

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6574239号
(P6574239)

(45) 発行日 令和1年9月11日 (2019.9.11)

(24) 登録日 令和1年8月23日 (2019.8.23)

(51) Int.Cl.

F I

C O 7 H 21/04 (2006.01)
 C 1 2 N 15/09 (2006.01)
 C 1 2 Q 1/68 (2018.01)
 G O 1 N 21/64 (2006.01)

C O 7 H 21/04 B
 C 1 2 N 15/09 Z N A
 C 1 2 Q 1/68
 G O 1 N 21/64 F

請求項の数 131 (全 82 頁)

(21) 出願番号 特願2017-503774 (P2017-503774)
 (86) (22) 出願日 平成27年3月30日 (2015.3.30)
 (65) 公表番号 特表2017-516494 (P2017-516494A)
 (43) 公表日 平成29年6月22日 (2017.6.22)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2015/023403
 (87) 国際公開番号 W02015/153496
 (87) 国際公開日 平成27年10月8日 (2015.10.8)
 審査請求日 平成30年2月15日 (2018.2.15)
 (31) 優先権主張番号 61/972,389
 (32) 優先日 平成26年3月30日 (2014.3.30)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 14/673,403
 (32) 優先日 平成27年3月30日 (2015.3.30)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

(73) 特許権者 516295020
 セフィエド
 アメリカ合衆国、カリフォルニア州 94
 089、サニーベール、カリビアン ドラ
 イブ 904
 (74) 代理人 100079108
 弁理士 稲葉 良幸
 (74) 代理人 100109346
 弁理士 大貫 敏史
 (74) 代理人 100117189
 弁理士 江口 昭彦
 (74) 代理人 100134120
 弁理士 内藤 和彦

最終頁に続く

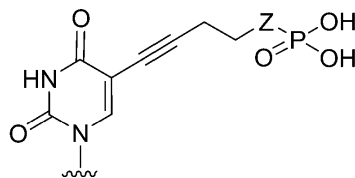
(54) 【発明の名称】 修飾チミンポリヌクレオチドオリゴマーおよび方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも1つの修飾塩基を含むポリヌクレオチドであって、前記少なくとも1つの修飾塩基が、式：

【化 1】



10

(式中、Zは、CH₂またはOである)で表されるポリヌクレオチド。

【請求項 2】

少なくとも1つのデオキシリボヌクレオチド部分をさらに含む、請求項1に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 3】

前記修飾塩基が、前記デオキシリボヌクレオチド部分に共有結合されている、請求項2に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 4】

少なくとも1つのペプチド核酸部分を含む、請求項1に記載のポリヌクレオチド。

20

【請求項 5】

前記修飾塩基が、前記ポリヌクレオチド中の前記少なくとも 1 つのペプチド核酸部分に共有結合されている、請求項 4 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 6】

PNA/DNA キメラである、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 7】

少なくとも 2 つの修飾塩基を含み、前記少なくとも 2 つの修飾塩基中の Z が、同じであるか、または異なる、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 8】

その 3' 末端に、またはその 3' 末端から 1 つ目の塩基に前記修飾塩基を含む、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。 10

【請求項 9】

マイナーグループ結合剤またはインターカレーターをさらに含む、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 10】

糖修飾をさらに含む、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 11】

前記糖修飾が、アラビノース、d - アラビノ - ヘキシトール、2 - フルオロアラビノース、キシロース、ヘキソース、および二環式の糖から成る群から選択される、請求項 10 に記載のポリヌクレオチド。 20

【請求項 12】

骨格修飾をさらに含む、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 13】

前記骨格修飾が、修飾糖リン酸骨格、ロックド核酸骨格、ペプチド骨格、ホスホトリエステル骨格、ホスホルアミデート骨格、シロキサノ骨格、カルボキシメチルエステル骨格、アセトアミデート骨格、カルバメート骨格、チオエーテル骨格、架橋ホスホン酸メチレン骨格、ホスホロチオエーテル骨格、メチルホスホン酸骨格、アルキルホスホン酸骨格、リン酸エステル骨格、アルキルホスホロチオエーテル骨格、ホスホロジチオエーテル骨格、炭酸骨格、リン酸トリエステル骨格、カルボキシメチルエステル骨格、メチルホスホロチオエーテル骨格、ホスホロジチオエーテル骨格、p - エトキシ結合を有する骨格、および上述のいずれかのうちの 2 つまたはそれ以上の組合せから成る群から選択される、請求項 12 に記載のポリヌクレオチド。 30

【請求項 14】

DNA または RNA 依存性ポリメラーゼ酵素により伸長可能である 3' 末端ヌクレオチドをさらに含む、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 15】

30 個よりも少ないヌクレオチドを含む、請求項 14 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 16】

前記ポリヌクレオチドが、9 ~ 25 個のヌクレオチドを含む、請求項 15 に記載のポリヌクレオチド。 40

【請求項 17】

少なくとも 1 つの検出可能な標識をさらに含む、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 18】

前記検出可能な標識が、フルオロフォアである、請求項 17 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 19】

前記ポリヌクレオチドに結合した蛍光消光剤をさらに含む、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 20】

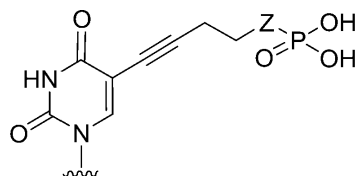
修飾塩基を含むポリヌクレオチドと、反応混合物中に存在すると推測される核酸標的配 50

列とのハイブリダイゼーションのための方法であって、

(a) ポリヌクレオチドを含み、かつ標的核酸配列を含むと推測される反応混合物を、前記反応混合物中に存在する場合に前記標的核酸配列との前記ポリヌクレオチドのハイブリダイゼーションに好適な条件下でインキュベートする工程、および

(b) 前記反応混合物中の前記標的核酸配列の存在を検出するか、または前記標的核酸配列の非存在を確認する工程であって、前記ポリヌクレオチドが、前記核酸標的配列内の配列に相補的であり、前記ポリヌクレオチドが、少なくとも1つの修飾塩基を含み、前記少なくとも1つの修飾塩基が、式：

【化2】



10

(式中、Zは、 CH_2 またはOである)で表される工程を含む方法。

【請求項21】

前記ポリヌクレオチドが、検出可能な標識、および蛍光消光剤から成る群から選択される部分をさらに含む、請求項20に記載の方法。

20

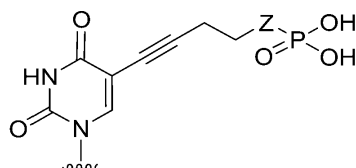
【請求項22】

(i) 少なくとも1つのポリヌクレオチド、および

(ii) ポリヌクレオチド配列

を含む二重鎖であって、前記少なくとも1つのポリヌクレオチドが、前記ポリヌクレオチド配列の少なくとも4つの連続塩基と相補的でありそれらとハイブリダイズされている4つまたはそれ以上の連続塩基を含み、前記ポリヌクレオチドが、少なくとも1つの修飾塩基を含み、前記少なくとも1つの修飾塩基が、式：

【化3】



30

(式中、Zは、 CH_2 またはOである)で表される二重鎖。

【請求項23】

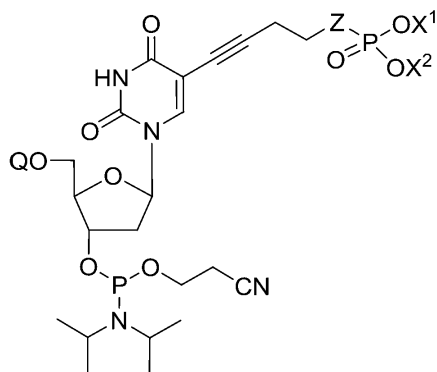
前記ポリヌクレオチドが、検出可能な標識、および蛍光消光剤から成る群から選択される部分をさらに含む、請求項22に記載の二重鎖。

【請求項24】

式：

40

【化 4】



10

(式中、

Z は、 CH_2 または O であり、

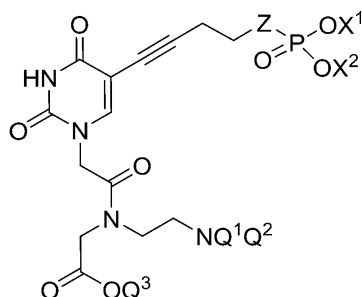
X^1 および X^2 は別個になって、同じであるか、もしくは異なる保護基であるか、または X^1 および X^2 は一緒になって、二座保護基であり、

Q は、ヒドロキシル保護基である) で表される修飾ヌクレオシドホスホルアミダイト。

【請求項 25】

式：

【化 5】



20

(式中、

Z は、 CH_2 または O であり、

X^1 および X^2 は別個になって、同じであるか、もしくは異なる保護基であるか、または X^1 および X^2 は一緒になって、二座保護基であり、

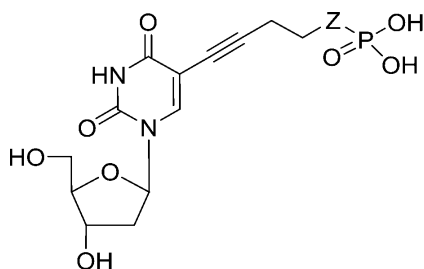
Q^1 および Q^2 は独立して、H もしくは窒素保護基であるか、または Q^1 および Q^2 は一緒に、窒素保護基であり、

Q^3 は、H またはカルボキシル保護基である) で表される修飾ペプチド核酸モノマー。

【請求項 26】

式：

【化 6】



40

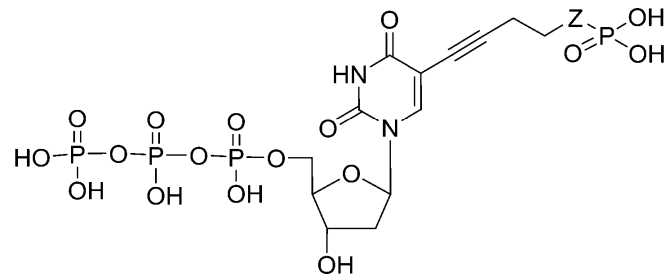
(式中、Z は、 CH_2 または O である) で表される修飾チミジンヌクレオシド。

【請求項 27】

式：

50

【化 7】



(式中、Zは、 CH_2 またはOである)で表される修飾チミジンヌクレオチド5'-三リン酸。

10

【請求項 2 8】

発色団、放射性同位体、スピン標識、酵素標識、化学発光標識、電気化学発光化合物、磁気標識、ミクロスフェア、コロイド金属、免疫学的標識、リガンド及び蛍光色素から成る群から選択される標識をさらに含む、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 2 9】

少なくとも 1 つの修飾塩基が、5' から 3' 方向で表される場合、前記ポリヌクレオチドの 1 位、前記ポリヌクレオチドの 2 位、前記ポリヌクレオチドの 3 位、前記ポリヌクレオチドの 4 位、前記ポリヌクレオチドの 5 位、前記ポリヌクレオチドの 6 位、前記ポリヌクレオチドの 7 位、前記ポリヌクレオチドの 8 位、前記ポリヌクレオチドの 9 位、前記ポリヌクレオチドの 10 位、前記ポリヌクレオチドの 11 位、前記ポリヌクレオチドの 12 位、前記ポリヌクレオチドの 13 位、前記ポリヌクレオチドの 14 位、前記ポリヌクレオチドの 15 位、前記ポリヌクレオチドの 16 位、前記ポリヌクレオチドの 17 位、前記ポリヌクレオチドの 18 位、前記ポリヌクレオチドの 19 位、及び前記ポリヌクレオチドの 20 位から成る群から選択される位置にある、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。

20

【請求項 3 0】

固体支持体に結合される、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 3 1】

前記固体支持体がビーズ、アレイ、及びマイクロアレイから成る群から選択される、請求項 3 0 に記載のポリヌクレオチド。

30

【請求項 3 2】

修飾糖部分と結合した 1 つまたは複数のヌクレオチドをさらに含む、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 3 3】

前記修飾糖部分が 2' 置換糖及びロックド核酸糖から成る群から選択される、請求項 3 2 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 3 4】

1 つまたは複数の非標準塩基をさらに含む、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 3 5】

前記 1 つまたは複数の非標準塩基が、修飾プリン及び修飾ピリミジンから成る群から選択される、請求項 3 4 に記載のポリヌクレオチド。

40

【請求項 3 6】

1 つまたは複数のペンダント基をさらに含む、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 3 7】

前記 1 つまたは複数のペンダント基が、親油性基、マイナーグループ結合剤、インターカレーター、キレート剤及び架橋剤から成る群から選択される、請求項 3 6 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 3 8】

前記ポリヌクレオチドの 3' もしくは 5' 末端のいずれかで、または両方の末端で結合される尾部部分をさらに含む、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。

50

【請求項 39】

前記尾部部分が、リン酸、リン酸エステル、アルキル基、アミノアルキル基及び親油性基から成る群から選択される、請求項 38 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 40】

前記ポリヌクレオチドが少なくとも 1 つのデオキシリボヌクレオチド部分を含む、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 41】

前記修飾塩基が、前記デオキシリボヌクレオチド部分に共有結合されている、請求項 40 に記載の方法。

【請求項 42】

前記ポリヌクレオチドが少なくとも 1 つのペプチド核酸部分を含む、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 43】

前記修飾塩基が、前記ポリヌクレオチド中の前記少なくとも 1 つのペプチド核酸部分に共有結合されている、請求項 42 に記載の方法。

【請求項 44】

前記ポリヌクレオチドが PNA / DNA キメラである、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 45】

前記ポリヌクレオチドが少なくとも 2 つの修飾塩基を含み、前記少なくとも 2 つの修飾塩基中の 2 が、同じであるか、または異なる、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 46】

前記ポリヌクレオチドがその 3' 末端に、またはその 3' 末端から 1 つ目の塩基に前記修飾塩基を含む、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 47】

前記ポリヌクレオチドがマイナーグループ結合剤またはインターカレーターをさらに含む、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 48】

前記ポリヌクレオチドが糖修飾をさらに含む、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 49】

前記糖修飾が、アラビノース、d - アラビノ - ヘキシトール、2 - フルオロアラビノース、キシロース、ヘキソース、および二環式の糖から成る群から選択される、請求項 48 に記載の方法。

【請求項 50】

前記ポリヌクレオチドが骨格修飾をさらに含む、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 51】

前記骨格修飾が、修飾糖リン酸骨格、ロックド核酸骨格、ペプチド骨格、ホスホトリエステル骨格、ホスホルアミデート骨格、シロキサ骨格、カルボキシメチルエステル骨格、アセトアミデート骨格、カルバメート骨格、チオエーテル骨格、架橋ホスホン酸メチレン骨格、ホスホロチオエート骨格、メチルホスホン酸骨格、アルキルホスホン酸骨格、リン酸エステル骨格、アルキルホスホノチオエート骨格、ホスホロジチオエート骨格、炭酸骨格、リン酸トリエステル骨格、カルボキシメチルエステル骨格、メチルホスホロチオエート骨格、ホスホロジチオエート骨格、p - エトキシ結合を有する骨格、および上述のいずれかのうちの 2 つまたはそれ以上の組合せから成る群から選択される、請求項 50 に記載の方法。

【請求項 52】

前記ポリヌクレオチドが、DNA または RNA 依存性ポリメラーゼ酵素により伸長可能である 3' 末端ヌクレオチドをさらに含む、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 53】

前記ポリヌクレオチドが 30 個よりも少ないヌクレオチドを含む、請求項 52 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 5 4】

前記ポリヌクレオチドが、9 ~ 25 個のヌクレオチドを含む、請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 5】

前記検出する工程が、前記ポリヌクレオチドに結合した検出可能な標識を検出することを含む、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 5 6】

前記検出可能な標識が、フルオロフォアである、請求項 5 5 に記載の方法。

【請求項 5 7】

前記ポリヌクレオチドが、前記ポリヌクレオチドに結合した蛍光消光剤をさらに含む、請求項 2 0 に記載の方法。

10

【請求項 5 8】

前記ポリヌクレオチドが、発色団、放射性同位体、スピン標識、酵素標識、化学発光標識、電気化学発光化合物、磁気標識、マイクロスフェア、コロイド金属、免疫学的標識、リガンド及び蛍光色素から成る群から選択される標識をさらに含む、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 5 9】

少なくとも 1 つの修飾塩基が、5' から 3' 方向で表される場合、前記ポリヌクレオチドの 1 位、前記ポリヌクレオチドの 2 位、前記ポリヌクレオチドの 3 位、前記ポリヌクレオチドの 4 位、前記ポリヌクレオチドの 5 位、前記ポリヌクレオチドの 6 位、前記ポリヌクレオチドの 7 位、前記ポリヌクレオチドの 8 位、前記ポリヌクレオチドの 9 位、前記ポリヌクレオチドの 10 位、前記ポリヌクレオチドの 11 位、前記ポリヌクレオチドの 12 位、前記ポリヌクレオチドの 13 位、前記ポリヌクレオチドの 14 位、前記ポリヌクレオチドの 15 位、前記ポリヌクレオチドの 16 位、前記ポリヌクレオチドの 17 位、前記ポリヌクレオチドの 18 位、前記ポリヌクレオチドの 19 位、及び前記ポリヌクレオチドの 20 位から成る群から選択される位置にある、請求項 2 0 に記載の方法。

20

【請求項 6 0】

前記ポリヌクレオチドが固体支持体に結合される、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 6 1】

前記固体支持体がビーズ、アレイ、及びマイクロアレイから成る群から選択される、請求項 6 0 に記載の方法。

30

【請求項 6 2】

前記ポリヌクレオチドが修飾糖部分と結合した 1 つまたは複数のヌクレオチドをさらに含む、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 6 3】

前記修飾糖部分が 2' 置換糖及びロックド核酸糖から成る群から選択される、請求項 6 2 に記載の方法。

【請求項 6 4】

前記ポリヌクレオチドが 1 つまたは複数の非標準塩基をさらに含む、請求項 2 0 に記載の方法。

40

【請求項 6 5】

前記 1 つまたは複数の非標準塩基が、修飾プリン及び修飾ピリミジンから成る群から選択される、請求項 6 4 に記載の方法。

【請求項 6 6】

前記ポリヌクレオチドが 1 つまたは複数のペンダント基をさらに含む、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 6 7】

前記 1 つまたは複数のペンダント基が、親油性基、マイナーグループ結合剤、インターカレーター、キレート剤及び架橋剤から成る群から選択される、請求項 6 6 に記載の方法。

50

【請求項 68】

前記ポリヌクレオチドが、前記ポリヌクレオチドの3'もしくは5'末端のいずれかで、または両方の末端で結合される尾部部分をさらに含む、請求項20に記載の方法。

【請求項 69】

前記尾部部分が、リン酸、リン酸エステル、アルキル基、アミノアルキル基及び親油性基から成る群から選択される、請求項68に記載の方法。

【請求項 70】

(c)増幅反応を実施する工程をさらに含む、請求項20に記載の方法。

【請求項 71】

前記増幅反応が、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、逆転写酵素PCR、リアルタイムPCR、ネステッドPCR、マルチプレックスPCR、定量的PCR、核酸配列ベースの増幅、転写媒介性増幅、リガーゼ連鎖反応、ローリングサイクル増幅及び鎖置換増幅から成る群から選択される、請求項70に記載の方法。

10

【請求項 72】

前記増幅反応が自動サーマルサイクラーで実施される、請求項70に記載の方法。

【請求項 73】

(c)DNAシーケンシング反応を実施する工程をさらに含む、請求項20に記載の方法。

【請求項 74】

(c)プライマー伸長反応を実施する工程をさらに含む、請求項20に記載の方法。

20

【請求項 75】

(c)前記ポリヌクレオチドをアレイに結合させる工程をさらに含む、請求項20に記載の方法。

【請求項 76】

前記アレイが、チップアレイ、プラットフォームアレイ、ビーズアレイ、液相アレイ及びジップコードアレイから成る群から選択される、請求項75に記載の方法。

【請求項 77】

前記アレイが、ニトロセルロース、ガラス、シリコンウエハー又は光ファイバーを含む、請求項75に記載の方法。

【請求項 78】

(c)5'ヌクレアーゼ反応を実施する工程をさらに含む、請求項20に記載の方法。

30

【請求項 79】

前記検出する工程が、前記ポリヌクレオチドに結合した検出可能な標識又は蛍光消光剤を検出することを含む、請求項20に記載の方法。

【請求項 80】

前記ポリヌクレオチドが少なくとも1つのデオキシリボヌクレオチド部分をさらに含む、請求項22に記載の二重鎖。

【請求項 81】

前記修飾塩基が、前記デオキシリボヌクレオチド部分に共有結合されている、請求項80に記載の二重鎖。

40

【請求項 82】

前記ポリヌクレオチドが少なくとも1つのペプチド核酸部分を含む、請求項22に記載の二重鎖。

【請求項 83】

前記修飾塩基が、前記ポリヌクレオチド中の前記少なくとも1つのペプチド核酸部分に共有結合されている、請求項82に記載の二重鎖。

【請求項 84】

前記ポリヌクレオチドがPNA/DNAキメラである、請求項22に記載の二重鎖。

【請求項 85】

前記ポリヌクレオチドが少なくとも2つの修飾塩基を含み、前記少なくとも2つの修飾

50

塩基中の Z が、同じであるか、または異なる、請求項 22 に記載の二重鎖。

【請求項 86】

前記ポリヌクレオチドがその 3' 末端に、またはその 3' 末端から 1 つ目の塩基に前記修飾塩基を含む、請求項 22 に記載の二重鎖。

【請求項 87】

前記ポリヌクレオチドがマイナーグループ結合剤またはインターカレーターをさらに含む、請求項 22 に記載の二重鎖。

【請求項 88】

前記ポリヌクレオチドが糖修飾をさらに含む、請求項 22 に記載の二重鎖。

【請求項 89】

前記糖修飾が、アラビノース、d - アラビノ - ヘキシトール、2 - フルオロアラビノース、キシロース、ヘキソース、および二環式の糖から成る群から選択される、請求項 88 に記載の二重鎖。

【請求項 90】

前記ポリヌクレオチドが骨格修飾をさらに含む、請求項 22 に記載の二重鎖。

【請求項 91】

前記骨格修飾が、修飾糖リン酸骨格、ロックド核酸骨格、ペプチド骨格、ホスホトリエステル骨格、ホスホルアミデート骨格、シロキサン骨格、カルボキシメチルエステル骨格、アセトアミデート骨格、カルバメート骨格、チオエーテル骨格、架橋ホスホン酸メチレン骨格、ホスホロチオエート骨格、メチルホスホン酸骨格、アルキルホスホン酸骨格、リン酸エステル骨格、アルキルホスホノチオエート骨格、ホスホロジチオエート骨格、炭酸骨格、リン酸トリエステル骨格、カルボキシメチルエステル骨格、メチルホスホロチオエート骨格、ホスホロジチオエート骨格、p - エトキシ結合を有する骨格、および上述のいずれかのうちの 2 つまたはそれ以上の組合せから成る群から選択される、請求項 90 に記載の二重鎖。

【請求項 92】

前記ポリヌクレオチドが DNA または RNA 依存性ポリメラーゼ酵素により伸長可能である 3' 末端ヌクレオチドをさらに含む、請求項 22 に記載の二重鎖。

【請求項 93】

前記ポリヌクレオチドが 30 個よりも少ないヌクレオチドを含む、請求項 92 に記載の二重鎖。

【請求項 94】

前記ポリヌクレオチドが、9 ~ 25 個のヌクレオチドを含む、請求項 93 に記載の二重鎖。

【請求項 95】

前記ポリヌクレオチドが少なくとも 1 つの検出可能な標識をさらに含む、請求項 22 に記載の二重鎖。

【請求項 96】

前記検出可能な標識が、フルオロフォアである、請求項 95 に記載の二重鎖。

【請求項 97】

前記ポリヌクレオチドが、前記ポリヌクレオチドに結合した蛍光消光剤をさらに含む、請求項 22 に記載の二重鎖。

【請求項 98】

前記ポリヌクレオチドが、発色団、放射性同位体、スピン標識、酵素標識、化学発光標識、電気化学発光化合物、磁気標識、マイクロスフェア、コロイド金属、免疫学的標識、リガンド及び蛍光色素から成る群から選択される標識をさらに含む、請求項 22 に記載の二重鎖。

【請求項 99】

少なくとも 1 つの修飾塩基が、5' から 3' 方向で表される場合、前記ポリヌクレオチドの 1 位、前記ポリヌクレオチドの 2 位、前記ポリヌクレオチドの 3 位、前記ポリヌクレ

10

20

30

40

50

オチドの 4 位、前記ポリヌクレオチドの 5 位、前記ポリヌクレオチドの 6 位、前記ポリヌクレオチドの 7 位、前記ポリヌクレオチドの 8 位、前記ポリヌクレオチドの 9 位、前記ポリヌクレオチドの 10 位、前記ポリヌクレオチドの 11 位、前記ポリヌクレオチドの 12 位、前記ポリヌクレオチドの 13 位、前記ポリヌクレオチドの 14 位、前記ポリヌクレオチドの 15 位、前記ポリヌクレオチドの 16 位、前記ポリヌクレオチドの 17 位、前記ポリヌクレオチドの 18 位、前記ポリヌクレオチドの 19 位、及び前記ポリヌクレオチドの 20 位から成る群から選択される位置にある、請求項 22 に記載の二重鎖。

【請求項 100】

前記ポリヌクレオチドが固体支持体に結合される、請求項 22 に記載の二重鎖。

【請求項 101】

前記固体支持体がビーズ、アレイ、及びマイクロアレイから成る群から選択される、請求項 100 に記載の二重鎖。

【請求項 102】

前記ポリヌクレオチドが、修飾糖部分と結合した 1 つまたは複数のヌクレオチドをさらに含む、請求項 22 に記載の二重鎖。

【請求項 103】

前記修飾糖部分が 2' 置換糖及びロックド核酸糖から成る群から選択される、請求項 102 に記載の二重鎖。

【請求項 104】

前記ポリヌクレオチドが、1 つまたは複数の非標準塩基をさらに含む、請求項 22 に記載の二重鎖。

【請求項 105】

前記 1 つまたは複数の非標準塩基が、修飾プリン及び修飾ピリミジンから成る群から選択される、請求項 104 に記載の二重鎖。

【請求項 106】

前記ポリヌクレオチドが、1 つまたは複数のペンダント基をさらに含む、請求項 22 に記載の二重鎖。

【請求項 107】

前記 1 つまたは複数のペンダント基が、親油性基、マイナーグループ結合剤、インターカレーター、キレート剤及び架橋剤から成る群から選択される、請求項 106 に記載の二重鎖。

【請求項 108】

前記ポリヌクレオチドが、前記ポリヌクレオチドの 3' もしくは 5' 末端のいずれかで、または両方の末端で結合される尾部部分をさらに含む、請求項 22 に記載の二重鎖。

【請求項 109】

前記尾部部分が、リン酸、リン酸エステル、アルキル基、アミノアルキル基及び親油性基から成る群から選択される、請求項 108 に記載の二重鎖。

【請求項 110】

前記二重鎖が固体支持体に結合される、請求項 22 に記載の二重鎖。

【請求項 111】

前記固体支持体がビーズ、アレイ、及びマイクロアレイから成る群から選択される、請求項 110 に記載の二重鎖。

【請求項 112】

Z が O である、請求項 24 に記載の修飾ヌクレオシドホスホルアミダイト。

【請求項 113】

Q がトリチル、メトキシトリチル、またはジメトキシトリチルである、請求項 24 に記載の修飾ヌクレオシドホスホルアミダイト。

【請求項 114】

前記二座保護基が o - ベンジレン、 - メチル - o - ベンジレン、または、 - ジメチル - o - ベンジレンである、請求項 24 に記載の修飾ヌクレオシドホスホルアミダイト

10

20

30

40

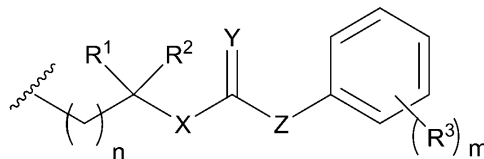
50

。

【請求項 1 1 5】

X^1 および X^2 は独立して、

【化 8】



で表される構造

10

(式中、 R^1 および R^2 は独立して、水素、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_2 \sim C_6$ アルケニル、 $C_2 \sim C_6$ アルキニル、 $C_3 \sim C_6$ シクロアルキル、またはフェニルであり、

n および m は独立して、0、1、2、3 または 4 であり、

X は、O または NR^4 であり、

Y は、O または S であり、

Z は、結合、O または NR^4 であり、

R^3 はそれぞれ、同じであるか、または異なり、独立して、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_2 \sim C_6$ アルケニル、 $C_2 \sim C_6$ アルキニル、 $C_3 \sim C_6$ シクロアルキル、シアノ、ニトロ、ハロゲン、 $C_1 \sim C_6$ アルキルオキシ、 $C_3 \sim C_6$ シクロアルキルオキシ、 $NR^{5a}R^{5b}$ またはフェニルであり、

20

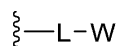
R^4 、 R^{5a} および R^{5b} はそれぞれ独立して、 $C_3 \sim C_6$ シクロアルキルまたはフェニルである)を有する、

請求項 2 4 に記載の修飾ヌクレオシドホスホルアミダイト。

【請求項 1 1 6】

X^1 および X^2 は独立して、

【化 9】



の構造

(式中、 L は、結合、 $C_1 \sim C_8$ アルキレン、 $C_2 \sim C_8$ ヘテロアルキレン、又は $C_2 \sim C_8$ アルケニレンであり、

30

W は、H、シアノ、 $C(O)NR^aR^b$ 、 NO_2 、 $N^+R^aR^bR^c$ 、 $C_6H_4NO_2$ 、 C_6H_4Cl 、 $C_6H_3(NO_2)_2$ 、 $C_6H_2(NO_2)_3$ 、 SO_2R^c 、または $S(O)_2OR^c$ であり、

R^a および R^b は独立して、H、 CF_3 、 $C_1 \sim C_8$ アルキルまたは $C_6 \sim C_{10}$ アリールであり、

R^c は、 $C_1 \sim C_8$ アルキルまたは $C_6 \sim C_{10}$ アリールである)を有する、

請求項 2 4 に記載の修飾ヌクレオシドホスホルアミダイト。

【請求項 1 1 7】

L が結合であり、 W が H である、請求項 1 1 6 に記載の修飾ヌクレオシドホスホルアミダイト。

40

【請求項 1 1 8】

X^1 および X^2 がそれぞれ独立して、ピバロイルオキシベンジル基である、請求項 2 4 に記載の修飾ヌクレオシドホスホルアミダイト。

【請求項 1 1 9】

Q^1 が H であり、 Q^2 が Fmoc であり、 Q^3 が H である、請求項 2 5 に記載の修飾ペプチド核酸モノマー。

【請求項 1 2 0】

前記ポリヌクレオチドが、フルオロフォアの部分をさらに含む、請求項 2 0 に記載の方法。

50

【請求項 1 2 1】

前記ポリヌクレオチドが、フルオロフォアの部分をさらに含む、請求項 2 2 に記載の二重鎖。

【請求項 1 2 2】

前記ポリヌクレオチドが、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ストレプトアビジン、ビオチン、抗体により認識されるエピトープ、クマリン、クマリン誘導体、シアニン色素、エオシン、エリスロシン、ランタニドイオンの大環状キレート、ローダミン色素及び蛍光エネルギー移動色素から成る群から選択される標識を更に含む、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 1 2 3】

前記修飾糖部分が、2' - O - アルキル - リボース糖、2' - アミノ - デオキシリボース糖、2' - フルオロ - デオキシリボース糖、2' - フルオロ - アラビノース糖、及び 2' - O - メトキシエチル - リボース糖から成る群から選択される、請求項 3 2 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 1 2 4】

前記 1 つまたは複数の非標準塩基が、無置換ピラゾロ [3 , 4 - d] ピリミジン塩基、3 - 置換ピラゾロ [3 , 4 - d] ピリミジン及び 5 - 置換ピリミジンから成る群から選択される、請求項 3 4 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 1 2 5】

前記ポリヌクレオチドが、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ストレプトアビジン、ビオチン、抗体により認識されるエピトープ、クマリン、クマリン誘導体、シアニン色素、エオシン、エリスロシン、ランタニドイオンの大環状キレート、ローダミン色素及び蛍光エネルギー移動色素から成る群から選択される標識を更に含む、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 1 2 6】

前記修飾糖部分が、2' - O - アルキル - リボース糖、2' - アミノ - デオキシリボース糖、2' - フルオロ - デオキシリボース糖、2' - フルオロ - アラビノース糖、及び 2' - O - メトキシエチル - リボース糖から成る群から選択される、請求項 6 2 に記載の方法。

【請求項 1 2 7】

前記 1 つまたは複数の非標準塩基が、無置換ピラゾロ [3 , 4 - d] ピリミジン塩基、3 - 置換ピラゾロ [3 , 4 - d] ピリミジン及び 5 - 置換ピリミジンから成る群から選択される、請求項 6 4 に記載の方法。

【請求項 1 2 8】

前記検出する工程が、前記ポリヌクレオチドに結合したフルオロフォアを検出することを含む、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 1 2 9】

前記ポリヌクレオチドが、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ストレプトアビジン、ビオチン、抗体により認識されるエピトープ、クマリン、クマリン誘導体、シアニン色素、エオシン、エリスロシン、ランタニドイオンの大環状キレート、ローダミン色素及び蛍光エネルギー移動色素から成る群から選択される標識を更に含む、請求項 2 2 に記載の二重鎖。

【請求項 1 3 0】

前記修飾糖部分が、2' - O - アルキル - リボース糖、2' - アミノ - デオキシリボース糖、2' - フルオロ - デオキシリボース糖、2' - フルオロ - アラビノース糖、及び 2' - O - メトキシエチル - リボース糖から成る群から選択される、請求項 1 0 2 に記載の二重鎖。

【請求項 1 3 1】

前記 1 つまたは複数の非標準塩基が、無置換ピラゾロ [3 , 4 - d] ピリミジン塩基、3 - 置換ピラゾロ [3 , 4 - d] ピリミジン及び 5 - 置換ピリミジンから成る群から選択

10

20

30

40

50

される、請求項 104 に記載の二重鎖。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願に対する相互参照

本出願は、2014年3月30日に出願され、「修飾チミンポリヌクレオチドオリゴマーおよび方法」という表題の仮特許出願番号第61/972,389号、および2015年3月30日に出願され、「修飾チミンポリヌクレオチドオリゴマーおよび方法」という表題の非仮特許出願番号第14/673,403号の有益性を主張し、それらの開示は、
それらの全体が全ての目的に関して参照により本明細書に援用される。

10

【0002】

発明の分野

本明細書中の技術は、核酸に関する。

【背景技術】

【0003】

ポリヌクレオチドは、例えば、標的検出、診断用途、治療用途、核酸配列決定、法医学的分析、および標的増幅などの様々な用途で有用である。通常、かかる用途は、特に標的核酸が限られた量で利用可能である場合に、高い特異性および感度を有する相補なポリヌクレオチド鎖とハイブリダイズするポリヌクレオチドを要する。

