

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6152415号
(P6152415)

(45) 発行日 平成29年6月21日 (2017.6.21)

(24) 登録日 平成29年6月2日 (2017.6.2)

(51) Int. Cl.	F I
C 0 7 F 9/24 (2006.01)	C 0 7 F 9/24 C S P Z
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A
C 1 2 M 1/00 (2006.01)	C 1 2 M 1/00 A
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 M

請求項の数 18 (全 68 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-503881 (P2015-503881)	(73) 特許権者	510021203
(86) (22) 出願日	平成25年4月4日 (2013.4.4)		サントル・ナショナル・ド・ラ・ルシエル
(65) 公表番号	特表2015-515471 (P2015-515471A)		シェ・シアンティフィーク (セーエヌエールエス)
(43) 公表日	平成27年5月28日 (2015.5.28)		CENTRE NATIONAL DE
(86) 国際出願番号	PCT/EP2013/057122		LA RECHERCHE SCIENT
(87) 国際公開番号	W02013/150106		IFIQUE (CNRS)
(87) 国際公開日	平成25年10月10日 (2013.10.10)		フランス国, エフ-75794 パリ セ
審査請求日	平成28年2月2日 (2016.2.2)		デックス 16, リュー ミシェランジュ
(31) 優先権主張番号	1253121		, 3
(32) 優先日	平成24年4月4日 (2012.4.4)	(73) 特許権者	512005748
(33) 優先権主張国	フランス (FR)		ユニヴェルシテ ド モンペリエ 1
			フランス国, 34967 モンペリエ セ
			デックス 2, セーエス 19044, プ
			ールバール アンリ ザ フォース, 5
			最終頁に続く

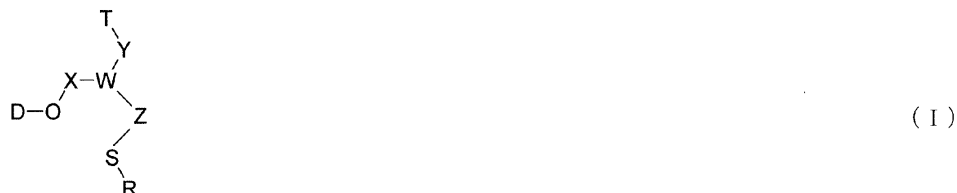
(54) 【発明の名称】 チオール化合物および修飾オリゴヌクレオチド合成のためのこれらの使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記の式 (I) に対応する化合物。

【化 1】



(式中、

T は、 $-O-P(OR_1)N(R_2)_2$ 、 $-O-PH(O)O^-$ 、 $-OC(O)JC(O)NH-$ から選択される基であり、・ R_1 は、2-シアノエチル、および $R'_1R'_2R'_3SiCH_2CH_2$ 基から選択され、 R'_1 、 R'_2 、 R'_3 は、同一であっても、または異なってもよく、直鎖もしくは分枝鎖の1から12の炭素原子を含むアルキルおよびC6-C12アリアルから選択される基を表し、・ R_2 は、直鎖もしくは分枝鎖の1から12の炭素原子を含むアルキル基、ピロリジ

ンから選択され、

・ J は、単結合、 $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{OCH}_2-$ 、Ph がベンジルである $-\text{CH}_2\text{OPhOCH}_2-$ の基から選択され、

・ は固体支持体を表し、

D は、アルコールの保護基であり、

W は、 CH 、 CCH_3 、 CCH_2CH_3 、シクロヘキサントリイルおよびベンゼントリイル基から選択され、

Z は、 $\text{C}1-\text{C}12$ アルキレンオキシ基、酸素含有または窒素含有 $\text{C}3-\text{C}12$ シクロヘテロアルキレン基、 $\text{C}1-\text{C}12$ $\text{NCO}-$ アルキレン基、 $\text{C}1-\text{C}12$ $\text{CON}-$ アルキレン基から選択され（ここで、各置換基中、アルキレン部位が S と結合する）、

Y は、直鎖または分枝鎖の、 $\text{C}1-\text{C}12$ アルキレン基、 $\text{C}1-\text{C}12$ アミノアルキレン基、 $\text{C}1-\text{C}12$ アルキレンオキシ基、 $\text{C}3-\text{C}12$ シクロアルキレン基、酸素含有または窒素含有 $\text{C}3-\text{C}12$ シクロヘテロアルキレン基から選択され（ここで、置換基中、アルキレン部位が T と結合する）、

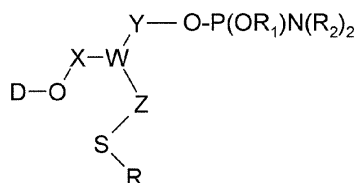
X は、直鎖または分枝鎖の、 $\text{C}1-\text{C}12$ アルキレン基、 $\text{C}1-\text{C}12$ アミノアルキレン基、 $\text{C}1-\text{C}12$ アルキレンオキシ基、 $\text{C}3-\text{C}12$ シクロアルキレン基、酸素含有または窒素含有 $\text{C}3-\text{C}12$ シクロヘテロアルキレン基から選択され（ここで、置換基中、アルキレン部位が O と結合する）、

R は、 $\text{C}1-\text{C}12$ アシル、 $\text{C}1-\text{C}12$ S - アルキル、 $\text{C}6-\text{C}12$ S - アリール、S - 2 - ピリジン、酸素含有または窒素含有 $\text{C}1-\text{C}12$ S - ヘテロアルキル、 $\text{C}3-\text{C}12$ S - シクロアルキル、酸素含有または窒素含有 $\text{C}3-\text{C}12$ S - シクロヘテロアルキル基から選択される。）

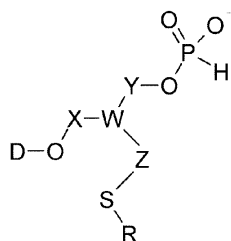
【請求項 2】

下記の式 (I a)、(I b) および (I c) :

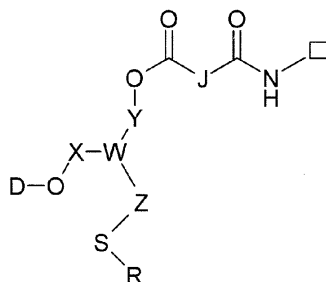
【化 2】



(I a)



(I b)



(I c)

のいずれか 1 つに対応する、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 3】

・ D が 4 , 4' - ジメトキシトリチル、9 - フェニルキサンテン - 9 - イルまたはフルオレニルメトキシカルボニルから選択され、

・ W が、 CH 、 CCH_3 、 CCH_2CH_3 、シクロヘキサントリイルおよびベンゼントリイル基から選択され、および / または

・ Z が、 $\text{C}1 - \text{C}6$ アルキレンオキシ基、酸素含有または窒素含有 $\text{C}3 - \text{C}6$ シクロヘテロアルキレン基、 $\text{C}1 - \text{C}6$ NCO - アルキレン基、 $\text{C}1 - \text{C}6$ CON - アルキレン基から選択され (ここで、置換基中、アルキレン部位が S と結合する)、および / または

・ Y が、直鎖または分枝鎖の $\text{C}1 - \text{C}6$ アルキレン基、 $\text{C}1 - \text{C}6$ アミノアルキレン基、 $\text{C}1 - \text{C}6$ アルキレンオキシ基、 $\text{C}3 - \text{C}6$ シクロアルキレン基、酸素含有または窒素含有 $\text{C}3 - \text{C}6$ シクロヘテロアルキレン基から選択され (ここで、置換基中、アルキレン部位が T と結合する)、および / または

・ X が、直鎖または分枝鎖の $\text{C}1 - \text{C}6$ アルキレン基、 $\text{C}1 - \text{C}6$ アミノアルキレン基、 $\text{C}1 - \text{C}6$ アルキレンオキシ基、 $\text{C}3 - \text{C}6$ シクロアルキレン基、酸素含有または窒素含有 $\text{C}3 - \text{C}6$ シクロヘテロアルキレン基から選択され (ここで、置換基中、アルキレン部位が O と結合する)、および / または

・ R が、 $\text{C}1 - \text{C}6$ アシル、 $\text{C}1 - \text{C}6$ S - アルキル、 $\text{C}6$ S - アリール、酸素含有または窒素含有 $\text{C}1 - \text{C}6$ S - ヘテロアルキル、 $\text{C}3 - \text{C}6$ S - シクロアルキル、酸素含有または窒素含有 $\text{C}3 - \text{C}6$ S - シクロヘテロアルキル基から選択される、請求項 1 または 2 に記載の化合物。

【請求項 4】

T が基 - $\text{O} - \text{P}(\text{OR}_1)\text{N}(\text{R}_2)_2$ である、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の化合物。

(式中、 R_2 はイソプロピル基であり、 R_1 は、2 - シアノエチル、2 - (トリメチルシリル)エチル、2 - (トリフェニルシリル)エチル、2 - (ジフェニルメチルシリル)エチル基から選択される。)

【請求項 5】

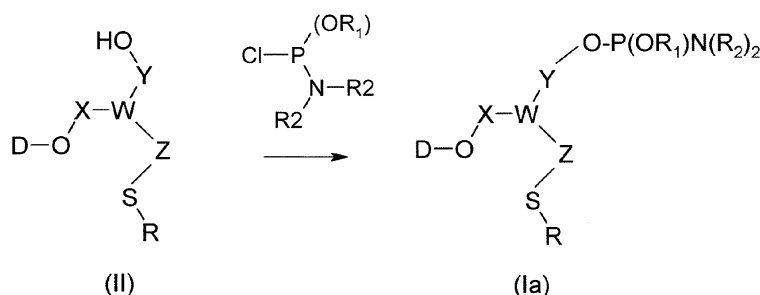
T が基 - $\text{OC}(\text{O})\text{JC}(\text{O})\text{NH}$ - (式中、 J は、樹脂から選択される固体支持体である) である、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 6】

下記のステップ：

- 化合物 (II) から出発する、下記の合成経路：

【化 3】



または下記の合成経路：

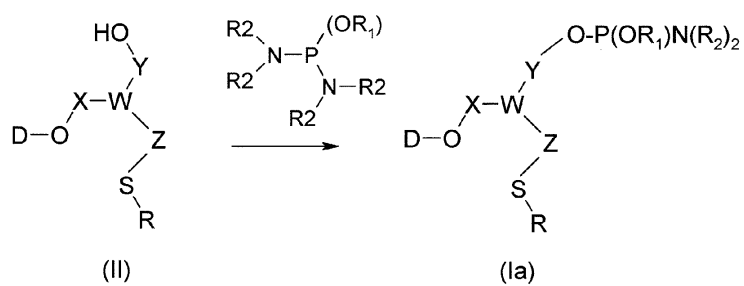
10

20

30

40

【化 4】

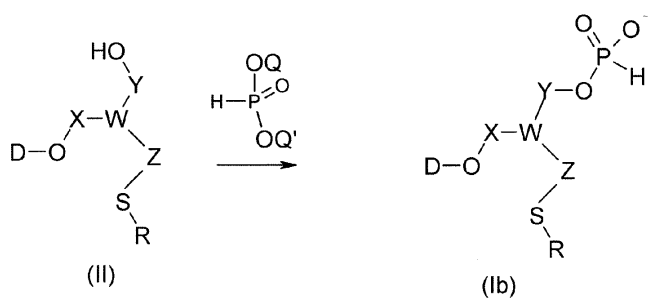


10

に従った化合物 (I a) の調製工程、

- 化合物 (I I) から出発する、下記の合成経路：

【化 5】

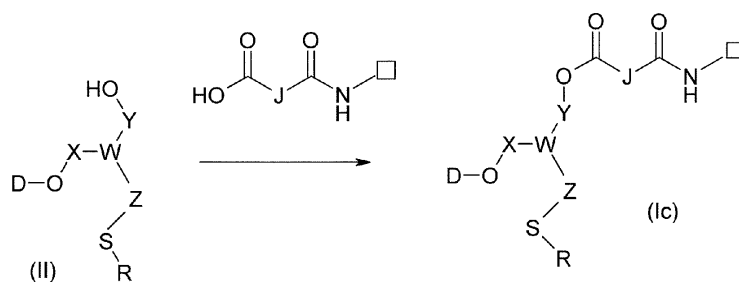


20

(式中、Q および Q ' は、それぞれ独立して、置換または非置換のベンゼン基を表す)
に従った、化合物 (I b) の調製工程、

- 化合物 (I I) から出発する、下記の合成経路：

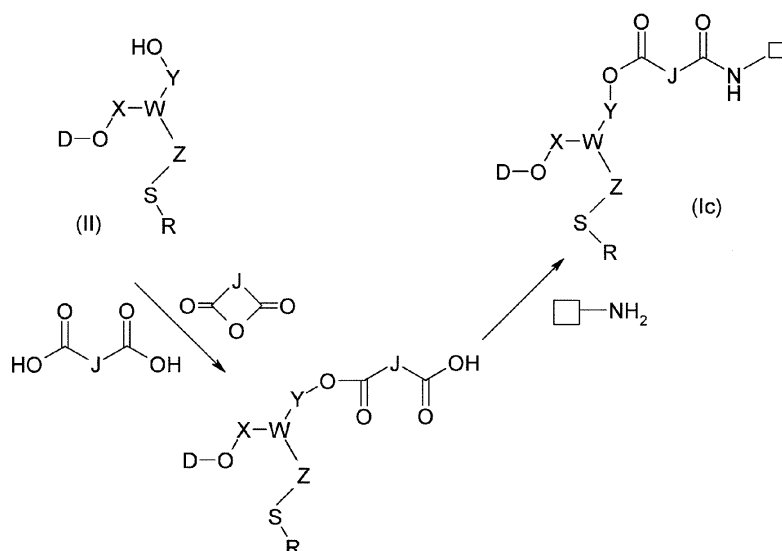
【化 6】



30

または下記の合成経路：

【化 7】



10

に従った化合物 (I c) の調製工程、

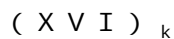
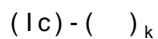
(D、X、Y、Z、W、R、 \square 、 R_1 および R_2 は、請求項 1 から 5 のこれらの各ステップにおける同じ定義を有する)

20

から選択される少なくとも 1 つのステップを含む、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の式 (I) の化合物の製造方法。

【請求項 7】

式：



[式中、

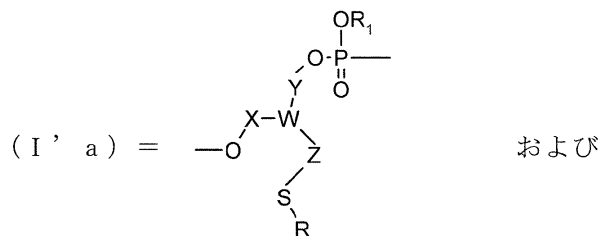
(I c) は、請求項 2 から 5 と同じ意味を有し、化合物 (I c) の R 基はさらに H を表してもよく、

k は、1 から 12 の間の整数を表し、

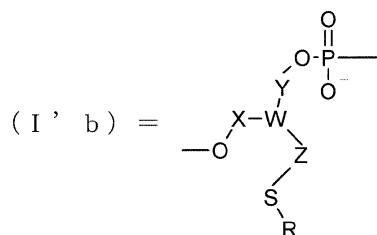
30

(\square) は、(I ' a) または (I ' b)：

【化 8】



40



(式中、X、Y、W、Z、R および R_1 は、請求項 1 から 5 と同じ定義を有し、R はさら

50

に H を表し得る) を表し、

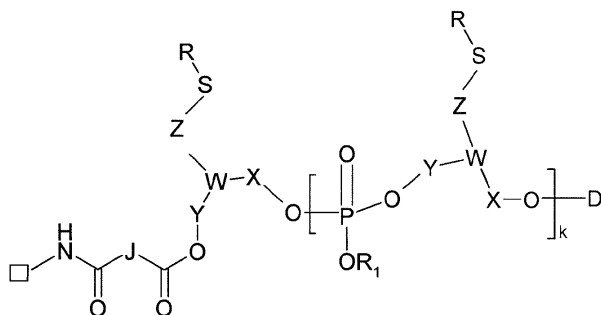
(I c) の X と結合する O と (I ' a) または (I ' b) の P とが結合する]

を有する、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の化合物 (I) のオリゴマー化により得ることができるオリゴマー。

【請求項 8】

式 (X I V) _k :

【化 9】



(X I V) _k

(式中、

、D、X、Y、W、Z、RおよびR₁は、請求項 1 から 4 と同じ定義を有し、Rはさらに H を表すことができ、Dはさらに H を表すことができ、k は、1 から 1 1 の間に含まれる整数である)

を有する、請求項 7 に記載のオリゴマー。

【請求項 9】

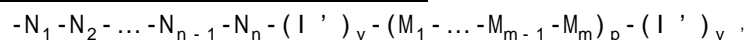
- 請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の化合物 (I) をオリゴヌクレオチド上にグラフトして、グラフト化オリゴヌクレオチドを得るステップ、または

- ヌクレオチドを、請求項 7 または請求項 8 に記載のオリゴマーにグラフトして、グラフト化オリゴヌクレオチドを得るステップ、

を少なくとも含む、修飾オリゴヌクレオチドを製造する方法。

【請求項 10】

前記グラフト化オリゴヌクレオチドが下記の式 (X I I a) :



(式中、

N₁、... N_n は、互いに独立して、ヌクレオチドを表し、

M₁、... M_m は、互いに独立して、ヌクレオチドを表し、

(I ') は、上記の式 (I ' a) または (I ' b) の化合物を表し、

n は、1 から 1 0 0 の間に含まれる整数であり、

m は、1 から 1 0 0 の間に含まれる整数であり、

y は、1 から 1 2 の間に含まれる整数であり、

p は、0 または 1 を表し、

y ' は、p が値 1 を有する場合、0 から 1 2 の間に含まれる整数であり、p が値 0 を有する場合、y ' は 0 に等しく、

は固体支持体を表し、

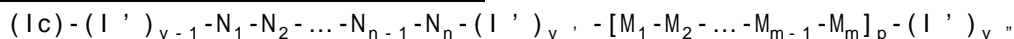
N_n の 5 ' 位と (I ' a) または (I ' b) の P とが結合し、

M_m の 5 ' 位と (I ' a) または (I ' b) の P とが結合する)

に対応する、請求項 9 に記載の修飾オリゴヌクレオチドを製造する方法。

【請求項 11】

前記グラフト化オリゴヌクレオチドが下記の式 (X I I I a) :



(式中、

N_1, \dots, N_n は、互いに独立して、ヌクレオチドを表し、

M_1, \dots, M_m は、互いに独立して、ヌクレオチドを表し、

(I') は、上記の式 (I' a) または (I' b) の化合物を表し、

n は、1 から 100 の間に含まれる整数であり、

m は、1 から 100 の間に含まれる整数であり、

y は、1 から 12 の間に含まれる整数であり、

y' は、0 から 12 の間に含まれる整数であり、

p は、 y' が 0 でなければ値 0 または 1 を有し、 y' が値 0 を有する場合、その時 p は値 0 を有し、

y'' は、 p が値 1 を有する場合、0 から 12 の間に含まれる整数であり、 p が値 0 を有する場合、その時 y'' は 0 を有し、

(Ic) の X と結合する O と (I' a) または (I' b) の P とが結合し、

N_n の 5' 位と (I' a) または (I' b) の P とが結合し、

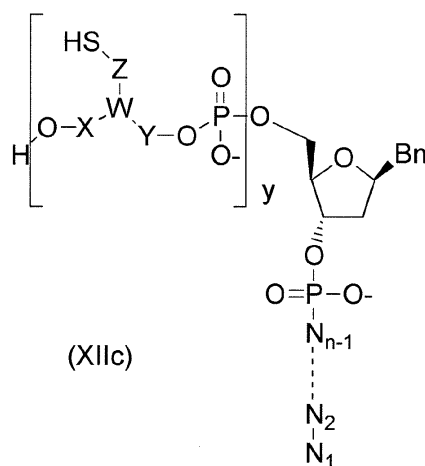
M_m の 5' 位と (I' a) または (I' b) の P とが結合する)

に対応する、請求項 9 に記載の修飾オリゴヌクレオチドを製造する方法。

【請求項 12】

式 (X I I c) :

【化 10】



(X I I c)

(式中、

n は、1 から 100 の間に含まれる整数であり、

y は、1 から 12 の間に含まれる整数であり、

N_1, \dots, N_{n-1} は、互いに独立して、ヌクレオチドを表し、

W は、 CH 、 CH_3 、 CH_2CH_3 、シクロヘキサントリイルおよびベンゼントリイル基から選択され、

Z は、 $C1-C6$ アルキレンオキシ基、酸素含有または窒素含有 $C3-C6$ シクロヘテロアルキレン基、 $C1-C6$ $NC(O)-$ アルキレン基、 $C1-C6$ $CON-$ アルキレン基から選択され (ここで、各置換基中、アルキレン部位が S と結合する)、

Y は、直鎖または分枝鎖の、 $C1-C6$ アルキレン基、 $C1-C6$ アミノアルキレン基、 $C1-C6$ アルキレンオキシ基、 $C3-C6$ シクロアルキレン基、酸素含有または窒素含有 $C3-C6$ シクロヘテロアルキレン基から選択され (ここで、置換基中、アルキレン部位が T と結合する)、

X は、直鎖または分枝鎖の、 $C1-C6$ アルキレン基、 $C1-C6$ アミノアルキレン基、 $C1-C6$ アルキレンオキシ基、 $C3-C6$ シクロアルキレン基、酸素含有または窒

10

20

30

40

50

を少なくとも含む、ヌクレオチドの合成のための自動装置。

【請求項 15】

請求項 12 または 13 に記載の少なくとも 1 つの修飾オリゴヌクレオチドによりグラフト化された基材であって、

前記基材は、金またはプラチナの膜により被覆された、または少なくとも 1 つ炭素 - 炭素二重結合もしくは炭素 - 炭素三重結合を含む基またはハロアセトアミド基によりグラフト化された、少なくとも 1 つのレシーピングゾーンを含み、

金の膜の場合、前記基材は金属製であり、

少なくとも 1 つの炭素 - 炭素二重結合もしくは炭素 - 炭素三重結合を含む基またはハロアセトアミド基によりグラフト化された場合、前記基材はプラスチック製である、グラフト化基材。

10

【請求項 16】

金属製基材が銅製もしくはチタン製である、および / またはプラスチック製基材がポリスチレン製である、請求項 15 に記載の基材。

【請求項 17】

試験キットであって、前記試験キットは、

- 少なくとも 1 つの基材であって、前記基材は、金またはプラチナの金属の膜により被覆された少なくとも 1 つのレシーピングゾーンを含む基材か、または少なくとも 1 つの炭素 - 炭素二重結合もしくは炭素 - 炭素三重結合を含む基またはハロアセトアミド基によりグラフト化された基材と、

20

- 請求項 12 または 13 に記載の少なくとも 1 つの修飾オリゴヌクレオチドと、を含む試験キット。

【請求項 18】

オリゴヌクレオチドと別の分子との間の親和性試験を行うための、請求項 15 に記載の基材の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、オリゴヌクレオチドにグラフト可能なオリゴマー鎖の形成に適切なチオール化合物に関する。本発明はさらに、このような化合物、つまり 1 以上のチオール官能基を有する化合物によりグラフト化されたオリゴヌクレオチドに関し、この化合物は、金表面への固定に、またはグラフト化表面、特に、マレイミドまたはアクリルアミド官能基によるグラフト化表面への固定に、適切に用いられる。本発明はさらに、検出試験のキットに関し、前記検出試験は、ヌクレオチドと、表面として使用する他の分子との間の相互作用を検出し、前記表面として使用する他の分子は、本発明に係るオリゴヌクレオチドが固定された金表面またはグラフト化表面、とりわけマレイミドまたはアクリルアミド官能基によるグラフト化表面として用いられる。

30

【背景技術】

【0002】

オリゴヌクレオチドは短鎖ヌクレオチドを含む分子であり、ヌクレオチドの数は、1 から約 100 の範囲である。オリゴヌクレオチドは RNA (リボ核酸) または DNA (デオキシリボ核酸) の断片である。オリゴヌクレオチドは、一般に一本鎖として合成される。

40

【0003】

オリゴヌクレオチドは、酵素的手段または化学合成方法により合成可能である。化学的方法を選択した場合、通常、オリゴヌクレオチドは、当業者に周知の技術、例えば、ホスホラミダイト、H - ホスホネートまたはホスホジエステルやホスホトリエステルを使用する方法によって実施される技術により固体支持体上に合成され、後者の 2 つの化合物は、リン酸の誘導体であり、一方ホスホラミダイトは亜リン酸の誘導体である。

【0004】

オリゴヌクレオチドの重要な特性は、特定の配列の遺伝子およびタンパク質機能を制御

50

する、それらの能力である。この特性により、オリゴヌクレオチドおよびそれらの誘導体化合物は、分子生物学研究および多数の薬学的および診断的用途に広範囲に使用される。この研究は、利用可能な大量のオリゴヌクレオチドを有することが必要である。したがって、非常に純粋な大量のオリゴヌクレオチドを作製する方法が要求される。

【0005】

特定のヌクレオチド配列を有する核酸は、生体試料中のDNAの検出に広範囲に使用される。この検出試験の原理は、ヌクレオチド配列と標的配列との相補性、それによる二本鎖の形成を頼りにしている。この二本鎖は、ハイブリダイゼーションと呼ばれる過程の間に形成される。

【0006】

このハイブリダイゼーション現象は、その後、さまざまな方法、特に当初存在した配列に結合することが意図されるヌクレオチド配列のマーキングにより検出可能である。ハイブリダイゼーション現象を検出するための、蛍光または放射性のマーキング法は、ある不利益を有する。マーキングは、ヌクレオチド配列の合成の間に付加ステップを必要とし、このステップは、時として実施が困難である。マーキングにより検出されるこのハイブリダイゼーション現象に基づく試験は、ハイブリダイゼーションステップの後で、試料の標的配列と結合しなかったマーキングされたヌクレオチド配列の除去を必要とする。

