのソース、710nmの検出部、ゲイン=10）に対して、リアルタイムPCR反応を、RotorGene 6000（Corbett Research）の上で循環した。その後、ヌクレアーゼ分解アッセイにより5プローブを検討し、そこでは、400nmの濃度でプローブを有する100  $\mu$ Lヌクレアーゼバッファ溶液に、1.5ユニットの球菌ヌクレアーゼを加える。10分の間隔で進行するよう、消化を実現する。この間隔の後、以下の設定で、テカンサファイア蛍光光度計上の信号強さを測定する：

設定           クエーサー670           クエーサー705

測定態様：        蛍光トップ        蛍光トップ

励起波長：        641nm        680nm

放出波長：        676nm        715nm

励起帯域幅：       12nm        12nm

放出帯域幅：       12nm        12nm

ゲイン：           150        150

フラッシュ数：     20        20

ラグタイム：       0  $\mu$ s        0  $\mu$ s

積分時間：        20  $\mu$ s        20  $\mu$ s

それぞれからのバッファブランクの信号を最初に減算した後に、ヌクレアーゼで処理する反応内でのプローブの蛍光強度を、未治療反応内の同一プローブの強度で除算することにより、信号対ノイズ値を算出する。

実時間PCR結果

【0193】

クエーサー670プロット（図3）内では、固体増幅痕跡は、コスミックエンチャープローブを表し、破線の痕跡は、ブラックベリクエンチャー（BBQ）プローブを表し、ドットの痕跡は、BHQ2プローブを表す。クエーサー705プロット（図4）内では、固体痕跡は、コスミックエンチャープローブを示す一方、ドットの痕跡は、BHQ2プローブを示している。増幅の開始前のベースライン信号強度により明示されるように、いずれか一方の蛍光体では、コスミックエンチャーは、BHQ2またはBBQよりも効率性の高いクエンチングを示している。

ヌクレアーゼ分解結果

【0194】

両方の蛍光体、特にBHQ2よりも1/6の背景蛍光を示すクエーサー705で、コスミックエンチャーにより最も効率的にクエンチされることを、ヌクレアーゼアッセイは明らかにする。その優れたクエンチング能率により、コスミックエンチャーは、クエー

10

20

30

40

50

サー705に対して最も高度なS/N比を示すものであり、そして、クエーサー670に対して2番目に高度な比を示している。

【0195】

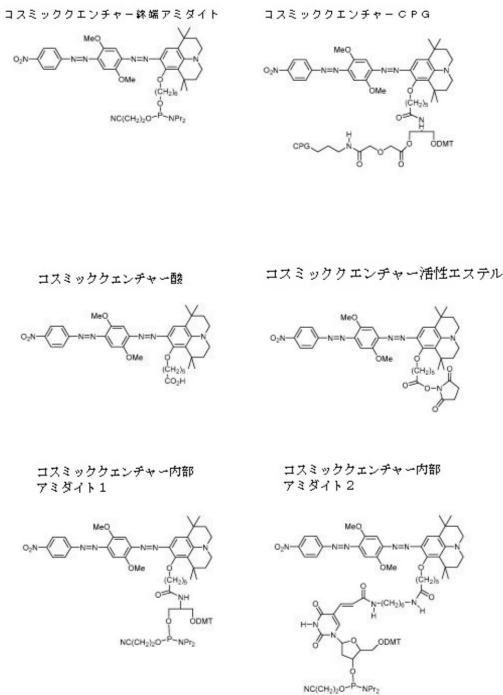
図5Aは、ヌクレアーゼアッセイの、クエーサー670コスミックエンチャー、クエーサー670-BHQ2、クエーサー670-BBQ、クエーサー705コスミックエンチャー、及びクエーサー705-BHQ2で標識される、プローブの消化有り及び無しにおける測定蛍光強度を表す。図5Bは、ヌクレアーゼ分解アッセイのクエーサー670コスミックエンチャー、クエーサー670-BHQ2、クエーサー670-BBQ、クエーサー705コスミックエンチャー、及びクエーサー705-BHQ2で標識される、プローブの消化及び未消化の蛍光から算出されるS/N比を表す。