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

修飾塩基を有するヌクレオチドアナログは、核酸ハイブリダイゼーション、増幅および/または検出の強度、感度および特異性を変更させるためにポリヌクレオチド中に含めるために開発されてきた。それにもかかわらず、核酸の操作および分析に利用可能な一連のツールを拡張させるのに、新たな化学構造および方法が必要とされる。

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明は、とりわけ、アデニンまたは2,6-ジアミノプリン塩基と高められた塩基対形成を提供し得る新規の天然に存在しないチミジン様修飾塩基（本明細書中では「修飾チミン塩基」または単に「修飾塩基」とも称される）、かかる修飾塩基を含むポリヌクレオチドオリゴマー、およびそれらの使用を提供する。

30

【0006】

驚くべきことに、本発明の修飾塩基は、ポリヌクレオチドオリゴマーに組み込まれると、かかる修飾塩基を含有しないオリゴマーと比較した場合に、相補的な配列とのハイブリダイゼーションに関して、それらを含むオリゴマーの結合親和性および特異性を増大させることが発見された。この驚くべき見解により、オリゴマーとその相補的な標的配列との間の相補性のより短いオリゴマーまたはより短い領域の使用が可能となる。本発明の修飾チミン塩基のさらなる利点は、それらが、それらを含むオリゴマーの水溶解度を高めることができるということである。これは、DNAおよびRNAの溶解度と比較して、比較的水不溶性であることが周知であるポリ核酸（PNA）オリゴマーの溶解度を増大させるのに特に有用であり得る。水溶解度の増大（ハイブリダイゼーション中のアデニンなどの相補的な塩基に対するチミンおよびウラシルの塩基対形成親和性の強度の増大に加えて）もまた、水性条件で標識されたポリヌクレオチドオリゴマーの望ましくない沈殿および凝集を促進し得る芳香族フルオロフォアおよび消光剤部分の疎水性を相殺するのに有用であり得る。さらに、本発明の1つまたは複数の修飾塩基は、使用者の特定のニーズに応じて、オリゴマー塩基配列中のどこに位置させてよい。

40

【0007】

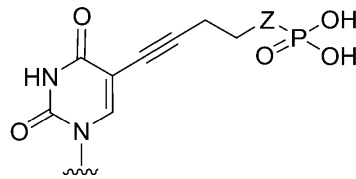
本発明のポリヌクレオチドオリゴマーは、任意数の修飾塩基を含んでもよい。本発明の

50

幾つかの実施形態では、ポリヌクレオチドオリゴマーは、少なくとも1つの修飾塩基を含み、ここで修飾塩基は、式：

【0008】

【化1】



【0009】

(式中、Zは、CH₂またはOである)で表される。本発明の特定の実施形態では、ZはOである。本明細書中で上記式中に示されるような修飾塩基は、「チミジン様修飾塩基」、「修飾チミン塩基」、または単に「修飾塩基」と称される。

【0010】

本発明のポリヌクレオチドオリゴマーは、任意数のデオキシヌクレオチド部分を含んでもよい。幾つかの実施形態では、ポリヌクレオチドオリゴマーは、少なくとも1つのデオキシリボヌクレオチド部分を含む。幾つかの実施形態では、修飾チミン塩基は、ポリヌクレオチドオリゴマー中のデオキシリボヌクレオチド部分に共有結合されている。

【0011】

本発明のポリヌクレオチドオリゴマーはまた、任意数のペプチド核酸(PNA)部分を含んでもよい。幾つかの実施形態では、ポリヌクレオチドオリゴマーは、少なくとも1つのペプチド核酸(PNA)部分を含む。幾つかの実施形態では、修飾チミン塩基は、ポリヌクレオチドオリゴマー中のペプチド核酸部分に共有結合されている。

【0012】

幾つかの実施形態では、ポリヌクレオチドオリゴマーは、PNA/DNAキメラであり、ここで本発明の修飾チミン塩基は、キメラのPNAセグメント中、もしくはDNAセグメント中に含まれるか、またはキメラのPNAセグメントおよびDNAセグメントの両方がそれぞれ、かかる修飾塩基を含む。

【0013】

本発明のポリヌクレオチドは、任意数の修飾塩基を含んでもよい。幾つかの実施形態では、ポリヌクレオチドオリゴマーは、複数の修飾塩基を含む。幾つかの実施形態では、ポリヌクレオチドオリゴマーは、少なくとも2つの修飾塩基を含む。ポリヌクレオチドオリゴマーが、複数の修飾チミン塩基を含む場合、修飾チミン塩基は、同じであってもよく、または異なってもよい。

【0014】

ポリヌクレオチドオリゴマー内で、修飾チミン塩基がどこに組み込まれ得るかにして制限はない。本発明の幾つかの実施形態では、ポリヌクレオチドオリゴマーは、ポリヌクレオチドオリゴマーの3'末端に修飾チミン塩基を含む。幾つかの実施形態では、ポリヌクレオチドオリゴマーは、ポリヌクレオチドオリゴマーの3'末端から1つ目の塩基に修飾チミン塩基を含む。

【0015】

本発明のポリヌクレオチドオリゴマーは、1つまたは複数のさらなる化合物を含んでもよい。本発明の幾つかの実施形態では、ポリヌクレオチドオリゴマーは、マイナーグループ結合剤を含む。幾つかの実施形態では、ポリヌクレオチドオリゴマーは、インターカレーターを含む。

【0016】

本発明の好ましいポリヌクレオチドオリゴマーは、骨格が2'-デオキシリボースまたはリボースを含むポリヌクレオチドオリゴマーである。しかしながら、本発明のポリヌクレオチドオリゴマーは、1つまたは複数の修飾を含んでもよい。幾つかの実施形態では、ポリヌクレオチドオリゴマーは、糖修飾を含む。各種糖修飾が有用である。幾つかの非限

10

20

30

40

50

定的な糖修飾として、アラビノース、d - アラビノ - ヘキシトール、2 - フルオロアラビノース、キシロース、ヘキソース、または二環式の糖が挙げられる。

【0017】

本発明のポリヌクレオチドオリゴマーは、1つまたは複数の骨格修飾を含んでもよい。幾つかの実施形態では、ポリヌクレオチドオリゴマーは、骨格修飾を含む。幾つかの実施形態では、骨格修飾は、修飾糖リン酸骨格、ロックド核酸骨格、ペプチド骨格、ホスホトリエステル骨格、ホスホルアミデート骨格、シロキサン骨格、カルボキシメチルエステル骨格、アセトアミデート骨格、カルバメート骨格、チオエーテル骨格、架橋ホスホン酸メチレン骨格、ホスホロチオエート骨格、メチルホスホン酸骨格、アルキルホスホン酸骨格、リン酸エステル骨格、アルキルホスホノチオエート骨格、ホスホロジチオエート骨格、炭酸骨格、リン酸トリエステル骨格、カルボキシメチルエステル骨格、メチルホスホロチオエート骨格、ホスホロジチオエート骨格、p - エトキシ結合を有する骨格、および上述のいずれかの2つまたはそれ以上の組合せから成る群から選択される。本発明の特定の実施形態では、骨格修飾は、修飾糖リン酸骨格である。

【0018】

本発明の幾つかの実施形態では、ポリヌクレオチドオリゴマーは、DNAまたはRNA依存性ポリメラーゼ酵素により伸長可能である3'末端ヌクレオチドを含む。

【0019】

本発明のポリヌクレオチドオリゴマーは、任意の有用な数のヌクレオチドを含んでもよい。幾つかの実施形態では、ポリヌクレオチドオリゴマーは、30個よりも少ないヌクレオチドを含む。幾つかの実施形態では、ポリヌクレオチドオリゴマーは、約9～約25個のヌクレオチド、即ち9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24または25個のヌクレオチドを含む。

【0020】

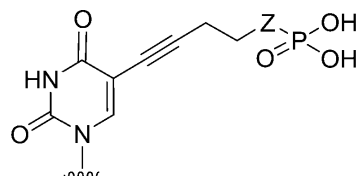
本発明のポリヌクレオチドオリゴマーは、1つまたは複数の検出可能な標識を含んでもよい。本発明の幾つかの実施形態では、ポリヌクレオチドオリゴマーは、少なくとも1つの検出可能な標識を含む。検出可能な標識は制限される。幾つかの実施形態では、検出可能な標識は、フルオロフォアまたは蛍光消光剤である。幾つかの実施形態では、ポリヌクレオチドオリゴマーは、フルオロフォアおよび消光剤を含む。

【0021】

本発明はまた、ハイブリダイゼーションのための方法において、本発明の修飾チミン塩基を使用する方法を提供する。本明細書中に記載する修飾チミン塩基のいずれかが、ハイブリダイゼーションのための方法で使用されてもよい。本発明の幾つかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチドオリゴマーと、反応混合物中に存在すると推測される核酸標的配列とのハイブリダイゼーションのための方法が提供される。幾つかの実施形態では、上記方法は、ポリヌクレオチドオリゴマーを含み、かつ標的核酸配列を含むと推測される反応混合物を、反応混合物中に存在する場合に標的核酸配列とのポリヌクレオチドオリゴマーのハイブリダイゼーションに好適な条件下でインキュベートする工程を含む。その方法で使用されるポリヌクレオチドオリゴマーは、反応混合物中に存在すると推測される核酸標的配列内の配列に相補的であり、式：

【0022】

【化2】



【0023】

(式中、Zは、CH₂またはOである)で表される少なくとも1つの修飾塩基を含む。本発明の特定の実施形態では、ZはOである。

【 0 0 2 4 】

反応混合物をインキュベートして、それによりポリヌクレオチドオリゴマーと、反応混合物中に存在する場合には標的核酸配列との間で二重鎖を形成する。幾つかの実施形態では、上記方法は、反応混合物中の標的核酸配列の存在を検出するか、または標的核酸配列の非存在を確認する工程を含む。反応混合物中の標的核酸配列の存在は、かかる二重鎖の形成の結果として検出される。反応混合物中の標的核酸配列の非存在は、かかる二重鎖の無形成の結果として確認される。上記方法の幾つかの実施形態では、ポリヌクレオチドオリゴマーは、検出可能な標識、フルオロフォアおよび蛍光消光剤から成る群から選択される部分を含む。検出可能な標識、フルオロフォアおよび / または蛍光消光剤は、二重鎖、および / または標的核酸配列の検出を容易とする。

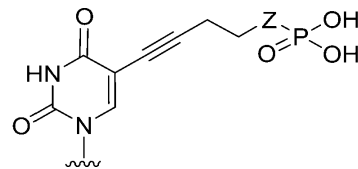
10

【 0 0 2 5 】

本発明はまた、本発明の修飾チミン塩基を含む任意数のポリヌクレオチドオリゴマーを含む二重鎖を提供する。本発明の幾つかの実施形態では、二重鎖は、少なくとも1つのポリヌクレオチドオリゴマーおよびポリヌクレオチド配列を含む。少なくとも1つのポリヌクレオチドオリゴマーは、修飾チミン塩基、および相補的なポリヌクレオチド配列の少なくとも4つの連続塩基と相補的でありそれらとハイブリダイズされている4つまたはそれ以上の連続塩基を含む。かかる二重鎖は、本発明の任意のポリヌクレオチドオリゴマーで形成され得る。幾つかの実施形態では、二重鎖を伴うポリヌクレオチドオリゴマーは、下記式

【 0 0 2 6 】

【 化 3 】



【 0 0 2 7 】

(式中、Zは、 CH_2 またはOである)で表される少なくとも1つの修飾塩基を含む。本発明の特定の実施形態では、ZはOである。

【 0 0 2 8 】

幾つかの実施形態では、二重鎖内のポリヌクレオチドオリゴマーは、検出可能な標識、フルオロフォアおよび蛍光消光剤から成る群から選択される部分を含む。検出可能な標識、フルオロフォアおよび / または蛍光消光剤は、二重鎖、および / または二重鎖内のポリヌクレオチド配列の検出を容易とする。

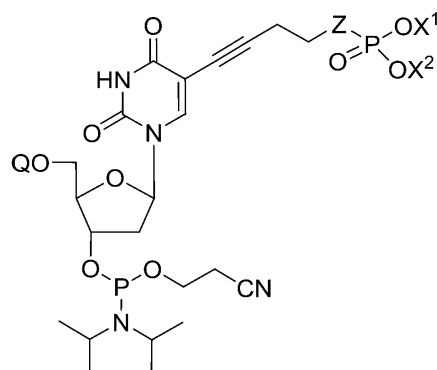
30

【 0 0 2 9 】

本発明の幾つかの実施形態では、修飾ヌクレオシドホスホルアミダイトが提供される。本発明の幾つかの実施形態では、修飾ヌクレオシドホスホルアミダイトは、式：

【 0 0 3 0 】

【 化 4 】



40

【 0 0 3 1 】

50

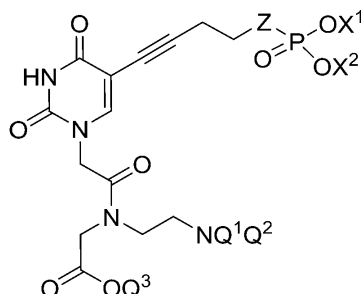
(式中、Zは、 CH_2 またはOであり、 X^1 および X^2 は別個になって、同じであるか、もしくは異なる保護基であるか、または X^1 および X^2 は一緒になって、二座保護基であり、Qは、ヒドロキシル保護基である)で表される。本発明の特定の実施形態では、ZはOである。

【0032】

本発明の幾つかの実施形態では、修飾ペプチド核酸モノマーが提供される。本発明の実施形態では、修飾ペプチド核酸モノマーは、式：

【0033】

【化5】



10

【0034】

(式中、Zは、 CH_2 またはOであり、 X^1 および X^2 は別個になって、同じであるか、もしくは異なる保護基であるか、または X^1 および X^2 は一緒になって、二座保護基であり、 Q^1 および Q^2 は独立して、Hもしくは窒素保護基であるか、または Q^1 および Q^2 は一緒に、窒素保護基であり、 Q^3 は、Hまたはカルボキシル保護基である)で表される。本発明の特定の実施形態では、ZはOである。

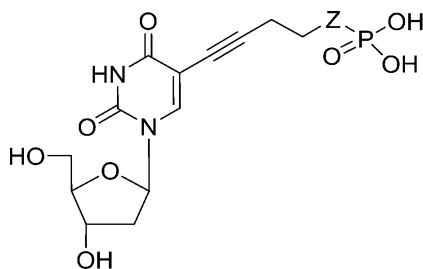
20

【0035】

本発明の幾つかの実施形態では、修飾チミンヌクレオシドが提供される。本発明の幾つかの実施形態では、修飾チミンヌクレオシドは、式：

【0036】

【化6】



30

【0037】

(式中、Zは、 CH_2 またはOである)で表される。本発明の特定の実施形態では、ZはOである。

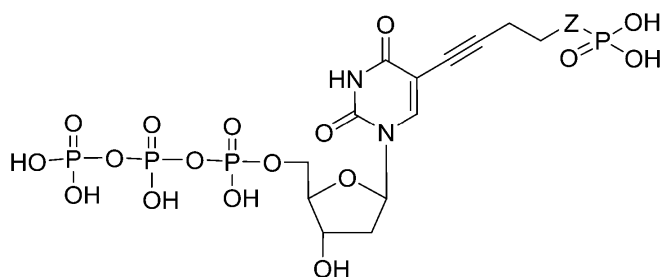
【0038】

本発明の幾つかの実施形態では、修飾チミジンヌクレオチド5'-三リン酸が提供される。本発明の幾つかの実施形態では、修飾チミジンヌクレオチド5'-三リン酸は、式：

40

【0039】

【化7】



50

【 0 0 4 0 】

(式中、Zは、 CH_2 またはOである)で表される。本発明の特定の実施形態では、ZはOである。

【 0 0 4 1 】

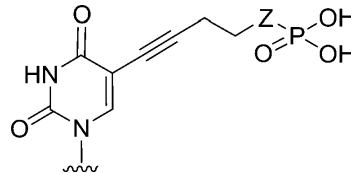
本発明の幾つかの実施形態を、以下に請求項形式で直接記載する：

【 0 0 4 2 】

請求項1． 少なくとも1つの修飾塩基を含むポリヌクレオチドオリゴマーであって、該少なくとも1つの修飾塩基が、式：

【 0 0 4 3 】

【化8】



10

【 0 0 4 4 】

(式中、Zは、 CH_2 またはOであり、好ましくは、ZはOである)で表されるポリヌクレオチドオリゴマー。

【 0 0 4 5 】

請求項2． 複数のデオキシリボヌクレオチド部分、好ましくは少なくとも1つのデオキシリボヌクレオチド部分を含む、請求項1に記載のポリヌクレオチドオリゴマー。

20

【 0 0 4 6 】

請求項3． 前記修飾塩基が、前記少なくとも1つのデオキシリボヌクレオチド部分に共有結合されている、請求項2に記載のポリヌクレオチドオリゴマー。

【 0 0 4 7 】

請求項4． 複数のペプチド核酸部分、好ましくは少なくとも1つのペプチド核酸部分を含む、請求項1から3のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドオリゴマー。

【 0 0 4 8 】

請求項5． 前記修飾塩基が、前記少なくとも1つのペプチド核酸部分に共有結合されている、請求項4に記載のポリヌクレオチドオリゴマー。

30

【 0 0 4 9 】

請求項6． PNA/DNAキメラである、請求項1から5のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドオリゴマー。

【 0 0 5 0 】

請求項7． 少なくとも2つの修飾塩基を含み、該少なくとも2つの修飾塩基中のZが、同じであるか、または異なる、請求項1から6のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドオリゴマー。

【 0 0 5 1 】

請求項8． その3'末端に、またはその3'末端から1つ目の塩基に前記修飾塩基を含む、請求項1から7のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドオリゴマー。

40

【 0 0 5 2 】

請求項9． マイナーグループ結合剤またはインターカレーターをさらに含む、請求項1から8のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドオリゴマー。

【 0 0 5 3 】

請求項10． 糖修飾をさらに含み、好ましくは、前記糖修飾が、アラビノース、d-アラビノ-ヘキシトール、2-フルオロアラビノース、キシロース、ヘキソース、および二環式の糖から成る群から選択される、請求項1から9のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドオリゴマー。

【 0 0 5 4 】

請求項11． 骨格修飾をさらに含み、好ましくは、前記骨格修飾が、修飾糖リン酸骨

50

格、ロックド核酸骨格、ペプチド骨格、ホスホトリエステル骨格、ホスホルアミデート骨格、シロキサン骨格、カルボキシメチルエステル骨格、アセトアミデート骨格、カルバメート骨格、チオエーテル骨格、架橋ホスホン酸メチレン骨格、ホスホロチオエート骨格、メチルホスホン酸骨格、アルキルホスホン酸骨格、リン酸エステル骨格、アルキルホスホノチオエート骨格、ホスホロジチオエート骨格、炭酸骨格、リン酸トリエステル骨格、カルボキシメチルエステル骨格、メチルホスホロチオエート骨格、ホスホロジチオエート骨格、p - エトキシ結合を有する骨格、および上述のいずれかのうちの2つまたはそれ以上の組合せから成る群から選択され、好ましくは、前記骨格修飾が、修飾糖リン酸骨格である、請求項1から10のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドオリゴマー。

【0055】

10

請求項12. DNAまたはRNA依存性ポリメラーゼ酵素により伸長可能である3'末端ヌクレオチドをさらに含む、請求項1から11のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドオリゴマー。

【0056】

請求項13. 30個よりも少ないヌクレオチドを含み、好ましくは前記オリゴヌクレオチドオリゴマーが、約9～約25個のヌクレオチドを含む、請求項1または2に記載のポリヌクレオチドオリゴマー。

【0057】

請求項14. 検出可能な標識、フルオロフォア、および蛍光消光剤から成る群から選択される部分をさらに含む、請求項1から13のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドオリゴマー。

20

【0058】

請求項15. 請求項1から14のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドオリゴマーと、反応混合物中に存在すると推測される核酸標的配列とのハイブリダイゼーションのための方法であって、

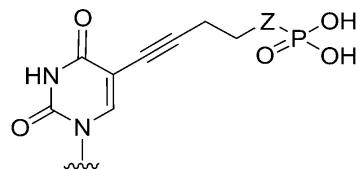
(a) 請求項1から14のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドオリゴマーを含み、かつ標的核酸配列を含むと推測される反応混合物を、該反応混合物中に存在する場合に該標的核酸配列との該ポリヌクレオチドオリゴマーのハイブリダイゼーションに好適な条件下でインキュベートする工程、および

(b) 該反応混合物中の該標的核酸配列の存在を検出するか、または該標的核酸配列の非存在を確認する工程であって、該ポリヌクレオチドオリゴマーが、該核酸標的配列内の配列に相補的であり、該ポリヌクレオチドオリゴマーが、少なくとも1つの修飾塩基を含み、該少なくとも1つの修飾塩基が、式：

30

【0059】

【化9】



40

【0060】

(式中、Zは、CH₂またはOであり、好ましくは、ZはOである)で表される工程を含む方法。

【0061】

請求項16. 前記ポリヌクレオチドオリゴマーが、検出可能な標識、フルオロフォアおよび蛍光消光剤から成る群から選択される部分をさらに含む、請求項15に記載の方法。

【0062】

請求項17. (i) 請求項1から14のいずれか一項に記載の少なくとも1つのポリヌクレオチド、および

50

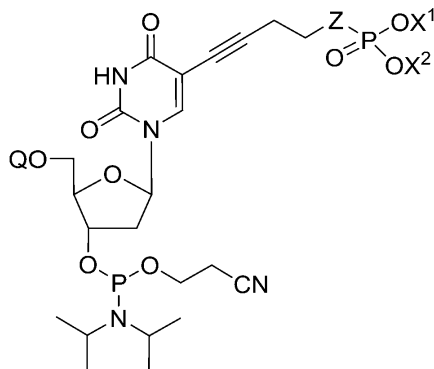
(i i) ポリヌクレオチド配列
を含む二重鎖であって、請求項 1 から 1 4 のいずれか一項に記載の該少なくとも 1 つのポリヌクレオチドオリゴマーが、該ポリヌクレオチド配列の少なくとも 4 つの連続塩基と相補的でありそれらとハイブリダイズされている 4 つまたはそれ以上の連続塩基を含む二重鎖。

【 0 0 6 3 】

請求項 1 8 . 式 :

【 0 0 6 4 】

【 化 1 0 】



10

【 0 0 6 5 】

20

(式中、

Z は、 CH_2 または O であり、好ましくは、Z は O であり、

X^1 および X^2 は別個になって、同じであるか、もしくは異なる保護基であるか、または X^1 および X^2 は一緒になって、二座保護基であり、

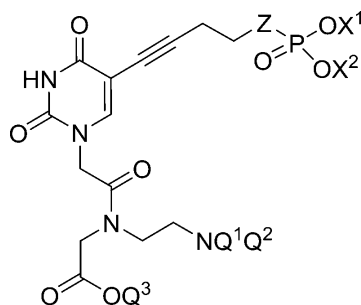
Q は、ヒドロキシル保護基である) で表される修飾ヌクレオシドホスホルアミダイト。

【 0 0 6 6 】

請求項 1 9 . 式 :

【 0 0 6 7 】

【 化 1 1 】



30

【 0 0 6 8 】

(式中、

Z は、 CH_2 または O であり、好ましくは、Z は O であり、

X^1 および X^2 は別個になって、同じであるか、もしくは異なる保護基であるか、または X^1 および X^2 は一緒になって、二座保護基であり、

Q^1 および Q^2 は独立して、Hもしくは窒素保護基であるか、または Q^1 および Q^2 は一緒に、窒素保護基であり、

Q^3 は、Hまたはカルボキシル保護基である) で表される修飾ペプチド核酸モノマー。

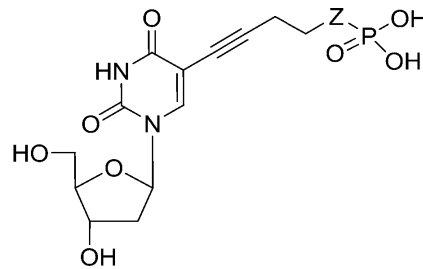
【 0 0 6 9 】

請求項 2 0 . 式 :

【 0 0 7 0 】

40

【化 1 2】



【0071】

(式中、Zは、 CH_2 またはOであり、好ましくはZはOである)で表される修飾チミンヌクレオシド。

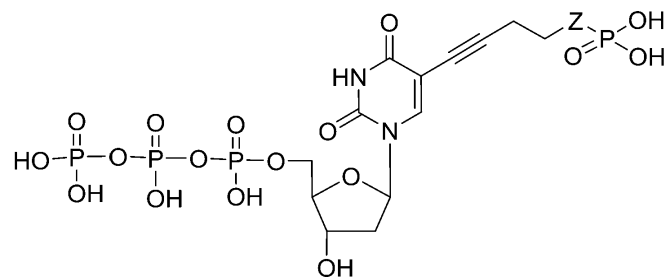
10

【0072】

請求項21. 式:

【0073】

【化 1 3】



20

【0074】

(式中、Zは、 CH_2 またはOであり、好ましくはZはOである)で表される修飾チミンヌクレオチド5'-三リン酸。

【0075】

本発明のさらなる特徴および利点を、下記の説明で記載する。開示のこれらの特徴および他の特徴は、下記の説明から十分に明らかとなり、本明細書中に記載する原則の実施により習得することができる。

【図面の簡単な説明】

30

【0076】

【図1A】ポリヌクレオチドオリゴマー(T1、T2およびT1-2)の混合物のRP(逆相)HPLC後の時間に対する吸光度(260nm)を示すクロマトグラムを図式的に表す図である。オリゴマーT1およびT2はそれぞれ、「 $\text{T}^{\text{B P}}$ 」と称される本発明の修飾塩基を含み、オリゴマーT1-2は、2つの $\text{T}^{\text{B P}}$ 部分を含む。図1Aにおけるオリゴマーはそれぞれ、5'ジメトキシトリチル(DMT)保護基を含有する。さらなる詳細は、実施例5および表3に提供する。

【図1B】図1Bは、ポリヌクレオチドオリゴマー(T1、T2およびT1-2)の混合物のRP(逆相)HPLC後の時間に対する吸光度(260nm)を示すクロマトグラムを図式的に表す。オリゴマーT1およびT2はそれぞれ、「 $\text{T}^{\text{B P}}$ 」と称される本発明の修飾塩基を含み、オリゴマーT1-2は、2つの $\text{T}^{\text{B P}}$ 部分を含む。図1Bで示される混合物では、DMT保護基は、オリゴマーから除去されている。さらなる詳細は、実施例5および表3に提供する。

40

【図2】それぞれが相補的なDNAポリヌクレオチドとハイブリダイズされる、4つの修飾塩基(「 $\text{T}^{\text{B P}}$ 」)を含むポリヌクレオチドオリゴマー、および標準的なT塩基(「未修飾」と称される)のみを含む第2のポリヌクレオチドオリゴマーから得られる、温度()に対する270nmでの吸光度(A^{270})の一次導関数としてプロットされる融解曲線を図式的に表す図である。図は、 $\text{T}^{\text{B P}}$ 置換されたオリゴマーが、4つの天然に存在しない $\text{T}^{\text{B P}}$ 塩基の代わりに標準的な天然に存在するT塩基のみを含有する天然の同じ配列のDNAポリヌクレオチドよりも、相補的な核酸配列に対して著しく強力なハイブリダ

50

イゼーション親和性を有することを示す。さらなる詳細は、実施例 6 および表 3 に提供する。

【図 3 A】P f 1 - T - 1、P f 1 - T - 2、P f 1 - T - 3、P f 1 - T - 4 および P f 1 - T - 5 として示される 1 ~ 6 つの T^B P 置換を含む蛍光プローブを使用した 5'ヌクレアーゼ PCR 反応から得られるサイクル数の関数としての蛍光 (516 nm、FAM (Em)) のプロットを図式的に示す図である。P f 1 は、修飾チミンプローブと同じヌクレオチド配列を有するが、天然の塩基、即ち未修飾チミン塩基のみを含む。さらなる詳細は、実施例 7 および表 3 に提供する。

【図 3 B】P f 1 - T - 6、P f 1 - T - 7、および P f 1 - T - 8 として示される 1 ~ 6 つの T^B P 置換を含む蛍光プローブを使用した 5'ヌクレアーゼ PCR 反応から得られるサイクル数の関数としての蛍光 (516 nm、FAM (Em)) のプロットを図式的に示す図である。P f 1 は、修飾チミンプローブと同じヌクレオチド配列を有するが、天然の塩基、即ち未修飾チミン塩基のみを含む。さらなる詳細は、実施例 7 および表 3 に提供する。

【図 4】図 4 は、それぞれが、蛍光プローブ、および 5'末端付近、中間位置付近、または 3'末端付近に 1 つの T^B P 修飾塩基を含む 3 つのフォワードプライマー、および標準的な未修飾 T 塩基のみを含む 2 つのリバースプライマーの種々の対での組合せを使用した 5'ヌクレアーゼ PCR 反応から得られるサイクル数の関数としての蛍光 (516 nm、FAM (Em)) のプロットを図式的に示す図である。対での組合せは、P 1 F + P 1 - 1 R、P 1 F + P 1 R、P 1 F + P 2 R、P 2 F + P 1 - 1 R、P 2 F + P 1 R、P 2 F + P 2 R として示される。さらなる詳細は、実施例 8 および表 3 に提供する。

【図 5】図 5 は、4 つのポリヌクレオチドオリゴマー (未修飾 PNA および 3 つの修飾 PNA オリゴマー: PNA - T 1、PNA - T 2 および PNA - T 3) の重ね合わせた RP (逆相) HPLC クロマトグラム (時間に対する吸光度 (270 nm)) を図式的に表す図である。オリゴマー T 1 および T 2 はそれぞれ、本発明の「T^B P」修飾塩基を含み、オリゴマー T 3 は、2 つの T^B P 部分を含む。さらなる詳細は、実施例 12 および表 3 に提供する。

【発明を実施するための形態】

【0077】

I. 定義

本明細書および併記の特許請求の範囲の全体にわたって、「を含む」および「を包含する」という単語は、「を含む (単数形)」、「を含んでいる」、「を包含する (単数形)」および「を包含している」などのそれらの変形は、包括的に解釈されよう。即ち、これらの単語は、文脈において可能であれば、具体的に列挙されない他の要素または整数の考え得る包含を意味することが意図される。明細書中の言語は、本発明の実施に必須な任意の特許請求されない要素を示すと解釈されるべきではない。本明細書中で使用する場合、「から成る」という用語は、「から成る」という語句に続くものを含み、かつそれらに限定されることを意味すると意図される。したがって、「から成る」という語句は、列挙される要素が必要とされるか、または必須であること、および他の要素が存在し得ないことを示す。「から本質的に成る」という用語は、組成物、方法または構造が、さらなる成分、工程および/または部品を含んでもよいが、さらなる成分、工程および/または部品が、特許請求する組成物、方法または構造の基本的および新規特性を実質的に変更させない場合に限ることを意味する。

【0078】

本発明について記載する文脈で (特に以降の請求項における文脈で) 使用される単数形の用語および類似の指示対象は、本明細書中で別記されない限り、または文脈により明らかに矛盾しない限りは、単数形および複数形の両方を網羅すると解釈されるべきである。

【0079】

本明細書中の値の範囲の列挙は、本明細書中で別記されない限り、範囲内に収まる別個の値それぞれに個別に言及する簡便な方法として役割を果たすと単に意図され、別個の値

それぞれが、本明細書中で個別に列挙されているかのように、明細書中に組み込まれる。範囲は、「約」（または「およそ」）ある特定の値から、および／または「約」（または「およそ」）別の特定の値として本明細書中で表され得る。かかる範囲が表される場合、別の実施形態は、ある特定の値から、および／または他の特定の値までを包含する。同様に、値が、先行する「約」または「およそ」の使用により、近似値として表される場合、特定の値が別の実施形態を形成することが理解されよう。さらに、範囲それぞれの終点は、他の終点に関連して、および他の終点とは無関係に重要であることが理解されよう。また、多数の本明細書中に開示する値が存在すること、およびその各値が、値自体の他に「約」その特定の値としても開示されると理解されよう。例えば、値「10」が開示される場合、「約10」もまた開示される。また、当業者により適切に理解されるように、値が、「その値未満、またはその値に等しい」または「その値よりも大きい」か、またはその値に等しい」値が開示される場合、これらの値間での考え得る範囲もまた、開示されることが理解されよう。例えば、値「10」が開示される場合、「10未満、または10に等しい」ならびに「10よりも大きい」か、または「10に等しい」もまた開示される。

10

【0080】

本明細書中に記載する方法は全て、本明細書中で別記されない限り、または他の箇所文脈により明らかに矛盾しない限りは、任意の適切な順序で実施することができる。さらに、本明細書中に記載し、かつ1つよりも多い工程を有する方法は全て、1人よりも多い人または実在者により実施することができる。したがって、人または実在者は、方法の工程(a)を実施することができ、別の人または別の実在者は、方法の工程(b)を実施することができ、さらなる別の人またはさらなる別の実在者は、方法の工程(c)を実施することができるなどである。本明細書中に提供する任意および全ての例、または例示的な言語(例えば、「などの」)の使用は、本発明をより良好に明らかにすると単に意図されるものであり、他の箇所の特許請求している本発明の範囲に対して限定を課すものではない。

20

【0081】

単位、接頭辞および記号は、それらの国際単位系(SI)の認められる形態で表される。別記されない限り、核酸は、5'から3'への配向性で左から右へ描かれ、アミノ酸配列は、アミノからカルボキシへの配向性で左から右へ描かれる。

【0082】

本明細書中に開示する本発明の代替的な要素または実施形態の分類は、限定と解釈されるべきではない。各群の成員は、個別に、または本明細書中に見出される群または他の要素の他の成員との任意の組合せで、言及され、特許請求され得る。群の1つまたは複数の成員は、利便性および／または特許性の理由で、群に包含され得るか、または群から削除され得る。任意のかかる包含または削除が行われると、明細書は、修飾されるような群を含有すると本明細書中でみなされ、したがって、併記の特許請求の範囲で使用する全てのマーカー群の書面による明細を満たす。

30

【0083】

本明細書中で使用する見出しは、構成的な目的のためのためであり、説明および特許請求の範囲を限定するのに使用されることは意図されず、それらは、全体として明細書に対する参照により付され得る。したがって、以下で即座に規定される用語は、その全体が明細書に対する参照によって、より完全に規定される。

40

【0084】

説明は、本発明の好ましい実施形態について記載する方法の目的のためであり、本発明をそれに限定するものと解釈されるべきではない。

【0085】

別記されない限り、本明細書中で使用する技術用語および科学用語は全て、本発明が属する技術分野の当業者により一般的に理解される意味を有する。下記の参照文献は、本発明で使用する用語の多くの一般的な定義を当業者に提供する: Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Mole

