(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第6407151号
(P6407151)
(45)発行日　平成30年10月17日(2018.10.17)　(24)登録日　平成30年9月28日(2018.9.28)

(51)Int.Cl.		F I		
C07H 21/02	(2006.01)	C07H	21/02	
C12N 15/10	(2006.01)	C12N	15/10	Z
G01N 33/58	(2006.01)	G01N	33/58	A
G01N 33/50	(2006.01)	G01N	33/50	P
C12Q 1/6806	(2018.01)	C12Q	1/6806	

請求項の数 23　(全 42 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2015-524746(P2015-524746)
(86)(22)出願日　平成25年7月26日(2013.7.26)
(65)公表番号　特表2015-526076(P2015-526076A)
(43)公表日　平成27年9月10日(2015.9.10)
(86)国際出願番号　PCT/EP2013/065854
(87)国際公開番号　WO2014/019966
(87)国際公開日　平成26年2月6日(2014.2.6)
審査請求日　平成28年5月12日(2016.5.12)
(31)優先権主張番号　1257526
(32)優先日　平成24年8月2日(2012.8.2)
(33)優先権主張国　フランス(FR)

前置審査

(73)特許権者　304043936
ビオメリュー
ＢＩＯＭＥＲＩＥＵＸ
フランス国　Ｆ－６９２８０　マーシーレトワール
(74)代理人　110002077
園田・小林特許業務法人
(72)発明者　カイイ，　トマ
フランス国　エフ－１４０００　カーン，　リュ　デュ　ヴォギュー　８０
(72)発明者　ファビズ，　フレデリク
フランス国　エフ－１４９２０　マチュー，　シュマン　デュ　クロ　ドゥ　サル　１０

最終頁に続く

(54)【発明の名称】アザイサト酸無水物又はその誘導体の一つを用いた官能化の方法及びこの方法において使用される試薬、このように処置された生物学的分子及びキット

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

液体試料中に含有される、少なくとも１のリボ核酸（ＲＮＡ）分子を官能化する方法であって、

ａ）少なくとも

－アザイサト酸無水物又はその誘導体からなる一の結合分子と、

－目的の基と、

－当該結合分子を、当該目的の基と連結する一のリンケージと

を提供する工程と、

ｂ）結合分子の無水物官能基を

－ＲＮＡヌクレオチドの１個のリボースの２’位、及び／又は

－ＲＮＡの３’末端のヌクレオチドのリボースの２’及び／又は３’位

に位置する少なくとも１個のヒドロキシル基と反応させる工程と、

ｃ）リンケージによってＲＮＡを目的の基と連結するアザアントラニレートを得る工程と

を含む方法。

【請求項２】

官能化は、液体試料中に含まれる少なくとも一のリボ核酸（ＲＮＡ）分子を標識するためであり、前記結合分子は内部蛍光を有するアザイサト酸無水物又はその誘導体からなり、及び前記目的の基は結合分子により発せられるシグナルとは異なる内部蛍光シグナルを

有するか、又は内部蛍光シグナルを有さない、請求項１に記載の方法。

【請求項３】

官能化は、少なくとも一のリボ核酸（ＲＮＡ）分子を、リガンド－抗リガンドの間の反応を介して捕捉又は分離するためであり、前記目的の基は抗リガンドに相補的なリガンドを含む、請求項１に記載の方法。

【請求項４】

液体試料はＤＮＡ及びＲＮＡを含有し、官能化は、ＲＮＡ分子を捕捉又は分離して捕捉又は分離されたＲＮＡ分子を貯蔵又は廃棄し、ＤＮＡ濃縮試料の残りを使用するためである、請求項３に記載の方法。

【請求項５】

リンケージは、目的の基と結合する前に結合分子に結合する、請求項１から４の何れか一項に記載の方法。

【請求項６】

リンケージは、目的の基と結合した後に結合分子に結合する、請求項１から４の何れか一項に記載の方法。

【請求項７】

工程ｂ）は、工程ａ）の前に実行される、請求項５又は６に記載の方法。

【請求項８】

請求項３若しくは４に記載の方法、又は請求項３若しくは４に従属する場合の請求項５から７の何れか一項に記載の方法であって、官能化は、少なくとも一のリボ核酸（ＲＮＡ）分子の選択的捕捉のためであり、前記結合分子は、

－ＲＮＡヌクレオチドの一のリボースの２’位、及び／又は

－ＲＮＡの３’位の末端ヌクレオチドのリボースの２’位及び３’位

に位置するヒドロシキシル基のレベルで共有結合により結合される、方法。

【請求項９】

ＲＮＡ分子を、他の生物学的成分から分離する方法であって、

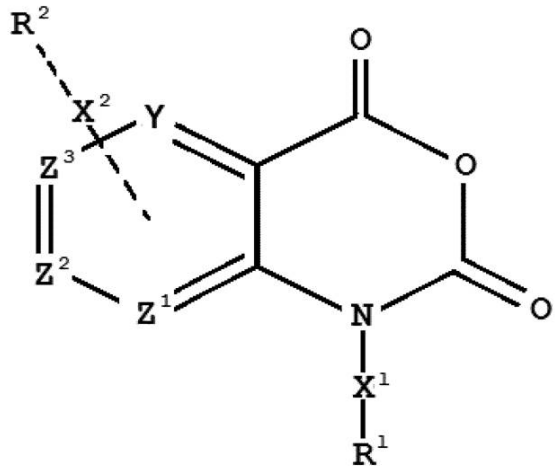
・区別されていない核酸（ＲＮＡ及びＤＮＡ）、生物学的試料の残りから容易に分離することができる少なくとも一の固体支持体と結合している目的の基を含有する生物学的試料に対して、請求項８に記載の方法を適用すること、及び

・生物学的試料の残りからＲＮＡ分子を保有する結合分子を分離すること

を含む方法。

【請求項１０】

式（Ｉ）



[ここで、

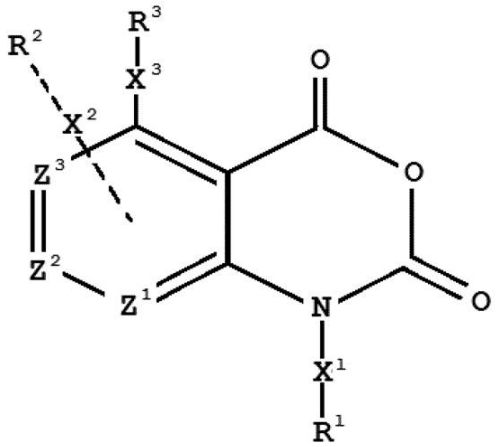
・ＹはＺ^{4}又はＣ－Ｘ^{3}－Ｒ^{3}の基を表し、

・Ｒ^{1}、Ｒ^{2}及びＲ^{3}は、互いに独立にＨ又は目的の基を表し、ラジカルＲ^{1}、Ｒ^{2}及

びＲ^{3}の少なくとも一は目的の基を表す、及び
・目的の基は、
－マーカー、標識化前駆体、又はリガンド
から選択され、
・Ｘ^{1}、Ｘ^{2}及びＸ^{3}は各々は、互いに独立に、目的の基を結合分子に連結するリンケージを表し、
・ラジカルＺ^{1}、Ｚ^{2}、Ｚ^{3}及びＺ^{4}の一つのみが窒素原子（Ｎ）を表し、及び他のラジカルは炭素原子（Ｃ）は表す]
の化合物を含む、少なくとも一のリボ核酸（ＲＮＡ）分子を官能化するための試薬。

【請求項１１】

請求項１０に記載の試薬であって、ＹはＣ－Ｘ^{3}－Ｒ^{3}の基を表し、従って前記化合物は以下の式（２）



[ここで、
－Ｒ^{1}、Ｒ^{2}及びＲ^{3}は、互い独立にＨ又は目的の基を表し、ラジカルＲ^{1}、Ｒ^{2}及びＲ^{3}の少なくとも一は目的の基を表し、及び目的の基は、マーカー、標識化前駆体、又はリガンドから選択され、
－Ｘ^{1}、Ｘ^{2}及びＸ^{3}の各々は、互いに独立に、目的の基を結合分子に連結するリンケージを表し、
－ラジカルＺ^{1}、Ｚ^{2}、及びＺ^{3}の一つのみが窒素原子（Ｎ）を表し、及び他のラジカルは炭素原子（Ｃ）を表す]
によって表される、試薬。

【請求項１２】

官能化は、ＲＮＡ分子を捕捉又は分離するためであり、前記試薬が固体支持体により固定化される、請求項１０又は１１に記載の試薬。

【請求項１３】

固体支持体は磁性又は非磁性のポリマー粒子若しくはシリカ粒子、フィルター、又は容器の内壁である、請求項１２に記載の試薬。

【請求項１４】

リンケージＸは、結合分子と目的の基を一緒に連結することを可能にする有機スペーサーである、請求項１０又は１１に記載の試薬。

【請求項１５】

有機スペーサーは、結合分子と目的の基の間の単純な共有結合、置換されていてもよい単一炭素原子、又は芳香族構造及び／又はヘテロ原子を任意で含む少なくとも２個の炭素原子の鎖である、請求項１４に記載の試薬。

【請求項１６】

ヘテロ原子は酸素、硫黄及び／又は窒素である、請求項１５に記載の試薬。

【請求項１７】
目的の基はマーカー又は標識化前駆体である、請求項１０から１６の何れか一項に記載の試薬。
【請求項１８】
目的の基はマーカーであり、前記マーカーは、結合分子により発せられるシグナルとは異なる内部蛍光シグナルを有するか、又は内部蛍光シグナルを有さない、請求項１７に記載の試薬。
【請求項１９】
少なくとも一のリボ核酸（ＲＮＡ）分子を官能化するための、請求項１０から１８の何れか一項に記載の試薬の使用。
【請求項２０】
請求項１０から１８の何れか一項に記載の試薬を含む、標的ＲＮＡ分子を検出するためのキット。
【請求項２１】
少なくとも一の標的ＲＮＡ分子を検出するための、請求項２０に記載のキットの使用。
【請求項２２】
工程ａ）とｂ）との間に、官能化される各ＲＮＡ鎖の３’位の末端一リン酸基を加水分解することからなる付加的工程を含む、請求項１から９の何れか一項に記載の官能化の方法。
【請求項２３】
以下の工程
一　請求項１から９及び２２のいずれか一項に記載の方法により官能化されたＲＮＡを得ること、及び
一　リガンド及び抗リガンド間の反応を介しＲＮＡを捕捉又は分離すること
を含む、少なくとも一のリボ核酸（ＲＮＡ）分子を捕捉又は分離するための方法であって、
前記目的の基は抗リガンドと相補するリガンドである、方法。
【発明の詳細な説明】
【発明の開示】
【０００１】
本発明は、生体分子、より正確には天然若しくは合成リボ核酸（ＲＮＡ）又は合成ＤＮＡ／ＲＮＡキメラ核酸を、特に官能化、標識、捕捉又は分離する新規な方法に関する。以下では、用語「官能化」又は関連する用語（例えば、「官能化する」）を使用するが、これらの用語は、生体分子を検出可能な分子で標識化すること、生体分子を捕捉、分離又は阻害することを可能にする付加物を付加することを同様に意味することができる。これらはまた、このように処理又は標識化した生体分子、並びに核酸の検出及び分析を用いる診断の分野、特に分子診断の分野に使用することができるキットに関する。
【０００２】
目的の基でヌクレオチド、オリゴヌクレオチド又は天然若しくは増幅技術により生成された核酸を官能化する従来技術の多くの方法が存在する。
【０００３】
第１の方法は、目的の基を塩基（それが天然であれ修飾されたものであれ）上に固定することにある。第２の方法は、目的の基を糖（ここでも、それが天然であるか修飾されたものであるかにかかわらず）上に固定することを提案している。第３の方法の目的は、目的の基をリン酸上に固定することである。
【０００４】
塩基上の目的の基は、特に、直接標識されたヌクレオチドの組み込みにより、核酸を標識化するアプローチに用いられてきた。
【０００５】
一般的に、糖のレベルでの官能化は、特異性及び感受性に影響を与える、リン酸又は塩

基上で実行されるものよりもはるかに中性である。

【０００６】

実際には、ヌクレオチドの若しくはヌクレオチドアナログの又は核酸の官能化を行う必要がある当業者は、この固定化を、塩基又は糖で行う傾向があり、大きな利便性とより多くの選択肢を提供する。これは、特に、塩基についてＥＰ－Ａ－０、０６３、８７９、ＥＰ－Ａ－０、０９７、３７３、ＥＰ－Ａ－０、３０２、１７５、ＥＰ－Ａ－０、３２９、１９８、ＥＰ－Ａ－０、５６７、８４１、ＵＳ－Ａ－５、４４９、７６７、ＵＳ－Ａ－５、３２８、８２４、ＷＯ－Ａ－９３／１６０９４又はＤＥ－Ａ－３、９１０、１５１、糖についてＥＰ－Ｂ－０、０６３、８７９又はＥＰ－Ｂ－０、２８６、８９８などの標識化を扱う多数の文献の研究から明らかになっていることである。

【０００７】

より具体的には、糖上の官能化は、しばしば、化学合成によって調製された核酸プローブの場合に使用される。しかし、リボヌクレオチド、オリゴリボヌクレオチド、天然又は転写により調製されるかどうかによらずＲＮＡ核酸、逆転写により又は酵素増幅により、少なくとも一のＲＮＡ部分及び少なくとも一のＤＮＡ部分を同時に含む核酸を無頓着に官能化するために、固定の位置のレベルに特異的であり、かつ特に、水素結合を介した二重らせんの形成に関与する塩基のハイブリダイゼーション特性に影響を及ぼさず、そしてまたＲＮＡに特異的である目的の基の必要性が存在する。

【０００８】

標識化の場合、また標的をＤＮＡチップ上で検出可能にするために、標識を前もってＤＮＡチップ上に固定することが必要である。これは、単独で核酸の存在を検出すること及び診断を確定することを可能にするので重要な工程である。そのため、標識化技術が、非常に再現性があり、堅牢かつ敏感であることが重要である。これは、化学標識化試薬の品質及び有効性に直接つながる。

【０００９】

更に、化学的な官能化のための技術において、目的の基は、核酸のハイブリダイゼーション特性に影響を及ぼしてはならない。

【００１０】

過去に、本出願人は、ジアゾ化合物を含む分子に関する一定数の特許出願を出願した：

－　２００２年５月３日に出願され、２０１０年２月１７日に付与された特許ＥＰ－Ｂ－１３８３７３２、

－　２００５年３月２４日に出願された出願ＥＰ０５／７３９６６０．８、

－　２００８年６月９日に出願された出願ＥＰ０８／８０５９６１．３、

－　２００８年６月２９日に出願された出願ＦＲ０８／５５１９０。

【００１１】

情報について、ジアゾ機能に基づいた目的の基は、ＲＮＡに化学特異的でも特定の位置に位置特異的でもない。したがってそれらは、ＤＮＡ又はＲＮＡを区別することなく官能化する。更に、ジアゾ官能基は、例えば、Ｃｙ５などの特定のシアニンとのコンジュゲーションと調和させることが困難である。

【００１２】

今や、標識化のために、官能化のメカニズムにおいてより特異的とすることができることが重要である：

Ａ）ｍＲＮＡ発現のレベルを測定するＤＮＡチップの場合、ＲＮＡのみを標識しなければならない。さて、複合生体試料では、ＤＮＡ及びｍＲＮＡが存在し得るので、同時に標識され得る。ＲＮＡに化学特異的でないマーカーを用いると、これはハイブリダイゼーション中に、バックグラウンドノイズの増加をもたらす可能性がある。

Ｂ）一般的には大過剰に使用されるマーカーは、標識された核酸をチップ上に固定化されたプローブと接触させる前に破壊又は除去する必要がある。実は、それ以外の場合は、解釈するのが不可能であるような結果をもたらし得るプローブの標識化の危険性が存在し得る。したがって、ＲＮＡ特異的マーカーを所有することは、過剰の非加水分解性マーカー

に起因してプローブを標識するこの問題を回避することを可能にするであろう。
Ｃ）立体効果のために、内側よりもむしろ標的ＲＮＡ鎖の末端（５’又は３’）を標識することはオリゴヌクレオチドプローブと核酸からなる標的との間のハイブリダイゼーションにとってあまり破壊的でない。市販の標識化技術は、このような標識化位置特異性を可能としていない。本発明者らの知る限りでは、過ヨウ素酸塩を用いた酸化の化学技術のみがこの程度の特異性を提供するが、これらは標識化プロトコルの複雑さにひどく影響される（３～４種を超える試薬及び標識ＲＮＡを得る前の２～３回の精製）。この点については、
－Ru-Qiang LiangのNucleic Acids Research, 2005, Vol. 33, No. 2 e17による「An oligonucleotide microarray for microRNA expression analysis based on labeling RNA with quantum dot and nanogold probe）」、又は
－Dmitri Proudnikovによる「Chemical methods of DNA and RNA fluorescent Labeling」Nucleic Acids Research, 1996, Vol. 24, No. 22 4535 4532」を参照されたい。
【００１３】
実は、ＲＮＡの３’末端の位置特異的官能化は、非常に特異的な酵素技術を用いてのみ得ることができる。このような技術は、例えば、アフィメトリクス（Santa Clara, USA）による、又はアジレント・テクノロジー（Santa Clara, USA）による、Ｔ４ ＲＮＡリガーゼを用いたＲＮＡの３’でのｐＣｐ－マーカータイプの基質による特異的標識化で使用され、又は特定の参考文献：
－ Huang Z. 「Selective labeling and detection of specific RNAs in an RNA mixture」 Analytical Biochemistry 2003 129-133、
－ Martin G. 「Tailing and 3'-end labeling of RNA with yeast poly(A) polymerase and various nucleotides」 RNA 1998 22-230、又は
－ Huang Z. 「A simple method for 3'-labeling of RNA」Nucleic Acids Research 1996 4360-4361
に記載された他の酵素技術によって使用される。
【００１４】
酵素技術を用いる問題は、基質のタイプ（標識するＲＮＡのサイズ及び配列）に対するその感受性、並びに当然、基質及び中でも酵素の両者に関するコストである。
【００１５】
また、病理学的状態のマーカーとなりうるマイクロＲＮＡ又はｍｉＲＮＡ（短い非コードＲＮＡ、真核細胞に固有）の検出の最近の開発は、ＲＮＡに対して、そして特に小さな二本鎖に関して特に顕著である立体障害の影響を最大限に制限するためその３’末端に対して実用的かつ特に位置特異的である化学的標識技術を必要とする。更に、参考文献Nucleic Acids Research, 2007, Vol. 35, No. 7 e52のF. Natt により記載されるように、これらの小さいオリゴマーは、他ならぬそのサイズのため、酵素技術による標識化は非常に不十分である。
【００１６】
したがって、低コストの化学的官能化のための技術であって、ＲＮＡに特異的であるだけでなく、標識される基質の大きさと配列に関して完全に独立して、３’末端に特異的でもある技術を持つことに大きな関心が存在する。
Ｄ）ジアゾ標識化技術は優れた技術であるが、これらの分子に至る合成工程の性質は、特定のフルオロフォア（例えば、ヒドラジンの存在下で不安定であるＣｙ５）の化学的性質に適合性でない。ジアゾ技術は、したがって好ましくは、目的の基としてビオチンとともに使用される。さて、蛍光ストレプトアビジン分子によってビオチン化化合物を検出する工程など付加的工程を不要にするために、フルオロフォアを保有する目的の直接的基を有することが本当に必要とされている。したがって、核酸と反応する基（例えば、イサト酸無水物）が、例えばＣｙ３又はＣｙ５のような様々な基とのコンジュゲーションに化学的に適合性である汎用性の高い技術を我々の意のままに持つことが重要である。
Ｅ）最後に、ＲＮＡとＤＮＡ間の化学選択性はまた、ＤＮアーゼを用いることのないＲＮ

