

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4948690号  
(P4948690)

(45) 発行日 平成24年6月6日(2012.6.6)

(24) 登録日 平成24年3月16日(2012.3.16)

(51) Int. Cl.	F I
<b>C07H 21/00 (2006.01)</b>	C07H 21/00
<b>A61K 31/7115 (2006.01)</b>	A61K 31/7115
<b>A61K 31/712 (2006.01)</b>	A61K 31/712
<b>C07D 487/04 (2006.01)</b>	C07D 487/04 137
<b>C07D 519/00 (2006.01)</b>	C07D 519/00 311

請求項の数 33 (全 52 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平8-531051  
 (86) (22) 出願日 平成8年4月3日(1996.4.3)  
 (65) 公表番号 特表平11-504626  
 (43) 公表日 平成11年4月27日(1999.4.27)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US1996/004559  
 (87) 国際公開番号 W01996/032496  
 (87) 国際公開日 平成8年10月17日(1996.10.17)  
 審査請求日 平成15年4月2日(2003.4.2)  
 審判番号 不服2008-1084(P2008-1084/J1)  
 審判請求日 平成20年1月15日(2008.1.15)  
 (31) 優先権主張番号 08/415,370  
 (32) 優先日 平成7年4月3日(1995.4.3)  
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 500461572  
 エポック・バイオサイエンシーズ・インコーポレイテッド  
 アメリカ合衆国 ワシントン 98021  
 ボセル トゥエンティサード・ドライブ  
 サウス・イースト 21720 スイート  
 ト 150  
 2172023RD DRIVE, S. E.  
 ., SUITE 150, BOTHELL  
 , WASHINGTON 98021, U  
 NITED STATES OF AME  
 RICA  
 (74) 代理人 100081422  
 弁理士 田中 光雄

最終頁に続く

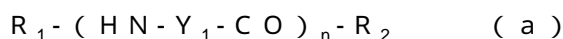
(54) 【発明の名称】 共有結合したオリゴヌクレオチド小溝結合物質複合体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

複数のヌクレオチド単位、3'末端及び5'末端を持つオリゴヌクレオチド；ならびに二本鎖DNA、RNA又はそれらのハイブリッドの小溝に約 $10^3 M^{-1}$ 以上の会合定数で非挿入的に結合する分子量約150～約2000ダルトンの分子のラジカルである小溝結合物質部分であって、該小溝結合物質部分を上記オリゴヌクレオチドに共有結合させる連結基によって該ヌクレオチドの少なくとも1つに結合した小溝結合物質部分；を含むオリゴヌクレオチド小溝結合物質複合体であって、連結基を含む小溝結合物質部分が次に挙げる(a)及び(b)群からなる群より選択される式を持つオリゴヌクレオチド小溝結合物質複合体：

【化1】



[式中、

Y<sub>1</sub>は、2つの二重結合とN及びSからなる群より選択される0～2個のヘテロ原子とを持つ5員環を表し；NH基とCO基は、互いに1環原子によって隔てられた2つの環炭素にそれぞれ結合しており；該2つの環炭素間に位置する環原子は、Hでのみ置換されているか、又は非置換であり；残りの各環原子は1又は2個のR<sub>3</sub>基で置換されていてもよく；

R<sub>1</sub>は独立して、H、-R<sub>4</sub>、-CONH<sub>2</sub>、-CONHR<sub>4</sub>、-CON(R<sub>4</sub>)<sub>2</sub>、-COOR<sub>4</sub>、H<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>CO-、-O(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>CO-、-HN(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>CO-、-CONH-、-C

10

20

OH、又は-COCH<sub>2</sub>C(NH)N(R<sub>4</sub>)<sub>2</sub>であり；そして  
 R<sub>2</sub>は独立して、OH、OR<sub>4</sub>、-NH<sub>2</sub>、-NHR<sub>4</sub>、-N(R<sub>4</sub>)<sub>2</sub>、-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>O-、-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>OH、-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>CH(OH)(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>O-、-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>CONH(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>CH(OH)(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>O-、-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>N(R<sub>4</sub>)<sub>2</sub>、-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>C(NH)N(R<sub>4</sub>)<sub>2</sub>、又は-HN(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>COO(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>S(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>NNC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>であるか；若しくはR<sub>1</sub>基とR<sub>2</sub>基の一方は存在せず；

R<sub>3</sub>は、F、Cl、Br、I、NH<sub>2</sub>、NHR<sub>4</sub>、N(R<sub>4</sub>)<sub>2</sub>、N(R<sub>4</sub>)<sub>3</sub><sup>+</sup>、OH、OR<sub>4</sub>、SH、SR<sub>4</sub>、COR<sub>4</sub>、CONHR<sub>4</sub>、及びCON(R<sub>4</sub>)<sub>2</sub>からなる群より選択され；  
 R<sub>4</sub>は、1～20個の炭素を持つアルキル基であり；

mは、1から10までの整数であり；

10

nは、1から10までの整数である]；

【化2】



[式中、

Y<sub>2</sub>は、1つの二重結合を持つ5員環と縮合した6員芳香環からなる環系であり；その縮合環系はN、S及びOからなる群より選択される0～3個のヘテロ原子を持ち；R<sub>6</sub>N基とCO基のそれぞれは、その縮合環系の異なる環中の環炭素であって、1つの共通する橋頭環原子からそれぞれ2番目の環原子である環炭素に結合しており；その結果、CO基とNR<sub>6</sub>基は、その縮合環系の一方の側でそれら自身の間に2つの非橋頭環原子を配し、その縮合環系の他方の側に3つの非橋頭環原子を配しており；その縮合環系の一方の側にある2つの非橋頭環原子はR<sub>7</sub>基で置換されていてもよく、その縮合環系の他方の側にある3つの非橋頭環原子はR<sub>3</sub>基で置換されていてもよく；

20

R<sub>1</sub>は独立して、H、-R<sub>4</sub>、-CONH<sub>2</sub>、-CONHR<sub>4</sub>、-CON(R<sub>4</sub>)<sub>2</sub>、-COOR<sub>4</sub>、H<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>CO-、-O(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>CO-、-HN(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>CO-、-CONH-、又は-COHであり；そして

R<sub>2</sub>は独立して、OH、OR<sub>4</sub>、-NH<sub>2</sub>、-NHR<sub>4</sub>、-N(R<sub>4</sub>)<sub>2</sub>、-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>O-、-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>OH、-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>CH(OH)(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>O-、又は-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>CONH(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>CH(OH)(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>O-であるか；若しくはR<sub>1</sub>基とR<sub>2</sub>基の一方は存在せず；

R<sub>3</sub>は、F、Cl、Br、I、NH<sub>2</sub>、NHR<sub>4</sub>、N(R<sub>4</sub>)<sub>2</sub>、N(R<sub>4</sub>)<sub>3</sub><sup>+</sup>、OH、OR<sub>4</sub>、SH、SR<sub>4</sub>、COR<sub>4</sub>、CONHR<sub>4</sub>、及びCON(R<sub>4</sub>)<sub>2</sub>からなる群より選択され；

30

R<sub>4</sub>は、1～20個の炭素を持つアルキル基であり；

R<sub>6</sub>はH、1～5炭素のアルキルであるか、又はR<sub>6</sub>とR<sub>7</sub>が一体となって、4、5又は6員環を形成し、この場合、-O-、-S-、-NH-、-NCH<sub>3</sub>-又はN-低級アルキル基が該環の一部であってもよく；

R<sub>7</sub>は、F、メチル又はエチル；-CH<sub>2</sub>-又は-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-であり；

mは、1から10までの整数であり；

nは、1から10までの整数である]。

【請求項2】

連結基が、小溝結合物質部分をオリゴヌクレオチドに15個以下の原子を介して共有結合させるものである請求項1のオリゴヌクレオチド小溝結合物質複合体。

40

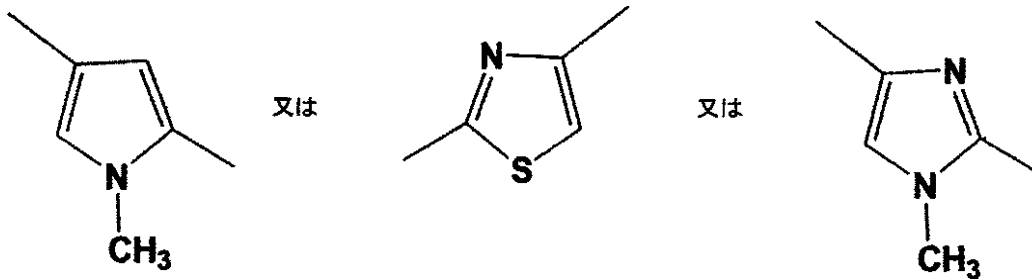
【請求項3】

連結基を含む小溝結合部分が式(a)によって表される請求項2のオリゴヌクレオチド小溝結合物質複合体。

【請求項4】

Y<sub>1</sub>が次の式で表される請求項3のオリゴヌクレオチド小溝結合物質複合体：

【化3】



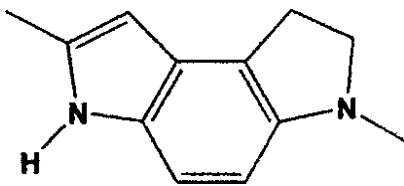
【請求項5】

連結基を含む小溝結合部分が式(b)によって表される請求項2のオリゴヌクレオチド小溝結合物質複合体。

【請求項6】

$Y_2$ が次の式で表される請求項5のオリゴヌクレオチド小溝結合物質複合体：

【化4】



【請求項7】

小溝結合部分がオリゴヌクレオチドの5'末端に結合している請求項1のオリゴヌクレオチド小溝結合物質複合体。

【請求項8】

小溝結合部分がオリゴヌクレオチドの3'末端に結合している請求項1のオリゴヌクレオチド小溝結合物質複合体。

【請求項9】

小溝結合物質部分が、オリゴヌクレオチドの3'末端でも5'末端でもないヌクレオチド単位に結合している請求項1のオリゴヌクレオチド小溝結合物質複合体。

【請求項10】

小溝結合物質部分がヌクレオチド単位の複素環式塩基部分に結合している請求項1のオリゴヌクレオチド小溝結合物質複合体。

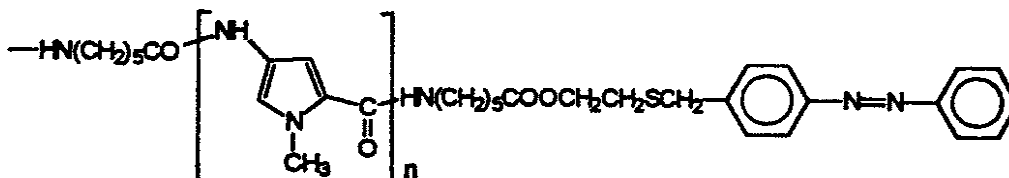
【請求項11】

小溝結合物質部分がヌクレオチド単位の複素環式塩基部分に結合している請求項9のオリゴヌクレオチド小溝結合物質複合体。

【請求項12】

連結基を含む小溝結合部分が式：

【化5】



(n = 2 ~ 5)

を持つ請求項3のオリゴヌクレオチド小溝結合物質複合体。

【請求項13】

小溝結合部分がオリゴヌクレオチドの3'末端に結合している請求項12のオリゴヌクレオチド小溝結合物質複合体。

【請求項14】

連結基を含む小溝結合部分が式：

10

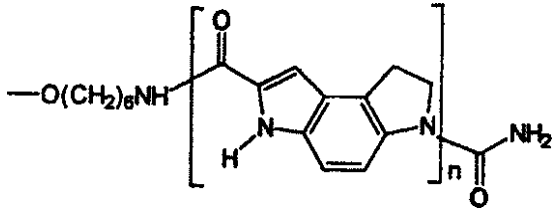
20

30

40

50

【化 6】



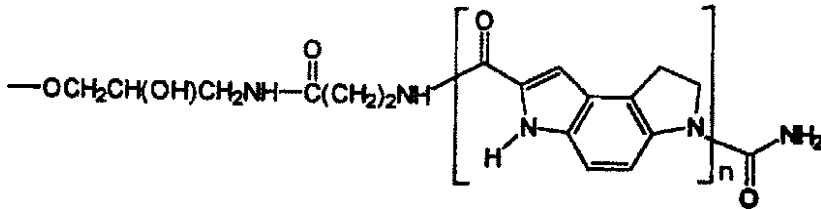
( n = 2 ~ 5 )