【0007】

検出の他の方法、特に、ヌクレオチド配列をまず表面に固定し、次いで、試験試料をその表面と接触させて、二本鎖の形成によりハイブリダイゼーション現象を作り出す方法をその後実施している。

【0008】

これらの他の方法の中で、電気化学的方法がますます使用されている。これらの方法は、電極、例えば金電極へのオリゴヌクレオチドの固定化に基づく。試験の間に、金電極に固定された一本鎖オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションを、電流を測定することにより定量化し、この電流は、固定された一本鎖オリゴヌクレオチドと試料のオリゴヌクレオチドとの間に形成された二本鎖の数に依存する。

【0009】

それらの試験を理解するために、オリゴヌクレオチドを金属表面、特に金表面に固定する。この固定化は、とりわけ、金原子とイオウ原子との間の結合を用いて得ることができる。しかし、Au-S結合は、中程度の強度の結合である。したがって、単一の金-イオウ結合は、オリゴヌクレオチドを金表面に非常に安定な様式で固定するためには十分ではない。実際に、試験方法は特に洗浄ステップを伴い、洗浄ステップは、Au-S結合を不安定化させ得る、強力な機械的ストレスを生じる。

【0010】

文献EP 0 523 978は、チオール-修飾オリゴヌクレオチドを作製するために使用可能なホスホラミダイトまたはホスホネート化合物を開示している。それらは、1回だけ、オリゴヌクレオチドの5'末端にだけ導入可能である。

【0011】

文献US 7,601,848は、少なくとも2つの金-イオウ結合を生じさせ、それ故、金表面のオリゴヌクレオチドを安定化させるために、オリゴマー中への組み込みが意図される2つのイオウ原子を含む、多官能性化合物を開示している。これらの化合物のいくつかは、ホスホラミダイト官能基を含む。この文献において使用される化合物は、非常に高価な化合物から製造され、多官能性化合物のオリゴヌクレオチドのカップリングは、この化合物の立体障害のため、満足の行く収率を有さない。この文献において、チオール化合物を互いに結合させるため、結合剤が必要であり、それによって、チオール化合物のオリゴヌクレオチド内への複数導入がもたらされる。

【0012】

U. K. Shigdel and C. He, J. Am. Chem. Soc. 2008, 130(52), 17634-5は、ホスホラミダイト官能基により修飾されたオリゴヌクレオチドを記載しており、該修飾オリゴヌ

10

20

30

40

50

レオチドは、このホスホラミダイト官能基によるオリゴヌクレオチド内への導入が意図される。記載の化合物の合成は、12ステップで実施される。

【0013】

S. Jin et al., J. Org. Chem. 2005, 70, 4284-4299は、ホスホラミダイト官能基およびチオール官能基により修飾されたヌクレオシドを記載している。修飾ヌクレオシドは、生物物理学的プローブをRNAに導入するために使用される。修飾ヌクレオシドは、9ステップで合成され、全収率は12.5%である。

【0014】

A. Hatano et al. Tetrahedron, 61, 2005, 1723-1730は、ホスホラミダイト官能基およびチオフェノール官能基を含むヌクレオシド塩基を伴うDNAの合成を記載している。修飾ヌクレオシドは、7ステップで合成され、収率はわずか5%未満である。

10

【0015】

上記の3つの科学的刊行物のうち、ホスホラミダイト化合物は、このホスホラミダイト官能基によってオリゴヌクレオチドに組み込まれることが意図される修飾ヌクレオシドである。出発試薬は高価であり、合成は、長く複雑であり、これらのホスホラミダイト化合物の合成の収率は低い。加えて、これらのモノサッカライド化合物 (osidic compounds) の立体障害は、表面への満足なグラフティングには適切ではない。

【0016】

A. A. Rowe et al., Anal. Chem. 2011, 83, 9462-9466 は、DNA検出のために金表面への固定が可能であるヌクレオシド化合物を記載している。ヌクレオシド化合物は、単一のチオール官能基による金表面への固定のために、わずか1回のみ含まれる。出発試薬は高価であり、チオール化合物は製造が複雑である。

20

【先行技術文献】

【特許文献】

【0017】

【特許文献1】EP 0 523 978

【特許文献2】US 7,601,848

【非特許文献】

【0018】

【非特許文献1】U. K. Shigdel and C. He, J. Am. Chem. Soc. 2008, 130(52), 17634-5

30

【非特許文献2】S. Jin et al., J. Org. Chem. 2005, 70, 4284-4299

【非特許文献3】A. Hatano et al. Tetrahedron, 61, 2005, 1723-1730

【非特許文献4】A. A. Rowe et al., Anal. Chem. 2011, 83, 9462-9466

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0019】

本発明の目的は、前述の欠点を少なくとも部分的に克服するチオール化合物、すなわち、製造が容易であり、単純かつ経済的な様式でオリゴマー化可能であり、オリゴヌクレオチド内に組み込まれ、表面に固定されることが意図されるチオール化合物を提供することである。

40

【0020】

より詳細には、本発明は、1以上のチオール官能基をオリゴヌクレオチド内に導入する、容易かつ効率的な方法を提供することを目的とする。

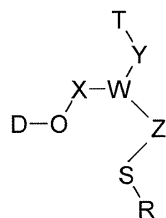
【課題を解決するための手段】

【0021】

本発明の第1の構成は、下記の式(I)に対応する化合物である。

【0022】

【化 1】



(I)

【0023】

(式中、

Tは、 $-\text{O}-\text{P}(\text{OR}_1)\text{N}(\text{R}_2)_2$ 、 $-\text{O}-\text{PH}(\text{O})\text{O}^-$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{JC}$ (O)NH- から選択される基であり、

・ R_1 は、2-シアノエチル、および $\text{R}'_1\text{R}'_2\text{R}'_3\text{SiCH}_2\text{CH}_2$ 基から選択され、 R'_1 、 R'_2 、 R'_3 は、同一であっても、または異なってもよく、直鎖もしくは分枝鎖の1から12の炭素原子を含むアルキルおよびC6-C12アリアルから選択される基を表し、

・ R_2 は、直鎖もしくは分枝鎖の1から12の炭素原子を含むアルキル基、ピロリジンから選択され、

・Jは、単結合、 $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{OCH}_2-$ 、Phがベンジルである $-\text{CH}_2\text{OPhOCH}_2-$ の基から選択され、

・ は固体支持体を表し、

Dは、アルコールの保護基であり、

Wは、C1-C12アルカントリイル基、C6-C18アリアルトリイル基およびC6-C18アラルカン(aralkane)トリイル基から選択され、

Zは、C1-C12アルコキシ基、酸素含有または窒素含有C3-C12シクロヘテロアルキル基、C1-C12 NCO-アルキル基、C1-C12 CON-アルキル基から選択され、

Yは、直鎖または分枝鎖の、C1-C12アルキル基、C1-C12アミノアルキル基、C1-C12アルコキシ基、C3-C12シクロアルキル基、酸素含有または窒素含有C3-C12シクロヘテロアルキル基から選択され、

Xは、直鎖または分枝鎖の、C1-C12アルキル基、C1-C12アミノアルキル基、C1-C12アルコキシ基、C3-C12シクロアルキル基、酸素含有または窒素含有C3-C12シクロヘテロアルキル基から選択され、

Rは、C1-C12アシル、C1-C12 S-アルキル、C6-C12 S-アリアル、S-2-ピリジン、酸素含有または窒素含有C1-C12 S-ヘテロアルキル、C3-C12 S-シクロアルキル、酸素含有または窒素含有C3-C12 S-シクロヘテロアルキル基から選択される。)

【0024】

一実施態様では、前記化合物は、下記の式(Ia)、(Ib)および(Ic)のいずれか1つに対応する。

【0025】

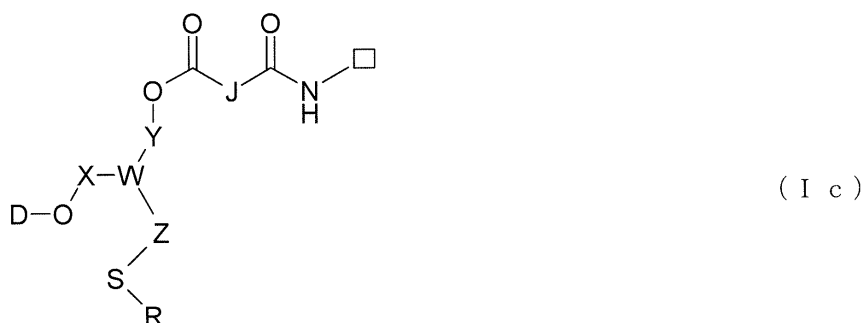
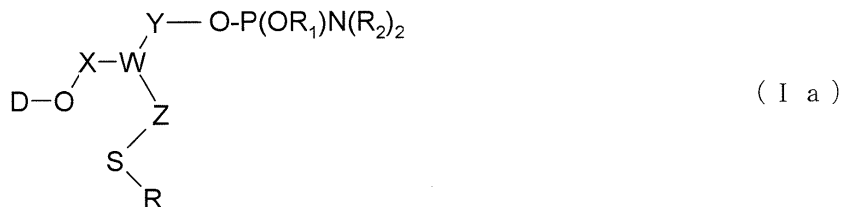
10

20

30

40

【化 2】



【0026】

ある実施態様では、

・Dが4,4'-ジメトキシトリチル、9-フェニルキサンテン-9-イルまたはフルオレニルメトキシカルボニルから選択され、

・Wが、C1-C6アルカントリイル基、C6-C12アリールトリイル基、C6-C12アラルカン(aralkane)トリイル基から選択され、より詳細には、CH、CCH₃、CCH₂CH₃、シクロヘキサントリイルおよびベンゼントリイル基から選択され、および/または

・Zが、C1-C6アルコキシ基、酸素含有または窒素含有C3-C6シクロヘテロアルキル基、C1-C6NCO-アルキル基、C1-C6CON-アルキル基から選択され、および/または

・Yが、直鎖または分枝鎖のC1-C6アルキル基、C1-C6アミノアルキル基、C1-C6アルコキシ基、C3-C6シクロアルキル基、酸素含有または窒素含有C3-C6シクロヘテロアルキル基から選択され、および/または

・Xが、直鎖または分枝鎖のC1-C6アルキル基、C1-C6アミノアルキル基、C1-C6アルコキシ基、C3-C6シクロアルキル基、酸素含有または窒素含有C3-C6シクロヘテロアルキル基から選択され、および/または

・Rが、C1-C6アシル、C1-C6S-アルキル、C6-C6S-アリール、酸素含有または窒素含有C1-C6S-ヘテロアルキル、C3-C6S-シクロアルキル、酸素含有または窒素含有C3-C6S-シクロヘテロアルキル基から選択され、好ましくは、RはC1-C6アシル基である。

【0027】

ある実施態様では、Tが基-O-P(OR₁)N(R₂)₂である。

(式中、R₂はイソプロピル基であり、R₁は、2-シアノエチル、2-(トリメチルシリル)エチル、2-(トリフェニルシリル)エチル、2-(ジフェニルメチルシリル)エチル基から選択される。)

10

20

30

40

50

【 0 0 2 8 】

ある実施態様では、Tが基 - OC(O)JC(O)NH -
 (式中、 は、樹脂、特にポリスチレン、ポリアクリルアミド、ポリエチレングリコール、セルロース、ポリエチレン、ポリエステル、ラテックス、ポリアミド、ポリジメチルアクリルアミド、合成または天然の親水性ポリマー、ガラスビーズ、シリカゲルから選択される固体支持体である)である。

【 0 0 2 9 】

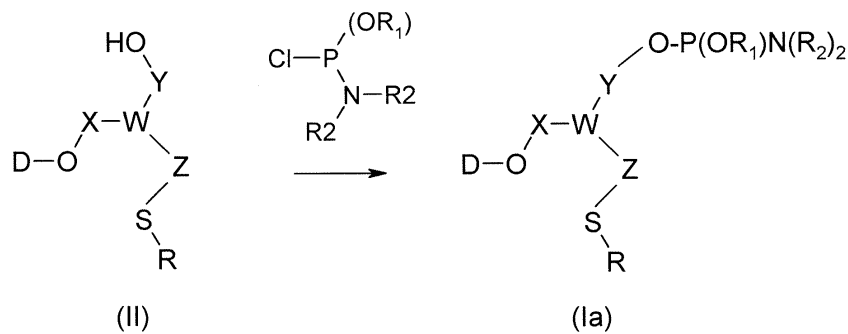
本発明の別の構成は、本発明に係る式 (I) の化合物を製造するための方法である。前記方法は、

下記のステップ：

- 化合物 (I I) から出発する、下記の合成経路：

【 0 0 3 0 】

【 化 3 】

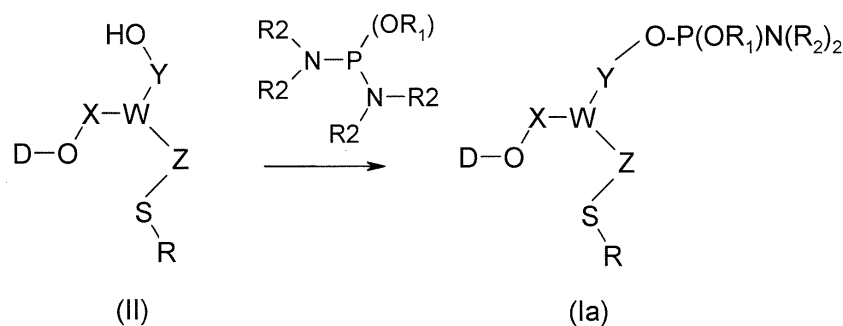


【 0 0 3 1 】

または下記の合成経路：

【 0 0 3 2 】

【 化 4 】



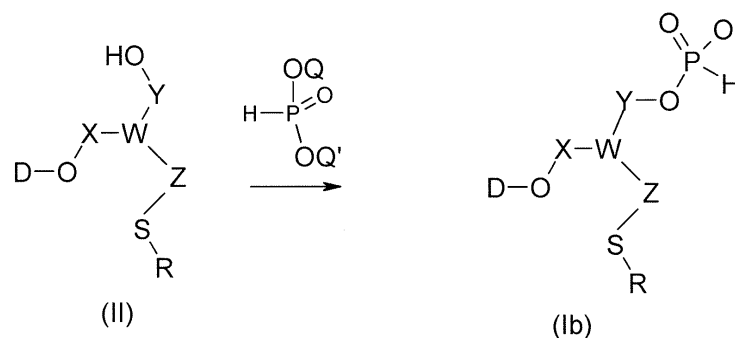
【 0 0 3 3 】

に従った化合物 (I a) の調製工程、

- 化合物 (I I) から出発する、下記の合成経路：

【 0 0 3 4 】

【 化 5 】



10

20

30

40

50

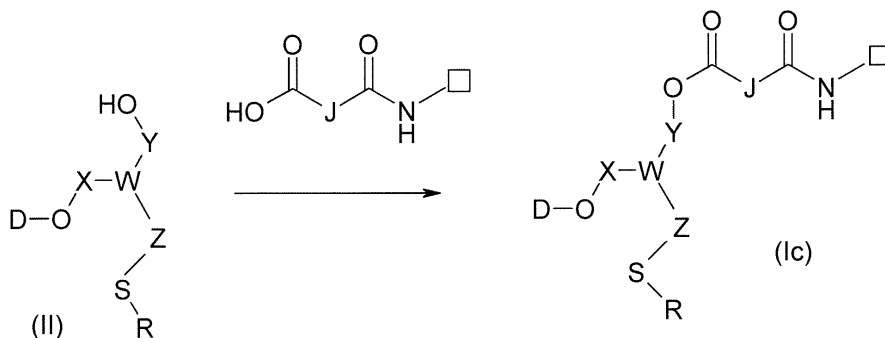
【 0 0 3 5 】

(式中、QおよびQ'は、それぞれ独立して、置換または非置換のベンゼン基を表す)
に従った、化合物(I b)の調製工程、

- 化合物(I I)から出発する、下記の合成経路：

【 0 0 3 6 】

【 化 6 】



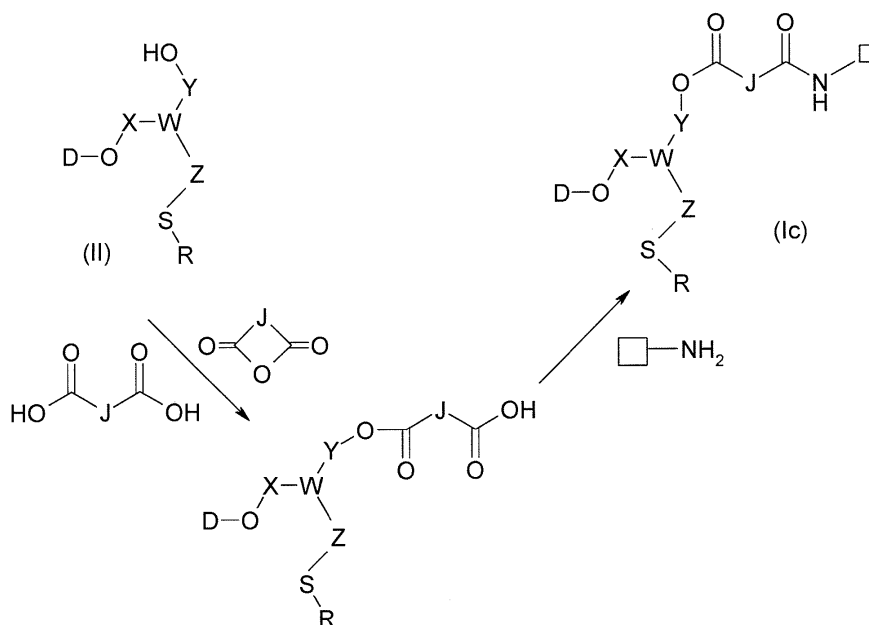
10

【 0 0 3 7 】

または下記の合成経路：

【 0 0 3 8 】

【 化 7 】



20

30

【 0 0 3 9 】

に従った化合物(I c)の調製工程、

(D、X、Y、Z、W、R、 \square 、R₁およびR₂は、化合物(I)におけるこれらの各ス
テップにおける同じ定義を有する)

から選択される少なくとも1つのステップを含む。

【 0 0 4 0 】

本発明の別の構成は、本発明にかかる化合物(I)のオリゴマー化により得ることが
できるオリゴマーであり、オリゴマーは、

式：



[式中、

(I c)は、化合物(I)と同じ意味を有し、化合物(I c)のR基はさらにHを表
してもよく、

40

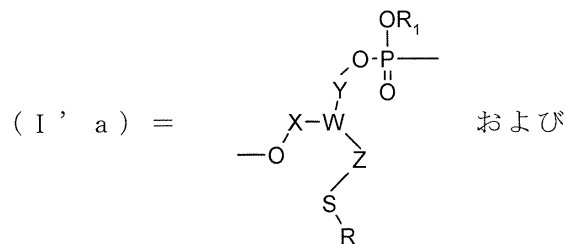
50

k は、1 から 12 の間の整数を表し、

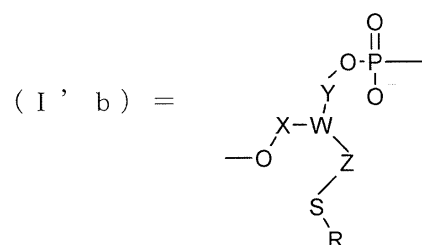
() は、(I ' a) または (I ' b) :

【 0 0 4 1 】

【 化 8 】



10



【 0 0 4 2 】

20

(式中、X、Y、W、Z、R および R₁ は、化合物 (I) と同じ定義を有し、R はさらに H を表し得る) を表す]

を有する。

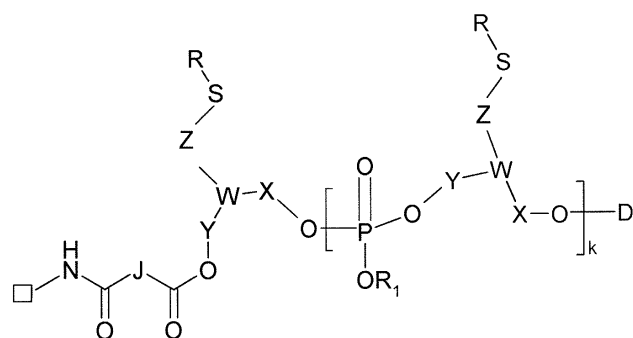
【 0 0 4 3 】

一実施態様では、本発明に係るオリゴマーは、

式 (X I V)_k :

【 0 0 4 4 】

【 化 9 】



30

【 0 0 4 5 】

(式中、

40

、D、X、Y、W、Z、R および R₁ は、化合物 (I) と同じ定義を有し、R はさらに H を表すことができ、D はさらに H を表すことができ、k は、1 から 11 の間に含まれる整数である)

を有する。

【 0 0 4 6 】

本発明は、また修飾オリゴヌクレオチドを製造する方法に関し、前記方法は、

- 本発明に係る化合物 (I) をオリゴヌクレオチド上にグラフトするステップ、または
- ヌクレオチドを、本発明に係るオリゴマーにグラフトするステップ、

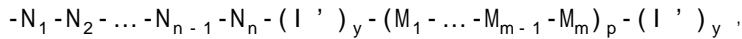
を少なくとも含む

【 0 0 4 7 】

50

本発明の別の構成は、本発明に係る製造方法により得ることができる修飾オリゴヌクレオチドであって、前記修飾オリゴヌクレオチドは、

下記の式 (X I I a) :



(式中、

N_1, \dots, N_n は、互いに独立して、ヌクレオチドを表し、

M_1, \dots, M_m は、互いに独立して、ヌクレオチドを表し、

(I') は、上記の式 ($I' a$) または ($I' b$) の化合物を表し、

n は、1 から 100 の間に含まれる整数であり、

m は、1 から 100 の間に含まれる整数であり、

y は、1 から 12 の間に含まれる整数であり、

p は、0 または 1 を表し、

y' は、 p が値 1 を有する場合、0 から 12 の間に含まれる整数であり、 p が値 0 を有する場合、 y' は 0 に等しく、

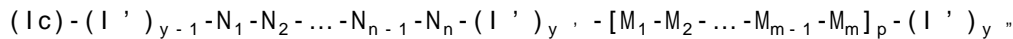
は固体支持体を表す)

を有する。

【0048】

本発明の別の構成は、本発明に係る製造方法により得ることができる修飾オリゴヌクレオチドであって、前記修飾オリゴヌクレオチドは、

下記の式 (X I I I a) :



(式中、

N_1, \dots, N_n は、互いに独立して、ヌクレオチドを表し、

M_1, \dots, M_m は、互いに独立して、ヌクレオチドを表し、

(I') は、上記の式 ($I' a$) または ($I' b$) の化合物を表し、

n は、1 から 100 の間に含まれる整数であり、

m は、1 から 100 の間に含まれる整数であり、

y は、1 から 12 の間に含まれる整数であり、

y' は、0 から 12 の間に含まれる整数であり、

p は、 y' が 0 でなければ値 0 または 1 を有し、 y' が値 0 を有する場合、その時 p は値 0 を有し、

y'' は、 p が値 1 を有する場合、0 から 12 の間に含まれる整数であり、 p が値 0 を有する場合、その時 y'' は 0 を有する)

を有する。

【0049】

一実施態様において、前記修飾オリゴヌクレオチドは、

式 (X I I c) :

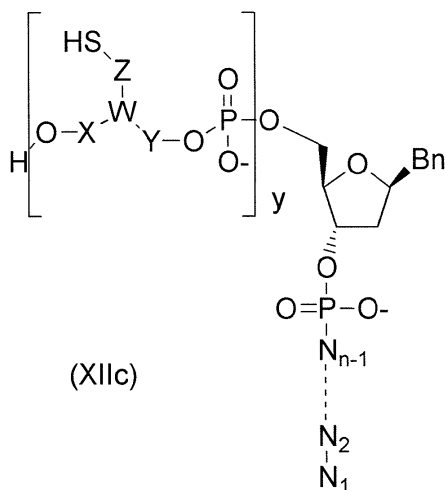
【0050】

10

20

30

【化 1 0】



10

【 0 0 5 1】

(式中、

n、y、N₁、... N_{n-1}は上記と同じ定義を有し

X、Y、Z、Wは上記と同じ定義を有し、

B_nは、n番目のヌクレオチドの塩基を表す)

20

を有する。

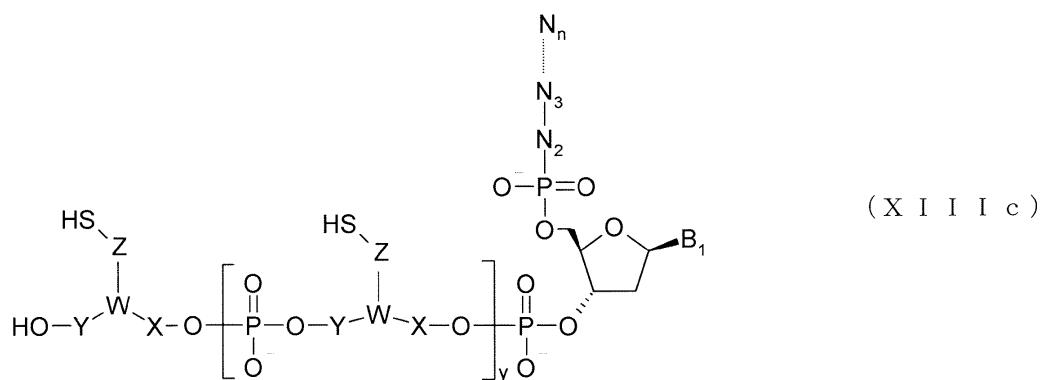
【 0 0 5 2】

一実施態様において、前記修飾オリゴヌクレオチドは、

式(XIIIIc)：

【 0 0 5 3】

【化 1 1】



30

【 0 0 5 4】

(式中、

n、y、Nは上記と同じ定義を有し、

X、Y、Z、Wは上記と同じ定義を有し、

B₁は、1番目のヌクレオチドの塩基に対応する)