Ａの選択、ＤＮＡを含む培地中でのＲＮＡの選択的捕捉、汚染除去、増幅の選択的阻害など、「サンプルプレップ（sample prep）」とも呼ばれる試料調製における用途を有し得る。

【００１７】

１９８２年に、Moorman (Moorman JACS 1982 104 6785-6786)は、タンパク質の不活性化をもたらす、キモトリプシンのセリンとの選択的反応のためのイサト酸無水物の使用を公表した。この刊行物は、水性媒体中で、生体分子のヒドロキシル基におけるイサト酸無水物の反応性を実証する最初の１つである。しかし、不思議なことに、アミン官能基がより求核性であるので、イサト酸無水物はタンパク質上に存在するアミン官能基との優先的な反応性を有することが予想されるのに、アルコール官能基が最初に反応することが明らかになった。

【００１８】

１９８３年に、Hiratsuka (Hiratsuka BBA 1983742 496-508)は、イサト酸無水物又はメチル化イサト酸無水物の遊離型リボヌクレオシド（５’三リン酸又は５’－ＯＨ）への反応性に関して最初の論文の一つを公開した。これは後者を研究するための酵素の蛍光基質を合成するためであった。実際、イサト酸無水物は、いったん開環すると、蛍光性になる。しかしながら、混乱を避けるために、アントラニレート分子になる開環イサト酸無水物の内部蛍光（励起：３３５～３５０ｎｍ及び発光：４２７～４４６ｎｍ）と発蛍光団とのコンジュゲーションによりもたらされる蛍光とを区別することが必要である。実際、イサト酸無水物によるＲＮＡの標識化に言及しているが、これを検出するためにアントラニル酸の内部蛍光を用いている多数の論文が存在する。これらの結論は以下の通りである：

－　イサト酸無水物は、２’－ＯＨよりもはるかに求核性であると一般的に記載されているにもかかわらず、塩基の環外アミンに反応を示さない、

－　イサト酸無水物は５’－ＯＨに反応性を示すことが知られていない、

－　イサト酸無水物は、３’－ＯＨ（熱的に好ましい）よりも２’－ＯＨに優先的に（動力学的に）反応性を示す。しかしながら、２’位と３’位との間のアシル基の転位のために、９０％程度の３’のエステルの混合物が得られる。

【００１９】

１９９０年、Ovodov (Ovodov, FEBS 1990 270 111-114)は、１９６３年のＫｈｏｒａｎａの研究（Stnark, Journal of the American Chemical Society 1963 75 2546及びKnorre Biokhimiya 1965 1218-1224）に基づく研究を通して、ＲＮアーゼの作用からＲＮＡを保護するための、無水酢酸による水性媒体中でのメッセンジャーＲＮＡのアシル化を記載している（ＤＭＦ５％、１Ｍ酢酸ナトリウム、ｐＨ７、室温で２～３時間）。それは、ＲＮアーゼの作用を阻害するのに十分な７０～７５％のアシル化レベルを記載している。

【００２０】

１９９３年、Servillo (Servillo Eur. J.Biochem. 1993 583-589）は、水性媒体中、ｐＨ８．８で３時間、室温でのイサト酸無水物（Molecular Probes、Eugene、USA）とのインキュベーション後のトランスファーＲＮＡの３’での特異的な「標識化」を示す論文を公開した。彼は、種々の技術を用いた、３’での絶対位置特異的官能化を示している。ＲＮアーゼＡ及びＲＮアーゼＴ２による完全加水分解を通して、彼は、単一の蛍光ヌクレオシドの存在を示している。ホスホジエステラーゼの阻害により、彼は、５’での標識化は言うまでもなく、位置特異的標識化に相当する３’位における完全標識化を示している。

【００２１】

２０００年、K.M.WeeksによるＲＮＡの２’のヒドロキシルの選択的アシル化についての進行中の一連の最初の論文が出た。Weeksはこの時、ＲＮＡの２’位ＯＨの選択的アシル化を記載しているので、この一連の論文は、アシル化の位置特異性の点からＳｅｒｖｉｌｌｏの結果を検討している。これは、ＳＨＡＰＥ（選択的２’－ヒドロキシルアシル化及びプライマー伸長）技術の文献を取り扱っており、特に、以下の論文を含む：

- K.A. Wilkinson, S.M.Vasa, K.E.Deigan, S.A. Mortimer, M.C.Giddings and K.M.We

eks, Influence of nucleotide identity on ribose 2'-hydroxyl reactivity in RNA.RNA 15, 1314-1321 (2009).

- K.E.Deigan, T.W.Li, D.H.Mathews and K.M.Weeks, Accurate SHAPE-directed RNA structure determination.Proc.Natl.Acad.Sci.USA 106, 97-102 (2009).

- S.A. Mortimer and K.M.Weeks, Time-resolved RNA SHAPE chemistry.J. Am. Chem.Soc.130, 16178-16180 (2008).

- C.M.Gherghe, S.A. Mortimer, J.M.Krahn, N.L.Thompson and K.M.Weeks, Slow conformational dynamics at C2'-endo nucleotides in RNA.J. Am. Chem.Soc.130, 8884-8885 (2008).

- S.A. Mortimer and K.M.Weeks, A fast acting reagent for accurate analysis of RNA secondary and tertiary structure by SHAPE chemistry.J. Am. Chem.Soc.129, 4144-4145 (2007).

- K.A. Wilkinson, E.J.Merino and K.M.Weeks, Selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension (SHAPE): quantitative RNA structure analysis at single nucleotide resolution.Nature Protocols 1, 1610-1616 (2006).

- K.A. Wilkinson, E.J.Merino and K.M.Weeks, RNA SHAPE chemistry reveals non-hierarchical interactions dominate equilibrium structural transitions in $tRNA^{Asp}$ transcripts.J. Am. Chem.Soc.127, 4659-4667 (2005).

- E.J.Merino, K.A. Wilkinson, J.L.Coughlan and K.M.Weeks, RNA structure analysis at single nucleotide resolution by Selective 2'-Hydroxyl Acylation and Primer Extension (SHAPE).J. Am. Chem.Soc.127, 4223-4231 (2005).

- S.I. Chamberlin and K.M.Weeks, Mapping local nucleotide flexibility by selective acylation of 2'-amine substituted RNA.J. Am. Chem.Soc.122, 216-224 (2000)、及び

- K.M.Weeks, The mechanism of RNA SHAPE chemistry, J. Am. Chem.Soc.134, 6617-24 (2012).

【００２２】

著者は、トランスファーＲＮＡ又は短い型のオリゴリボヌクレオチドに反応性を示すイサト酸無水物の誘導体（Ｎ－メチル化イサト酸無水物、イサト酸無水物、Ｎ－メチル化ニトロイサト酸無水物、ニトロイサト酸無水物）を用いている（水性媒体、ｐＨ８、室温又は３７℃、数時間）。接近可能でありかつリン酸ジエステル骨格からより遠いので、制約の少ない、すなわち、二次又は三次構造にほとんど関与しない２’－ＯＨのみがアシル化される。そのため、これらはより反応性となる。次いで、この部分アシル化ＲＮＡを、可変長のＤＮＡ断片を産生するインビトロ転写に供し、かさ高い２’－Ｏ－アントラニル酸、すなわち、糖の２’－ＯＨ上に固定されている開環イサト酸無水物分子に遭遇したらいつでも伸長を終結する。キャピラリー電気泳動によるこれらの断片の配列決定又は解析後に、この技術に供したメッセンジャーＲＮＡの三次構造のマップを確立することが可能である。これがＳＨＡＰＥ技術（プライマー伸長により解析する選択的２’－ヒドロキシルアシル化）の原理である。

【００２３】

２００８年、Liによる論文、「Aptamers that recognize drug-resistant HIV-1 reverse transcriptase」 Na Li, Nucleic Acids Research, 2008, Vol. 36, No. 21 6739 6751は、最も接近可能であり得る２’－ＯＨを特異的に内部標識するために、したがって、当のＲＮＡの構造マップを記載するためにWeeksによる研究を引用している。

【００２４】

２００７年、Thomas Cech (Cech T. R. RNA 2007 536-548)はまた、この技術を用いて結晶化ＲＮＡの構造を研究している。

【００２５】

従来技術はまた、捕捉に関する他の特許を含む。

【００２６】

特許ＵＳ－Ｂ－７，２４４，５６８は、疎水基（対応する無水物のブチリル又はペンタノイル）によるＲＮＡの２’－ＯＨの多少部分的な選択的アシル化に関する。したがって、ＲＮＡは、有機溶媒により選択的に抽出される又は選択的に固定化される（例えば、逆相、シリカ相、膜等）のに十分疎水性となる。この特許はまた、ＤＮＡ分子に対してＲＮＡ分子を選択的に固定化することを可能にする、酸塩化物又は無水物により活性化した固相を記載している。この工程は、固定化イサト酸無水物又はＢＣＰＢ（ポリスチレン上に固定化された塩化ベンジル）により行うことができる。最後に、この技術はまた、固相に吸着されたＲＮＡを分析するための技術も記載している：固定化ＲＮＡの２’－ＯＨがイサト酸無水物と反応し、生成した内部蛍光が固定化ＲＮＡを分析することを可能にする。

【００２７】

更に詳細な研究は、使用される無水物は化学特異的でなく、糖のヒドロキシル基と塩基の環外アミンを両方とも攻撃するので、この特許により主張されている条件では、ＤＮＡが同様に官能化されることを示している。

【００２８】

特許ＥＰ－Ｂ－１１９６６３１は、水性媒体中のＲＮＡの位置特異的アシル化と適合するアシル化剤を提案している。これらのアシル化剤は、このように修飾されたＲＮＡのハイブリダイゼーション特性を維持するために、過剰な立体障害を与えてはならない。それは、主には、使用されるアセチル基又はホルミル基を導入するためのアシル化剤である。このようにして、部分的に修飾されたＲＮＡは、次いで、重合反応のためのマトリックスとして機能し、それはまた、ノーザンブロット反応におけるプローブとしても機能し得る。この考え方は、ハイブリダイゼーション特性を維持するもの（修飾されたＲＮＡが伸長反応の基質のままである）である一方で、２’の基の存在を通して二次構造を破壊し、このように修飾されたＲＮＡをヌクレアーゼ抵抗性にする。更に、実施例２２は、ＲＮＡの蛍光標識化が想像されるが、メチル化イサト酸無水物を添加することによってのみであることを示しており、したがってこれは内部蛍光の問題である。

【００２９】

特許ＥＰ－Ｂ－１．１９６．６３１は、ｍＲＮＡ、ｒＲＮＡ又はウイルスＲＮＡを含むポリヌクレオチドを提案しており、そのリボースの２５％超は２’－ＯＨ位で共有結合的に修飾されている。更に、この特許は、ポリメラーゼ及び任意でプライマーの存在下で、複数のモノヌクレオチド（ＵＴＰ、ｄＴＴＰ及び／又はｄＵＴＰ、ＡＴＰ及び／又はｄＡＴＰ、ＧＴＰ及び／又はｄＧＴＰ並びにＣＴＰ及び／又はｄＣＴＰ）から出発して、出発核酸鎖から二本鎖オリゴヌクレオチド及びポリヌクレオチドを生成して、出発核酸に相補的な核酸の鎖の形成を可能にする方法に関する。

【００３０】

特許出願ＷＯ－Ａ－２００４／０１３１５５は、ＤＮＡとＲＮＡを区別するための、糞便、血液等の型の混合物中のＲＮＡの化学修飾を記載している。この区別を行うことができる試薬は無水酢酸である。次にエステル官能基は、生物学的に活性なＲＮＡを再生するために加水分解される。このために、この出願は、ＲＮＡに対して「ごくわずかに」攻撃的である有機塩基（リジン、ジアミン等）の、脱保護プロトコルと組み合わせた使用を促進することを提案する。

【００３１】

これらの文献全体から、いったん開環したイサト酸無水物の内部蛍光のみが用いられていることに留意すべきである。更に、他の用途のためのこの分子及びその誘導体の使用は、本発明により提案されているので、記載されていない。

【００３２】

イサト酸無水物の蛍光に関する限り、ＲＮＡを検出を可能とするたｊめにイサト酸無水物の蛍光を得ることだけでは利点はほとんどない。このように、この蛍光は、他の蛍光化合物に比べて弱く、そして自動検出のためのデバイスで現在使用されるレーザーの波長と必ずしも適合性でない。更に、開環イサト酸無水物の内部蛍光では、用途が単一（monoplex）検出に限られ、分子生物学でますますよくあるような多重検出ではない。例えば、使

用者は共にイサト酸無水物で標識した、核酸の第一型の検出と核酸の第二型の検出を区別することができないので、ＤＮＡチップの分野の用途のための標識化は、これらの特許では不可能である。

【００３３】

従来技術では、イサト酸無水物の全部で４つの異なる用途が存在する。第一は、特定の酵素の機構を研究するためにアントラニル酸エステルの内部蛍光特性を活用する問題である。第二に、位置選択的に核酸の重合を阻害するためのイサト酸無水物のアシル化の特性の使用であって；したがってそれは多かれ少なかれ制御された様式で、できるだけ穏やかな条件で、２’に嵩高い置換基を導入する単なる問題である。第三に、従来技術は、抽出工程中にそれらの分解を防止するためにイサト酸無水物を使用する。最後に、第四に、それは、非アシル化ＤＮＡに対してアシル化ＲＮＡを選択的に抽出する問題である。遊離の２’ＯＨ官能基、したがって、官能性ＲＮＡを再生するための、エステル官能基の可逆性という考え方がある。

【００３４】

目的の基とのコンジュゲーションは、予測することが困難な特性である、イサト酸無水物のアシル化特性及び安定性においてさえ変化をもたらし得るので、少なくとも２種の異なるスポット又はＤＮＡチップ上のハイブリダイゼーションのためのｍＲＮＡの標識化の用途のためのビオチン又はＣｙ３とイサト酸無水物分子をコンジュゲートする考え方は明らかではない。特に、イサト酸無水物の目的の基とのコンジュゲーションは、構造の極めて顕著な不安定化、合成の極めて大きな困難さ、水への乏しい溶解性、蛍光の減衰による目的の基の物理化学的特性の喪失、ＲＮＡに関する極めて乏しい反応性、標識されたＲＮＡとＤＮＡ（特に過剰な立体障害による又は官能化ＲＮＡ／ＤＮＡハイブリッドがもはやポリメラーゼ基質ではないという事実による捕捉用プローブ）との間に形成される二本鎖の極めて大きな不安定性を引き起こし得る原子及び結合によって起こらなければならない。

【００３５】

更に、本発明者らは、固体支持体が有していてもよく又は有していなくてもよい認識分子により捕捉されることを可能にするためのイサト酸無水物化合物によるＲＮＡの官能化の重要性を理解した。

【００３６】

更に、彼らは、その内部蛍光のためでなく、ＲＮＡに特異的に結合し及び後で定義されるように目的の基との結合を可能にするその能力のためにイサト酸無水物を使用することからなる発明ＷＯ－Ａ－２０１２／０７６７９４を以前に提案した。

【００３７】

上述したように、核酸の抽出のために最も広く使用される技術の一つは、カオトロピック塩の存在下でシリカ上に吸着させる技術（いわゆるＢＯＯＭ技術）であるが、それはその有効性と自動化されるためのその大きな潜在的可能性にもかかわらず、組成が依然として経験的である複雑な製剤の溶出緩衝液を使用する場合を除き、一般的であってＲＮＡに対してほとんど特異性を有しないという欠点がある。

【００３８】

簡潔には、「Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry. Vol 162 Edited by S. Mitra Wiley-Interscience 2003」に記載されるように、その技術は、リン酸基及びシリカの表面に存在するシラノール残基との間に結合を形成するであろう、核酸、シリカ及び陽イオンの間に生じる特定の親和性に基づいている。

【００３９】

ＢＯＯＭ技術の非常に多くの異形は、抽出収率を向上させ、増幅阻害剤の共精製を回避するために保護されている。

【００４０】

これに関連して、我々はＢＯＯＭ化学の改善を説明する幾つかの特許を挙げることができる。

【００４１】
特許ＥＰ－Ｂ－１，３６７，１３７は、はるかに容易に自動化を可能にする核酸の抽出のための磁性シリカ粒子を用いたＢＯＯＭ技術の改善を記載している。
【００４２】
特許ＥＰ－Ｂ－１，４７６，５５０は、チオエーテルで修飾された固相とリオトロピック塩からなる溶出液を使用する、核酸を精製するための方法を提示している。
【００４３】
特許ＥＰ－Ｂ－１，２６６，３８５は、核酸の精製のための強磁性又はフェリ磁性のシリカ粒子を提案している。
【００４４】
特許ＥＰ－Ｂ－１，７６２，６１８は、１５～３５％のグアニジンと界面活性剤からなる、血液から核酸を抽出するための溶液を開示している。
【００４５】
特許ＥＰ－Ｂ－１，７７１，５６２は、有機助剤の存在下でシリカに基づく核酸の抽出のための新たな方法を記載している。
【００４６】
最後に、特許ＥＰ－Ｂ－１，５８９，１０５は、シリカで覆われていない磁性粒子上における酸性ｐＨでの核酸の抽出を提案している。
【００４７】
しかし、これらの技術は、核酸と固体支持体との間の非共有結合性相互作用に基づいて、現在まで核酸の抽出のために使用される自動システムで主に使用されているが、どれも、ＤＮＡからＲＮＡの特異的区別を可能としていない。選択的な技術を開発する必要性がある。
【００４８】
固体支持体との非共有結合性相互作用により核酸を抽出するための若干より選択的な技術も提案されている。複雑な生物学的混合物から、ＲＮＡのみの又はＤＮＡのみのどちらかの自動化された選択的抽出を明確に説明する文書はほとんどない。
【００４９】
しかし、特許ＥＰ－Ｂ－１，４４８，７９９は、様々な陰イオンの存在下で、アルカリ性ｐＨでシリカ上における、核酸の多かれ少なかれ選択的な精製を提示している。
【００５０】
特許出願ＥＰ－Ａ－１，５１０，５７７は、ＲＮＡに対するＤＮＡの分離を最適化するための、カオトロピック塩と親水性添加剤の混合物の使用を保護しようとしている。
【００５１】
特許ＥＰ－Ｂ－１，４７９，７６９は、ＲＮＡとＤＮＡとの間の選択的分離を説明し、特許請求している。これは、特定の緩衝溶液の温度変化、イオン強度及び化学組成の変化に基づいている。
【００５２】
特許ＥＰ－Ｂ－１，８６９，１７９は、ＤＮＡに対するＲＮＡの特異的抽出のためのＲＮＡ又はＤＮＡに特異的なリガンドの使用を提案している。
【００５３】
特許出願ＵＳ－Ａ－２００７／０１４８６５１は、リン酸アニオンの存在下でのマグネタイト粒子上のＲＮＡの吸着によるＤＮＡ及びＲＮＡの混合物からのＲＮＡの特異的抽出を提示する。
【００５４】
特許出願ＷＯ－Ａ－２００９／０４０４４４は、ＤＮＡ／ＲＮＡ混合物からの、キトサン被覆マグネタイト粒子上のゲノムＤＮＡの選択的沈殿について記載している。次いで、ＲＮＡはアルコールで沈殿によって上清から回収される。
【００５５】
最後に、我々は、切断可能なリンケージによって固体支持体に結合された核酸結合部分