を持つ請求項 5 のオリゴヌクレオチド小溝結合物質複合体。

【請求項 1 5】

連結基を含む小溝結合部分が式：

【化 7】



( n = 2 ~ 5 )

を持つ請求項 5 のオリゴヌクレオチド小溝結合物質複合体。

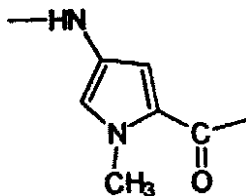
【請求項 1 6】

小溝結合部分がオリゴヌクレオチドの 3' 末端に結合している請求項 1 5 のオリゴヌクレオチド小溝結合物質複合体。

【請求項 1 7】

小溝結合部分が式 ( a ) で表され、その 5 員環が次の構造：

【化 8】

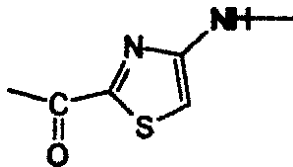


を持つ請求項 3 のオリゴヌクレオチド小溝結合物質複合体。

【請求項 1 8】

小溝結合部分が式 ( a ) で表され、その 5 員環が次の構造：

【化 9】

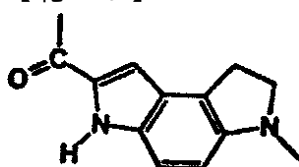


を持つ請求項 3 のオリゴヌクレオチド小溝結合物質複合体。

【請求項 1 9】

小溝結合部分が式 ( b ) で表され、その縮合環系が次の構造：

【化 1 0】



を持つ請求項 5 のオリゴヌクレオチド小溝結合物質複合体。

10

20

30

40

50

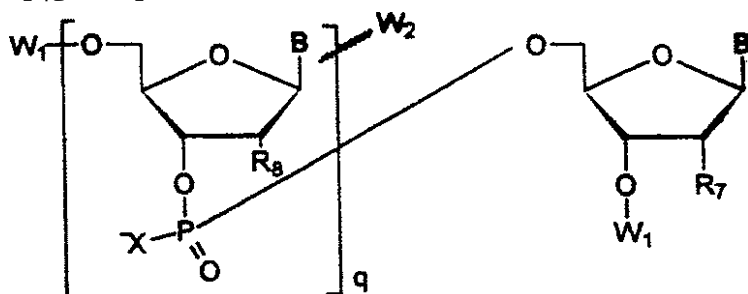
## 【請求項 20】

ヌクレオチド単位の少なくとも1つに共有結合した架橋官能基をさらに含む請求項1のオリゴヌクレオチド小溝結合物質複合体。

## 【請求項 21】

複数のヌクレオチド単位、3'末端及び5'末端を持つオリゴヌクレオチド；ならびに小溝結合物質部分を上記オリゴヌクレオチドに15個以下の原子を介して共有結合させる連結基によって該ヌクレオチドの少なくとも1つに結合した小溝結合物質部分；を含むオリゴヌクレオチド小溝結合物質複合体であって、次の式を持つ複合体であって

【化11】



10

[式中、

xはO又はSであり；

qは3から100までの整数であり；

R<sub>8</sub>はH、OH、1～6個の炭素を持つアルコキシ、O-C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>アルケニル又はFであり；

Bは、自然界で核酸中に認められる複素環式塩基、ヒポキサンチン、2-アミノアデニン、2-チオウラシル、2-チオチミン、5-N<sup>4</sup>-エテノシトシン、4-アミノピラゾロ[3,4-d]ピリミジン、6-アミノ-4-ヒドロキシ-[3,4-d]ピリミジンからなる群より選択されるアグリコンであり；

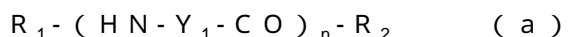
W<sub>1</sub>はH、PO(OH)<sub>2</sub>又はその塩、又は該オリゴヌクレオチドの3'又は5'末端に結合した小溝結合物質部分（該小溝結合物質部分を該オリゴヌクレオチドに15個以下の原子を介して共有結合させる連結基を含む）であり；

W<sub>2</sub>は存在しないか、アグリコンBの1つに結合した小溝結合物質部分（該小溝結合物質部分を該アグリコンに共有結合させる連結基を含む）であるか、若しくはW<sub>2</sub>は架橋官能基（該架橋官能基を該アグリコンに共有結合させるリンカーアームを含む）であり；

ここに、小溝結合物質部分とは、二本鎖DNA、RNA又はそれらのハイブリッドの小溝に約10<sup>3</sup>M<sup>-1</sup>以上の会合定数で非挿入的に結合する分子量約150～約2000ダルトンの分子のラジカルをいい、該W<sub>1</sub>基とW<sub>2</sub>基の少なくとも一つは小溝結合物質部分であるものとする]、

ここに、連結基を含む小溝結合物質部分は、次に挙げる(a)及び(b)群からなる群より選択される式を持つ、複合体；

## 【化12】



40

[式中、

Y<sub>1</sub>は、2つの二重結合とN、S及びOからなる群より選択される0～3個のヘテロ原子とを持つ5員環を表し；NH基とCO基は、互いに1環原子によって隔てられた2つの環炭素にそれぞれ結合しており；該2つの環炭素間に位置する環原子は、Hでのみ置換されているか、又は非置換であり；残りの各環原子は1、2又は3個のR<sub>3</sub>基で置換されていてもよく；

R<sub>1</sub>は独立して、H、-R<sub>4</sub>、-CONH<sub>2</sub>、-CONHR<sub>4</sub>、-CON(R<sub>4</sub>)<sub>2</sub>、-COOR<sub>4</sub>、H<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>CO-、-O(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>CO-、-HN(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>CO-、-CONH-、-COOH、又は-COCH<sub>2</sub>C(NH)N(R<sub>4</sub>)<sub>2</sub>であり；そして

R<sub>2</sub>は独立して、OH、OR<sub>4</sub>、-NH<sub>2</sub>、-NHR<sub>4</sub>、-N(R<sub>4</sub>)<sub>2</sub>、-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>O-、-

50

$\text{NH}(\text{CH}_2)_m\text{OH}$ 、 $-\text{NH}(\text{CH}_2)_m\text{CH}(\text{OH})(\text{CH}_2)_m\text{O}-$ 、 $-\text{NH}(\text{CH}_2)_m\text{CONH}(\text{CH}_2)_m\text{CH}(\text{OH})(\text{CH}_2)_m\text{O}-$ 、 $-\text{NH}(\text{CH}_2)_m\text{N}(\text{R}_4)_2$ 、 $-\text{NH}(\text{CH}_2)_m\text{C}(\text{NH})\text{N}(\text{R}_4)_2$ 、又は $-\text{HN}(\text{CH}_2)_m\text{COO}(\text{CH}_2)_m\text{S}(\text{CH}_2)_m\text{C}_6\text{H}_4\text{NNC}_6\text{H}_4$ であるか；若しくは $\text{R}_1$ 基と $\text{R}_2$ 基の一方は存在せず；

$\text{R}_3$ は、 $\text{F}$ 、 $\text{Cl}$ 、 $\text{Br}$ 、 $\text{I}$ 、 $\text{NH}_2$ 、 $\text{NHR}_4$ 、 $\text{N}(\text{R}_4)_2$ 、 $\text{N}(\text{R}_4)_3^+$ 、 $\text{OH}$ 、 $\text{OR}_4$ 、 $\text{SH}$ 、 $\text{SR}_4$ 、 $\text{COR}_4$ 、 $\text{CONHR}_4$ 、及び $\text{CON}(\text{R}_4)_2$ からなる群より選択され；

$\text{R}_4$ は、1～20個の炭素を持つアルキル基であり；

$m$ は、1から10までの整数であり；

$n$ は、1から10までの整数である]；

【化13】



[式中、

$\text{Y}_2$ は、1つの二重結合を持つ5員環と縮合した6員芳香環からなる環系であり；その縮合環系は $\text{N}$ 、 $\text{S}$ 及び $\text{O}$ からなる群より選択される0～3個のヘテロ原子を持ち； $\text{R}_6\text{N}$ 基と $\text{CO}$ 基のそれぞれは、その縮合環系の異なる環中の環炭素であって、1つの共通する橋頭環原子からそれぞれ2番目の環原子である環炭素に結合しており；その結果、 $\text{CO}$ 基と $\text{NR}_6$ 基は、その縮合環系の一方の側でそれら自身の間には2つの非橋頭環原子を配し、その縮合環系の他方の側に3つの非橋頭環原子を配しており；その縮合環系の一方の側にある2つの非橋頭環原子は $\text{R}_7$ 基で置換されていてもよく、その縮合環系の他方の側にある3つの非橋頭環原子は $\text{R}_3$ 基で置換されていてもよく；

$\text{R}_1$ は独立して、 $\text{H}$ 、 $-\text{R}_4$ 、 $-\text{CONH}_2$ 、 $-\text{CONHR}_4$ 、 $-\text{CON}(\text{R}_4)_2$ 、 $-\text{COOR}_4$ 、 $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_m\text{CO}-$ 、 $-\text{O}(\text{CH}_2)_m\text{CO}-$ 、 $-\text{HN}(\text{CH}_2)_m\text{CO}-$ 、 $-\text{CONH}-$ 、又は $-\text{COH}$ であり；そして

$\text{R}_2$ は独立して、 $\text{OH}$ 、 $\text{OR}_4$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHR}_4$ 、 $-\text{N}(\text{R}_4)_2$ 、 $-\text{NH}(\text{CH}_2)_m\text{O}-$ 、 $-\text{NH}(\text{CH}_2)_m\text{OH}$ 、 $-\text{NH}(\text{CH}_2)_m\text{CH}(\text{OH})(\text{CH}_2)_m\text{O}-$ 、又は $-\text{NH}(\text{CH}_2)_m\text{CONH}(\text{CH}_2)_m\text{CH}(\text{OH})(\text{CH}_2)_m\text{O}-$ であるか；若しくは $\text{R}_1$ 基と $\text{R}_2$ 基の一方は存在せず；

$\text{R}_3$ は、 $\text{F}$ 、 $\text{Cl}$ 、 $\text{Br}$ 、 $\text{I}$ 、 $\text{NH}_2$ 、 $\text{NHR}_4$ 、 $\text{N}(\text{R}_4)_2$ 、 $\text{N}(\text{R}_4)_3^+$ 、 $\text{OH}$ 、 $\text{OR}_4$ 、 $\text{SH}$ 、 $\text{SR}_4$ 、 $\text{COR}_4$ 、 $\text{CONHR}_4$ 、及び $\text{CON}(\text{R}_4)_2$ からなる群より選択され；

$\text{R}_4$ は、1～20個の炭素を持つアルキル基であり；

$\text{R}_6$ は $\text{H}$ 、1～5炭素のアルキルであるか、又は $\text{R}_6$ と $\text{R}_7$ が一体となって、4、5又は6員環を形成し、この場合、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{NH}-$ 、 $-\text{NCH}_3$ -又は $\text{N}$ -低級アルキル基が該環の一部であってもよく；

$\text{R}_7$ は、 $\text{F}$ 、メチル又はエチル； $-\text{CH}_2-$ 又は $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ であり；

$m$ は、1から10までの整数であり；

$n$ は、1から10までの整数である]。

【請求項22】

$\text{W}_1$ 基の少なくとも1つが小溝結合物質部分と連結基であり、 $\text{W}_2$ が存在しない請求項21のオリゴヌクレオチド小溝結合物質複合体。