40

を有する。

【 0 0 5 5】

本発明の別の構成は、ヌクレオチドの合成のための自動装置に関し、前記自動装置は、

以下を含有する別個の容器、

- ヌクレオチド
- カップリング活性化因子、および
- 洗浄剤、

生成物試料のサンプリングおよび分配のための機械的手段ならびにこれらの機械的手段

50

実施の制御のためのコンピュータ手段、ならびに

本発明に係るオリゴマーによるグラフト化固体支持体、および/または本発明に係る化合物(Ia)もしくは化合物(Ib)を含有する少なくとも1つの容器が配置された、少なくとも1つの容器、
を少なくとも含む。

【0056】

本発明は、さらに本発明に係る少なくとも1つの修飾オリゴヌクレオチドによりグラフト化された基材であって、

前記基材は、金またはプラチナの膜により被覆された、または少なくとも1つ炭素-炭素二重結合もしくは炭素-炭素三重結合を含む基またはハロアセトアミド基、好ましくは、マレイミドもしくはアクリルアミド基を含む基によりグラフト化された、少なくとも1つのレシーピングゾーンを含み、

金の膜の場合、前記基材は金属製であり、

少なくとも1つの炭素-炭素二重結合もしくは炭素-炭素三重結合を含む基またはハロアセトアミド基、好ましくは、マレイミドもしくはアクリルアミド基によりグラフト化された場合、前記基材はプラスチック製である、グラフト化基材に関する。

【0057】

本発明の一実施形態に従って、少なくとも1つの炭素-炭素二重結合または炭素-炭素三重結合を含む基は、アルファ位のカルボニル官能基により活性化されたアルケン、好ましくは、マレイミド、アクリルアミド基から選択されるアルケンから選択される。

【0058】

一実施形態に従って、ハロアセトアミド基は、プロモアセトアミドおよびヨードアセトアミド基から選択される。

【0059】

本発明の一実施形態に従って、少なくとも1つの炭素-炭素三重結合を含む基は、アルファ位のカルボニル官能基により活性化されたアルキンから選択され、このアルキンは、好ましくは2-プロピンアミド基から選択される。

【0060】

一実施形態に従って、金属基材は銅製またはチタン製であり、および/またはプラスチック基材はポリスチレン製である。

【0061】

本発明はまた、試験キットを提案し、前記試験キットは、

- 少なくとも1つの基材であって、前記基材は、金またはプラチナの金属の膜により被覆された少なくとも1つのレシーピングゾーンを含む基材か、または少なくとも1つの炭素-炭素二重結合もしくは炭素-炭素三重結合を含む基またはハロアセトアミド基、好ましくは、マレイミドもしくはアクリルアミド基によりグラフト化された基材と、

- 本発明に係る、少なくとも1つの修飾オリゴヌクレオチドと、
を含む。

【0062】

本発明の別の構成は、オリゴヌクレオチドと別の分子との間の親和性試験を行うための、本発明に係る基材の使用に関する。

【0063】

本発明の別の構成は、少なくとも2つのチオール基を含む化合物の、診断試験の確立のための使用に関し、

前記チオール基は、オリゴヌクレオチドを、少なくとも1つの炭素-炭素二重結合もしくは炭素-炭素三重結合を含む基またはハロアセトアミド基、好ましくは、マレイミドもしくはアクリルアミド基により修飾された表面にグラフトする。

【0064】

本発明の有利性は、下記：

- 本発明のチオール化合物は安価である、

- 本発明のチオール化合物は、実施が単純な方法により得られる、
- 本発明のチオール化合物は、単純かつ効率的な様式で、オリゴヌクレオチドに1回以上導入することができる、
- 本発明のグラフト化オリゴヌクレオチドは、金表面に、または通常アクリルアミドもしくはマレイミド基によりグラフト化された表面に、安定に固定することができる、
- 本発明のオリゴヌクレオチドは、完全に自動化された方法により製造可能である、のとおりでである。

【0065】

本発明の他の特長および有利性は、下記の本発明の好ましい実施形態の説明、所与の実施例を読み、添付の図面を参照することにより明らかになると思われる。

10

【図面の簡単な説明】

【0066】

【図1】図1は、化合物(I)の合成方法を説明する概略図を示す。

【図2A】図2Aは、化合物(Ia)から出発する、本発明の化合物のオリゴマーの合成方法を説明する概略図を示す。

【図2B】図2Bは、化合物(Ib)から出発する、本発明の化合物のオリゴマーの合成方法を説明する概略図を示す。

【図3】図3は、その5'末端において(I)のオリゴマーによりグラフト化されたオリゴヌクレオチド化合物(XIIc)の合成方法を説明する概略図を示す。

【図4】図4は、その3'末端において(I)のオリゴマーによりグラフト化されたオリゴヌクレオチド化合物(XIIIC)の合成方法を表す概略図を示す。

20

【図5】図5は、修飾オリゴヌクレオチドの金表面におけるグラフト率のヒストグラムを示す。

【図6】図6は、修飾オリゴヌクレオチドの金表面へのグラフティングの安定性を、60における時間の関数として表すグラフを示す。

【図7】図7は、修飾オリゴヌクレオチドの金表面へのグラフティングの安定性を、80における時間の関数として表すグラフを示す。

【図8】図8は、蛍光検出によるELOS A試験の結果のグラフを示す。

【図9】図9は、モノチオールプローブによるプローブ/標的ハイブリダイゼーション試験の結果のグラフを示す。

30

【図10】図10は、ジチオールプローブによるプローブ/標的ハイブリダイゼーション試験の結果のグラフを示す。

【図11】図11は、テトラチオールプローブによるプローブ/標的ハイブリダイゼーション試験の結果のグラフを示す。

【図12】図12は、金表面にグラフトされたテトラチオールプローブによる、プローブ/標的ハイブリダイゼーション試験の結果のグラフを示す。

【図13a】図13aは、本発明に従った修飾オリゴヌクレオチドと、活性化アルケニルもしくはアルキニル基によりグラフト化された表面との間の反応式を示す。

【図13b】図13bは、本発明に従った修飾オリゴヌクレオチドと、光($\lambda = 265\text{ nm}$)により活性化されたアルケニルもしくはアルキニル基によりグラフト化された表面との間の反応式を示す。

40

【図14】図14は、それぞれ、本発明に係る、1、2、4、6および8つのチオール基含有化合物を含むプローブによる、プローブ/標的ハイブリダイゼーション試験の結果のグラフを示す。

【発明を実施するための形態】

【0067】

本発明は、ホスホラミダイト、H-ホスホネート構造の化合物または保護されたチオール官能基を有する固体支持体に結合された化合物の調製および使用に関する。これらのチオール化合物は、オリゴヌクレオチド内への導入が意図される。このようにして得られたオリゴヌクレオチドは、複数のチオール官能基を有し得る。

50

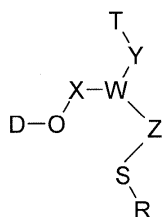
【 0 0 6 8 】

[チオール化合物]

本発明の化合物は、下記の式 (I) に対応する。

【 0 0 6 9 】

【 化 1 2 】



(I)

10

【 0 0 7 0 】

(式中、

T は、 $-\text{O}-\text{P}(\text{OR}_1)\text{N}(\text{R}_2)_2$ 、 $-\text{O}-\text{PH}(\text{O})\text{O}^-$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{JC}(\text{O})\text{NH}-$ から選択される基であり、

・ R_1 は、2 - シアノエチル、 $\text{R}'_1\text{R}'_2\text{R}'_3\text{SiCH}_2\text{CH}_2$ 基から選択され、ここで、 R'_1 、 R'_2 、 R'_3 は、同一であっても、または異なってもよく、直鎖もしくは分枝鎖の、1 から 12 の炭素原子を含むアルキルおよび C 6 - C 12 アリールから選択される基を表し、

20

・ R_2 は、直鎖もしくは分枝鎖の 1 から 12 の炭素原子を含むアルキル基、ピロリジンから選択され、

・ J は、単結合、 $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{OCH}_2-$ 、Ph がベンジルである $-\text{CH}_2\text{OPhOCH}_2-$ の基から選択され、

・ は固体支持体を表し、

D は、アルコールの保護基であり、

W は、C 1 - C 12 アルカントリイル基、C 6 - C 18 アリールトリイル基および C 6 - C 18 アラルカン (aralkane) トリイル基から選択され、

Z は、C 1 - C 12 アルコキシ基、酸素含有または窒素含有 C 3 - C 12 シクロヘテロアルキル基、C 1 - C 12 NCO - アルキル基、C 1 - C 12 CON - アルキル基から選択され、

30

Y は、直鎖または分枝鎖の、C 1 - C 12 アルキル基、C 1 - C 12 アミノアルキル基、C 1 - C 12 アルコキシ基、C 3 - C 12 シクロアルキル基、酸素含有または窒素含有 C 3 - C 12 シクロヘテロアルキル基から選択され、

X は、直鎖または分枝鎖の、C 1 - C 12 アルキル基、C 1 - C 12 アミノアルキル基、C 1 - C 12 アルコキシ基、C 3 - C 12 シクロアルキル基、酸素含有または窒素含有 C 3 - C 12 シクロヘテロアルキル基から選択され、

R は、C 1 - C 12 アシル、C 1 - C 12 S - アルキル、C 6 - C 12 S - アリール、S - 2 - ピリジン、酸素含有または窒素含有 C 1 - C 12 S - ヘテロアルキル、C 3 - C 12 S - シクロアルキル、酸素含有または窒素含有 C 3 - C 12 S - シクロヘテロアルキル基から選択される。)

40

【 0 0 7 1 】

本発明の意味の範囲内で、「アルカントリイル」は、1 以上のアルキル基により場合により置換されている直鎖、分枝鎖または環状のアルカントリイルを意味する。

【 0 0 7 2 】

本発明に従った化合物中に存在できるアリールトリイル基としては、ベンゼントリイルおよびナフタレントリイルを挙げることができる。

【 0 0 7 3 】

アラルカン (aralkane) 基としては、1, 3, 5 - トリメチルベンゼントリイルおよびトリメチルナフタレントリイルを挙げることができる。

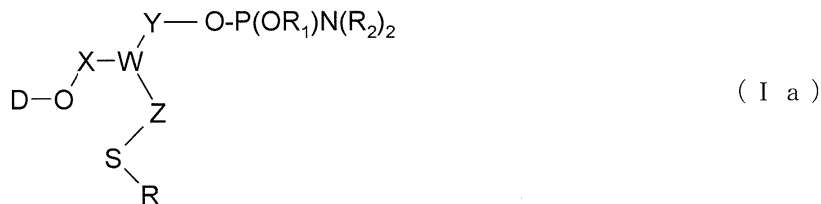
50

【 0 0 7 4 】

化合物 (I) は、下記の式 (I a)、(I b) および (I c) に対応する 3 種類の亜化合物 (I a)、(I b) および (I c) に分けることができ、式中、パラメーター X、Y、Z、R、R₁、R₂ および D は、上記の式 (I) に提示される同じ定義を有する：

【 0 0 7 5 】

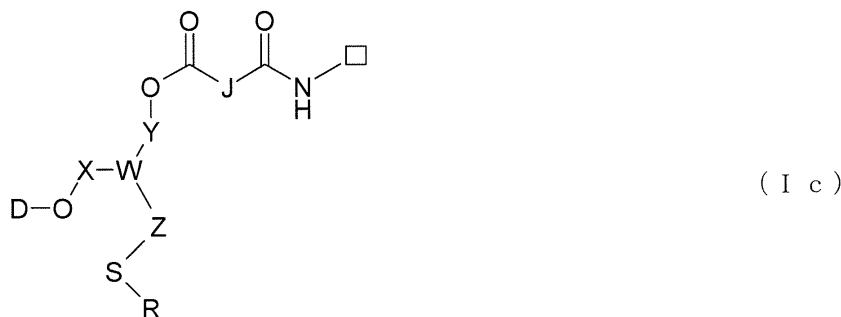
【 化 1 3 】



10



20



【 0 0 7 6 】

好ましくは、R₁ は、2 - シアノエチルおよび R'₁ R'₂ R'₃ Si CH₂ CH₂ 基から選択され、

R'₁、R'₂、R'₃ は同一であっても、または異なってもよく、直鎖または分枝鎖の、1 から 6 の炭素原子を含むアルキル基およびフェニルから選択される基を表し、

好ましくは R₁ は、2 - シアノエチルおよび R'₁ R'₂ R'₃ Si CH₂ CH₂ 基から選択され、

R'₁、R'₂、R'₃ は同一であっても、または異なってもよく、直鎖または分枝鎖の、1 から 3 の炭素原子を含むアルキル基およびフェニルから選択される基を表し、

さらに好ましくは、R₁ は、2 - シアノエチル、2 - (トリメチルシリル) エチル、2 - (トリフェニルシリル) エチル、2 - (ジフェニルメチルシリル) エチル基から選択される。

【 0 0 7 7 】

好ましくは、R₂ は、直鎖または分枝鎖の、1 から 6 の炭素原子を含むアルキル基から選択される。好ましくは、R₂ は、イソプロピル基 (i P r) を表す。

【 0 0 7 8 】

好ましくは、固体支持体 は、樹脂、特にポリスチレン、ポリアクリルアミド、ポリエチレングリコール、セルロース、ポリエチレン、ポリエステル、ラテックス、ポリアミド、ポリジメチルアクリルアミドで構成される樹脂、合成または天然の親水性ポリマー、ガ

30

40

50

ラスビーズ、シリカゲルから選択される。

【0079】

好ましくは、Wは、C1 - C6アルカントリイル基、C6 - C12アリールトリイル基、C6 - C12アラルカン (aralkane) トリイル基から選択され、より好ましくは、CH、CCH₃、CCH₂CH₃基、シクロヘキサントリイルおよびベンゼントリイルから選択される。

【0080】

好ましくは、Dは、化合物(I)の他の基に対して直交脱保護 (orthogonal deprotection) が可能なアルコールの保護基から選択される。より詳細には、Dは、4, 4' - ジメトキシトリチル (DMTr)、9 - フェニルキサンテン - 9 - イル (ピキシル (pixyl)) またはフルオレニルメトキシカルボニル (Fmoc) から選択される。ピキシル保護基は、特に、文献Chattopadhyaya and Reese, Chem. Soc. Chem. Comm., 1978年, 639-640頁に記載されている。アルコールの別の保護基候補は、tert - ブチル - ジメチルシリル基であり、およびこの場合ポリスチレン支持体が特に好ましいと思われる。

10

【0081】

好ましくは、Zは、C1 - C6アミノアルキル、C1 - C6アルコキシ、酸素含有または窒素含有C3 - C6シクロヘテロアルキル、C1 - C6NCO - アルキル、C1 - C6CON - アルキル基から選択される。

【0082】

好ましくは、Yは、直鎖または分枝鎖の、C1 - C6アルキル基、C1 - C6アミノアルキル、C1 - C6アルコキシ、C3 - C6シクロアルキル、酸素含有または窒素含有C3 - C6シクロヘテロアルキル基から選択される。

20

【0083】

好ましくは、Xは、直鎖または分枝鎖の、C1 - C6アルキル基、C1 - C6アミノアルキル、C1 - C6アルコキシ、C3 - C6シクロアルキル、酸素含有または窒素含有C3 - C6シクロヘテロアルキル基から選択される。

【0084】

好ましくは、Rは、C1 - C12アシル、C1 - C6S - アルキル、C6S - アリール、酸素含有または窒素含有C6S - ヘテロアルキル、C6S - シクロアルキル、酸素含有または窒素含有C6S - シクロヘテロアルキル基から選択される。

30

【0085】

一実施形態に従って、直鎖または分枝鎖のアルキルは、メチル、エチル、プロピル、ブチル、ペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル、ノニル、デシル、ウンデシル、ドデシル、イソプロピル、イソブチル、tert - ブチルの基から選択される。

【0086】

一実施形態に従って、アミノアルキルは、1以上の窒素原子を含む、アミノメチル、アミノエチル、アミノプロピル、アミノブチル、アミノペンチル、アミノヘキシル、アミノヘプチル、アミノオクチル、アミノノニル、アミノデシル、アミノウンデシル、アミノドデシル、アミノイソプロピル、アミノイソブチル、アミノ - tert - ブチルの基から選択される。

40

【0087】

一実施形態に従って、アルコキシは、1以上の酸素原子を含む、メトキシ、エトキシ、プロピルオキシ、オキシブチルオキシ、ペンチルオキシ、ヘキシルオキシ、ヘプチルオキシ、オクチルオキシ、ノニルオキシ、デシルオキシ、ウンデシルオキシ、ドデシルオキシ、イソプロピルオキシ、イソブチルオキシ、tert - ブチルオキシの基から選択される。

【0088】

一実施形態に従って、シクロアルキルは、場合により1以上の不飽和を含み、3から12の間の炭素原子、好ましくは6の炭素原子を含む環から選択される。

【0089】

50

一実施形態に従って、シクロヘテロアルキルは、1以上の窒素原子および/または酸素原子により置換され、場合により、1以上の不飽和を含み、3から12の間の炭素原子、好ましくは5の炭素原子および1個の窒素原子または酸素原子を含む環から選択される。

【0090】

一実施形態に従って、NCO-アルキルおよびCON-アルキルは、アルキルが、メチル、エチル、プロピル、ブチル、ペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル、ノニル、デシル、ウンデシル、ドデシル、イソプロピル、イソブチル、tert-ブチルの基から選択される直鎖または分枝鎖のアルキル基であってよい基である。

【0091】

一実施形態に従って、R₂は、イソプロピル基(iPr)である、および/またはR₁はシアノエチル基である。

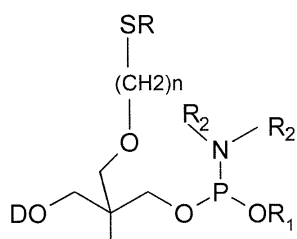
10

【0092】

好ましい実施形態に従って、チオール化合物(Ia)は、下記の式：

【0093】

【化14】



(VI)

20

【0094】

(式中、

nは、1から12の間、好ましくは1から6の間の整数であり、

R、R₁、R₂およびDは、上記の(Ia)と同じ定義を有する)

に対応する化合物(VI)である。

【0095】

好ましくは、R₂はイソプロピル基(iPr)であり、R₁はシアノエチル基である。

【0096】

好ましくは、Rはアセチル基である。

30

【0097】

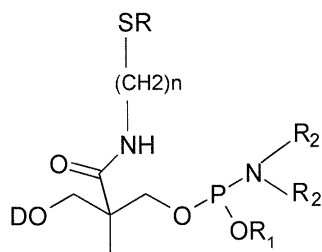
好ましくは、Dは4,4'-ジメトキシトリチルである。

【0098】

別の実施形態に従って、チオール化合物(Ia)は、下記の式：

【0099】

【化15】



(VII)

40

【0100】

(式中、

nは、1から12の間、好ましくは1から6の間の整数であり、

R、R₁、R₂およびDは、上記の式(Ia)と同じ定義を有する)

に対応する化合物(VII)である。

50

【 0 1 0 1 】

好ましくは、 R_2 はイソプロピル基 (i P r) であり、 R_1 はシアノエチル基である。

【 0 1 0 2 】

好ましくは、 R はアセチル基である。

【 0 1 0 3 】

好ましくは、 D は 4 , 4 ' - ジメトキシトリチルである。

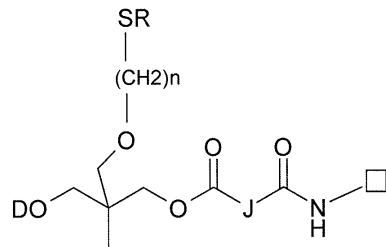
【 0 1 0 4 】

一実施形態に従って、チオール化合物 (I c) は、下記の式：

【 0 1 0 5 】

【 化 1 6 】

10



(V I I I)

【 0 1 0 6 】

(式中、

n は、1 から 1 2 の間、好ましくは 1 から 6 の間の整数であり、

20

R 、 D および J は、上記の式 (I c) と同じ定義を有する)

に対応する化合物 (V I I I) である。

【 0 1 0 7 】

好ましくは、 R はアセチル基である。好ましくは、 J はエチル基である。好ましくは、 D は 4 , 4 ' - ジメトキシトリチルである。

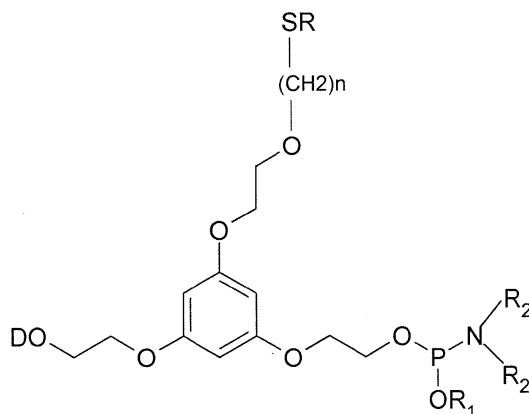
【 0 1 0 8 】

一実施形態に従って、チオール化合物 (I a) は、式：

【 0 1 0 9 】

【 化 1 7 】

30



(I X)

40

【 0 1 1 0 】

(式中、

n は、1 から 1 2 の間、好ましくは 1 から 6 の間の整数であり、

R 、 R_1 、 R_2 および D は、上記の式 (I a) と同じ定義を有する)

の化合物 (I X) である。

【 0 1 1 1 】

好ましくは、 R_2 はイソプロピル基 (i P r) であり、 R_1 はシアノエチル基である。

【 0 1 1 2 】

好ましくは、 R はアセチル基である。

50

【 0 1 1 3 】

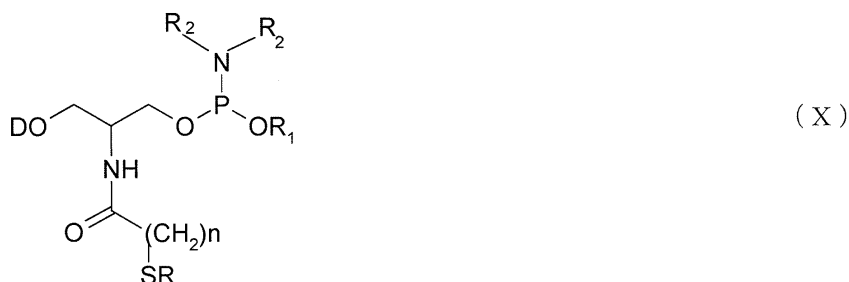
好ましくは、Dは4,4'-ジメトキシトリチルである。

【 0 1 1 4 】

一実施形態に従って、チオール化合物 (I a) は、式：

【 0 1 1 5 】

【 化 1 8 】



10

【 0 1 1 6 】

(式中、

nは、1から12の間、好ましくは1から6の間の整数であり、

R、R₁、R₂およびDは、上記の (I a) と同じ定義を有する)

の化合物 (X) である。

【 0 1 1 7 】

好ましくは、R₂はイソプロピル基 (iPr) であり、R₁はシアノエチル基である。

【 0 1 1 8 】

好ましくは、Rはアセチル基である。

【 0 1 1 9 】

好ましくは、Dは4,4'-ジメトキシトリチルである。

【 0 1 2 0 】

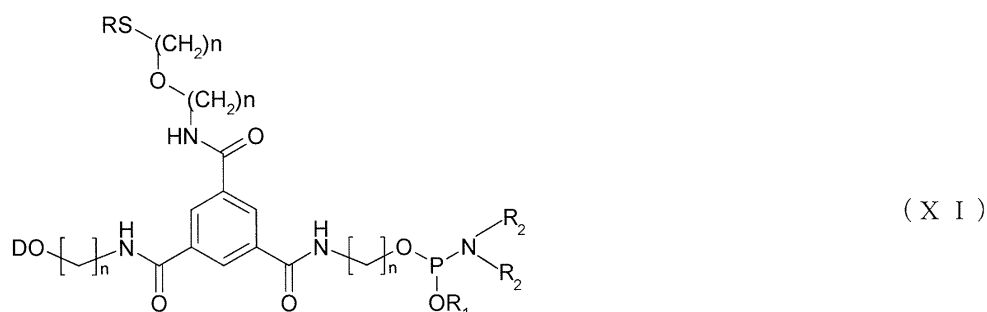
好ましくは、R₂はイソプロピル基 (iPr) であり、R₁はシアノエチル基である。

【 0 1 2 1 】

一実施形態に従って、チオール化合物 (I a) は、式：

【 0 1 2 2 】

【 化 1 9 】



40

【 0 1 2 3 】

(式中、

nは、1から12の間、好ましくは1から6の間の整数であり、

R、R₁、R₂およびDは、上記の式 (I a) と同じ定義を有する)

の化合物 (XI) である。

【 0 1 2 4 】

好ましくは、R₂はイソプロピル基 (iPr) であり、R₁はシアノエチル基である。

【 0 1 2 5 】

好ましくは、Rはアセチル基である。

【 0 1 2 6 】

50

好ましくは、Dは4,4'-ジメトキシトリチルである。

【0127】

[製造方法]