（ＮＡＢＰ）を保護する、特許ＵＳ－Ａ－２００５／０１０６５７６及びＵＳ－Ａ－２００５／０１０６５７７を述べる。ＮＡＢＰは、核酸に対する親和性を有するが、ＤＮＡと比較してＲＮＡに対する選択性を有しない荷電分子である。また、ＮＡＢＰは、我々の発明と比較して、非特異的吸着、立体障害などを伴うといった全ての欠点を持つ固体支持体に担持される。

【００５６】

これらの全ての技術はまた、多かれ少なかれ選択的吸着を調節する種々の添加剤の存在下での、核酸（ＲＮＡ又はＤＮＡ）と固相との間の非共有結合性相互作用に基づいていることに留意すべきである。核酸の吸着に関与する相互作用は、共有結合と比較して弱い性質のもの（静電、イオン性、疎水性、水素結合、等）である。

【００５７】

したがって、改善の試みにもかかわらず、ＲＮＡとＤＮＡとの間の絶対的選択を可能にする本当に満足できる技術は無いことがわかる。新しい革新的な技術を提案する真の必要性がある。

【００５８】

更に、ＤＮＡに対するＲＮＡの選択的抽出のための技術が提案されている。ＤＮＡの混入を最小限にして、比較的選択的ＲＮＡを抽出するための唯一の技術は、

－　効果的ではあるが、有機溶媒の使用を必要とし、したがって、毒性、自動化の困難さ等の点で欠点を有する、例えばフェノール／クロロホルム（Ｔｒｉｚｏｌ（登録商標））抽出などの化学的技術、

－　ＤＮアーゼ又はＲＮアーゼを添加する酵素的技術（しかしコストの欠点とその作用後に、これらの酵素の変性の必要性がある）、

－　自動化が非常に複雑であって、生体分子の相対密度に基づいた、塩化セシウム塩勾配に関する分画遠心法などの物理化学的技術、

－　メッセンジャーＲＮＡのポリＡ配列を特異的に認識するためのポリｄＴオリゴヌクレオチドで被覆された磁性粒子を用いた特異的捕捉のための技術（認識されているリボソームＲＮＡ、μＲＮＡｓ、その他の「小さな」ＲＮＡは含まれずに、ｍＲＮＡのみが捕捉されるという欠点を有する）

に基づいている。

【００５９】

対応する特許出願ＷＯ－Ａ－２０１２／０７６７９４が、参照により本明細書に援用される。本出願において、出願人は、複合培地からのＲＮＡとＤＮＡとの間の分離に関する問題を解決するために着手した。それらの化学組成に基づいてＤＮＡからＲＮＡを識別することが提案された。実際には、ＲＮＡとＤＮＡとの間の唯一の違いは、リボースの２’の水酸基の存在である。目的は、目的の基の特異的認識に基づいて、分子ソーティングが２つの巨大分子との間で実行されるようにする、目的の基を備えたそれ（イサト酸無水物の誘導体）に対して、結合分子を特異的に結合させるために、この機能を利用することであった。反応性結合分子は、温和な条件下（６５℃で、水性媒体中で１時間未満）で反応できなければならなかった。

【００６０】

ＲＮＡ上に供給される目的の基、例えば、固相に特定の親和性を有する特定の基を適切に選択することによって、したがって、複合培地から特異的にＲＮＡを抽出することが可能である。ＲＮＡの特異的官能化の後、後者は、固相上に固定することができるが、一方精製されたＤＮＡは溶出された（しかし、特異的に増幅されるために回収することができる）。ＤＮＡを含まない捕捉されたＲＮＡは、今度は特異的に溶出され増幅されることができるように、その後、固相上で直接に目的の基から分離され得る。

【００６１】

この方法は、したがって、非常に高い選択性でＤＮＡからＲＮＡを選別し分離することを可能とし：

１　－　ＲＮＡと目的の基を有する結合分子（イサト酸無水物の誘導体）との間に共有

結合を形成し；
２　－　官能化されていないものに対して、目的の基によって、このように官能化された核酸を選別し；
３　－　ＤＮＡを完全に含まない（アントラニル酸塩又は裸の）生物学的に活性なＲＮＡを放出するために、ＲＮＡと目的のグループとの間の結合を切断する
ことからなる。しかし、出願人は、特に実施例１４において、ＤＮＡに対してＲＮＡを選別する現実性を完全に実証したが、本質的にこれらの問題に応答することがより可能であるアザーイサト化合物に基づく分子の新しいファミリーを設計することによって、このプロトコルの有効性を改善する要望が依然として存在する。

【００６２】

したがって、本発明は、
－　・工業的に使用可能な自動診断システムでこの方法の統合を容易にするように、６５℃でなく、室温で官能化することができる、
・この方法の工業的応用を視野に入れて（試薬のコストを下げる）、アザイサト酸無水物のアシル化試薬の消費を最小限に抑える、
・診断プラットフォームにおけるこのプロトコルの統合を改善するために、過剰な試薬の除去を容易にする、
・ＤＮＡに対するＲＮＡの濃縮度をより一層高める、
ようにイサト酸無水物の反応性をより一層増加させ、
－　過剰試薬の除去を促進し、その反応性を増大させることを常に目的として、水性媒体における溶解性をより一層高める、
－　結合分子の反応及び結合の開裂後、（アザアントラニレートに起因する任意の阻害を回避することを目的として）アザアントラニレート基を持たない「裸の」ＲＮＡを得る、
－　・ＲＮＡの制御されない官能化により、ヌクレアーゼに対する絶対的な耐性を有するＲＮＡを賦与し、
・ＲＮＡ／ＤＮＡ混合物中のＲＮＡの選択的増幅の阻害、
・ＤＮＡチップの用途又はその他のためのリボ核酸の標識化
などの、他の用途への概念を適用する
ことを可能とする。

【００６３】

本特許出願の文脈において、我々は、新しい分子、すなわち：
－　室温でＲＮＡを官能化することができるので、より反応性でより効果的であり、
－　同じ効果について低濃度を必要とし、それに応じて除去するのが容易であるので、より経済的であり、
－　ピリジニル基の導入により水性媒体中での溶解度が増加するため、より可溶性であり、
－　より選択的であり、したがって選択的抽出の問題を一層解決することができ、
－　切断により裸のＲＮＡを再生することを可能とし、続く増幅の阻害の任意の問題を回避する、置換されたメチルジスルフィドアームを有する付加的な官能性が任意で賦与され、
－　他の用途に適用可能である
ものを用いて他の分子に対するＲＮＡの選別のための新規な解決策を提供する。

【００６４】

定義により、「目的の基」は、
・特定の条件下（求核試薬及び求電子試薬の例としては、アジドを有するアルキン、チオールを有するマレイミド、アルケンを有するジエン等）で別の反応性分子又は別の反応性基と反応することができる反応性分子又は反応性基であり、及び／又は
・開環イサト酸無水物（アントラニル酸エステル）のものとは異なる内部蛍光を有し、及び／又は
・認識分子若しくは表面、又は粒子等により認識することができ、ビオチン／ストレプ

トアビジン型、疎水性若しくは親水性分子／疎水性若しくは親水性担体、抗原／抗体、糖類若しくは多糖類／レクチン等の安定な（かつ任意に可逆性の）複合体を形成することができる、リガンドであり、及び／又は

・以下の型のリガンド／受容体ペア：

－　ビオチン／ストレプトアビジン、

－　ハプテン／抗体、

－　抗原／抗体、

－　ペプチド／抗体、

－　糖類又は多糖類／レクチン、

－　求電子分子／求核性分子、

－　ポリヌクレオチド／ポリヌクレオチドの相補体、

－　疎水性リガンド／疎水性固相、又は

－　リガンド／配位金属

からなる間接反応のためのマーカー分子である、

分子である。

【００６５】

「結合分子」は、アザイサト酸無水物又はその誘導体を意味する。アザイサト酸無水物が求核試薬との反応後に開環すると、アザアントラニレートという名称を有することに留意すべきである。

【００６６】

アザイサト酸無水物誘導体は、アザイサト酸無水物に相当する部分を含み、アザイサト酸無水物の芳香族部分又は複素環部分に、例えば化学又は有機基などの少なくとも１種のラジカルを有する任意の有機化合物を意味する。

【００６７】

「少なくとも一のリボ核酸分子の官能化」は、共有又は非共有結合による目的の基の前期核酸上へのグラフト作用を意味する。グラフトされた目的の基のタイプ（マーカー、標識化前駆体、少なくとも一の捕捉手段による、生体分子の捕捉、分離又は阻害を可能にする基、など）に応じて、用語「官能化」又は関連する用語（例えば、「官能化する」）は、検出可能な分子を用いた－直接的又は間接的な－前記リボ核酸分子の標識化、前記リボ核酸分子の捕捉、分離又は阻害を可能とする基の前記リボ核酸分子上への付加を意味する。

【００６８】

「リンケージ」は、単純な共有結合などの、結合分子及び目的の基を連結することができる有機質のスペーサーとして定義される。これには、物理化学的、光化学的、酵素的、化学的、熱的手段等により切断することができる官能基が含まれ得る。

【００６９】

「認識若しくは捕捉の手段又は分子」は、目的の基との強い親和性を有する、固体支持体上に固定されていてもされていなくてもよい分子として定義される。

【００７０】

「ＲＮＡ」の定義は、少なくとも２個の修飾若しくは非修飾連続リボヌクレオチド単位から構成される天然又は合成ポリマーである。

【００７１】

「ＤＮＡ」という用語は、少なくとも２個の修飾若しくは非修飾連続デオキシリボヌクレオチド単位から構成される天然又は合成ポリマーにより定義される。

【００７２】

少なくとも一のＤＮＡセグメント及び少なくとも一のＲＮＡセグメントから構成される単一キメラ鎖を用いることも可能である。

【００７３】

「阻害」とは、イサト酸無水物誘導体により過剰に官能化されたＲＮＡを、遺伝物質を増幅するための技術（ＮＡＳＢＡ、ＰＣＲ等）により増幅することができないことである

と理解される。

【００７４】

定義により、「糖」という単語は、リボース又はデオキシリボース化合物を意味する。

【００７５】

「液体試料」とは、核酸は完全に可溶性である均一又は不均一の水溶液を意味する。溶液は、例えば、固体支持体を、任意でその表面上にＲＮＡを固定して含む場合に、不均一であると言われている。

【００７６】

「ピリジニル」基は、溶解性に加えて、その電子を引きつける能力が、カルボニル官能基の反応性を増加させ、ＲＮＡのヒドロキシル基への求核攻撃をより可能にすることを意味するという事実に基づいて選択される。

【００７７】

出願人による、６位、７位又は８位のピリジニル核の置換のための位置の選択はまた、最終分子の安定性に影響を及ぼしうる。当業者にとっては、ＢｉｏｔＰＥＧ４ＳＳ Ｐｙｒ ＩＡ Ｍｅ分子（１４）の場合には６位に置換することは技術的に容易であるが、７位又は８位を置換するための技術的解決法を採用することも可能である。

【００７８】

任意で目的の基に結合した２つのリンケージを導入する場合、アントラニレートの自己犠牲を可能とするリンケージが必ず５位に組み込まれなければならないので、合成の困難さは更に増加する（参照：以下の式（２）及び図２）。リンケージにより２回置換されたアザイサト分子は、生体分子の選別のための適用のために記載されたことはない。

【００７９】

本発明は、液体試料中に含有される、少なくとも一のリボ核酸（ＲＮＡ）分子を官能化する方法であって、

ａ）少なくとも

－　アザイサト酸無水物又はその誘導体からなる一結合分子と、

－　目的の基と、

－　結合分子を目的の基と連結する一のリンケージを提供する工程と、

ｂ）結合分子の無水物官能基を

－　ＲＮＡヌクレオチドの一のリボースの２’位、及び／又は

－　ＲＮＡの３’末端のヌクレオチドのリボースの２’及び／又は３’位

に位置する少なくとも一のヒドロキシル基と反応させる工程と、

ｃ）リンケージによってＲＮＡを目的の基と連結するアザアントラニレートを得る工程と

を含む方法に関する。

【００８０】

本方法は、液体試料中に含有される、少なくとも一のリボ核酸（ＲＮＡ）分子を標識する方法であって、

ａ）少なくとも

－　内部蛍光を有する、アザイサト酸無水物又はその誘導体により構成される結合分子と、

－　結合分子により発せられるシグナルとは異なる内部蛍光シグナルを有するか、又は内部蛍光シグナルを有さない目的の基と、

－　結合分子を目的の基と連結する一のリンケージとを提供する工程と、

ｂ）結合分子の無水物官能基を

－　ＲＮＡヌクレオチドの一のリボースの２’位、及び／又は

－　ＲＮＡの３’位の末端ヌクレオチドのリボースの２’及び／又は３’位

に位置する少なくとも一のヒドロキシル基と反応させ、

－　リンケージによってＲＮＡを目的の基と連結するアザアントラニレートを得る工程と

を含む。

【００８１】

本発明は、少なくとも一のリボ核酸（ＲＮＡ）分子を捕捉又は分離するための方法であって、

ａ）少なくとも

－　アザイサト酸無水物又はその誘導体からなる一結合分子と、

－　抗リガンドに相補的なリガンドからなる目的の基と、

－　結合分子を目的の基と連結する一のリンケージとを提供する工程と、

ｂ）結合分子の無水物官能基を

－　ＲＮＡヌクレオチドの一のリボースの２’位、及び／又は

－　ＲＮＡの３’位の末端ヌクレオチドのリボースの２’及び／又は３’位

に位置する少なくとも一のヒドロキシル基と反応させる工程と、

ｃ）リンケージによってＲＮＡを目的の基と連結するアザアントラニレートを得る工程と、

ｄ）リガンド－抗リガンドの間の反応を介してＲＮＡを捕捉又は分離する工程と

を含む方法に関する。

【００８２】

本発明の捕捉又は分離のための方法において、

ｅ）こうして捕捉又は分離されたＲＮＡ分子を貯蔵又は廃棄し、ＤＮＡ濃縮試料の残りを使用すること

を含む付加的工程があってもよい。

【００８３】

前述の方法の全ての場合において、及び第一の実施態様によれば、リンケージは、目的の基と結合する前に結合分子に結合する。

【００８４】

前述の方法の全ての場合において、及び第二の実施態様によれば、リンケージは、目的の基と結合した後に結合分子に結合する。

【００８５】

当該実施態様にもかかわらず、結合分子は、予めＲＮＡと結合している。

【００８６】

本方法は、少なくとも一の結合分子、抗リガンドに相補的なリガンドからなる一の目的の基、及び該目的の基と該結合分子を連結する一のリンケージを用いた、ＲＮＡの少なくとも一分子の選択的捕捉の方法であって、該結合分子は、

－　ＲＮＡヌクレオチドの一のリボースの２’位に、及び／又は、

－　ＲＮＡの３’位の末端ヌクレオチドのリボースの２’位及び３’位に、及び／又は

－　ＲＮＡの３’位の前記末端ヌクレオチドのリボースの３’位に

位置するヒドロシキシル基のレベルで共有結合により結合される、アザイサト酸無水物又はその誘導体からなる、方法に常に関する。

【００８７】

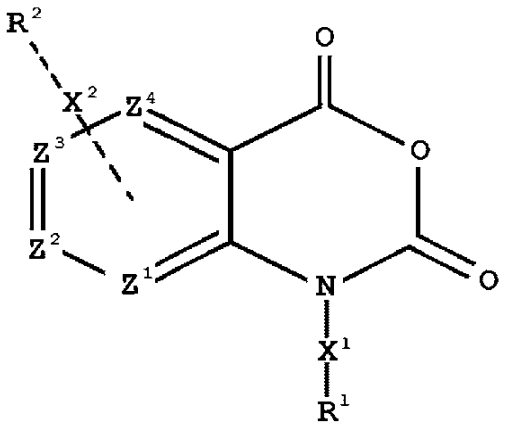
本発明は最終的には、ＲＮＡ分子を、他の生物学的成分、特にＤＮＡ分子に対して分離する方法であって、

・区別されていない核酸（ＲＮＡ及びＤＮＡ）、生物学的試料の残りから容易に分離することができる少なくとも一の固体支持体と結合している目的の基を含有する生物学的試料に対して、前述の捕捉方法を適用し、

・生物学的試料の残りからＲＮＡ分子を保有する結合分子を分離することを含む方法に関する。

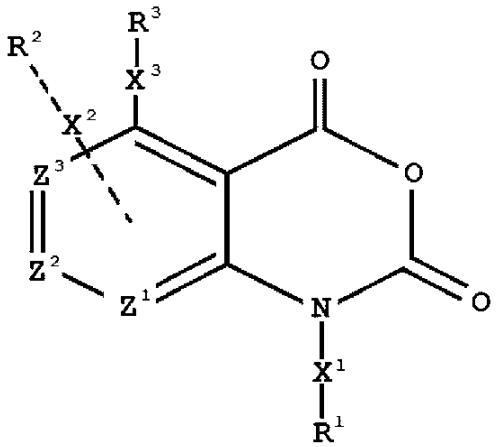
【００８８】

本発明は、式（１）：



［式中、
・R^1及びR^2は、互い独立にＨ又は目的の基を表し、ラジカルR^1及びR^2の少なくとも一は、目的の基を表す、及び
・目的の基は、
ａ．マーカー若しくは標識化前駆体、又は
ｂ．認識分子若しくは表面又は粒子等によって認識することができ安定な複合体を形成することができるリガンドであって良く、
・X^1及びX^2は各々は、互いに独立に、目的の基を結合分子に連結するリンケージを表し、
・ラジカルZ^1、Z^2、Z^3及びZ^4の一つのみが窒素原子（Ｎ）から構成され、及び他のラジカルは炭素原子（Ｃ）から構成される］
の官能化試薬を提供する。

【００８９】
より詳細には、本発明は、式（２）の官能化試薬を、提案している。



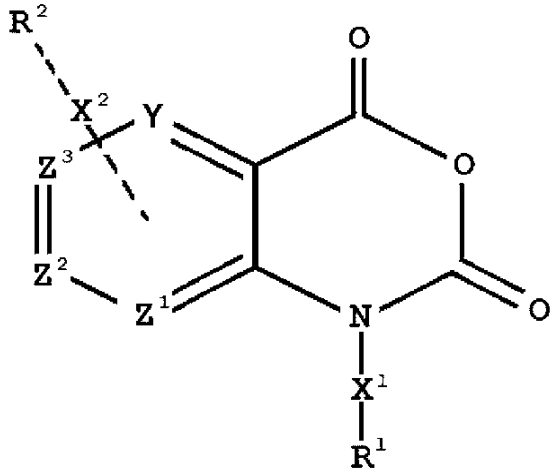
［式中、
・R^1、R^2及びR^3は、互い独立にＨ又は目的の基を表し、ラジカルR^1及びR^2の少なくとも一は目的の基を表し、及び
・目的の基は、
ａ．マーカー若しくは標識化前駆体、又は
ｂ．認識分子若しくは表面又は粒子等によって認識することができ安定な複合体を形成することができるリガンドであって良く、
・X^1、X^2及びX^3は各々は、互いに独立に、目的の基を結合分子に連結するリンケ