50

cular Biology (2nd ed. 1994); The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed., 1988); The Glossary of Genetics, 5th Ed., R. Rieger et al. (eds.), Springer Verlag (1991); および Hale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991)。本明細書中で使用する場合、下記用語は、他の箇所で明記されない限り、それらに帰する意味を有する。

【0086】

本明細書中で使用する場合、「約」という用語は、明記される値の10%プラスまたはマイナスの範囲を指す。例えば、「約200」という語句は、文脈により明らかに矛盾しない限りは、200の10%プラスまたはマイナス、すなわち180~220を含む。

【0087】

本明細書中で使用する場合、「増幅」という用語は、通常は、核酸配列を増幅させるための広範囲の技法を含むが、限定されない鋳型依存性様式で、直線的に、または指数関数的に、少なくとも1つの標的核酸またはその配列相補体の少なくとも部分的な配列が生ずる任意の手段を指す。非限定的な例示的増幅方法として、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、逆転写酵素PCR、リアルタイムPCR、ネステッドPCR、マルチプレックスPCR、定量的PCR(Q-PCR)、核酸配列ベースの増幅(NASBA)、転写媒介性増幅(TMA)、リガーゼ連鎖反応(LCR)、ローリングサイクル増幅(RCA)、鎖置換増幅(SDA)、リガーゼ検出反応(LDR)、マルチプレックスライゲーション依存性プローブ増幅(MLPA)、ライゲーション、続くQ-複製酵素増幅、プライマー伸長、鎖置換増幅(SDA)、超分岐鎖置換増幅、多重置換増幅(MDA)、核酸鎖ベースの増幅(NASBA)、2工程多重化増幅、デジタル増幅等が挙げられる。かかる技法の説明は、数ある情報源の中でも、Ausubel et al.; PCR Primer: A Laboratory Manual, D. M. D. Diffenbach, Ed., Cold Spring Harbor Press (1995); The Electronic Protocol Book, Chang Bioscience (2002); The Nucleic Acid Protocols Handbook, R. Rapley, ed., Humana Press, Totowa, N. J. (2002); および Innis et al., PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press (1990)に見出すことができる。

【0088】

本明細書中で使用する場合、「増幅条件」または「伸長条件」という用語は、本明細書中で交換可能に使用され、ポリメラーゼが、ポリヌクレオチドの3'末端に、1つまたは複数のヌクレオチドを付加し得る条件を指す。かかる増幅または伸長条件は当該技術分野で周知であり、例えば Sambrook and Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Edition, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press and Ausubel, et al., Current Protocols in Molecular Biology, 1987-2007, John Wiley & Sons に記載されている。

【0089】

本明細書中で使用する場合、「アレイ」または「マイクロアレイ」は概して、基板上のポリヌクレオチドプローブなどのハイブリダイズすることが可能なアレイ要素の秩序配置を指す。「アレイ」は通常、例えばオリゴヌクレオチド配列またはRNAなどのヌクレオチド配列産物またはオリゴヌクレオチド配列によりコードされるタンパク質の、空間的にまたは論理的に系統的な収集である。アレイ要素は、オリゴヌクレオチド、DNA断片、ポリヌクレオチド等であり得る。アレイ要素は、遺伝子発現が定性的にまたは定量的に決定され得るように、標的配列に特異的に結合することが可能である、固体支持体上に固定

10

20

30

40

50

化された任意の要素を含み得る。高密度オリゴヌクレオチドアレイは、試料中の多数の RNA に関する遺伝子発現プロフィールを決定するのに特に有用である。アレイ要素は、合成的にまたは生合成的に調製することができる。アレイ要素は、同一であり得るか、または互いに異なり得る。アレイは、様々な形式、例えば可溶性分子のライブラリー、樹脂ビーズ、シリカチップ、または他の固体支持体に係留された化合物のライブラリーを取ることができる。アレイは、アレイ上の試料スポットのサイズに応じて、マクロアレイまたはマイクロアレイのいずれかであり得る。マクロアレイは一般的に、約 300 ミクロンまたはそれよりも大きい試料スポットサイズを含有し、ゲルおよびプロットスキャナーにより容易に画像化することができる。マイクロアレイは一般的に、300 ミクロン未満のスポットサイズを含有する。多重ウェルアレイは、試料スポットを含有するための多重チャンバーを含む支持体である。好ましいアレイ要素は、本発明の修飾ポリヌクレオチドオリゴマーである。アレイ上の好ましい分子は、本発明の修飾ポリヌクレオチドオリゴマーである。幾つかの実施形態では、本発明の修飾ポリヌクレオチドオリゴマーは、アレイに結合される。

【0090】

本明細書中で使用する場合、「～に結合する」もしくは「～に結合される」またはそれらの文法的な等価体は、～上に留めること、～と一緒に留めること、～へ添えること、～へ取り付けること、～に取り付けること、～上に取り付けること、～へ接続すること、または～に連結することを意味する。「結合」は、結合する行為または結合されている状態を意味する。結合は、直接的にまたは間接的であり得る。例えば、部品 A は、部品 B へ直接的に結合され得る。あるいは、部品 A は、まず部品 A を部品 C に結合すること、続いて部品 C を部品 B に結合することによって、部品 B へ間接的に結合され得る。1 つよりも多い中間部品が、部品 A を部品 B に結合するのに使用することができる。結合は、永続的、一時的、または長時間であり得る。例えば、また本発明の方法または本発明の方法の工程を実施するのに必要な時間、一時的に固体支持体またはアレイに結合され得る。あるいは、例えば本発明の方法または本発明の方法の工程が実施されない場合にも、本発明の修飾ポリヌクレオチドオリゴマーは、長時間、固体支持体またはアレイに結合され得る。また、本発明の修飾ポリヌクレオチドオリゴマーは、固体支持体またはアレイへ永続的に結合され得る。

【0091】

本明細書中で使用する場合、「塩基」という用語は、相補的なヌクレオチド塩基またはヌクレオチド塩基アナログ、例えばプリン、7-デアザプリンまたはピリミジンと、ワトソン-クリック型水素結合を形成することが可能な窒素含有複素環式部分を意味する。典型的な塩基は、天然に存在する塩基であるアデニン、シトシン、グアニン、チミンおよびウラシルである。塩基としてはまた、デアザアデニン、7-デアザ-8-アザアデニン、7-デアザグアニン、7-デアザ-8-アザグアニン、イノシン、ネブラリン、ニトロピロール、ニトロインドール、2-アミノ-プリン、2,6-ジアミノプリン、ヒポキサンチン、5-メチルシトシン、イソシトシン、プソイドイソシトシン、5-プロモウラシル、5-プロピルウラシル、6-アミノプリン、2-クロロ-6-アミノプリン、キサンチン、ヒポキサンチン等などの天然に存在する塩基のアナログが挙げられる。

【0092】

本明細書中で使用する場合、「ビーズ」という用語は、球形、円筒形、楕円形、長円形、またはドーム形状の物体などの幾つかの丸みを帯びた態様または表面を有する小さな物体を意味する。

【0093】

本明細書中で使用する場合、「生物学的流体」は、宿主由来の流体を指し、全血、血清、血漿、尿、涙、粘液、腹水、口腔液、精液、糞便、痰、脳脊髄液および胎児液 (fetal fluid) を含む。生物学的流体は、細胞を含んでもよく、または細胞を欠如し得る。

【0094】

本明細書中で使用する場合、「生物学的試料」は、核酸またはポリペプチドを含有する

10

20

30

40

50

生物学的組織または生物学的流体を意味する。かかる試料は通常、ヒト由来であるが、非ヒト霊長類またはげっ歯類、例えばマウスおよびラットから単離される組織を含む。また、生物学的試料として、外科的生検、微細針吸引生検および部検試料などの組織の切片、組織学的目的で採取した凍結切片、血液、血漿、血清、痰、糞便、涙、粘液、毛髪、皮膚等が挙げられ得る。また、生物学的試料として、患者組織に由来する外植片または初代および/もしくは形質転換細胞培養物が挙げられる。「生物学的試料」はまた、動物由来の細胞もしくは細胞の集団または大量の組織もしくは流体を指す。ほとんどの場合、生物学的試料は、動物から取り出されているが、「生物学的試料」という用語はまた、*in vivo*で、即ち動物から取り出すことなく分析される細胞または組織を指すこともできる。通常、「生物学的試料」は、動物由来の細胞を含有するが、この用語はまた、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの発現レベルを測定するのに使用することができる血液、唾液または尿の非細胞分画などの非細胞生物学的材料を指すこともできる。組織生検または血液試料を含むが、それらに限定されない多数のタイプの生物学的試料が、本発明で使用され得る。本明細書中で使用する場合、「組織生検」は、動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくは霊長類、最も好ましくはヒトから取り出されたある量の組織を指す。「生物学的試料」は、試薬による処理、洗浄、核酸試料（さらなる操作に適した核酸を含む試料）を得るための処理、またはCD4⁺Tリンパ球、グリア細胞、マクロファージ、腫瘍細胞、末梢血単核球（PBMC）等などのある特定の細胞集団の濃縮によるなど、それらの調達後に何らかの形で操作された試料を包含する。「生物学的試料」という用語は、臨床試料を包含し、また培養物、細胞上清、組織試料、臓器、骨髓等中の細胞も含む。本明細書中で使用する場合、「生物学的試料を供給すること」は、本発明に記載する方法における使用のために生物学的試料を得ることを意味する。ほとんどの場合、これは、対象由来の細胞の試料を取り出すことにより成されるが、同様に予め単離した細胞（例えば、別の人により、別の時間に、および/または別の目的で単離される）を使用することにより、または本発明の方法を*in vivo*で実施することにより達成され得る。治療または転帰歴を有する保存記録組織は特に有用である。生物学的試料はまた、患者、別の動物またはがん細胞株から移植された異種移植片腫瘍を保有する動物に由来し得る。

【0095】

本明細書中で使用する場合、「相補的な」という用語は、オリゴマー配列の、互いにハイブリダイズして、互いに塩基対を形成する能力を指す。塩基対は通常、逆平行ポリヌクレオチド（オリゴマー）鎖中のヌクレオチド単位間の水素結合により形成される。相補的なポリヌクレオチドオリゴマー鎖は、ワトソン-クリック様式（例えば、A対T、A対U、C対G）で、または二重鎖の形成を可能にする任意の他の様式で、塩基対形成することができる。標的配列に対するプローブ配列の「相補性」のパーセントは、標的の配列、または標的の配列の相補体に対するプローブ配列の「同一性」パーセントである。プローブと標的配列との間の「相補性」度を決定する際、「相補性」度は、プローブの配列と標的配列の配列またはそれと最良に整列する標的配列の配列の相補体との間の同一性パーセントとして表される。例示的なプローブは、本明細書に記載されるようなオリゴヌクレオチドオリゴマーである。

【0096】

本明細書中で使用する場合、「異なる」という用語は、同じではないこと、同じ同一性ではないことを意味する。

【0097】

本明細書中で使用する場合、「二重鎖」という用語は、相補的な（または部分的に相補的な）単鎖ポリヌクレオチドオリゴマー、例えばDNA、RNA、またはPNAをアニーリングすること（ハイブリダイズすること）により形成される二重鎖ハイブリダイゼーション複合体を指す。

【0098】

「ハイブリダイズする」または「ハイブリダイゼーション」という用語は、優先的に特定のヌクレオチド配列への、幾つかの実施形態ではストリンジェントな条件下での核酸分

10

20

30

40

50

子の結合、二重鎖形成またはアニーリングである「特異的なハイブリダイゼーション」に関して本明細書中で使用される。「ストリンジェントな条件」という用語は、プローブが、優先的にその標的配列とハイブリダイズして、また他の配列とより少ない程度にハイブリダイズするか、または他の配列と全くハイブリダイズしない条件を指す。「ストリンジェントなハイブリダイゼーション」および「ストリンジェントなハイブリダイゼーション洗浄条件」は、核酸ハイブリダイゼーションの状況で、配列依存的であり、種々の環境パラメーター下で異なる。核酸のハイブリダイゼーションの広範な手引きは、例えば、Tijssen (1993) Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology - Hybridization with Nucleic Acid Probes part I, Ch. 2, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays," Elsevier, NYに見出される。概して、フィルターハイブリダイゼーションのための非常にストリンジェントなハイブリダイゼーションおよび洗浄条件は、規定のイオン強度およびpHにおける特定の配列の「熱融解温度」または「 T_m 」とも称される熱融点よりも約5 低いように選択される。緩衝液組成、温度およびプローブ強度に関するハイブリダイゼーションストリンジェンシーの依存性は、当業者に周知である（例えば、Sambrook and Russell (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd ed.) Vol.1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, NYを参照）。ハイブリダイゼーション強度としても公知である、標的配列とのオリゴマー（またはポリヌクレオチドオリゴマー）のハイブリダイゼーション度は、当該技術分野で周知である方法により決定される。好ましい方法は、所定のハイブリッド二重鎖の T_m を決定することである。これは、溶液中で形成される二重鎖を、徐々に上昇する温度へ付すことにより、および例えば、変性に付随する塩基対のアンスタッキングに伴って増大する紫外線の吸収により、二重鎖の変性をモニタリングすることにより達成され得る。 T_m は一般的に、DNA鎖の半分が単鎖(ssDNA)状態で存在する温度として定義される。 T_m は、ハイブリダイズされる相補的な鎖配列の長さ、それらの特異的なヌクレオチド配列、塩基組成、および相補鎖の濃度などの各種パラメーターに依存する。

【0099】

本明細書で使用する場合、「標識」または「検出可能な標識」という用語は、生体分子、ヌクレオシド、ヌクレオチドまたはポリヌクレオチドオリゴマーに結合されると、かかる生体分子、ヌクレオシド、ヌクレオチドまたはポリヌクレオチドオリゴマーを適切な検出手段により検出可能にさせる部分を指す。例示的な標識として、フルオロフォア、発色団、放射性同位体、スピン標識、酵素標識、化学発光標識、電気化学発光化合物、磁気標識、ミクロスフェア、コロイド金属、免疫学的標識、リガンド、酵素等が挙げられる。幾つかの実施形態では、標識は、フルオレセイン型またはローダミン型色素などの蛍光色素である。幾つかの実施形態では、標識は、放射標識、ホースラディッシュペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼなどの酵素、ストレプトアビジン、ビオチン、抗体により認識されるエピトープ、およびそれらの等価体から成る群から選択される。

【0100】

「不適正ヌクレオチド」は、例えば増幅反応において、興味が持たれる配列および標的配列がハイブリダイズされる場合に、相当する配列中の相当するヌクレオチドに対して相補的ではない興味が持たれる配列中のヌクレオチドに関して本明細書中で使用される。Cの相補体はGであり、Aの相補体はTである。換言すると、興味が持たれる配列中の「C」は、標的配列における「T」、「C」または「A」とは不適正であるとみなされる。

【0101】

本明細書中で使用する場合、「修飾ヌクレオチド塩基」または「修飾塩基」という用語は、天然に存在する塩基の構造を有さない、したがって天然に存在しない塩基を指す。例えば、本明細書中に開示する好ましい修飾塩基は、修飾チミン塩基またはチミジン様修飾塩基である。

【 0 1 0 2 】

本明細書中で使用する場合、「修飾ポリヌクレオチドオリゴマー」、「修飾オリゴヌクレオチドオリゴマー」および「修飾オリゴマー」という用語は、少なくとも1つの修飾塩基を含む本発明のポリヌクレオチドオリゴマーを指す。例えば、本明細書中に開示する好ましい修飾塩基は、修飾チミン塩基またはチミジン様修飾塩基である。本明細書中で使用される場合に交換可能であるとみなされる「修飾ポリヌクレオチドオリゴマー」、「修飾オリゴヌクレオチドオリゴマー」および「修飾オリゴマー」という用語はまた、例えばそれらの二重鎖および単鎖デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、アルファ-アノマー形態等を含むポリヌクレオチドオリゴマー、オリゴヌクレオチドオリゴマーまたはオリゴマーの天然に存在しない修飾形態の直鎖ポリマーを指す。本発明の好ましい修飾ポリヌクレオチドオリゴマーは、修飾チミン塩基を含むものである。修飾ポリヌクレオチドオリゴマーは全体的に、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチドもしくはそれらのアナログで構成され得るか、または2つもしくはそれ以上の種々のモノマータイプのブロックもしくは混合物を含有し得る。これらの用語はまた、「オリゴヌクレオチドアナログ」または「核酸アナログ」とも称される、DNAおよびRNAの公知の塩基アナログのいずれかを含む配列を包含する。様々な参照文献が、例えばホスホルアミデート (Beaucage et al., Tetrahedron 49 (10): 1925 (1993) およびその中の参照文献; Letsinger, J. Org. Chem. 35:3800 (1970); Sprinzl et al., Eur. J. Biochem. 81:579 (1977); Letsinger et al., Nucl. Acids Res. 14:3487 (1986); Sawai et al., Chem. Lett. 805 (1984), Letsinger et al., J. Am. Chem. Soc. 110:4470 (1988); および Pauwels et al., Chemica Scripta 26: 141 (1986))、ホスホロチオエート (Mag et al., Nucleic Acids Res. 19: 1437 (1991) および米国特許第 5,644,048 号)、ホスホロジチオエート (Briu et al., J. Am. Chem. Soc. 111:2321 (1989))、オメチルホホロアミダイト結合 (Eckstein, Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, Oxford University Pressを参照)、およびペプチド核酸骨格および結合 (Egholm, J. Am. Chem. Soc. 114: 1895 (1992); Meier et al., Chem. Int. Ed. Engl. 31: 1008 (1992); Nielsen, Nature 365:566 (1993); Carlsson et al., Nature 380:207 (1996) を参照、それらは全て、参照により援用される) を含むかかる核酸アナログを開示している。他のアナログ核酸として、正の骨格 (Denpcy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:6097 (1995))、; 非イオン性骨格 (米国特許第 5,386,023 号、同第 5,637,684 号、同第 5,602,240 号、同第 5,216,141 号および同第 4,469,863 号; Kiedrowski et al., Angew. Chem. Intl. Ed. English 30:423 (1991); Letsinger et al., J. Am. Chem. Soc. 110:4470 (1988); Letsinger et al., Nucleoside & Nucleotide 13: 1597 (1994); Chapters 2 and 3, ASC Symposium Series 580, "Carbohydrate Modifications in Antisense Research", Ed. Y.S. Sanghui and P. Dan Cook; Mesmaeker et al., Bioorganic & Medicinal Chem. Lett. 4:395 (1994); Jeffs et al., J. Biomolecular NMR 34: 17 (1994); Tetrahedron Lett. 37:743 (1996)、および米国特許第 5,235,033 号および同第 5,034,506 号、ならびに Chapters 6 and 7, ASC Symposium Series 580, "Carbohydrate Modifications in Antisense Research", Ed. Y.S. Sanghui and P. Dan Cook に記載されるものを含む非リボース骨格を有するものが挙げられる。1つまたは複数の炭素環式糖を含有する核酸もまた、核酸の1つの定義内に含まれる (Jenkins et al., Chem. Soc. Rev. pp 169-176 (1995) を参照)。幾つかの核酸アナログは、Rawls, C & E News June 2, 1997 page 35 に記載される。これらの参照文献は全て、参照により明確に本明細書に援用される。

【 0 1 0 3 】

本明細書中で使用する場合、「天然に存在する」という用語は、核酸分子の状況で、自然に存在するヌクレオチド配列を有し、かつ自然に存在する塩基、ヌクレオシドおよびヌクレオチドなどの構成要素のみを含むRNAまたはDNA分子(単鎖または二重鎖)を指

10

20

30

40

50

す。

【0104】

本明細書中で使用する場合、「ヌクレオシド」という用語は、ベータ-グリコシド結合を介してリボースまたはデオキシリボース糖に結合されている本明細書中で言及されるタイプの窒素性塩基で構成される分子を指す。ヌクレオシドの例として、アデノシン、シチジン、グアノシン、チミジン、ウリジンおよびイノシンが挙げられる。通常、塩基が、AまたはGである場合、リボース糖は、塩基のN⁹位に結合される。塩基が、C、TまたはUである場合、リボース糖は、塩基のN¹位に結合される(Kornberg and Baker, DNA Replication, 2nd Ed., Freeman, San Francisco, Calif., (1992))。

【0105】

本明細書中で使用する場合、「ヌクレオチド」という用語は、独立したモノマーとしての、またはポリヌクレオチド内のサブユニットとしての、ヌクレオシドのリン酸エステルを意味する。ヌクレオチドモノマーとしては、例えば、ヌクレオチド5'-リン酸、5'-二リン酸、5'-三リン酸、および3'-リン酸が挙げられる。ヌクレオチド三リン酸は、特にリボース糖の構造特性を指摘するのに場合によっては「NTP」、「dNTP」(2'-デオキシペントース)または「ddNTP」(2', 3'-ジデオキシペントース)と示される。「ヌクレオチド5'-三リン酸」は、5'位に三リン酸エステル基を有するヌクレオチドを指す。三リン酸エステル基は、1つまたは複数のリン酸酸素原子に対して硫黄置換、例えば、アルファ-チオヌクレオチド5'-三リン酸を含んでもよい。ヌクレオチドリン酸、二リン酸または三リン酸は、核酸または核酸中間体の修飾を触媒する核酸プロセッシング酵素に対する基質として機能を果たし得る。

【0106】

本明細書中で使用する場合、「ヌクレオチドプロセッシング酵素」という用語は、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチドもしくは核酸を修飾またはプロセッシングする酵素を指し、プライマー伸長酵素、DNAポリメラーゼ、RNAポリメラーゼ、制限酵素、ニックング酵素、修復酵素およびライゲーション酵素が挙げられるが、それらに限定されない。

【0107】

本明細書中で使用する場合、「複数」という用語は、1つよりも多いことを意味する。例えば、複数の修飾ポリヌクレオチドオリゴマーは、少なくとも2つの修飾ポリヌクレオチドオリゴマー、少なくとも3つの修飾ポリヌクレオチドオリゴマー、または少なくとも4つの修飾ポリヌクレオチドオリゴマー等を意味する。本発明の実施形態が、1つよりも多い修飾ポリヌクレオチドオリゴマーを含む場合、それらはまた、第1の修飾ポリヌクレオチドオリゴマー、第2の修飾ポリヌクレオチドオリゴマー、第3のポリヌクレオチドオリゴマー等と称され得る。

【0108】

本明細書中で使用する場合、本明細書中で使用される場合には交換可能であるとみなされる「ポリヌクレオチドオリゴマー」、「オリゴヌクレオチドオリゴマー」および「オリゴマー」という用語は、本発明の「修飾ポリヌクレオチドオリゴマー」、「修飾オリゴヌクレオチドオリゴマー」および「修飾オリゴマー」とは異なる天然に存在するヌクレオチドモノマーの直鎖ポリマーを指す。通常、「ポリヌクレオチドオリゴマー」のヌクレオチドモノマーは、ホスホジエステル結合により連結される。しかしながら、非ホスホジエステル結合を含有する修飾ポリヌクレオチドオリゴマーもまた意図される。「修飾ポリヌクレオチドオリゴマー」はまた、ペプチド核酸(PNA、例えば、核酸塩基が非アミド骨格要素を介して結合されるアミド連結N-(2-アミノエチル)-グリシンサブユニットの骨格を含むポリマー。Nielsen et al., Science 254: 1497-1500 (1991)を参照)などの、1つまたは複数の天然に存在しないモノマーおよび/またはサブユニット間結合を含有するポリマーを包含する。ポリヌクレオチドオリゴマーおよび修飾ポリヌクレオチドオリゴマーは通常、サイズが数個のモノマー単位、例えば8~40個から数千個のモノマー単位までの範囲である。ポリヌクレオチドオリゴマーまたは修飾ポリヌクレオチドオリゴマーが、「ATGCCCTG」などの文字の配列で表されるときは常に、ヌクレオチドは、別記

しない限り、左から右へ 5' 3' の順序で存在し、「A」はアデノシンを示し、「C」はシチジンを示し、「G」はグアノシンを示し、「T」はチミジンを示し、「U」はウリジンを示すことが理解されよう。従来の 5' および / または 3' 末端を有さない骨格（例えば、PNA）に関しては、通常二重鎖 DNA の逆平行相補鎖の場合と同様に、塩基配列は、配列が、3' 5' 配向性を有する相補的な配列と、逆平行様式でハイブリダイズするような 5' 3' の順序であるように提供される。

【0109】

単独で使用する場合、「ポリヌクレオチド」および「オリゴヌクレオチド」は、従来の DNA または RNA モノマー単位で、即ち、A、C、G、T または U 塩基で置換されているデオキシリボースまたはリボース糖環で、主としてまたは全体的に構成され、従来のリン酸骨格部分により連結されるポリヌクレオチドオリゴマーを指す。

10

【0110】

本明細書中で使用する場合、「プライマー」という用語は、標的核酸鎖に対して相補的であるポリヌクレオチド鎖を合成するための出発点として有効であるオリゴマーまたは修飾オリゴマーを指す。例えば、PCR における使用のためのプライマーは、フォワードおよびリバースプライマーを含み、ここで、フォワードプライマーは、標的核酸鎖の領域に対して相補的である配列を含有し、相補鎖の合成を誘導する。リバースプライマーは、反対の鎖に対して相補的な配列を含有し、標的核酸鎖の反対の鎖に沿って合成を誘導する。

【0111】

本明細書中で使用する場合、「プローブ」という用語は、標的核酸配列の領域に対して相補的な配列を含有する標識オリゴヌクレオチドまたは標識修飾オリゴヌクレオチドを指し、プローブを、標的配列と二重鎖を形成させて、標的配列の領域の存在を示す検出可能なシグナルを発生させることが可能である。検出可能なシグナルは、直接的に、または間接的に、ハイブリダイゼーション中または後に発生する。5' - ヌクレアーゼ PCR におけるプライマー伸長中などの幾つかの用途において、プローブは、伸長可能な 3' 水酸基を欠如させて、プローブのポリメラーゼ媒介性伸長を防ぐ。

20

【0112】

「プライマー」または「プローブ」は通常、標的核酸分子の少なくとも 6 個の連続ヌクレオチドの配列に対して相補的である領域を含むオリゴマーまたは修飾オリゴマーであるが、プライマーおよびプローブは、6 個未満の連続ヌクレオチドを含むことができる。幾つかの実施形態では、標的核酸分子の 6 個またはそれ以上、7 個またはそれ以上、8 個またはそれ以上、9 個またはそれ以上、10 個またはそれ以上、11 個またはそれ以上、12 個またはそれ以上、13 個またはそれ以上、14 個またはそれ以上、15 個またはそれ以上、16 個またはそれ以上、17 個またはそれ以上、18 個またはそれ以上、19 個またはそれ以上、20 個またはそれ以上、21 個またはそれ以上、22 個またはそれ以上、23 個またはそれ以上、24 個またはそれ以上、25 個またはそれ以上、約 50 個またはそれ以上、または最大約 100 個の連続ヌクレオチドに対して同一であるか、または相補的である配列を含む修飾オリゴマーが提供される。プライマーまたはプローブが、標的核酸分子の少なくとも x 個の連続ヌクレオチドに対して「相補的」である領域を含む場合、「プライマー」または「プローブ」は、標的核酸分子の少なくとも x 個の連続ヌクレオチドに対して少なくとも 95% 相補的である。幾つかの実施形態では、プライマーまたはプローブは、標的核酸分子に対して、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または 100% 相補的である。好ましい「プローブ」または「プライマー」は、修飾塩基、好ましくは修飾チミン塩基を含む「プローブ」または「プライマー」である。

30

40

【0113】

本明細書中で使用する場合、「保護基 (protecting group)」、「保護性基 (protective group)」、または「保護形態」という用語は、その官能性を保存して、および / または続く化学反応において化学選択性を得ると意図される官能基（例えば、リン酸基またはホスホン酸基）の易動性化学修飾を指す。保護基は、脱保護処理（例えば、濃アンモニア

50

水による処理)により最終生成物から除去される。幾つかの実施形態では、リン酸およびホスホン酸保護基 X^1 および X^2 は、独立して、自動ホスホルアミダイトオリゴヌクレオチド合成におけるホスフィチル化試薬の保護に使用され、および/または自動ホスホルアミダイトオリゴヌクレオチド合成の条件に適合する保護基から選択される。ある特定の実施形態では X^1 基および X^2 基は、独立して、任意選択により置換されているベンジル、任意選択により置換されているアルキル(例えば、シアノエチル)、および任意選択により置換されているヘテロアルキルである。例示的なアミノ保護基として、ホルミル、アセチル、トリフルオロアセチル、ベンジル、ベンジロキシカルボニル(CBZ)、t-ブトキシカルボニル(Boc)、トリメチルシリル(TMS)、2-トリメチルシリル-エタンスルホニル(SES)、トリチルおよび置換トリチル基、アリロキシカルボニル、9-フルオレニルメチロキシカルボニル(Fmoc)、およびニトロ-ベラチロキシカルボニル(NVOC)が挙げられるが、それらに限定されない。例示的なヒドロキシ保護基として、ベンジルおよびトリチルエーテルならびにアルキルエーテル、テトラヒドロピラニルエーテル、トリアルキルシリルエーテルおよびアリルエーテルなどの、ヒドロキシ基がアシル化またはアルキル化されたものが挙げられる。また、Chapter 1: Protecting Groups in Oligonucleotide Synthesis by Etienne Sonveaux in Methods in Molecular Biology, Vol. 26, Protocols for Oligonucleotide Conjugates, S. Agrawal (Ed.), Humana Press Inc., Totowa, NJ (1994); Greene's Protective Groups in Organic Synthesis, P. Wutz and T. Greene (Eds.), Wiley-Interscience, 4th Edition (2006); Thomson, S. A., et al., "Fmoc Mediated Synthesis of Peptide Nucleic Acids", Tetrahedron 51: 6179-6194 (1995); および "Solid-Phase Synthesis of Peptide Nucleic Acids", J. Peptide Science 3: 175-183 (1995)を参照されたい。それらは、かかる開示に関して参照により本明細書に援用される。

【0114】

本明細書中で使用する場合、「塩」という用語は、本明細書中に記載する化合物に見られる特定の置換基に応じて、比較的無毒性の酸または塩基を用いて調製される本明細書中に記載する修飾部分などの化合物の塩を指す。本発明の化合物が、比較的酸性の官能性を含有する場合、塩基付加塩は、ニートで、または適切な不活性溶媒中で、かかる化合物の中性形態を、十分量の所望の塩基と接触させることにより得ることができる。薬学的に許容される塩基付加塩の例として、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、または同様の塩が挙げられる。本発明の化合物が、比較的塩基性の官能性を含有する場合、酸付加塩は、ニートで、または適切な不活性溶媒中で、かかる化合物の中性形態を、十分量の所望の酸と接触させることにより得ることができる。薬学的に許容される酸付加塩の例として、塩酸、臭化水素酸、硝酸、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、ヨウ化水素酸、またはホスホン酸等のような無機酸に由来するもの、ならびに酢酸、プロピオン酸、イソ酪酸、マレイン酸、マロン酸、安息香酸、コハク酸、スベリン酸、フマル酸、マンデル酸、フタル酸、ベンゼンスルホン酸、p-トリルスルホン酸、クエン酸、酒石酸、メタンスルホン酸等のような比較的無毒性の有機酸に由来する塩が挙げられる。また、アルギン酸塩等などのアミノ酸の塩、およびグルクロン酸またはガラクトン酸(galactunoric acids)等のような有機酸の塩も含まれる(例えば、Berge et al., 1977, "Pharmaceutical Salts", Journal of Pharmaceutical Science, 66: 1-19を参照)。本発明のある特定の化合物は、化合物を塩基または酸付加塩のいずれかへと変換するのを可能にする塩基性および酸性官能性の両方を含有する。化合物の中性形態は、従来の様式で、塩を塩基または酸と

接触させること、および親化合物を単離することにより再生され得る。化合物の親形態は、極性溶媒中での溶解度などのある特定の物理特性において、各種塩形態とは異なるが、他の場合では、塩は、本発明の目的で、本発明の親形態と等しい。

【0115】

本明細書中で使用する場合、「固体支持体」という用語は、粒子（例えば、ビーズ）、繊維、モノリス、膜、フィルター、プラスチック片、アレイ等を含む任意の不溶性材料を指す。

【0116】

本明細書中で使用する場合、「実質的な相補的な」という用語は、20%以下（例えば、15%、10%または5%以下）の標的配列と不適正な当該配列中のヌクレオチドを有する配列を指す。幾つかの実施形態では、ハイブリダイゼーション複合体の相補鎖は、1つ、2つ、3つ、4つ、5つまたはそれ以上のヌクレオチドミスマッチを有する。

10

【0117】

本明細書中で使用する場合、「標的核酸」または「標的核酸分子」という用語は、幾つかの実施形態で、ハイブリダイゼーション、増幅用などの、即ち検出の目的での標的である核酸またはポリヌクレオチドオリゴマーを指す。幾つかの実施形態では、標的核酸は、本発明の修飾ポリヌクレオチドオリゴマーに部分的にまたは完全に相補的であるRNAまたはDNAを含む。

【0118】

本明細書中で使用する場合、「標的配列」、「標的核酸配列」または「標的ヌクレオチド配列」という用語は、標的核酸内の配列を指す。標的配列は通常、DNAの4つの塩基（A、T、GおよびC）またはRNAの4つの塩基（A、U、GおよびC）を使用して記載することができる。

20

【0119】

II. 組成物

本開示は、改善されたハイブリダイゼーション特性を示し、ハイブリダイゼーション反応で、およびポリメラーゼ酵素に対する基質として有用である1つまたは複数の修飾塩基（「修飾ポリヌクレオチドオリゴマー」）を含むポリヌクレオチドオリゴマーを提供する。さらに、本開示は、例えば、プローブおよび/またはプライマーとしての、およびヌクレオチドアレイにおけるかかる修飾ポリヌクレオチドオリゴマーの使用に関する。

30

【0120】

かかる修飾ポリヌクレオチドオリゴマーを含む組成物、方法およびキットが、さらに提供される。修飾ポリヌクレオチドオリゴマーは、かかる修飾塩基を欠如するオリゴマーと比較した場合に、修飾ポリヌクレオチドオリゴマーと、相補的なポリヌクレオチド配列との間の塩基対形成において優れた安定性を提供する。

【0121】

幾つかの実施形態では、本明細書中に記載する修飾ポリヌクレオチドオリゴマーは、DNA、RNA、PNAおよびDNA/PNAキメラオリゴマーを含む。本発明の修飾塩基および修飾ポリヌクレオチドオリゴマーは、相補的な配列に関するより大きな二重鎖安定性、および1つまたは複数の塩基ミスマッチがハイブリダイゼーション複合体中に存在する場合のミスマッチ識別の改善を提供する。

40

【0122】

また、本発明の修飾塩基を含有するヌクレオシドおよびヌクレオチドも提供される。かかるヌクレオシドは、相当する一、二および三リン酸エステルの合成用の前駆体として、または酵素基質として使用され得る。本発明のヌクレオチドは、ポリメラーゼ媒介性プライマー伸長により、ポリヌクレオチドオリゴマーに組み込まれ得る。