【請求項23】

$\text{W}_2$ が小溝結合物質部分と連結基である請求項21のオリゴヌクレオチド小溝結合物質複合体。

【請求項24】

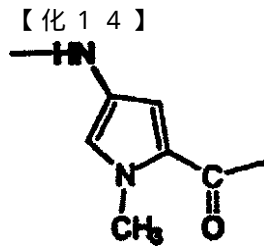
連結基を含む小溝結合部分が式(a)で表され、その5員環が次の構造：

10

20

30

40



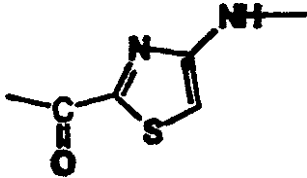
を持つ請求項 2 1 のオリゴヌクレオチド小溝結合物質複合体。

【請求項 2 5】

小溝結合部分が式 ( a ) で表され、その 5 員環が次の構造：

10

【化 1 5】



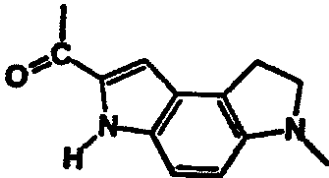
を持つ請求項 2 1 のオリゴヌクレオチド小溝結合物質複合体。

【請求項 2 6】

小溝結合部分が式 ( b ) で表され、その縮合環系が次の構造：

20

【化 1 6】

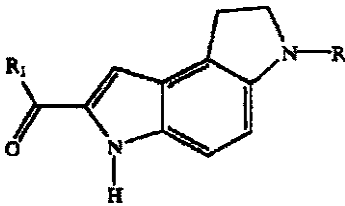


を持つ請求項 2 1 のオリゴヌクレオチド小溝結合物質複合体。

【請求項 2 7】

次の式で示される化合物：

【化 1 7】



30

[ 式中、R は CONH<sub>2</sub> または t-ブチルオキシカルボニルであり、R<sub>1</sub> は 2, 3, 5, 6-テトラフルオロフェニルオキシである ]。

【請求項 2 8】

R が CONH<sub>2</sub> である請求項 2 7 の化合物。

【請求項 2 9】

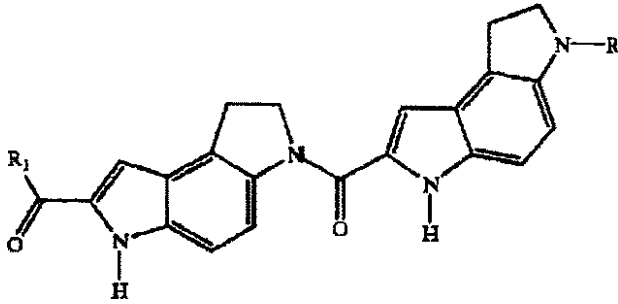
40

R が t-ブチルオキシカルボニルである請求項 2 7 の化合物。

【請求項 3 0】

次の式で示される化合物：

## 【化18】



[ 式中、RはCONH<sub>2</sub>またはt-ブチルオキシカルボニルであり、R<sub>1</sub>は2,3,5,6-テトラフルオロフェニルオキシである ]。

10

## 【請求項31】

RがCONH<sub>2</sub>である請求項30の化合物。

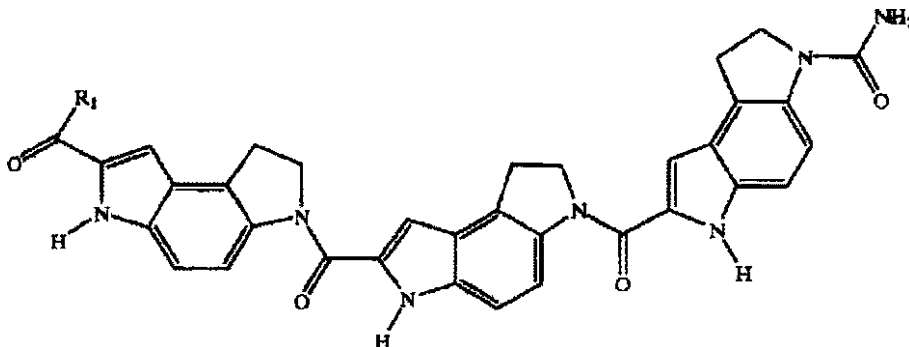
## 【請求項32】

Rがt-ブチルオキシカルボニルである請求項30の化合物。

## 【請求項33】

次の式で示される化合物：

## 【化19】



20

[ 式中、R<sub>1</sub>は2,3,5,6-テトラフルオロフェニルオキシである ]。

## 【発明の詳細な説明】

## 1. 発明の分野

30

本発明はオリゴヌクレオチドの新規誘導体に関する。より具体的には、本発明は1又はそれ以上の小溝結合分子がオリゴヌクレオチドに共有結合しているオリゴヌクレオチド誘導体に関する。本オリゴヌクレオチド小溝結合部分複合体は、一本鎖又は二本鎖核酸の相補鎖にハイブリッド形成し、それに強固に結合する強い親和性を示すので、配列特異的プローブとして、またアンチセンス及びアンチジーン治療剤として有効である。

## 2. 先行技術の簡単な説明

当該技術分野では、二本鎖DNAの小溝に非共有結合する小溝結合剤が知られている。また、二本鎖DNA又はRNAに結合する挿入剤も、当該技術分野ではよく知られている。挿入剤は、概して言えば、二本鎖DNA又はRNAの2本の鎖の界面を成すプリン塩基とピリミジン塩基の間に自身を置く（挿入する）ことによって二本鎖DNA又はRNAに非共有結合する平板な芳香族分子である。米国特許第4,835,263号は、挿入基に共有結合したオリゴヌクレオチドを記述している。挿入基を持つこのようなオリゴヌクレオチドは、ハイブリッド形成プローブとして有用である。

40

## 発明の要約

本発明は、複数のヌクレオチド単位、3'-末端及び5'-末端を持つオリゴヌクレオチドと、該ヌクレオチドの少なくとも1つに共有結合した小溝結合物質部分を含む、共有結合したオリゴヌクレオチドと小溝結合物質の複合体に関する。この小溝結合物質は、典型的には、15原子を超えない鎖からなる連結基を介してオリゴヌクレオチドに取り付けられる。小溝結合物質部分は、二本鎖DNA、RNA又はそれらのハイブリッドの小溝に約10<sup>3</sup>M<sup>-1</sup>を超える会合定数で非挿入的に結合する分子量約150～約2000ダルトンの分子のラジカルであ

50



る。

もう1つの側面として、本発明は、ある種の共有結合オリゴヌクレオチド小溝結合物質複合体を合成する方法と、そのような複合体をハイブリッド形成プローブ及び関連する分析、診断用途、並びに治療（アンチセンス及びアンチジーン）用途に使用方法に関する。

#### 【図面の簡単な説明】

図1は、スロットプロットハイブリッド形成検定の結果を示すグラフである。

発明の詳細な説明

一般的態様

本発明の新規組成物の顕著な特徴は、小溝結合分子がオリゴヌクレオチドに共有結合していることである。本願の序文で述べたように、小溝結合物質とは、二本鎖デオキシリボ核酸（DNA）の小溝内に結合する分子をいう。既知の小溝結合化合物は極めて多様な化学構造を持つので、それらの全てを表す一般化学式を示すことはできないが、DNAの小溝に結合することができる化合物は、概して、三日月型の三次元構造を持つ。先行技術の小溝結合化合物のほとんどは、B型二本鎖DNAの高A-T（アデニン及びチミジン）含有領域に強い選択性を持つ。本発明の小溝結合化合物、より正確に述べると、本発明のオリゴヌクレオチド-小溝結合複合体の小溝結合化合物部分も、同じ選択性を持つ。（以下、本発明のオリゴヌクレオチド-小溝結合複合体をODN-MGBともいう。）しかし、高C-G（シトシン及びグアニン）含有領域に対する選択性を示す小溝結合化合物も理論的にも考えられる。したがって、C-G領域に対する選択性を持つ小溝結合物質分子から誘導される基又は部分を組込んだODN-MGB化合物も、本発明の範囲に含まれる。既知の小溝結合物質のA-T領域に対する選択性は、現在のところ、グアニンの2-アミノ基といくつかの周知の小溝結合物質の間の不利な立体障害の存在によって説明されている。しかし、後述の説明から明らかになるように、本発明のODN-MGBにおいてグアニンをヒポキサンチンに置換すると、上記の不利な立体障害の可能性が存在しなくなり、そのODN-MGBの相補鎖に対する強固な結合が起こり得る。

概して、先行技術で知られている小溝結合化合物は、二本鎖RNAや、DNAとRNAの二本鎖ハイブリッドには結合しない。しかし、本発明のODN-MGB化合物は一本鎖RNAに結合する潜在能力を示し、上述の特徴は、本発明のもう1つの興味深く新規な側面を形成する。

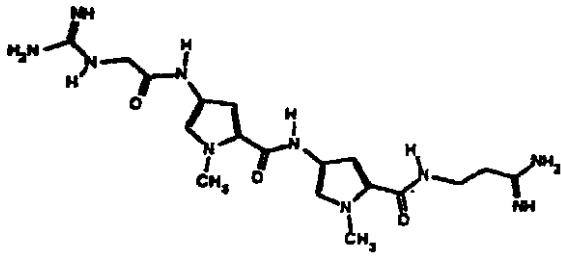
本発明に従ってODNに共有結合することにより新規ODN-MGB複合体を形成することができる先行技術の既知小溝結合化合物の例は、ある種の天然化合物、例えばネトロプシン（netropsin）、ジスタマイシン（distamycin）及びレキシトロプシン（lexitropsin）、ミトラマイシン、クロモマイシン（chromomycin）<sub>A3</sub>、オリボマイシン（olivomycin）、アントラマイシン（anthramycin）、シピロマイシン（sibiromycin）その他の関連抗生物質及び合成誘導体である。ある種のビス四級アンモニウム複素環式化合物、ペンタミジン、スチルバミジン（stilbamidine）及びベレニル（berenil）などのジアリールアミジン類、CC-1065及び関連するピロロインドール及びインドールポリペプチド、Hoechst 33258、4'-6'-ジアミジノ-2-フェニルインドール（DAPI）、並びに天然アミノ酸又は合成アミノ酸からなるいくつかのオリゴペプチドは、小溝結合化合物である。次の例の化学構造を以下に示す。

10

20

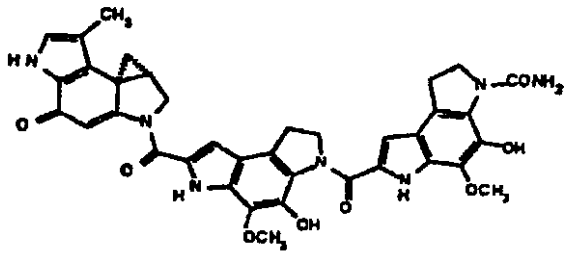
30

40



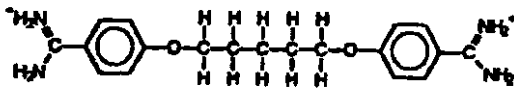
ネトロプシン

10



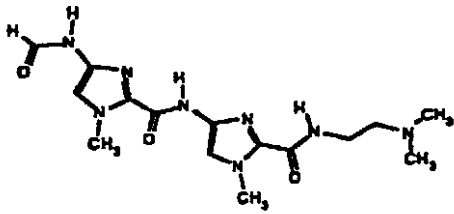
CC-1065

20

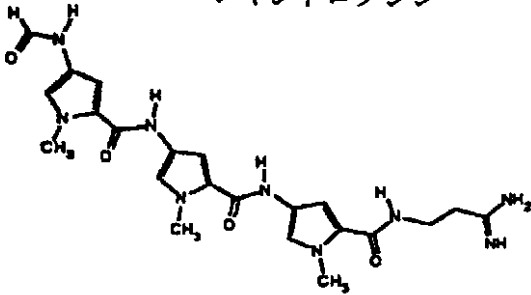


ペンタミジン

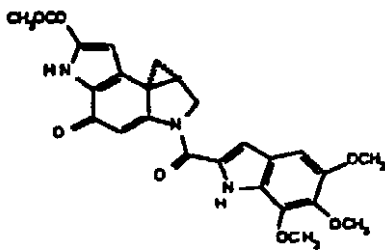
30



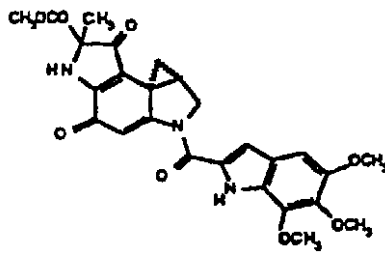
レキシトロプシン



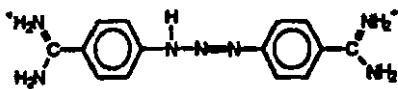
ジスタマイシン



デュオカルマイシン (Duocarmycin) SA



デュオカルマイシン A



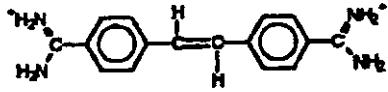
ベレニル

10

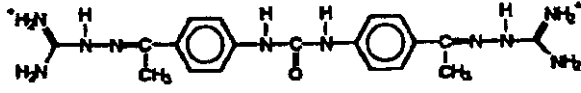
20

30

40

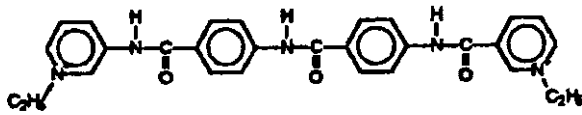


スチルバミジン



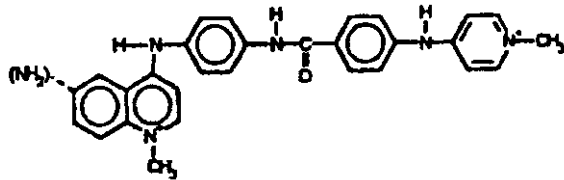
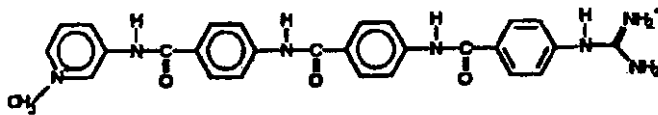
DDUG