ージを表し、

・ラジカルＺ^{1}、Ｚ^{2}、及びＺ^{3}の一つのみは窒素原子（Ｎ）から構成され、及び他のラジカルは炭素原子（Ｃ）から構成される。］

【００９０】

式（１）及び式（２）の官能化試薬からなるアセンブリーは、以下の式（Ｉ）により表すこともできる。



［式中、

・ＹはＺ^{4}又はＣ－Ｘ^{3}－Ｒ^{3}の基を表し、

・Ｒ^{1}、Ｒ^{2}及びＲ^{3}（Ｙ＝Ｃ－Ｘ^{3}－Ｒ^{3}である場合）は、互いに独立にＨ又は目的の基を表し、ラジカルＲ^{1}、Ｒ^{2}及びＲ^{3}（Ｙ＝Ｃ－Ｘ^{3}－Ｒ^{3}である場合）の少なくとも一は、目的の基を表し、及び

・目的の基は、

ｃ．マーカー若しくは標識化前駆体、又は

ｄ．認識分子若しくは表面又は粒子等によって認識することができ安定な複合体を形成することができるリガンド

から選択され、

・Ｘ^{1}、Ｘ^{2}及びＸ^{3}（Ｙ＝Ｃ－Ｘ^{3}－Ｒ^{3}である場合）は各々は、互いに独立に、目的の基を結合分子に連結するリンケージを表し、

・ラジカルＺ^{1}、Ｚ^{2}、Ｚ^{3}及びＺ^{4}（Ｙ＝Ｚ^{4}である場合）の一つのみが窒素原子（Ｎ）を含み、及び他のラジカルは炭素原子（Ｃ）を含む。］

【００９１】

どのような試薬を用いても、後者は、捕捉又は分離のために使用される場合、捕捉手段又は分離手段は、磁性又は非磁性のポリマー粒子又はシリカ粒子、又はフィルター、あるいは容器の内壁などの、固体支持体からなる。

【００９２】

どのような試薬を用いても、後者は、官能化のために使用される場合、リンケージＸは、結合分子と目的の基の間の単純な共有結合、又は置換されていてもよい単一炭素原子、芳香族構造及び／又はヘテロ原子（酸素、硫黄、窒素等）を任意で含む少なくとも２個の炭素原子の鎖など、結合分子と目的の基を一緒に連結することを可能にする有機スペーサーである。

【００９３】

官能化試薬のこの後者の実施態様によれば、リンケージＸは、光の、温度の、酵素的若しくは化学的特定条件下で結合分子をＲＮＡから分離する、物理化学的、光化学的、熱的、酵素的及び／又は化学的手段により切断することができる官能基又は結合を含む。

【００９４】

本発明はまた、前記のような方法の一つにより得ることができる官能化ＲＮＡの生物学的分子に関する。

【００９５】

本発明はまた、前記のような試薬を含む、標的ＲＮＡ分子を検出するためのキットを網羅することを提案する。

【００９６】

本方法に関係なく、本発明は、最後に、官能化する各ＲＮＡ鎖の３’位の末端一リン酸基を加水分解することからなる、工程ａ）とｂ）との間の以下の付加的工程を含む、官能化の方法に関する。

【００９７】

一実施態様において、リンケージは、目的の基への結合の有無によらず、ピリジニル基を置換する。更に、切断可能な官能基は、切断後、アザアントラニレートＲＮＡのカルボニル官能基を有する５から８環員を有する環式複素環を形成し、したがって、ＲＮＡの増幅、検出又は保護の何れかの方法で使用可能であって、必要ならば、アザアントラニレートによるものであろう任意の潜在的な阻害を絶対的に回避する、２’－ＯＨをフリーにした裸のＲＮＡを放出することができるように、設計され、配置される。

【００９８】

この最後に述べた実施態様は、好ましくは、５位に位置するリンケージの切断可能なジスルフィド（－ＳＳ－）官能基の切断中に自発的に形成する、アザチオラクトンの形成に基づく。このような自己犠牲のシステムは、ＲＮＡを放出する目的で、アザイサト酸のシリーズでは説明されてこなかった。

【００９９】

この最後に述べた実施態様は更に、ＤＴＴによる加水分解の際に副生成物、支持体上に残ったチオラクトンの放出を回避することができる。また、－ＯＲ、－ＮＲのタイプの切断可能な官能基を持ち、Ｒ基を除去した後、それぞれアルコール又はアミン官能基を放出させ、「裸の」ＲＮＡを放出するためにも、ＲＮＡ－アントラニル酸のカルボニル官能基による環化を可能にする同様のシステムを想倒することも可能である。

【０１００】

本発明は添付の図面に関して以下に述べる詳細な説明によってより良く理解されるだろう。

【図面の簡単な説明】

【０１０１】

【図１】図１は、第一の実施態様によるアザイサト酸無水物を用いたＲＮＡソーティングの原理を示す。

【図２】図２は、第二の実施態様において「裸の」ＲＮＡ分子の放出を誘導する基を備えた、自己犠牲アザイサト酸無水物と呼ばれるアザイサト酸無水物の存在下におけるＲＮＡソーティングの原理を示す。

【図３】図３は、目的のビオチン化基を備えたアザイサト酸誘導体の合成を説明する。

【図４】図４は、イサト酸化合物のものと比較して、溶液中のアザイサト酸化合物の安定性を調べるためのグラフを示す。

【図５】図５は、イサト酸とアザイサト酸無水物の誘導体による、２７－ｍｅｒのＯＲＮの官能化試験のためのグラフを示している。

【図６】図６は、ＤＮＡのアザイサト酸に対する、ＲＮＡに対するアザイサト酸シリーズの化学選択性を強調することを目的としている。

【０１０２】

以下の略語を、以下に記載する実施例に使用する。

・ＡＣＮ：アセトニトリル、

・ＥｔＯＡｃ：酢酸エチル、

・Ｂｏｃ$_2$Ｏ：二炭酸ジ－ｔｅｒｔ－ブチル、

・ＤＮＡ：デオキシリボ核酸、

・ＲＮＡ：リボ核酸、
・Ｂｉｏｔ－ｐｅｇ$_4$－ＣＯＰＦＰ：３－（２－（２－（３－ビオチン－ｄＰＥＧ$_3$－プロパンアミド）エチル）ジスルファニル）プロパン酸とペンタフルオロフェノールのエステル
・Ｂｉｏｔ－ｐｅｇ$_4$－ＳＳ－ａｚａＩＡＭｅ：本出願の分子１４（１－｛５－［（３ａＳ，６ａＲ）－２－オキソ－ヘキサヒドロ－１Ｈ－チエノ［３，４－ｄ］イミダゾリジン－４－イル］ペンタンアミド｝－Ｎ－（２－｛［２－（３－｛１－メチル－２，４－ジオキソ－１Ｈ，２Ｈ，４Ｈ－ピリド［２，３－ｄ］［１，３］オキサジン－６－ｙｌ｝プロパンアミド）エチル］ジスルファニル｝エチル）－３，６，９，１２－テトラオキサペンタデカン－１５－アミド）、
・出願ＷＯ－Ａ－２０１２／０７６７９４の実施例１～１０に記載される、Ｂｉｏｔ－ｐｅｇ$_4$－ＳＳ－ＩＡＭｅ：５－（３－（２－（２－（ビオチン－ｄＰＥＧ$_3$－プロパンアミド）エチルｅｔｈｙｌ）ジスルファニル））プロパンアミド）イサト酸無水物、
・ＴＬＣ：薄層クロマトグラフィー、
・ＣＤＣｌ$_3$：重水素化クロロホルム、
・ｄ：二重項、
・ＤＣＭ：ジクロロメタン、
・ｄｄ：分裂二重項、
・ＤＭＦ：ジメチルホルムアミド、
・ＤＭＳＯ：ジメチルスルホキシド、
・ＤＭＳＯ－ｄ６：重水素化ジメチルスルホキシド、
・ＭｉｌｌｉＱ水：超純水（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、Ｍｏｌｓｈｅｉｍ、フランス）、
・ＥＤＣ：１－エチル－３－（３－ジメチルアミノプロピル）　カルボジイミド、
・Ｅｑ：当量、
・ＰＥ：石油エーテル、
・Ｅｔ$_2$Ｏ：ジエチルエーテル、
・ＨＰＬＣ：高速液体クロマトグラフィー、
・ＨＯＢｔ：ヒドロキシベンゾトリアゾール、
・ＩＡ：イサト酸無水物、
・ＩＶＴ：インビトロ転写産物、
・ｍ：多重項、
・Ｍｅ：メチル、
・ＭｅＯＨ：メタノール、
・Ｎｂ　ｅｘｐ：実験反復数
・ｎｄ：未決定、
・ＮＨＳ：Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド、
・ＮＩＳ：Ｎ－ヨードスクシンイミド、
・ＮＭＯ：Ｎ－メチルモルフォリン、
・ＮＰ１：ヌクレアーゼＰ１、
・ＯＤＮ：オリゴデオキシリボヌクレオチド、
・ＯＲＮ：オリゴリボヌクレオチド、
・ＡＰ：アルカリホスファターゼ、
・ＰＢＳ　１ｘ：リン酸緩衝食塩水＝（０．０１Ｍ ＰＯ$_4$－、０．００２７Ｍ ＫＣｌ、０．１３７Ｍ ＮａＣｌ、２５℃でｐＨ＝７．４ ＳＩＧＭＡ 参照番号４４１７、Ｓａｉｎｔ Ｌｏｕｉｓ、ＵＳＡ），
・ＰＦＰ：ペンタフルオロフェノール、
・ｑ：四重項、
・Ｙｌｄ：収率、
・Ｒｆ又はＴＲ：保持時間、
・ＮＭＲ：核磁気共鳴、

・ｒｐｍ：毎分回転数、
・ｓ：一重項、
・ＳＳ：ジスルフィド結合、
・ｔ：三重項、
・Ｒｔ又はＲＴ：室温、
・ＴＥＡＡｃ：酢酸トリエチルアンモニウム、
・Ｄｆ：官能化度、
・ＴＦＡ：トリフルオロ酢酸、
・ＴＨＦ：テトラヒドロフラン、
・ＵＶ：紫外線。

以下の実施例に用いる化合物の分析及び合成のための一般的条件を以下に記載する：
ＬＣ－ＭＳ分析は、３０℃で１ｍｌ／分の流れを用いて（２６０ｎｍ又は最大プロットで検出）、ＰＤＡ９９６（Waters）ダイオードアレイ検出器、ＺＱ２０００（Waters）質量分析検出器、Ｅｍｐｏｗｅｒバージョン２ソフトウェア及びＷＡＴＥＲＳ ＸＴｅｒｒａ ＭＳ Ｃ１８カラム（４．６×３０ ２．５μＭ）を備えるＨＰＬＣ ＷＡＴＥＲＳ Ａｌｌｉａｎｃｅ ２７９５ ｃｈａｉｎにより行った。ＺＱ２０００質量分析器はエレクトロスプレーイオン化源を有する。イオン化は、２０Ｖのコーン電圧及び３．５ｋＶのキャピラリー電圧を用いてポジティブモードで行った。
ＨＰＬＣ分析に用いた条件は以下の通りである（条件１）：

溶出液Ａ	溶出液Ｂ	溶出液Ｃ	直線勾配
MilliQ 水	アセトニトリル	ギ酸アンモニウム 500 mM pH 7	アイソクラティックモードで、溶出液Ｃ２％を含み、１８分で、Ａ ９８％/ B0%からＡ２４％/B74%

表 1:ＨＰＬＣ分析に用いた条件

【０１０３】
ＮＭＲスペクトルは、Ｊｅｏｌ Ｌａｍｂｄａ ４００ＭＨｚ分光計又はＢｒｕｅｋｅｒ Ａｖａｎｃｅ ５００ＭＨｚ分光計で記録した。化学シフト（δ）は、内部標準とみなす溶媒ピーク（ＣＤＣｌ$_3$：７．２４ｐｐｍ；ＤＭＳＯ－ｄ６：２．４９ｐｐｍ）に対するｐｐｍで与える。スペクトルは、上記略語：ｓ、ｄ、ｔ、ｑ、ｑｕ、ｍ及びＭで記載する。カップリング定数（Ｊ）はヘルツ（Ｈｚ）で表す。スペクトルは、上記略語：ｓ、ｄ、ｔ、ｑ、ｑｕ、ｍ及びＭで記載する。カップリング定数（Ｊ）はヘルツ（Ｈｚ）で表す。
【０１０４】
カラムクロマトグラフィーは、シリカゲルＭａｃｈｅｒｅｙ－Ｎａｇｅｌ Ｋｉｅｓｅｌｇｅｌ ６０、０．０６３－０．２ｍｍ／７０－２３０メッシュ又はＭｅｒｃｋ ＬｉＣｈｒｏｐｒｅｐ（登録商標）ＲＰ－１８ ４０－６３μｍで実施した。
【０１０５】
薄層クロマトグラフィーによる分析は、Ｍａｃｈｅｒｅｙ－Ｎａｇｅｌ ｐｌａｔｅｓ ＰＯＬＹＧＲＡＭ（登録商標）ＳＩＬ Ｇ／ＵＶ２５４、０．２０ｍｍ又はＡＬＵＧＲＡＭ（登録商標）ＲＰ－１８ Ｗ／ＵＶ２５４ ０．１５ｍｍで実施した。
【０１０６】
実施例１：目的の基とコンジュゲートしたアザイサト酸無水物誘導体の合成
序論：実施例１に記載される化合物の合成の一般的詳述。

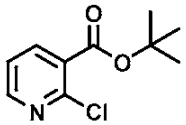
アザイサト酸無水物又はその誘導体の目的の基とのコンジュゲーションは、反応性官能基を備えたアザイサト酸無水物と同様に反応性官能基を備えた目的の分子との間の化学反応を想定している。このカップリングの間アザイサト酸無水物部分の完全性を維持することが特に重要であることに留意のこと。当業者は、両方に共通の特性を有する新たな分子を得るために、このように２つの分子をコンジュゲートさせる多くの方法を知っている。

【０１０７】

この合成のために選択された戦略は、化合物４を得るために、ｔｅｒｔ－ブチルエステルの形態で保護された２、ニコチン酸の６位でのヨウ素化に基づいている。次いで、これをカルボン酸官能基の前駆体を６位に挿入することを可能とし（化合物５）、前記官能基は、リンケージの導入、次いで擬似ペプチドタイプのカップリングによる目的の基の導入のための付着点となるであろう。図３に明らかに示されるように、最後の工程では、ホスゲンの存在下で、ｔｅｒｔ－ブチルアミノエステル１１又は１２の分子内環化により、アザイサト酸無水物の形成が起こる。この戦略によって、合成を通じて、それが安定前駆体上で機能することが可能となる。より壊れやすいアザイサト酸無水物が合成され、精製され、最後に精製される。ｔｅｒｔ－ブチルアミノエステルから出発して、アザイサト酸無水物への直接アクセスを可能にするプロトコルでは、一般的に、無水物の形成は、適切に置換されたアザアントラニレートから出発して行われた。最後に、この合成経路は汎用性があり、非常に多くのリンケージ及び目的の基に適用させることができ；その主な利点は、目的の基若しくはリンケージ又は塩基に不安定なそれらの前駆体の１つを使用する可能性である。

【０１０８】

実施例１.１：ｔｅｒｔ－ブチル２－クロロニコチン酸の合成：



2

$C_{10}H_{12}NO_2Cl$

M=213.66 g/mol

【０１０９】

２５０ｍＬのフラスコ中で、２－クロロニコチン酸５ｇ（３１．７３ｍｍｏｌ；１当量）を無水ＴＨＦ１００ｍＬに溶解する。塩化オキサリルの５．３７ｍＬの容積（６３．４７ｍｍｏｌ；２当量）と、ＤＭＦ５滴を０℃で反応混合物に連続的に加える。この混合物を２時間室温で磁気的に攪拌する。次いで、反応混合物を蒸発乾固させ、得られた油を無水ＴＨＦ１００ｍＬに溶解させる。ｔＢｕＯＫの４．２７ｇ（３８．０８ｍｍｏｌ、１．２当量）の量を－１０℃で添加し、反応混合物を室温で２時間磁気的に撹拌する。

【０１１０】

反応混合物を蒸発乾固し、K_2CO_3の５％水溶液２００ｍＬに溶解し、次いで、ジクロロメタン（３×１５０ｍＬ）で抽出する。次に有機相を混合し、無水硫酸ナトリウム上で乾燥し、濾過し、最後に蒸発させる。最終生成物は、８８％の収率で油の形態で得られる（５．９７ｇ；２７．９４ｍｍｏｌ）。

【０１１１】

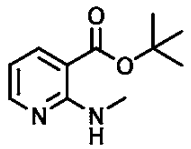
ＩＲ（ＫＢｒ）：ν １７３２（Ｃ＝Ｏ）、１５７９、１４０３、１３７０、１３１５、１２８８、１１７３、１１４４、１０６５、１０５６cm^{-1}.