化合物(Ia)、(Ib)および(Ic)の製造方法を、図1の概略図に表す。

【0128】

化合物(Ia)、(Ib)および(Ic)は、下記の式：

【0129】

【化20】



10

【0130】

(式中、D、X、W、Y、ZおよびRは、チオール化合物(I)と同じ定義を有する)を有する同じ化合物(II)から得られる。

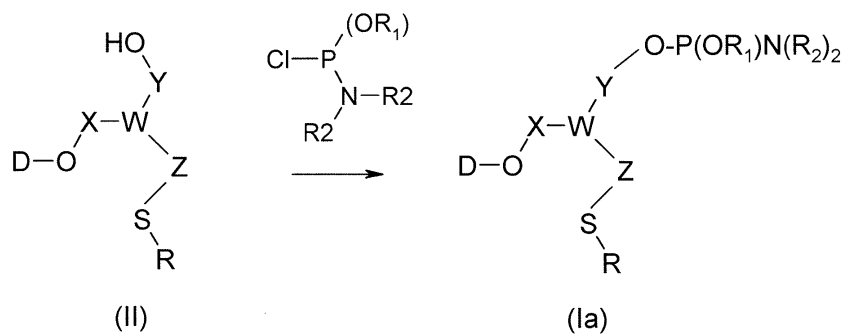
【0131】

式(Ia)の化合物は、下記の式：

20

【0132】

【化21】



30

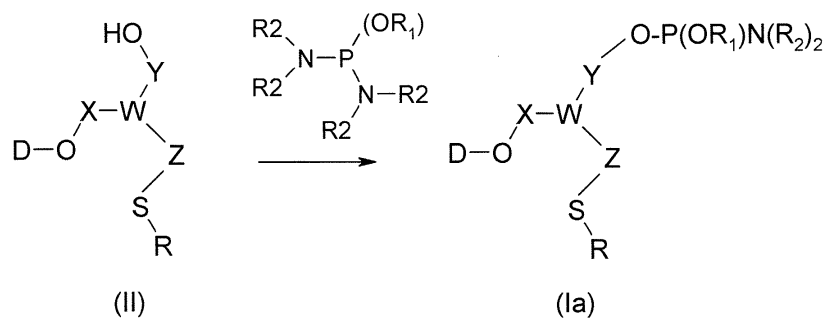
【0133】

に表された反応により、

または、好ましくはジイソプロピルアミンテトラゾリドの塩の存在下で、下記の式：

【0134】

【化22】



40

【0135】

に表された反応によって得ることができる。

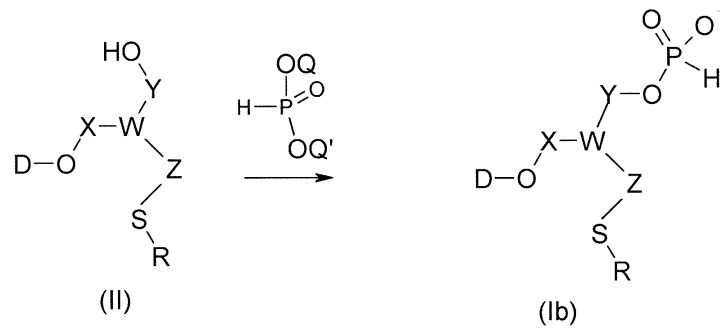
【0136】

式(Ib)の化合物は、下記の式：

50

【 0 1 3 7 】

【 化 2 3 】



10

【 0 1 3 8 】

(式中、QおよびQ'は互いに独立して、置換または非置換のベンゼン基を表す)に表された反応によって得ることができる。

【 0 1 3 9 】

化合物(I a)または(I b)を得るための前述の反応は、化合物(II)から出発して、好ましくは塩基、例えばジイソプロピルエチルアミン(D I E A)の存在下で、無水溶媒、例えば無水ジクロロメタン中で実施される。

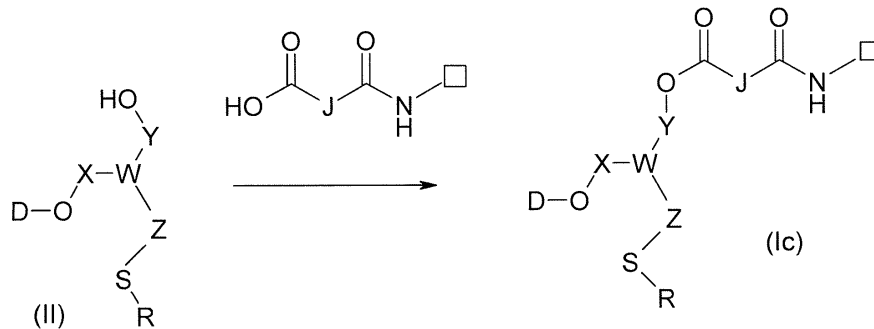
【 0 1 4 0 】

20

式(I c)の化合物もまた、化合物(II)から出発するが、好ましくは下記の式：

【 0 1 4 1 】

【 化 2 4 】



30

【 0 1 4 2 】

に表される反応ステップに従う。

【 0 1 4 3 】

化合物(I c)を得るための前述の反応は、好ましくは無水溶媒、例えばピリジン中で、塩基、例えばトリエチルアミンの存在下で実施される。

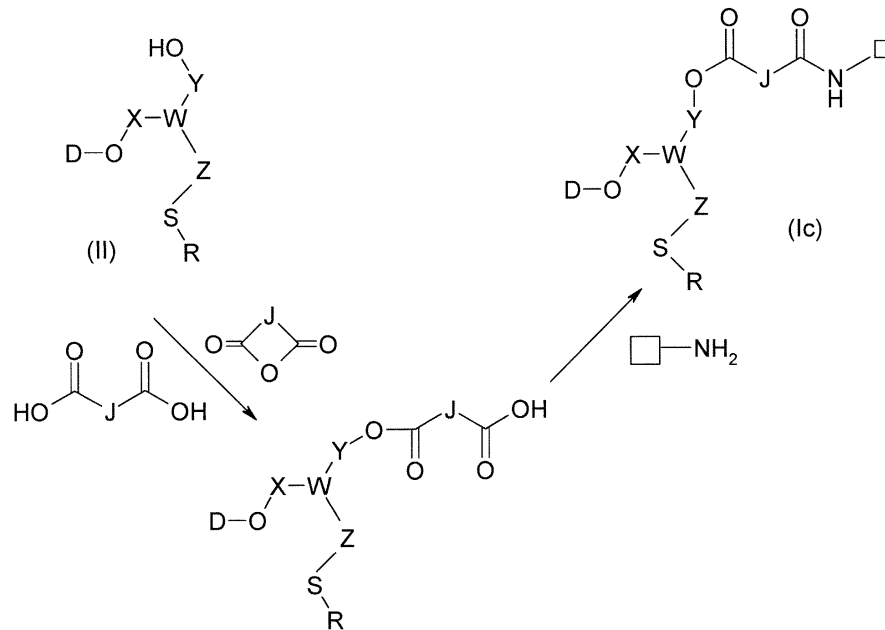
【 0 1 4 4 】

化合物(I c)を、下記の反応式：

40

【 0 1 4 5 】

【化 2 5】



10

【 0 1 4 6】

に従って得ることもまた可能である。

20

【 0 1 4 7】

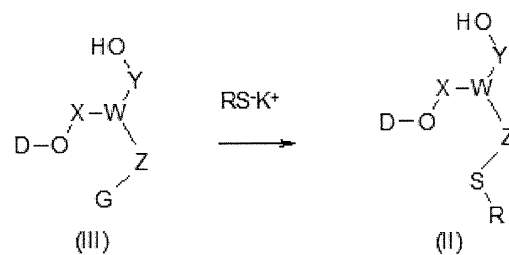
本発明の目的は、上記の式の化合物 (II) (式中、D、X、W、Z、YおよびR基は、化合物 (I) と同じ定義を有する) である。

【 0 1 4 8】

式 (II) の化合物は、化合物 (III) から下記の反応ステップ：

【 0 1 4 9】

【化 2 6】



30

【 0 1 5 0】

(式中、Gはハロゲン、好ましくは臭素またはヨウ素である) に従って得ることができる。

【 0 1 5 1】

上記の反応は、好ましくは、無水溶媒、例えば無水トルエン中で、クラウンエーテルの存在下で実施される。

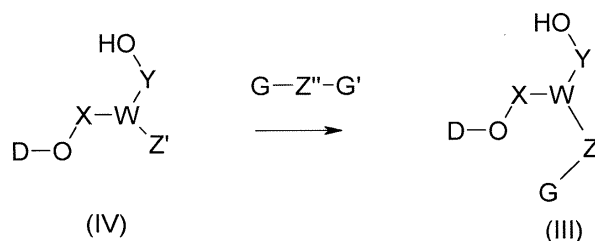
40

【 0 1 5 2】

化合物 (III) は、化合物 (IV) から、下記の反応ステップ：

【 0 1 5 3】

【化 2 7】



【0154】

(式中、

10

GおよびG'はハロゲン原子であり、同一であっても、または異なってもよく、好ましくはGおよびG'は臭素またはヨウ素原子であり、

Z'は、C1-C12アミノアルキル、C1-C12アルコキシ、酸素含有または窒素含有C3-C12シクロヘテロアルキル、C1-C12NCO-アルキル、C1-C12CON-アルキル基であり、

Z''は、C1-C12の直鎖または分枝鎖アルキル、C1-C12アミノアルキル、C1-C12アルコキシ、C3-C12シクロアルキル、酸素含有または窒素含有C3-C12シクロヘテロアルキル、C1-C12NCO-アルキル、C1-C12CON-アルキル基であり、

ジハロゲン化合物G-Z''-G'は、化合物(IV)のZ'基と反応して、化合物(III)のZ-G基の形成をもたらすことが意図される)に従って得ることができる。

20

【0155】

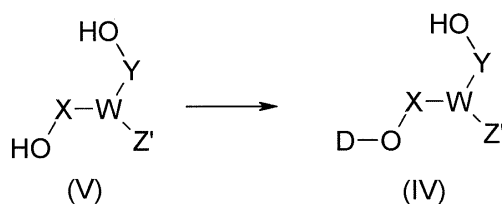
化合物(III)を得るステップは、好ましくはアルカリ金属水素化物、例えばNaHの存在下で実施される。

【0156】

化合物(IV)は、市販の化合物(V)から、下記の反応ステップ：

【0157】

【化 2 8】



30

【0158】

に従ってアルコール官能基の保護によって得ることができる。

【0159】

アルコール官能基の保護のこのステップは、当業者に周知の条件下で、Dの選択に依存して実施される。

40

【0160】

一実施形態に従って、化合物(IV)は、化合物(V)からアルコール官能基を保護するために好ましくは溶媒、例えばピリジン中で、4,4'-ジメトキシトリチル塩化物(DMTT-C1)との反応により、得られる。

【0161】

別の実施形態に従って、化合物(IV)は、化合物(v)から、9-フェニルキサンテン-9-イル塩化物(ピキシル-C1)から出発して、文献Chattopadhyaya and Reese, Chem. Soc. Chem. Comm., 1978年, 639-640頁に記載の条件下で得られる。

【0162】

別の実施形態に従って、化合物(IV)は、化合物(V)から、当業者に周知の条件下

50

でフルオレニルメトキシカルボニル塩化物 (Fmoc-Cl) との反応により得られる。

【0163】

上記の式 (I I) から (V) において、X、Y、W、Z、D、R、R₁、R₂ は、上記の化合物 (I) の定義と同じ定義を有する。

【0164】

好ましくは、出発化合物 (V) は、1, 1, 1 - トリス (ヒドロキシメチル) エタンまたは 2, 2 - ビス (ヒドロキシメチル) プロピオン酸または 1, 3, 5 - トリス (ヒドロキシエトキシ) ベンゼンまたは 1, 3, 5 - トリス (ヒドロキシメチル) シクロヘキサンまたは 2 - アミノ - 1, 3 - プロパンジオールである。

【0165】

[チオール化合物のオリゴマー]

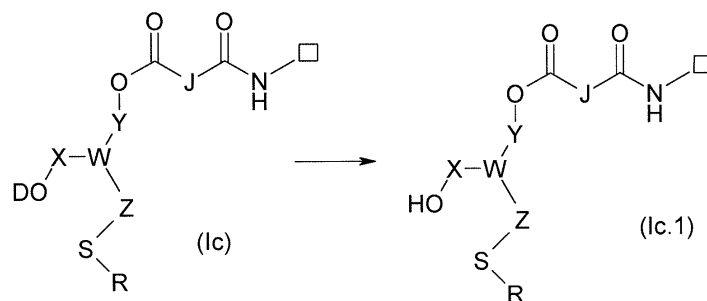
本発明の目的は、上記の式 (I) のチオール化合物から形成されるオリゴマーに関する。これらのオリゴマーの合成方法は、式 (I a) の化合物のオリゴマー化に関しては図 2 A の略図に、式 (I b) の化合物のオリゴマー化に関しては図 2 B に記載する。

【0166】

第 1 のステップにおいて、化合物 (I c) のアルコール官能基を、化合物 (I c . 1) を得るために脱保護させる。この脱保護ステップは、当業者に周知の手段により、好ましくは、DMTr および Pixyl 基に関してはジ - またはトリクロロ酢酸の存在下で、および Fmoc 基に関してはピペリジンの存在下で実施される。

【0167】

【化 29】



【0168】

次いで、化合物 (I c . 1) を化合物 (I a) または (I b) と反応させ、それぞれ、化合物垂リン酸トリエステル (X I V ') 1 または H - ホスホネートジエステル (X V ') 1 を得る。

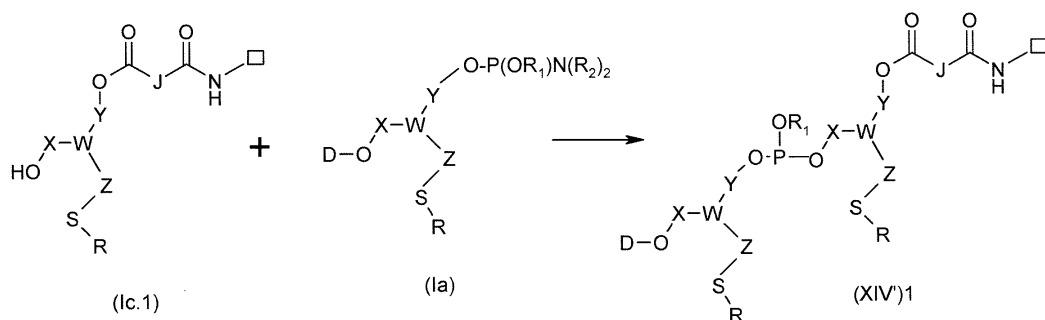
【0169】

10

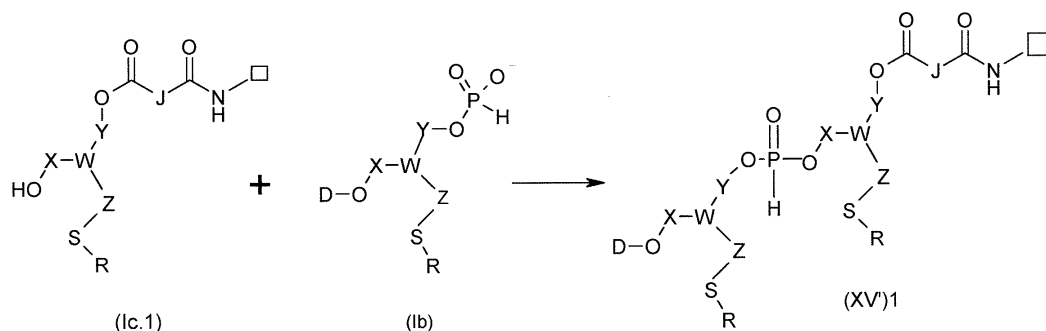
20

30

【化 3 0】



10



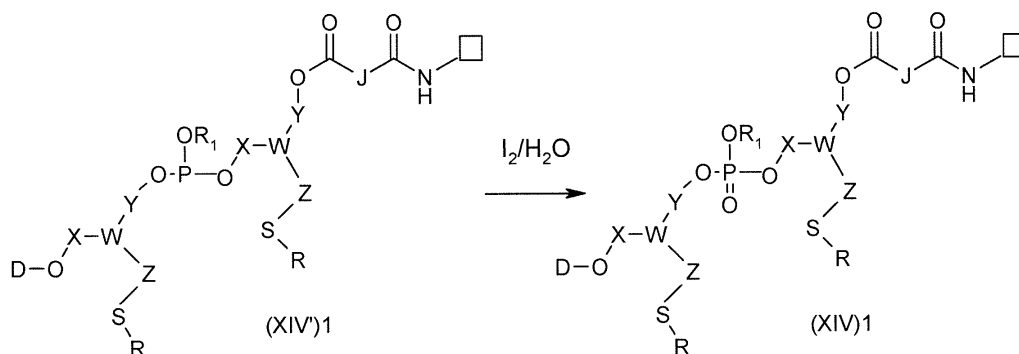
20

【 0 1 7 0】

次いで、化合物 (XIV') 1 を、好ましくは 2 ヨウ素の存在下で酸化させ、この 2 ヨウ素をその後、亜リン酸トリエステル結合の酸素原子を供給する水により置き換え、リン酸トリエステル化合物 (XIV) 1 を得る。この酸化ステップは、化合物 (XIV) i と化合物 (I a) との間の各カップリングステップ後に実施される。

【 0 1 7 1】

【化 3 1】



30

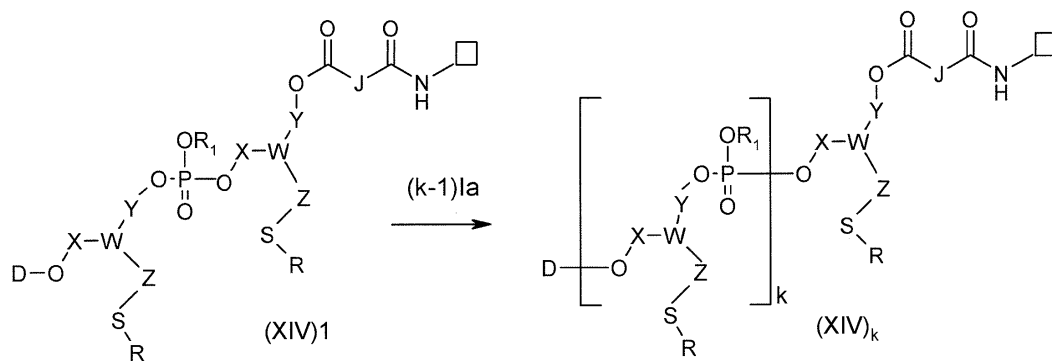
【 0 1 7 2】

次いで、同じ方法において、化合物 (XIV) 1 を (k - 1) の化合物 (I a) と反応させ、(k - 1) の酸化後、化合物 (XIV) _k を得：

40

【 0 1 7 3】

【化 3 2】



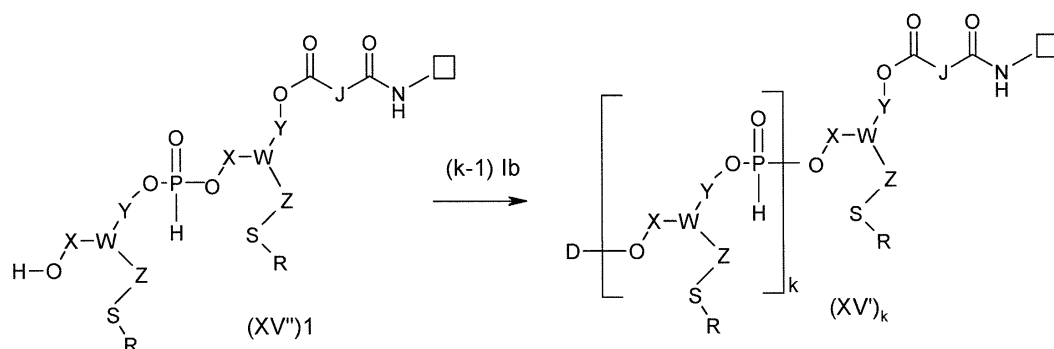
10

【0174】

化合物 (XV')₁ を、そのアルコール官能基において脱保護し、(XV'')₁ を得、これを (k-1) の化合物 (Ib) と反応させ、化合物 (XV')_k を得る：

【0175】

【化 3 3】



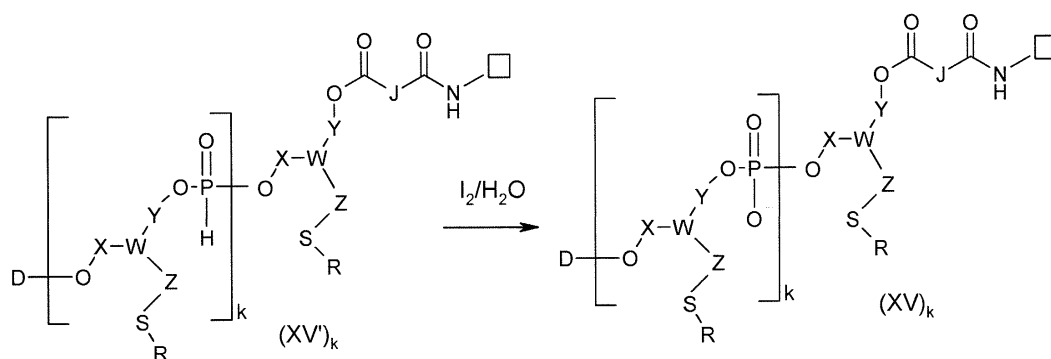
20

【0176】

次いで、化合物 (XV')_k を、好ましくは 2 ヨウ素および水の存在下で酸化させ、リン酸ジエステル化合物 (XV)_k を得る。

【0177】

【化 3 4】



40

【0178】

最終的に、任意選択の最終ステップは、化合物 (XIV)_k または (XV)_k の脱保護から成り、同じ化合物 (I)_k を得る。

【0179】

$$\left[\begin{array}{c} \text{H}-\text{O}-\text{X}-\text{W}-\text{Z} \\ | \quad \diagdown \quad / \\ \text{S} \quad \text{Y} \quad \text{P}(=\text{O})(\text{O}^-) \\ | \quad \diagup \quad \diagdown \\ \text{H} \quad \text{O} \end{array} \right]_k - \text{O}-\text{X}-\text{W}-\text{Z} - \text{Y}-\text{OH}$$

10

20

一実施形態に従って、オリゴマーは、式（I a）の化合物または式（I b）化合物から単独で作製可能である。オリゴマー化は、第1の化合物（I）の脱保護されたアルコール官能基と、第2の化合物（I）のホスホラミダイトまたはH-ホスホネート官能基との間の反応により実施される。

化合物 (I a) および化合物 (I b) の混合物から出発するオリゴマーの作製を想定することも可能であるが、この実施形態はあまり興味深くない。

好ましくは、オリゴマーは、ホスホラミダイトの化学的性質を利用して、すなわち、タイプ（I a）の化合物のオリゴマー化により作製される。

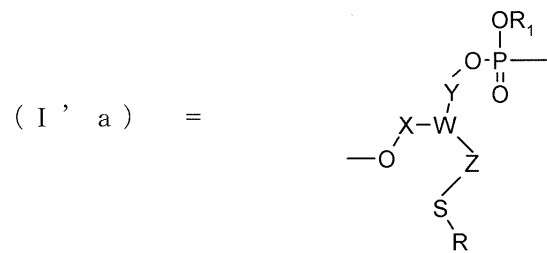
オリゴマー化は、固体支持体上、または溶液中で実施可能である。好ましくは、オリゴマー化は、固体支持体上で実施される。実際に、溶液中のオリゴマー化は、特に、診断応用に必要な少量のために経済的には採算の合わないクロマトグラフィーによる精製ステップを伴う。

上記した本発明の別の目的は、化合物 (I a) のオリゴマーまたは化合物 (I b) のオリゴマーによるグラフト化固体支持体であって、下記の式 (XVI) _k :

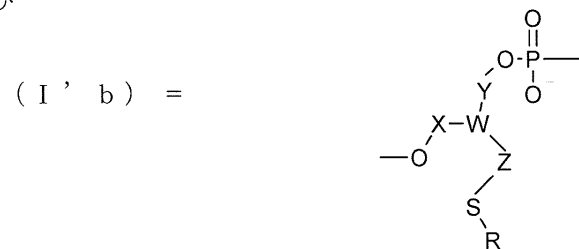
(I ') は、 (I ' a) または (I ' b) :

40

【化 3 6】



および



10

【0187】

を表す)

に対応するものである。

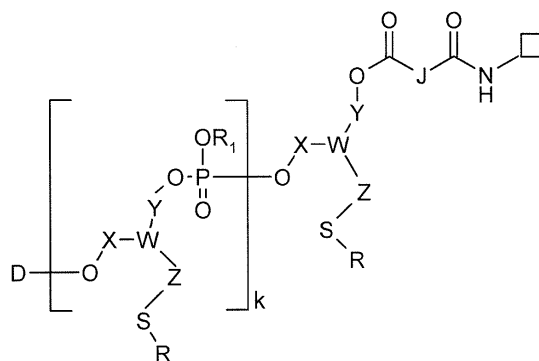
【0188】

化合物 (I c) および式 (I a) の化合物から形成された固体支持体 上のオリゴマーは、下記の式 (X I V) _k :

20

【0189】

【化 3 7】

(X I V) _k

30

【0190】

(式中、 \square 、D、X、Y、W、Z、J、RおよびR₁は、上記と同じ定義を有し、RはさらにHを表してもよく、kは、1から11の間の整数である)