【0123】

本開示の様々な実施形態が、以下で詳細に論述される。具体的な実施が論述されているが、これは、単に説明の目的で成されていることが理解されるべきである。他の構成要素および設定は、本開示の趣旨および範囲を逸脱することなく使用され得る。

50

【 0 1 2 4 】

A . 修飾チミジン様塩基

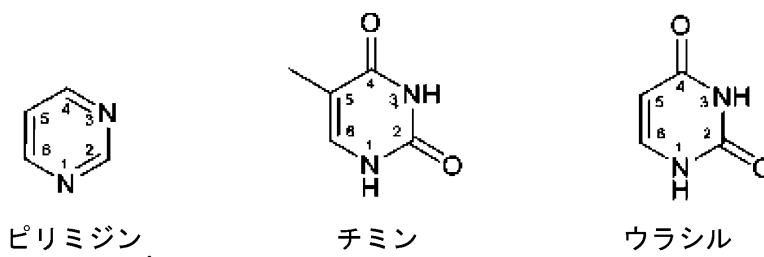
本開示は、改善されたハイブリダイゼーション特性を示し、ハイブリダイゼーション反応で、およびポリメラーゼ酵素に対する基質として有用である 1 つまたは複数の修飾塩基を含むポリヌクレオチドオリゴマーを提供する。本発明の修飾塩基は、天然に存在しない。

【 0 1 2 5 】

本明細書中に開示する修飾塩基は、ピリミジン環構造の 5 位ヘリンカー部分により連結されるリン酸またはホスホン酸基を含む。本発明の修飾塩基は、従来の塩基チミンおよびウラシルのアナログであるとみなされ得る。チミンに関しては、以下でさらに示すように、チミンの 5 - メチル置換基が、リンカーリン酸またはリンカーホスホン酸部分で置換されている。ウラシルに関しては、5 - 水素が、リンカーリン酸またはリンカーホスホン酸部分で置換されている。本開示では、修飾塩基は、場合によっては修飾チミン塩基（例えば、 T^{BP} または T^{PP} ）として表されるが、それらはまた、望ましい場合には、修飾ウラシル塩基：

【 0 1 2 6 】

【 化 1 4 】



【 0 1 2 7 】

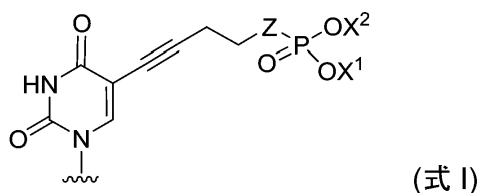
として表すこともできる。

【 0 1 2 8 】

本発明の修飾塩基は、式：

【 0 1 2 9 】

【 化 1 5 】

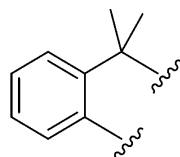


【 0 1 3 0 】

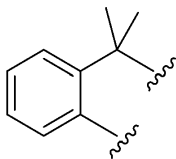
（式中、Z は、 CH_2 または O であり、 X^1 および X^2 は独立して、H もしくは保護基であるか、または一緒に、保護基であり、破線は、オリゴマー骨格へ、またはデオキシリボヌクレオシドのリボース環、デオキシリボヌクレオチドのリボース環もしくは PNA アミノ酸モノマーの骨格などの単量体骨格部分への修飾塩基の結合点を示す）で一般的に表され得る。 X^1 および X^2 がともに、保護基である場合、 X^1 および X^2 は別個になって、同じであってもよく、または異なってもよく、 X^1 および X^2 は一緒になって、ジメチル - o - ペンジレン：

【 0 1 3 1 】

【 化 1 6 】

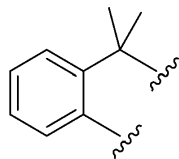


【 0 1 3 2 】

などの二座保護基であり得る。本発明の特定の実施形態では、式 I による本発明の修飾塩基は、修飾塩基（式中、Z は、O であり、X¹ および X² は一緒になって、 - ジメチル - o - ベンジレン：

【0133】

【化17】



【0134】

である）である。

【0135】

リン酸およびホスホン酸保護基ならびにそれらの導入方法のさらなる説明は、Greene's Protective Groups in Organic Synthesis, P. Wutz and T. Greene (Eds.), Wiley-Interscience, 4th Edition, 2006に見出すことができ、それは、かかる開示に関して参照により本明細書に援用される。

【0136】

通常、ホスホルアミダイト法によるポリヌクレオチドオリゴマーの、またはペプチド合成によるPNAオリゴマーの合成の場合のように、オリゴマー合成中の損傷または修飾から、リン酸またはホスホン酸部分を保護することが望ましい場合には、X¹ および X² はともに、保護基である。本発明の修飾塩基を含有するポリヌクレオチドオリゴマーでは、増大した塩基対形成親和性および水溶解度を提供するために、保護基は通常、オリゴマーが相補的なポリヌクレオチドオリゴマーとハイブリダイズするのに使用される前に除去される。好ましくは、X¹、X² または両方が、保護基（単数）であるか、または保護基（複数）であるときは常に、保護基（複数可）は、アンモニア処理により除去可能である。

【0137】

Z が O である幾つかの実施形態では、修飾塩基は、リン酸部分を含む。

【0138】

Z が CH₂ である幾つかの実施形態では、修飾塩基は、ホスホン酸部分を含む。

【0139】

以下でさらに記載するように、本発明の修飾ポリヌクレオチドオリゴマー、ホスホルアミデート、修飾PNAモノマー、修飾ヌクレオシド、および修飾ヌクレオチドは、上述する修飾塩基（式 I）の1つまたは複数を含む。

【0140】

B. 修飾ポリヌクレオチドオリゴマー

本開示は、改善されたハイブリダイゼーション特性を示し、ハイブリダイゼーション反応で、およびポリメラーゼ酵素に対する基質として有用である1つまたは複数の修飾塩基を含むポリヌクレオチドオリゴマーを提供する。それらは、本明細書中で「修飾ポリヌクレオチドオリゴマー」と称され、また天然に存在しない。本開示はさらに、例えば、プローブおよび/またはプライマーとしての、およびヌクレオチドアレイにおけるかかる修飾ポリヌクレオチドオリゴマーの使用に関する。

【0141】

幾つかの実施形態では、本明細書中に記載する修飾ポリヌクレオチドオリゴマーは、上記式に従って、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つまたはそれ以上の修飾塩基を含む（式 I を参照）。修飾ポリヌクレオチドオリゴマー内の修飾塩基の数は、特定の用途のニーズに最適であることを決定するために、種々のオリゴマー構築物に関して融解研究または他の実験により、本明細書中に記載するように決定することができる、オリゴマー配列中の T 塩基の数および望ましい結合親和性の増大の量に依存する。

【0142】

10

20

30

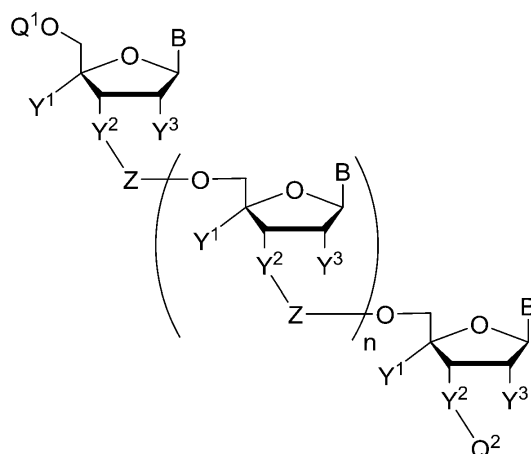
40

50

幾つかの実施形態では、修飾ポリヌクレオチドオリゴマーは、式：

【 0 1 4 3 】

【 化 1 8 】



10

【 0 1 4 4 】

(式中、

Y¹ はそれぞれ独立して、H、C₁ ~ C₈ アルキルであるか、または Y₃ と任意選択により組み合わせて、5 ~ 7 員環を形成し、

Y² はそれぞれ独立して、O、S または NH であり、

Y³ はそれぞれ独立して、H、F または OR^a であり、

R^a はそれぞれ独立して、H、C₁ ~ C₈ アルキルまたはヒドロキシ保護基であり、

Z はそれぞれ独立して、P(O)OH、P(S)OH または P(O)CH₃ であり、

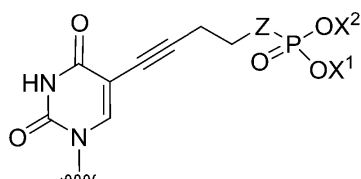
n は、1 ~ 98 であり、

Q¹ および Q² はそれぞれ独立して、H、一リン酸、二リン酸、三リン酸、蛍光レポーター色素、または消光剤、好ましくは蛍光消光剤であり、

B はそれぞれ独立して、アデニン、グアニン、シトシン、チミン、ウリジン、ジアミノプリンであるが、但し、少なくとも 1 つの B が、式：

【 0 1 4 5 】

【 化 1 9 】



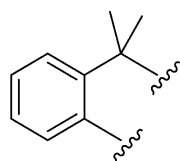
(式 I)

【 0 1 4 6 】

で表される修飾塩基であり、ここで、Z は、CH₂ または O であり、X¹ および X² は、同じであるか、または異なり、別個になって、H もしくは保護基であるか、または X¹ および X² は一緒になって、
 , - ジメチル - o - ベンジレン：

【 0 1 4 7 】

【 化 2 0 】



【 0 1 4 8 】

などの二座保護基である) で表される。

【 0 1 4 9 】

幾つかの実施形態では、X¹ および X² は、H である。幾つかの実施形態では、Z は O である。幾つかの実施形態では、Z は CH₂ である。

20

30

40

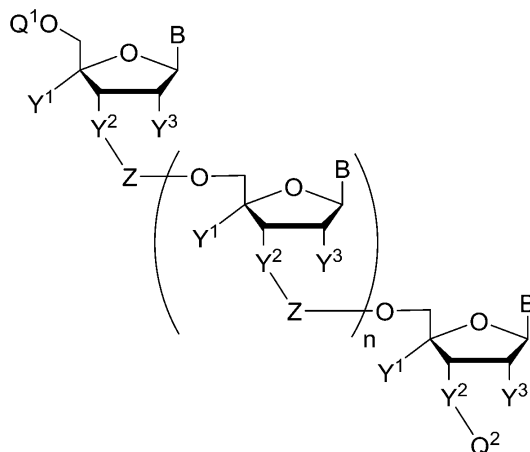
50

【 0 1 5 0 】

特定の実施形態では、修飾ポリヌクレオチドオリゴマーは、式：

【 0 1 5 1 】

【 化 2 1 】



10

【 0 1 5 2 】

(式中、

Y^1 はそれぞれ、Hであり、

Y^2 はそれぞれ、Oであり、

Y^3 はそれぞれ、Hであり、

R^a はそれぞれ、Hであり、

Zはそれぞれ独立して、 $P(O)OH$ であり、

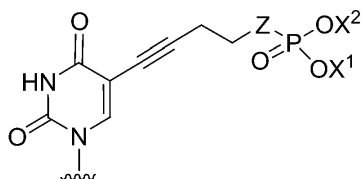
nは、1 ~ 98であり、

Q^1 および Q^2 はそれぞれ独立して、H、一リン酸、二リン酸、三リン酸、蛍光レポーター色素、または消光剤、好ましくは蛍光消光剤であり、

Bはそれぞれ独立して、アデニン、グアニン、シトシン、チミン、ウリジン、ジアミノプリンであるが、但し少なくとも1つのBが、式：

【 0 1 5 3 】

【 化 2 2 】



(式 I)

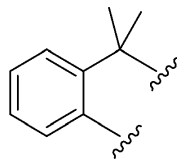
30

【 0 1 5 4 】

で表される修飾塩基であり、ここで、ZはOであり、 X^1 および X^2 は一緒になって、
 , -ジメチル - o - ベンジレン：

【 0 1 5 5 】

【 化 2 3 】



40

【 0 1 5 6 】

である)で表される。

【 0 1 5 7 】

本発明の修飾ポリヌクレオチドオリゴマーは通常、100個よりも少ないヌクレオチドを有する単鎖ポリヌクレオチドを含むか、またはそれで構成されるが、何百もしくは何千またはそれ以上のより長い配列もまた意図される。

50

【 0 1 5 8 】

幾つかの実施形態では、修飾ポリヌクレオチドオリゴマーは、30個よりも少ないヌクレオチドを含み、好ましくは、オリゴヌクレオチドオリゴマーは、約9～約25個のヌクレオチド、即ち9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24または25個のヌクレオチドを含む。

【 0 1 5 9 】

幾つかの実施形態では、修飾ポリヌクレオチドオリゴマーは、2～約100個、2～約50個、2～約25個、2～約15個、5～約50個、5～約25個、5～約15個、約10～約50個、約10～約25個、約10～約20個、約10～約15個、約12～約50個、約12～約25個、約12～約20個のヌクレオチドを含むか、またはそれらで構成される。オリゴマーは、それらの長さによって称され得る。例えば、15個のヌクレオチドオリゴマーは、15量体と称され得る。

【 0 1 6 0 】

当業者が理解するように、修飾チミン塩基が組み込まれ得る修飾ポリヌクレオチドオリゴマー、プローブ、プライマーまたはPNA内の位置は限定されない。修飾チミン塩基が様々な位置で組み込まれるポリヌクレオチドオリゴマー、プローブ、プライマーまたはPNAが本明細書中で開示される。幾つかの実施形態では、修飾チミン塩基は、5' 3'方向で描かれる場合、ポリヌクレオチドの1位に存在する。幾つかの実施形態では、修飾チミン塩基は、5' 3'方向で描かれる場合、ポリヌクレオチドの2位に存在する（例えば、Pf1-T-1、Pf1-T-4、Pf1-T-5、Pf1-T-7、Pf1-T-8；表3を参照）。幾つかの実施形態では、修飾チミン塩基は、5' 3'方向で描かれる場合、ポリヌクレオチドの3位に存在する。幾つかの実施形態では、修飾チミン塩基は、5' 3'方向で描かれる場合、ポリヌクレオチドの4位に存在する（例えば、P1-1R、PNA-T1、PNA-T3；表3を参照）。幾つかの実施形態では、修飾チミン塩基は、5' 3'方向で描かれる場合、ポリヌクレオチドの5位に存在する。幾つかの実施形態では、修飾チミン塩基は、5' 3'方向で描かれる場合、ポリヌクレオチドの6位に存在する（例えば、Pf1-T-2、Pf1-T-4、Pf1-T-5、Pf1-T-8；表3を参照）。幾つかの実施形態では、修飾チミン塩基は、5' 3'方向で描かれる場合、ポリヌクレオチドの7位に存在する（例えば、PNA-T2、PNA-T3；表3を参照）。幾つかの実施形態では、修飾シトシン塩基は、5' 3'方向で描かれる場合、ポリヌクレオチドの8位に存在する（例えば、T1、T1-2、O4；表3を参照）。幾つかの実施形態では、修飾チミン塩基は、5' 3'方向で描かれる場合、ポリヌクレオチドの9位に存在する（例えば、O4、P1R；表3を参照）。幾つかの実施形態では、修飾チミン塩基は、5' 3'方向で描かれる場合、ポリヌクレオチドの10位に存在する。幾つかの実施形態では、修飾チミン塩基は、5' 3'方向で描かれる場合、ポリヌクレオチドの11位に存在する（例えば、O4、Pf1-T-3、Pf1-T-5；表3を参照）。幾つかの実施形態では、修飾チミン塩基は、5' 3'方向で描かれる場合、ポリヌクレオチドの12位に存在する（例えば、T2、T1-2、O4、Pf1-T-6、Pf1-T-7、Pf1-T-8；表3を参照）。幾つかの実施形態では、修飾チミン塩基は、5' 3'方向で描かれる場合、ポリヌクレオチドの13位に存在する。幾つかの実施形態では、修飾チミン塩基は、5' 3'方向で描かれる場合、ポリヌクレオチドの14位に存在する。幾つかの実施形態では、修飾チミン塩基は、5' 3'方向で描かれる場合、ポリヌクレオチドの15位に存在する。幾つかの実施形態では、修飾チミン塩基は、5' 3'方向で描かれる場合、ポリヌクレオチドの16位に存在する（例えば、Pf1-T-6、Pf1-7-7、Pf1-T-8、プローブ；表3を参照）。幾つかの実施形態では、修飾チミン塩基は、5' 3'方向で描かれる場合、ポリヌクレオチドの17位に存在する。幾つかの実施形態では、修飾チミン塩基は、5' 3'方向で描かれる場合、ポリヌクレオチドの18位に存在する（例えば、Pf1-T-6、Pf1-T-7、Pf1-T-8、プローブ；表3を参照）。幾つかの実施形態では、修飾チミン塩基は、5' 3'方向で描かれる場合、ポリヌクレオチドの19位に存在する。

10

20

30

40

50

幾つかの実施形態では、修飾チミン塩基は、5' - 3' 方向で描かれる場合、ポリヌクレオチドの20位に存在する（例えば、P1F；表3を参照）。幾つかの実施形態では、修飾チミン塩基は、5' - 3' 方向で描かれる場合、ポリヌクレオチドの21位に存在する（例えば、Pf1 - T - 6、Pf1 - T - 7、Pf1 - T - 8；表3を参照）。

【0161】

当業者が理解するように、ポリヌクレオチドオリゴマー、プローブまたはプライマー内の修飾チミン塩基の数は限定されない。様々な数の修飾チミン塩基を含むポリヌクレオチドオリゴマー、プローブ、プライマーおよびPNAが本明細書中に開示される。幾つかの実施形態では、ポリヌクレオチドオリゴマー、プライマー、プローブまたはPNAは、1個の修飾チミン塩基を含む（例えば、T1、T2、Pf1 - T - 1、Pf1 - T - 2、Pf1 - T - 3、P1F、P1R、P1 - 1R、PNA - T1、PNA - T2；表3を参照）。幾つかの実施形態では、ポリヌクレオチドオリゴマー、プライマー、プローブまたはPNAは、2個の修飾チミン塩基を含む（例えば、T1 - 2、Pf1 - T - 4、プローブ、PNA - T3；表3を参照）。幾つかの実施形態では、ポリヌクレオチドオリゴマー、プライマー、プローブまたはPNAは、3個の修飾チミン塩基を含む（例えば、Pf1 - T - 5、表3を参照）。幾つかの実施形態では、ポリヌクレオチドオリゴマー、プライマー、プローブまたはPNAは、4個の修飾チミン塩基を含む（例えば、O4、Pf1 - T - 6；表3を参照）。幾つかの実施形態では、ポリヌクレオチドオリゴマー、プライマー、プローブまたはPNAは、5個の修飾チミン塩基を含む（例えば、Pf1 - T - 7；表3を参照）。幾つかの実施形態では、ポリヌクレオチドオリゴマー、プライマー、プローブまたはPNAは、6個の修飾チミン塩基を含む（例えば、Pf1 - T - 8；表3を参照）。幾つかの実施形態では、ポリヌクレオチドオリゴマー、プライマー、プローブまたはPNAは、少なくとも1個の修飾チミン塩基を含む。幾つかの実施形態では、ポリヌクレオチドオリゴマー、プライマー、プローブまたはPNAは、少なくとも2個の修飾チミン塩基を含む。幾つかの実施形態では、ポリヌクレオチドオリゴマー、プライマー、プローブまたはPNAは、少なくとも3個の修飾チミン塩基を含む。幾つかの実施形態では、ポリヌクレオチドオリゴマー、プライマー、プローブまたはPNAは、少なくとも4個の修飾チミン塩基を含む。幾つかの実施形態では、ポリヌクレオチドオリゴマー、プライマー、プローブまたはPNAは、少なくとも5個の修飾チミン塩基を含む。幾つかの実施形態では、ポリヌクレオチドオリゴマー、プライマー、プローブまたはPNAは、少なくとも6個の修飾チミン塩基を含む。幾つかの実施形態では、ポリヌクレオチドオリゴマー、プライマー、プローブまたはPNAは、少なくとも7個の修飾チミン塩基を含む。幾つかの実施形態では、ポリヌクレオチドオリゴマー、プライマー、プローブまたはPNAは、少なくとも10個の修飾チミン塩基を含む。幾つかの実施形態では、ポリヌクレオチドオリゴマー、プライマー、プローブまたはPNAは、少なくとも12個の修飾チミン塩基を含む。

【0162】

ポリヌクレオチドオリゴマー、プライマー、プローブまたはPNAが、少なくとも2つの修飾チミン塩基を含む幾つかの実施形態では、修飾チミン塩基は、互いに隣接している（例えば、O4；表3を参照）。ポリヌクレオチドオリゴマー、プライマー、プローブまたはPNAが、少なくとも2つの修飾チミン塩基を含む幾つかの実施形態では、修飾チミン塩基は、1つまたは複数の天然に存在する塩基により、互いに分離される。

【0163】

幾つかの実施形態では、本発明の修飾ポリヌクレオチドオリゴマーは、固体支持体に結合される。幾つかの実施形態では、本発明の修飾ポリヌクレオチドオリゴマーは、ビーズに結合される。幾つかの実施形態では、本発明の修飾ポリヌクレオチドオリゴマーは、アレイに結合される。幾つかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチドオリゴマーは、マイクロアレイに結合される。

【0164】

1. さらなる修飾を含む修飾ポリヌクレオチドオリゴマー

幾つかの実施形態では、本発明の1つまたは複数の修飾塩基を含む修飾ポリヌクレオチドオリゴマーは、修飾塩基もしくは塩基アナログおよび/または検出可能な標識、蛍光および/または化学発光消光剤および/またはマイナーグループ結合剤および/または1つまたは複数の塩基修飾、糖修飾および/または骨格修飾を含むなどの他の型の修飾をさらに含む。

【0165】

下記パラグラフにおいて、修飾ポリヌクレオチドオリゴマーのさらなる修飾が、明瞭化のために個別に記載されるが、個別に記載される修飾はそれぞれ、互いと組み合わせることができることを当業者は理解するであろう。例えば、さらなる修飾ポリヌクレオチドオリゴマーは、糖修飾および骨格修飾を含む。別の非限定的な例では、さらなる修飾ポリヌクレオチドオリゴマーは、糖修飾および標識を含む。さらに別の例では、さらなる修飾ポリヌクレオチドオリゴマーは、骨格修飾および標識を含む。さらに別の非限定的例では、さらなる修飾ポリヌクレオチドオリゴマーは、標識および塩基修飾を含む。

10

【0166】

(a) 糖修飾を含む修飾ポリヌクレオチドオリゴマー

幾つかの実施形態では、本明細書中に記載する修飾ポリヌクレオチドオリゴマーは、1つまたは複数の修飾糖部分を含む。様々な糖部分を使用して、本発明の修飾ポリヌクレオチドを修飾することができる。当業者が理解するように、本発明の修飾ポリヌクレオチドオリゴマー内の糖修飾の位置は様々であってもよく、本明細書中の開示に限定されない。幾つかの実施形態では、本発明の修飾ポリヌクレオチドオリゴマーを修飾するための糖部分として、アラビノース、d-アラビノ-ヘキシトール、2-フルオロアラビノース、キシロース、およびヘキソースが挙げられるが、それに限定されない。幾つかの実施形態では、本発明の修飾ポリヌクレオチドオリゴマーを修飾するための糖部分は、アラビノース、d-アラビノ-ヘキシトール、2-フルオロアラビノース、キシロース、およびヘキソースから成る群から選択される。

20

【0167】

幾つかの実施形態では、本発明の修飾ポリヌクレオチドオリゴマーは、修飾糖部分が結合された1つまたは複数のヌクレオチドを含む。様々な糖部分が、本発明の修飾ポリヌクレオチドオリゴマーに組み込まれるヌクレオチドに結合させるために使用される。幾つかの実施形態では、ヌクレオチドに結合される糖部分は、2'-O-アルキル-リボース糖、2'-アミノ-デオキシリボース糖、2'-フルオロ-デオキシリボース糖、2'-フルオロ-アラビノース糖、または2'-O-メトキシエチル-リボース(2'MOE)糖などの2'置換糖である。幾つかの実施形態では、ヌクレオチドに結合された糖部分は、2'-O-アルキル-リボース糖、2'-アミノ-デオキシリボース糖、2'-フルオロ-デオキシリボース糖、2'-フルオロ-アラビノース糖、および2'-O-メトキシエチル-リボース(2'MOE)糖などの2'置換糖から成る群から選択される。本発明の特定の実施形態では、ヌクレオチドに結合される糖部分は、2'-O-メトキシエチル-リボース(2'MOE)糖である。

30

【0168】

幾つかの実施形態では、修飾ポリヌクレオチドオリゴマーは、ロックド核酸(「LNA」)糖を含む。LNA糖は二環式の糖、即ち、C-4'とC-2'位にある酸素原子との間にメチレン架橋を含有する二環式の糖である。幾つかの実施形態では、修飾ポリヌクレオチドオリゴマーは、LNA糖を有する1つまたは複数のヌクレオチドを含む。幾つかの実施形態では、修飾ポリヌクレオチドオリゴマーは、LNA糖部分を有するヌクレオチドで構成される1つまたは複数の領域を含有する。幾つかの実施形態では、修飾オリゴヌクレオチドオリゴマーは、デオキシリボヌクレオチドが散在しているLNA糖部分を有するヌクレオチドを含有する。例えば、Frieden, M. et al. (2008) Curr. Pharm. Des. 14(11): 1138-1142を参照されたい。

40

【0169】

(b) 骨格修飾を含む修飾ポリヌクレオチドオリゴマー

50

幾つかの実施形態では、修飾ポリヌクレオチドオリゴマーは、骨格修飾を含む。様々な骨格修飾が、修飾オリゴヌクレオチドに導入され得る。当業者が理解するように、本発明の修飾ポリヌクレオチドオリゴマー内の骨格修飾の位置は様々であってもよく、本明細書中の開示に限定されない。

【0170】

幾つかの実施形態では、修飾ポリヌクレオチドオリゴマーは、1つまたは複数のホスホジエステル結合を含む。幾つかの実施形態では、ヌクレオチドアナログは、ペプチド核酸(PNA)の使用などの骨格修飾を含む。幾つかの実施形態では、修飾ポリヌクレオチドオリゴマーは、ホスホトリエステル、ホスホルアミデート、シロキサン、カルボキシメチルエステル、アセトアミデート、カルバメート、チオエーテル、架橋ホスホルアミデート、架橋ホスホン酸メチレン、ホスホロチオエート、メチルホスホン酸、アルキルホスホン酸、リン酸エステル、アルキルホスホノチオエート、ホスホロジチオエート、炭酸、リン酸トリエステル、カルボキシメチルエステル、メチルホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、p-エトキシ結合、およびそれらの組合せなどの修飾結合を含む。幾つかの実施形態では、修飾ポリヌクレオチドオリゴマーは、ホスホトリエステル、ホスホルアミデート、シロキサン、カルボキシメチルエステル、アセトアミデート、カルバメート、チオエーテル、架橋ホスホルアミデート、架橋ホスホン酸メチレン、ホスホロチオエート、メチルホスホン酸、アルキルホスホン酸、リン酸エステル、アルキルホスホノチオエート、ホスホロジチオエート、炭酸、リン酸トリエステル、カルボキシメチルエステル、メチルホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、p-エトキシ結合、およびそれらの組合せから成る群から選択される修飾結合を含む。

【0171】

例えば、PNAは、従来のDNA塩基(A、C、TおよびG)または非従来型塩基を含有するように容易に合成することができるが、PNAモノマー単位は、糖-リン酸骨格ではなく、ポリアミド骨格により連結される。

【0172】

(c) 塩基修飾を含む修飾ポリヌクレオチドオリゴマー

幾つかの実施形態では、修飾ポリヌクレオチドオリゴマーは、1つまたは複数の非標準塩基(即ち、アデニン、グアニン、チミン、シトシンおよびウラシル以外の)を含む。様々な非標準塩基が、修飾オリゴヌクレオチドに導入され得る。当業者が理解するように、本発明の修飾ポリヌクレオチドオリゴマー内の塩基修飾の位置は様々であってもよく、本明細書中の開示に限定されない。かかる非標準塩基は、例えば、ハイブリダイゼーションを安定化もしくは不安定化するための、プローブ分解を促進もしくは阻害するための、または検出可能な部分もしくは消光剤部分の結合点としての多数の目的に役立ち得る。修飾塩基(本発明の修飾塩基以外)および塩基アナログの多数の例は、上述しており、当該技術分野で公知であり、修飾ポリヌクレオチドオリゴマーをさらに修飾するのに使用することができる。

【0173】

幾つかの実施形態では、修飾オリゴマーは、アミン修飾ヌクレオチド、即ち、反応性アミン基を含有するように修飾されたヌクレオチドである修飾塩基を含む。

【0174】

本発明の修飾ポリヌクレオチドオリゴマーは、例えば、無置換ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン塩基(例えば、PPGおよびPPA)、3-置換ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン、修飾プリン、修飾ピリミジン、5-置換ピリミジンまたはユニバーサル塩基などの一般的な塩基または修飾塩基の任意の組合せを含み得る。

【0175】

(d) 標識を含む修飾オリゴヌクレオチドオリゴマー

幾つかの実施形態では、修飾ポリヌクレオチドオリゴマーは、標識、好ましくは検出可能な標識を含む。検出可能な標識を含む修飾ポリヌクレオチドオリゴマーが、本明細書中に記載するように、例えば、プローブとして、またはプライマーとして使用される。様々

な標識が、修飾オリゴヌクレオチドに導入され得る。当業者が理解するように、本発明の修飾ポリヌクレオチドオリゴマー内の標識の位置は様々であってもよく、本明細書中の開示に限定されない。

【0176】

幾つかの実施形態では、修飾ポリヌクレオチドオリゴマーは、その配列の一方の末端にフルオロフォア、および/またはその配列の他の末端に蛍光消光剤を含み、その結果、蛍光消光剤は、蛍光共鳴エネルギー移動(「FRET」)などのエネルギー移動メカニズムを介して、無傷のプロープ(即ち、プロープとして使用される修飾ポリヌクレオチドオリゴマー)中のフルオロフォアの蛍光シグナルを抑制する。ポリメラーゼは、プロープが同様にハイブリダイズされた鋳型に沿ってプライマーを伸長する場合、ポリメラーゼの5'-ヌクレアーゼ活性は、プロープ(即ち、修飾ポリヌクレオチドオリゴマー)を切断し、それによりフルオロフォアが蛍光消光剤から離れて拡散するのを可能にし、その結果、蛍光シグナルがそこで検出される。シグナルは、切断されるプロープの量に比例して、したがって増幅生成物(アンプリコン、標的配列)の量に比例して、各PCRサイクルに伴って増大する。これにより、標的DNA配列の直接的な検出および定量化が可能となる。幾つかの実施形態では、フルオロフォアは、修飾ポリヌクレオチドオリゴマーの配列の末端から少なくとも1つのヌクレオチド分、離れた位置である塩基に結合され、および/または蛍光消光剤は、修飾ポリヌクレオチドオリゴマーの他の末端から少なくとも1つのヌクレオチド分、離れた位置である塩基に結合される。幾つかの実施形態では、フルオロフォアおよび/または蛍光消光剤は、修飾ポリヌクレオチドオリゴマー内の内部に位置する。当業者が理解するように、本発明の修飾ポリヌクレオチドオリゴマー内のフルオロフォアおよび/または蛍光消光剤の位置は様々であってもよく、本明細書中の開示に限定されない。

【0177】

幾つかの実施形態では、フルオロフォアおよび蛍光消光剤は、FRETプロープの末端に存在しない。幾つかの実施形態では、フルオロフォアの発光スペクトルは、蛍光消光剤の吸収スペクトルと大幅に重複する。しかしながら、例えば、消光が衝突メカニズムを包含する場合、かかるスペクトルの重複は、あまり重要でないか、もしくは必要とされず、または重複は、例えば、反応条件またはプロープ構造に起因して増大される。

【0178】

幾つかの実施形態では、FRETプロープ上で(即ち、FRETプロープとして使用される修飾ポリヌクレオチドオリゴマー上で)使用される標識は、Alexa Fluor色素、BODIPY FLなどのBODIPY色素; Cascade Blue; Cascade Yellow; 7-アミノ-4-メチルクマリン、アミノクマリンおよびヒドロキシクマリンなどのクマリンならびにその誘導体; Cy3およびCy5などのシアニン色素; エオシンおよびエリスロシン; フルオレセインイソチシアネートなどのフルオレセインおよびその誘導体; Quantum Dye(商標)などのランタニドイオンの大環状キレート; Marina Blue; Oregon Green; ロードミンレッド、テトラメチルロードミンおよびロードミン6Gなどのロードミン色素; Texas Red; チアゾールオレンジ-エチジウムヘテロ二量体などの蛍光エネルギー移動色素; およびTOTABなどの比色分析用色素またはフルオロフォアを含む。

【0179】

本発明の修飾ポリヌクレオチドオリゴマーを修飾するのに使用することができる有用な色素の具体例として、上記で同定するもの、ならびにAlexa Fluor 350、Alexa Fluor 405、Alexa Fluor 430、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 500、Alexa Fluor 514、Alexa Fluor 532、Alexa Fluor 546、Alexa Fluor 555、Alexa Fluor 568、Alexa Fluor 594、Alexa Fluor 610、Alexa Fluor 633、Alexa Fluor 647、Alexa Fluor 660、Alexa Fluor 680、Alexa Fluor 700、およびAlexa Fluor 750; BODIP

Y 493 / 503、BODIPY 530 / 550、BODIPY 558 / 568、BODIPY 564 / 570、BODIPY 576 / 589、BODIPY 581 / 591、BODIPY 630 / 650、BODIPY 650 / 655、BODIPY FL、BODIPY R6G、BODIPY TMRおよびBODIPY - TRなどのアミン反応性BODIPY色素；Cy3、Cy5、6 - FAM、フルオレセインイソチオシアネート、HEX、6 - JOE、Oregon Green 488、Oregon Green 500、Oregon Green 514、Pacific Blue、REG、Rhodamine Green、Rhodamine Red、Renographin、ROX、SYPRO、TAMRA、2' , 4' , 5' , 7' - テトラブロモスルホン - フルオレセイン、TETおよびTexas Redが挙げられるが、それらに限定されない。