^{1}ＨＮＭＲ（４００ＭＨｚ、$CDCl_3$）：δ１．６２（ｓ、９Ｈ）；７．３１（ｄｄ、１Ｈ、^{3}Ｊ＝７．８Ｈｚ、^{3}Ｊ＝４．４Ｈｚ）；８．０７（ｄｄ、１Ｈ、^{3}Ｊ＝７．８Ｈｚ、^{4}Ｊ＝１．９Ｈｚ）；７．３１（ｄｄ、１Ｈ、^{3}Ｊ＝４．４Ｈｚ、^{4}Ｊ＝１．９Ｈｚ

）．
^{13}ＣＮＭＲ（１００ＭＨｚ、ＣＤＣｌ$_3$）：δ２８．０（３Ｃ）；８３．３；１２２．０；１２８．８；１３９．８；１４９．４；１５１．２；１６３．９．
ＨＲＭＳ（ＥＳＩ）理論値Ｃ$_{10}$Ｈ$_{12}$ＮＯ$_2$Ｃｌ［Ｍ＋Ｈ］$^+$ ２１４．０６３５；実験値 ２１４．０６３８．

【０１１２】

実施例１．２：ｔｅｒｔ－ブチル２－（メチルアミノ）ニコチン酸の合成：



3

$C_{11}H_{16}N_2O_2$

M=208.26 g/mol

【０１１３】

３０ｍＬの密封管に、ｔｅｒｔ－ブチル２－クロロニコチン酸２の２．８２ｇ（１３．２０ｍｍｏｌ；１当量）をメタノール４．６ｍＬに溶解する。メチルアミンの４０％水溶液４．６ｍＬ（５３．２６ｍｍｏｌ；４当量）を室温で反応混合物に添加する。反応物を１００℃で２時間磁気的に攪拌する。

【０１１４】

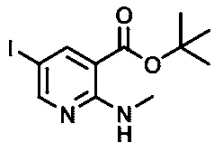
反応混合物を蒸発乾固し、水７５ｍＬに溶解し、次いで、ジクロロメタン（３×７５ｍＬ）で抽出する。次に有機相を混合し、無水硫酸ナトリウム上で乾燥し、濾過し、最後に蒸発させる。次いで、得られた油を溶離液の勾配（ＰＥ次いでＰＥ／Ｅｔ$_2$Ｏ ９．５：０．５）を用いてシリカゲルカラムで精製する。最終生成物は、８５％の収率で油の形態で得られる（２．３５ｇ；１１：２８ｍｍｏｌ）。

【０１１５】

ＩＲ（ＫＢｒ）：ν ３３８０（ＮＨ），１６８４（Ｃ＝Ｏ），１５９５，１５８３、１５２０、１３９２、１３０５、１２６２、１２５０、１１７２、１１２６ｃｍ$^{-1}$．
^{1}ＨＮＭＲ（４００ＭＨｚ、ＣＤＣｌ$_3$）：δ１．５７（ｓ、９Ｈ）；３．０５（ｄ、３Ｈ、^{3}Ｊ＝４．９Ｈｚ）；６．４９（ｄｄ、１Ｈ、^{3}Ｊ＝７．５Ｈｚ、^{3}Ｊ＝４．４Ｈｚ）；７．９８（ｓｌ、１Ｈ）；８．０４（ｄｄ、１Ｈ、^{3}Ｊ＝７．５Ｈｚ、^{4}Ｊ＝２．０Ｈｚ）；８．２８（ｄｄ、１Ｈ、^{3}Ｊ＝４．４Ｈｚ、^{4}Ｊ＝２．０Ｈｚ）．
^{13}ＣＮＭＲ（１００ＭＨｚ、ＣＤＣｌ$_3$）：δ２７．８；２８．２（３Ｃ）；８１．２；１０７．５；１１０．４；１３９．９；１５３．０；１５９．３；１６７．１．
ＨＲＭＳ（ＩＥ）理論値Ｃ$_{11}$Ｈ$_{16}$Ｎ$_2$Ｏ$_2$［Ｍ］$^+$ ２０８．１２１２；実験値２０８．１２１３．

【０１１６】

実施例１．３：ｔｅｒｔ－ブチル－５－ヨード－２－（メチルアミノ）ニコチン酸の合成：

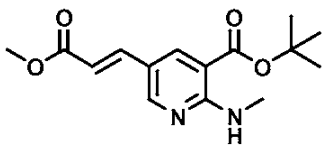


4

$C_{11}H_{15}IN_2O_2$

M=334.15 g/mol

【０１１７】
１００ｍＬのフラスコ中で、ｔｅｒｔ－ブチル２－（メチルアミノ）ニコチン酸３を４．５ｇ（２１．６１ｍｍｏｌ；１当量）を、ジクロロメタン／酢酸混合物（６：１）の３０ｍＬに溶解させる。Ｎ－ヨードスクシンイミド５．８３ｇ（２５．９３ｍｍｏｌ；１．２当量）を室温で反応混合物に添加する。反応物を室温で３０分間磁気的に攪拌する。
【０１１８】
次いで、反応混合物はチオ硫酸ナトリウムの飽和水溶液７ｍＬで中和し、K_2CO_3の５％水溶液１００ｍＬに溶解し、次いで、ジクロロメタン（３×１００ｍＬ）で抽出する。次に有機相を混合し、無水硫酸ナトリウム上で乾燥し、濾過し、最後に蒸発させる。次いで、得られた個体を溶離液の勾配（ＰＥ次いでＰＥ／Et_2O ９：１）を用いてシリカゲルカラムで精製する。最終生成物は、９６％の収率で黄色い粉末形態で得られる（６．９２ｇ；２０．７１ｍｍｏｌ）。
【０１１９】
融点：１０１°Ｃ．
ＩＲ（ＫＢｒ）：ν ３３７１（ＮＨ）、１６７９（Ｃ＝Ｏ）、１５８８、１５６９、１５０５、１３６７、１３０７、１２４３、１１６７、１１４０、１１０７、７９６cm^{-1}．
^{1}ＨＮＭＲ（４００ＭＨｚ、$CDCl_3$）：δ１．５７（ｓ、９Ｈ）；３．０１（ｄ、３Ｈ、^{3}Ｊ＝４．９Ｈｚ）；７．９７（ｓｌ、１Ｈ）；８．２１（ｄ、１Ｈ、^{4}Ｊ＝２．０Ｈｚ）；８．４０（ｄ、１Ｈ、^{4}Ｊ＝２．０Ｈｚ）．
^{13}ＣＮＭＲ（１００ＭＨｚ、$CDCl_3$）：δ２７．８；２８．２（３Ｃ）；７３．１；８２．０；１０９．８；１４６．８；１５７．９；１５８．３；１６６．０．
ＨＲＭＳ（ＩＥ） 理論値 $C_{11}H_{15}N_2O_2I$ $[M]^+$ ３３４．０１７９；実験値 ３３４．０１６７．
【０１２０】
実施例１．４：ｔｅｒｔ－ブチル ５－［（１Ｅ）－３－メトキシ－３－オキソプロプ－１－イン－１－イル］－２－（メチルアミノ）ニコチン酸の合成：



5

$C_{15}H_{20}N_2O_4$

M=292.33 g/mol

【０１２１】
２５０ｍＬのフラスコ中で、トリフェニルホスフィン３９４ｍｇ（１．５０ｍｍｏｌ；０．１当量）、酢酸パラジウム１６８ｍｇ（０．７５ｍｍｏｌ；０．０５当量）及び２．

０８ｍＬのトリエチルアミン（１４．９６ｍｍｏｌ、１当量）を、先に窒素下で脱気したジオキサン５０ｍＬに溶解させる。混合物を１００℃で５分間磁気的に攪拌する。ヨウ化誘導体４の５ｇ（１４．９６ｍｍｏｌ；１当量）とアクリル酸メチル６．７４ｍＬ（７４．８２ｍｍｏｌ；５当量）を添加し、反応物を４時間１００℃で磁気的に攪拌する。

【０１２２】

反応混合物を蒸発乾固し、ジクロロメタン５０ｍＬに溶解し、次いで、セライトで濾過する。水２００ｍＬを添加し、混合物をジクロロメタン（３×１５０ｍＬ）で抽出する。次に有機相を混合し、無水硫酸ナトリウム上で乾燥し、濾過し、最後に蒸発させる。次いで、得られた個体を溶離液の勾配（ＰＥからＰＥ／Ｅｔ$_2$Ｏ ７:３）を用いてシリカゲルカラムで精製する。最終生成物は、７６％の収率で黄色い粉末形態で得られる（３．３３ｇ；１１．３９ｍｍｏｌ）。

【０１２３】

融点：１１４°Ｃ.

ＩＲ（ＫＢｒ）：ν ３３７３（ＮＨ）、１７２０（Ｃ＝Ｏ）、１６９３（Ｃ＝Ｏ）、１６３４、１６０４、１５８５、１５２６、１３１７、１２６６、１２５３、１２０３、１１８８、１１６１、１１３４ｃｍ$^{-1}$.

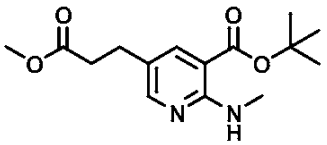
^{1}ＨＮＭＲ（４００ＭＨｚ、ＣＤＣｌ$_3$）：δ１．５９（ｓ、９Ｈ）；３．０９（ｄ、３Ｈ、^{3}Ｊ＝４．９Ｈｚ）；３．８０（ｓ、３Ｈ）；６．２７（ｄ、１Ｈ、^{3}Ｊ＝１５．８Ｈｚ）；７．５９（ｄ、１Ｈ、^{3}Ｊ＝１５．８Ｈｚ）；８．２２（ｄ、１Ｈ、^{4}Ｊ＝２．４Ｈｚ）；８．３０（ｓｌ、１Ｈ）；８．４１（ｄ、１Ｈ、^{4}Ｊ＝２．４Ｈｚ）.

^{13}ＣＮＭＲ（１００ＭＨｚ、ＣＤＣｌ$_3$）：δ２８．０；２８．２（３Ｃ）；５１．５；８２．１；１０７．７；１１３．７；１１７．６；１３８．２；１４１．２；１５３．９；１５９．６；１６６．５；１６７．６.

ＨＲＭＳ（ＩＥ） 理論値 Ｃ$_{15}$Ｈ$_{20}$Ｎ$_2$Ｏ$_4$ ［Ｍ］$^+$ ２９２．１４２３；実験値２９２．１４１３.

【０１２４】

実施例１．５：ｔｅｒｔ－ブチル ５－（３－メトキシ－３－オキソプロピル）－２－（メチルアミノ）ニコチン酸の合成：



6

$C_{15}H_{22}N_2O_4$

M=294.35 g/mol

【０１２５】

５００ｍＬのフラスコ中で、ビニル誘導体５の６ｇ（２０．５２ｍｍｏｌ；１当量）を、酢酸エチル２５０ｍＬに溶解させる。Ｐｄ／Ｃの２．１ｇを添加し、反応物を２４時間水素気流下、室温で磁気的に攪拌する。

【０１２６】

反応混合物をビューヒナーで次いでセライト上で濾過し、最終的に蒸発乾固する。次いで、得られた個体を溶離液の勾配（ＰＥからＰＥ／Ｅｔ$_2$Ｏ ７：３）を用いてシリカゲルカラムで精製する。最終生成物は、８１％の収率で黄色い粉末形態で得られる（４．８８ｇ；１６．５８ｍｍｏｌ）。

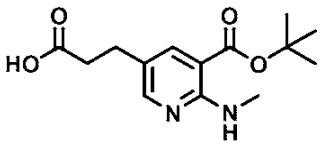
【０１２７】

融点：６９°Ｃ.

ＩＲ（ＫＢｒ）：ν ３３９２（ＮＨ）、１７３６（Ｃ＝Ｏ）、１６９０（Ｃ＝Ｏ）、１

５７４、１５２０、１３７１、１２２７、１１９４、１１７３、１１５６、１１２７、１０９０、８０２ｃｍ$^{-1}$．
^{1}ＨＮＭＲ（４００ＭＨｚ、ＣＤＣｌ$_{3}$）：δ１．５７（ｓ、９Ｈ）；２．５８（ｔ、２Ｈ、^{3}Ｊ＝７．８Ｈｚ）；２．８２（ｔ、２Ｈ、^{3}Ｊ＝７．８Ｈｚ）；３．０３（ｄ、３Ｈ、^{3}Ｊ＝４．９Ｈｚ）；３．６８（ｓ、３Ｈ）；７．８５（ｓｌ、１Ｈ）；７．８７（ｓ、１Ｈ）；８．１４（ｓ、１Ｈ）．
^{13}ＣＮＭＲ（１００ＭＨｚ、ＣＤＣｌ$_{3}$）：δ２７．１；２７．９；２８．２（３Ｃ）；３５．８；５１．７；８１．４；１０７．３；１２２．０；１３９．７；１５２．７；１５８．２；１６７．０；１７３．１．
ＨＲＭＳ（ＥＳＩ）理論値Ｃ$_{10}$Ｈ$_{22}$Ｎ$_{2}$Ｏ$_{4}$［Ｍ＋Ｈ］$^{+}$ ２９５．１６５８；実験値 ２９５．１６５５．

【０１２８】
実施例１．６：３－｛５－［（ｔｅｒｔ－ブトキシ）カルボニル］－６－（メチルアミノ）ピリジン－３－イル｝プロパン酸の合成：



7

$C_{14}H_{20}N_2O_4$

M=280.32 g/mol

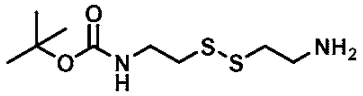
【０１２９】
２５０ｍＬのフラスコ中で、誘導体６の４．８７ｇ（１６．５４ｍｍｏｌ；１当量）を、テトラヒドロフラン５０ｍＬに溶解させる。水酸化リチウムの１Ｍ水溶液を５０ｍＬ（５０ｍｍｏｌ；３当量）を加え、反応物を４５分間室温で磁気的に攪拌する。

【０１３０】
反応混合物を、テトラヒドロフランを除去するために、蒸発させる。得られた水溶液のｐＨを酢酸で６に調整する。次いで、この溶液を酢酸エチル（４×５０ｍＬ）で抽出する。次に有機相を混合し、無水硫酸ナトリウム上で乾燥し、濾過し、そして最後に、トルエンで共蒸発させる。最終生成物は、９２％の収率で黄色い粉末形態で得られる（４．２５ｇ；１５．１６ｍｍｏｌ）。

【０１３１】
融点：１０６°Ｃ．
ＩＲ（ＫＢｒ）：ν ３３７４（ＮＨ）、１７１３（Ｃ＝Ｏ）、１６８３（Ｃ＝Ｏ）、１５８４、１５３８、１３６７、１３４２、１３０４、１２８２、１２４５、１１９２、１１６９、１１３９、１１０１、８０１ｃｍ$^{-1}$．
^{1}ＨＮＭＲ（４００ＭＨｚ、ＣＤＣｌ$_{3}$）：δ１．５７（ｓ、９Ｈ）；２．６２（ｄ、２Ｈ、^{3}Ｊ＝７．８Ｈｚ）；２．８５（ｔ、２Ｈ、^{3}Ｊ＝７．８Ｈｚ）；３．０２（ｔ、３Ｈ、^{3}Ｊ＝４．９Ｈｚ）；７．９２（ｄ、１Ｈ、^{4}Ｊ＝２．０Ｈｚ）；７．９５（ｓｌ、１Ｈ）；８．２０（ｓ、１Ｈ）．
^{13}ＣＮＭＲ（１００ＭＨｚ、ＣＤＣｌ$_{3}$）：δ２７．０；２８．１；２８．２（３Ｃ）；３５．９；８１．６；１０７．８；１２２．２；１４０．５；１５２．６；１５７．９；１６６．８；１７７．０．
ＨＲＭＳ（ＥＳＩ）理論値Ｃ$_{14}$Ｈ$_{20}$Ｎ$_{2}$Ｏ$_{4}$［Ｍ＋Ｈ］$^{+}$ ２８１．１５０１；実験値 ２８１．１５００．

【０１３２】
実施例１．７：ｔｅｒｔ－ブチル Ｎ－｛２－［（２－アミノエチル）ジスルファニル］

エチル} カルバミン酸の合成：



8

$C_9H_{20}N_2O_2S_2$

M=252.40 g/mol

【０１３３】

２５０ｍＬのフラスコ中で、シスタミン６ｇ（２６．６４ｍｍｏｌ；１当量）をメタノール５０ｍＬに溶解する。ＴＥＡの１１．１４ｍＬ中に、Ｂｏｃ$_2$Ｏの５．８１４ｇ（２６．６４ｍｍｏｌ；１当量）とＴＦＡの１１．１４ｍＬ（７９．１２ｍｍｏｌ；３当量）の溶液が、次いで、シスタミン溶液に対して、４５分間、室温で磁気撹拌しながら滴下される。

【０１３４】

次いで、反応混合物を、蒸発乾固させ、白色の固体を得る。得られた固体は、ＮａＨ$_2$ＰＯ$_4$の１Ｍ溶液７０ｍＬ中に取り込まれる。次いで、この溶液をジエチルエーテル（３×９０ｍＬ）で抽出する。水相を、１ＭのＮａＯＨ溶液を用いてｐＨ９にアルカリ化する。次いで、混合物を酢酸エチル（６×５０ｍＬ）で抽出する。有機相を混合し、ＭｇＳＯ$_4$で乾燥し、次いで、真空下で蒸発させる。

【０１３５】

生成物は、４２％の収率で油の形態で得られる（２．８２ｇ；１１．１９ｍｍｏｌｌ）。

【０１３６】

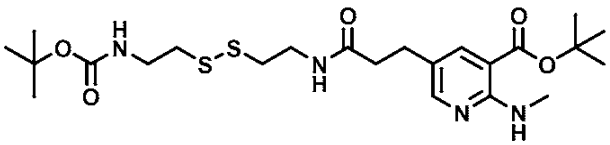
ＩＲ（ＫＢｒ）：ν ３３５６（ＮＨ）、２９７６、２９３０、１６９４（ＣＯ）、１５１７、１３９２、１３６６、１２７５、１２５３、１１７０ｃｍ$^{-1}$．

^{1}ＨＮＭＲ（４００ＭＨｚ、ＣＤＣｌ$_3$）：δ１．４５（ｓ、９Ｈ）；１．７５（ｓ、２Ｈ）；２．７８（ｍ、４Ｈ）；３．０３（ｍ、２Ｈ、Ｊ＝５Ｈｚ）；３．４６（ｍ、２Ｈ）；５．０１（ｓ、１Ｈ）．

^{13}ＣＮＭＲ（１００ＭＨｚ、ＣＤＣｌ$_3$）：δ３８．１；３９．２；４０．１；４１．３；７９．４；１５５．７．

【０１３７】

実施例１．８：ｔｅｒｔ－ブチル ５－［２－（｛２－［（２－｛［（ｔｅｒｔ－ブトキシ）カルボニル］アミノ｝エチル）ジスルファニル］エチル｝カルバモイル）エチル］－２－（メチルアミノ）ニコチン酸の合成：



9

$C_{23}H_{38}N_4O_5S_2$

M=514.7 g/mol

【０１３８】

２５０ｍＬのフラスコ中で、酸誘導体７を３ｇ（１０．７０ｍｍｏｌ；１当量）、ＥＤＣを３．０８ｇ（１６．０６ｍｍｏｌ；１．５当量）及びＨＯＢｔを２．１７ｇ（１６．０６ミリモル；１．５当量）がジクロロメタン５０ｍＬに溶解される。室温で１０分後、

２．９７ｇのアミノ誘導体８を添加し、次いで反応物を２時間室温で撹拌する。

【０１３９】

反応混合物を蒸発乾固させ、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液７５ｍＬに溶解し、次いで酢酸エチル（４×７５ｍＬ）で抽出する。次いで有機相を混合し、無水硫酸ナトリウム上で乾燥し、濾過する。次いで、得られた個体を溶離液の勾配（ＤＣＭ／ＥｔＯＡｃ　８／２からＤＣＭ／ＥｔＯＡｃ　２／８）を用いてシリカゲルカラムで精製する。最終生成物は、９４％の収率で白い粉末形態で得られる（５．２ｇ；１０．１０ｍｍｏｌ）。

【０１４０】

融点：１０６°Ｃ．

ＩＲ（ＫＢｒ）：ν ３３８５（ＮＨ）、３３３８（ＮＨ）、３２７５（ＮＨ）、１６８２（Ｃ＝Ｏ）、１６５４（Ｃ＝Ｏ）、１５６９、１５４７、１５３８、１５１１、１３８９、１３６６、１３０３、１２８９、１２５３、１２２９、１１６５、１１２６ｃｍ$^{-1}$．