に対応する。

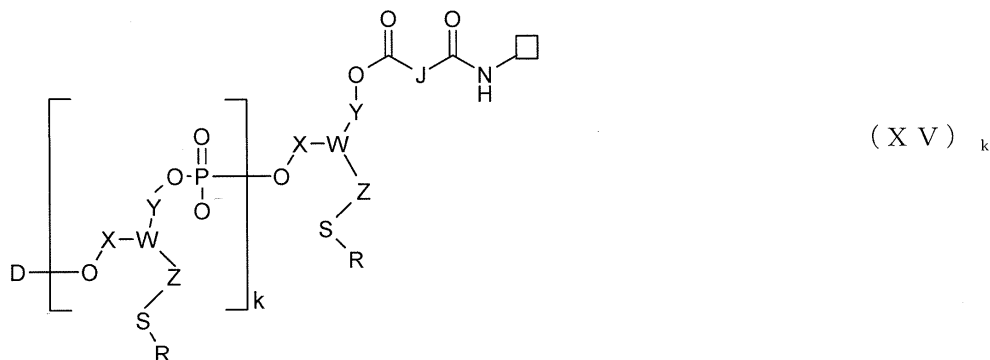
【0191】

化合物 (I c) および式 (I b) の化合物から形成された固体支持体上のオリゴマーは、下記の式 (X V) _k :

40

【0192】

【化 3 8】



10

【0193】

(式中、 D 、 X 、 Y 、 W 、 Z 、 J および R は、上記と同じ定義を有し、 R はさらに H を表してもよく、 k は、1から11の間の整数である)に対応する。

【0194】

オリゴマーが、化合物(Ⅰc)および化合物(Ⅰb)から出発して、固体支持体上に形成される場合、得られた化合物(XV)_kは、化合物(XⅠV)_kと同じ式に対応するが、 H -ホスホネートジエステル結合の酸化後、 R_1 は水素原子である。

【0195】

オリゴマー化反応の終わりに、既存の方法によるチオール官能基の脱保護が想定され、その後 R は H を表す。

20

【0196】

[修飾オリゴヌクレオチド]

本発明の別の主題は、少なくとも1つのヌクレオチド(好ましくは、少なくとも2つのヌクレオチド)および少なくとも1つの前記チオール化合物(Ⅰ)で構成された修飾オリゴヌクレオチドに関する。

【0197】

本出願において、オリゴヌクレオチドという用語は、2から100のヌクレオチドを含む鎖を表す。

30

【0198】

本発明に従ったチオール化合物は、鎖の3'位またはオリゴヌクレオチドの5'位にグラフトされる。

【0199】

前記修飾オリゴヌクレオチドの調製方法は、少なくとも：

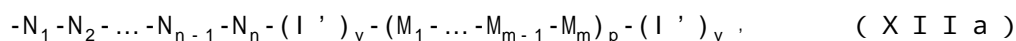
- 化合物(Ⅰ)をオリゴヌクレオチド上にグラフトして、5'-チオールオリゴヌクレオチドを得るステップ、または

- 化合物(Ⅰ)のオリゴマー上にヌクレオチドをグラフトして、3'-チオールオリゴヌクレオチドを得るステップ、を含む。

40

【0200】

本発明の一実施形態に従って、グラフト化オリゴヌクレオチドは、下記の式(XⅠⅠa)：



(式中、

N_1 、 \dots N_n は、互いに独立して、ヌクレオチドを表し、

M_1 、 \dots M_m は、互いに独立して、ヌクレオチドを表し、

(I')は、式(Ⅰ'a)または(Ⅰ'b)の化合物を表し、

n は、1から100の間に含まれる整数であり、

m は、1から100の間に含まれる整数であり、

50

y は、1 から 12 の間に含まれる整数であり、
 p は、0 または 1 を表し、
 y' は、p が値 1 を有する場合、0 から 12 の間に含まれる整数であり、p が値 0 を有する場合、y' は 0 に等しく、
 は固体支持体をあらわす）
 に対応する。

【0201】

修飾オリゴヌクレオチド (XIIa) は、オリゴヌクレオチド N の 5' 位またはヌクレオチド鎖に、1 以上のチオール化合物を有する。前記化合物は、化合物 (I) をグラフトし、その後、オリゴヌクレオチドの 5' 位における (I) から得られたオリゴマーを伸長

10

【0202】

化合物 (XIIa) を得るための略図を、図 3 に記載するが、ここでチオール化合物はタイプ (Ia) であり、p は 0 に等しい。化合物 (XIIa) の調製の最初の 3 ステップにより、オリゴヌクレオチドの合成が可能である。オリゴヌクレオチドは、固体支持体上に、当業者に周知の方法により合成される。第 1 のステップにおいて、第 1 のヌクレオチドを固体支持体にグラフトし、次いで、他のヌクレオチドを、当業者に周知の合成方法によりグラフトさせる。下記の化合物が得られる：

20

【0203】

【化 39】



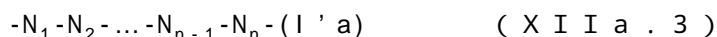
【0204】

その後、別のヌクレオチドを、同じ方法によりグラフトし、式 (XIIa.2) の化合物を得る。

【0205】

次のステップにおいて、本発明に従うタイプ (Ia) のチオール化合物を、オリゴヌクレオチド (XIIa.2) の 5' 位にグラフトし、化合物 (XIIa.3) を得る：

30



【0206】

このステップにおいて、グラフティングは、化合物 (Ia) のホスホラミダイト官能基と、化合物 (XIIa.2) の末端ヌクレオチドの 5' 位のアルコール官能基との反応により、従来通りに実施される。

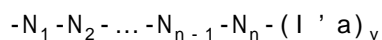
【0207】

図 3 の概略図において、合成例は、タイプ (Ia) のチオール化合物のオリゴマー化により記載しているが、同様の合成方法は、タイプ (Ib) のチオール化合物により修飾されたオリゴヌクレオチドの合成にも使用される。

40

【0208】

その後、前記のオリゴマー化、特に図 2 A および図 2 B に記載のオリゴマー化を、上記の化合物 (XIIa.3) から出発して実施し、1 以上の化合物 (Ia) または (Ib) との反応により、式：

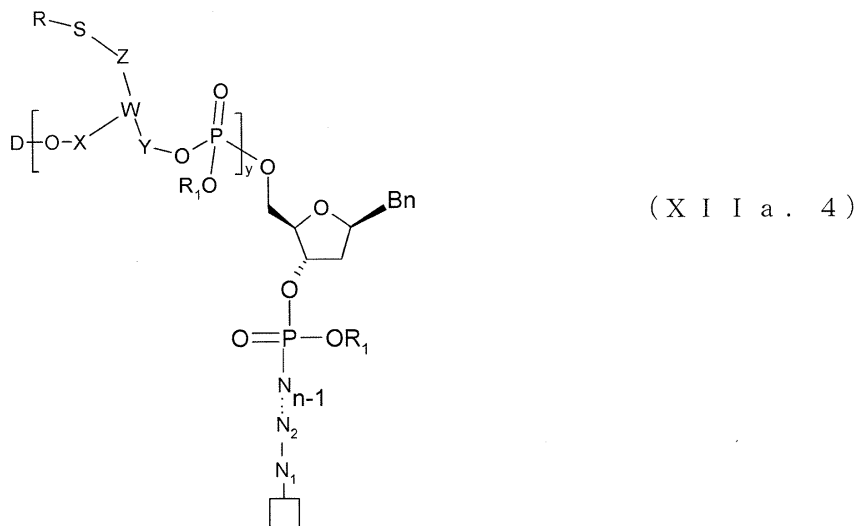


の化合物 (XIIa.4)

または構造式 (p = 0 の場合)：

【0209】

【化 40】



10

【0210】

(式中、

、D、R、X、Y、W、Z、R₁は、化合物(I)と同じ定義を有し、R₁はさらにHを表してもよく、

n、yおよびN₁、N₂、...N_{n-1}は、化合物(XIIa)と同じ定義を有し、

Bnは、ヌクレオチド鎖に従来通り使用される塩基を表す)

20

を得る。

【0211】

オリゴマーの伸長がタイプ(Ib)の化合物により実施される場合、修飾オリゴヌクレオチドは、修飾オリゴヌクレオチド(XIIa.4)と類似の構造を有するが、R₁はHを表す。

【0212】

その後、ヌクレオチド化合物M₁、M₂、...M_mを続けてグラフティングすることが可能であり、p=1の生成物(XIIa)が得られる。これらの場合も、固体支持体上においてさらに伸長が起こる。

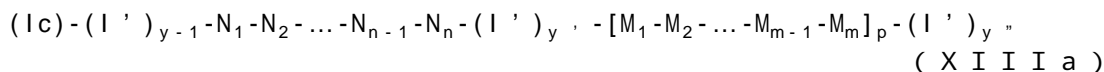
30

【0213】

このグラフトステップは、当業者に周知の方法により、従来通り実施される。

【0214】

本発明の別の実施形態に従って、グラフト化オリゴヌクレオチドは、下記の式(XII Ia)：



(式中、

N₁、...N_nは互いに独立して、ヌクレオチドを表し、

M₁、...M_mは互いに独立して、ヌクレオチドを表し、

(I')は、式(I'a)または(I'b)の化合物を表し、

nは、1から100の間に含まれる整数であり、

mは、1から100の間に含まれる整数であり、

yは、1から12の間に含まれる整数であり、

y'は、0から12の間に含まれる整数であり、

pは、y'が0でなければ値0または1を有し、y'が値0を有する場合、その時pは値0を有し、

y''は、pが値1を有する場合0から12の間に含まれる整数であり、pが値0を有する場合、その時y''は値0を有する)

に対応する。

40

50

【 0 2 1 5 】

J がエチル基であるタイプ (I c) の化合物およびタイプ (I b) の化合物から形成されるオリゴマーを使用する、化合物 (X I I I c) の合成方法を表す略図を図 4 に記載する。

【 0 2 1 6 】

式 (X I I I c) の化合物の合成は、式 (I) の本発明に従ったチオール化合物のオリゴマー化からなる第 1 のステップを含み、そのための方法は上に記載しており、式 (X I I I a . 1) :



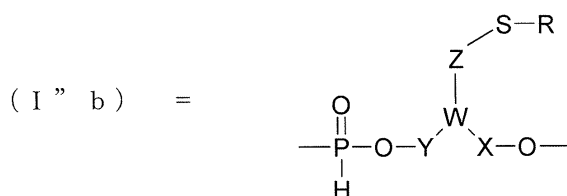
(式中、

(I c) は、前述と同じ定義を有し、

(I ') は、タイプ (I ' a) または (I " b) の基を表し、

【 0 2 1 7 】

【 化 4 1 】



【 0 2 1 8 】

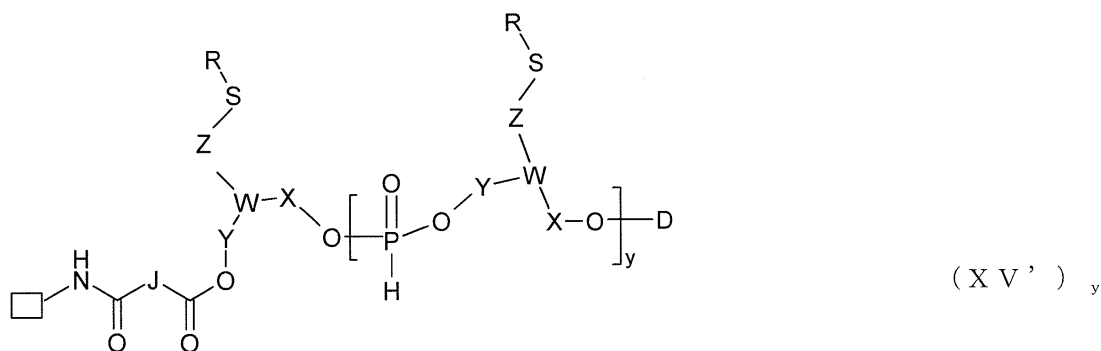
である)

または

(I ') が (I " b) を表す場合の構造式として、

【 0 2 1 9 】

【 化 4 2 】



【 0 2 2 0 】

の化合物をもたらす。

【 0 2 2 1 】

第 2 のステップにおいて、第 1 のヌクレオチド N_1 を式 (X I I I a . 1) のオリゴマーにグラフトし、下記の式 (X I I I a . 2) :



の化合物を得る。

【 0 2 2 2 】

このグラフトステップは、化合物 (X I I I a . 1) のオリゴマー鎖の末端の脱保護されたアルコール官能基と、第 1 のヌクレオチド N_1 のホスホラミダイトまたは H - ホスホネート官能基との間の反応により実施される。

【 0 2 2 3 】

修飾オリゴヌクレオチドは、次いで、当業者に公知の任意の方法、特に、チオール化合物のオリゴマー上に存在する第 1 のヌクレオチドの 5 ' のアルコール官能基と、第 2 のヌ

10

20

30

40

50

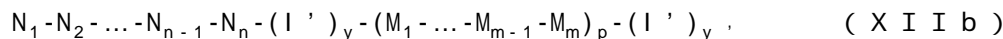
クレオチドの 3' 位のホスホラミダイトまたは H - ホスホネート官能基との間の反応による、当業者に周知の従来どおりの方法により合成される。合成を、当業者に周知のヌクレオチド鎖の伸長の同様の連続ステップにより継続し、式 (X I I I a) の化合物を得る。

【0224】

本発明の別の主題は、修飾オリゴヌクレオチドを固体支持体に結び付ける結合の切断後の、上記の式 (X I I a) および (X I I I a) の化合物から得られる化合物に関する。結合の切断は、エステル官能基のレベルにおいて起こる。

【0225】

したがって、本発明の一実施形態に従って、支持されていないオリゴヌクレオチドは、下記の構造 (X I I b) :



(式中、

N_1, \dots, N_n は互いに独立して、ヌクレオチドを表し、

M_1, \dots, M_m は互いに独立して、ヌクレオチドを表し、

(I') は、式 ($I' a$) または ($I' b$) の化合物を表し、

n は、1 から 100 の間に含まれる整数であり、

m は、1 から 100 の間に含まれる数であり、

y は、1 から 12 の間に含まれる整数であり、

p は、0 または 1 を表し、

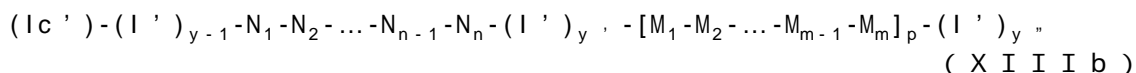
y' は、 p が値 1 を有する場合、0 から 12 の間に含まれる整数であり、 p が値 0 を有する場合、 y' は 0 に等しい)

【0226】

支持体の離脱は 2 ステップで実施される。まず、シアノエチル基が存在する場合 (ホスホラミダイトの場合) その除去が非求核性強塩基 (ピペリジンまたは DBU) により行われ、第 2 に、当業者に公知の従来の方法、好ましくは化合物 (X I I a) を水酸化アンモニウム (NH_4OH) により処理することによって実施される。シアノエチル基はその除去の間にアクリロニトリルを形成し、アクリロニトリルはチオール官能基と強力に反応するので、チオール基の脱保護の前にシアノエチル基を除去することが必要である。

【0227】

本発明の別の実施形態に従って、支持されていないオリゴヌクレオチドは、下記の構造 (X I I I b) :



(式中、

N_1, \dots, N_n は、互いに独立して、ヌクレオチドを表し、

M_1, \dots, M_m は、互いに独立して、ヌクレオチドを表し、

(Ic') は、(Ic) から、固体支持体とのエステル結合を切断することによって得られる化合物を表し、

(I') は、式 ($I' a$) または ($I' b$) の化合物を表し、

n は、1 から 100 の間に含まれる整数であり、

m は、1 から 100 の間に含まれる数であり、

y は、1 から 12 の間に含まれる整数であり、

y' は、0 から 12 の間に含まれる整数であり、

p は、 y' が 0 でなければ値 0 または 1 を有し、 y' が値 0 を有する場合、その時 p は値 0 を有し、

y'' は、 p が値 1 を有する場合 0 から 12 の間に含まれる整数であり、 p が値 0 を有する場合、その時 y'' は 0 を有する)

【0228】

支持体の離脱は、当業者に公知の従来の方法、好ましくは化合物 (X I I a) を水酸化アンモニウム (NH₄OH) により処理することによって実施される。

【0229】

本発明はさらに、修飾オリゴヌクレオチド (X I I c) および (X I I I c) に関し、それぞれ、化合物 (X I I a) および (X I I I a) から出発して、チオール官能基の脱保護および化合物と支持体とを結ぶ結合の切断により得られる (それぞれ、図3および4)。

【0230】

オリゴヌクレオチドが、1以上のタイプ (I a) のチオール化合物により修飾される場合、当業者に公知の処理による、チオール官能基および化合物 (X I I a) のホスホラミ

10

ダイトの脱保護後、式 (X I I c) :

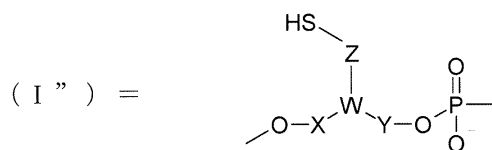
(式中、

N₁、... N_n は、互いに独立して、ヌクレオチドを表し、

M₁、... M_m は、互いに独立して、ヌクレオチドを表し、

【0231】

【化43】



20

【0232】

であり、

n は、1から100の間に含まれる整数であり、

m は、1から100の間に含まれる数であり、

y は、1から12の間に含まれる整数であり、

p は、0または1を表し、

y' は、p が値1を有する場合、0から12の間に含まれる整数であり、p が値0を有する場合、y' は0に等しい)

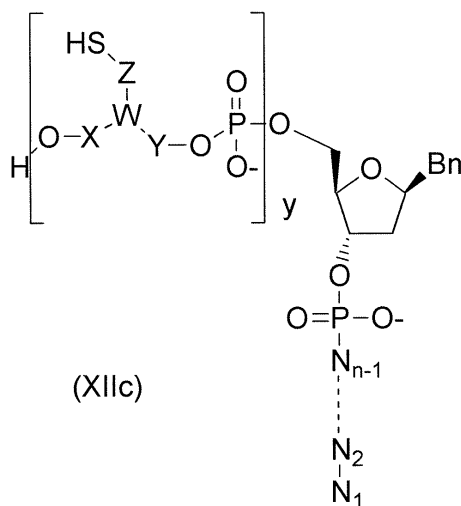
30

の化合物、

または p = 0 の場合、構造式 :

【0233】

【化44】



(XIIc)

(X I I c)

40

【0234】

(式中、

50

X、Y、W、Zは化合物(I)と同じ定義を有し、

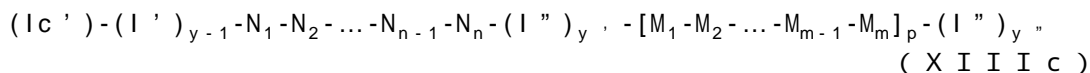
N_1, \dots, N_n 、 n 、 y は、化合物(XIIa)と同じ定義を有し、

B_n は、ヌクレオチド鎖中に従来通り使用される塩基を表す)

の化合物を得る。

【0235】

オリゴヌクレオチドが、タイプ(Ib)の1以上のチオール含有化合物により修飾される場合、当業者に公知の処理による化合物(XIIa)のチオール官能基の脱保護後、式(XIIc)：



10

(式中、

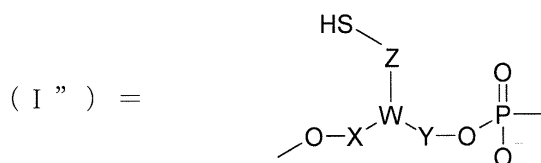
N_1, \dots, N_n は、互いに独立して、ヌクレオチドを表し、

M_1, \dots, M_m は、互いに独立して、ヌクレオチドを表し、

(Ic')は、(Ic)から、固体支持体 とのエステル結合を切断することによって得られる化合物を表し、

【0236】

【化45】



20

【0237】

であり、

n は、1から100の間に含まれる整数であり、

m は、1から100の間に含まれる数であり、

y は、1から12の間に含まれる整数であり、

y' は、0から12の間に含まれる整数であり、

p は、 y' が0でなければ値0または1を有し、 y' が値0を有する場合、その時 p は値0を有し、

30

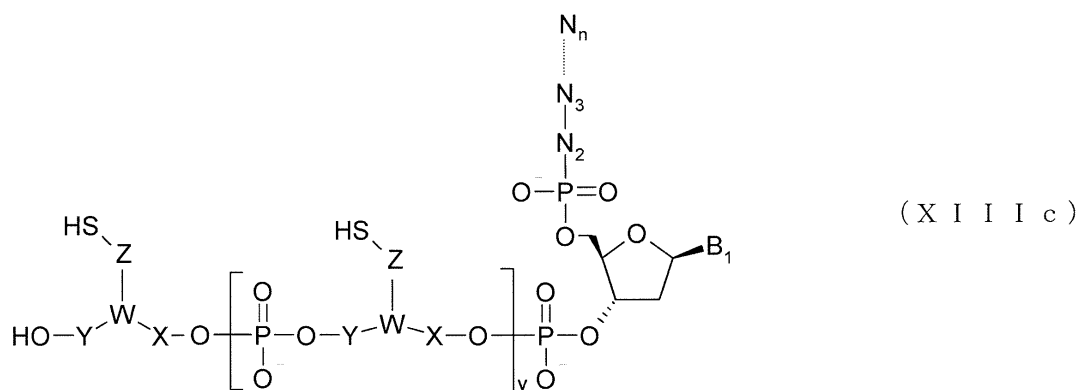
y'' は、 p が値1を有する場合0から12の間に含まれる整数であり、 p が値0を有する場合、その時 y'' は0を有する)

の化合物；

または $y' = p = 0$ の場合、構造式：

【0238】

【化46】



40

【0239】

(式中、

X、Y、W、Zは、化合物(I)と同じ定義を有し、

50

N_2, \dots, N_n 、 n および y は、化合物(X I I a)と同じ定義を有し、
 B_n は、ヌクレオチド鎖中に従来通り使用される塩基に対応する)
 の化合物を得る。

【0240】

オリゴヌクレオチドの合成の間に、チオール官能基は保護されることが好ましい。実際に、チオール官能基は、入ってくるホスホラミダイト官能基と反応可能である。

【0241】

一実施形態に従って、チオール官能基の脱保護および固体支持体の除去のステップは、修飾オリゴヌクレオチド(X I I a)または(X I I I a)の単一ステップ処理で実施される。

10

【0242】

一実施形態に従って、固体支持体の除去は第1のステップにおいて実施され、チオール官能基の脱保護は第2のステップにおいて実施される。

【0243】

最終オリゴヌクレオチド(X I I c)(それぞれ、最終オリゴヌクレオチド(X I I I c))は、出発チオール化合物とは独立して、化合物(I a)から出発しても、または化合物(I b)から出発しても得られる。実際、モノマー(I a)または(I b)のいずれを使用するかに関わりなく、オリゴマー化反応から得られるチオールモノマー単位は、上記の化合物(I'')に対応する。

【0244】

20

本発明に従った式(X V I)_kのグラフト化支持体は、オリゴヌクレオチドの合成開始を可能にする。オリゴヌクレオチドの3'位において、ポリチオール配列として使用されるオリゴマーの配列によりグラフト化された固体支持体の工業的または半工業的調製が、特に想定可能である。

【0245】

[合成キット]

第1のオリゴマー(I c) - (I')_kによりグラフト化されるこのような固体支持体は、修飾オリゴヌクレオチドの合成のためのキットに、有利に使用することができる。このようなキットにおいて、該固体支持体は、マルチウェルプレートのウェルなどのレーシングゾーンを有する担体に関連付けることができ、合成反応は、ヌクレオチドのオリゴマー化反応を実施するための当業者に公知の方法などの方法によって実施される。

30

【0246】

[自動装置]

このようなキットは、オリゴヌクレオチド合成のための自動装置において使用することができる。この場合、このような装置は、少なくとも：

- ・以下をそれぞれ含有する別個の容器、
 - ヌクレオチド
 - カップリング活性化因子および
 - 洗浄剤、

・生成物試料のサンプリングおよび分配のための機械的手段およびこれらの機械的手段実施の制御のためのコンピュータ手段、ならびに

40

・上記の化合物(I)のオリゴマー(X V I)_kによるグラフト化固体支持体を含有する少なくとも1つの容器、および/または化合物(I a)もしくは化合物(I b)を含有する少なくとも1つの容器、を含む。

【0247】

このような自動化は、さまざまな容器に試料を採取するための機械的手段、およびこれらの試料を、固体支持体を含む容器に分配する手段をさらに含む。このような手段は、1セットの流体流動パイプおよびバルブ中に存在してもよく、必要に応じて、マイクロ流体チャンネルに配置されて存在してもよい。または、このような手段は、ピペットサンプ

50

リングを装備した多関節アームに存在してもよい。自動装置は、これらの機械的手段の実施を制御可能なコンピュータ手段（ソフトウェア）や、連続反応(reactions sequencees)の実施が可能なコンピュータ手段（ソフトウェア）をさらに含む。

【0248】

[表面の官能化]

本発明に従った修飾オリゴヌクレオチドは、基材上に付着させることができる。それにより、この基材の表面を官能化することができる。基材は、金属製またはポリマー製であってよい。

【0249】

一実施形態に従って、基材は金属、例えば銅もしくはチタン製であり、部分的もしくはその全表面にわたって金またはプラチナの膜、好ましくは金の膜で被覆される。

【0250】

別の実施形態において、ポリマー基材、例えばポリスチレンは、アルケニルもしくはアルキニルまたはプロモアセトアミドもしくはヨードアセトアミドの官能基によりグラフト化される。