10



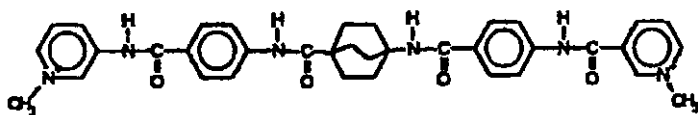
NSC 101327

20

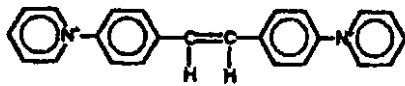
SN 6999 (NH<sub>2</sub> - NSC 176319)

SN 6136

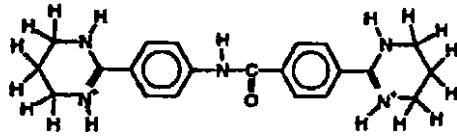
30



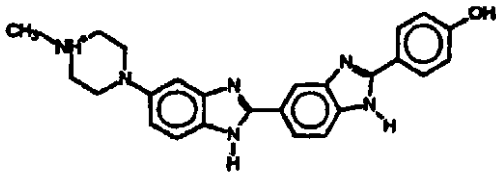
SN 16814



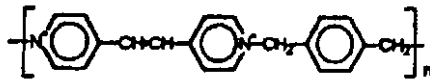
SN 18071



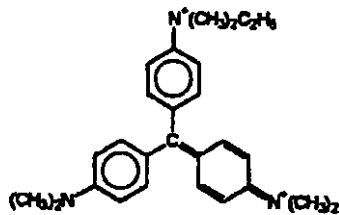
NSC 57153



Hoechst 33258



イオネン (Ionen) X



メチルグリーン

本発明の目的にとっては、ある分子が $10^3\text{M}^{-1}$ 又はそれ以上の会合定数で二本鎖DNAの小溝内に結合できるならば、その分子は小溝結合物質である。このタイプの結合は、十分に確立された分光光度測定法、例えば紫外(u.v.)及び核磁気共鳴(nmr)分光法や、ゲル電気泳動によって検出できる。小溝結合物質分子が結合した時のu.v.スペクトルの変化と、「核オーバーハウザー」(NOSEY)効果を利用するnmr分光法はとりわけよく知られており、この目的にとって有用な技術である。ゲル電気泳動は、二本鎖DNA又はその断片に対する小溝結合物質の結合を検出する。そのような結合が起こると、二本鎖DNAの移動度が変化するからである。

挿入分子又は挿入剤は、小溝結合物質が「三日月型」又は類似の外形を持つのに対して、挿入剤は平板な芳香族(好ましくは多環式)分子であるということに基づいて、小溝結合物質とは容易に区別される。核オーバーハウザー効果を利用するnmr分光法によって、実験的に区別することもできる。

上述のように、本発明の目的にとっては、二本鎖DNAの小溝内におけるある分子の会合定数が $10^3\text{M}^{-1}$ 又はそれ以上ならば、その分子は小溝結合物質である。しかし、いくつかの小溝結合物質は、 $10^7 \sim 10^9\text{M}^{-1}$ 程度の会合定数で二本鎖DNAの高親和性部位に結合する。

本発明では、小溝結合物質分子を誘導体化して本質的に「ラジカル」として、それを、ODNにその小溝結合物質を結合する適当な共有構造又は原子鎖に連結する。ある意味で、そ

10

20

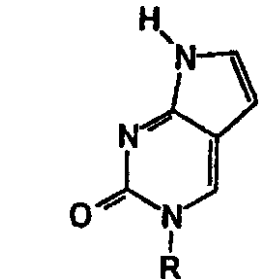
30

40

50

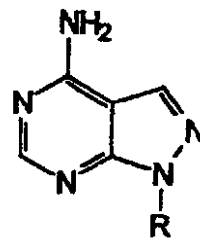
の連結「鎖」は小溝結合物質の一部と見なすことができ、またそのようにみなす場合がある。その結合は、そのODN-MGB分子の小溝結合性に悪影響を与えないような性質を持つからである。しかし、小溝結合物質と、それをODNに共有結合させる基とを概念的に区別した方が、本発明にとっては好都合である。小溝結合物質分子から「生成した」ラジカルを、以下、「小溝結合物質部分」といい、その小溝結合物質部分をオリゴヌクレオチドに結び付ける共有結合（これは約15原子までの鎖であってもよい）を「連結基」と呼ぶ。本発明による小溝部分の好ましい態様については、本発明のODN-MGB複合体化合物のオリゴヌクレオチドを説明した後に、詳細に説明する。

本発明のODN-MGB複合体のオリゴヌクレオチド部分は、概して、約3~100ヌクレオチド単位を含む。本発明に従ってODNに組込むことができるヌクレオチド単位には、自然界で核酸中に認められる主要な複素環式塩基（ウラシル、シトシン、チミン、アデニン及びグアニン）と、これら塩基の天然及び合成修飾体及び類似物、例えばヒポキサンチン、2-アミノアデニン、2-チオウラシル、2-チオチミン、5-N<sup>4</sup>エテノシトシン、4-アミノピラゾロ[3,4-d]ピリミジン及び6-アミノ-4-ヒドロキシ-[3,4-d]ピリミジンなどが含まれる。5-N<sup>4</sup>エテノシトシン、4-アミノピラゾロ[3,4-d]ピリミジン及び6-アミノ-4-ヒドロキシ-[3,4-d]ピリミジンの2-デオキシリボシドの各構造を下に示す。



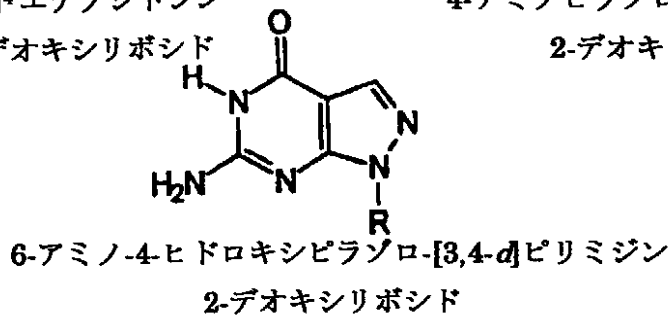
5-N<sup>4</sup>エテノシトシン

2-デオキシリボシド



4-アミノピラゾロ[3,4-d]ピリミジン

2-デオキシリボシド



6-アミノ-4-ヒドロキシピラゾロ-[3,4-d]ピリミジン

2-デオキシリボシド

**R=2-デオキシ-β-D-リボフラノシル**

さらに、本発明のODN-MGB複合体のODNに組込まれるヌクレオチド単位は、その塩基の1又はそれ以上に連結アームを介して共有結合した架橋官能基（アルキル化剤）を持ってよい。結合した架橋剤を持つODN-MGB複合体は本発明の好ましい態様の重要な一群を成すので、これらの構造について以下により詳しく説明する。

本発明のODN-MGBの「糖」又はグリコシド部分は、デオキシリボース、リボース、2-フルオロリボース、2-O-アルキル又はアルケニルリボース（ここにアルキル基は1~6個の炭素を持つことができ、アルケニル基は2~6個の炭素を持つことができる）を含みうる。天然ヌクレオチドと本明細書に記載するその修飾体及び類似物において、そのデオキシリボース又はリボース部分はフラノース環を形成し、そのグリコシド結合（glycosidic linkage）は立体配置を持ち、プリン塩基はその9位で、ピリミジン類はその1位で、ピラゾロピリミジン類はその1位で糖部分に結合している。現在のところ、本発明ではオリゴデオキシリボヌクレオチドが好ましいので、好ましい糖は2-デオキシリボースである。ODNのヌクレオチド単位は、当該技術分野で良く知られているように、「リン酸」骨格によって相互に連結される。本発明のODN-MGB複合体のODNは、「天然の」リン酸ジエステル結合に加えて、チオリン酸エステル（phosphorothioates）及びメチルホスホン酸エステルを含んでもよい。

本発明のODN-MGB複合体のODNは、その3'-又は5'-末端のいずれかに結合した比較的分子量の「テール部分」を持ってよい。この文脈における「テール部分」は、やはり3'-又は5'-末端若しくはその両方に結合していることが好ましい小溝結合部分とは区別されるべきものである。したがって、この文脈における「テール部分」が存在するとすれば、それは小溝結合物質部分を保持しないODNの末端に結合している。例えば、テール分子はリン酸、リン酸エステル、アルキル基及びアミノアルキル基又は親油性基などでありうる。

本発明ODN-MGB複合体のODNのヌクレオチド単位、「リン酸骨格」及び「テール」の考える異型については、次に挙げることに留意すべきである。本発明のODN-MGB複合体の主たる有用な作用は、その分子のODN部分が一本鎖DNA、RNA、二本鎖DNA及びDNA-RNAハイブリッド中の相補配列に結合することができ、この際に、小溝結合部分が新たに形成された「二重らせん」に組み込まれて、その結合を強くすること、すなわち、新たに形成された二重らせんの溶解温度（及び会合定数）を増大させることにある。さらに、架橋剤を含む本発明ODN-MGB複合体の好ましい態様は、その相補DNA又はRNA鎖に対する本ODN-MGB分子の恒久的な共有結合をもたらし、恒久結合型となる。上述の説明から、当業者は、本発明ODN-MGB複合体のODN部分の様々な構成部分の一次構造上の制限は、そのODN部分が特定の標的配列に相補的な鎖を形成できるということにのみあること、及び、それ自体は当該技術分野で知られている多数の構造修飾体が、これらの範囲に含まれることを、容易に理解するだろう。さらに、本発明のODN-MGB複合体のODN部分を形成しうる種々の複素環式塩基、ヌクレオシド、ヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドは、概して、当該技術分野で十分に開発され、よく知られている。N<sub>4</sub>,N<sub>4</sub>-エタノ-5-メチルデオキシシチジン、そのヌクレオシド、ヌクレオチド及び/又はこの塩基を組み込んだオリゴヌクレオチドは、Webb, T.R.; Matteucci, M.D. *Nucleic Acids Res.*, 1986, 14, 7661-7674, Webb, T.R.; Matteucci, M.D., *J. Am. Chem. Soc.*, 1986, 108, 2764の教示に従って、製造することができる。4-アミノピラゾロ[3,4-d]ピリミジン、6-アミノ-4-ヒドロキシピラゾロ[3,4-d]ピリミジン、それらのヌクレオシド、ヌクレオチド及びこの塩基を組み込んだオリゴヌクレオチドは、Kazimierzukら, *J. Am. Chem. Soc.*, 1984, 106, 6479-6382の教示に従って、製造することができる。標的配列に対して相補的になるように予め決定した特定の配列のONDを製造するには、オリゴヌクレオチド合成を当該分野の技術水準に従って行なうことができるのであるが、好ましい方法を以下に記述する。好ましい方法は、既に特許され特許料が納付された出願番号08/090,408号（1993年7月12日出願）の教示を具体化するものである。出願番号08/090,408の明細書は、特に、参考文献として本明細書の一部を構成するものとする。