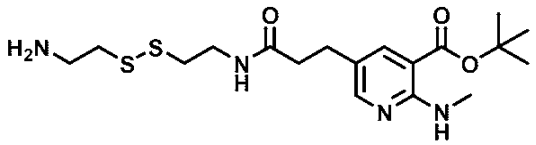
^{1}ＨＮＭＲ（４００ＭＨｚ、ＣＤＣｌ$_{3}$）：δ１．４３（ｓ、９Ｈ）；１．５７（ｓ、９Ｈ）；２．４７（ｔ、２Ｈ、^{3}Ｊ＝７．５Ｈｚ）；２．７４（ｔ、２Ｈ、^{3}Ｊ＝６．８Ｈｚ）；２．８３（ｍ、４Ｈ）；３．０３（ｄ、３Ｈ、^{3}Ｊ＝４．９Ｈｚ）；３．４２（ｑ、２Ｈ、^{3}Ｊ＝６．４Ｈｚ）；３．５５（ｑ、２Ｈ、^{3}Ｊ＝５．８Ｈｚ）；５．０３（ｓｌ、１Ｈ）；６．５１（ｓｌ、１Ｈ）；７．８４（ｓｌ、１Ｈ）；７．８７（ｄ、１Ｈ、^{4}Ｊ＝１．３Ｈｚ）；８．１４（ｄ、１Ｈ、^{4}Ｊ＝１．３Ｈｚ）．

^{13}ＣＮＭＲ（１００ＭＨｚ、ＣＤＣｌ$_{3}$）：δ２７．９（２Ｃ）；２８．２（３Ｃ）；２８．３（３Ｃ）；３７．４；３８．０；３８．３；３８．５；３９．５；７９．７；８１．３；１０７．２；１２２．４；１３９．８；１５２．８；１５５．９；１５８．２；１６７．０；１７２．２．

ＨＲＭＳ（ＥＳＩ）理論値 Ｃ$_{23}$Ｈ$_{38}$Ｎ$_{4}$Ｏ$_{5}$Ｓ$_{2}$ ［Ｍ＋Ｈ］$^{+}$ ５１５．２３６２；実験値 ５１５．２３４２．

【０１４１】

実施例１．９：ｔｅｒｔ－ブチル ５－［２－（｛２－［（２－アミノエチル）ジスルファニル］エチル｝カルバモイル）エチル］－２－（メチルアミノ）ニコチン酸の合成：



10

$C_{18}H_{30}N_4O_3S_2$

M=414.59 g/mol

【０１４２】

１００ｍＬのフラスコ中に窒素下で、誘導体９の２ｇ（３．８９ｍｍｏｌ；１当量）を、ジクロロメタン１５ｍＬに溶解させる。トリフルオロ酢酸５ｍＬ（６５．２９；１６．８当量）を加え、反応物を３０分間室温で磁気的に撹拌する。

【０１４３】

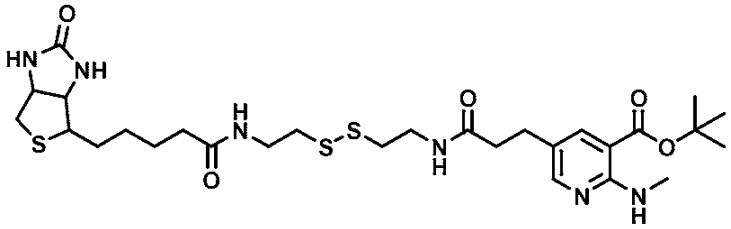
反応混合物を蒸発乾固させ、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液５０ｍＬに溶解し、次いで酢酸エチル（４×５０ｍＬ）で抽出する。次いで有機相を混合し、水（２×５０ｍＬ）で洗浄し、無水硫酸ナトリウム上で乾燥し、濾過する。最終生成物は、定量的収率で油の形態で得られる（１．６ｇ；３．８６ｍｍｏｌ）。

【０１４４】

ＩＲ（ＫＢｒ）：ν ３３７８（ＮＨ）、２９７７、２９３１、１６８２（ＣＯ）、１６１２、１５７８、１５２０、１３６８、１３０４、１２２８、１１６０、１１３１、１０

９５、９１０、７３２ｃｍ$^{-1}$.
^{1}ＨＮＭＲ（４００ＭＨｚ、ＣＤＣｌ$_{3}$）：δ１．５８（ｓ、９Ｈ）；１．６４（ｓｌ、２Ｈ）；２．４２（ｔ、２Ｈ、^{3}Ｊ＝７．６Ｈｚ）；２．７６（ｔ、４Ｈ、^{3}Ｊ＝６．１Ｈｚ）；２．８４（ｔ、４Ｈ、^{3}Ｊ＝７．６Ｈｚ）；３．０３（ｄ、３Ｈ、^{3}Ｊ＝４．９Ｈｚ）；３．０３（ｍ、２Ｈ）；３．５８（ｑ、２Ｈ、^{3}Ｊ＝６．１Ｈｚ）；６．００（ｓｌ、１Ｈ）；７．８４（ｓｌ、１Ｈ）；７．８７（ｄ、１Ｈ、^{4}Ｊ＝２．４Ｈｚ）；８．１４（ｄ、１Ｈ、^{4}Ｊ＝２．４Ｈｚ）.
^{13}ＣＮＭＲ（１００ＭＨｚ、ＣＤＣｌ$_{3}$）：δ２７．７；２７．８；２８．１（３Ｃ）；３７．４；３７．９；３８．３；４０．３；４１．９；８１．３；１０７．１；１２２．２；１３９．７；１５２．５；１５８．０；１６６．８；１７１．９.
ＨＲＭＳ（ＥＳＩ）理論値 Ｃ$_{18}$Ｈ$_{30}$Ｎ$_{4}$Ｏ$_{3}$Ｓ$_{2}$ ［Ｍ＋Ｈ］$^{+}$ ４１５．１８３８；実験値 ４１５．１８２１.

【０１４５】
実施例１．１０：ｔｅｒｔ－ブチル ５－［２－（｛２－［（２－｛５－［（３ａＳ，６ａＲ）－２－オキソ－ヘキサヒドロ－１Ｈ－チエノ［３，４－ｄ］イミダゾリジン－４－イル］ペンタンアミド｝エチル）ジスルファニル］エチル｝カルバモイル）エチル］－２－（メチルアミノ）ニコチン酸の合成：



11

$C_{28}H_{44}N_{6}O_{5}S_{3}$

M=640.88 g/mol

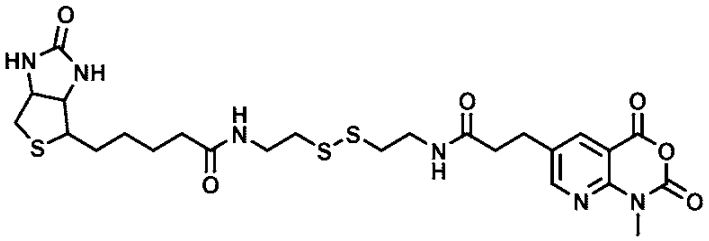
【０１４６】
１００ｍＬのフラスコ中で、アミノ誘導体１０の５００ｍｇ（１．２１ｍｍｏｌ；１当量）を、無水ジメチルホルムアミド２０ｍＬに溶解させる。Ｂｉｏｔ－ＣＯＮＨＳの４１２ｍｇ（１５、１４．９６ｍｍｏｌ；１当量）とトリエチルアミンの１６８μＬ（１．２１ｍｍｏｌ；１当量）を添加し、反応物を室温で１時間磁気的に攪拌する。

【０１４７】
反応混合物を蒸発乾固し、溶離液の勾配（Ｈ$_{2}$ＯからＨ$_{2}$Ｏ／ＡＣＮ ３／７）を用いて、グラフトされたＣ１８シリカゲルカラムで直接精製した。最終生成物は、７０％の収率で白い粉末形態で得られる（５４５ｍｇ；０．８５ｍｍｏｌ）。

【０１４８】
融点：１０８°Ｃ.
ＩＲ（ＫＢｒ）：ν ３２９７（ＮＨ）、３０７４、２９２８、２８５３、１７０４（ＣＯ）、１６８３（ＣＯ）、１６４２（ＣＯ）、１６１３、１５７８、１５２０、１２２６、１１５９、１０９４、８０３、７２７、５９７ｃｍ$^{-1}$.
^{1}ＨＮＭＲ（５００ＭＨｚ、ＤＭＳＯ－ｄ６）：δ１．４２（ｍ、２Ｈ）；１．５７（ｓ、９Ｈ）；１．６０－１．７３（ｍ、４Ｈ）；２．２３（ｔｄ、２Ｈ、^{4}Ｊ＝２．９Ｈｚ、^{3}Ｊ＝７．２Ｈｚ，）；２．４７（ｔ、２Ｈ、^{3}Ｊ＝７．５Ｈｚ）；２．７１（ｄ、１Ｈ、^{2}Ｊ＝１２．８Ｈｚ）；２．７８－２．８８（ｍ、６Ｈ）；２．８９（ｄｄ、１Ｈ、^{3}Ｊ＝４．９Ｈｚ、^{2}Ｊ＝１２．８Ｈｚ）；３．０１（ｄ、３Ｈ、^{3}Ｊ＝４．９Ｈｚ）；３．１０－３．１５（ｍ、１Ｈ）；３．５０－３．５４（ｍ、４Ｈ）；４．３０（ｄｄ、１Ｈ、^{3}Ｊ＝４．５Ｈｚ、^{3}Ｊ＝７．５Ｈｚ）；４．５０（ｄｄ、１Ｈ、^{3}Ｊ＝４．９Ｈ

z、^{3}J＝7．5Hz）；5．71（sl、1H）；6．58（sl、1H）；6．85（t、1H、^{3}J＝5．8Hz）；7．09（t、1H、^{3}J＝5．8Hz）；7．83（q、1H、^{3}J＝4．9Hz）；7．88（d，、1H ^{4}J＝2．4Hz）；8．14（d、1H、^{4}J＝2．4Hz）．
^{13}CNMR（125MHz、DMSO－d6）：δ25．6；27．9；27．9；28．0；28．1；28．3（3C）；35．7；37．6；38．0；38．2；38．4；38．5；40．6；55．7；60．2；61．7；81．5；107．4；122．6；140．0；152．6；158．2；164．1；167．0；172．6；173．8．
HRMS（ESI）理論値 $C_{28}H_{44}N_6O_5S_3$ ［M＋H］$^{+}$ 641．2614；実験値 641．2626．

【0149】
実施例1．11：［（3aS，6aR）－2－オキソ－ヘキサヒドロ－1H－チエノ［3，4－d］イミダゾリジン－4－イル］－N－（2－｛［2－（3－｛1－メチル－2，4－ジオキソ－1H，2H，4H－ピリド［2，3－d］［1，3］オキサジン－6－イル｝プロパンアミド）エチル］ジスルファニル｝エチル）ペンタンアミドの合成：



12

$C_{25}H_{34}N_6O_6S_3$

M=610.77 g/mol

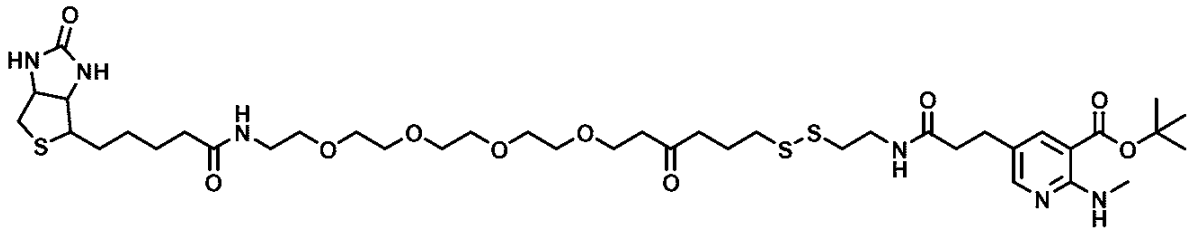
【0150】
30mLのフラスコ中で、誘導体11の500mg（0．78mmol；1当量）を、ジエチルエーテル20mLに溶解させる。トルエン中20％ホスゲン溶液の1．23mLの（2．34mmol；1当量）及びトリエチルアミン325μL（2．34mmol；3当量）が添加され、反応物を室温で30分間磁気的に攪拌する。

【0151】
反応混合物を蒸発乾固し、溶離液の勾配（H_2OからH_2O／ACN　4／6）を用いて、グラフトされたC18シリカゲルカラムで直接精製した。最終生成物は、42％の収率で白い粉末形態で得られる（200mg；0．33mmol）。

【0152】
融点：125°C．
IR（KBr）：ν 3299（NH）、2927、1785（CO）、1735（CO）、1704（CO）、1641（CO）、1612、1488、1326、1232、1179、1069、1045、979、787、745、674cm^{-1}．
^{1}HNMR（500MHz、DMSO－d6）：δ1．24－1．34（m、2H）；1．41－1．59（m、4H）；2．05（t、^{3}J＝7．4Hz、2H）；2．44（t、2H、^{3}J＝7．4Hz）；2．56（d、1H、^{2}J＝12．4Hz）；2．68－2．73（m、4H）；2．80（dd、1H、^{3}J＝5．0Hz、^{2}J＝12．4Hz）；2．90（t、2H、^{3}J＝7．4Hz）；3．26－3．29（m、4H）；3．47（s、3H）；4．11（m、1H）；4．28（m、1H）；6．35（sl、1H）；6．41（sl、1H）；7．97（t、1H、^{3}J＝5．5Hz）；8．06（t、1H、^{3}J＝5．5Hz）；8．21（d、1H、^{4}J＝2．2Hz）；8．62

（d、1H、^{4}J＝2．2Hz）．
^{13}CNMR（125MHz、DMSO－d6）：δ25．2；26．9；27．9；28．1；29．9；35．1；36．0；37．2（2C）；37．8；37．8；39．8；55．4；59．2；61．0；107．2；132．7；137．8；147．7；150．9；155．4；158．4；162．7；170．9；172．2．
HRMS（ESI）理論値 $C_{25}H_{34}N_{6}O_{6}S_{3}$ ［M＋H］$^{+}$ 611．1780；実験値 611．1777．

【0153】
実施例1．12：tert－ブチル 5－{2－［（2－{［2－（1－{5－［（3aS，6aR）－2－オキソ－ヘキサヒドロ－1H－チエノ［3，4－d］イミダゾリジン－4－イル］ペンタンアミド}－3，6，9，12－テトラオキサペンタデカン－15－アミド）エチル］ジスルファニル}エチル）カルバモイル］エチル}－2－（メチルアミノ）ニコチン酸：の合成：



13

$C_{39}H_{65}N_{7}O_{10}S_{3}$

M=888.17 g/mol

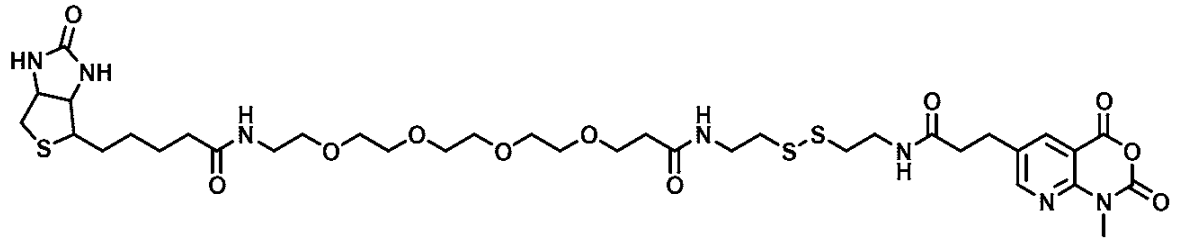
【0154】
100mLのフラスコ中で、アミノ誘導体10の400mg（0．965mmol；1当量）を、ジクロロメタン15mLに溶解させる。Biot－peg$_{4}$－COPFPの635mg（0．965mmol；1当量、QuantaBioDesign，Powell，USA）とトリエチルアミンの134μL（0．965mmol；1当量）を添加し、反応物を室温で45分間磁気的に攪拌する。

【0155】
反応混合物を蒸発乾固し、溶離液の勾配（$H_{2}O$から$H_{2}O$／ACN 4／6）を用いて、グラフトされたC18シリカゲルカラムで直接精製した。最終生成物は、85％の収率で白い粉末形態で得られる（730mg；0．822mmol）。

【0156】
IR（KBr）：ν 3400（NH）、2925、1681（CO）、1644（CO）、1579、1525、1157、1124、804、618cm^{-1}．
^{1}HNMR（500MHz、DMSO－d6）：δ1．40－1．46（m、2H）；1．57（s、9H）；1．61－1．78（m、4H）；2．22（t、2H、^{3}J＝7．1Hz）；2．46－2．49（m、4H）；2．73（d、1H、^{2}J＝12．7Hz）；2．77－2．83（m、6H）；2．90（dd、^{3}J＝5．0Hz、1H、^{2}J＝12．7Hz）；3．02（d、3H、^{3}J＝4．9Hz）；3．13（m、1H）；3．39－3．44（m、2H）；3．52－3．55（m、6H）；3．62－3．63（m、12H）；3．72（t、2H、^{3}J＝5．9Hz）；4．31（m、1H）；4．50（m、1H）；5．41（sl、1H）；6．33（sl、1H）；6．85（t、1H、^{3}J＝5．5Hz）；6．95（t、1H、^{3}J＝5．6Hz）；7．28（t、1H、^{3}J＝5．8Hz）；7．82（q、1H、^{3}J＝4．9Hz）；7．88（d、1H、^{4}J＝2．5Hz）；8．14（d、1H、^{4}J＝2．5Hz）．
^{13}CNMR（125MHz、DMSO－d6）：δ24．6；26．9；26．9；2

７．１；２７．１；２７．３（３Ｃ）；３４．８；３５．８；３６．２；３７．２；３７．３；３７．４；３７．５；３８．２；３９．５；５４．５；５９．１；６０．８；６６．２；６８．９；６９．０；６９．２；６９．３；６９．５（３Ｃ）；８０．４；１０６．３；１２１．７；１３８．９；１５１．８；１５７．２；１６２．７；１６６．１；１７１．０；１７１．５；１７２．３．
ＨＲＭＳ（ＥＳＩ） 理論値 $C_{39}H_{65}N_7O_{10}S_3$ ［Ｍ＋Ｈ］$^+$ ８８８．４０３３；実験値 １８８８．４０２０．

【０１５７】
実施例１．１３：［（３ａＳ，６ａＲ）－２－オキソ－ヘキサヒドロ－１Ｈ－チエノ［３，４－ｄ］イミダゾリジン－４－イル］ペンタンアミド｝－Ｎ－（２－｛［２－（３－｛１－メチル－２，４－ジオキソ－１Ｈ，２Ｈ，４Ｈ－ピリド［２，３－ｄ］［１，３］オキサジン－６－イル｝プロパンアミド）エチル］ジスルファニル｝）－３，６，９，１２－テトラオキサペンタデカン－１５－アミドの合成：