10

【0180】

本発明の修飾ポリヌクレオチドオリゴマーを修飾するのに使用することができるフルオロフォア / 蛍光消光剤対（即ち、供与体 / 受容体対）の例として、フルオレセイン / テトラメチルローダミン；IAEDANS / フルオレセイン；EDANS / ダブシル；フルオレセイン / フルオレセイン；BODIPY FL / BODIPY FL；フルオレセイン / QSY 7またはフルオレセイン / QSY 9が挙げられるが、それらに限定されない。供与体および受容体が同じである場合、FRETは、幾つかの実施形態では、蛍光脱分極により検出され得る。フルオロフォア / 消光剤対（即ち、供与体 / 受容体）のある特定の具体例として、Alexa Fluor 350 / Alexa Fluor 488；Alexa Fluor 488 / Alexa Fluor 546；Alexa Fluor 488 / Alexa Fluor 555；Alexa Fluor 488 / Alexa Fluor 568；Alexa Fluor 488 / Alexa Fluor 594；Alexa Fluor 488 / Alexa Fluor 647；Alexa Fluor 546 / Alexa Fluor 568；Alexa Fluor 546 / Alexa Fluor 594；Alexa Fluor 546 / Alexa Fluor 647；Alexa Fluor 555 / Alexa Fluor 594；Alexa Fluor 555 / Alexa Fluor 647；Alexa Fluor 568 / Alexa Fluor 647；Alexa Fluor 594 / Alexa Fluor 647；Alexa Fluor 350 / QSY 35；Alexa Fluor 350 / ダブシル；Alexa Fluor 488 / QSY 35；Alexa Fluor 488 / ダブシル；Alexa Fluor 488 / QSY 7またはQSY 9；Alexa Fluor 555 / QSY 7またはQSY 9；Alexa Fluor 568 / QSY 7またはQSY 9；Alexa Fluor 568 / QSY 21；Alexa Fluor 594 / QSY 21；およびAlexa Fluor 647 / QSY 21が挙げられるが、それらに限定されない。幾つかの実施形態では、同じ消光剤は、多重フルオロフォア、例えば、Iowa Black (R) 消光剤 (Integrated DNA Technologies、Coralville、A) またはBlack Hole Quencher (商標) (またはBHQ (商標)) (Biosearch Technologies、Petaluma、CA) などの広域スペクトル消光剤に使用され得る。したがって、本発明の幾つかの実施形態では、修飾ポリヌクレオチドオリゴマーは、フルオレセイン / テトラメチルローダミン；IAEDANS / フルオレセイン；EDANS / ダブシル；フルオレセイン / フルオレセイン；BODIPY FL / BODIPY FL；フルオレセイン / QSY 7；フルオレセイン / QSY 9；Alexa Fluor 350 / Alexa Fluor 488；Alexa Fluor 488 / Alexa Fluor 546；Alexa Fluor 488 / Alexa Fluor 555；Alexa Fluor 488 / Alexa Fluor 568；Alexa Fluor 488 / Alexa Fluor 594；Alexa Fluor 488 / Alexa Fluor 647；Alexa Fluor 546 / Alexa Fluor 568；Alexa Fluor 546 / Alexa Fluor 594；Alexa Fluor 546 / Alexa Fluor 647；Alexa Fluor 555 / Alexa Fluor 594；Alexa Fluor 555 / Alexa Fluor 647；Alexa Fluor 568 / Alexa Fluor 647；Alexa Fluor 594 / Alexa Fluor 647；Alexa Fluor 350 / QSY 35；Alexa Fluor 350 / ダブシル；Alexa Fluor 488 / QSY 35；Alexa Fluor 488 / ダブシル；Alexa Fluor 488 / QSY 7またはQSY 9；Alexa Fluor 555 / QSY 7またはQSY 9；Alexa Fluor 568 / QSY 7またはQSY 9；Alexa Fluor 568 / QSY 21；Alexa Fluor 594 / QSY 21；およびAlexa Fluor 647 / QSY 21が挙げられるが、それらに限定されない。

20

30

40

50

594; Alexa Fluor 546 / Alexa Fluor 647; Alexa Fluor 555 / Alexa Fluor 594; Alexa Fluor 555 / Alexa Fluor 647; Alexa Fluor 568 / Alexa Fluor 647; Alexa Fluor 594 / Alexa Fluor 647; Alexa Fluor 350 / QSY 35; Alexa Fluor 350 / ダブシル; Alexa Fluor 488 / QSY 35; Alexa Fluor 488 / ダブシル; Alexa Fluor 488 / QSY 7またはQSY 9; Alexa Fluor 555 / QSY 7またはQSY 9; Alexa Fluor 568 / QSY 7またはQSY 9; Alexa Fluor 568 / QSY 21; Alexa Fluor 594 / QSY 21; および; Alexa Fluor 647 / QSY 21 から成る群から選択されるフルオロフォア / 蛍光消光剤対を含む。

10

【0181】

幾つかの実施形態では、例えば、2つまたはそれ以上の部分が同時に検出される多重反応では、同じ反応で同時に検出される場合に、フルオロフォアが区別され得るように、修飾ポリヌクレオチドオリゴマーはそれぞれ、検出可能に異なるフルオロフォアを含み得る。当業者は、上記で開示するフルオロフォア / 蛍光消光剤由来の多重反応における使用のための検出可能に異なるフルオロフォアおよび当該技術分野で公知の他のもののセットを選択することができる。当業者が理解するように、フルオロフォアおよび / または蛍光消光剤の選択、ならびに本発明の修飾ポリヌクレオチドオリゴマー内のフルオロフォアおよび / または蛍光消光剤の位置は様々であってもよく、本明細書中の開示に限定されない。

20

【0182】

(e) 他の修飾を含む修飾オリゴヌクレオチドオリゴマー

幾つかの実施形態では、本明細書中に記載する修飾ポリヌクレオチドオリゴマーは、1つまたは複数のペンダント基をさらに含む。様々なペンダント基が、本発明の修飾ポリヌクレオチドオリゴマーを修飾するのに使用され得る。当業者が理解するように、ペンダント基の選択、および本発明の修飾ポリヌクレオチドオリゴマー内のペンダント基の位置は様々であってもよく、本明細書中の開示に限定されない。ペンダント基は、1つもしくは複数の内部に位置する塩基へ、3' - 末端に、5' - 末端に、両方の末端に、または内部にかつ修飾ポリヌクレオチドオリゴマーの一方もしくは両方の末端で結合される親油性基、マイナーグループ結合剤、インターカレーター、キレート剤または架橋剤などの部分であり得る。したがって、幾つかの実施形態では、修飾ポリヌクレオチドオリゴマーに結合されるペンダント基は、親油性基、マイナーグループ結合剤、インターカレーター、キレート剤および架橋剤から成る群から選択される部分である。かかるペンダント基を結合するのに適した方法は、当該技術分野で一般的に知られている。

30

【0183】

幾つかの実施形態では、本発明の修飾ポリヌクレオチドオリゴマーは、低分子量「尾部部分」を含む。様々な「尾部部分」が、本発明の修飾ポリヌクレオチドオリゴマーをさらに修飾するのに使用され得る。当業者が理解するように、「尾部部分」の選択、および本発明の修飾ポリヌクレオチドオリゴマー内の「尾部部分」の位置は様々であってもよく、本明細書中の開示に限定されない。幾つかの実施形態では、尾部部分は、3' もしくは5' 末端のいずれかで、または修飾ポリヌクレオチドオリゴマーの両方の末端で結合される。尾部分子は、リン酸、リン酸エステル、アルキル基、アミノアルキル基または親油性油であり得る。したがって、幾つかの実施形態では、修飾ポリヌクレオチドオリゴマーに結合される尾部部分は、リン酸、リン酸エステル、アルキル基、アミノアルキル基および親油性基から成る群から選択される。幾つかの実施形態では、尾部部分は、インターカレーター、親油性基、マイナーグループ結合剤 (MGB)、レポーター基、キレート剤または架橋官能性を、修飾ポリヌクレオチドオリゴマーに連結させる。例えば、MGBは、修飾オリゴヌクレオチドオリゴマーの一方または両方の末端で結合され得る。さらに、または代

40

50

わりに、1つまたは複数のMGBは、修飾オリゴヌクレオチドオリゴマー内の内部位置に結合され得る。当業者が理解するように、かかる選択は、修飾オリゴヌクレオチドオリゴマーの長さに依存し得る。

【0184】

幾つかの実施形態では、修飾ポリヌクレオチドオリゴマーは、不自然な比率の原子同位体を含む。幾つかの実施形態では、修飾ポリヌクレオチドオリゴマーは、放射標識される。適切な放射標識として、トリチウム (^3H)、ヨウ素-125 (^{125}I)、リン (^{32}P) または炭素-14 (^{14}C) が挙げられるが、それらに限定されない。

【0185】

幾つかの実施形態では、修飾ポリヌクレオチドオリゴマーは、塩形態で供給される。修飾ポリヌクレオチドオリゴマーは、各種塩形態で供給することができる。当業者が理解するように、本発明の修飾ポリヌクレオチドオリゴマーの塩形態は、様々であってもよく、本明細書中の開示に限定されない。本発明の修飾ポリヌクレオチドオリゴマーの塩形態として、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、または同様の塩などの塩基付加塩が挙げられるが、それらに限定されない。

【0186】

幾つかの実施形態では、本明細書中に記載する修飾ポリヌクレオチドオリゴマーは、塩基性および/または酸性官能性を含む。任意のイオン性基の電荷状態は、環境のpHに依存する。例えば、修飾ポリヌクレオチドオリゴマー内のリン酸基の非架橋酸素原子は、塩基性pH条件下よりも、酸性pH条件下でよりプロトン化される傾向にある。したがって、構造は、特定のプロトン化状態（例えば、完全にプロトン化されたリン酸二酸部分）で示され得るが、修飾ポリヌクレオチドオリゴマー内のイオン性基の真のプロトン化状態は、溶媒のpH、含水量および塩濃度などの要因に依存する。

【0187】

幾つかの実施形態では、修飾ポリヌクレオチドオリゴマーは、不斉炭素原子または二重結合を保有し、例えばラセミ体、ジアステレオマー、幾何異性体および個々の異性体として供給され、それらは全て、本発明の範囲内に包含されると意図される。例えば、従来のDNAおよびRNAは、ヌクレオチドサブユニットのD-立体異性体を含むが、DNAおよびRNAのL-立体異性体もまた、本開示により包含される。

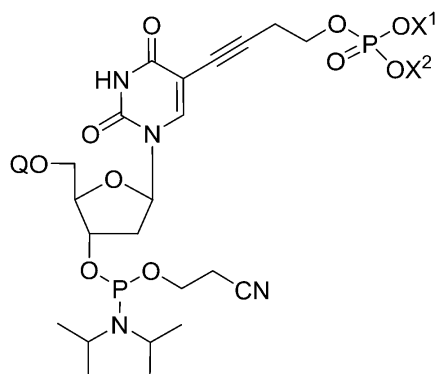
【0188】

C. 修飾ヌクレオシドホスホルアミダイト

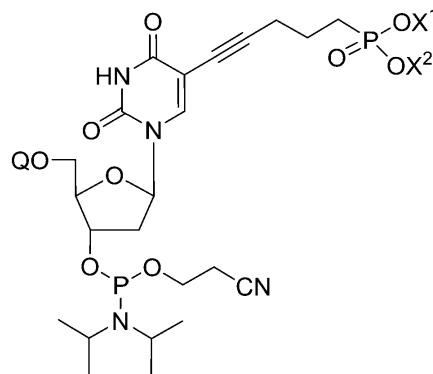
本発明はまた、式：

【0189】

【化24】



T^{BP} ホスホルアミダイト



T^P ホスホルアミダイト

【0190】

(式中、

X¹ および X² は別個になって、同じであるか、または異なるリン酸もしくはホスホン酸保護基であるか、あるいは X¹ および X² は一緒になって、二座リン酸またはホスホン

酸保護基であり、

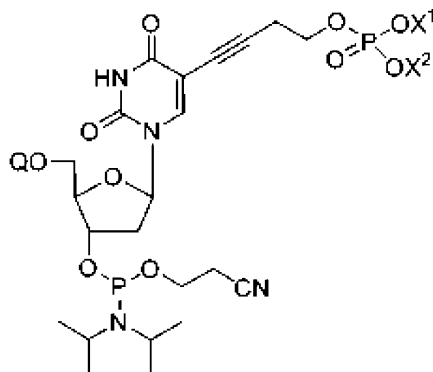
Q は、ヒドロキシル保護基である) で表される修飾ヌクレオシドホスホルアミダイトを提供する。

【 0 1 9 1 】

本発明の特定の実施形態では、修飾ヌクレオシドホスホルアミダイトは、式：

【 0 1 9 2 】

【 化 2 5 】



10

T^{BP} ホスホルアミダイト

【 0 1 9 3 】

(式中、X¹ および X² は別個になって、同じであるか、または異なるリン酸もしくはホスホン酸保護基であるか、あるいは X¹ および X² は一緒になって、二座リン酸またはホスホン酸保護基であり、Q は、ヒドロキシル保護基である) で表される。

【 0 1 9 4 】

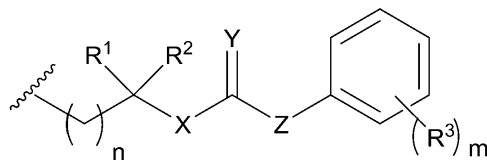
上記式において、好ましくは、Q は、酸性条件下で除去可能である。幾つかの実施形態では、Q は、トリチル、メトキシトリチル (MMT)、またはジメトキシトリチル (DMT) である。幾つかの実施形態では、X¹ および X² は一緒になって、o - ベンジレン、- メチル - o - ベンジレン、または、- ジメチル - o - ベンジレンなどの二座保護基である。

【 0 1 9 5 】

修飾ヌクレオシドホスホルアミダイトの幾つかの実施形態では、保護基 X¹ および X² が別個になって存在する場合、それぞれ、式：

【 0 1 9 6 】

【 化 2 6 】



【 0 1 9 7 】

(式中、R¹ および R² は独立して、水素、C₁ ~ C₆ アルキル、C₂ ~ C₆ アルケニル、C₂ ~ C₆ アルキニル、C₃ ~ C₆ シクロアルキル、またはフェニルであり、n および m は独立して、0、1、2、3 または 4 であり、X は、O または NR⁴ であり、Y は、O または S であり、Z は、結合、O または NR⁴ であり、R³ はそれぞれ、同じであるか、または異なり、独立して、C₁ ~ C₆ アルキル、C₂ ~ C₆ アルケニル、C₂ ~ C₆ アルキニル、C₃ ~ C₆ シクロアルキル、シアノ、ニトロ、ハロゲン、C₁ ~ C₆ アルキルオキシ、C₃ ~ C₆ シクロアルキルオキシ、NR^{5a} R^{5b} またはフェニルであり、R⁴、R^{5a} および R^{5b} はそれぞれ独立して、C₃ ~ C₆ シクロアルキルまたはフェニルである) で表される構造を有し得る (例えば、国際公開第 2 0 0 0 / 0 5 5 1 7 9 A 1 号を参照) 。

【 0 1 9 8 】

20

30

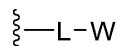
40

50

修飾ヌクレオシドホスホルアミダイトの幾つかの実施形態では、 R^1 および R^2 は独立して、構造：

【0199】

【化27】

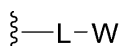


【0200】

(式中、Lは、結合、 $C_1 \sim C_8$ アルキレンまたは $C_2 \sim C_8$ ヘテロアルキレン、 $C_2 \sim C_8$ アルケニレンであり、Wは、H、シアノ、 $C(O)NR^aR^b$ 、 NO_2 、 $N^+R^aR^bR^c$ 、 $C_6H_4NO_2$ 、 C_6H_4Cl 、 $C_6H_3(NO_2)_2$ 、 $C_6H_2(NO_2)_3$ 、 SO_2R^c 、または $S(O)_2OR^c$ であり、 R^a および R^b は独立して、H、 CF_3 、 $C_1 \sim C_8$ アルキルまたは $C_6 \sim C_{10}$ アリールであり、 R^c は、 $C_1 \sim C_8$ アルキルまたは $C_6 \sim C_{10}$ アリールである)を有する。かかる基は、それらが、従来のアンモニウムまたは水酸化アンモニウム処理で除去することが可能であるため好適である。本発明の特定の実施形態では、上記式による修飾ヌクレオシドホスホルアミダイトは、修飾ヌクレオシドホスホルアミダイトであり、ここで、 X^1 および X^2 は独立して、構造：

【0201】

【化28】



【0202】

(式中、Lは結合であり、WはHである)を有する。

【0203】

幾つかの実施形態では、 X^1 および X^2 はそれぞれ独立して、ピバロイルオキシベンジル基である。

【0204】

本発明の修飾ヌクレオシドホスホルアミダイトは、天然に存在しない。当業者が理解するように、修飾ヌクレオシドホスホルアミダイトは、本発明の修飾ポリヌクレオチドオリゴマーを合成するのに有用である。

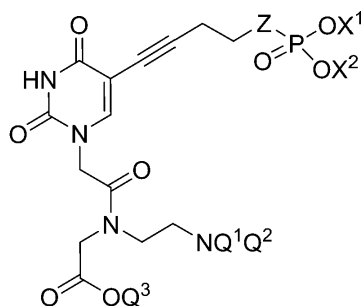
【0205】

D．修飾PNAモノマー

本発明はまた、式：

【0206】

【化29】



【0207】

(式中、

Zは、 CH_2 またはOであり、

X^1 および X^2 は別個になって、同じであるか、もしくは異なる保護基であるか、または X^1 および X^2 は一緒になって、二座保護基であり、

Q^1 および Q^2 は独立して、Hもしくは窒素保護基であるか、または Q^1 および Q^2 は一緒に、窒素保護基であり、

Q^3 は、Hまたはカルボキシル保護基である)で表される保護された修飾PNAモノマーを提供する。

【0208】

10

20

30

40

50

修飾 PNA モノマーの幾つかの実施形態では、Z は O である。幾つかの実施形態では、Z は CH_2 である。本発明の特定の実施形態では、上記式に従う保護された修飾 PNA モノマーは、保護された修飾 PNA モノマー（式中、Z は O である）である。

【0209】

幾つかの実施形態では、 Q^1 は H であり、 Q^2 は Fmoc である。幾つかの実施形態では、 Q^3 は H である。幾つかの実施形態では、 X^1 および X^2 は一緒になって、o-ベンジレン、-メチル-o-ベンジレン、または、-ジメチル-o-ベンジレンなどの二座保護基である。好ましくは、 X^1 、 X^2 またはその両方は、常に保護基であり（単数または複数）、保護基（複数可）は、アンモニア処理により除去可能である。

【0210】

本発明の修飾 PNA モノマーは、天然に存在しない。

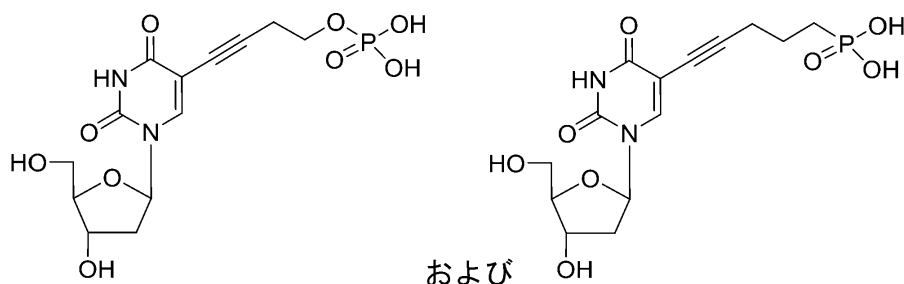
【0211】

E. 修飾ヌクレオシドおよび修飾ヌクレオチド

本発明はまた、式：

【0212】

【化30】



【0213】

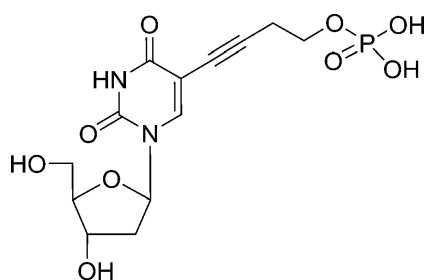
で表される修飾ヌクレオシドを提供する。

【0214】

本発明の特定の実施形態では、修飾ヌクレオシドは、式：

【0215】

【化31】



【0216】

で表される。

【0217】

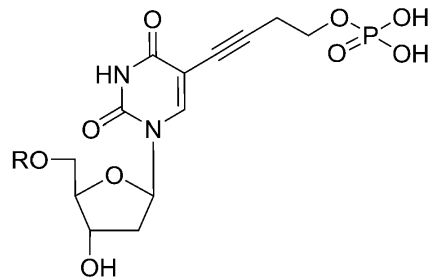
本発明の修飾ヌクレオシドは、天然に存在しない。それらは、例えば、化学的であろうと、または酵素的であろうと任意の反応での基質として有用であり、それに関して、相当する従来の DNA および RNA ヌクレオシドチミンが基質である。例えば、ヌクレオシドは、適切なキナーゼ酵素により、一、二および三リン酸へと変換され得る。かかる修飾チミンヌクレオシドを作製するための一般的な手順を、例えば実施例 13 に提供する。

【0218】

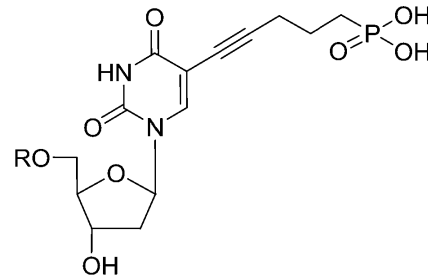
本発明はまた、式：

【0219】

【化 3 2】



5'-二/三リン酸



5'-二/三リン酸

10

【 0 2 2 0】

(式中、

 $R = (HO)_2(O =)P -$ 、または $R = (HO)_2(O =)P - O - [(HO)(O =)P] -$ 、または $R = (HO)_2(O =)P - O - [(HO)(O =)P] - O - [(HO)(O =)P] -$ で表される修飾ヌクレオチドを提供する。

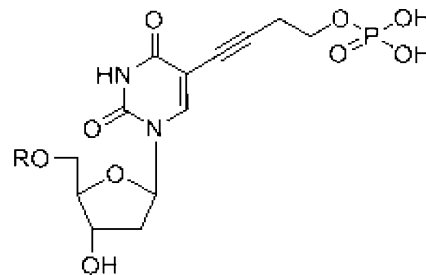
【 0 2 2 1】

本発明の特定の実施形態では、修飾ヌクレオチドは、式：

【 0 2 2 2】

【化 3 3】

20



【 0 2 2 3】

(式中、

 $R = (HO)_2(O =)P -$ 、または $R = (HO)_2(O =)P - O - [(HO)(O =)P] -$ 、または $R = (HO)_2(O =)P - O - [(HO)(O =)P] - O - [(HO)(O =)P] -$ で表される。

【 0 2 2 4】

かかる修飾チミンヌクレオチド 5' - 三リン酸を作製するための一般的な手順を、例えば実施例 1 4 に提供する。また、本発明の修飾ヌクレオチドは、従来のヌクレオチドと同じ様式でヌクレオチジルトランスフェラーゼを使用してポリヌクレオチドオリゴマーに導入することができ、こうして、修飾ポリヌクレオチドオリゴマーを生ずる。

【 0 2 2 5】

本発明の修飾ヌクレオチドは、天然に存在しない。かかるヌクレオチドは、本発明の修飾塩基を使用することが望ましい任意の酵素または合成反応において、相当する従来のチミジンリン酸エステルに代わって使用され得る。例えば、本発明の修飾塩基を含むヌクレオチド 5' - 三リン酸は、DNA ポリメラーゼにより修飾ポリヌクレオチドオリゴマーに組み込むことができる。これは、例えば、結果として得られるプライマー伸長産物（複数可）のハイブリダイゼーション親和性を高めるために行われ得る。非限定的な例では、これは、下記の通りに行われる：(a) 鋳型依存性 DNA ポリメラーゼ、本発明のヌクレオチド 5' - 三リン酸、および任意選択により、dATP、dCTP、dGTP および / または従来の TTP、および Mg^{2+} および / または Mn^{2+} イオンなど他の緩衝液構成要素などの 1 つまたは複数のデオキシヌクレオチド三リン酸を含む混合物を供給すること、および (b) ポリメラーゼが、修飾塩基（即ち、修飾ヌクレオチド）および存在する場合

30

40

50

には他のNTPを、伸長されたプライマーに組み込むことができるように、プライマーを、鋳型DNAまたはRNA鎖における相補的な配列ヘアニーリングさせて、それにより本発明の修飾塩基を含むポリヌクレオチドオリゴマーを形成すること。また、プライマー伸長に関する適切な反応条件に関しては、Kutyavin, I., Biochemistry 47:13666-13673 (2008), "Use of Base-Modified Duplex-Stabilizing Deoxynucleoside 5'-Triphosphates to Enhance the Hybridization Properties of Primers and Probes in Detection Polymerase Chain Reaction"を参照されたい。

10

【0226】

F. 二重鎖

幾つかの実施形態では、本発明は、修飾ポリヌクレオチドオリゴマーおよびポリヌクレオチド配列を含む二重鎖を提供する。幾つかの実施形態では、本発明は、複数の修飾ポリヌクレオチドオリゴマーおよびポリヌクレオチド配列を含む二重鎖を提供する。幾つかの実施形態では、本発明は、少なくとも1つの修飾ポリヌクレオチドオリゴマーおよびポリヌクレオチド配列を含む二重鎖を提供する。かかる二重鎖内の修飾ポリヌクレオチドオリゴマーが、天然に存在しないオリゴマーである一方で、幾つかの実施形態では、二重鎖内のポリヌクレオチド配列は、天然に存在するポリヌクレオチド配列である。幾つかの実施形態では、修飾ポリヌクレオチドおよびポリヌクレオチド配列の両方が、天然に存在しない。本発明の二重鎖の幾つかの実施形態では、少なくとも1つの修飾ポリヌクレオチドオリゴマーは、ポリヌクレオチド配列の少なくとも4つの連続塩基と相補的でありそれらとハイブリダイズされている4つまたはそれ以上の連続塩基を含む。

20

【0227】

当業者が理解するように、本明細書中に記載する任意の修飾ポリヌクレオチドオリゴマーおよび本明細書中に記載するような任意のさらなる修飾を含む任意の修飾ポリヌクレオチドを使用して、ポリヌクレオチド配列を有する二重鎖を形成することができる。また、ポリヌクレオチド配列は、非限定的である。修飾ポリヌクレオチドに対して相補性を有する少なくとも4つまたはそれ以上の連続ヌクレオチドを有する任意のポリヌクレオチドを使用することができる。

30

【0228】

幾つかの実施形態では、ポリヌクレオチド配列は、原核生物ヌクレオチド配列を含む。幾つかの実施形態では、ポリヌクレオチド配列は、真核生物ヌクレオチド配列を含む。幾つかの実施形態では、ポリヌクレオチド配列は、ウイルスヌクレオチド配列を含む。

【0229】

二重鎖の幾つかの実施形態では、ポリヌクレオチド配列は、修飾ポリヌクレオチドオリゴマーよりも長く、即ち、ポリヌクレオチド配列は、修飾ポリヌクレオチドオリゴマーよりも多いヌクレオチドを含む。

【0230】

幾つかの実施形態では、二重鎖は、固体支持体に結合される。幾つかの実施形態では、本発明の二重鎖は、ビーズに結合される。幾つかの実施形態では、本発明の二重鎖は、アレイに結合される。幾つかの実施形態では、本発明の二重鎖は、マイクロアレイに結合される。

40

【0231】

III. 方法

A. 修飾チミン塩基を含む修飾ポリヌクレオチド、修飾ヌクレオシド、修飾ヌクレオチド、および他の部分の合成

本発明の修飾チミン塩基を含有するオリゴマー、ヌクレオシド、ヌクレオチド、および他の部分は、任意の適切な方法により合成することができ、通常、化学的に、および/または酵素的に合成される。好ましい方法を、本明細書中に記載する。例えば、実施例1～

50

実施例 12 を参照されたい。

【0232】

例えば、修飾ポリヌクレオチドオリゴマーは、ホスホルアミダイト法および適切に保護された 2' -デオキシヌクレオシド (dA、dC、dG および dT)、リボヌクレオシド (A、C、G および T) または化学的に修飾されたヌクレオシド、例えば LNA、BNA 等に由来するホスホルアミダイト構成要素を使用して、固相合成により実験室で合成することができる。ポリヌクレオチド鎖構築は通常、「合成サイクル」と称される日常的な手順に倣うことにより、3' から 5' 末端への方で進行する。1 回の合成サイクルの完了は、成長中の鎖へ 1 つのヌクレオチド残基の付加をもたらす。HPLC および当該技術分野で公知の他の方法を使用して、所望の配列を有する修飾ポリヌクレオチドオリゴマーを単離する。

10

【0233】

ポリヌクレオチドおよびそれらのアナログを合成する方法は、多数の出版物に記載されており、周知であり、本発明の修飾部分を合成するのに実施例 1 ~ 実施例 12 に記載する方法に加えて使用することができる。例えば、Gait, Oligonucleotide Synthesis, IRL Press (1990)、および S. Agrawal, Protocols for Oligonucleotides and Analogs, Methods in Molecular Biology Vol. 20, Humana Press, Totowa, N. J. (1993) を参照されたい。修飾 PNA オリゴマー合成に関して、従来のペプチド合成法を使用してもよく、当該技術分野で公知である (例えば、Nielsen et al., Science 254: 1497-1500 (1991) を参照)。DNA ポリメラーゼにより媒介されるプライマー伸長または適切なキナーゼを使用した 5' 位でのヌクレオシドのリン酸化などの酵素法もまた使用することができる。

20

【0234】

本発明のポリヌクレオチドオリゴマーの様々な特性は、本明細書中で実施例 5 ~ 実施例 12 でさらに説明する。

【0235】

本明細書中の実施例 9 ~ 実施例 12 は、本発明に従う幾つかの例示的な PNA オリゴマーの合成および特性決定について記載する。

【0236】

30

B. 修飾チミン塩基を含む修飾ポリヌクレオチド、修飾ヌクレオシド、修飾ヌクレオチド、および他の部分の例示的な有用性

当業者がこの開示に目を通すと理解するように、本明細書中に記載する修飾塩基、ならびにそれらを含む修飾ポリヌクレオチドオリゴマー、修飾ヌクレオシド、修飾ヌクレオチド、および他の修飾部分は、核酸加工処理および操作の分野で様々な用途を見出している。例えば、それらは、例えばポリヌクレオチド二重鎖および三重鎖などのハイブリダイゼーション複合体において二重鎖安定性を高めるのに有用である。幾つかの実施形態では、修飾ポリヌクレオチドオリゴマーは、例えば DNA シーケンシング、ライブラリー構築、アレイ、サザンブロット、ASO 分析、蛍光インサイツハイブリダイゼーション (FISH)、人工遺伝子合成において、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 等用のプライマーとして、ライゲーションアッセイ (例えば、公知のヌクレオチド多型の検出用の) においてなど、分子プローブとして使用される。上記で列挙される方法は、当該技術分野で公知である。当業者にとっては、例えば、それらの方法のいずれかで使用される天然に存在する塩基、天然に存在するヌクレオシド、天然に存在するヌクレオチドまたは天然に存在するポリヌクレオチドオリゴマーを、本明細書に記載するような天然に存在しない修飾チミン塩基で、本明細書中に記載するような天然に存在しない修飾ヌクレオシドで、天然に存在しない修飾ヌクレオチドで、または本明細書中に記載するような修飾ポリヌクレオチドオリゴマーで置換することは難しくない。

40

【0237】

幾つかの実施形態では、本発明の 1 つまたは複数の修飾チミン塩基を含む修飾ポリヌク

50

レオチドオリゴマーは、プライマー伸長反応の効率を改善する。本発明の修飾チミン塩基により提供される二重鎖安定性の付加により、当業者は、かかる修飾チミン塩基を欠如する天然に存在するポリヌクレオチドオリゴマーを用いた場合よりも高い温度で、プライマー伸長を実施することが可能となる。それにより、プライマー伸長時間および/または変性温度とアニリング温度との間の移行勾配時間を低減させることができる。より高い反応温度はまた、標的分子における潜在的に問題のある二次構造を最低限に抑えるのに好適であり、プライマー二量体の形成を低減させることができる。さらに、理論により拘束されないが、より高い反応温度の使用はまた、ノイズも低減させると考えられる。

【0238】

下記は、本明細書中に記載するような天然に存在しない修飾チミン塩基、天然に存在しない修飾ヌクレオシド、天然に存在しない修飾ヌクレオチドおよび天然に存在しない修飾ポリヌクレオチドオリゴマーの幾つかの非限定的な使用について記載する。

【0239】

1. アレイ用途における修飾ポリヌクレオチドオリゴマーの使用

幾つかの実施形態では、修飾ポリヌクレオチドオリゴマーは、アレイを含む用途で使用する。当業者は、アレイを含む多数の用途を認識している。当業者が理解するように、本発明の修飾ポリヌクレオチドオリゴマーが結合されたアレイを含む用途の選択は様々であってもよく、本明細書中の開示に限定されない。幾つかの実施形態では、アレイ用途は、例えば、ハイブリダイゼーションまたは遺伝子発現のアレイベースの解析に関するものである。例示的な非限定的なアレイとして、チップまたはプラットフォームアレイ、ビーズアレイ、液相アレイ、「ジップコード」アレイ等が挙げられる。標的ヌクレオチド配列との塩基対形成における修飾ポリヌクレオチドオリゴマーの優れた安定性は、特にハイブリダイゼーションまたはアレイベースの解析で好適である単一ヌクレオチドレベルで、関連配列の識別の改善をもたらす。ニトロセルロース、ガラス、シリコンウエハー、光ファイバー等などのアレイの構築に適した材料は、当業者に公知である。

【0240】

したがって、本発明の幾つかの実施形態では、修飾ポリヌクレオチドオリゴマーが結合されたアレイが提供される。本発明の幾つかの実施形態では、複数の修飾ポリヌクレオチドオリゴマーが結合されたアレイが提供される。本発明の幾つかの実施形態では、複数の異なる修飾ポリヌクレオチドオリゴマーが結合されたアレイが提供される。複数の異なる修飾ポリヌクレオチドオリゴマーは、修飾ポリヌクレオチドオリゴマーの異なるさらなる修飾、または異なる配列を有する修飾ポリヌクレオチドオリゴマーを含んでもよい。

【0241】

2. プローブとしての修飾ポリヌクレオチドオリゴマーの使用

幾つかの実施形態では、修飾ポリヌクレオチドオリゴマーは、プローブである。幾つかの実施形態では、プローブは、検出可能な標識または部分を含む。検出可能な標識は、本明細書中で使用する場合、蛍光色素（フルオロフォア）などの直接的に検出可能な部分、および結合対の成員などの間接的に検出可能な部分の両方を含む。検出可能な部分が、結合対の成員である場合、幾つかの実施形態では、プローブを、結合対の第2の成員に結合されている検出可能な標識とともにインキュベートすることにより、プローブは検出可能であり得る。幾つかの実施形態では、プローブが、例えばマイクロアレイまたはビーズ上では捕捉プローブである場合などは、プローブは標識されない。幾つかの実施形態では、プローブは、例えばポリメラーゼにより伸長不可能である。幾つかの実施形態では、プローブは伸長可能である。

【0242】

幾つかの実施形態では、修飾ポリヌクレオチドオリゴマーは、FRETプローブである。FRETプローブは、5'末端で蛍光色素により、また3'末端で蛍光消光剤により、即ち基が極めて接近している（即ち、同じプローブに結合される）場合に色素からの蛍光放出を吸収（即ち、抑制）する化学基により標識されてもよい。

【0243】

幾つかの実施形態では、修飾ポリヌクレオチドオリゴマーは、5'ヌクレアーゼPCRプローブ、Molecular Beacon（商標）またはScorpion（商標）プローブである。