連結基とは、本複合体のODN部分を小溝結合物質部分に共有結合させる部分をいう。連結基は、その結合が15原子を超えない鎖を介して起こるような基であることが好ましい。また、本発明では、小溝結合物質部分をオリゴヌクレオチドの3'又は5'末端のいずれかに共有結合することが好ましい。しかし、中間位置にあるヌクレオチドへの結合、具体的には中間位置にあるヌクレオチドの複素環式塩基への結合も、本発明の範囲に含まれる。概して、連結基は、アミン官能基のような一方の官能基を例えばODNの5'末端に結合し、カルボニル基(CO)のような他方の官能基を小溝結合物質部分のアミノ基に結合するべく、二官能性分子から誘導される。別法として、アルコール官能基を例えばODNの3'-リン酸末端に結合し、アミノ官能基を小溝結合物質のカルボニル基に結合するべく、連結基をアミノアルコールから誘導してもよい。連結基のさらなる選択肢には、小溝結合物質のカルボニル基にペプチド結合として連結されるアミノカルボン酸に結合したアミノアルコール(3'-リン酸にエステル結合で結合する)が含まれる。したがって、連結基の好ましい態様は、-HN(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>CO、O(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>CO、及び(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>CH(OH)(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>NHCO(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>NHという式を持つ(ここにmに対する制限は、小溝結合物質部分がODNから約15原子分より遠く離れるべきでないということである)。連結基の好ましい態様は、-O(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>NH、-OCH<sub>2</sub>CH(OH)CH<sub>2</sub>NHCOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH、及び-HN(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>COである。上述のように、連結基を小溝結合物質部分の一部として概念化することもできる。その場合、その小溝結合物質部分はODNに

10

20

30

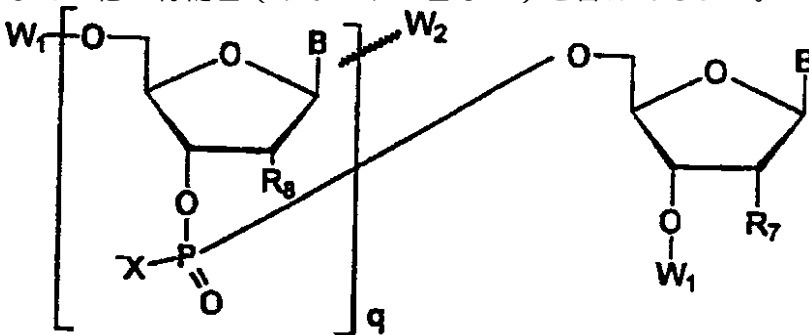
40

50

直接結合していると見なされる。

小溝結合物質部分に関する基本的な制限については上述したとおりであり、特定の化学構造で定義づけることはできない。小溝結合を引き起こす分子構造に加えて、小溝結合物質部分は、それらの機能が小溝結合能を妨害しない限り、付加的な機能を持ってよい。例えば、色、uvスペクトルその他の容易に認識できる物理的又は化学的特徴によってその小溝結合物質を容易に検出できるようにするリポーター基を、小溝結合物質部分に共有結合してもよい。そのようなリポーター基の例は、好ましい態様として  $-\text{HN}(\text{CH}_2)_m\text{COO}(\text{CH}_2)_n\text{S}(\text{CH}_2)_m$ -橋を介して小溝結合物質のカルボニル官能基に結合されるジアゾベンゼン官能基である。ここでも、小溝結合物質が保持するリポーター基その他の官能基を、小溝結合物質部分自体の一部として概念化することができる。

ODN-MGBの好ましい態様は、次の化学式1によって定義される。この定義は、本発明に従って小溝結合物質部分の好ましい態様を含み、それは上述のように連結基の一部又は全部及びその他の付随基（リポーター基など）を含んでもよい。



式1

[式中、

xは0又はSである。

qは3から100までの整数である。

$R_8$ はH、OH、1~6個の炭素を持つアルコキシ、 $O-C_2-C_6$ アルケニル又はFである。

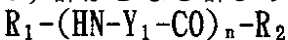
Bは、自然界で核酸中に認められる複素環式塩基、ヒポキサンチン、2-アミノアデニン、2-チオウラシル、2-チオチミン、5- $N^4$ -エテノシトシン、4-アミノピラゾロ[3,4-d]ピリミジン、6-アミノ-4-ヒドロキシ-[3,4-d]ピリミジンからなる群より選択されるアグリコンである。

$W_1$ はH、 $PO(OH)_2$ 又はその塩、又は該オリゴヌクレオチドの3'又は5'末端に結合した小溝結合物質部分（この $W_1$ 基は、小溝結合物質部分をオリゴヌクレオチドに15個以下の原子を介して共有結合させる連結基を含む）である。

$W_2$ は存在しないか、アグリコンBの1つに結合した小溝結合物質部分（この $W_2$ 基は、小溝結合物質部分を該アグリコンに共有結合させる連結基を含む）であるか、若しくは $W_2$ は、架橋官能基を該アグリコンに共有結合させるリンカーアームを含む架橋官能基である。

ここに、小溝結合物質部分とは、二本鎖DNA、RNA又はそれらのハイブリッドの小溝に約 $10^3$ 以上の会合定数で非挿入的に結合する分子量約150~約2000ダルトンの分子のラジカルをいい、該 $W_1$ 基と $W_2$ 基の少なくとも一つは小溝結合物質部分であるものとする。

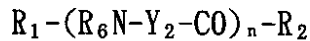
また、連結基を含む小溝結合物質部分は、次に挙げる(a)、(b)、(c)、(d)及び(e)群からなる群より選択される式を持つ。



(a)

( $Y_1$ は、2つの二重結合とN、S及びOからなる群より選択される0~3個のヘテロ原子を持つ5員環を表し、NH基とCO基は、互いに1環原子によって隔てられた2つの環炭素にそれぞれ結合しており、該2つの環炭素間に位置する環原子はHでのみ置換されているか、非置換であり、残りの各環原子は1、2又は3個の $R_3$ 基で置換されていてもよい。)

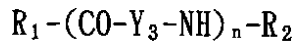




(b)

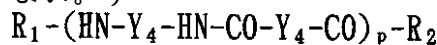
(Y<sub>2</sub>は、1つの二重結合を持つ5員環と縮合した6員芳香環からなる環系であって、その縮合環系はN、S及びOからなる群より選択される0~3個のヘテロ原子を持つ。R<sub>6</sub>N基とCO基のそれぞれは、その縮合環系の異なる環中であって、かつ、1つの共通する橋頭環原子からそれぞれ2番目の環原子である環炭素に結合しており、その結果、CO基とNR<sub>6</sub>基はその縮合環系の一方の側でそれら自身の間には2つの非橋頭環原子を配し、その縮合環系の他方の側に3つの非橋頭環原子を配している。また、その一方の側にある2つの非橋頭環原子はR<sub>7</sub>基で置換されていてもよく、その縮合環系の他方の側にある3つの非橋頭環原子はR<sub>3</sub>基で置換されていてもよい。)

10



(c)

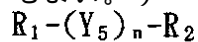
(Y<sub>3</sub>は、0~3個のNヘテロ原子を持つ6員芳香環であり、CO基とNH基のそれぞれは、環炭素に結合している。また、該環炭素は互いに1,4位にあり、その6員環の2つの側のどちらか一方にあつてCO基又はNH基で占有されていない2つの環原子はR<sub>3</sub>基で置換されていてもよく、その6員環の他方の側にあつて占有されていない2つの環原子はR<sub>7</sub>基で置換されていてもよい。)



20

(d)

(Y<sub>4</sub>は、0~3個のNヘテロ原子を持つ6員芳香環であり、CO基とNH基のそれぞれは、環炭素に結合している。また、該環炭素は互いに1,4位にあり、その6員環の2つの側のどちらか一方にあつてCO基又はNH基で占有されていない2つの環原子はR<sub>3</sub>基で置換されていてもよく、その6員環の他方の側にあつて占有されていない2つの環原子はR<sub>7</sub>基で置換されていてもよい。)



(e)

(Y<sub>5</sub>は、1つの二重結合を持つ5員環と縮合した6員芳香族環からなる環系であって、その縮合環系はN、S及びOからなる群より選択される0~3個のヘテロ原子を持つ。R<sub>1</sub>基とR<sub>2</sub>基のそれぞれは、その縮合環系の異なる環中であって、かつ、1つの共通する橋頭環原子からそれぞれ2番目の環原子である環炭素に結合しており、その結果、R<sub>1</sub>基とR<sub>2</sub>基はその縮合環系の一方の側でそれら自身の間には2つの非橋頭環原子を配し、その縮合環系の他方の側に3つの非橋頭環原子を配している。また、その一方の側にある2つの非橋頭環原子はR<sub>7</sub>基で置換されていてもよく、その縮合環系の他方の側にある3つの非橋頭環原子はR<sub>3</sub>基で置換されていてもよい。)

30

ここに、R<sub>1</sub>とR<sub>2</sub>は独立して、H、F、Cl、Br、I、NH<sub>2</sub>、NHR<sub>4</sub>、N(R<sub>4</sub>)<sub>2</sub>、N(R<sub>4</sub>)<sub>3</sub><sup>+</sup>、OH、-O-、-S-、OR<sub>4</sub>、SH、SR<sub>4</sub>、COR<sub>4</sub>、CONHR<sub>4</sub>、CON(R<sub>4</sub>)<sub>2</sub>、R<sub>4</sub>、H<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>CO、CONH<sub>2</sub>、CONHR<sub>4</sub>、H<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>COO(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>S(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>NNC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>、-HN(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>CO、-CONH-、-CONR<sub>4</sub>、-HN(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>COO(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>S(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>NNC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>、及び、-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>CH(OH)(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>NHCO(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>NH-であるか、若しくはR<sub>1</sub>基とR<sub>2</sub>基の一方が存在しない。

40

R<sub>3</sub>は、F、Cl、Br、I、NH<sub>2</sub>、NHR<sub>4</sub>、N(R<sub>4</sub>)<sub>2</sub>、N(R<sub>4</sub>)<sub>3</sub><sup>+</sup>、OH、OR<sub>4</sub>、SH、SR<sub>4</sub>、COR<sub>4</sub>、CONHR<sub>4</sub>、CON(R<sub>4</sub>)<sub>2</sub>及びR<sub>4</sub>からなる群より選択されるか、若しくはR<sub>3</sub>基はY<sub>1</sub>環に縮合した3、4、5又は6員環を形成してもよい。

R<sub>4</sub>は、1~20個の炭素を持つアルキル又はシクロアルキル基、1~20個の炭素と1~3個の二重結合を持つアルケニル又はシクロアルケニル基、炭素25個以下の炭素環式芳香族基、炭素25個以下の複素環式芳香族基、炭素25個以下の炭素環式又は複素環式アリールアルキル基であり、R<sub>4</sub>は1、2又は3個のF、Cl、Br、I、NH<sub>2</sub>、NHR<sub>5</sub>、N(R<sub>5</sub>)<sub>2</sub>、N(R<sub>5</sub>)<sub>3</sub><sup>+</sup>、OH、OR<sub>5</sub>

50

、SH、SR<sub>5</sub>、COR<sub>5</sub>、CONHR<sub>5</sub>、CON(R<sub>5</sub>)<sub>2</sub>又はR<sub>5</sub>基で置換されていてもよい。

R<sub>5</sub>は、1~6炭素のアルキルである。

R<sub>6</sub>はH、1~5炭素のアルキルであるか、又はR<sub>6</sub>とR<sub>7</sub>が一体となって、4、5又は6員環を形成する。この場合、-O-、-S-、-NH-、-NCH<sub>3</sub>-又はN-低級アルキル基が該環の一部であってもよい。

R<sub>7</sub>は、F、メチル又はエチル、-CH<sub>2</sub>-又は-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-である。

mは、1から10までの整数である。

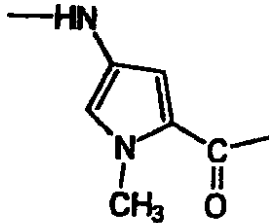
nは、1から10までの整数である。

pは、1から5までの整数である。]

本発明のODN-MBG複合体のさらに好ましい態様は、その小溝結合物質部分が次のように定義されるものである：

10

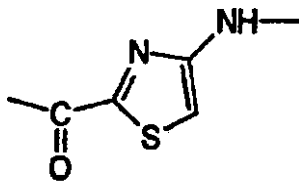
(1) 小溝結合部分が上記式(a)によって表され、その5員環が次式の構造を持つ：