14

$C_{36}H_{55}N_7O_{11}S_3$

M=858.06 g/mol

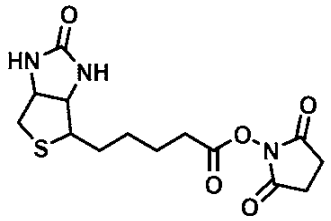
【０１５８】
３０ｍＬの封管中で、前にＣ１８のグラフトされたシリカの５００ｍｇ上に吸着された誘導体１３を２００ｍｇ（２２５μｍｏｌ；１当量）が、ジエチルエーテル２０ｍＬに溶解される。トルエン中２０％ホスゲン溶液の３５５μＬの（６７５μｍｏｌ；１当量）及びトリエチルアミン９４μＬ（６７５μｍｏｌ；３当量）が添加され、反応物を室温で３０分間磁気的に攪拌する。

【０１５９】
反応混合物を蒸発乾固し、溶離液の勾配（H_2OからH_2O／ＡＣＮ　４／６）を用いて、グラフトされたＣ１８シリカゲルカラムで直接精製した。最終生成物は、２６％の収率で白い粉末形態で得られる（５０ｍｇ；５８．２μｍｏｌ）。

【０１６０】
ＩＲ（ＫＢｒ）：ν ３４２６（ＮＨ）、２９２６、２８７５、１７８２（ＣＯ）、１７２９（ＣＯ）、１６４１（ＣＯ）、１５５０、１４９０、１３６９、１３３０、１０９３、７８８、７４６、６７７ｃｍ$^{-1}$．
^{1}ＨＮＭＲ（５００ＭＨｚ、ＤＭＳＯ－ｄ６）：δ１．４１－１．４７（ｍ、２Ｈ）；１．５８－１．７８（ｍ、４Ｈ）；２．２３（ｔ、２Ｈ、^{3}Ｊ＝７．４Ｈｚ）；２．４９（ｔ、２Ｈ、^{3}Ｊ＝５．７Ｈｚ）；２．６４（ｔ、２Ｈ、^{3}Ｊ＝７．２Ｈｚ）；２．７５（ｍ、３Ｈ）；２．７８（ｔ、２Ｈ、^{3}Ｊ＝５．９Ｈｚ）；２．９１（ｄｄ、１Ｈ、^{3}Ｊ＝４．９Ｈｚ、^{2}Ｊ＝１２．５Ｈｚ）；３．０５（ｔ、２Ｈ、^{3}Ｊ＝７．２Ｈｚ）；３．１５（ｍ、１Ｈ）；３．３９－３．４５（ｍ、２Ｈ）；３．４６－３．５１（ｍ、４Ｈ）；３．５６（ｔ、２Ｈ、^{3}Ｊ＝５．０Ｈｚ）；３．６３－３．６４（ｍ、１２Ｈ）；３．６６（ｓ、３Ｈ）；３．７４（ｔ、２Ｈ、^{3}Ｊ＝５．７Ｈｚ）；４．３３（ｍ、１Ｈ）；４．５２（ｍ、１Ｈ）；５．５１（ｓｌ、１Ｈ）；６．３７（ｓｌ、１Ｈ）；６．９０（ｔ、１Ｈ、^{3}Ｊ＝５．４Ｈｚ）；７．３８（ｔ、１Ｈ、^{3}Ｊ＝５．７Ｈｚ）；７．４９（ｔ

、１Ｈ、^{3}Ｊ＝５．７Ｈｚ）；８．２９（ｄ、１Ｈ、^{4}Ｊ＝２．２Ｈｚ）；８．６０（ｄ、１Ｈ、^{4}Ｊ＝２．２Ｈｚ）．
^{13}ＣＮＭＲ（１２５ＭＨｚ、ＤＭＳＯ－ｄ６）：δ２４．６；２６．７；２７．０；２７．１；２９．４；３４．８；３５．６；３５．７；３５．８；３７．１；３７．６；３７．７；３８．２；３９．５；５４．５；５９．２；６０．８；６４．８；６６．２；６８．９；６９．０；６９．１；６９．２；６９．４（２Ｃ）；１０５．８；１３２．３；１３７．７；１４６．８；１５０．１；１５５．５；１５７．１；１６２．８；１７０．８；１７１．２；１７２．４．
ＨＲＭＳ（ＥＳＩ）理論値 $C_{35}H_{56}N_{7}O_{11}S_{3}$ ［Ｍ＋Ｈ］$^{+}$ ８５８．３２００；実験値 ８５８．３１８５．

【０１６１】
実施例１．１４：Ｂｉｏｔ－ＣＯＮＨＳの合成：



15

$C_{14}H_{19}N_{3}O_{5}S$

M=341.38 g/mol

【０１６２】
１００ｍＬのフラスコ中で、Ｄ－ビオチンの２．５ｇ（１０．２３ｍｍｏｌ；１当量）とＮ－ヒドロキシスクシンイミド１．１８ｇ（１０．２３ｍｍｏｌ；１当量）を、無水ジメチルホルムアミド４０ｍＬに溶解させる。試薬が完全に溶解するまで、反応物を７０℃で磁気的に攪拌する。次いで、ＥＤＣの２．５５ｇ（１３．３０ｍｍｏｌ；１．３当量）が添加され、反応混合物を室温で１２時間攪拌する。

【０１６３】
混合物を蒸発乾固し、次いで３０ｍＬのメタノールに溶解する。その後得られた沈殿物をフリット上で濾過し、次いで、ＭｅＯＨ（３×ｍＬ）及びジエチルエーテル（３ｘ９０ｍＬ）で洗浄する。

【０１６４】
生成物は、７０％の収率で白い粉末形態で得られる（２．４６ｇ；７．２１ｍｍｏｌ）。

【０１６５】
融点：２１０°Ｃ．
ＩＲ（ＫＢｒ）：ν ３２３４；１８２０；１７８９；１７４７（ＣＯ）；１７３０（ＣＯ）；１７０５（ＣＯ）；１２１６；１０７２ｃｍ$^{-1}$．
^{1}ＨＮＭＲ（４００ＭＨｚ、ＤＭＳＯ－d_{6}）：δ１．３９－１．６７（ｍ、６Ｈ）；２．５７（ｍ、１Ｈ）；２．６６（ｔ、２Ｈ、^{3}Ｊ＝７．３Ｈｚ）；２．６８（ｓ、４Ｈ）；２．８４（ｍ、１Ｈ）；３．０９（ｍ、１Ｈ）；４．１４（ｍ、１Ｈ）；４．２９（ｍ、１Ｈ）；６．３７（ｓ、１Ｈ）；６．４３（ｓ、１Ｈ）．
^{13}ＣＮＭＲ（１００ＭＨｚ、ＤＭＳＯ－d_{6}）：δ２４．３；２５．５（２Ｃ）；２７．６；２７．９；３０．０；３９．９；５５．３；５９．１；６１．０；１６２．８；１６９．０；１７４．４（２Ｃ）．

【０１６６】
結果と結論：目的の基を備えたアザイサト酸誘導体の合成は実現可能であることが実証

される。
【０１６７】
実施例２：目的の基を備えたアザーイサト化合物の溶液中における安定性の実証。
目的：出願ＦＲ１０６０１０２に記載されているように、参照化合物Ｂｉｏｔ－ｐｅｇ$_4$－ＳＳ－ＩＡＭｅに対して、アザイサト酸誘導体１４の化学的安定性を検証しかつ実証することを意図した幾つかの試験が実施された。これらの比較試験は、室温と４℃で、ＤＭＳＯ溶液中で行った。
【０１６８】
手順：各イサト酸誘導体については、ＤＭＳＯ中で１２０ｍＭの二つの溶液を調製し、それぞれ室温と４℃で２週間保存した。溶液のそれぞれに対して、３種のＬＣ－ＭＳ分析（条件１）が、ｔ＝０、ｔ＝４日及びｔ＝７日で実施された。各分析において、化合物の純度は、イサト酸誘導体に対応するピーク並びに分解生成物に対応する任意のピークの積分によって、ＵＶ ＰＤＡマックスプロットで決定される。図４は、得られた結果を示す。
【０１６９】
結果と結論：得られた結果は、２つのイサト酸誘導体が時間と共に分解しないことを示している。分解生成物は、これらの実験では検出されなかった。それらは、少なくとも７日間、４℃だけでなく室温でも、ＤＭＳＯ溶液中で安定である。そこで我々は、アザーイサトシリーズにおける化学的安定性の維持を実証した。
【０１７０】
当業者は、アザーイサト分子は、より反応性であり、したがって安定性が低いだろうと思うかもしれない。今や、驚くべきことに、実施例２は、これは、そうではなく、全く逆に、分子は、より反応性であるにもかかわらず、室温で経時的に完全に安定のままであることを実証している（標識化を扱う実施例３も参照）。
【０１７１】
実施例３：アザーイサト化合物対２７個の塩基を有するモデルオリゴリボヌクレオチド（ＯＲＮ）の室温での反応性の実証－官能化の程度の測定：
目的：アザイサト酸シリーズの反応性の増加を実証するために、室温及び６５℃での２７－ｍｅｒのＯＲＮの官能化の比較試験を、参照のイサト酸誘導体のＢｉｏｔ－ｐｅｇ$_4$－ＳＳ－ＩＡＭｅ、及びアザイサト酸誘導体のＢｉｏｔ－ｐｅｇ$_4$－ＳＳ－ａｚａＩＡＭｅ（１４）について実施した。
【０１７２】
参照のイサト酸誘導体に対するアザイサト酸無水物誘導体１４の反応性の比較が、ＷＯ－Ａ－２０１２／０７６７９４に記載されているように、２７塩基モデルＯＲＮ（配列：５’－ＡＡＣ－ＣＧＣ－ＡＧＵ－ＧＡＣ－ＡＣＣ－ＣＵＣ－ＡＵＣ－ＡＵＵ－ＡＣＡ－３’、Eurogentec, Liege Science Park, Belgium）に関して行われる。このために、一定量のＯＲＮを、６５℃及び室温で、目的の分子とコンジュゲートしたイサト酸無水物誘導体と反応させる。反応は、先に実施例３で特許出願ＷＯ－Ａ－２０１２／０７６７９４において説明したように、２６０ｎｍでＨＰＬＣによりモニターされる。この分析は、初期ＯＲＮに相当するピークの消失及びアシル化ＯＲＮに相当するピークの出現を検出することが可能になる。
【０１７３】
これらの生成物は、より長い保持時間を有し、ＯＲＮのものとそして官能化試薬のものの両者に相当する吸収スペクトルを有する。
官能化の程度（Ｄｆ）の正確な評価のために、ＯＲＮの集団（標識されたもの及び標識されていないもの）がアセトン／過塩素酸リチウムを用いた沈殿により過剰マーカーから分離される。そして、このようにして得られたＯＲＮ類は、ＯＲＮのリン酸ジエステル結合を加水分解するために、ヌクレアーゼＰ１（Aldrich, Saint Louis, USA）及びアルカリホスファターゼ（Aldrich, Saint Louis, USA）による加水分解を受ける。
次いで、この混合物のＬＣ－ＭＳ分析により、いくつかの集団が特徴づけられ、同定され

ることが可能になる：
－標識されていないリボヌクレオシド；
－より長い保持時間並びに核酸及び官能化試薬のＵＶスペクトル特性により極めて明確に異なる標識モノヌクレオシド付加物；
－２’で目的の基により置換されたアントラニル酸基のために、ヌクレアーゼＰ１により切断することができない２’でアシル化されたジヌクレオチド；
－過アシル化（per-acylated）２’ＯＨのトリヌクレオチド又はテトラヌクレオチドは、これは理論的に形成してもよいが統計的には滅多に示されないものであり（これはその後の２’ＯＨの２つ又は３つの連続したアシル化を必要とするので）、調査されない。

【０１７４】
５’－Ｏ－アルル化誘導体は、ごく僅かにしか見受けられないに過ぎず、Servillo (Eur. J.Biochem. 1993 583-589)により説明されるように目に見えないことに留意すべきである。

【０１７５】
ＯＲＮの官能化の程度（Ｄｆ）は、
－（２’と３’で官能化された）末端モノヌクレオシド付加物に相当する面積及びアシルジヌクレオチド（２’ＯＨで内部で官能化されている）に相当する面積
－４つのリボヌクレオシドに相当するピークの面積と比較して
を測定することによって評価される.

【０１７６】
手順：標準的な実験では、２７塩基を有するＯＲＮ（５’－ＡＡＣ－ＣＧＣ－ＡＧＵ－ＧＡＣ－ＡＣＣ－ＣＵＣ－ＡＵＣ－ＡＵＵ－ＡＣＡ－３’、Eurogentec, Liege Science Park, Belgium）の８ナノモルの当量の水溶液を、最初に２ｍＬプラスチックエッペンチューブ中で遠心エバポレーター（ＲＣＴ６０、Jouan, St Herblain, Fracce）で乾燥する。

【０１７７】
得られた乾燥残渣は最初に水４０μＬに溶解し、その後、緩衝化溶液（実施例では、１Ｍのトリエチルアンモニウムアセテート緩衝液、ｐＨ７、Aldrich, St Louis, USA 参照番号：０９７４８－１００ｍｌ）の２０ｍＬを添加する。最後に、イサト酸無水物誘導体の１２０ｍＭのＤＭＳＯ溶液２０μｌが、前の溶液（ＦＲ １０６０１０２に記載の参照分子Ｂｉｏｔ－ｐｅｇ$_4$－ＳＳ－ＩＡＭｅ又はこの実施例中のアザイサト酸誘導体Ｂｉｏｔ－ｐｅｇ$_4$－ＳＳ－ａｚａＩＡＭｅ（１４）の何れか）に加えられる。

【０１７８】
混合物を、予め温度を平衡化したラック上のオーブン中で、室温で又は６５℃で６０分間インキュベートする。塩と過剰マーカーを除去するために、次いで、混合物を１８０ｍＭアセトン／ＬｉＣｌＯ$_4$ ７５／２５混合液１．２ｍＬ中に３回沈殿させることによって精製する。最後に、沈渣をアセトンで乾燥させ、遠心エバポレーター（RCT60, Jouan, St Herblain, France）で蒸発させる。次いで、残渣をＨ$_2$Ｏ／ＤＭＳＯ ８５／１５溶液２０μＬに溶解し、官能化試薬の欠損を確認するためにＨＰＬＣ注入（条件１）を行う。その緩衝液：２０ｍＭ酢酸ナトリウムｐＨ５．５；；１ｍＭ ＺｎＣｌ$_2$；５０ｍＭ ＮａＣｌ中１Ｕ／μｌ溶液のヌクレアーゼＰ１ ２μＬ（参照番号：Ｎ８６３０ Sigma-Aldrich, St Louis, USA））及び水中７ｕ／μｌアルカリホスファターゼ（参照番号Ｐ７９２３－２ＫＵ Sigma-Aldrich, St Louis, USA）１μＬを混合物に添加する。混合物を４から５時間室温に放置する。次いで、ＯＲＮの完全加水分解を確認し、その断片の性質を分析するために、ＨＰＬＣ注入（条件１）を実施する。

【０１７９】
官能化の程度は、４つのリボヌクレオシドに対応する多重項に対して、アシル化ジヌクレオチド及びアシル化ヌクレオシド相当する多重項の積分によって、２６０ｎｍのＵＶで評価される。

【０１８０】
注意：本発明の文脈において示される官能化の程度の値は、それらがヌクレオシド又は

ヌクレオチドであるかどうかによらず、ヌクレオシドの各々の２６０ｎｍにおけるモル吸光係数の関数として適用されなければならない補正係数を考慮してはいない。

【０１８１】

図５は、室温及び６５℃において、ＦＲ１０６０１０２に記載されているように、誘導体のＢｉｏｔ－ｐｅｇ$_4$－ＳＳ－ＩＡＭｅ、及びＢｉｏｔ－ｐｅｇ$_4$－ＳＳ－ａｚａＩＡＭｅ １４を用いた２７－ｍｅｒのＯＲＮ類の官能化試験で得られた結果を示す。

【０１８２】

議論と結論：６５℃において、未補正の官能化の程度は、参照化合物であるＢｉｏｔ－ｐｅｇ$_4$－ＳＳ－ＩＡＭｅの７．５％に対して、アザイサト酸誘導体の１３．５％で評価された。オリゴリボヌクレオチドに関する反応性は、したがって、６５℃で、アザイサト酸シリーズにおいて、１．８倍に増加している。より興味深いことに、アザ誘導体１４は、室温でＲＮＡを官能化することが可能とするが（未補正のＤｆ＝７．８％）、一方参照化合物は、これらの条件下で非常に低い反応性を有している（未補正Ｄｆ＝１％）。

【０１８３】

この実施例は、我々は、アザイサト酸誘導体１４とのＯＲＮに関する反応性の増加並びに室温でＯＲＮを官能化するための能力を実証する。試薬の全く同じ濃度において、ＯＲＮは、室温でアザイサト酸誘導体により、６５℃でイサト酸誘導体によるのと同じＤｆで官能化される。

【０１８４】

実施例４：アザイサト酸シリーズにおけるＤＮＡへのＲＮＡの相対的な化学選択性の実証：

目的：アザイサト酸シリーズにおいてＲＮＡ対ＤＮＡの官能化の選択性を実証するために、比較試験が、２７塩基を有するＯＤＮと、アザイサト酸誘導体Ｂｉｏｔ－ｐｅｇ$_4$－ＳＳ－ａｚａＩＡＭｅ（１４）と反応させた２７塩基を有するＯＲＮとの間で行われた。

【０１８５】

手順：２７塩基を有するＯＤＮ：配列：５’－ＡＡＣ－ＣＧＣ－ＡＧＴ－ＧＡＣ－ＡＣＣ－ＣＴＣ－ＡＴＣ－ＡＴＴ－ＡＣＡ－３’（Eurogentec, Liege Science Park, Belgium）の８ｎｍｏｌ、又は２７塩基を有するＯＲＮ：配列：５’－ＡＡＣ－ＣＧＣ－ＡＧＵ－ＧＡＣ－ＡＣＣ－ＣＵＣ－ＡＵＣ－ＡＵＵ－ＡＣＡ－３’（Eurogentec, Liege Science Park, Belgium）の８ｎｍｏｌを、ＤＭＳＯ／ＴＥＡＡｃの２５／７５混合物緩衝液（２５０ｍＭ ｐＨ７）中３０ｍＭのアザイサト酸誘導体（１４）と室温で１時間反応させる。アセトンによる沈殿並びにヌクレアーゼＰ１及びアルカリホスファターゼによる加水分解の後、加水分解した断片を実施例３に記載するようにＬＣ－ＭＳにより分析する。ＯＤＮ又はＯＲＮと化合物１４の反応を監視するクロマトグラムの例を図６に示し、ここではトレースＡ、Ｂ及びＣはそれぞれ、ＯＲＮ、化合物１４で官能化し沈殿させたＯＲＮ、及び１４で官能化し、沈殿させ、加水分解したＯＲＮを表す。トレースＤ、Ｅ及びＦは、ＯＤＮを用いて得られた同じ結果である。

【０１８６】

結果と結論：ＯＲＮの未補正の官能化の程度は、化合物１４で７．８％で評価する一方で、ＯＤＮのそれは０．５％で評価する。これらの実験条件では、ＯＤＮはほとんど官能化されていない。これらの結果は、ＲＮＡについてのアザイサト酸無水物の誘導体１４の官能化の選択性及び塩基への反応性の欠如を確認している。実際、塩基が化合物１４に反応したならば、ＯＤＮとの反応から生じたアントラニル酸ヌクレオシド付加物が観察されるであろう。ＯＤＮの０．５％の官能化は、ＤＮＡの５’－ＯＨ及び３’－ＯＨ末端の極めて低い反応性に由来するものであることに留意すべきである（この点に関しては、Nawrot Nucleosides and Nucleotides 1998 815-829を参照）。