【0244】

3. ハイブリダイゼーション法における修飾ポリヌクレオチドオリゴマーの使用

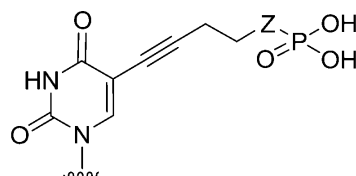
相補的な修飾ポリヌクレオチドオリゴマーとのオリゴマーおよび核酸のハイブリダイゼーションは、当業者により理解されるように、多種多様な用途で有用である。例えば、本発明の修飾ポリヌクレオチドオリゴマーを含むハイブリダイズされた二重鎖の形成は、例えば蛍光インサイツハイブリダイゼーション（FISH）技法と同様に、二重鎖の検出可能なシグナルまたは特徴の変化の結果として直接的に検出することができる。したがって、本発明の修飾ポリヌクレオチドオリゴマーは、かかる検出を容易とするための非標識または標識プローブとして提供され得る。二重鎖はまた、例えば真のシグナルをバックグラウンドと識別するために、固相または電気泳動分離に付されてもよい。幾つかの実施形態では、ハイブリダイズされた修飾ポリヌクレオチドオリゴマーは、相補的な標的配列とハイブリダイズすることの結果として何らかの方法で化学的に変更される。例えば、PCRなどのプライマー伸長プロセスにおいて、修飾ポリヌクレオチドオリゴマーは、「修飾プライマー」と称され得る。かかる修飾プライマーは、伸長されて、次のPCRサイクル用の鋳型として機能し得るプライマー伸長産物を形成することができる。5'-ヌクレアーゼ反応では、修飾ポリヌクレオチドオリゴマーは、「修飾オリゴマープローブ」と称され得る。かかる修飾オリゴマープローブは、TaqポリメラーゼなどのDNAポリメラーゼのエキソヌクレアーゼ活性により切断されて、蛍光または他の手段により検出され得る切断断片を生じ得る。かかる用途では、プライマーの伸長またはプローブの切断は、本発明の修飾ポリヌクレオチドオリゴマーが、相補的な核酸配列とのハイブリダイゼーションにより二重鎖を形成したという証拠である。さらに、反応条件は、特定の用途に関してハイブリダイゼーションを最大化するのに最も適切な条件を決定するように調節することができる。特に、反応温度は通常、その標的に関するオリゴマーの T_m 付近、 T_m よりもわずかに下、または場合によっては T_m よりもわずかに上であるように選択される。反応温度が高すぎる場合、オリゴマーは、その標的配列とハイブリダイズせず、プライマー伸長またはプローブ切断の効率が低減される。

【0245】

本発明はまた、ハイブリダイゼーションのための方法において、本発明の修飾チミン塩基を含むポリヌクレオチドオリゴマー（本明細書中では「修飾ポリヌクレオチドオリゴマー」とも称される）を使用する方法を提供する。本明細書中に記載する修飾チミン塩基のいずれかは、ハイブリダイゼーションのための方法で使用され得る。本発明の幾つかの実施形態では、反応混合物中に存在すると推測される核酸標的配列との、修飾チミン塩基を含むポリヌクレオチドオリゴマーのハイブリダイゼーションのための方法が提供される。幾つかの実施形態では、この方法は、修飾ポリヌクレオチドオリゴマーを含み、かつ標的核酸配列を含むと推測される反応混合物を、反応混合物中に存在する場合に標的核酸配列との修飾ポリヌクレオチドオリゴマーのハイブリダイゼーションに好適な条件下でインキュベートする工程を含む。その方法で使用される修飾ポリヌクレオチドオリゴマーは、反応混合物中に存在すると推測される核酸標的配列内の配列に相補的であり、式：

【0246】

【化34】



【0247】

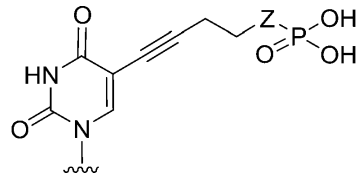
（式中、Zは、 CH_2 またはOである）で表される少なくとも1つの修飾塩基を含む。

【 0 2 4 8 】

本発明の特定の実施形態では、その方法で使用される修飾ポリヌクレオチドオリゴマーは、反応混合物中に存在することが推測される核酸標的配列内の配列に相補的であり、式：

【 0 2 4 9 】

【 化 3 5 】



10

【 0 2 5 0 】

(式中、ZはOである)で表される少なくとも1つの修飾塩基を含む。

【 0 2 5 1 】

反応混合物はインキュベートされ、それにより、修飾ポリヌクレオチドオリゴマーと、反応混合物中に存在する場合には標的核酸配列と二重鎖を形成する。幾つかの実施形態では、上記方法は、反応混合物中の標的核酸配列の存在を検出するか、または標的核酸配列の非存在を確認する工程を含む。反応混合物中の標的核酸配列の存在は、かかる二重鎖の形成の結果として検出される。反応混合物中の標的核酸配列の非存在は、かかる二重鎖の非形成の結果として確認される。上記方法の幾つかの実施形態では、修飾ポリヌクレオチドオリゴマーは、検出可能な標識、フルオロフォアおよび蛍光消光剤から成る群から選択される部分を含む。検出可能な標識、フルオロフォアおよび/または蛍光消光剤は、二重鎖および/または標的核酸配列の検出を容易にする。

20

【 0 2 5 2 】

幾つかの実施形態では、反応混合物は、生物学的試料を含む。幾つかの実施形態では、反応混合物は、生物学的試料から調製される核酸試料を含む。生物学的試料から核酸サンプルを調製する方法が当該技術分野で公知である。

【 0 2 5 3 】

本発明は、生物学的試料中の標的核酸を検出する方法を提供する。幾つかの実施形態では、この方法は、(a)生物学的試料の標的核酸を、修飾チミン塩基を含む修飾ポリヌクレオチドオリゴマーと接触させる工程であって、標的核酸が、修飾ポリヌクレオチドと特異的にハイブリダイズする工程、および(b)標的核酸と修飾ポリヌクレオチドオリゴマーとの間の二重鎖形成を検出する工程を含む。

30

【 0 2 5 4 】

幾つかの実施形態では、本発明は、(a)標的核酸を含有すると推測される核酸試料を供給する工程、(b)修飾チミン塩基および標的核酸に相補的なヌクレオチド配列を含む修飾ポリヌクレオチドオリゴマーを供給する工程、および(c)核酸試料および修飾ポリヌクレオチドオリゴマーを、標的核酸と修飾ポリヌクレオチドオリゴマーとの間での二重鎖形成を可能にするハイブリダイゼーション条件下で組み合わせる工程を含む方法を提供する。

40

【 0 2 5 5 】

幾つかの実施形態では、本発明は、(a)(i)標的核酸を含有すると推測される核酸試料および(ii)修飾チミン塩基および標的核酸に相補的なヌクレオチド配列を含む修飾ポリヌクレオチドオリゴマーを、標的核酸と修飾ポリヌクレオチドオリゴマーとの間での二重鎖形成を可能にするハイブリダイゼーション条件下で組み合わせる工程、および(b)標的核酸と修飾ポリヌクレオチドオリゴマーとの間での二重鎖形成を検出する工程を含む方法を提供する。

【 0 2 5 6 】

幾つかの実施形態では、本発明は、(a)(i)標的核酸を含有すると推測される核酸試料および(ii)修飾チミン塩基および標的核酸に相補的なヌクレオチド配列を含む修

50

飾ポリヌクレオチドオリゴマーを、標的核酸と修飾ポリヌクレオチドオリゴマーとの間での二重鎖形成を可能にするハイブリダイゼーション条件下で組み合わせる工程、および（b）核酸試料中の標的核酸の非存在を確認する工程を含む方法を提供する。

【0257】

当業者が理解するように、ハイブリダイゼーションおよび試料中の標的核酸の存在の検出または標的核酸の非存在の確認の方法は、標的の幾つかの情報が利用可能である限り、任意の標的核酸を用いて実施することができ、その結果、標的核酸に対して少なくとも4つの連続した相補的なヌクレオチドを有する修飾ポリヌクレオチドオリゴマーを調製することができる。

【0258】

4．プライマーとしての修飾ポリヌクレオチドオリゴマーの使用

幾つかの実施形態では、修飾ポリヌクレオチドオリゴマーは、プライマーである。本明細書中で使用し、また場合によっては修飾プライマーと称されるプライマーは、標的配列に特異的にハイブリダイズすることが可能であり、鋳型依存性DNAまたはRNAポリメラーゼにより一方の末端、通常3'末端で伸長される修飾ポリヌクレオチドオリゴマーである。鋳型、ポリメラーゼならびに適切な緩衝液および試薬の存在下で、修飾プライマーは伸長されて、標的配列に相補的である修飾プライマー伸長産物（伸長プライマーとも称される）を形成することができる。幾つかの実施形態では、修飾プライマーは、標識を含むか、または重合用の前駆物質の1つもしくは複数（例えば、ヌクレオシド三リン酸）は、標識を含み得る。修飾プライマー伸長産物（複数可）は、当業者に公知の多数の技法のいずれかにより検出することができる。幾つかの実施形態では、修飾プライマーは、標識されない。幾つかの実施形態では、修飾ポリヌクレオチドオリゴマーは、増幅用のプライマーとして使用される。

【0259】

5．増幅用の修飾ポリヌクレオチドオリゴマーの使用

幾つかの実施形態では、修飾ポリヌクレオチドオリゴマーは、増幅反応で使用される。当業者が理解するように、本発明の修飾ポリヌクレオチドオリゴマーを使用することができる増幅反応は限定されない。増幅の例示的な非限定的な例として、ポリメラーゼ連鎖反応（「PCR」）、逆転写酵素PCR、リアルタイムPCR、ネステッドPCR、マルチプレックスPCR、定量的PCR（Q-PCR）、核酸配列ベースの増幅（NASBA）、転写増幅（TMA）、リガーゼ連鎖反応（LCR）、ローリングサークル増幅（RCA）、または鎖置換増幅（SDA）が挙げられる。したがって、幾つかの実施形態では、増幅のための方法が提供される。幾つかの実施形態では、この方法は（a）修飾ポリヌクレオチドプライマーを標的配列へアニーリングさせる工程、および（b）修飾ポリヌクレオチドオリゴマーを伸長させて、修飾ポリヌクレオチドオリゴマー伸長産物を形成する工程を含む。

【0260】

増幅のための方法の幾つかの実施形態では、修飾ポリヌクレオチドオリゴマーは、固体支持体に結合される。増幅のための方法の幾つかの実施形態では、修飾ポリヌクレオチドオリゴマーは、ビーズに結合される。増幅のための方法の幾つかの実施形態では、修飾ポリヌクレオチドオリゴマーは、アレイに結合される。増幅のための方法の幾つかの実施形態では、修飾ポリヌクレオチドオリゴマーは、マイクロアレイに結合される。

【0261】

PCRなどの多くの増幅反応は、反復プライマー依存性重合を利用する。幾つかの実施形態では、修飾ポリヌクレオチドオリゴマーは、標的核酸配列にハイブリダイズすることが可能であり、いったんハイブリダイズされると、鋳型として標的核酸配列を使用して（ヌクレオチド三リン酸などのヌクレオチド基質の存在下で）重合用酵素により伸長されることが可能であるプライマーである。重合用酵素として、DNAおよびRNAポリメラーゼ、逆転写酵素等が挙げられるが、それらに限定されない。種々の重合用酵素による重合に好適な条件は、当業者に周知である。

【0262】

10

20

30

40

50

増幅反応は、所望の温度でのインキュベーション時間を容易にするために好ましくは自動サーマルサイクラーで実施される。幾つかの実施形態では、増幅は、少なくとも1つのプライマー（即ち、修飾ポリヌクレオチドオリゴマー）を、少なくとも1つの標的核酸中の相補的または実質的に相補的な配列とアニーリングさせること、ポリメラーゼを使用して、鋳型依存性様式でヌクレオチドの少なくとも1つの鎖を合成すること、および新たに形成された核酸二重鎖を変性させて、鎖を分離させることの逐次手順の少なくとも1回のサイクルを含む。サイクルは、反復されてもよく、または反復されなくてもよい。増幅は、熱循環を含むことができるか、または等温的に実施することができる。

【0263】

幾つかの実施形態では、増幅は、約90～約100で約1～約10分の初期変性、続く約55～約75で約1～約30秒のアニーリング、約55～約75で約5～約60秒の伸長および約90～約100で約1～約30秒の変性を含む循環を含む。他の時間およびプロファイルも使用され得る。例えば、プライマーアニーリングおよび伸長は、同じ工程で、単一温度で実施されてもよい。

【0264】

幾つかの実施形態では、サイクルは、少なくとも5回、少なくとも10回、少なくとも15回、少なくとも20回、少なくとも25回、少なくとも30回、少なくとも35回、少なくとも40回、または少なくとも45回実施される。

【0265】

特定のサイクル回数および温度は、増幅される特定の核酸配列に依存し、当業者により容易に決定することができる。

【0266】

6. 治療用途における修飾ポリヌクレオチドオリゴマーの使用

幾つかの実施形態では、修飾ポリヌクレオチドオリゴマーは、治療用途において有用性を見出す。当業者が理解するように、本発明の修飾ポリヌクレオチドオリゴマーを使用することができる治療用途は限定されない。治療用途の例示的な非限定的な例として、RNAに結合するアンチセンスオリゴマーまたはsiRNAとしての修飾ポリヌクレオチドの使用、DNAに結合するアンチセンスオリゴヌクレオチドとしての修飾ポリヌクレオチドの使用、アプタマーとしての修飾ポリヌクレオチドの使用、デコイとしての修飾ポリヌクレオチドの使用、またはタンパク質に結合するCpGオリゴマーとしての修飾ポリヌクレオチドの使用が挙げられる。修飾ポリヌクレオチドオリゴマーは、遺伝子発現を調節するのに、およびアンチセンス遺伝子療法において使用することができる。

【0267】

IV. キット

上記で提示される診断、研究および治療用途における使用のために、キットもまた本発明により提供される。診断および研究用途では、かかるキットは、1つまたは複数の修飾塩基、1つまたは複数のポリヌクレオチドオリゴマー、1つまたは複数の修飾ヌクレオシド、1つまたは複数の修飾ヌクレオチド、1つまたは複数の修飾PNA、1つまたは複数の修飾因子部分、1つまたは複数のアッセイ試薬、1つまたは複数の緩衝液等のいずれかまたは全てを含み得る。治療用製品は、滅菌生理食塩水または別の薬学的に許容されるエマルジョンおよび懸濁液基剤を含み得る。任意選択により、キットは、本明細書中に記載するような修飾部分の作製および/または使用について記載する取扱説明書を含む。通常、取扱説明書以外のこれらの構成要素は、1つまたは複数の容器中に供給される。

【0268】

幾つかの実施形態では、本発明は、本明細書中に記載するような修飾部分を含むキットを提供する。幾つかの実施形態では、本発明は、本明細書中に記載するような修飾ポリヌクレオチドオリゴマーを含むキットを提供する。幾つかの実施形態では、キットは、熱安定性ポリメラーゼ酵素などの少なくとも1つのポリメラーゼをさらに含む。幾つかの実施形態では、キットは、dNTPをさらに含む。幾つかの実施形態では、キットは、プライマーおよび/またはプローブをさらに含む。

【 0 2 6 9 】

幾つかの実施形態では、本発明は、本明細書中に記載するような、核酸試料を加工処理すること、酵素反応を実施すること、ハイブリダイゼーションを実施すること、二重鎖を形成することなどを含むが、それらに限定されない本発明の方法を実施するための組成物を含むキットを提供する。

【 0 2 7 0 】

指導的材料は、本発明の方法の実施のための指示書（即ち、プロトコール）を含有し得る。説明書は、様々な形態で対象キット中に存在してもよく、それらの1つまたは複数が、キット中に存在してもよい。指導的材料は通常、資料または印刷物を含むが、それらはそれらに限定されない。かかる説明書を保管して、それらを最終使用者へ伝達することが可能な任意の媒体が本発明により意図される。かかる媒体として、電子保管媒体（例えば、磁気ディスク、テープ、カートリッジ、チップ）、光媒体（例えば、CD ROM）等が挙げられるが、それらに限定されない。かかる媒体は、かかる指導的材料を提供するインターネットサイトへのアドレスを含んでもよい。

10

【 0 2 7 1 】

当業者が理解するように、多種多様なキットおよび構成要素は、キットの意図される使用者および使用者の特定のニーズに応じて、本発明に従って調製することができる。本発明のさらなるキット実施形態は、当業者が本明細書中に記載する方法の変形のいずれかを実施するのを可能にする任意選択の機能的構成要素を含む。

【 0 2 7 2 】

本発明を実施するための本発明者らに公知である最良の形態を含む本発明の好ましい実施形態を本明細書中に記載する。当然のことながら、好ましい実施形態に対する変動、変化、修飾および等価体の置換は、上述の説明に目を通すことで当業者に明らかとなる。本発明者らは、必要に応じて、当業者がかかる変動、変化、修飾および等価体の置換を用いると見込んでおり、本発明者らは、本明細書中に具体的に記載する以外で本発明が実施されると意図する。当業者は、本質的に類似した結果をもたらすように変化、変動または修飾することができる様々な重要ではないパラメータを容易に認識する。したがって、本発明は、適用法により認可されるような併記の特許請求の範囲に列挙される主題の修飾および等価体全てを包含する。さらに、それらの全ての考え得る変形における上述の要素の任意の組合せは、本明細書中で別記しない限り、または他の場合で文脈により明らかに矛盾しない場合に、本発明により包含される。

20

30

【 0 2 7 3 】

本発明の要素それぞれが、多重の実施形態を含有するとして本明細書中に記載されているが、別記しない限り、本発明の所定の要素の実施形態それぞれは、本発明の他の要素の実施形態それぞれとともに使用されることが可能であり、かかる使用はそれぞれ、本発明の別個の実施形態を形成すると意図されることが理解されるべきである。

【 0 2 7 4 】

参照される特許、特許公開、および本明細書中で言及される科学文献は、個々の出版物、特許または特許公開が、参照により援用されるために具体的におよび個別に示されているかのように、それらの全体が参照により援用される。本明細書中で引用される任意の参照文献と、本明細書の具体的な教示との間の任意の矛盾は、後者を支持して解決されるべきである。同様に、単語または語句の当該技術分野で理解される定義と、本明細書中で具体的に教示するような単語または語句の定義との間の任意の矛盾は、後者を支持して解決されるべきである。

40

【 0 2 7 5 】

上記開示から理解され得るように、本発明は、多種多様な用途を有する。本発明は、下記の実施例でさらに説明されるが、実施例は、単に例示的であり、どのような場合でも本発明の定義および範囲を限定するものと意図されない。

【 実施例 】

【 0 2 7 6 】

50

V. 実施例

一般的な方法および推奨

下記実施例は、本明細書中に記載する本発明を説明するのに提供されるが、本明細書中に記載する本発明を限定しない。

【0277】

空気および水分感受性の反応は、全てアルゴン (Ar) 下で行った。無水溶媒および試薬は、別記しない限り、商業的供給源から入手した。フラッシュクロマトグラフィーは、230 ~ 400 メッシュのシリカゲル (VWR) で実施した。

【0278】

^1H NMR スペクトルは、Brucker 400 分光計で、20 で実行し、 ^1H に関しては標準物質 Me_4Si 、および ^{31}P に関しては H_3PO_4 に対する ppm で報告した。

10

【0279】

融点は、オープンキャピラリーで Mel-Temp 融点装置を使用して決定し、未補正である。

【0280】

UV-可視吸収スペクトルは、Cary Varian 分光光度計で、200 ~ 400 nm の範囲で記録した。

【0281】

薄層クロマトグラフィーは、シリカゲル 60 F-254 アルミニウム裏打ち TLC 板 (EM Reagents) で実施した。

20

【0282】

HPLC 分析は、クォータナリポンプ、オートサンプラーおよびダイオードアレイ検出器を備えた Agilent 1100 機器で行い、別記しない限り、270 nm での吸光度をモニタリングした。

【0283】

オリゴヌクレオチド合成は、MerMade 12 DNA 合成機 (BioAutomation) で実施した。標準的なホスホルアミダイト合成サイクルを使用して、カップリング時間は、修飾ホスホルアミダイトに関しては 360 秒に増やした。全ての融解実験に関して、各オリゴヌクレオチドの濃度は $1\text{ }\mu\text{M}$ であり、緩衝液内容物は、3 mM MgCl_2 、15 mM KCl 、25 mM HEPES 、pH 8 であった。固体支持体からの切断および脱保護は、濃アンモニア水中で、室温で 24 時間行った。

30

【0284】

本発明の実施は、本明細書中で別記しない限り、当該技術分野の技量内の細胞生物学、分子生物学、微生物学、ウイルス学、組換え DNA 等の従来の技法を用いる。かかる技法は、文献で十分に説明されている。例えば、Sambrook, Fritsch, and Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition (1989)、Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait Ed., 1984)、Animal Cell Culture (R. I. Freshney, Ed., 1987)、the series *Methods In Enzymology* (Academic Press, Inc.); *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells* (J. M. Miller and M. P. Calos eds., 1987)、*Current Protocols In Molecular Biology* (F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Siedman, J. A. Smith, and K. Struhl, eds., 1987) を参照されたい。

40

【0285】

下記の具体的な実施例では、実施例後に関連反応スキームが続く。

【0286】

50

実施例 1 . DMT - T^B P ホスホルアミダイト (M 5) の合成

実施例 1 は、1 - ブチニルリンカーによりピリミジン 5 - 炭素に連結された、保護されたリン酸部分を含む修飾チミン 3' - ホスホルアミダイトモノマー (T^B P と称される) の保護形態である M 5 を調製するための合成手順について記載する。M 5 の 5' - ヒドロキシルは DMT 基で保護されており、リン酸部分の 2 つの水酸基は、ピバロイルオキシベンジル基で保護されている。

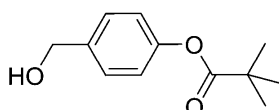
【 0 2 8 7 】

5' - O - DMT - 5 - ヨード - 2' - デオキシウリジン。この化合物は、一般的に Ahmadian, M., Zhang, P., and Bergstrom, D. E. (1998) Nucl. Acids Res., v. 26, No. 13, pp. 3127 - 3135 に記載される手順に倣って合成した。

【 0 2 8 8 】

【 化 3 6 】

4-ピバロイルオキシベンジルアルコール(化合物 M1)



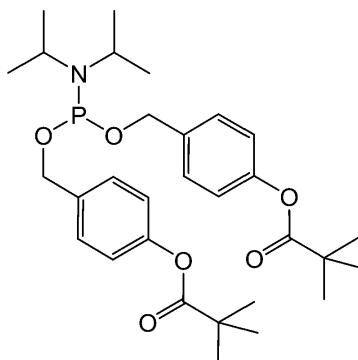
【 0 2 8 9 】

トリエチルアミン (10 . 43 mL、75 mmol) を含有する無水 THF (50 mL) 中の 4 - ヒドロキシベンジルアルコール (6 . 21 g、50 mmol) の攪拌溶液に、塩化ピバロイル (6 . 79 mL、55 mmol) を、アルゴン雰囲気下で室温にて滴下した。60 分間攪拌した後、反応混合物を水 (0 . 2 mL) でクエンチして、一晩放置した。次に、EtOAc (およそ 400 mL) で希釈して、飽和 NaHCO₃ (3 × 100 mL) および塩水 (100 mL) で洗浄した。続いて、それを Na₂SO₄ で乾燥させて、濾過して、濃縮した。生成物 (TLC : 酢酸エチル / ヘキサン (4 : 6) 中で R_f およそ 0 . 4) を、酢酸エチル / ヘキサン (4 : 6) で溶出させるシリカゲルカラム (4 × 20 cm) 上でのフラッシュクロマトグラフィーを使用して単離した。純粋な分画をプールして、濃縮して、真空中で乾燥させて、無色油状物質 7 . 75 g (74 %) を得た。¹H NMR (DMSO - d₆) : 7 . 35 (d , 2 H , J = 8 . 6 Hz)、7 . 04 (d , 2 H , J = 8 . 6 Hz)、5 . 22 (t , 1 H)、4 . 50 (d , 2 H)、1 . 31 (s , 9 H)。

【 0 2 9 0 】

【 化 3 7 】

化合物 M2.



【 0 2 9 1 】

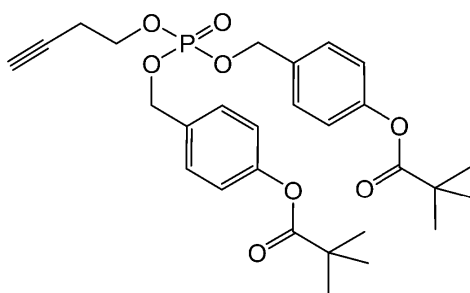
化合物 M 1 (上記を参照、7 . 79 g、37 . 4 mmol) を、アルゴン下で N , N - ジイソプロピルエチルアミン (8 . 14 mL、46 . 8 mmol) を含有する無水 THF (50 mL) 中に溶解して、得られた溶液を氷水浴中で 0 に冷却した。ジイソプロピル亜ホスホルアミドジクロリド (3 . 46 mL、18 . 8 mmol) を、攪拌および冷却し

ながら、5分かけてシリンジで滴下した。反応混合物を室温にまで加温して、一晚攪拌した。沈殿した塩を濾過により除去して、濾液を真空中で濃縮した。残渣を酢酸エチル（およそ150 mL）中に溶解して、5% NaHCO₃（3×50 mL）、続いて塩水（50 mL）で洗浄した。有機層を分離して、Na₂SO₄で乾燥させて、濾過して、濃縮した。生成物（TLC：酢酸エチル/ヘキサン/トリエチルアミン（20：80：2）中でR_fおよそ0.6）を、ヘキサン/トリエチルアミン（100：2）で充填して、かつ酢酸/ヘキサン/トリエチルアミン（20：80：2）で溶出させるシリカゲルカラム（4×20 cm）上でのフラッシュクロマトグラフィーを使用して単離した。純粋な分画をプールして、濃縮して、無色油状物質8.1 g（79%）を得た。¹H NMR（DMSO-d₆）： 7.37（d, 4H, J = 8.6 Hz）、7.07（d, 4H, J = 8.6 Hz）、4.76~4.63（m, 4H）、3.70~3.61（m, 2H）、1.30（s, 18H）、1.16（d, 12H, J = 6.8 Hz）。³¹P NMR（DMSO-d₆）： 147.30。

【0292】

【化38】

化合物M3.



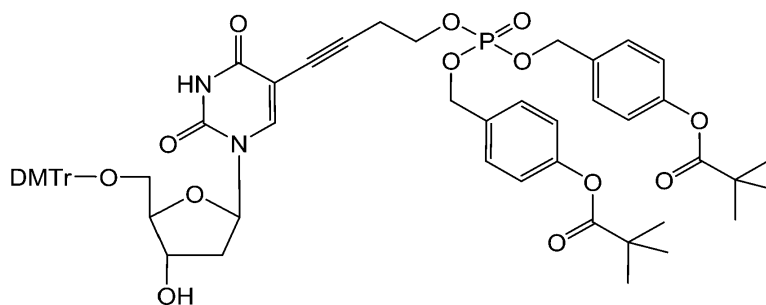
【0293】

3-ブチン-1-オール（1.18 mL、15.0 mmol）および化合物M2（以下を参照、8.1 g、14.8 mmol）を、アルゴン雰囲気下で無水THF中に溶解した。5-（エチルチオ）-1H-テトラゾール（66 mL、アセトニトリル中0.25 M）の溶液を一度に添加して、反応混合物を室温で1時間攪拌した。t-ブチルヒドロペルオキシド溶液（4.0 mL、デカン中5~6 M）を添加して、混合物をさらに2時間攪拌した。次に、溶媒を真空下で除去して、残渣を酢酸エチル（200 mL）中に溶解して、飽和NaHCO₃（3×50 mL）、および塩水（50 mL）で洗浄した。有機相を、Na₂SO₄で乾燥させて、濾過して、濃縮した。生成物（TLC：酢酸エチル/ヘキサン（1：1）中でR_fおよそ0.35）を、20~50%のヘキサン中の酢酸エチルのステップ勾配を使用したシリカゲル上でのフラッシュクロマトグラフィーにより単離した。無定形固体5.3 g（67%）を得た。¹H NMR（DMSO-d₆）： 7.42（d, 4H, J = 8.6 Hz）、7.11（d, 4H, J = 8.6 Hz）、5.07（d, 4H, J = 8.2 Hz）、4.07~4.01（m, 2H）、2.93（t, 1H, J = 2.6 Hz）、2.56~2.52（m, 2H）、1.31（s, 18H）。³¹P NMR（DMSO-d₆）： -1.2。

【0294】

【化 3 9】

化合物 M4.



10

【 0 2 9 5】

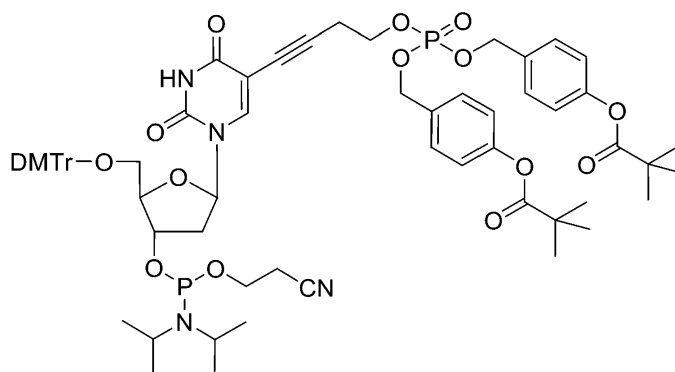
5'-O-DMT-5-ヨード-2'-デオキシウリジン (656 mg、1 mmol) を、磁気攪拌子を備えた丸底フラスコ中で $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (116 mg、0.1 mmol)、ヨウ化銅 (I) (38 mg、0.2 mmol) および化合物 M3 (上記を参照、637 mg、1.2 mmol) と合わせた。フラスコを排気させて (evacuate)、アルゴンガスで満たして、セプタムおよびアルゴン風船で密封した。N,N-ジメチルホルムアミド (10 mL) およびトリエチルアミン (697 μL 、5 mmol) を、シリンジを使用してセプタムに通して添加して、混合物を Ar 雰囲気下で外気温にて攪拌した。 C_{18} RP HPLC または TLC を使用して、出発ヌクレオシドの消失をモニタリングして、
 反応の進行を管理した。12~72 時間後、反応混合物を酢酸エチル (150 mL) で希釈して、0.1 M Na_2EDTA (2 x 50 mL)、飽和 NaHCO_3 水 (3 x 50 mL)、および塩水 (50 mL) で洗浄した。有機層を分離して、 Na_2SO_4 で乾燥させて、油状物質にまで濃縮した。反応生成物 (TLC: 酢酸エチル中で R_f およそ 0.5) を、酢酸エチル/ヘキサン (2:1) で充填して、かつ純粋な酢酸エステルで溶出させるシリカゲルカラム (4 x 20 cm) 上でのフラッシュクロマトグラフィーにより単離した。褐色ガラス状固体 576 mg を得た (576 mg、54%)。 ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$): 11.64 (s, 1H)、7.93 (s, 1H)、7.41~6.87 (m, 21H)、6.12 (t, 1H)、5.34 (d, 1H)、5.04 (d, 4H)、4.34~4.29 (m, 1H)、3.95~3.87 (m, 3H)、3.72 (s, 6H)、3.28~3.05 (m, 2H)、2.56~2.52 (m, 2H)、2.29~2.15 (m, 2H)、1.30 (s, 18H)。 ^{31}P NMR ($\text{DMSO}-d_6$): -1.31。

20

30

【 0 2 9 6】

【化 4 0】

T^{BP} DMT ホスホルアミダイト (化合物 M5)

40

【 0 2 9 7】

0 に維持した N,N-ジイソプロピルエチルアミン (348 μL 、2.0 mmol) を含有する無水 CH_2Cl_2 (10 mL) 中の化合物 M4 (上記を参照、576 mg、0

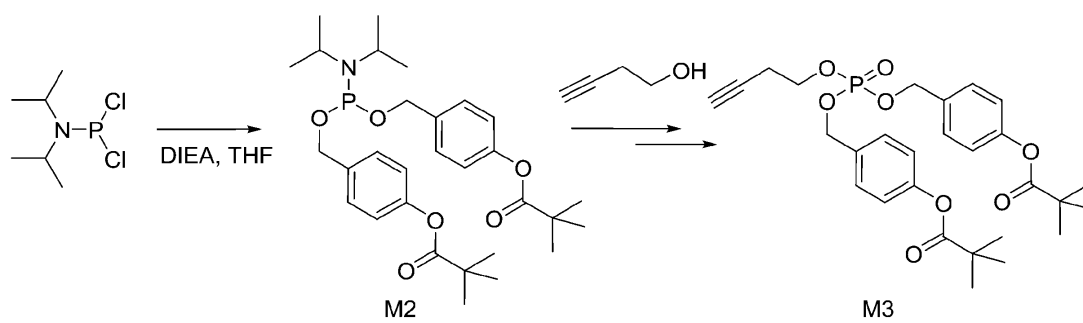
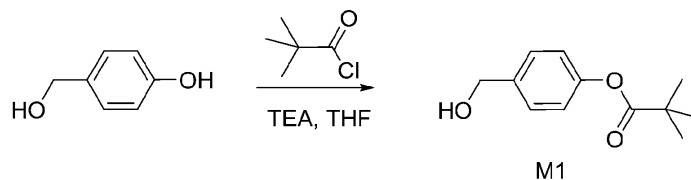
50

、54 mmol) の攪拌溶液に、2 - シアノエチル N, N - ジイソプロピルクロロホスホルアミダイト (159 μ L、0.71 mmol) をアルゴン下で滴下した。反応混合物を室温にまで加温して、30 分後にメタノール (0.1 mL) を添加した。反応混合物を酢酸エチル (150 mL) で希釈して、5% NaHCO₃ 水 (3 × 50 mL)、および塩水 (50 mL) で洗浄した。有機層を分離して、Na₂SO₄ で乾燥させて、油状物質にまで濃縮した。粗製生成物を、酢酸エチル/トリエチルアミン (100 : 2) 中でのシリカゲルカラム (3 × 15 cm) 上でクロマトグラフィーに付した。純粋な分画をプールして、真空下で濃縮して、オフホワイト色の泡状物質 (M5、350 mg、51%) を得た。
³¹P NMR (DMSO - d₆) : 147.54、147.19。

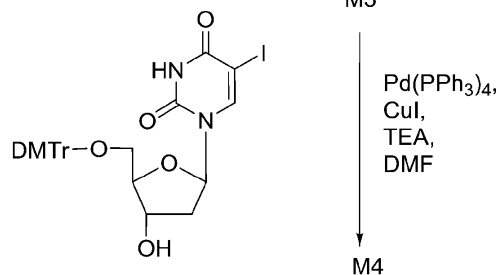
【0298】

10

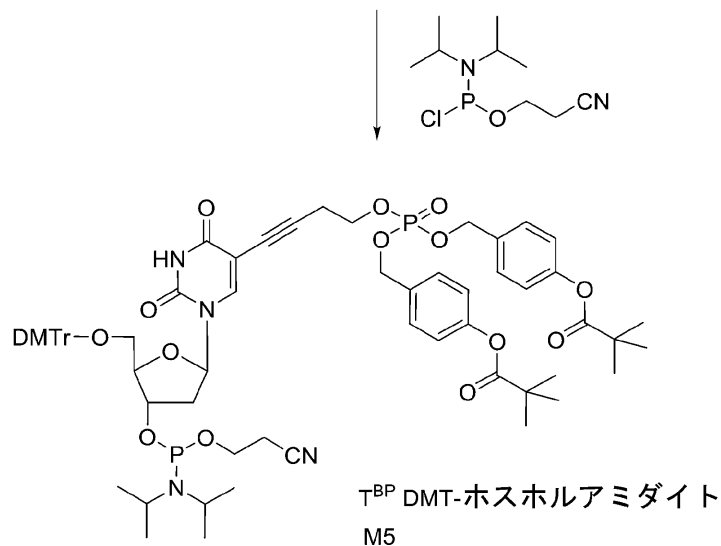
【化41】



20



30



40

【0299】

実施例 2 . DMT - T^{PP} ホスホルアミダイト (M10) の合成

実施例 2 は、リン原子が 1 - ペンチニルリンカーによりピリミジン 5 - 炭素に連結され

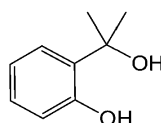
50

た、保護されたホスホン酸部分を含む修飾チミン 3' - ホスホルアミダイトモノマー (T^{PP} と称される) の保護形態である化合物 M10 を調製するための合成手順について記載する。M10 の 5' - ヒドロキシルは DMT 基で保護されており、リン酸部分の 2 つの水酸基は、CC(C)Oc1ccc(cc1)C(=O)O - ジメチル - o - ベンジレン保護基で保護されている。

【0300】

【化42】

2-(ヒドロキシ-1-メチルエチル)-フェノール(化合物 M6)



10

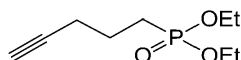
【0301】

この化合物は、Johnsson, R., Mani, K., Cheng, F., Ellervik, U. (2006) J. Org. Chem., v. 71, pp. 3444 - 3451 に記載されるプロトコールに倣って合成した。

【0302】

【化43】

化合物 M7.