式2

20

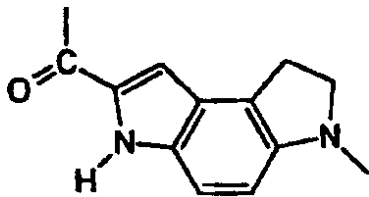
(2) 小溝結合部分が上記式(a)によって表され、その5員環が次式の構造を持つ：



式3

(3) 小溝結合部分が式(b)によって表され、その縮合環系が次式の構造を持つ：

30



式4

#### 架橋官能基を含有する態様

本発明のODN-MGB複合体の好ましい態様的一种は、1又はそれ以上の架橋官能基をも含み、それによって、ODN-MGB複合体がDNA、RNA又はそれらの断片の相補的標的配列に結合した後に、その架橋官能基がその標的と不可逆的に反応して、それとの共有結合を形成する。標的配列に対するこのような共有結合は、ハイブリッド形成プローブの場合は分析、診断用途に有利であり、また治療的(アンチセンス及びアンチジーン)応用にも有利である。標的配列を相補するODNにも共有結合しているこの小溝結合物質部分は、標的配列に対するODN-MGB複合体の初期の非共有結合を高めるので、その架橋官能基による以降の共有結合化が促進される。次に述べる考察は、この種のODN-MGB複合体に組み込まれた架橋官能基又は架橋剤に関する限り、妥当である。

40

本発明に組み込まれる架橋剤は、ODN-MGB上のある部位に共有結合される。その長さや立体的配向は、そのODN-MGBが標的とハイブリッド形成した後に、その標的DNA又はRNA配列中

50

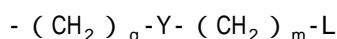
の適当な反応部位に、それが届きうるようにすべきである。定義上、架橋官能基又は架橋剤は、標的DNA又はRNA配列の反応性基と反応する反応性基を持つ。この(又はこれらの)架橋剤は、ODN-MGB複合体の1又はそれ以上の複素環式塩基、糖又は修飾糖残基、リン酸又は修飾リン酸官能基に共有結合させることができる。共有結合剤は、それがその小溝結合能を妨害しない限り、小溝結合物質部分に結合させてもよい。好ましくは、架橋剤又は架橋官能基を複素環式塩基の1つに結合する。

簡単に述べると、架橋剤自体は、概念的に2つの基又は部分、すなわち典型的には(そして好ましくは)求電子脱離基(L)である反応性基と、その脱離基LをODN-MGBの各部位に結合する「アーム」(A)とに分割することができる。脱離基Lは、例えばクロロ、プロモ、ヨード、 $\text{SO}_2\text{R}''$ 又は $\text{S}^+\text{R}''$ 、 $\text{R}''$  (ここに、 $\text{R}''$ と $\text{R}''$ はそれぞれ独立に $\text{C}_{1-6}$ アルキル又はアリールであるか、若しくは $\text{R}''$ と $\text{R}''$ が全体として $\text{C}_{1-6}$ アルキレン橋を形成する)などの基から選択することができる。クロロ、プロモ及びヨードが好ましい。これらの基の中では、 $-\text{COCH}_2$ などのハロアセチル基と、 $-\text{N}[(\text{CH}_2)_2\text{Cl}]_2$ などの二官能性「窒素マスタード」が好ましい。脱離基はその脱離能によって変更されるだろう。不可逆的に結合するプローブに所望の特異性を与えるために、特定の脱離基の性質と反応性によって、個々のケース毎に使用すべき基を選択する。

上述のように、「アーム」(又はリンカーアーム)Aは、概念的には、ODN-MGBを脱離基Lに共有結合し、かつ、その脱離基LをODN-MGBに対して所望の距離と立体的配向に保つ単一物と見なされるが、実際問題としては、二官能性分子を、その第1官能基を介してODN-MGBに、又は小溝結合物質部分を結合する前のODNに(例えばリン酸エステル結合によって3'又は5'末端に、炭素-炭素結合によって複素環式塩基に、又は炭素-窒素結合によってアミノ置換複素環式塩基に)共有結合させると共に、その第2官能基(例えばアミン)を介して、今度は脱離基Lを保持する「ヒドロカルビル橋」(アルキル橋、アルキルアリール橋又はアリール橋など)に共有結合させる合成反応で構築することができる。

したがって、架橋官能基の一般式は、 $-\text{A}-\text{L}$ 又は $-\text{A}-\text{L}_2$ (ここに、Lは上に定義した脱離基であり、AはODN-MGBに共有結合した部分である)となる。このA「アーム」自体は、ODN-MGBと標的配列のハイブリッド形成条件下に、非反応性(脱離基Lによる他は)であるべきで、脱離基Lを所望の立体位置と、所望の反応部位(例えば標的配列中のグアノシン残基のN-7位)から望ましい距離に保つべきである。概して、A基の長さは約2~20炭素の直鎖アルキル鎖の長さに等しくすべきである。

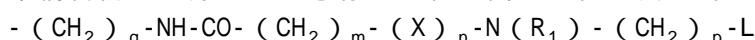
架橋官能基の好ましい態様的一种に関する典型的でより具体的な式は、



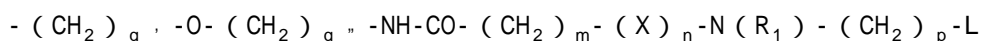
(Lは、上に定義した脱離基である。mとqはそれぞれ独立に0から8まで(両端を含む)である。Yは「機能性連結基」と定義される)

である。ここに記載する架橋剤結合用の機能性連結基は、小溝結合物質部分をODNのどちらかの末端に、或いはODNの中間部分にあるヌクレオチドに結合するためにも使用できるが、記述を明解にするには、この「機能性連結基」は、小溝結合物質部分をODNに結合する「連結基」とは区別すべきものである。「機能性連結基」は、 $(\text{CH}_2)_q$ 橋と $(\text{CH}_2)_m$ 橋を連結することができる2つの官能基、例えば $-\text{NH}_2$ と $-\text{OH}$ 、又は $-\text{COOH}$ と $-\text{OH}$ 、又は $-\text{COOH}$ と $-\text{NH}_2$ を持つ基である。アセチレン末端( $\text{HC} \equiv \text{C}-$ )は後述のようにある種の複素環にカップリングできるので、これもYにとって好適な官能基である。

架橋官能基の好ましい態様的一种に関する他の典型的でより具体的な式は、



と、



(q、m及びLは、架橋官能基の説明に関して上述したように定義される。q'は3から7まで(両端を含む)であり、q''は1から7まで(両端を含む)である。Xはフェニル又は単純な置換フェニル(クロロ、プロモ、低級アルキル又は低級アルコキシ置換フェニルなど)である。nは0から1までであり、pは1から6までの整数である。R<sub>1</sub>はH、低級アルキル又は $(\text{C}_2\text{H}_5)_p-\text{L}$ である。)

10

20

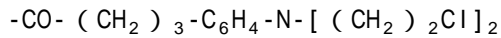
30

40

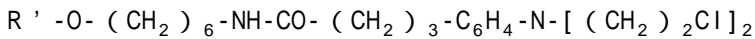
50

である。pは2であることが好ましい。 $-N(R_1)-(CH_2)_2-L$ という構造が一群の強力なアルキル化剤である「窒素マスタード」を表すことは、当業者にはわかるだろう。この種類のODN-MGB複合体の中で特に好ましいものは、架橋剤が $-N(R_1)-(CH_2)_2-L$ (ここにLはハロゲン、好ましくは塩素である)という官能基を含むものである。さらに好ましいものは、架橋剤が $-N[(CH_2)_2-L]_2$ (「二官能性」N-マスタード)という基を含むODN-MGB複合体である。

架橋剤の特に好ましい部分構造は、



という基を含む。好ましい態様として、この架橋基を、ODNの5'及び3'末端にあるn-ヘキシルアミン保持テールに、次の構造式に従って結合する：



(R'は、ODNの末端5'又は3'リン酸基を表す)。

他の末端、又は中間位置にあるヌクレオチドは、小溝結合物質部分を保持する。

他の好ましい態様では、架橋官能基を複素環式塩基(例えばODN-MGB複合体の2'-デオキシウリジル酸構成単位のウラシル部分)に共有結合する。この結合はアミノ基の仲介によって起こりうる。つまり、「アーム-脱離基複合体」(A-L)を、ODNの5'-アミノ-2'-デオキシウリジル酸構成単位のウラシル部分に結合することができる。さらなる好ましい態様では、「アーム-脱離基複合体」(A-L)を、ODNの2'-デオキシウリジン酸構成単位の5位に、炭素-炭素結合によって結合する。5-置換-2'-デオキシウリジン類は、概して、Robinら(Can. J. Chem., 60:554 (1982); J. Org. Chem., 48:1854 (1983))の一般法を適用することによって得られる。この適用により、置換1-アルキンの5-ヨード-2'-デオキシウリジンに対するパラジウム媒介カップリングで、アセチレン結合生成物が得られる。このアセチレンdUrd類似物を、例えばラネーニッケルで還元して飽和化合物を得た後、それを、自動DNA合成装置で使用するための試薬に直接変換する。この方法で5-ヨード-2'-デオキシウリジンとカップリングすることができる試薬の例は、

$HC-CCH_2OCH_2CH_2N(CO)_2C_6H_4$ (フタルイミドエトキシプロピン; phthalimidoethoxypropyne)と $HC-CCH_2OCH_2CH_2NHCOCF_3$ (トリフルオロアセタミドエトキシプロピン)である。

これらの例では、この方法で得られるヌクレオチドを所望のODNに組み込み、各フタル酸(phthalic)又はトリフルオロアセチル遮断基の除去後に、架橋剤のアルキル化部分をその末端アミノ基に結合する。複素環式塩基に架橋剤が結合される他のヌクレオチドの例は、2'-デオキシ-4-アミノピラゾロ[3,4-d]ピリミジン誘導体である。これらの化合物は、公開されたPCT出願WO:90/03370(公開日4/05/90)の教示に従って製造できる。

さらに本発明の修飾ODNの構造を概括的に述べるが、球-棒モデル(ball-and-stick models)と高分解能コンピューターグラフィックスで二本鎖DNAを調べると、プリン7位とピリミジンの5位が、二本鎖核酸のB型二重らせんの主溝にあることが示される。これらの位置は、かなり大きな側鎖で、それら塩基のハイブリッド形成特性を妨害することなく、置換することができる。これらの側鎖は、dThd又はdCydの誘導体化によって、或いはその複素環式塩基の直接的な全合成とそれに続くグリコシル化によって、導入することができる。これらの修飾ヌクレオチドは、自動DNA合成装置でオリゴヌクレオチドに組み込むための適当な活性化ヌクレオチドに変換できる。アデニンの類似物であるピラゾロ[3,4-d]ピリミジン類の場合は、プリン7位と等価なその3位に、架橋アームを結合する。

架橋側鎖(アーム=A)は、プリン7位又は8位、ピリミジン5位、ピロロピリミジン5位又はピラゾロピリミジン3位から主溝を横切って届き、その修飾類似物を含有する塩基対の上(オリゴマー3'側)に位置するプリン(好ましくはグアニン)のN-7と反応するに足る長さを持つべきである。架橋側鎖(アーム=A)は、その塩基が二本鎖錯体内のもう1つの塩基と対を成している時は、その官能基をその塩基から離れた状態に保つ。上述のように、概してアームAは2~20炭素の直鎖アルキル鎖に等しい長さを持つべきである。このアームは、好ましくは、1~12炭素原子のアルキレン基、1又は2個のオレフィン結合と2~12炭素原子のアルケニレン基、1又は2個のアセチレン結合と2~12炭素原子のアルキニレン基、若しくは末端がオキシ、チオ、アミノなどの求核基又は化学的に遮断されたそれらの誘

10

20

30

40

50

導体（トリフルオロアセタミド、フタルイミド、CONR'、NR'CO及びSO<sub>2</sub>NR'など；ここにR' = H又はC<sub>1-6</sub>アルキル）で置換された上記の基を含む。脂肪族又は芳香族アミンを含むこれらの官能基は求核性を示し、典型的架橋官能基の成分として上述した-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-Lや-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-(X)<sub>n</sub>-N(R<sub>1</sub>)-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-Lなどといった基への結合点として機能することができる。