【０１８７】

この実施例は、ＯＤＮに対する、ＯＲＮについてのアザイサト酸シリーズの化学選択性の保存を実証している。ＯＲＮに特異的な２’－ＯＨ基の存在は、ＯＲＮへの化学特異的反応の原因である。

【０１８８】
実施例５：ＨＩＶのＲＮＡ転写物とゲノムＤＮＡの混合物を含む溶液からのＨＩＶ ＲＮＡ転写物の選択的抽出。
目的：本目的は、室温で官能化試薬としてアザイサト酸誘導体１４を使用した、ＲＮＡとＤＮＡの混合物を含有する生物学的溶液のＲＮＡ濃縮の概念は可能であることを実証することである。このために、核酸の２つの生物学的モデル、ＲＮＡについてはＨＩＶ転写物及びＤＮＡについては仔ウシのゲノムを選択した。アザイサト酸誘導体１４の有効性を比較するために、これらの試験はまた、参照化合物Ｂｉｏｔ－ｐｅｇ$_4$－ＳＳ－ＩＡＭｅで６５℃で及び室温で行った。
【０１８９】
手順：この実施例で使用される核酸は以下の通りである：
－１．９４μｇ／μＬで、ＨＩＶ転写物 ＷＴ １５００塩基。
－１．９２μｇ／μＬで、ウシ胸腺ｇＤＮＡ、ＳＩＧＭＡ（Saint Louis, USA）、参照番号Ｄ４７６４－５ＵＮ。
【０１９０】
１－官能化：
以下の試薬が３本の０．２ｍｌのプラスチックチューブに入れられる（下記表２）：

試験	２μｇ／μＬでのＨＩＶ転写物／ｇＤＮＡ １／９の混合物 (μL)	TEAAc 1M pH 7 (μL)	６ｍＭ／DMSO でのBiot-peg$_4$-SS-IAMe (μL)	６ｍＭ／DMSO でのBiot-peg$_4$-SS-azaIAMe (μL)	温度
1	6	3	3	-	65° C
2	6	3	3	-	室温
3	6	3	-	3	室温

表 2：実施例５に記載される実験条件の概要

各々の場合において、ＴＥＡＡｃと官能化試薬の最終濃度は、それぞれ２５０ｍＭと１．５ｍＭである。
【０１９１】
３本のチューブは、加熱されたラック上で室温又は６５℃で１時間インキュベートする。
【０１９２】
２－磁性シリカでの精製による過剰な官能化試薬の除去：
各試験のための核酸の精製は、この工程のための最適な条件を満たすために（即ち、２μｇの核酸あたり１ｍｇの磁性シリカ）、等量の５つの異なるチューブ中で行った。したがって、各試験は５つの１．５ｍＬのエッペンドルフチューブに、即ち、２．１μＬを５回分配される（２μｇのＡＮ）。溶解緩衝液（Easy Mag buffer、参照番号２８０１３４、bioMerieux, Marcy l'Etoile, France）９００μＬ及び磁性シリカ粒子（EasyMAG silica、参照番号２８０１３３、bioMerieux, Marcy l'Etoile, France）５０μＬを各チューブに添加する。後者は、シリカを添加した後、ボルテックス効果によりただちに撹拌し、次いで室温で１０分間インキュベートする。ＤＹＮＡＬ磁石上で磁化した後、上清をピペットで吸引して除去する。次の洗浄工程では、チューブは常にボルテックス効果により攪拌され、磁化され、続いて上清を除去する。最初の洗浄は、洗浄緩衝液１（Easy Mag buffer、参照番号２８０１３０、bioMerieux, Marcy l'Etoile, France）を５００μＬ用いて行われる。２回の洗浄が、洗浄緩衝液２（Easy Mag buffer、参照番号２８０１３１、bioMerieux, Marcy l'Etoile, France）の９００μＬ次いで５００μＬで実施される。最

後に、最終洗浄工程は、室温で、洗浄緩衝液３（Easy Mag buffer、参照番号２８０１３２、bioMerieux、Marcy l'Etoile, France）を５００μＬ用いて行われる。核酸の溶出は、７０℃で加熱したスターラーで攪拌した（１４００ｒｐｍ）溶出緩衝液３の２０μＬを用いて行われる。５分後、チューブはボルテックス効果により撹拌され、次いで上清を回収するために磁化される。後者は、量子ビット（登録商標）フルオロメーター装置、参照番号Ｑ３２８５７、Invitrogen (Carlsbad, California, United States of America）により、キットのＱｕａｎｔ－ｉＴ ＲＮＡアッセイキット５－１００ｎｇ（参照番号Ｑ３２８５５、Invitrogen, Carlsbad, California, United States of America）、及びＱｕａｎｔ－ｉＴ ｄｓＤＮＡ ＨＳアッセイキット０．２－１００ｎｇ（参照番号Ｑ３２８５４、Invitrogen, Carlsbad, California, United States of America）を使用して分析する。これらの分析キットは、ＲＮＡ／ＤＮＡ比が混合物中で決定されることを可能にする。

【０１９３】

３－ストレプトアビジンでコーティングされた磁性粒子上の核酸の捕捉：

磁性粒子上でこの捕捉を行うためには、先行する精製工程で５つのチューブに分割された試験の各々を保管しておく必要がある。この工程のための最適条件、即ち、２μｇの核酸を完全に捕捉するための磁性粒子４０μｇの使用は、したがって満たされている。各試験のために、８μＬ（４０μｇに等価）のＭａｇＰｒｅｐ Ｐ－２５ストレプトアビジン、ＭＥＲＣＫ（Darmstadt, Germany）が、あらかじめ０．２－ｍｌのプラスチックチューブに入れられる。これらの粒子は、磁気分離のために、テーパーチップ及びＭＰＣ ９６００ Ｄｙｎａｌマグネット Invitrogen (Carlsbad, California, United States of America) を使用して、ＰＢＳ １Ｘ＋ＳＤＳ ０．１％の８０μＬで２回洗浄する。粒子が洗浄されたら、工程２で精製した核酸を１５μＬ、次いでＰＢＳ４Ｘ＋ＳＤＳ０．４％の５μＬが各ペレットに添加される。チューブを１０分間インキュベートし、室温で緩やかに（最低速度でボルテックススターラーで）攪拌する。磁気分離後、上清をテーパーチップを使用して回収する。この上清は、量子ビット（登録商標）フルオロメーター装置で以前のように分析される。

【０１９４】

４－官能化されたＲＮＡの溶出：

ストレプトアビジン磁性粒子のペレットは、その上に官能化された核酸が固定化され、６５℃（加熱したラック）で５分間、ＰＢＳ１×＋０．１％ＳＤＳの８０μＬで洗浄される。種々の試験は、ボルテックス効果によって撹拌され、５分後に、洗浄緩衝液は、テーパーチップを用いた磁気分離後に除去される。この操作を２回繰り返す。ペレットの最終洗浄はＰＢＳ １Ｘの２０μＬを用いて行われる。各試験に対応する５つのペレットが次いで単一チューブ内で混合される。そのときの容量は各試験について１００μＬのＰＢＳ １Ｘである。これらは、ボルテックス効果により撹拌し、次いで上清をテーパーチップを用いて磁気分離後に除去する。各ペレットをＰＢＳ１Ｘ中の１００ｍＭでのＤＴＴの溶液８μＬに懸濁する。各試験は、次いで、ボルテックス効果によって撹拌され、次いで、４０℃、３００ｒｐｍで１時間インキュベートする。磁気分離後、上清をテーパーチップを使用して回収する。この上清を、以前と同様に（約１００ｎｇのＲＮＡが回収される）、量子ビット（登録商標）フルオロメーター装置（Invitrogen, Carlsbad, California, United States of America）を用いて分析する。

【０１９５】

結果と結論：

１－結果：

量子ビット（登録商標）フルオロメーターによる溶出液の分析は、上記のように、プロセスの各工程に存在する核酸の定量化を可能にする。

【０１９６】

得られた測定値より、一方ではＲＮＡ及びＤＮＡの抽出の収率を、他方で、Ｓ＊と呼ばれる中間選択指数を算出することができる。この指数は、異なるイサト誘導体を用いて行

われた幾つかの試験を比較することを可能とする。

$$S^* = \frac{Yld\ RNA\quad 抽出}{Yld\ DNA\quad 抽出} = \frac{[RNA]_{最終}/[RNA]_{精製工程2}}{[DNA]_{最終}/[DNA]_{精製工程2}}$$

【０１９７】
注意：中間選択性の評価は、第２の精製工程によって供給され得るバイアスを考慮することを不要とする。得られた測定と行った計算に基づいて、以下の表３が確立される。

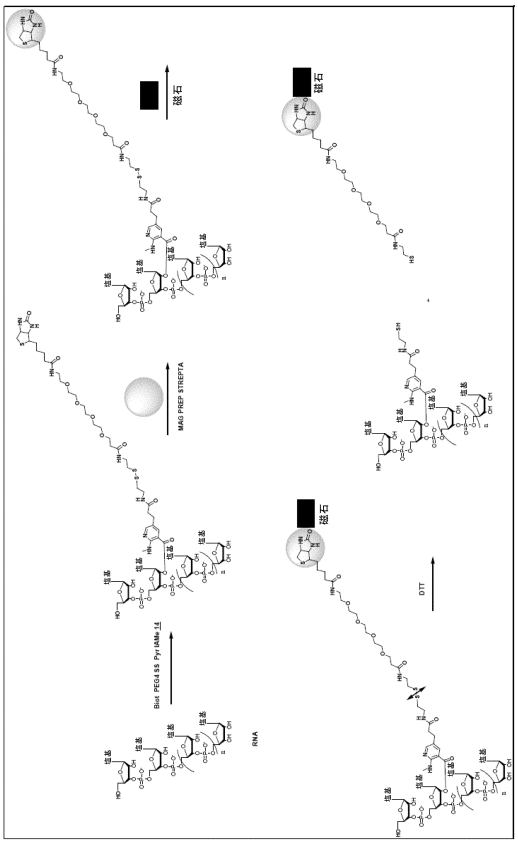
	1.5 mMの タグ	官能化の温度	初期の ＤＮＡ／ＲＮＡ の比率	最終的な ＤＮＡ／ＲＮＡ の比率	S*
試験 1	Biot-peg4-SS-IAMe	65° C	90/10	14/86	6
試験 2	Biot-peg4-SS-IAMe	室温	90/10	未決定	未決定
試験 3	Biot-peg4-SS-azaIAMe	室温	90/10	4/96	30

表 3：ＲＮＡの官能化/捕捉/切断/溶出のプロセスにおいて工程２及び４で測定されたＤＮＡ/ＲＮＡの比率の概要

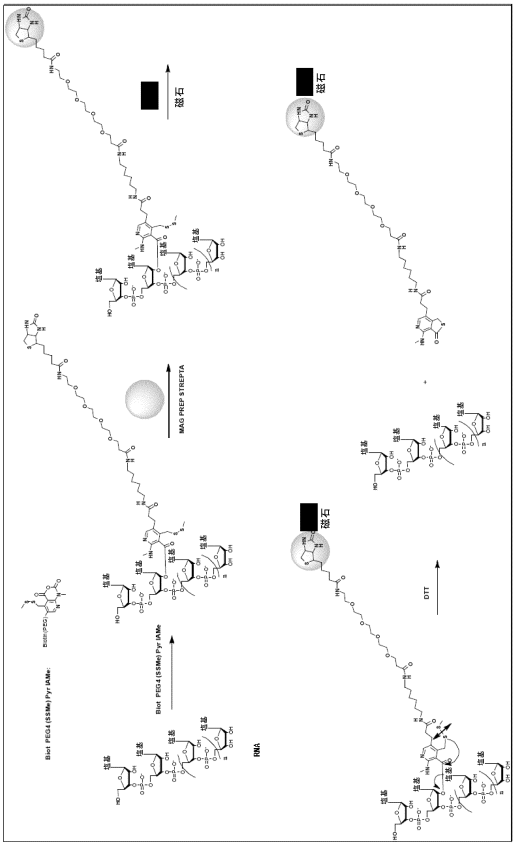
【０１９８】
２－結果：
室温でアザイサト酸誘導体１４によるＲＮＡの選択的官能化に基づくＲＮＡの濃縮プロセスが実証される。ＤＮＡ／ＲＮＡの比率は、したがって、精製工程の終了時の９０／１０から、プロセス完結後の比率４／９６（試験３）へと変化する。この結果は、室温におけるＲＮＡの選択的抽出のためのアザイサト酸誘導体１４の有効性を示す。
更に、参照化合物Ｂｉｏｔ－ｐｅｇ$_4$－ＳＳ－ＩＡＭｅに対して、この誘導体は、室温で官能化工程を行うことにより、ＲＮＡとの混合物を濃縮することを可能にする。最終的に、中間体選択性は、６５℃で、同一条件下における参照化合物に比して、室温で５倍に増加する。
【０１９９】
アザイサト酸誘導体１４は、リボ核酸を室温で官能化することができ、結果としてＲＮＡに関して抽出プロセスの選択性が増加する。
【０２００】
実施例６：ビオチン化アザイサト酸無水物に結合した自己犠牲基の概念の実証。芳香族部分にジスルフィド基を備えたアザイサト酸誘導体の合成
一例が図２で説明されている、アザイサト酸無水物誘導体の合成が実施された（ＢｉｏｔＰＥ４（ＳＳＭｅ）ＰｙｒＩＡＭｅ）。それは、
－カルボニル基のオルト且つベンジル位にジメチルジスルフィド結合を有するリンケージ
－ベンジル位にビオチン化誘導体
を備えている。
【０２０１】
リボ核酸とこの誘導体の反応後、形成するリボ核酸－アザアントラニレートコンジュゲートは、ジスルフィド結合を加水分解するＤＤＴで処理され、その後生成されたチオールは、非常に安定したアザチオラクトンの形成によってアザアントラニレートのエステル官

能基に分子内で反応する。アザアントラニレートを含まない裸のリボ核酸がその後遊離される（図２）。

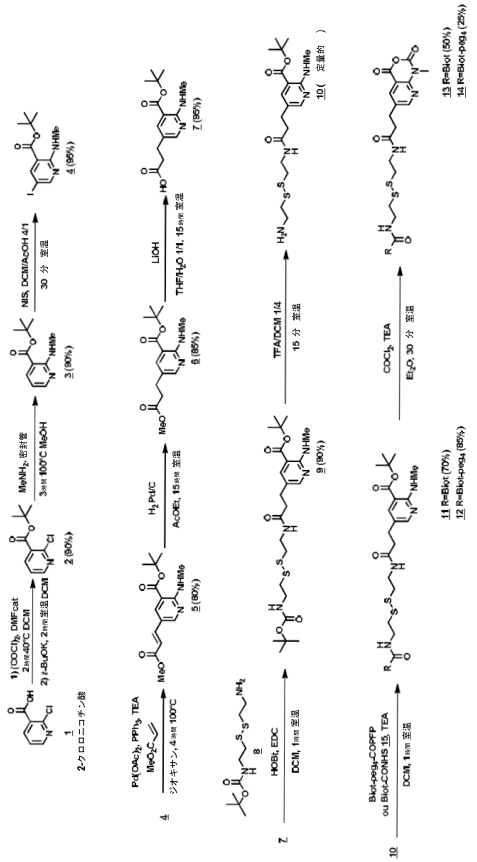
【図１】



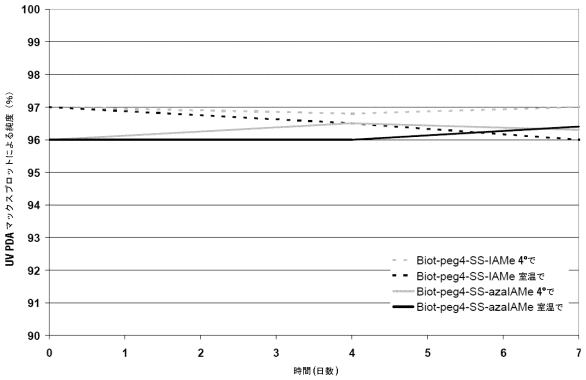
【図２】



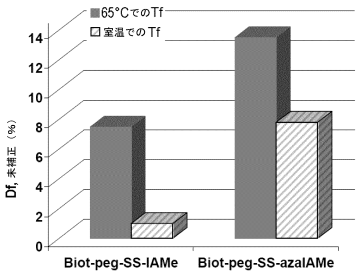
【図３】



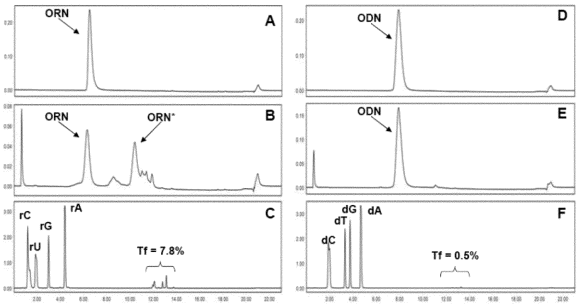
【図４】


UV PDA マックスプロットによる純度（%）
時間（日数）
Biot-peg4-SS-IAMe 4°で
Biot-peg4-SS-IAMe 室温で
Biot-peg4-SS-azaIAMe 4°で
Biot-peg4-SS-azaIAMe 室温で

【図５】


65°CでのTf
室温でのTf
Df, 未補正（%）
Biot-peg-SS-IAMe
Biot-peg-SS-azaIAMe

【図６】


ORN
A
ORN
ORN*
B
rC
rG
rU
rA
C
Tf = 7.8%
ODN
D
ODN
E
dC
dT
dG
dA
F
Tf = 0.5%

フロントページの続き

(51)Int.Cl. FI
C12Q 1/6811 (2018.01) C12Q 1/6811
C07D 519/00 (2006.01) C07D 519/00

(72)発明者 ラアユーン, アリ
フランス国 エフ－３８２６０ ラ フレット, シュマン デュ トゥリヴォズ ２１４
(72)発明者 ローラン, アラン
フランス国 エフ－３８１００ グルノーブル, リュ シャトーブリアン ３
(72)発明者 ユールスーギー, シルヴァン
フランス国 エフ－１４０００ カーン, アヴェニュー アルベール ソレル ５

審査官 早川 裕之

(56)参考文献 特開昭４９－０８６３９７（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２００２／０３０９１１（WO，Ａ１）
国際公開第２０１２／０７６７９４（WO，Ａ１）
国際公開第２００７／１４５９４０（WO，Ａ１）
J. Heterocyclic Chem.，１９８５年，２２，１９３－２０６
J. Am. Chem. Soc.，２００７年，１２９，４１４４－４１４５

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ １５／１０
Ｇ０１Ｎ ３３／５０
Ｇ０１Ｎ ３３／５８
Ｃ１２Ｑ １／６８０６
Ｃ１２Ｑ １／６８１１
Ｃ０７Ｈ ２１／０２
Ｃ０７Ｄ ５１９／００
ＣＡｐｌｕｓ／ＲＥＧＩＳＴＲＹ（ＳＴＮ）
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）