20

【0303】

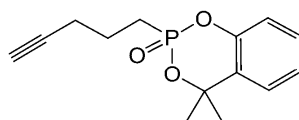
空気冷却器を取り付けた 100 mL の丸底フラスコに、5 - クロロ - 1 - ペンチン (15.0 mL、0.14 mol) および亜リン酸トリエチル (25.7 mL、0.15 mol) を入れた。フラスコの内容物を還流するまで加熱した (120 の鉱油浴)。還流は、断続的に 2 週間継続し、その期間中に、沸点が徐々に 180 まで上昇した。その時点で、ほんの微量の亜リン酸トリエチルが、³¹P NMR により反応混合物中で検出可能であった。加熱を中断して、混合物を外気温まで冷却して、およそ 1 mm, Hg で真空蒸留した。91 ~ 92 / およそ 1 mm で沸騰する分画を収集して、無色液体 14.0 g (48%) を得た。¹H NMR (DMSO - d₆) : 4.04 ~ 3.93 (m, 4 H), 2.82 (t, 1 H), 2.26 (dt, 2 H), 1.85 ~ 1.74 (m, 2 H), 1.69 ~ 1.58 (m, 2 H), 1.23 (t, 6 H)。³¹P NMR (DMSO - d₆) : 31.20。

30

【0304】

【化44】

化合物 M8.



40

【0305】

化合物 M7 (上記を参照、2.04 g、10.0 mmol) を、Ar 雰囲気下で室温にてプロトトリメチルシラン (3.96 mL、30.0 mmol) 中に溶解して、50 mL の丸底フラスコ中で一晩、密封状態を維持した。揮発性物質を減圧下で除去して、残渣を高真空中で 30 分間、乾燥させた。フラスコの内容物を、N, N - ジメチルホルムアミド (0.1 mL) を含有する無水ジクロロメタン (10 mL) 中に溶解して、アルゴン下で -20 に冷却した。溶液を、攪拌しながら塩化オキサリル (3.43 mL、40.0 mmol) 滴下で処理した。反応混合物を室温にまで加温して、2 時間攪拌した。次に、それを減圧下で蒸発させて、残渣を高真空中で 1 時間乾燥させた。残存する黄褐色固体を、無水ジクロロメタン (5.0 mL) 中に溶解して、得られた溶液を -20 に冷却した。

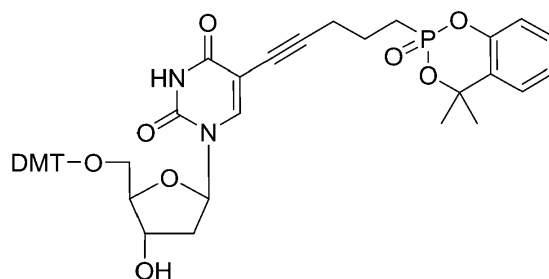
50

N, N - ジイソプロピルエチルアミン (6 . 9 6 m L 、 4 0 . 0 m m o l) を含有するジクロロメタン (5 m L) 中の化合物 M 6 (上記を参照、 1 . 5 2 g 、 1 0 . 0 m m o l) の溶液を、攪拌しながら滴下した。反応混合物を外気温まで加温して、一晚攪拌して、続いて、酢酸エチル (1 5 0 m L) で希釈した。得られた溶液は、 5 % N a H C O ₃ (3 × 5 0 m L) および塩水 (5 0 m L) で洗浄した。有機層を分離して、 N a ₂ S O ₄ で乾燥させて、濾過して、濃縮した。生成物 (T L C : 酢酸エチル / ヘキサン (1 : 1) 中で R_f およそ 0 . 2 、または酢酸エチル中で R_f およそ 0 . 6) を、 2 0 ~ 8 0 % のヘキサン中の酢酸エチルのステップ勾配を使用したシリカゲル上でのフラッシュクロマトグラフィーにより単離した。収量 : 2 . 0 5 g (7 8 % 、わずかに着色した油) 。 ¹ H N M R (D M S O - d₆) : 7 . 4 3 ~ 7 . 3 5 (m , 2 H) 、 7 . 2 3 ~ 7 . 1 3 (m , 2 H) 、 2 . 7 9 (t , 1 H) 、 2 . 2 4 (b t , 2 H) 、 1 . 9 9 ~ 1 . 8 9 (m , 2 H) 、 1 . 7 3 (d s , 6 H) 、 1 . 6 8 ~ 1 . 5 7 (m , 2 H) 。 ³¹ P N M R (D M S O - d₆) : 2 2 . 3 4 。

【 0 3 0 6 】

【 化 4 5 】

化合物 M9.

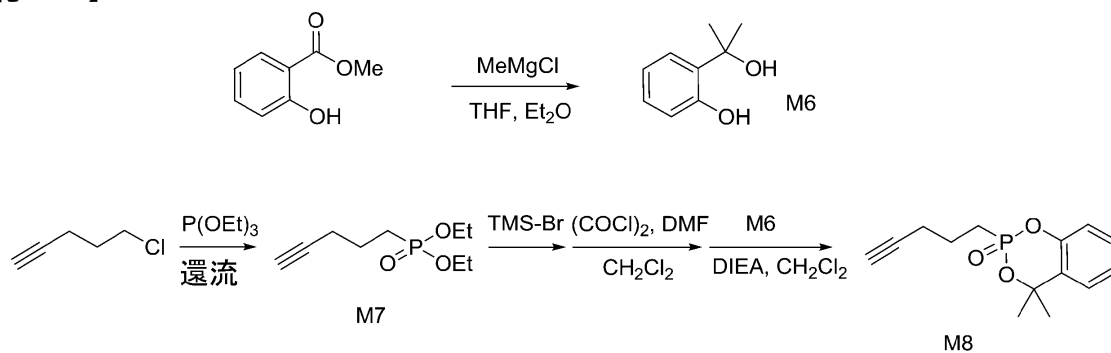


【 0 3 0 7 】

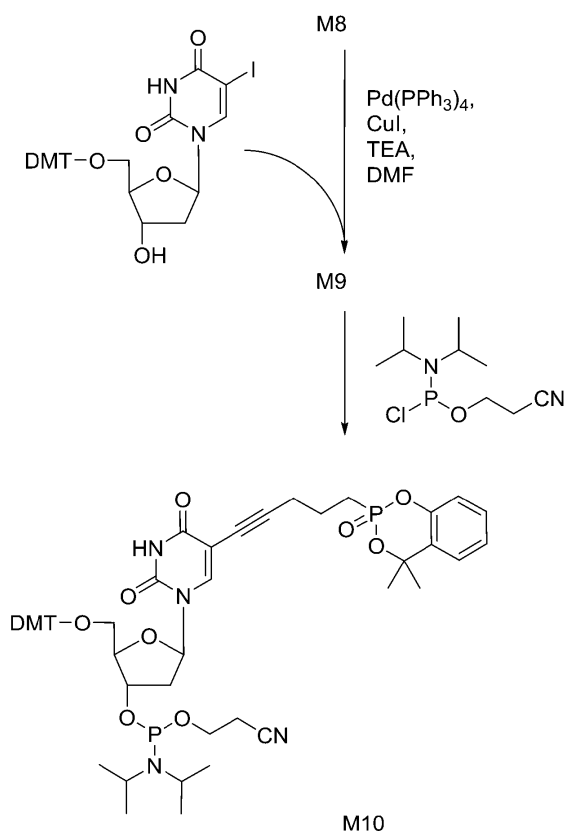
5' - O - D M T - 5 - ヨード - 2' - デオキシウリジン (9 8 4 m g 、 1 . 5 m m o l) を、磁気攪拌子を備えた丸底フラスコ中で P d (P P h ₃)₄ (1 7 3 m g 、 0 . 1 5 m m o l) 、 ヨウ化銅 (I) (5 7 m g 、 0 . 3 m m o l) と合わせた。フラスコを排気させて、アルゴンガスで満たして、セプタムおよびアルゴン風船で密封した。N, N - ジメチルホルムアミド (2 0 m L) 中の化合物 M 8 (上記を参照、 5 1 7 m g 、 1 . 9 5 m m o l) およびトリエチルアミン (1 . 0 5 m L 、 7 . 5 m m o l) の溶液を、シリンジを使用してセプタムに通して添加して、混合物を、 A r 雰囲気下で外気温にて攪拌した。 1 5 時間後、反応混合物を酢酸エチル (1 5 0 m L) で希釈して、 0 . 1 M N a ₂ E D T A (2 × 5 0 m L) 、飽和 N a H C O ₃ 水 (3 × 5 0 m L) 、および塩水 (5 0 m L) で洗浄した。有機層を分離して、 N a ₂ S O ₄ で乾燥させて、油状物質にまで濃縮した。反応生成物 M 1 0 (T L C : 酢酸エチル中で R_f およそ 0 . 2 5) を、酢酸エチル / ジクロロメタン (1 : 1) で充填して、かつ 0 ~ 1 5 % の酢酸エチル中のアセトンのステップ勾配で溶出させるシリカゲルカラム (4 × 2 0 c m) 上でのフラッシュクロマトグラフィーにより単離した。黄褐色泡状物質を得た (7 2 7 m g 、 6 1 %) 。 ¹ H N M R (D M S O - d₆) : 1 1 . 6 2 (s , 1 H) 、 7 . 8 5 (s , 1 H) 、 7 . 4 2 ~ 7 . 0 6 (m , 1 3 H) 、 6 . 8 9 ~ 6 . 8 6 (m , 4 H) 、 6 . 1 2 (t , 1 H) 、 5 . 3 4 (d , 1 H) 、 4 . 3 3 ~ 4 . 2 8 (m , 1 H) 、 3 . 9 5 ~ 3 . 9 0 (m , 1 H) 、 3 . 7 3 (s , 6 H) 、 3 . 2 9 ~ 3 . 2 3 (m , 1 H) 、 3 . 1 1 ~ 3 . 0 7 (m , 1 H) 、 2 . 3 0 ~ 2 . 1 9 (m , 4 H) 、 1 . 9 4 ~ 1 . 8 5 (m , 2 H) 、 1 . 7 2 (d s , 6 H) 、 1 . 6 1 ~ 1 . 5 2 (m , 2 H) 。 ³¹ P N M R (D M S O - d₆) : 2 2 . 4 3 。

【 0 3 0 8 】

【化 4 7】



10



20

30

【 0 3 1 1】

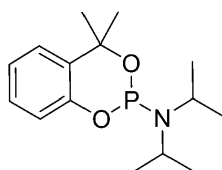
実施例 3 . DMT - T^BP - ホスホルアミダイト M 1 4 の合成

実施例 3 は、上記 M 5 のように、リン酸部分を含む修飾チミン 3' - ホスホルアミダイトモノマーの保護形態である M 1 4 を調製するための合成手順について記載するが、M 1 0 におけるホスホン酸のように、M 1 4 におけるリン酸部分が、
 , - ジメチル - o - ベンジレン保護基で保護されている。

【 0 3 1 2】

【化 4 8】

化合物 M11.



【 0 3 1 3】

化合物 M 6 (上記を参照、 3 . 4 2 g、 2 2 . 5 m m o l) を、アルゴン下で無水 T H F (5 0 m L) 中に溶解して、得られた溶液をアセトン - ドライアイス浴中で - 2 0 に

40

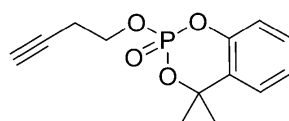
50

冷却した。攪拌および冷却しながら、ジイソプロピル亜ホスホルアミドジクロリド (5.0 g、24.7 mmol) を、続いて N, N - ジイソプロピルエチルアミン (9.80 mL、56.3 mmol) を滴下した。反応混合物を室温にまで加温して、一時間攪拌した。続いて、それを酢酸エチル (およそ 150 mL) で希釈して、5% NaHCO₃ (3 × 50 mL)、続いて塩水 (50 mL) で洗浄した。有機層を分離して、Na₂SO₄ で乾燥させて、濾過して、濃縮した。生成物 (TLC : ヘキサン/トリエチルアミン (100 : 2) 中で R_f およそ 0.85) を、ヘキサン/トリエチルアミン (100 : 2) で溶出させるシリカゲルカラム (4 × 20 cm) 上でのフラッシュクロマトグラフィーを使用して単離した。純粋な分画をプールして、濃縮して、無色油状物質 5.58 g (88%) を得て、それは、-20 °C での保管時には凝固した。¹H NMR (DMSO - d₆) : 7.23 ~ 7.13 (m, 2H)、6.97 ~ 6.82 (m, 2H)、3.67 ~ 3.54 (m, 2H)、1.69 (s, 3H)、1.56 (s, 3H)、1.19 ~ 1.14 (m, 12H)。³¹P NMR (DMSO - d₆) : 130.75。

【0314】

【化49】

化合物 M12.



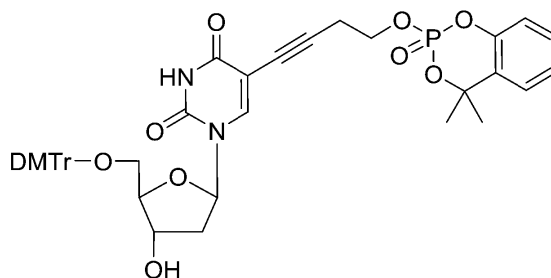
【0315】

3 - ブチン - 1 - オール (1.50 mL、18.9 mmol) および化合物 M11 (上記を参照、5.58 g、19.8 mmol) を、アルゴン雰囲気下で無水アセトニトリル (50 mL) 中に溶解した。5 - (エチルチオ) - 1H - テトラゾール (87 mL、アセトニトリル中 0.25 M) の溶液を一度に添加して、反応混合物を室温で 1 時間攪拌した。t - ブチルヒドロペルオキシド溶液 (5.0 mL、デカン中 5 ~ 6 M) を添加して、混合物をさらに 2 時間攪拌した。次に、溶媒を真空下で除去して、残渣を酢酸エチル (200 mL) 中に溶解して、飽和 NaHCO₃ (3 × 50 mL)、および塩水 (50 mL) で洗浄した。有機相を、Na₂SO₄ で乾燥させて、濾過して、濃縮した。生成物 (TLC : 酢酸エチル/ヘキサン (1 : 1) 中で R_f およそ 0.33) を、30 ~ 50% のヘキサン中の酢酸エチルのステップ勾配を使用したシリカゲル上でのフラッシュクロマトグラフィーにより単離した。無色油状物質 4.79 g (91%) を得た。¹H NMR (DMSO - d₆) : 7.45 ~ 7.35 (m, 2H)、7.25 ~ 7.13 (m, 2H)、4.13 ~ 4.05 (m, 2H)、2.85 (t, 1H, J = 2.7 Hz)、2.55 ~ 2.49 (m, 2H)、1.79 (s, 3H)、1.73 (s, 3H)。³¹P NMR (DMSO - d₆) : -12.45。

【0316】

【化50】

化合物 M13.



【0317】

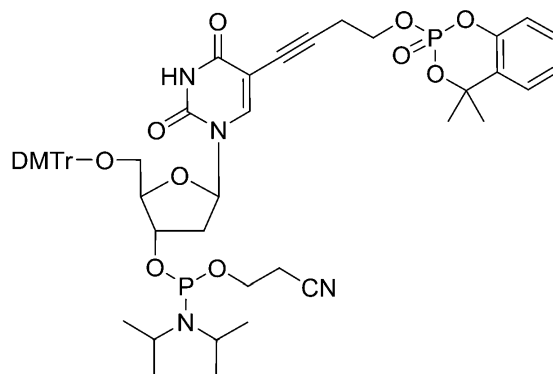
5' - O - DMT - 5 - ヨード - 2' - デオキシウリジン (1.97 g、3.0 mmol) を、磁気攪拌子を備えた丸底フラスコ中で Pd (PPh₃)₄ (346 mg、0.3

mmol)、ヨウ化銅(I)(114mg、0.6mmol)および化合物M12(上記を参照、1.04g、3.9mmol)と合わせた。フラスコを排気させて、アルゴンガスで満たして、セプタムおよびアルゴン風船で密封した。N,N-ジメチルホルムアミド(40mL)およびトリエチルアミン(2.09mL、15mmol)を、シリンジを使用してセプタムを通して添加して、混合物をAr雰囲気下で外気温にて攪拌した。C₁₈ RP HPLCまたはTLCを使用して、出発ヌクレオシドの消失をモニタリングして、反応の進行を管理した。15時間後、反応混合物を酢酸エチル(およそ150mL)で希釈して、0.1M Na₂EDTA(2×50mL)、飽和NaHCO₃水(3×50mL)、および塩水(50mL)で洗浄した。有機層を分離して、Na₂SO₄で乾燥させて、油状物質にまで濃縮した。反応生成物(TLC: 酢酸エチル中でR_fおよそ0.35)を、酢酸エチル/DCM(1:1)で充填して、かつ純粋な酢酸エステルで溶出させるシリカゲルカラム(4×25cm)上でのフラッシュクロマトグラフィーにより単離した。純粋な分画をプールして、真空中で濃縮した。クリーム色の泡状物質を得た(1.61g、68%)。¹H NMR(DMSO-d₆): 11.65(s, 1H)、7.88(s, 1H)、7.42~6.87(m, 17H)、6.12(t, 1H)、5.36(d, 1H)、4.33~4.27(m, 1H)、3.96~3.87(m, 3H)、3.73(s, 6H)、3.28~3.07(m, 2H)、2.56~2.49(m, 2H)、2.30~2.17(m, 2H)、1.74(s, 3H)、1.71(s, 3H)。³¹P NMR(DMSO-d₆): -12.52。

【0318】

【化51】

化合物 M14.

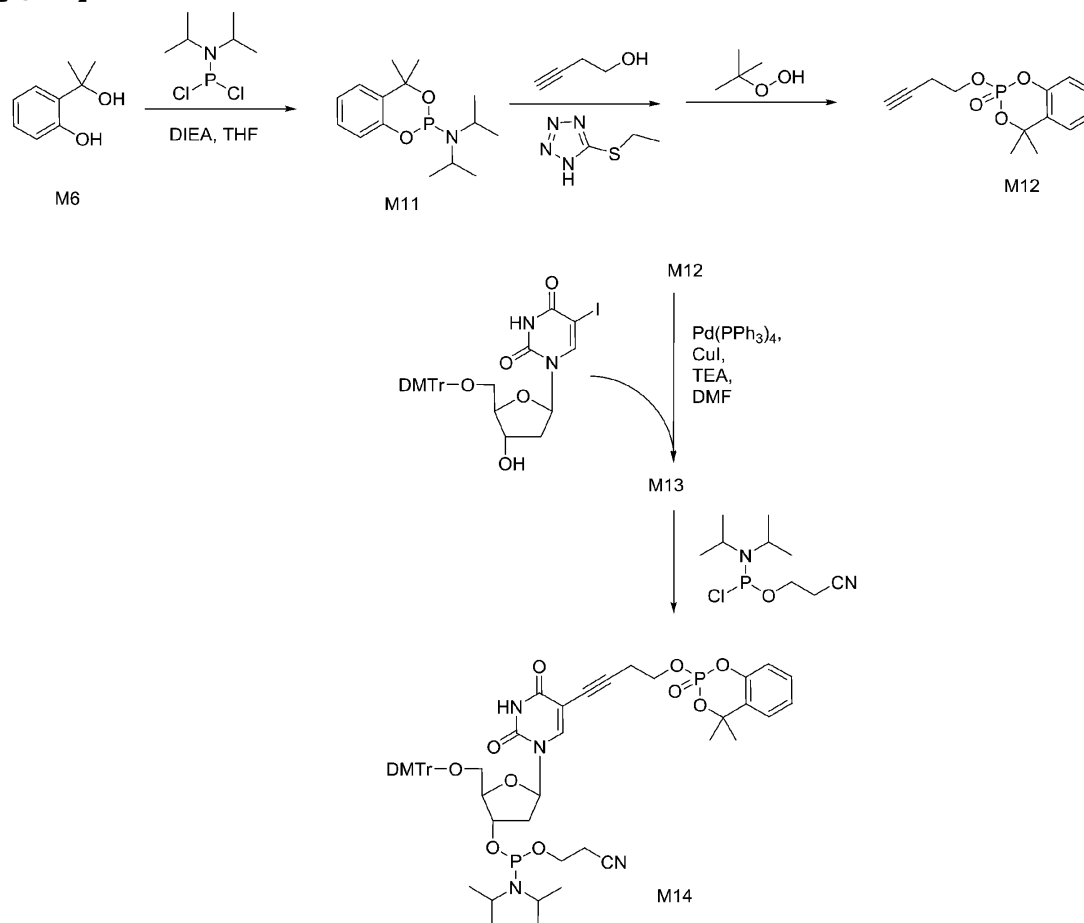


【0319】

0 に維持したN,N-ジイソプロピルエチルアミン(869μL、5.0mmol)を含有する無水CH₂Cl₂(20mL)中の化合物M13(上記を参照、1.59g、2.0mmol)の攪拌溶液に、2-シアノエチルN,N-ジイソプロピルクロロホスホリタミダイト(581μL、2.6mmol)をアルゴン下で滴下した。反応混合物を室温にまで加温して、30分後にメタノール(0.1mL)を添加した。反応混合物を酢酸エチル(およそ150mL)で希釈して、5%NaHCO₃水(3×50mL)、および塩水(50mL)で洗浄した。有機層を分離して、Na₂SO₄で乾燥させて、油状物質にまで濃縮した。粗製生成物を、酢酸エチル/ヘキサン/トリエチルアミン(80:20:2)で充填して、かつ0~20%の酢酸エチル/トリエチルアミン(100:2)中のアセトニトリルのステップ勾配で溶出させるシリカゲルカラム(4×20cm)上でクロマトグラフィーに付した。純粋な分画をプールして、真空下で濃縮して、オフホワイト色の泡状物質(1.42g、71%)を得た。³¹P NMR(DMSO-d₆): 147.55、147.15、-12.51。

【0320】

【化 5 2】



【 0 3 2 1】

実施例 4 . P N A - T^{B P} モノマーの合成

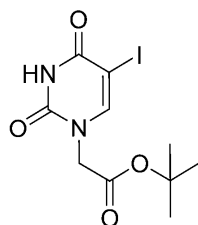
実施例 4 は、P N A モノマー骨格に連結された T^{B P} 部分を含む修飾チミン P N A モノマーの保護形態である M 1 9 を調製するための合成手順について記載する。モノマーは、
 , - ジメチル - o - ベンジレン保護基で保護されているリン酸部分を含む。

30

【 0 3 2 2】

【化 5 3】

化合物 M15.



40

【 0 3 2 3】

5 - ヨードウラシル (7 . 4 0 g、3 1 m m o l、1 e q) を、アルゴン下で無水 D M F 1 0 0 m L 中に溶解して、固体 K₂ C O₃ (4 . 7 3 g、3 4 . 2 m m o l、1 . 1 e q) を添加した。溶液を 0 に冷却して、プロモ酢酸 t - ブチル (4 . 5 9 m L、3 1 m m o l) を 5 分かけて滴下した。0 で 5 分間攪拌した後、反応混合物を室温で 2 4 時間進行させた。形成した沈殿物を濾過により除去して、D M F で洗浄して、濾液を蒸発させた。残渣を、酢酸エチル 3 0 0 m L と水 1 5 0 m L との間で分配させて、有機層を分離して、水 (3 × 1 0 0 m L) で洗浄して、Na₂ S O₄ で乾燥させた。濾過による乾燥剤の除去後、溶液を蒸発させて、生成物 9 . 4 3 g (8 6 %) を得て、それは、さらなる精製なしで、次工程で利用した。 ¹ H N M R (D M S O - d₆) : 1 . 4 2 (s , 9 H

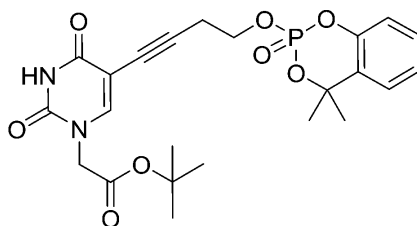
50

)、4.39 (s, 2H)、8.20 (s, 1H)、11.76 (s, 1H)。LC/MS m/z 353.1 ($M+H^+$)。

【0324】

【化54】

化合物M16.



10

【0325】

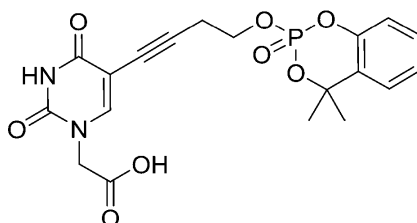
化合物M15 (上記を参照、6.45 g、18.3 mmol) および化合物M12 (上記を参照、4.88 g、18.3 mmol) を、磁気攪拌子を備えた丸底フラスコ中で、アルゴン下で無水DMSO 75 mL中に溶解して、 $Pd(PPh_3)_4$ (2.12 g、1.8 mmol)、ヨウ化銅(I) (349 mg、1.8 mmol) およびトリエチルアミン (12.75 mL、91.5 mmol) を添加した。溶液を65 に加熱して、65 で12時間攪拌して、続いて外気温で一晩攪拌させた。TLCにより不完全な変換が示され、CuI (349 mg、1.8 mmol) を添加して、混合物を65 へ3時間加熱した。反応混合物をジクロロメタン (400 mL) で希釈して、水 (400 mL)、0.1 M Na_2EDTA (2×250 mL)、水 (250 mL)、および塩水 (250 mL) で洗浄した。有機層を分離して、 Na_2SO_4 で乾燥させて、濾過して、油状物質にまで濃縮した。反応生成物を、1~4%のジクロロメタン中のメタノールのステップ勾配で溶出させるシリカゲルカラム (7×18 cm) 上でのフラッシュクロマトグラフィーにより単離して、3.62 g (40%) を得た。 1H NMR (DMSO- d_6) : 1.40 (s, 9H)、1.73 (s, 3H)、1.79 (s, 3H)、2.76 (t, 2H)、4.14 (m, 2H)、4.40 (s, 2H)、7.14~7.42 (m, 4H)、7.91 (s, 1H)、11.69 (s, 1H)。

20

【0326】

【化55】

化合物M17.



30

【0327】

t-ブチルエステルM16 (上記を参照、3.59 g、7.3 mmol) を、ジクロロメタン 20 mL中に溶解して、溶液を0 に冷却した。溶液に、TFA (20 mL) を1分かけて1.5 mLずつ添加した。反応を0 で20分間進行させて、続いて反応混合物を徐々に外気温まで加温した。外気温で90分後に、加水分解は、TLCにより完了していた。混合物を真空中で蒸発させて、残渣をアセトニトリル中に溶解して、溶液を3回蒸発させることにより、残留TFAを除去した。反応生成物は、1~2%のアセトニトリル中の水のステップ勾配で溶出させるシリカゲルカラム (5×18 cm) 上でのフラッシュクロマトグラフィーにより単離して、2.49 g (78%) を得た。 1H NMR (DMSO- d_6) : 1.72 (s, 3H)、1.78 (s, 3H)、2.75 (t, 2H)、4.12 (m, 2H)、4.60 (s, 2H)、7.13~7.42 (m, 4H)、

40

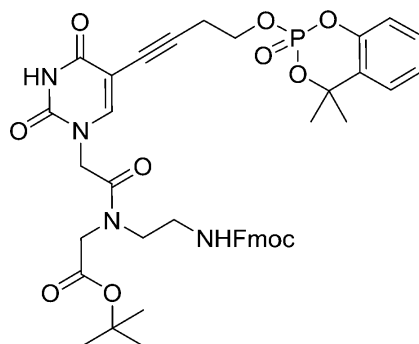
50

7.91 (s, 1H)、11.68 (s, 1H)。

【0328】

【化56】

化合物 M18.



10

【0329】

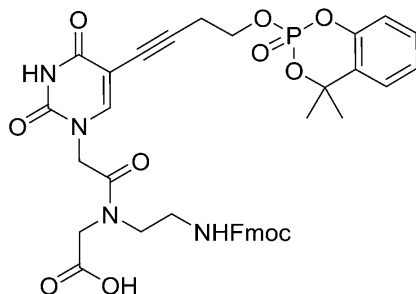
化合物 M17 (上記を参照、1.53 g、3.5 mmol) および Fmoc-Boc-エチレンジアミン (1.40 g、3.5 mmol) を、アルゴン下で無水 DMF 40 mL 中に溶解して、得られた溶液を 0 に冷却した。DIEA (1.40 mL、8 mmol) を、続いて HATU (1.61 g、3.8 mmol) を添加して、0 で 10 分間攪拌した後、混合物を外気温まで加温して、外気温で一晩攪拌した。反応混合物をジクロロメタン (200 mL) で希釈して、1 M HCl (200 mL)、水 (2 × 150 mL)、および塩水 (150 mL) で洗浄した。有機層を分離して、Na₂SO₄ で乾燥させて、濾過して、油状物質にまで濃縮した。反応生成物を、1~3% のジクロロメタン中のメタノールのステップ勾配で溶出させるシリカゲルカラム (5 × 18 cm) 上でのフラッシュクロマトグラフィーにより単離して、化合物 M18 2.09 g (73%) を得た。¹H NMR (DMSO-d₆): 1.41 (s, 9H)、1.71 (s, 3H)、1.77 (s, 3H)、2.69 (m, 2H)、3.05~3.41 (m, 4H)、3.95 (s, 1H)、4.07~4.35 (m, 5H)、4.71 (s, 1H)、7.12~7.43 (m, 8H)、7.66~7.96 (m, 5H)、11.69 (s, 1H)。

20

【0330】

【化57】

化合物 M19.