架橋官能基A-L又はその適当な前駆体（-(CH<sub>2</sub>)<sub>q</sub>-NH<sub>2</sub>又は-(CH<sub>2</sub>)<sub>q</sub>-Y基など；YはNH<sub>2</sub>などの求核基で終わる）を保持するヌクレオシド又はヌクレオチドを製造した後、さらに、当該分野の技術水準に従って、本発明の修飾オリゴヌクレオチドの製造を進めることができる。したがって、オリゴヌクレオチドを製造するには、そのヌクレオシド又はヌクレオチド上に保護基を導入し、オリゴヌクレオチド合成で使用するためにその化合物を活性化

10

する。保護活性型への変換は、いくつかの総説で2'-デオキシヌクレオシドについて詳細に記述されている手法に従って行なうことができる。Sonveaux, *Bioorganic Chemistry*, 14:274-325 (1986)；Jones, 「*Oligonucleotide Synthesis, a Practical Approach*」 M.J. Gait編, IRL Press, 23-34頁 (1984) を参照のこと。

この活性化ヌクレオチドは、DNAヌクレオチド及びRNAヌクレオチドの場合と類似の方法でオリゴヌクレオチドに組込まれ、正しいヌクレオチドが順番に連結されて標的DNA又はRNA中のヌクレオチドの配列に相補的なヌクレオチドを鎖を形成する。ヌクレオチドは酵素的に組込んでよいし、化学合成によって組込んでよい。「*Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*」(上記)に記載の手法に従って、ヌクレオチドを、その5'-O-

20

ジメトキシトリチル-3'-(N,N-ジイソプロピル)ホスホルアミダイトシアノエチルエステル誘導体に変換し、合成オリゴヌクレオチドに組込んでよい。次に、そのN-保護基を他のオリゴヌクレオチド遮断基と共に、合成後アミノリシスによって、当該技術分野で広く知られる手法で除去する。

好ましい態様として、本活性化ヌクレオチドを自動DNA合成装置で、使用する合成装置の手法と指示に従って直接使用してもよい。本オリゴヌクレオチドは、標準的な市販のホスホルアミダイト又はH-ホスホン酸化学を用いる合成装置で製造できる。

ハロアシル基や-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-(X)<sub>n</sub>-N(R<sub>1</sub>)-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-L基（さらに好ましくはCO-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-N[CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Cl]<sub>2</sub>）のような脱離基を含有する部分は、オリゴヌクレオチドへの組込みと遮断基の除去後に、アミノアルキルなどのテール(-(CH<sub>2</sub>)<sub>q</sub>-Y)に付加することができる。

30

架橋剤(A-L部分)を、例えば式-(CH<sub>2</sub>)<sub>q</sub>-Y(Yはアミンで終わる)のアルキルアミン結合によって、オリゴヌクレオチドの3'又は5'末端に結合する場合は、オリゴヌクレオチド合成を行なって先ず該アミノアルキルテールを持つオリゴヌクレオチドを得た後、それに上記ハロアシル基や-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-(X)<sub>n</sub>-N(R<sub>1</sub>)-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-Lなどのアルキル化部分を導入することができる。

ヌクレオチド塩基の1つに結合した架橋剤を持つODN-MGB複合体の典型的な好ましい態様は、次式によって示される：



(下線を付した記号「U」(この50マー中26番目のヌクレオチド単位)は、アミノ基に結合したクロラムブシル残基を持つ5-(3-アミノプロピル)-2'-デオキシウリジンを表す)。記号「CDPI<sub>3</sub>」は、反応式1に関して後述する小溝結合物質部分を表す。この5-(3-アミノプロピル)-2'-デオキシウリジン成分は、Gibson, K.J.及びBenkovic, S.J. (1987) *Nucleic Acids Res.* 15, 6455の手法に従い、5'-O-トリチル-5-トリフルオロアセタミドプロピル-2'-デオキシウリジン3'-(N,N-ジイソプロピル-シアノエチル-ホスホルアミダイトを用いて、ODNに組込まれる。クロラムブシル残基と小溝結合物質部分は、下記実験項に記述するようにODNに導入される。

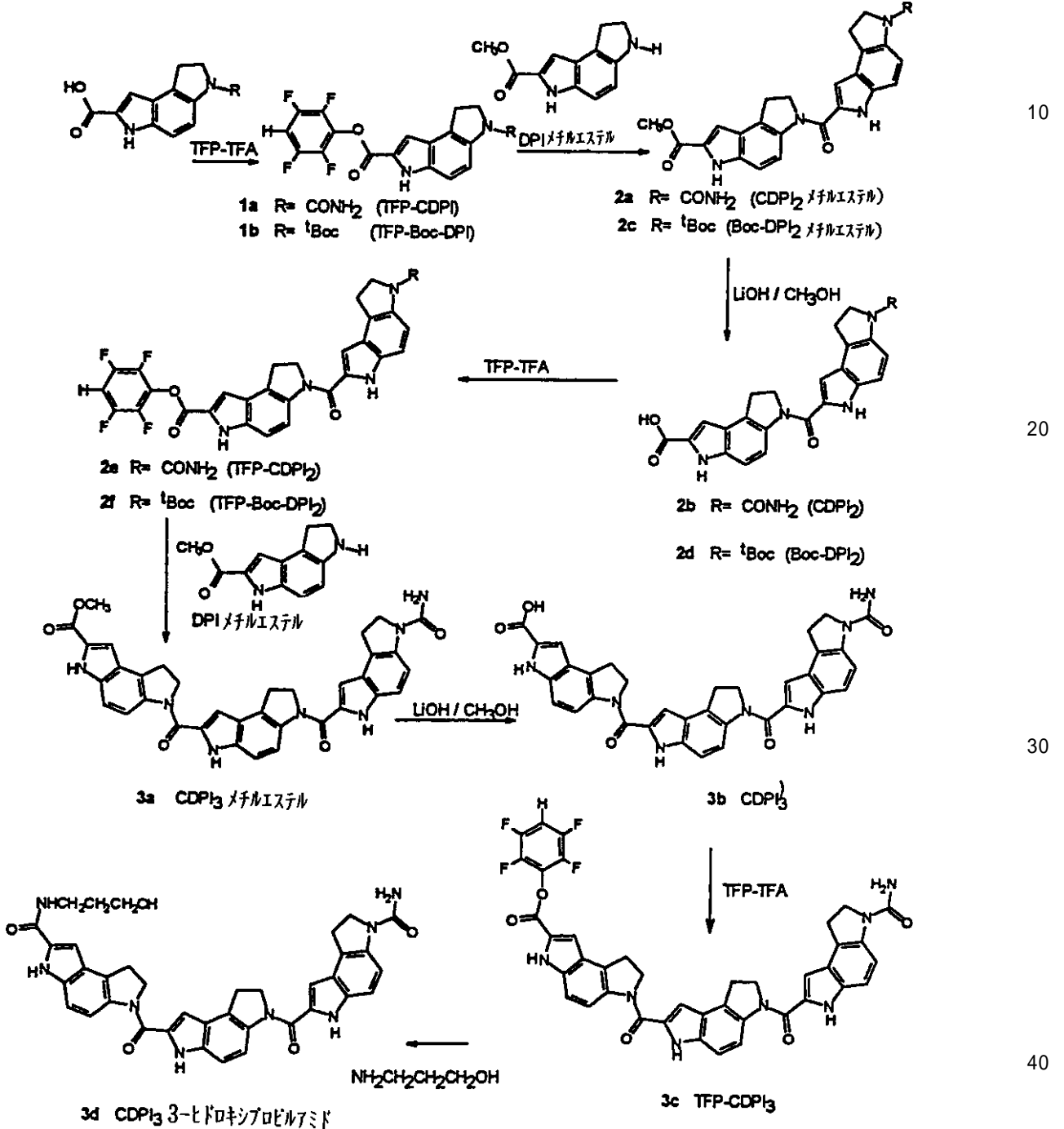
40

#### 小溝結合物質部分とODN-MGB複合体の合成

本発明の小溝結合物質部分の現在最も好ましい態様は、1,2-ジヒドロ-3H-ピロロ[3,2-e]インドール-7-カルボン酸(CDPI)から、並びに4-アミノ-N-メチルピロール-2-カルボン

50

酸から誘導される「オリゴペプチド」である。これらは、それぞれ式2及び式4に示す構造の繰り返し単位を持つ合成ペプチドであり、そのペプチドの重合度 (m) は好ましくは3から5まで、最も好ましくは式2のペプチドについて5、式4のペプチドについて3である。反応式1は、「CDPI<sub>3</sub>」と略記される特殊なトリペプチドの製造法を開示している。次いで、このトリペプチドを、わずかな修飾を加えて若しくは修飾することなく、ODNにカップリングすることにより、本発明ODN-MGBの好ましい態様を得ることができる。



#### 【反応式1】

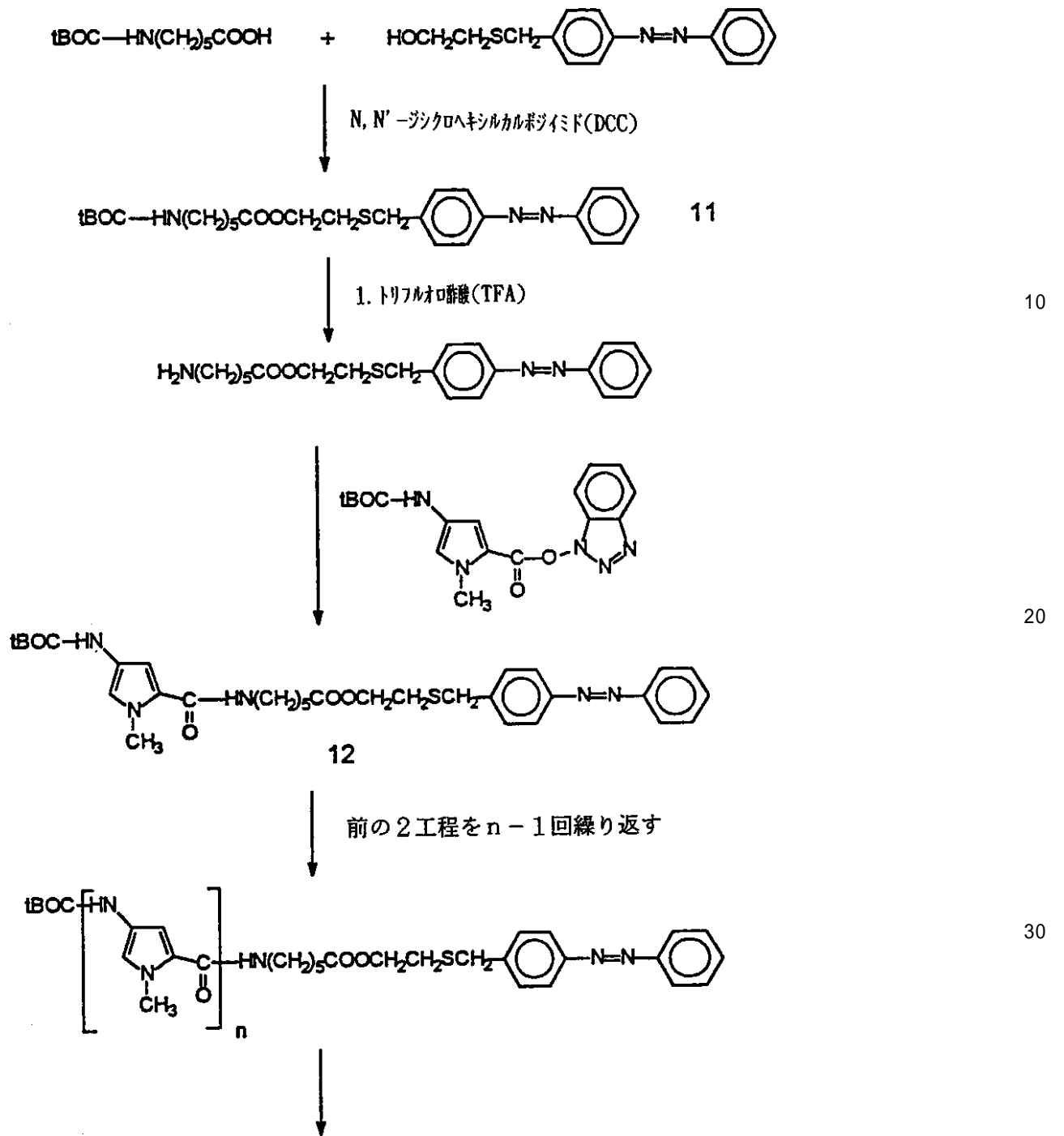
従って、反応式1を参照すると、この合成反応式における出発物質は、化学文献 (D.L. Bo ger, R.S. Coleman, および B.J. Invergo, J. Org. Chem., 1987, Vol. 52, 1521-1530) によって製造することができる3-カルバモイル-1,2-ジヒドロ-3H-ピロロ[3,2-e]インドール-7-カルボン酸または3-t-ブチルオキシカルボニル-1,2-ジヒドロ-3H-ピロロ[3,2-e]インドール-7-カルボン酸である。出発化合物は、トリフルオロ酢酸のテトラフルオロフェニルエステルで処理することによって、活性エステルに変換される (TFP-TFA)。反応式に示される化合物1aにおいては、R基はCON