【0251】

一実施形態に従って、ポリマー基材は導電性ポリマーである。

【0252】

一実施形態に従って、アルケニルまたはアルキニル官能基は、アルファ位のカルボニル官能基により活性化され、好ましくは、アルケニルまたはアルキニル官能基は、マレイミド、アクリルアミド、ヨードアセトアミドまたはプロモアセトアミド、2 - プロピンアミドまたはN - アルキル - 2 - プロピンアミド基から選択される。

【0253】

例えば、基材は、金もしくはプラチナの膜により被覆されたレシービングゾーンを含んでいてもよく、またはアルケニルもしくはアルキニル官能基、例えばアクリルアミドまたはマレイミド官能基により被覆された、レシービングゾーンを含んでよく、レシービングゾーンには修飾オリゴヌクレオチドが付着される。

【0254】

化合物 $gpt-SH$ が本発明に従った修飾オリゴヌクレオチド (XIIc) または修飾オリゴヌクレオチド (XIIIc) を表す図13aに例示するように、チオール官能基は、アルファ位のカルボニル官能基により活性化された炭素 - 炭素二重結合または炭素 - 炭素三重結合と反応する。図13aの上から下にかけて、第1の官能化反応はマレイミドによるグラフト化表面に対応し、第2の反応はアクリルアミドによるグラフト化表面に対応し、第3の反応はヨードアセトアミドまたはプロモアセトアミドによるグラフト化表面に対応し、第4の反応は2 - プロピンアミドによるグラフト化表面に対応し、これらは、オリゴヌクレオチド (XIIc) または (XIIIc) が本発明に従った2つのチオール基含有化合物により修飾された場合に実施される。

【0255】

図13bの場合、表面は、活性化されていないアルケニル基 (第1の反応) およびアルキニル基 (第2の反応) によりグラフト化される。修飾オリゴヌクレオチド (XIIc) または (XIIIc) のチオール官能基の反応は、光 ($\lambda = 265\text{ nm}$) による活性化を使用して実施される。第1の官能化反応は、 $gpt-SH$ により模式的に表されるモノチオール修飾オリゴヌクレオチドを使用して実施され、第2の反応は、ジチオール修飾オリゴヌクレオチドを使用して実施される。

【0256】

支持体がアルキニル官能基によりグラフト化される場合、ポリチオール修飾オリゴヌクレオチドによる表面官能化は非常に興味深い (図13aおよび13b)。なぜなら第1ステップにおける第1のチオール官能基と、 $-In$ 官能基との間およびその後の第2ステップにおける第2のチオール官能基と得られた $-En$ 官能基との間の、2つの連続反応により環状構造がもたらされるためである。

10

20

30

40

50

【 0 2 5 7 】

好ましい実施形態に従って、基材は、マレイミドまたはアクリルアミド基によりグラフト化される。

【 0 2 5 8 】

したがって、本発明は、例えば、基材の表面と修飾オリゴヌクレオチドとの間に金 - イオウ結合を作製することによって金表面の官能化を可能にしてもよく、またはチオエーテル結合の作製によって、マレイミドまたはアクリルアミド官能基を有するグラフト化表面の官能化を可能にしてもよい。

【 0 2 5 9 】

修飾オリゴヌクレオチドの基材表面への固定化は、処理される表面を、修飾オリゴヌクレオチド、例えば式 (X I I c) および (X I I I c) により表される修飾オリゴヌクレオチドを含む溶液と接触させることによって実施される。一般的に、洗浄および乾燥の 1 以上のさらなるステップが提供される。概して、修飾オリゴヌクレオチドの溶液は、基材表面が金製である場合、 $0.10 \mu\text{M}$ から $500 \mu\text{M}$ 、好ましくは $0.50 \mu\text{M}$ から $100 \mu\text{M}$ の間が含まれる濃度であり、マレイミドもしくはアクリルアミドの場合、 50 nM から 200 nM の間、好ましくは 75 nM から 150 nM の間が含まれる濃度であり、次いで洗浄を行い、未反応生成物をすべて除去する。

【 0 2 6 0 】

オリゴヌクレオチド上の複数のイオウ原子の存在は、複数の金 - イオウ結合、または複数のチオエーテル結合の作製を可能にし、これにより、オリゴヌクレオチドを表面に安定化させることができる。

【 0 2 6 1 】

一実施形態に従って、基材は非平面、例えば、マイクロ粒子またはナノ粒子の形態である。本発明に従った修飾オリゴヌクレオチドは、これらのマイクロ粒子またはナノ粒子にグラフト可能である。好ましくは、これらの粒子は磁性である。実際、これらの磁性粒子は、検出試験の目的で、磁石を利用して、電極の表面またはマイクロプレートのウェルの底に容易にもたらすことができる。

【 0 2 6 2 】

[マーカーまたはリガンドへの固定]

本発明のオリゴマーは、1 以上の結合点によりマーカーまたはリガンドを分子またはポリマーに結合させるために使用することもできる。このマーカーまたはリガンドは、例えば、酵素性、発色性、蛍光発生性、放射性、または化学発光性のマーカー、金属、金属イオン、ホルモン、タンパク質、ペプチド、糖類、オリゴ糖、核酸分解剤もしくはタンパク質分解剤、ビオチンなどの結合剤、抗原、ハプテン、抗体または受容体であってよい。このマーカーまたはリガンドは、生体膜を通したオリゴヌクレオチドの輸送に影響を与え得る、および/またはオリゴヌクレオチドの溶解度を改良し得る、生体対象のすべての化合物であってよい。

【 0 2 6 3 】

[試験キット]

本発明の別の主題は、試験キットおよび/または診断キットからなり、前記キットは、少なくとも 1 つの支持体を含み、前記支持体は、本発明に従った少なくとも 1 つの修飾オリゴヌクレオチドが配置された少なくとも 1 つレシーピングゾーンを含んでいる。

【 0 2 6 4 】

すなわち、試験キットは、生物学的活性分子のスクリーニングまたは診断もしくはシーケンシング試験のために使用することができる。診断キットが、複数の別個のレシーピングゾーンを含み、その上に、同一もしくは異なるオリゴヌクレオチドによるグラフト化固体支持体が付着されることが想定可能である。例えば、試験および/または診断用支持体を形成するために、同一または異なるオリゴヌクレオチドによるグラフト化固体支持体は、一つの基材中の別個のレシーピングゾーンに配置することができる。前記基材は、金膜により被覆された基材であってもよく、または少なくとも 1 つの炭素 - 炭素二重結合また

10

20

30

40

50

は炭素 - 炭素三重結合を含む官能基またはハロアセトアミド官能基、好ましくはマレイミドもしくはアクリルアミド官能基によるグラフト化基材であってもよい。

【0265】

支持体は、特に金電極であってよい。試験キットは、作用電極、対電極および基準電極を含む、電気化学セルを含むことができる。作用電極は金製、対電極はプラチナ製および基準電極は銀製であってよい。修飾オリゴヌクレオチドと被験分子との間の相互作用の調査は、サイクリックボルタンメトリーのステップを含むことができる。

【0266】

アルケニルまたはアルキニルまたはハロアセトアミド官能基、例えば、マレイミドもしくはアクリルアミド官能基によるグラフティングは、例えば、マイクロプレートフォーマットにおける診断分野への応用のため、および/またはE L O S Aタイプ(Enzyme-Linked Oligo Sorbent Assay)の試験を実施するために使用することができる。このタイプの試験の過程において、ウェルの表面は、アルケニル、アルキニルまたはハロアセトアミド官能基、例えばマレイミドもしくはアクリルアミド官能基によりグラフト化される。その後、この表面を、本発明に従った修飾オリゴヌクレオチドと接触させる。したがって、オリゴヌクレオチド上の本発明に従った1以上のチオール官能基の存在のため、1以上のチオエーテル結合が形成される。次いで、試験は、特に、オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションを測定するために、試験試料と、このように官能化されたウェルとを接触させるステップからなる。測定は、例えば、オリゴヌクレオチド鎖を標識化することによる蛍光に基づくことができる。

【0267】

本発明はさらに、少なくとも2つのチオール官能基を含む化合物の使用に関し、前記チオール官能基は、オリゴヌクレオチドを、官能化された表面、特に、マレイミドまたはアクリルアミドにより官能化された表面にグラフトするための化合物の使用に関する。一実施形態に従って、化合物は、3または4つのチオール官能基を含んでもよい。少なくとも2つのチオール官能基を含む化合物により、マレイミドまたはアクリルアミド表面に固定されたオリゴヌクレオチドは、診断試験(例えばE L O S Aタイプの試験)に使用する場合非常に優れた安定性を示すとともに、標的に関するより優れた利用可能性を示す。化合物中のチオール官能基の数が増加した場合、検出試験の間にグラフト化された全支持体のハイブリダイゼーションの数が増加する。したがって、4つのチオール官能基を有するオリゴマーは、標的のより効率的なハイブリダイゼーションを可能にする。実際に、オリゴヌクレオチドとの反応後、E L O S Aタイプの検出試験において、非常に優れた結果を得ることが可能である。

【実施例】

【0268】

実施例において、「プローブ」は、表面への固定が意図される、少なくとも1つの本発明に従ったチオール化合物を含むオリゴヌクレオチド鎖を意味する。

【0269】

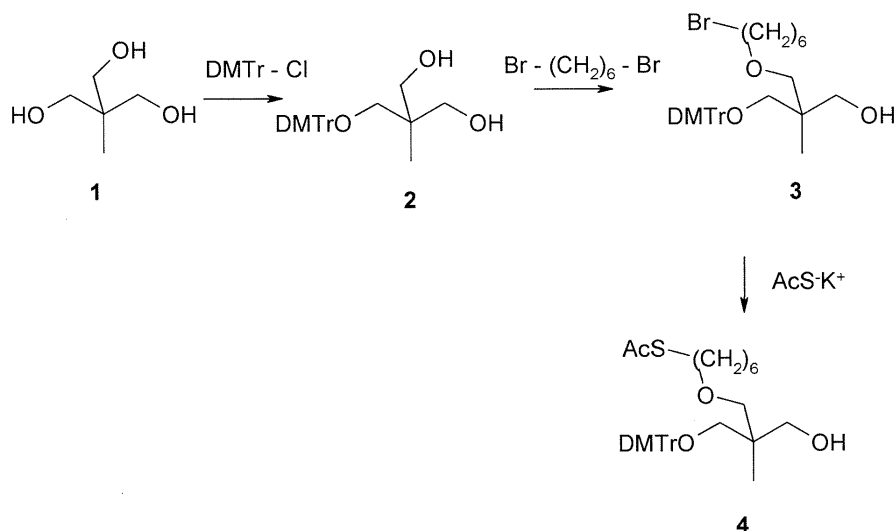
「標的」は、例えば診断試験の間に、プローブとのハイブリダイズが意図されるオリゴヌクレオチド鎖を意味する。

【0270】

[化合物1-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2-(6-S-アセチルチオヘキシルオキシメチル)-2-メチルプロパン-1,3-ジオール4の合成]

【0271】

【化 4 7】



10

【0 2 7 2】

化合物 3 を、Pourceau, G., Meyer, A., Vasseur, J. J., and Morvan, F., Journal of Organic Chemistry 74, 2009, 1218-1222 に記載のプロトコルに従って、化合物 1 から得る。

20

【0 2 7 3】

クラウンエーテル 18 - 6 (70 mg、0.26 mmol) を、無水トルエン (10 mL) 中 1 - O - (4, 4' - ジメトキシトリチル) - 2 - (6 - プロモヘキシルオキシメチル) - 2 - メチル - 1, 3 - プロパンジオール 3 (556 mg、0.95 mmol) およびチオ酢酸カリウム (162 mg、1.42 mmol) の溶液に加える。この混合物を、2 時間、50 °C において磁気攪拌に供する。ジクロロメタン (150 mL) による希釈後、混合物をろ過し、有機相を水 (2 × 50 mL) で洗浄し、次いで、Na₂SO₄ で乾燥する。蒸発後、粗反応生成物をシリカクロマトグラフィー (シクロヘキサン中 0 から 30 % のエチルアセテート) により精製し、所望の生成物を、無色の油状物質の形態で得る (413 mg、75 %)。

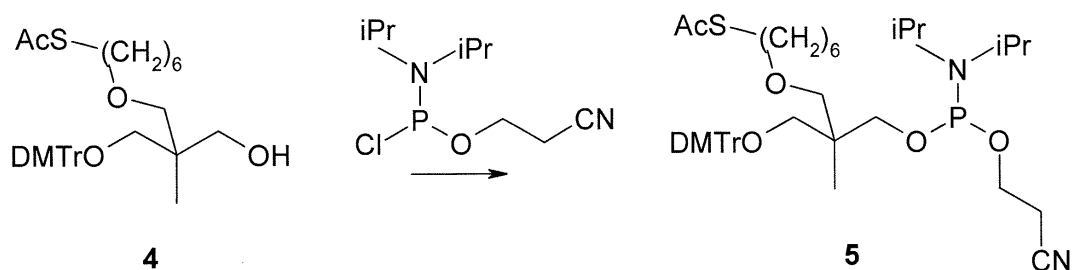
30

【0 2 7 4】

[1 - O - (4, 4' - ジメトキシトリチル) - 2 - (6 - S - アセチルチオヘキシルオキシメチル) - 2 - メチル - 3 - O - (2 - シアノエチル - N, N' - ジイソプロピルホスホラミダイト) - プロパン - 1, 3 - ジオール 5 の合成]

【0 2 7 5】

【化 4 8】



40

【0 2 7 6】

2 - シアノエチル - N, N' - ジイソプロピルクロロホスホラミダイト (190 μL、0.85 mmol) を、無水ジクロロメタン (10 mL) 中 1 - O - (4, 4' - ジメトキシトリチル) - 2 - (6 - S - アセチルチオヘキシルオキシメチル) - 2 - メチルプロパン - 1, 3 - ジオール 4 (413 mg、0.71 mmol) およびジイソプロピルエチルアミン (186 μL、1.06 mmol) の溶液に加える。混合物を、1 時間、周囲温

50

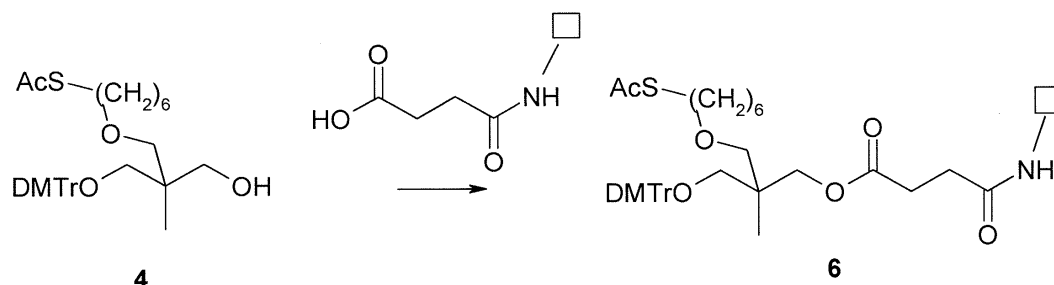
度において磁気攪拌に供する。過剰な試薬を、500 μ Lの水を加えることによって中和し、次いで混合物を、ジクロロメタン(150 mL)で希釈する。有機相を飽和NaHCO₃水溶液(100 mL)で洗浄し、次いでNa₂SO₄で乾燥する。蒸発後、粗反応生成物を、シリカクロマトグラフィー(4%のトリエチルアミン含有シクロヘキサン中0から30%の酢酸エチル)により精製し、所望の化合物5を、無色の油状物の形態で得る(400 mg、72%)。

【0277】

[チオール固体支持体6の合成]

【0278】

【化49】



【0279】

すりガラス管において、1-O-(4,4-ジメトキシトリチル)-2-(6-S-アセチルチオヘキシルオキシメチル)-2-メチル-1,3-プロパンジオール4(178 mg、0.3 mmol)およびジメチルアミノピリジン(DMAP 36 mg、0.3 mmol)を3 mLの無水ピリジンと一緒に同時蒸発させる。次いで、スクシニル-長鎖アルキルアミン-CPG(Controlled Pore Glass)(1 g)、無水ピリジン(5 mL)、無水トリエチルアミン(160 mL、1.2 mmol)およびエチルジメチルアミノプロピルカルボジイミド(EDC、280 mg、2.0 mmol)を加える。次いで、1 mLの無水ピリジンによりすすぐ。混合物を一晩攪拌する。

【0280】

混合物をろ過し、CH₂Cl₂(10 mL)で洗浄し、その後デシケーター中で乾燥させる。支持体上のチオール化合物を、THF中無水酢酸、N-メチルイミダゾール、2,6-ルチジンの溶液により、3時間、攪拌しながら処理する。混合物をろ過し、CH₂Cl₂(10 mL)で洗浄し、その後デシケーター中で乾燥させ、29 μ mol/gで官能化されたチオール固体支持体6(940 mg)を得る。

【0281】

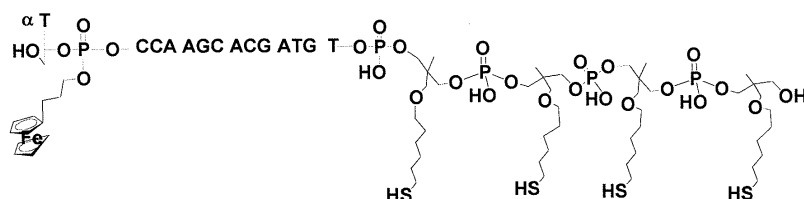
[修飾オリゴヌクレオチドの調製]

フェロセン基を5'位に含み、本発明に従ったタイプ(Ia)の漸増数のチオール化合物(1、2および4チオールの化合物)を含む3種のオリゴヌクレオチドを、DNA合成装置で合成した。金表面へのオリゴヌクレオチドの固定化をサイクリックボルタンメトリーにより可視化するために、フェロセン基を使用した。1、2または4つのチオール基を、プロパンジオールタイプの固体支持体に導入し、配列番号3のDNA配列をグラフトした。最終的に、フェロセン基を保有するアルファ-チミジンホスホラミダイトを、修飾オリゴヌクレオチドの5'位に導入した。その後の脱保護は、2ステップで実施する。第1に、ベータ-除去によりシアノエチル基を除去するために、媒体を、アセトニトリル中10%のピペリジンにより10分間処理し、得られたアクリロニトリルを、アセトニトリルによる洗浄によって媒体から除去する。次いで、濃水酸化アンモニウムによる処理で、核酸塩基上およびチオール官能基上のアシル保護基の除去を可能にし、スクシニル連結(固体支持体)の加水分解を可能にする。このプロトコルは、脱保護されたチオール官能基とアクリロニトリルとの間のMichael付加の回避を可能にする。蒸発後、支持されていない修飾オリゴヌクレオチドを、C18カラムによる逆相HPLCクロマトグラフィーにより精製する。

【 0 2 8 2 】

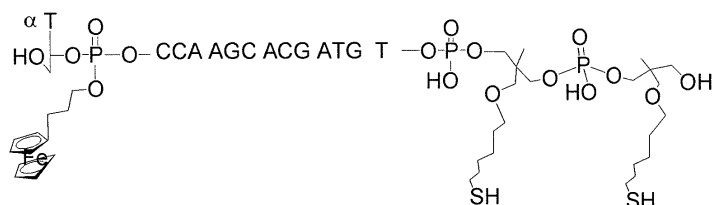
【 化 5 0 】

テトラチオール（４つのチオール化合物により修飾されたオリゴヌクレオチド）



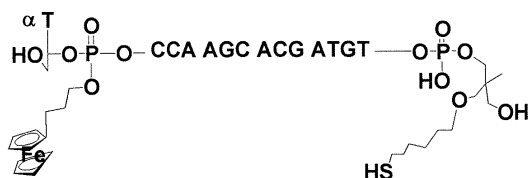
10

ジチオール（２つのチオール化合物により修飾されたオリゴヌクレオチド）



モノチオール（１つのチオール化合物により修飾されたオリゴヌクレオチド）

20



【 0 2 8 3 】

[修飾オリゴヌクレオチド（テトラチオール、ジチオールおよびモノチオール）のグラフティングおよび安定性調査]

この研究のために、VMP3 Biologicマルチチャンネル・ポテンシostat (Biologic Science Instruments、Pont de Claix) を使用した。結果を、EC-Labソフトウェア、Biologic Science Instruments社製を使用して記録した。

30

【 0 2 8 4 】

電気化学セルは、表面積 0.28 cm^2 の金電極、プラチナの対電極および Ag / AgCl 基準電極からなる。

【 0 2 8 5 】

ステップ 1 : チオール基の還元

4 nmol の ODN - チオール（１以上のチオール化合物により修飾されたオリゴヌクレオチド）を、トリス（２ - カルボキシエチル）ホスフィン塩酸塩（TCEP - HCl、Sigma - Aldrich）（160 mM）、すなわち、溶液中、濃度 20 mM の TCEP - HCl で、20 において 2 時間アルゴン下で還元する。

40

【 0 2 8 6 】

ODN を、TCEP - HCl の 20 mM 溶液による 2 回連続の希釈 / 遠心分離により精製し、アミコン YM3000 フィルター（Millipore）において 15 分間 14000 rcf（rcf = 相対遠心力（Relative Centrifugal Force））でガス抜きする。450 μL のガス抜きした 100 mM のリン酸バッファーで希釈後、媒体を、アミコン YM3000 フィルターにおいて 30 分、14000 rcf で、再度遠心分離する。

【 0 2 8 7 】

50

4 nmol の ODN、90 mM のリン酸ナトリウム、2 mM の TCEP-HCl を含有するグラフティング溶液を得る。

【0288】

ステップ2：金電極の活性化

金の作用電極を、アセトン中で10分間、超音波による1回目の洗浄により、浄化する。一度乾燥させ、すべての有機残留物を表面から除去するために、表面を「ピラニア」溶液（0.7 mL の H_2SO_4 、0.3 mL の H_2O_2 ）に1分間浸漬する。

【0289】

電極の最終基本活性化は、0.5 M のソーダ中で負電位（-1.4 V 対 Ag / AgCl）において数サイクル、水の加水分解により電極において水素を発生させることによる金の表面浄化からなる。

10

【0290】

ステップ3：プローブのグラフティング

すすぎ後、チオールオリゴヌクレオチドを含有するグラフティング溶液を、活性化された金電極と、不活性雰囲気下で3日間接触させる。

【0291】

すすぎ後、電気化学セルに分析電解質（10 mM の二塩基性のリン酸ナトリウム、10 mM の一塩基性のリン酸カリウム、250 mM の過塩素酸ナトリウム、pH 6.5）を満たす。

【0292】

20

表面を、1 mM のメルカプトプロパノール溶液により30分間不動態化し、すすぎ後、グラフト層を安定化させるために、セルを分析電解質に2時間入れる。

【0293】

ステップ4：表面にグラフトされた化合物の安定性分析

分析は、50 mV / 秒において -0.1 V から 0.45 V の間で、サイクリックボルタンメトリー（CV）により実施される。グラフト層の安定性の研究は、30分ごとのサイクルで2時間、電気化学シグナルの安定化後、実施される。

【0294】

セルを、60 または 80 で1または5分ガス抜きした蒸留水で満たし、すすぎ後、セルを、1.5 mL の分析電解質のリン酸塩（20 mM）過塩素酸塩（250 mM）で満たす。30分間安定化後、CVを実施する。

30

【0295】

操作を必要な回数繰り返す。

【0296】

結果

チオール化合物（テトラチオール、ジチオールおよびモノチオール）により修飾された3種のオリゴヌクレオチドのグラフト率の比較を実施した。グラフト率は、フェロセンの酸化ピークの積分により決定した。実際、移動した電子電荷は、電極の表面に存在するフェロセンの数に直接関係し、したがって、金にグラフトされたプローブの数に直接関係する。

40

【0297】

下記の得られた結果は、各プローブに関する3種の異なるグラフティングのグラフト率の平均値に対応する。

【0298】

【表 1】

	分子 / c m ²
モノチオール	5. 2 1 E + 1 2
ジチオール	5. 8 1 E + 1 2
テトラチオール	1. 4 0 E + 1 2

結果のヒストグラムを図 5 に示す。

【 0 2 9 9 】

10

モノチオールおよびジチオールに関するグラフト率は極めて同等であり、テトラチオールのグラフティングは、チオール連結の数との調和においておそらく障害の大きさのため、低レベルであることが観察されている。この差にもかかわらず、テトラチオールのグラフト率はそれでもかなりの量であり、非常に再現性がある。

【 0 3 0 0 】

チオール化合物により修飾された 3 種のオリゴヌクレオチドの、温度に対する安定性試験を、ガス抜きした蒸留水中で実施した。電気化学応答の進展を、サイクリックボルタメトリーによりモニターした。フェロセンの酸化強度の百分率低下を、安定化後に得られたシグナルに関して計算する。

【 0 3 0 1 】

20

時間の関数としてのこれらの低下を、図 6 および 7 に提示する。

【 0 3 0 2 】

テトラチオール分子は、60 の水中における連続処理に対し非常に安定である（図 6）。実際に、1 分のこの処置を 5 回後、モノチオール（出発シグナルの 70 %）およびジチオール（出発シグナルの 62 %）とは対照的に、97 % の出発シグナルが残存する。

【 0 3 0 3 】

80 において、シグナルの喪失はより多い（図 7）。1 分間の 5 回連続処理後、83 % の出発シグナルがテトラチオールに関して再度定量可能である。したがって、テトラチオールの安定性は、モノチオール（残留シグナルの 45 %）の安定性およびジチオール（残留シグナルの 18 %）の安定性を超えて十分上である。