40

【0331】

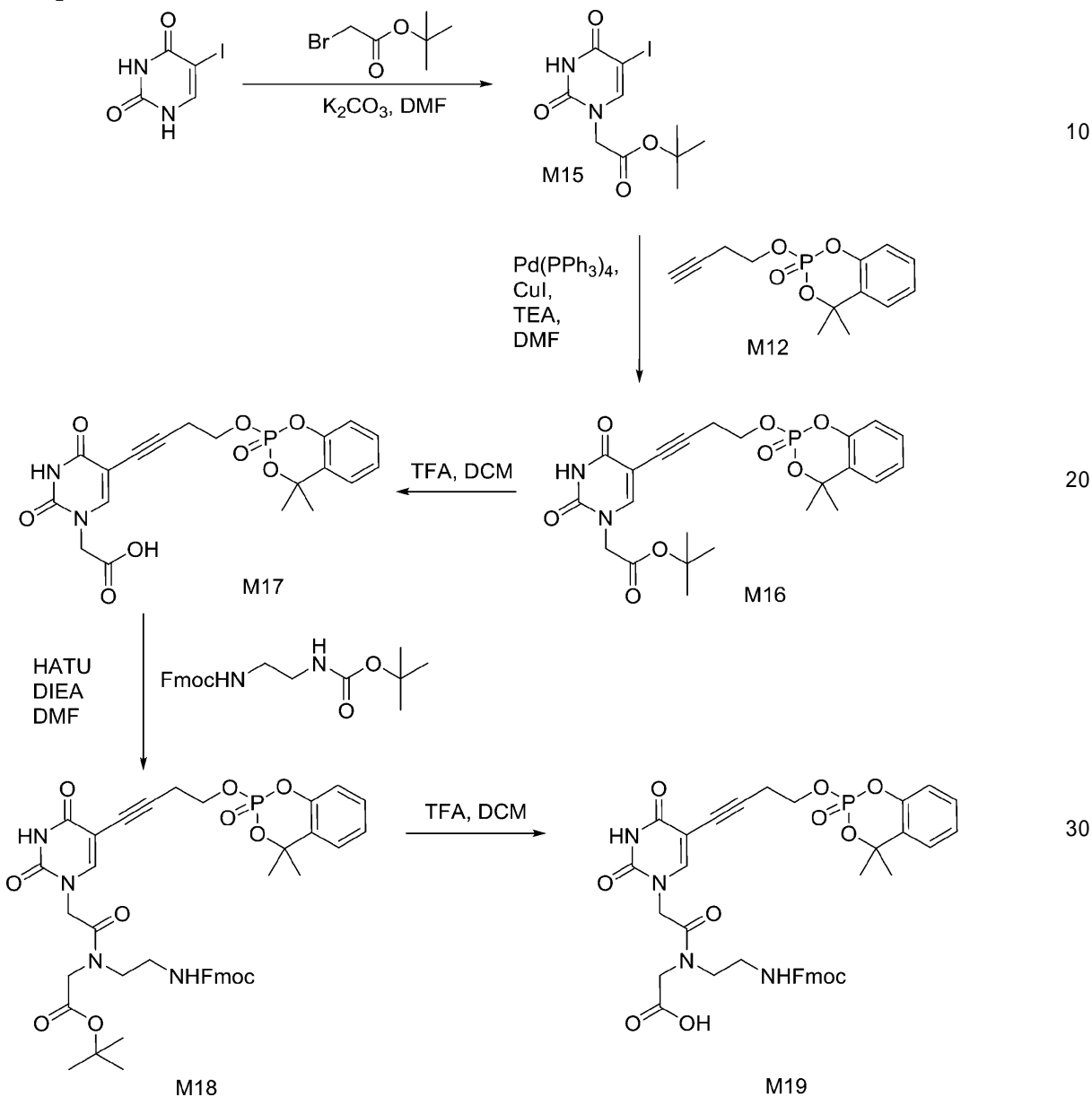
化合物 M18 (上記を参照、2.07 g、2.5 mmol) を、ジクロロメタン 20 mL 中に溶解して、溶液を 0 に冷却した。溶液に、TFA (20 mL) を 10 分かけて少しずつ添加した。反応を外気温まで加温した。外気温で 90 分後に、加水分解は、TLC により完了していた。混合物を真空下で蒸発させて、残渣は、ジクロロメタンを用いて蒸発させて、真空下で乾燥させた。反応生成物は、2~8% のジクロロメタン中のメタノールのステップ勾配で溶出させるシリカゲルカラム (3.5 × 18 cm) 上でのフラッシュクロマトグラフィーにより単離して、1.48 g (77%) を得た。¹H NMR (DMSO-d₆): 1.72 (s, 3H)、1.78 (s, 3H)、2.72 (t, 2H

50

)、3.25～3.41 (m, 4H)、4.00 (s, 1H)、4.07～4.35 (m, 5H)、4.73 (s, 1H)、7.13～7.20 (m, 2H)、7.31～7.43 (m, 7H)、7.64～7.74 (m, 3H)、7.88～7.90 (m, 2H)、11.63 (m, 1H)、12.75 (br s, 1H)。

【0332】

【化58】



【0333】

実施例5．オリゴマー合成における $T^B P$ ホスホルアミダイトの性能
合成

実施例5では、2つの異なる位置に単一の $T^B P$ 部分を含有するオリゴマーのいずれか（オリゴマーT1およびT2）、または両方の位置に2つの $T^B P$ 部分を含有するオリゴマー（オリゴマーT1-2）を、増加アセトニトリル濃度の勾配を用いた逆相HPLCに付した。図1Aにおけるクロマトグラムは、DMT5'-リン酸保護基がオリゴマー中で修飾塩基から除去されていない場合、オリゴマーは一緒に密接に溶出したことを示す。対比して、図1Bにおけるクロマトグラムは、DMT基が全て除去された後、2つの $T^B P$ 部分を有するオリゴマー（T1-2）は、単一の $T^B P$ 部分を含むオリゴマー（T1およびT2）よりも迅速に溶出したことを示す。これらの結果により、 $T^B P$ 部分は、DNAオリゴマーの親水性、したがって水溶解度を有意に改善させることができることが示され

40

50

る。

【0334】

1つまたは複数の $T^{B\ P}$ 修飾塩基を含むオリゴマーは、ABI 394 DNA合成機 (Applied Biosystems) で合成した。標準的なオリゴホスホルアミダイト合成サイクルを使用した。ポリヌクレオチドオリゴマーは、アセトニトリル/0.1 M重炭酸トリエチルアンモニウム、pH7の線形勾配: DMT-onのポリヌクレオチドオリゴマーに関しては20分かけて16~23%アセトニトリル、およびDMT基を除去したポリヌクレオチドオリゴマー (DMT-off) に関しては7~14%アセトニトリルで溶出させるC18 Geminiカラム (4.6 mm x 250 mm、5 μ m、Phenomenex) 上での逆相HPLC (RP HPLC) を使用して分析した。オリゴマーは、下記配列を有していた:

T1 TTT AGA C($T^{B\ P}$)T CTT GGA TTT (配列番号1)

T2 TTT AGA CTT CT($T^{B\ P}$) GGA TTT (配列番号2)

T1-2 TTT AGA C($T^{B\ P}$)T CT($T^{B\ P}$) GGA TTT (配列番号3)

【0335】

オリゴ合成後のオリゴヌクレオチドの粗製混合物に関するRP HPLCデータは、ジメトキシトリチル (DMT) 保護基onを用いた場合には図1Aに、また酢酸による処理によりDMT保護基が除去された場合には図1Bに示される。図1Bからわかるように、2つの $T^{B\ P}$ 部分を有するT1-2オリゴマーは、HPLCにより分離される3つのオリゴマーのうちで最も親水性である。

【0336】

実施例6. 4つの $T^{B\ P}$ 置換を含む修飾ポリヌクレオチドオリゴマーのハイブリダイゼーション

実施例6は、それぞれが相補的な12量体DNAオリゴマーにハイブリダイズした場合に、4つの $T^{B\ P}$ 部分 (脱保護されたリン酸基を伴う) を含む18量体DNAオリゴマーの親和性を、従来のA、C、GおよびTヌクレオチドのみを含む相当する18量体DNAオリゴマーのハイブリダイゼーション親和性と比較した実験について記載する。図2における融解曲線により示されるように、本発明の4つの $T^{B\ P}$ 部分を含む18量体オリゴマーは、未修飾18量体の T_m よりも約10 高い T_m (融解温度) を有することが観察された。

【0337】

4つの $T^{B\ P}$ 置換を含む本発明の例示的なポリヌクレオチドオリゴマーのハイブリダイゼーション結合親和性を、下記配列を有する相補的なDNA鎖を使用して評価した:

O4 5' TTT AGA C($T^{B\ P}$)($T^{B\ P}$)C($T^{B\ P}$)($T^{B\ P}$)GGA TTT - 3' (配列番号4)

OC 5' - TCC AAG AAG TCT - 3' (配列番号5)

その3' 5'方向では、OCは、3' - TCTGAAGAACCT - 5' (O4に対して相補性を示す) を読み取る。

【0338】

比較の目的で、無置換鎖 (一般的なDNA) のハイブリダイゼーションもまた評価した。

OO 5' - TTT AGA CTT CTT GGA TTT - 3' (配列番号6)

【0339】

ハイブリダイゼーション融解データが図2に示され、ここでは無置換オリゴマーに関して観察された融解曲線は「未修飾」と称され、 $T^{B\ P}$ 含有オリゴマーに関して観察された融解曲線は「 $T^{B\ P}$ 」と称される。図2に示されるように、 $T^{B\ P}$ 含有オリゴマーは、無

置換オリゴマーと比較して、優れたハイブリダイゼーション親和性を示す。約 10 の T_m のシフトが観察された。

【0340】

実施例 7 . 5'ヌクレアーゼ PCR プローブの性能

実施例 7 では、本発明の 0、1、2、3、4、5 または 6 つの修飾 (T^{BP}) 塩基を含む切断可能な蛍光プローブを使用して、5' - ヌクレアーゼ PCR 反応を実施した。図 3 A および図 3 B に示される PCR プロフィールにより、 T^{BP} 部分を含む修飾ポリヌクレオチドオリゴマーが全て、検出プローブとして効率的に作用したことが実証される。さらに、 T^{BP} 部分を含む修飾ポリヌクレオチドオリゴマーは、未修飾オリゴマーよりも相補的なオリゴマー配列に対して、より大きな親和性を有し、より高い PCR 伸長温度およびより短い PCR サイクル回数を可能にする。

【0341】

1 ~ 6 つの T^{BP} 修飾塩基を含む 5'ヌクレアーゼ PCR プローブの性能を評価した。一貫性のために、これらのプローブは全て、5' - 末端 FAM 部分および 3' - BHQ (商標) 消光剤部分を含有していた。ヒトゲノム DNA ベータ - グロブリンハウスキーピング配列を PCR 鋳型として使用した。PCR は、Stratagene Mx3005P (商標) 機器で実施し、反応はそれぞれ、三重反復で試験した。下記の PCR 濃度および PCR サイクルを使用した：

初期アンプリコン長 - 96 bp、10,000 個のコピー / 反応、

プライマー濃度 - 200 nM、

プローブ濃度 - 200 nM、

PCR サイクル (68 で 30 秒のアニーリング / 伸長、95 で 8 秒の変性)

【0342】

オリゴマーおよび修飾ポリヌクレオチドオリゴマープローブは、下記配列を有していた：

【0343】

【表 1】

表 1

名称	5'	配列	3'	配列番号
Pfl	FAM	5'-CTC CGT GGC CTT AGC TGT GCT C-3'	BHQ1	7
Pfl-T-1	FAM	5'-C(T^{BP})C CGT GGC CTT AGC TGT GCT C-3'	BHQ1	8
Pfl-T-2	FAM	5'-CTC CG(T^{BP}) GGC CTT AGC TGT GCT C-3'	BHQ1	9
Pfl-T-3	FAM	5'-CTC CGT GGC C(T^{BP})T AGC TGT GCT C-3'	BHQ1	10
Pfl-T-4	FAM	5'-C(T^{BP})C CG(T^{BP}) GGC CTT AGC TGT GCT C-3'	BHQ1	11
Pfl-T-5	FAM	5'-C(T^{BP})C CG(T^{BP}) GGC C(T^{BP})T AGC TGT GCT C-3'	BHQ1	12
Pfl-T-6	FAM	5'-CTC CGT GGC CT(T^{BP}) AGC (T^{BP})G(T^{BP}) GC(T^{BP}) C-3'	BHQ1	13
Pfl-T-7	FAM	5'-C(T^{BP})C CGT GGC CT(T^{BP}) AGC (T^{BP})G(T^{BP}) GC(T^{BP}) C-3'	BHQ1	14
Pfl-T-8	FAM	5'-C(T^{BP})C CG(T^{BP}) GGC CT(T^{BP}) AGC (T^{BP})G(T^{BP}) GC(T^{BP}) C-3'	BHQ1	15

【0344】

得られた PCR データを図 3 A および図 3 B に示す。データにより実証されるように、5'ヌクレアーゼ PCR プローブにおける T^{BP} 部分の存在は、PCR と完全に適合する。かかるプローブにおいて T^{BP} 部分を含むことにより、プローブ中の任意の位置または多重位置で含まれる場合に、相補的な塩基配列に対するハイブリダイゼーション親和性が増大した。

【0345】

実施例 8 . PCR プライマーにおける T^{BP} 部分

実施例 8 は、切断可能な蛍光プローブならびに T^{B^P} 部分を含有しない（プライマー P2F および P2R）か、または 3 つの異なる位置のうちの 1 つに単一の T^{B^P} 部分を含有する（P1F、P1R、および P1-1R）フォワードおよびリバースプライマーの種々の対での組合せを使用して、5'-ヌクレアーゼ PCR 反応を実施した実験について記載する。得られた PCR プロフィールを図 4 に示す。 T^{B^P} 部分を含むプライマーは全て、5'-ヌクレアーゼ PCR における DNA ポリメラーゼの基質として効率的に作用した。

【0346】

T^{B^P} 置換を有する修飾ポリヌクレオチドオリゴマーを、PCR プライマーとして評価した。3' 末端付近の、中央における、および 5' 末端付近の単一の T^{B^P} 置換を有するプライマーを合成および評価した。下記 PCR 条件を使用した：プライマーおよびプローブの濃度 200 nM；PCR 緩衝液、0.3% Tween 20；10,000 個のコピー / HG DNA の反応；95 で 60 秒、続く 55 回の PCR サイクル（60 で 30 秒、72 で 10 秒；95 で 8 秒）。

P1F 5' - ATTCCTGAAGCTGACAGCA (T^{B^P}) T - 3' (配列番号 16)

P1R 5' - AAA TAGCC (T^{B^P}) CCAGGCA - 3' (配列番号 17)

P1-1R 5' - AAA (T^{B^P}) AGCCTCCAGG CA - 3' (配列番号 18)

P2F 5' - AATTCCTGAAGCTGACAGCA - 3' (配列番号 19)

P2R 5' - AAA TAGCCTCCAGGCCA - 3' (配列番号 20)

Probe 5' - FAM - CCACGGAGCGAGACA (T^{B^P}) C (T^{B^P}) CGGC - BHQ1 - 3' (配列番号 21)

【0347】

上記フォワードおよびリバースプライマーおよびプローブの様々な組合せを用いた 6 つの PCR 反応混合物を試験した。結果を図 4 に表す。図 4 は、上述の T^{B^P} 修飾プライマーおよびプローブセットの性能を実証している。

【0348】

実施例 9 . T^{B^P} 部分を含む修飾 PNA オリゴマーの合成

実施例 9 は、3 つの 9 量体 PNA オリゴマーが従来の固相 PNA 合成により調製された合成プロトコールを提供する。

【0349】

Applied Biosystems からの Fmoc - PAL - PEG - PS 樹脂 (0.16 mmol / g) を使用して、修飾 PNA オリゴマー合成を手動で実施した。Fmoc 保護されたモノマーおよび HATU は、PolyOrg, Inc. から入手し、溶媒は、EMD から入手した。ピペリジン、TFA、DIEA および m - クレゾールは、Aldrich から入手した。樹脂は、使用前に少なくとも 2 時間、DCM 中で膨潤させ、続いて DCM (5x) および DMF (5x) で洗浄した。

合成プロトコール：

脱保護：DMF 中で 20% ピペリジン、2x 5 分

洗浄：DMF (5x)、DMF / DCM (1:1) (5x)

事前活性化：HATU (4 eq)、DIEA (4.5 eq)、PNA モノマー (1 eq)、DMF、3 分

カップリング：30 分

洗浄：DMF / DCM (1:1) (5x)

キャッピング：5% Ac₂O / 5% DIEA、10 分

洗浄：DMF (5x)

【0350】

TFA / m - クレゾール (9:1) を用いて、室温で 90 分間、固体支持体からの切断

を実施した後、 Et_2O 中に沈殿させた。固体を遠心分離により収集して、 Et_2O 洗浄／遠心分離を二回繰り返した。逆相HPLCによる精製後、ESI(+)質量分析により、PNAについて特性決定した。

【0351】

実施例10．PNA-DNAキメラの合成

実施例10は、PNA-DNAキメラオリゴマーを公知の方法により作製することができる一般的な方法を提供し、ここで、本発明の修飾塩基を含むPNAモノマーは、ヌクレオシドホスホルアミダイトを用いて、または修飾PNAモノマーとして組み込まれる。

【0352】

PNAオリゴマーおよびDNA-PNAキメラは、これまでに報告されているように(Petraccone et al., J. Am. Chem. Soc., 2005, 16125-16223)、Fmoc保護されたPNAモノマーおよびヌクレオシドホスホルアミダイトを使用した固相ストラテジーによって合成される。N-Fmocグリシンで官能基化されたTentagel-OH樹脂を、第1のPNA単位と反応させた後、5'-O-DMT-3'-O-(2-シアノエチル)ホスホルアミダイトグアノシン、チミジン、アデノシンおよびシチジン単位と反応させて、キメラを得る。キメラは、55℃で12~16時間、濃アンモニア水で、固体支持体から脱離されて、脱保護した。溶液を蒸発させて、アンモニアを除去して、生成物を分取用逆相HPLCによって単離する。

【0353】

実施例11．DNAとの $T^B P$ 修飾PNAのハイブリダイゼーション

実施例11は、実施例9のプロトコールにより作製され、かつ各オリゴマーにおける4番目および／または7番目の位置に1つ(PNA-T1およびPNA-T2)または2つ(PNA-T3)の $T^B P$ 部分を含むPNAオリゴマーに関して、融解温度を決定した実験について記載する。実施例11の表2に示すように、3つの $T^B P$ 含有PNAオリゴマーは全て、相補的な標的DNAオリゴマーとともに形成されるハイブリダイゼーション二重鎖に関して測定された、対照DNAオリゴマーに関して観察される T_m 値よりも高い T_m 値、したがってより高い結合親和性を有した。 T_m データはまた、2つの介在する標準的なPNAモノマーにより分離される2つの修飾塩基を含むPNAオリゴマーが、単一の $T^B P$ 部分のみを含む2つのオリゴマーよりもわずかに低い T_m 値を有するようである(しかし、相当するDNA-DNA二重鎖の T_m を十分に上回る)ことを示す。したがって、幾つかのオリゴマー構築物を作製および評価して、特定の用途にとって最良である $T^B P$ 部分の数および位置を決定することは、有益であり得る。

【0354】

1つまたは2つの $T^B P$ 部分を有するPNAオリゴマーを調製して、以下の表2に概要するように、相補的な標的DNAに対するハイブリダイゼーション親和性に関して、それらの融解温度(T_m)を決定した。PNAオリゴマーと同じ配列を有する相当する未修飾対照DNAの T_m もまた、標的DNAとハイブリダイズした際に決定した。 T_m データは、標準的な融解条件(各オリゴに関して1 μM 、3 mM MgCl_2 、15 mM KCl 、25 mM HEPES 、pH 8)を使用して得られた。下記表2は、オリゴマー配列および観察された T_m 値を列挙する。

【0355】

【表 2】
表 2

識別子	配列	T _m , °C	配列番号
PNA-T1	5'-CGA(T ^{BP})ACTGC-3'	46.7	22
PNA-T2	5'-CGATAC(T ^{BP})GC-3'	47.8	23
PNA-T3	5'-CGA(T ^{BP})AC(T ^{BP})GC-3'	46.0	24
対照 DNA	5'-CGATACTGC-3'	38.4	25
標的 DNA	5'-TTTGCAGTATCGTTT-3'		26

10

【0356】

表 2 からわかるように、PNA オリゴマー PNA - T1 および PNA - T2 は、T^{BP} 部分を含むしない対照 DNA オリゴマーよりも高い融解温度、したがってハイブリダイゼーション時に相補的な配列に対してより強力な結合親和性を示した。

【0357】

実施例 12 . T^{BP} 修飾 PNA オリゴマーの HPLC

実施例 12 は、実施例 11 由来の PNA オリゴマーを、増加アセトニトリル濃度の勾配を用いた逆相 HPLC に付した実験について記載する。図 5 中のクロマトグラムは、2 つの T^{BP} 修飾塩基を含む PNA オリゴマー (PNA - T3) が、単一の T^{BP} 部分を含むオリゴマー (PNA - T1 および PNA - T2) よりも実質的に早く溶出し、単一の T^{BP} 部分を含むオリゴマー (PNA - T1 および PNA - T2) は、未修飾 PNA オリゴマーよりも早く溶出したことを示す。これらの結果により、T^{BP} 部分が、PNA オリゴマーの親水性、したがって水溶解度を有意に改善させることができることが示される。

20

【0358】

実施例 11 由来の T^{BP} 修飾 PNA オリゴマーを、RP HPLC (Gemini C18 カラム、4.6 × 25 mm、TEA 重炭酸緩衝液 (pH 7.5) 中で 5% ~ 15% のアセトニトリルの線形勾配で 40 分間) で分析した。図 5 における重ね合わせたクロマトグラムにより示されるように、T^{BP} 修飾 PNA 配列は、未修飾 PNA の保持時間と比較して、より少ない保持時間を有し、それにより、T^{BP} 修飾が、PNA オリゴマーの親水性 (したがって、水溶解度) を増大させることが実証される。

30

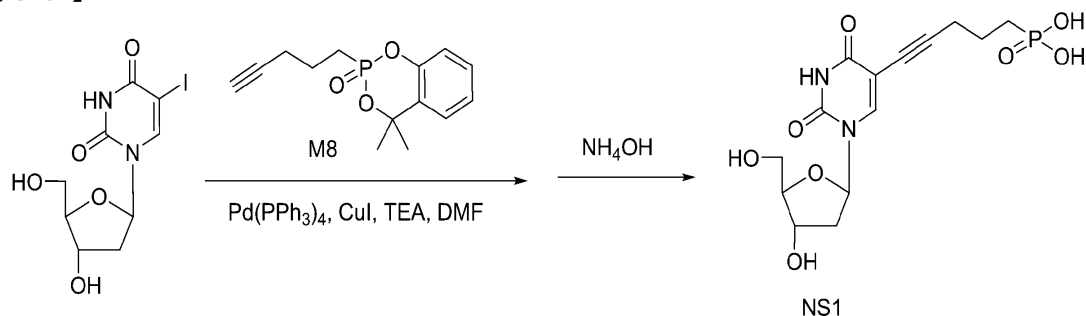
【0359】

実施例 13 . ヌクレオシドの合成に関する一般的な方法

化合物 NS1 は、ホスホン酸部分を含む修飾塩基を含む修飾ヌクレオシドを示す。化合物 NS1 は、化合物 M9 (上記を参照) に類似して、5 - ヨード - 2' - デオキシウリジンおよび化合物 M8 から出発して、Pd(PPh₃)₄ およびヨウ化銅 (I) を触媒とするカップリング、続く 25% アンモニア水による保護基の除去によって調製される。

【0360】

【化 59】



40

【0361】

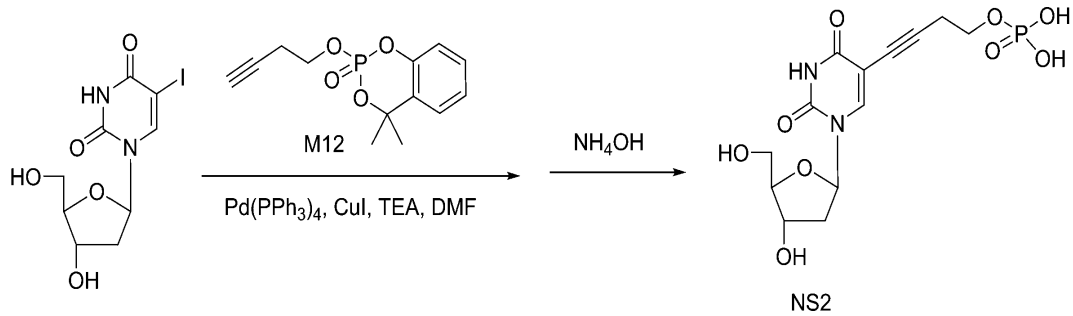
化合物 NS2 は、リン酸部分を含む修飾塩基を含む修飾ヌクレオシドを示す。化合物 NS2 は、化合物 M13 (上記を参照) に類似して、5 - ヨード - 2' - デオキシウリジンおよび化合物 M12 (上記を参照) から出発して、Pd(PPh₃)₄ およびヨウ化銅 (

50

I) を触媒とするカップリング、続く 25% アンモニア水による保護基の除去によって調製される。

【0362】

【化60】



10

【0363】

実施例14.ヌクレオチド-5'-三リン酸の合成に関する一般的な方法

修飾ヌクレオチド三リン酸NT1およびNT2は、相当する5'-DMTr誘導体M13およびM9(上記を参照)から、3'-ヒドロキシ基のアセチル化、続く5'-DMTr基の除去およびHollenstein M., "Synthesis of Deoxynucleoside Triphosphates that Include Proline, Urea, or Sulfonamide Groups and Their Polymerase Incorporation into DNA," Chem. Eur. J. 2012, 18, 13320-13330により記載されるプロトコルを使用した相当する三リン酸への変換により合成された。

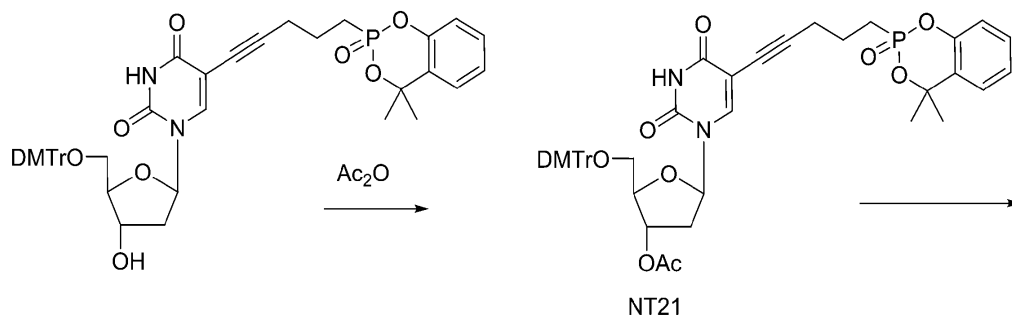
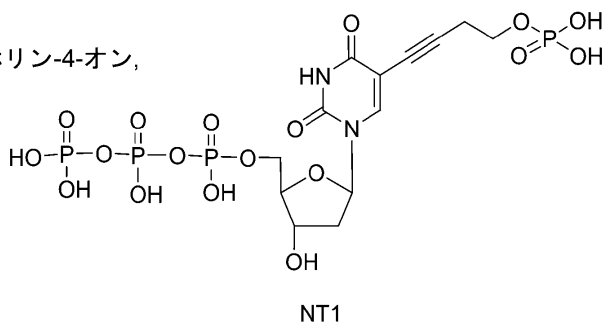
20

【0364】

Chemical reaction scheme showing the conversion of a nucleoside derivative to NT1-1. The starting material is a nucleoside with a 3'-OH group and a 5'-DMTr (4,4-dimethoxy-1,2,3,5-tetrahydro-2H-pyran-2-yl) protecting group. The nucleoside is linked via an alkyne to a benzylidene-protected phosphate group. The reaction uses Ac_2O (acetic anhydride) to convert the 3'-OH to a 3'-OAc (acetate) group, resulting in the product NT1-1.


1. DCAA (1%), CH₂Cl₂
2. 2-クロロ-1,3,2-ベンゾジオキサホスホリン-4-オン,
Py, ジオキサン
3. (nBu₃NH)₂H₂P₂O₇, DMF, nBu₃N

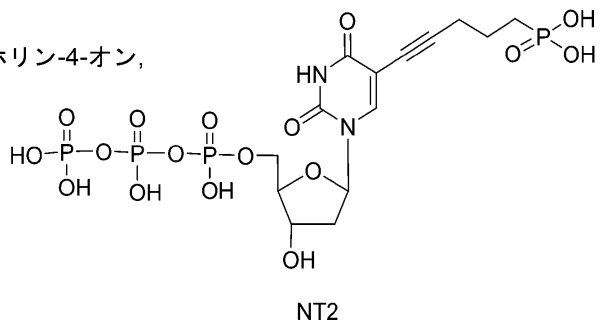
$$\xrightarrow{\begin{array}{l} 4. \text{I}_2, \text{Py}, \text{H}_2\text{O} \\ 5. \text{NH}_4\text{OH} \end{array}}$$

$$\text{HO}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{OH}}{\text{P}}}=\text{O}-\text{O}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{P}}}=\text{O}$$


1. DCAA (1%), CH₂Cl₂
2. 2-クロロ-1,3,2-ベンゾジオキサホスホリン-4-オン,
Py, ジオキサン
3. (nBu₃NH)₂H₂P₂O₇, DMF, nBu₃N

4. I₂, Py, H₂O
5. NH₄OH





実施例 15 . 配列の総合リスト

40

【 0 3 6 6 】

【表 3 - 1】

表 3. 配列の総合リスト

配列番号	名称	配列
1	T1	5'-TTT AGA C(T ^{BP})T CTT GGA TTT-3'
2	T2	5'-TTT AGA CTT CT(T ^{BP}) GGA TTT-3'
3	T1-2	5'-TTT AGA C(T ^{BP})T CT(T ^{BP}) GGA TTT-3'
4	O4	5'-TTT AGA C(T ^{BP})(T ^{BP})C(T ^{BP})(T ^{BP}) GGA TTT-3'
5	OC	5'-TCC AAG AAG TCT-3'
6	OO	5'-TTT AGA CTT CTT GGA TTT-3'
7	Pf1	5'-FAM-CTC CGT GGC CTT AGC TGT GCT C-BHQ1-3'
8	Pf1-T-1	5'-FAM-C(T ^{BP})C CGT GGC CTT AGC TGT GCT C-BHQ1-3'
9	Pf1-T-2	5'-FAM-CTC CG(T ^{BP}) GGC CTT AGC TGT GCT C-BHQ1-3'
10	Pf1-T-3	5'-FAM-CTC CGT GGC C(T ^{BP})T AGC TGT GCT C-BHQ1-3'
11	Pf1-T-4	5'-FAM-C(T ^{BP})C CG(T ^{BP}) GGC CTT AGC TGT GCT C-BHQ1-3'
12	Pf1-T-5	5'-FAM-C(T ^{BP})C CG(T ^{BP}) GGC C(T ^{BP})T AGC TGT GCT C-BHQ1-3'
13	Pf1-T-6	5'-FAM-CTC CGT GGC CT(T ^{BP}) AGC (T ^{BP})G(T ^{BP})GC(T ^{BP}) C-BHQ1-3'
14	Pf1-T-7	5'-FAM-C(T ^{BP})C CGT GGC CT(T ^{BP}) AGC (T ^{BP})G(T ^{BP})GC(T ^{BP}) C-BHQ1-3'
15	Pf1-T-8	5'-FAM-C(T ^{BP})C CG(T ^{BP}) GGC CT(T ^{BP}) AGC (T ^{BP})G(T ^{BP})GC(T ^{BP}) C-BHQ1-3'
16	P1F	5'-ATTCCTGAAGCTGACAGCA(T ^{BP})T -3'
17	P1R	5'-AAATAGCC(T ^{BP})CCAGGCA-3'
18	P1-1R	5'-AAA(T ^{BP})AGCCTCCAGG CA-3'
19	プローブ	5'-FAM-CCACGGAGCGAGACA(T ^{BP})C(T ^{BP})CGGC-BHQ1-3'
20	P2F	5'-AATTCCTGAAGCTGACAGCA-3'
21	P2R	5'-AAATAGCCTCCAGGCCA-3'

10

20

30

40

【表 3 - 2】

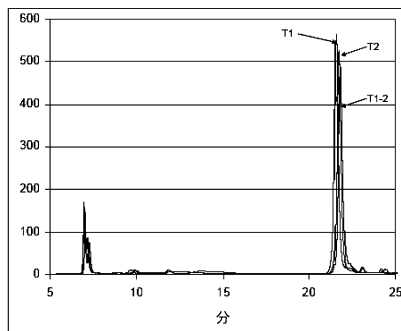
22	PNA-T1	5'-CGA (T ^{BP})AC TGC-3'
23	PNA-T2	5'-CGA TAC (T ^{BP})GC-3'
24	PNA-T3	5'-CGA(T ^{BP})AC(T ^{BP})GC-3'
25	対照 DNA	5'-CGA TAC TGC-3'
26	標的 DNA	5'-TTT GCA GTA TCG TTT-3'

【 0 3 6 8 】

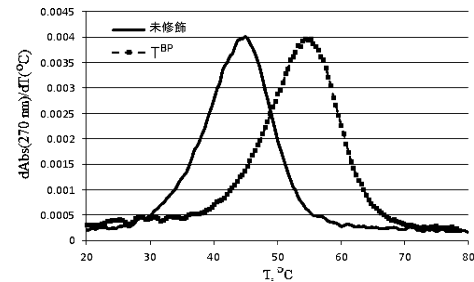
様々な実施例および他の情報を上記で提供して、特許請求の範囲内の態様を説明しているが、当業者は、これらの実施例を使用して、多種多様な実行を導き出すことが可能であるように、かかる実施例における特定の特徴または配置に基づいて、特許請求の範囲の限定を暗示すべきではない。さらに、幾つかの主題を、構造的特徴、条件または使用の実施例に特異的な言語で記載した部分もあるが、特許請求の範囲で規定される主題は、必ずしもそのように限定されるものではない。

10

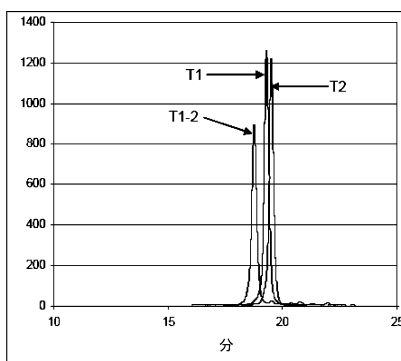
【図 1 A】



【図 2】



【図 1 B】



【図 3 A】

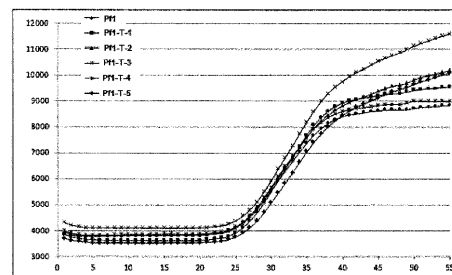


FIG. 3A

【図 3 B】

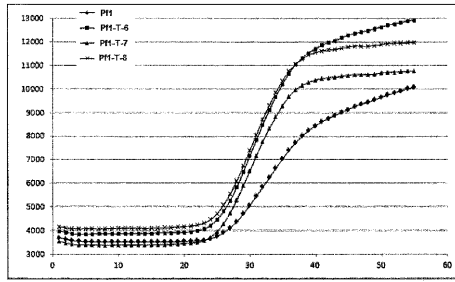


FIG. 3B

【図 4】

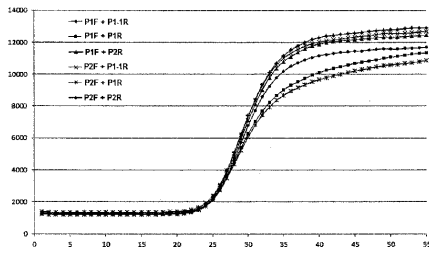
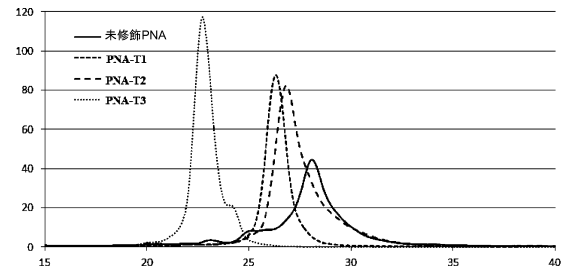


FIG. 4

【図 5】



【配列表】

0006574239000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 ギャル, アレキサンダー エー .
アメリカ合衆国, ワシントン州 98072, ウッディンビル, 170番 アベニュー ノースイ
ースト 20051
- (72)発明者 ロコフ, セルゲイ ジー .
アメリカ合衆国, ワシントン州 98012, ボセル, 175番 ストリート サウスイースト
3318
- (72)発明者 ポディミノギン, ミハイル
アメリカ合衆国, ワシントン州 98155, レイク フォレスト パーク, 44番 アベニュー
ノースイースト 20316
- (72)発明者 ヴィアゾフキナ, エカテリーナ ブイ .
アメリカ合衆国, ワシントン州 98037, リンウッド, 33番 アベニュー ウェスト 16
602
- (72)発明者 ルンド, ケビン パトリック
アメリカ合衆国, ワシントン州 98087, リンウッド, 22番 プレイス ウェスト 152
06

審査官 東 裕子

- (56)参考文献 特表2008-534609(JP, A)
米国特許出願公開第2013/0261014(US, A1)
SAQI, J., TETRAHEDRON LETTERS, Vol.34, No.13, 1993年, pp.2191-2194
HASHIMOTO, M., NUCLEIC ACIDS SYMPOSIUM SERIES, 2007年, No.51, pp.431-432

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C07HCAplus/REGISTRY(STN)