10

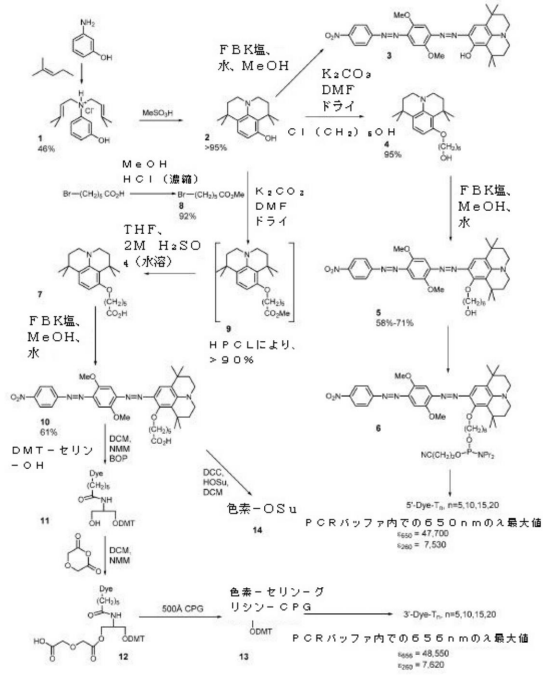
【0196】

ここに記載される実施例及び実施形態は、実例となる目的のためのみであり、様々な修飾またはその光の変化は、技術に熟達せる人に提案されるものであり、この適用の精神及び範囲内に含まれるものにあり、かつ、添付の特許請求の範囲の範囲内で考慮されることが、理解されるものである。ここに引用される全ての公表、特許及び特許出願は、全ての目的のために完全に、参照によりここに統合される。

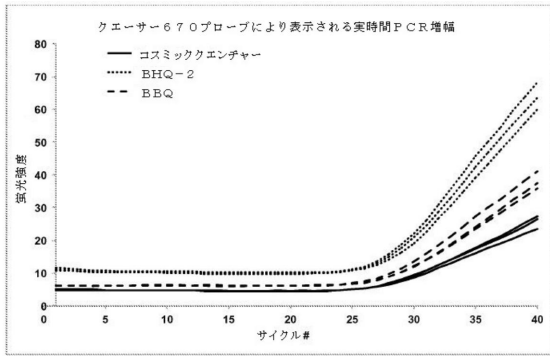
【図1】



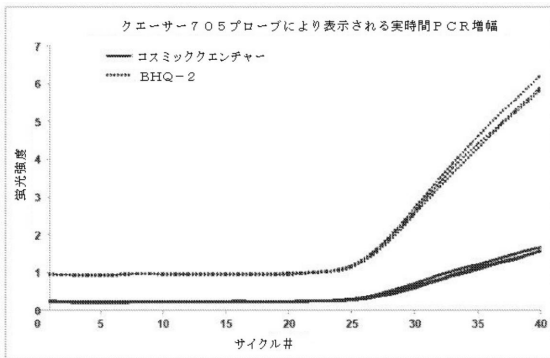
【図2】



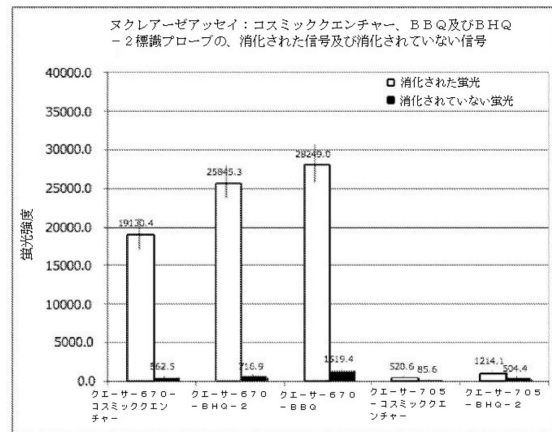
【 図 3 】



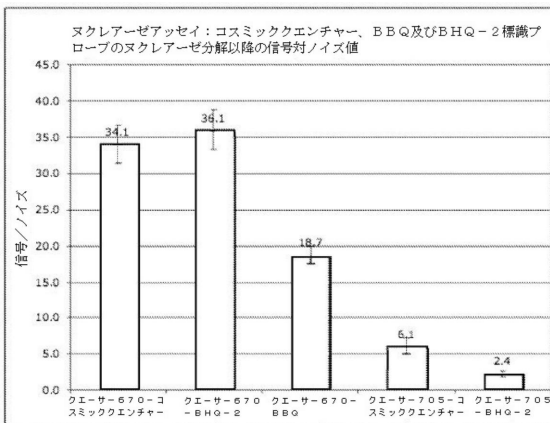
【 図 4 】



【 図 5 A 】



【 図 5 B 】



## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 0 7 F	9/60 (2006.01)	C 0 7 F	9/60
C 0 7 F	9/6558 (2006.01)	C 0 7 F	9/6558
G 0 1 N	21/64 (2006.01)	G 0 1 N	21/64 F
C 0 9 B	43/00 (2006.01)	C 0 9 B	43/00

(72)発明者 クック,ロナルド,エム.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 9 4 7, ノバート, 7 メドウ レーン

(72)発明者 ソワーズ,ベン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 9 5 2, ベタルマ, アpartment 2 0 6, 1 0 1 セ  
カンド ストリート

審査官 伊藤 佑一

(56)参考文献 特表2011-519356(JP,A)

国際公開第2006/084067(WO,A1)

米国特許出願公開第2011/0178280(US,A1)

米国特許出願公開第2005/0272088(US,A1)

韓国公開特許第10-2014-0023755(KR,A)

仏国特許出願公開第02920779(FR,A1)

Journal of Physical Chemistry B, 2009年, Vol.113, No.10, pp.3203-3211, DOI: 10.1021/jp810324v

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 0 9 B

C 0 7 D

C A p l u s / R E G I S T R Y ( S T N )