30

【 0 3 0 4 】

この研究は、4 チオール化合物（テトラチオール）により修飾されたオリゴヌクレオチドの使用により、金へのチオールのグラフティングの安定性が、モノチオールまたはジチオールのグラフティングと比較して著しく増加することを示す。この最後に述べたジチオールの安定性の欠如は、金へのグラフティングと、分子内ジスルフィド結合の再形成のための閉環との間の競合による可能性があり得る。したがって、グラフティング連結における 4 つのチオールの数を維持し、温度に対する優れた安定性を確実にすることが好ましいと思われる。

【 0 3 0 5 】

[応用：C 型肝炎ウイルスの存在の検出]

40

被験標的試料

1) 天然標的：H C V (+) アンプリコン

サンプリング：国家規模の C 型肝炎ウイルス（H C V）の存在に関する検査で陽性となった血液ドナー由来の血漿試料を、シーケンシングにより解析する。

ウイルス RNA の増幅：401 bp の H C V アンプリコンを、R T - P C R により、上記の血漿試料から、NS5b ウイルス領域に作製する。RNA を、200 μ L のヒト血漿から High Pure Viral Nucleic Acid kit (Roche) を使用して、製造業者の推奨に従って抽出する。RNA を、50 μ L の滅菌水 (D N a s e / R N a s e 非含有) に溶出させる。逆転写 (A T) ステップのために、11 μ L の R N A を 72 で 10 分間変性させ、4 μ L の 5 X F i r s t S t r a n d B u f f

50

er (Invitrogen)、2 μ Lの10X Hexanucleotide Mix (Roche)、2 μ Lの10mMのdNTPミックス (Invitrogen) および200UのSuperScript (登録商標) II Reverse Transcriptase (Invitrogen) の存在下で逆転写する。逆転写条件は下記のとおりである：10分23、45分37、および10分95。

【0306】

5マイクロリットルのcDNAをその後、PCR (ポリメラーゼ連鎖反応) により、プライマー「ビオチン化HCVセンス」(配列番号1 [B t n] T g g g g A T C C C g T A T G A T A C C C g C T g C T T T g A) および「HCVアンチセンス」(配列番号2 g g C g g A A T T C C T g g T C A T A g C C T C C g T g A A) (Catherine Tamalet, Philippe Colson, Herve Tissot-Dupont, Mireille Henry, Christian Tourres, Natacha Tivoli, Danielle Botta, Isabelle Ravaux, Isabelle Poizot-Martin and Nouara Yahia. 2003, Journal of Medical Virology 71: 391-398を参照されたい) を使用して、50 μ Lの反応混合物：MgCl₂ 非含有1X PCR Buffer (Invitrogen)、0.2 μ Mの各プライマー、1.5mMのMgCl₂ (Invitrogen)、0.2mMのdNTPミックス (Invitrogen) および1.3UのTaq Polymerase (Invitrogen) を含む中で増幅させる。PCR条件は下記のとおりである：5分95、40サイクル (変性：40秒95；ハイブリダイゼーション：40秒56；伸長：50秒72) および最終伸長が10分72。

【0307】

得られたHCVアンプリコンを、アガロースゲル電気泳動により解析し、アリコートを採取し、-20において使用まで保存する。

【0308】

2) 合成標的：ビオチン化オリゴヌクレオチド

5'末端においてビオチン化された15-merのオリゴヌクレオチドを合成した。これらのオリゴヌクレオチドは、下記のように選択されたHCVプローブに厳密に相補的である。

【0309】

HCV配列の認識のためのオリゴヌクレオチドプローブの設計

HCVのNS5b領域を、オリゴヌクレオチドプローブの設計のための標的とした。

【0310】

最も保存されたゾーンを同定するために、NS5b領域において増幅されたHCVゲノム配列 (800試料のバンク) を、クラスタルW2アライメントソフトウェアおよびMeg a5系統樹解析ソフトウェアを使用して解析した。ウイルスの遺伝子型1a1bのすべてのゲノムの特異的増幅を可能にする高度に保存された領域、およびウイルスの遺伝子型3aのゲノムの特異的増幅を可能にする第2の領域を選択した。それらの各領域に相補的な、2種の15-merのプローブを設計した。プローブ1a1bおよび3aの設計を、マルチ-チオールオリゴヌクレオチドの合成のためにこのように使用する。

【0311】

[ELISA (enzyme-linked oligosorbent assay) によるプローブ/標的のハイブリダイゼーションの評価]

任意のタイプのチオールプローブ (アルファ-アノマーまたはベータ-アノマーのオリゴヌクレオチド、線形または構造化 (例えばステムループ) のプローブ) のグラフティングは、この最適化されたプロトコルに従って、マレイミド活性化マイクロプレートウェル (Pierce) を、WB1バッファー (0.1MのNa₂HPO₄、0.15MのNaCl、0.05%のTween 20 (w/v)、pH 7.2) により洗浄後、実施することができる。ウェルの官能化を、BBバッファー (0.1MのNa₂HPO₄、0.15MのNaCl、10mMのEDTA、pH 7.2) 中100nMのマルチチオールプローブにより、2時間、周囲温度 (AT) において実施する。次いでウェルをWB1により3

10

20

30

40

50

回洗浄し、BB中 $10\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ のシステイン-HCl溶液(Pierce)で1時間ATにおいて満たし、WB1により再度3回洗浄する。

【0312】

ハイブリダイゼーション試験を、短鎖の15-merの合成標的により、または実際のHCVアンプリコン：上記の鎖長(401ヌクレオチド)により実施する。合成標的およびアンプリコンを、 $150\mu\text{L}$ のハイブリダイゼーションバッファー(HB:0.9MのNaCl、60mMの NaH_2PO_4 、6mMのEDTA、pH7.4、Denhardt 5X)で希釈し、その後ウェルに付着させた。10分、95℃の追加の変性ステップをアンプリコンに実施し、その後マイクロウェルに移す。ハイブリダイゼーションを、一晩、37℃において実施する。ウェルを、WB2バッファー(0.75MのNaCl、50mMの NaH_2PO_4 、5mMのEDTA、pH7.4、SDS 0.1%)により、2分間ATにおいて3回、および30分間50℃において1回洗浄する。

【0313】

検出ステップを、30分間ATにおけるウェルのインキュベーション後に、 $100\mu\text{L}$ のアッセイバッファー(「Assay Buffer」、Perkin Elmer)で希釈された $100\mu\text{L}$ /ウェルのストレプトアビジン-ユーロピウムの存在下で実施する。ウェルを最終的にWB3バッファー(WB1X、Perkin Elmer)により6回洗浄し、 $200\mu\text{L}$ の増幅バッファー(「Enhancement Buffer」、Perkin Elmer)を、各ウェルに5分間ATにおいて加える。時間分解蛍光(time-resolved fluorescence)を、Victor₃(商標)1420マルチ標識検出器(「マルチラベルカウンター(multilabel counter)」、Perkin Elmer)において、製造業者のプロトコル(340nmにおいて励起および615nmにおいて放射)に従って測定する。

【0314】

ELOSA試験を、HCV3a遺伝子型に特異的なアンプリコン(1/10、1/100および1/1000希釈)およびHCV1a1b遺伝子型に特異的なアンプリコン(したがって3a遺伝子型に非特異的)より実施する。ハイブリダイゼーションの対照は、1000pMおよび5pMで試験した、3a遺伝子型に特異的な合成標的(15-mer)(プローブに相補的)、および1000pMで試験した遺伝子型1a1bに特異的な合成標により実施する。

【0315】

蛍光試験に対応する図8のグラフは、ELOSA試験の結果を示すとともに、HCV遺伝子型3aに対応するテトラチオールプローブによるハイブリダイゼーションの定量化の結果を説明する。「対照1a1b」試験はバックグラウンドノイズに対応し、「3a特異的」の結果は、この試験がハイブリダイゼーションを定量化可能なように、バックグラウンドノイズを超えていなければならない。

【0316】

[グラフト密度の効果の研究]

同じELOSA試験を、プローブ溶液(モノチオール、ジチオールおよびテトラチオール)の濃度を、1nMから100nMにさまざまに変化させることによって実施する。ELOSA試験を、短鎖(15-mer)および中程度の鎖(105-mer)の1a1bおよび3a標的により実施する。1a1b遺伝子型に特異的なプローブにより実施された試験は、1a1b特異的標的との非常に優れたハイブリダイゼーション特異性を示し、非相補的3a遺伝子型標的とはハイブリダイゼーションを示さない。

【0317】

プローブ/標的のハイブリダイゼーションの検出を、上記のように、蛍光により実施する(図8)。

【0318】

各タイプのプローブ(モノチオール、ジチオールおよびテトラチオール)の結果を、図9、10および11のグラフに示す。TH対照は、プローブが存在しないウェルにおいて

実施した試験に対応する。他のプローブ（6および8つのチオールを含む）もまた試験し、図14に示す。

【0319】

図9は、モノチオールプローブ、すなわち、本発明に従った単一のチオール化合物を含むプローブに関して得られた結果を示す。モノチオールプローブは、105-merの標的の検出には効率的ではなく、105-merの標的のシグナルは、TH対照のシグナルと同一である。加えて、図9はまた、10nMから100nMの間の、グラフティングに使用したプローブの濃度が、ハイブリダイゼーションの効率には効果がなく、要するに、10nMのプローブにより実施された試験と、100nMのプローブにより実施された試験との間に有意な差がないことを示している。しかし、1nMの濃度のプローブの使用は、ハイブリダイゼーションの効率の低下を引き起こす。

10

【0320】

図10は、ジチオールプローブ、すなわち、本発明に従った2つのチオール化合物を含むプローブに関して得られた結果を示す。ジチオールプローブは、105-merの標的の検出には殆ど効果がなく、ハイブリダイゼーションの検出は、1000pMの1a1b標的濃度に対して見られる。さらに、図10は、グラフティングの密度が、ハイブリダイゼーションの検出にほとんど影響を与えないことを示している。実際に、プローブの濃度が1nMから100nMへ推移した場合、蛍光シグナルは大きくなり、25nMから100nMの間は殆ど差がない。

20

【0321】

図14は、テトラチオールプローブ、すなわち、本発明に従った4つのチオール化合物を含むプローブに関して得られた結果を示す。テトラチオールプローブは、105-merの標的の検出に非常に効率的であり、蛍光シグナルは、特に100pMおよび1000pMの標的濃度に関して、TH対照の蛍光シグナルより高い。さらに、図11は、グラフト密度が、105-merに対するハイブリダイゼーションの検出に影響を与えることを示している。実際に、同じ濃度の標的、例えば1000pMに対して、プローブの濃度が100nMである場合、蛍光シグナルは、1nMのプローブ濃度と比較して高い。「用量依存性」とも称されるこの効果は、105-merの標的の検出に対して非常に明白である。

30

【0322】

図14は、6または8つのチオールを含むプローブが、満足の行くハイブリダイゼーション結果をもたらすことを示している。実際に、それらの2種のプローブに関する蛍光シグナルは、テトラチオールプローブの蛍光シグナルと同様であった。

【0323】

図12は、HCVの遺伝子型1a/1bに関する配列により実施されたハイブリダイゼーション試験の結果を示す。試験は、3種の標的濃度100pM、10pMおよび1pMにおいて、105塩基長の合成標的により実施する。陰性対照は、非相補的な標的3aを用いて実施する。テトラチオールプローブ1a/1bを、電気化学セルの、金表面を有する作用電極にグラフトする。ハイブリダイゼーション反応を、差次的パルスボルタメトリーによりモニターする。y軸に示した値は、電流変化の正規化された値に対応する。電気化学によるこの試験は、1pMの標的濃度において感度が高く、特異的である。シグナルの変動もまた、試験を100pMにおいて実施された試験よりも大きくなると思われる。より高い標的濃度において、電極表面における標的の非特異的吸着の効果は、認識反応の有効性を低下させる。100pMにおいて実施された試験のシグナルの変動は、1pMにおける試験で観察されたシグナルの変動よりも低くなると思われる。この電気化学的方法では、ハイブリダイゼーション反応の定量的モニタリングは不可能である。にもかかわらず、電気化学的方法は、非常に高い感度で特異的応答の有無を供給する。

40

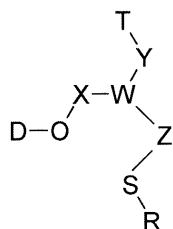
なお、本発明は、実施の態様として以下の内容を含む。

〔態様1〕

下記の式(I)に対応する化合物。

50

【化 5 1】



(I)

(式中、

Tは、 $-O-P(OR_1)N(R_2)_2$ 、 $-O-PH(O)O^-$ 、 $-OC(O)JC(O)NH-$ から選択される基であり、

・ R_1 は、2-シアノエチル、および $R'_1R'_2R'_3SiCH_2CH_2$ 基から選択され、 R'_1 、 R'_2 、 R'_3 は、同一であっても、または異なってもよく、直鎖もしくは分枝鎖の1から12の炭素原子を含むアルキルおよびC6-C12アリールから選択される基を表し、

・ R_2 は、直鎖もしくは分枝鎖の1から12の炭素原子を含むアルキル基、ピロリジンから選択され、

・Jは、単結合、 $-CH_2-$ 、 $-CH_2CH_2-$ 、 $-CH_2OCH_2-$ 、Phがベンジルである $-CH_2OPhOCH_2-$ の基から選択され、

・ は固体支持体を表し、

Dは、アルコールの保護基であり、

Wは、C1-C12アルカントリイル基、C6-C18アリールトリイル基およびC6-C18アラルカン(alkanane)トリイル基から選択され、

Zは、C1-C12アルコキシ基、酸素含有または窒素含有C3-C12シクロヘテロアルキル基、C1-C12 NCO-アルキル基、C1-C12 CON-アルキル基から選択され、

Yは、直鎖または分枝鎖の、C1-C12アルキル基、C1-C12アミノアルキル基、C1-C12アルコキシ基、C3-C12シクロアルキル基、酸素含有または窒素含有C3-C12シクロヘテロアルキル基から選択され、

Xは、直鎖または分枝鎖の、C1-C12アルキル基、C1-C12アミノアルキル基、C1-C12アルコキシ基、C3-C12シクロアルキル基、酸素含有または窒素含有C3-C12シクロヘテロアルキル基から選択され、

Rは、C1-C12アシル、C1-C12 S-アルキル、C6-C12 S-アリール、S-2-ピリジン、酸素含有または窒素含有C1-C12 S-ヘテロアルキル、C3-C12 S-シクロアルキル、酸素含有または窒素含有C3-C12 S-シクロヘテロアルキル基から選択される。))

〔態様2〕

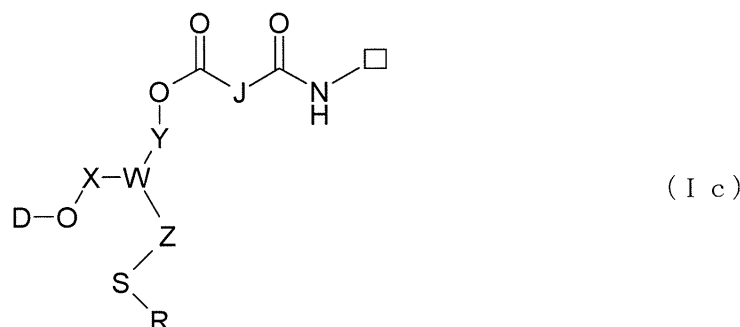
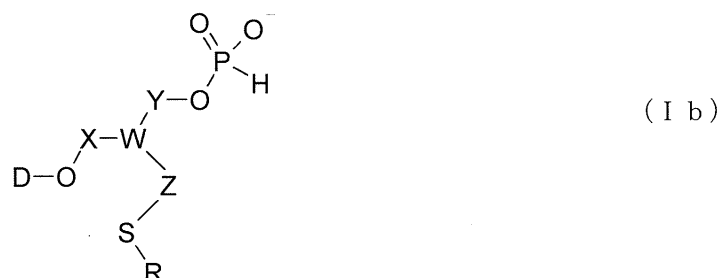
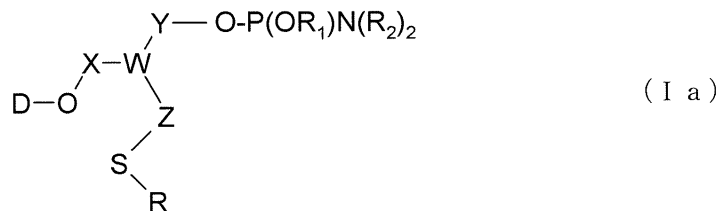
下記の式(Ia)、(Ib)および(Ic)：

10

20

30

【化 5 2】



のいずれか 1 つに対応する、態様 1 に記載の化合物。

〔態様 3〕

・ D が 4 , 4' - ジメトキシトリチル、9 - フェニルキサンテン - 9 - イルまたはフルオレニルメトキシカルボニルから選択され、

・ W が、C 1 - C 6 アルカントリイル基、C 6 - C 12 アリールトリイル基、C 6 - C 12 アラルカン (aralkane) トリイル基から選択され、より詳細には、CH、CCH₃、CCH₂CH₃、シクロヘキサントリイルおよびベンゼントリイル基から選択され、および / または

・ Z が、C 1 - C 6 アルコキシ基、酸素含有または窒素含有 C 3 - C 6 シクロヘテロアルキル基、C 1 - C 6 NCO - アルキル基、C 1 - C 6 CON - アルキル基から選択され、および / または

・ Y が、直鎖または分枝鎖の C 1 - C 6 アルキル基、C 1 - C 6 アミノアルキル基、C 1 - C 6 アルコキシ基、C 3 - C 6 シクロアルキル基、酸素含有または窒素含有 C 3 - C 6 シクロヘテロアルキル基から選択され、および / または

・ X が、直鎖または分枝鎖の C 1 - C 6 アルキル基、C 1 - C 6 アミノアルキル基、C 1 - C 6 アルコキシ基、C 3 - C 6 シクロアルキル基、酸素含有または窒素含有 C 3 - C 6 シクロヘテロアルキル基から選択され、および / または

・ R が、C 1 - C 6 アシル、C 1 - C 6 S - アルキル、C 6 - C 6 S - アリール、酸素含有または窒素含有 C 1 - C 6 S - ヘテロアルキル、C 3 - C 6 S - シクロアルキル、酸素含有または窒素含有 C 3 - C 6 S - シクロヘテロアルキル基から選択され、好ましくは、R は C 1 - C 6 アシル基である、態様 1 または 2 に記載の化合物。

〔態様 4〕

T が基 - O - P (OR₁)N (R₂)₂ である、態様 1 から 3 のいずれか一態様に記載の化合物。

(式中、R₂ はイソプロピル基であり、R₁ は、2 - シアノエチル、2 - (トリメチルシ

10

20

30

40

50

リル)エチル、2-(トリフェニルシリル)エチル、2-(ジフェニルメチルシリル)エチル基から選択される。)

〔態様5〕

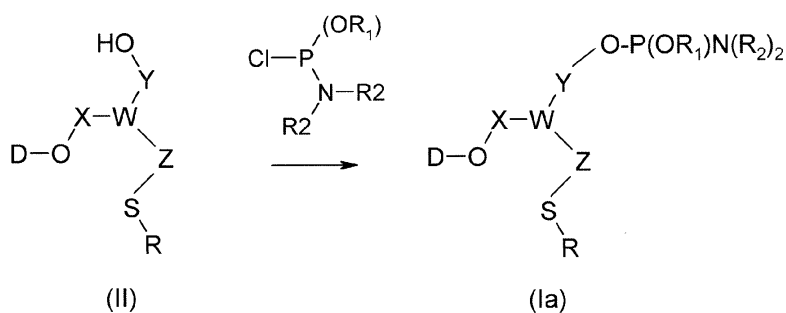
Tが基-OC(O)JC(O)NH- (式中、Jは、樹脂、特にポリスチレン、ポリアクリルアミド、ポリエチレングリコール、セルロース、ポリエチレン、ポリエステル、ラテックス、ポリアミド、ポリジメチルアクリルアミド、合成または天然の親水性ポリマー、ガラスビーズ、シリカゲルから選択される固体支持体である)である、態様1から3のいずれか一態様に記載の化合物。

〔態様6〕

下記のステップ：

- 化合物(II)から出発する、下記の合成経路：

【化53】

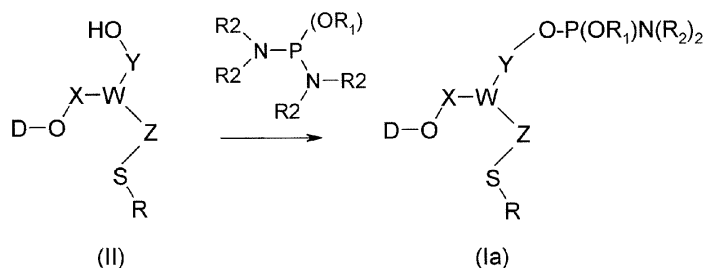


10

20

または下記の合成経路：

【化54】

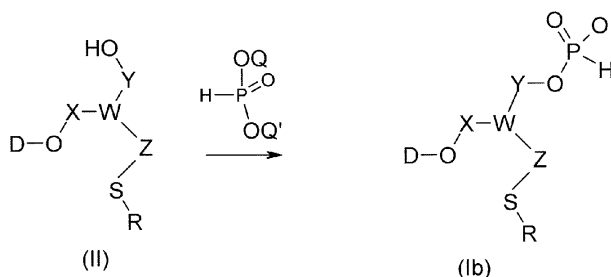


30

に従った化合物(Ia)の調製工程、

- 化合物(II)から出発する、下記の合成経路：

【化55】



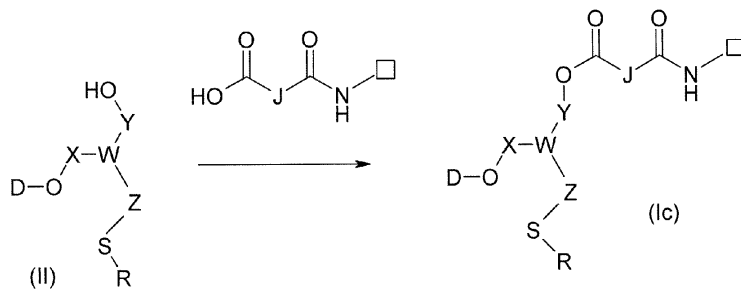
40

(式中、QおよびQ'は、それぞれ独立して、置換または非置換のベンゼン基を表す)

に従った、化合物(Ib)の調製工程、

- 化合物(II)から出発する、下記の合成経路：

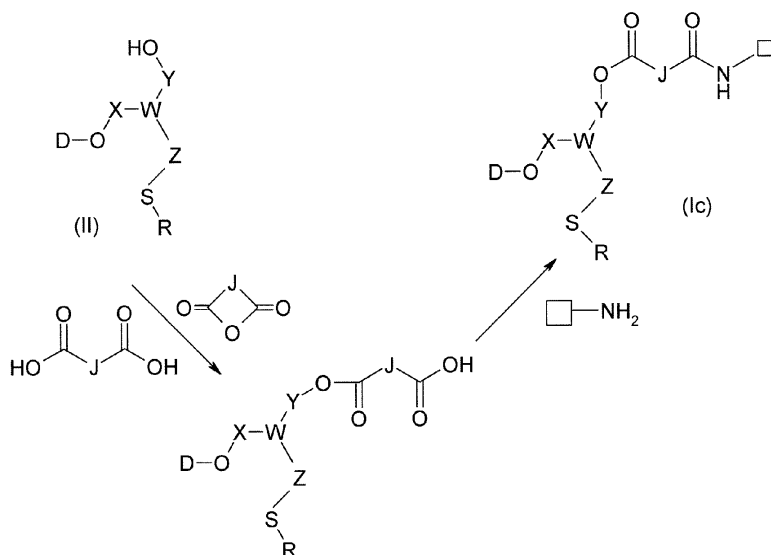
【化 5 6】



10

または下記の合成経路：

【化 5 7】



20

に従った化合物 (I c) の調製工程、

(D、X、Y、Z、W、R、 \square 、R 1 および R 2 は、態様 1 から 5 のこれらの各ステップにおける同じ定義を有する)

30

から選択される少なくとも 1 つのステップを含む、態様 1 から 5 のいずれか一態様に記載の式 (I) の化合物の製造方法。

〔態様 7〕

式：



〔式中、

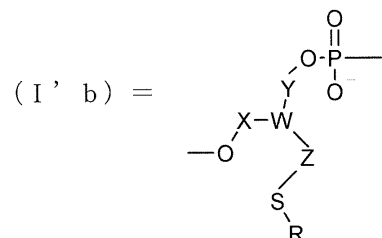
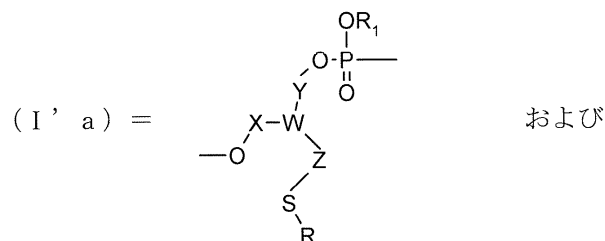
(I c) は、態様 2 から 5 と同じ意味を有し、化合物 (I c) の R 基はさらに H を表してもよく、

k は、1 から 12 の間の整数を表し、

40

(\square) は、(I ' a) または (I ' b) :

【化 5 8】



10

(式中、X、Y、W、Z、RおよびR₁は、態様1から5と同じ定義を有し、RはさらにHを表し得る)を表す]

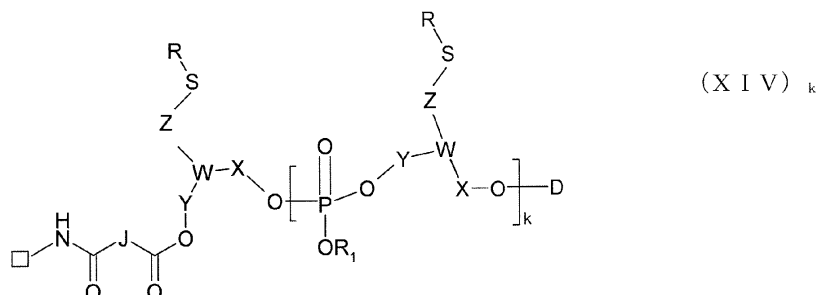
を有する、態様1から5のいずれか一態様に記載の化合物(I)のオリゴマー化により得ることができるオリゴマー。

20

【態様8】

式(XIV)_k：

【化 5 9】



30

(式中、

、D、X、Y、W、Z、RおよびR₁は、態様1から4と同じ定義を有し、RはさらにHを表すことができ、DはさらにHを表すことができ、kは、1から11の間に含まれる整数である)

を有する、態様7に記載のオリゴマー。

【態様9】

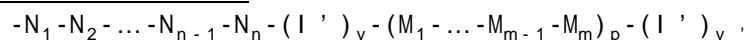
- 態様1から5のいずれか一態様に記載の化合物(I)をオリゴヌクレオチド上にグラフトするステップ、または

40

- ヌクレオチドを、態様7または態様8に記載のオリゴマーにグラフトするステップ、を少なくとも含む、修飾オリゴヌクレオチドを製造する方法。

【態様10】

下記の式(XIIa)：



(式中、

N₁、... N_nは、互いに独立して、ヌクレオチドを表し、

M₁、... M_mは、互いに独立して、ヌクレオチドを表し、

(I')は、上記の式(I'a)または(I'b)の化合物を表し、

nは、1から100の間に含まれる整数であり、

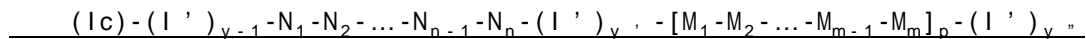
50

m は、1 から 1 0 0 の間に含まれる整数であり、
y は、1 から 1 2 の間に含まれる整数であり、
p は、0 または 1 を表し、
y' は、p が値 1 を有する場合、0 から 1 2 の間に含まれる整数であり、p が値 0 を有する場合、y' は 0 に等しく、
は固体支持体を表す)

を有する、態様 9 に記載の方法により得ることができる修飾オリゴヌクレオチド。

〔態様 1 1〕

下記の式 (X I I I a) :



10

(式中、

N₁、... N_n は、互いに独立して、ヌクレオチドを表し、

M₁、... M_m は、互いに独立して、ヌクレオチドを表し、

(I') は、上記の式 (I' a) または (I' b) の化合物を表し、

n は、1 から 1 0 0 の間に含まれる整数であり、

m は、1 から 1 0 0 の間に含まれる整数であり、

y は、1 から 1 2 の間に含まれる整数であり、

y' は、0 から 1 2 の間に含まれる整数であり、

p は、y' が 0 でなければ値 0 または 1 を有し、y' が値 0 を有する場合、その時 p は値 0 を有し、

20

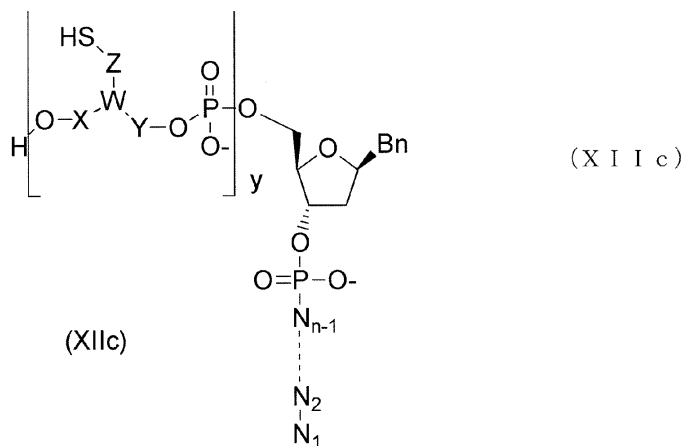
y'' は、p が値 1 を有する場合、0 から 1 2 の間に含まれる整数であり、p が値 0 を有する場合、その時 y'' は 0 を有する)

を有する、態様 9 に記載の方法により得ることができる修飾オリゴヌクレオチド。

〔態様 1 2〕

式 (X I I c) :

【化 6 0】



30

(式中、

n、y、N₁、... N_{n-1} は上記と同じ定義を有し

40

X、Y、Z、W は上記と同じ定義を有し、

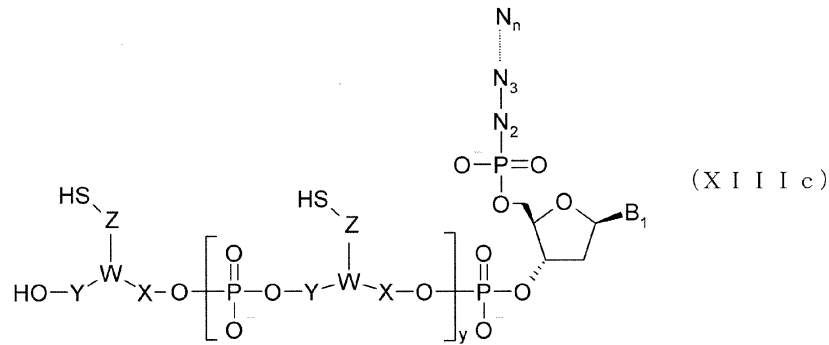
Bn は、n 番目のヌクレオチドの塩基を表す)

を有する、態様 1 0 に記載の修飾オリゴヌクレオチド。

〔態様 1 3〕

式 (X I I I c) :

【化 6 1】



10

(式中、

n、y、Nは上記と同じ定義を有し、X、Y、Z、Wは上記と同じ定義を有し、B 1 は、1 番目のヌクレオチドの塩基に対応する)
を有する、態様 1 1 に記載の修飾オリゴヌクレオチド。

〔態様 1 4〕

以下を含有する別個の容器、- ヌクレオチド- カップリング活性化因子、および- 洗浄剤、生成物試料のサンプリングおよび分配のための機械的手段ならびにこれらの機械的手段
実施の制御のためのコンピュータ手段、ならびに態様 7 または 8 に記載のオリゴマーによるグラフト化固体支持体、および / または態様
2 に記載の化合物 (I a) もしくは化合物 (I b) を含有する少なくとも 1 つの容器が配
置された、少なくとも 1 つの容器、
を少なくとも含む、ヌクレオチドの合成のための自動装置。

〔態様 1 5〕

態様 1 0 から 1 3 のいずれか一態様に記載の少なくとも 1 つの修飾オリゴヌクレオチド
によりグラフト化された基材であって、前記基材は、金またはプラチナの膜により被覆された、または少なくとも 1 つ炭素 - 炭
素二重結合もしくは炭素 - 炭素三重結合を含む基またはハロアセトアミド基、好ましくは
、マレイミドもしくはアクリルアミド基を含む基によりグラフト化された、少なくとも 1
つのレシーピングゾーンを含み、金の膜の場合、前記基材は金属製であり、少なくとも 1 つの炭素 - 炭素二重結合もしくは炭素 - 炭素三重結合を含む基またはハロ
アセトアミド基、好ましくは、マレイミドもしくはアクリルアミド基によりグラフト化さ
れた場合、前記基材はプラスチック製である、グラフト化基材。

〔態様 1 6〕

金属製基材が銅製もしくはチタン製である、および / またはプラスチック製基材がポリ
スチレン製である、態様 1 5 に記載の基材。

〔態様 1 7〕

試験キットであって、前記試験キットは、- 少なくとも 1 つの基材であって、前記基材は、金またはプラチナの金属の膜により被
覆された少なくとも 1 つのレシーピングゾーンを含む基材か、または少なくとも 1 つの炭
素 - 炭素二重結合もしくは炭素 - 炭素三重結合を含む基またはハロアセトアミド基、好ま
しくは、マレイミドもしくはアクリルアミド基によりグラフト化された基材と、- 態様 1 0 から 1 3 のいずれか一態様に記載の少なくとも 1 つの修飾オリゴヌクレオチ
ドと、

20

30

40

50

を含む試験キット。

〔態様 18〕

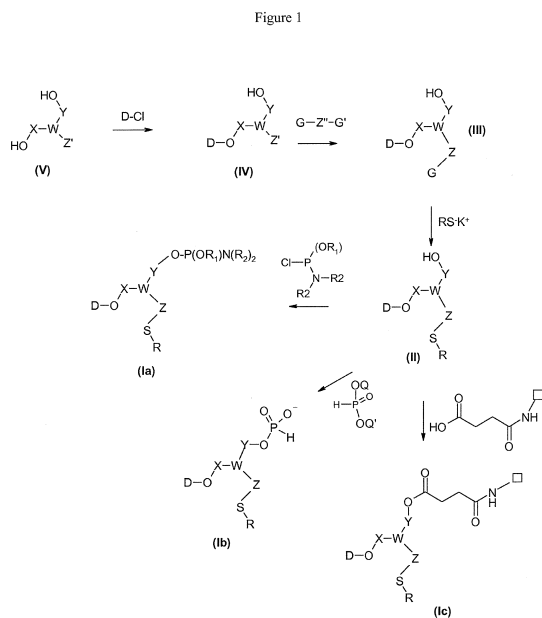
オリゴヌクレオチドと別の分子との間の親和性試験を行うための、態様 15 に記載の基材の使用。

〔態様 19〕

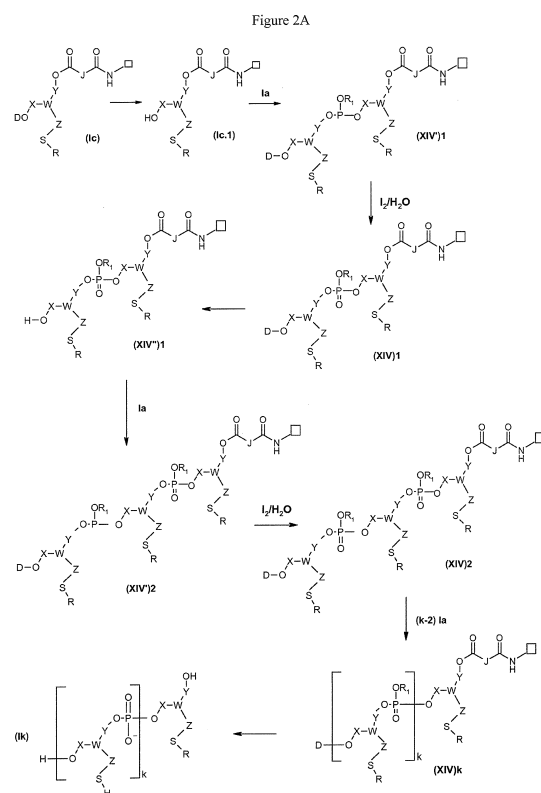
少なくとも 2 つのチオール基を含む化合物の、診断試験の確立のための使用であって、前記チオール基は、オリゴヌクレオチドを、少なくとも 1 つの炭素 - 炭素二重結合もしくは炭素 - 炭素三重結合を含む基またはハロアセトアミド基、好ましくは、マレイミドもしくはアクリルアミド基により修飾された表面にグラフトする、チオール基を含む化合物の使用。

10

【図 1】

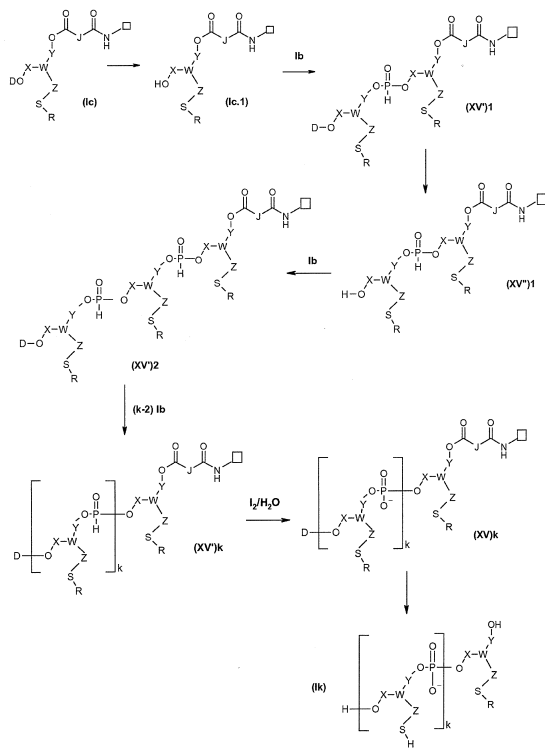


【図 2 A】



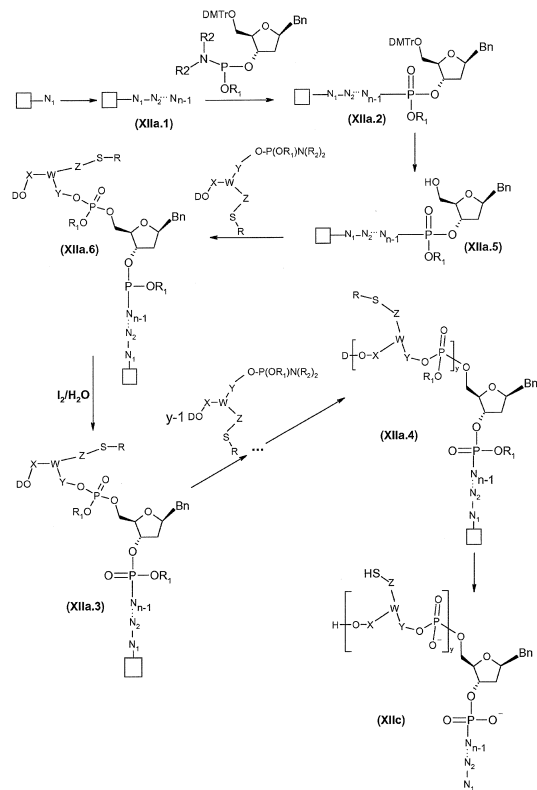
【図 2 B】

Figure 2B



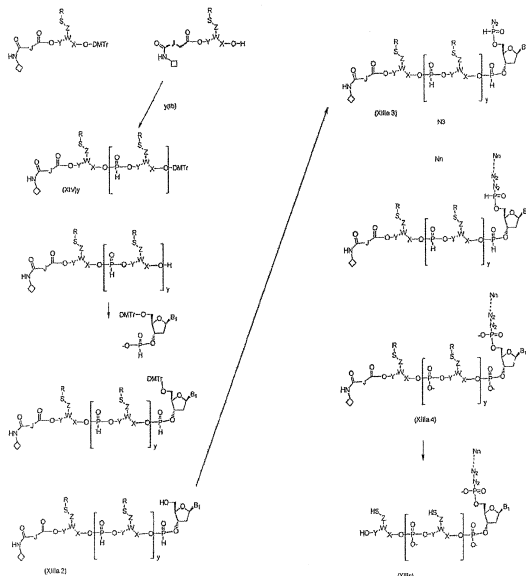
【図 3】

Figure 3



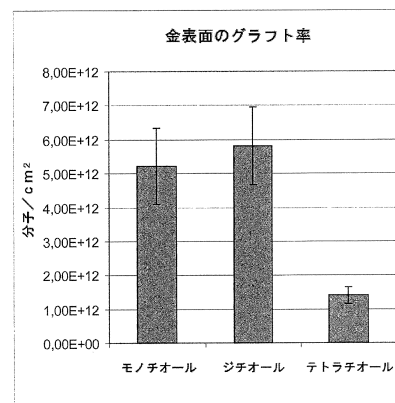
【図 4】

Figure 4



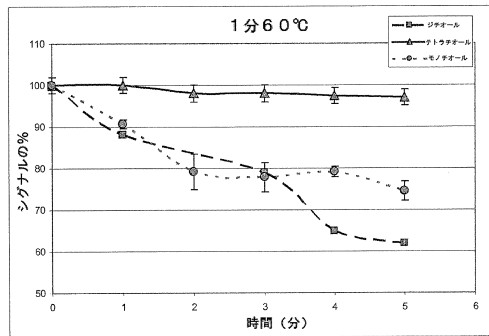
【図 5】

Figure 5



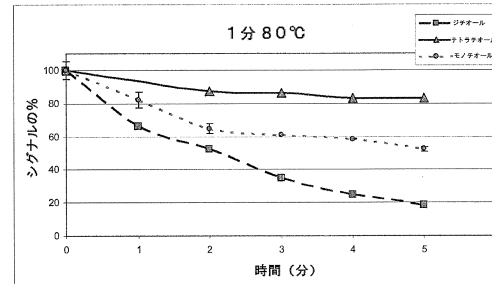
【図 6】

Figure 6



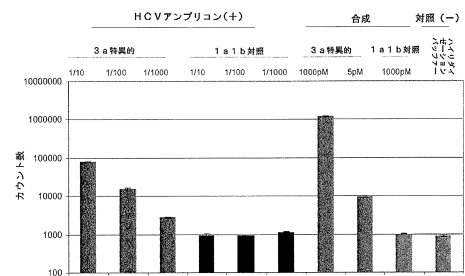
【図 7】

Figure 7



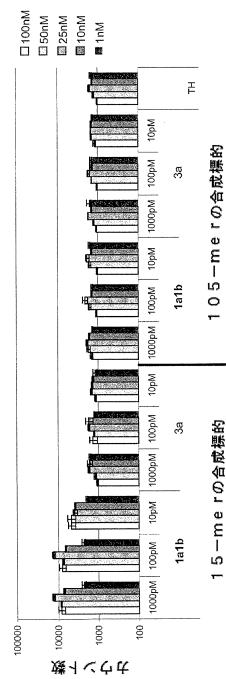
【図 8】

Figure 8



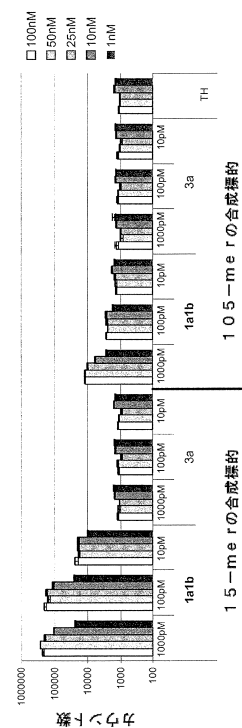
【図 9】

Figure 9

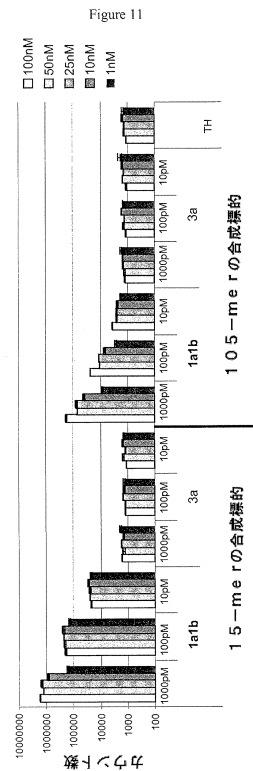


【図 10】

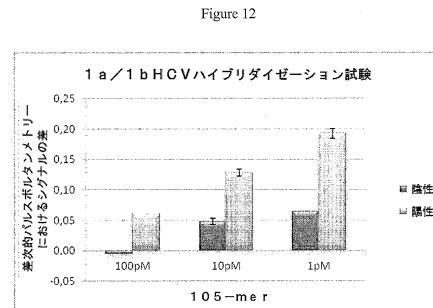
Figure 10



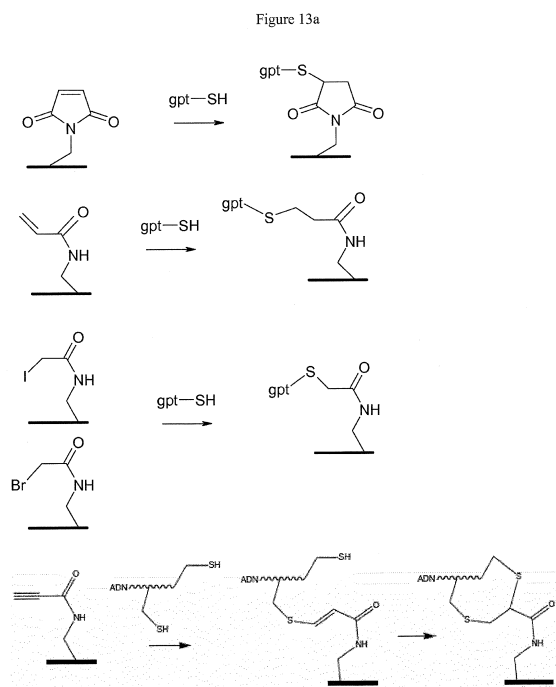
【図 1 1】



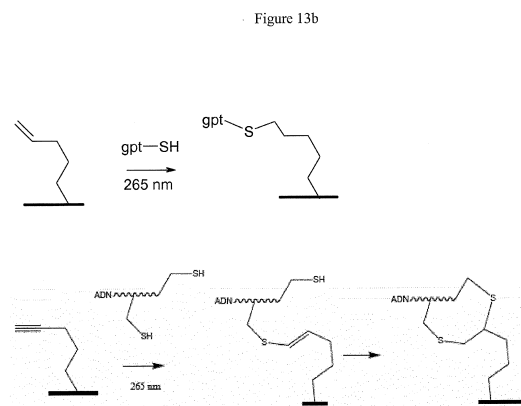
【図 1 2】



【図 1 3 a】



【図 1 3 b】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
G 0 1 N	33/547	(2006.01)	G 0 1 N 33/547
G 0 1 N	33/545	(2006.01)	G 0 1 N 33/545 A
G 0 1 N	33/58	(2006.01)	G 0 1 N 33/58 A

(73)特許権者 512132491

エタブリスモン フランセ ドュ サン
 ETABLISSEMENT FRANCAIS DU SANG
 フランス、エフ - 9 3 2 1 8 ラ プレンヌ サン デニス、アベニュー ドュ スタデ ド フラ
 ンス 2 0
 2 0 avenue du Stade de France, F - 9 3 2 1 8 La Pla
 ine Saint Denis, FRANCE

(73)特許権者 505257028

ユニヴェルシテ クロード ベルナール リヨン 1
 フランス国 エフ - 6 9 6 2 2 ヴィルールバンヌ, ブルヴァール デュ 1 1 ノヴァンブル
 1 9 1 8, 4 3

(74)代理人 100087941

弁理士 杉本 修司

(74)代理人 100086793

弁理士 野田 雅士

(74)代理人 100112829

弁理士 堤 健郎

(74)代理人 100144082

弁理士 林田 久美子

(74)代理人 100142608

弁理士 小林 由佳

(74)代理人 100154771

弁理士 中田 健一

(74)代理人 100155963

弁理士 金子 大輔

(72)発明者 モルヴァン・フランソワ

フランス国, エフ 3 4 1 7 0 カステルノー ル レ, リュー ドゥ ロパル 1 7

(72)発明者 メイェール・アルベル

フランス国, エフ 3 4 4 7 0 ペロル, リュー デ ラスカセ 1 1

(72)発明者 ヴァスール・ジャン ジャック

フランス国, エフ 3 4 9 8 0 コンベロ, アレ デュ プレン シュド 5

(72)発明者 マヤン・ジュリ

フランス国, エフ 8 4 2 7 0 ヴデーヌ, リュー ジョリオ キュリ 3 4 3

(72)発明者 シェ・カロル

フランス国, エフ 6 9 9 7 0 シャポネ, シュマン ドゥ トロメ 5

(72)発明者 ファーレ・キャロル

フランス国, エフ 6 9 0 0 3 リヨン, アヴェニュー デュ マレシャル ドゥ サックス 1 3
9

(72)発明者 フルニエ ウィルトゥ・シャントル

フランス国, エフ 9 3 2 1 8 ラ プレンヌ サン ドニ, セデ, アベニュー ドュ スタドゥ ド
ゥ フランス 2 0, エタブリスモン フランセ ドュ サン

(72)発明者 カントルーブ・ジャン フランソワ

フランス国, エフ 9 3 2 1 8 ラ プレンヌ サン ドニ, セデ, アベニュー ドュ スタドゥ ド

ウ フランス 20, エタブリスモン フランセ ドュ サン
(72)発明者 ルロー・ミリアン
フランス国, エフ 93218 ラ プレヌ サン ドニ, セデ, アベニユ ドュ スタドゥ ド
ウ フランス 20, エタブリスモン フランセ ドュ サン

審査官 杉江 渉

(56)参考文献 米国特許第07601848 (US, B1)
特表平07-500576 (JP, A)
国際公開第2009/061941 (WO, A1)
特表2009-535323 (JP, A)
UDDHAV KUMAR SHIGDEL, A NEW A'-METHYLENEDISULFIDE DEOXYRIBOSE 以下省略, JOURNAL OF THE
AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, 2008年12月31日, V130 N52, P17634-17635
SHENGXI JIN, SYNTHESIS OF AMINE- AND THIOL-MODIFIED NUCLEOSIDE 以下省略, THE JOURNAL O
F ORGANIC CHEMISTRY, 2005年 5月 1日, V70 N11, P4284-4299
HATANO AKIHIKO, SYNTHESIS AND REDOX-ACTIVE BASE-PAIRING PROPERTIES 以下省略, TETRAHEDR
ON, NL, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, 2005年 2月14日, V61 N7, P1723-1730
Bioorg. Med. Chem., 2001年, Vol.9, p.1241-1247
Bioorg. Med. Chem., 2006年, Vol.14, p.6235-6238
Eur. J. Org. Chem., 2012年, Vol.2012, p.1851-1856
Org. Lett., 2007年, Vol.9, p.2187-2190

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C07F 9/00 - 9/94
CAplus / REGISTRY (STN)