H<sub>2</sub>であり、1 bにおいては、Rはt-ブチルオキシカルボニル(<sup>t</sup>Boc)である。t-ブチルオキシカルボニル(<sup>t</sup>Boc)基は、酸によって除去することができるアミノ官能基の既知の保護基である。得られる活性エステル1 aおよび1 bを、メチル 1,2-ジヒドロ-3H-ピロロインドール-7-カルボキシレート(これも化学文献によって得られる。D.L.Boger, R.S.Coleman、およびB.J. Invergo. J. Org. Chem., 1987, Vol. 52, 1521-1530を参照)と反応させて、「ダイマー」ペプチド化合物2 aおよび2 cを得る。カルボキシル官能基のメチル基を、塩基で処理することによって除去して、カルボン酸基が遊離している「ダイマー」ペプチドを得る。このダイマーを再び活性化して、テトラフルオロフェノールで活性エステルを形成する(R = CONH<sub>2</sub>、TFP-CDPI<sub>2</sub>のとき2 e; および、R = <sup>t</sup>Boc、TFP-<sup>t</sup>Boc-CDPI<sub>2</sub>のとき2 f)。TFP-TFAで活性化した後に、ダイマーの活性エステルを、対応するトリマーに関して下記に記載するように、ODN-MGB複合体を形成するのに使用することができる。ダイマーペプチドの活性エステルは、メチル-1,2-ジヒドロ-3H-ピロロインドール-7-カルボキシレートのさらに別の分子と反応して、そのカルボン酸官能基がメチルエステルとして保護されている「トリマーペプチド」、3 a (メチル3-カルバモイル-1,2-ジヒドロ-3H-ピロロ[3,2-e]インドール-7-カルボキシレートトリマー)を形成することもできる。塩基で処理することによってメチル基を除去し、得られる「トリマーペプチド」3 bを、活性テトラフルオロフェニルエステル3 c、(2,3,5,6-テトラフルオロフェニル 3-カルバモイル-1,2-ジヒドロ-3H-ピロロ[3,2-e]インドール-7-カルボキシレートトリマー、TFP-CDPI<sub>3</sub>)に再び変換する。活性テトラフルオロフェニルエステル3 cを用いて、メチル 1,2-ジヒドロ-3H-ピロロインドール-7-カルボキシレートとの反応の段階を繰り返し、得られるメチルエステルを鹸化し、および所望であれば、TFP-TFAと再び反応させて、4CDPI成分を組み込むペプチドの活性テトラフルオロフェニルエステルを形成することによって、ペプチド鎖をさらに長くすることができる。容易に理解されるように、これらの段階は、所望の数のCDPI成分がペプチドに含まれるまで、さらに繰り返すことができる。本明細書に記載の好ましい具体例においては、ODNと結合してODN-MGBを形成するために、または反応式4および5に関して下記に記載のように、適切な改質制御孔ガラス(CPG)固体サポート(asuitable modified controlled pore glass (CPG) solid support)においてODN-MGBを合成するために、トリペプチド3 cの活性テトラフルオロフェニルエステル(TFP-CDPI<sub>3</sub>)が使用される。反応式1は、その最後の段階として、トリペプチド3 cの活性テトラフルオロフェニルエステル(TFP-CDPI<sub>3</sub>)からの、ヒドロキシプロピルアミド誘導体の製造を示している。トリペプチド3 dのヒドロキシプロピルアミド誘導体(3-カルバモイル-1,2-ジヒドロ-3H-ピロロ[3,2-e]インドール-7-カルボキシ]-1-アミド-3-プロパノールトリマー、CDPI<sub>3</sub>-3-ヒドロキシプロピルアミド)を、ODNとの結合に用いて、本発明のODN-MGBを得ることができる。しかし、トリペプチド3 dは、下記に記載される結合試験において、対照標準として、「フリースタンディング」小溝結合物質分子("free standing" minor groove binder molecule)としても用いられた。

10

20

30

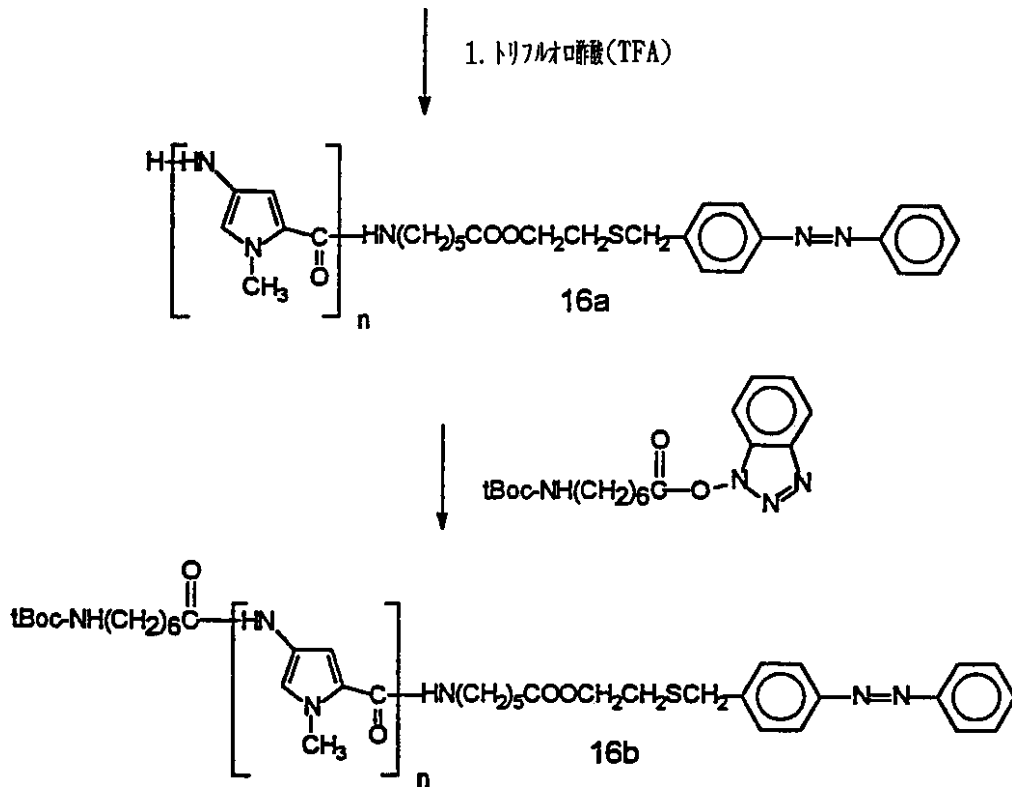


10

20

30





10

20

## 【反応式 2】

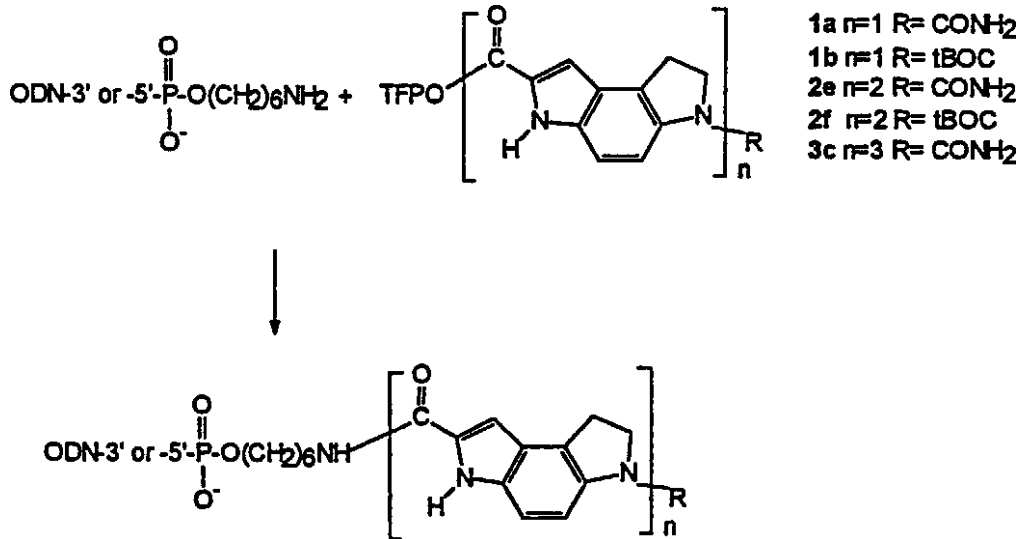
反応式 2 を参照すると、小溝結合物質ペプチドの他の好ましい具体例の合成が示されており、ここで、「モノマー」は 4 - アミノ - N - メチルピロール - 2 - カルボン酸の残基であり、この具体例はジアゾベンゼン成分を含有するリポーター基も担持している。従って、この反応式によって、6 - [ ( *t* - ブチルオキシ ) カルボキシアミド ] ヘキサン酸が、N, N - ジシクロヘキシルカルボジイミドの存在下に、2 - [ 4 - ( フェニルアゾ ) ベンジルチオ ] エタノールと縮合して、( 2 - [ 4 - ( フェニルアゾ ) ベンジルチオ ] エチル 5 - [ ( *t* - ブチルオキシ ) カルボキシアミド ] ペンチルカルボキシレート、11) を形成する。<sup>t</sup>Boc 保護基を、トリフルオロ酢酸 ( TFA ) で処理することによって化合物 11 から除去し、結果として得られる遊離アミノ官能基を有する化合物を、<sup>t</sup>Boc 保護 4 - アミノ - N - メチルピロール - 2 - カルボン酸の活性エステルと反応させる。前記活性エステル化合物 ( 1, 2, 3 - ベンゾトリアゾール - 1 - イル 1 - メチル - 4 - ( *t* - ブチルオキシ ) カルボキシアミド - ピロール - 2 - カルボキシレート ) は、L.Grehn, V. Ragnarsson, *J. Org. Chem.*, 1981, 46, 3492-3497 に記載の方法によって得られる 1 - メチル - 4 - [ *t* - ブチルオキシ ) カルボキシアミド ] ピロール - 2 - カルボン酸から形成される。得られる 2 - [ 4 - ( フェニルアゾ ) ベンジルチオ ] エチル 5 - [ 1 - メチル - 4 - ( *t* - ブチルオキシ ) カルボキシアミド ] ピロール - 2 - カルボキシアミド ] ペンチルカルボキシレート、12 は、ジアゾベンゼン成分を担持するリポーター基に結合した「2 - アミノ - N - メチルピロールカルボン酸」残基のモノマーの 1 単位を有する。トリフルオロ酢酸を用いて <sup>t</sup>Boc 保護基を除去した後、所望の数のモノマー残基を含有するペプチドが得られるまで、1, 2, 3 - ベンゾトリアゾール - 1 - イル 1 - メチル - 4 - ( *t* - ブチルオキシ ) カルボキシアミド - ピロール - 2 - カルボキシレートの 1 分子またはそれ以上との結合を行うことができる。n 個のモノマーおよび遊離アミノ基を有するそのような化合物が、反応式 2 に 16 a として示されている。化合物 16 a を、<sup>t</sup>Boc 保護 6 - アミノヘキサン酸の活性エステル ( 例えば、1, 2, 3 - ベンゾトリアゾール - 1 - イル活性エステル ) と反応させて、反応式 2 において化合物 16 b として示されるオリゴペプチドを得ることができる。<sup>t</sup>Boc 保護基は、酸性条件下において前記化合物から除去することができ、結果として得られる遊離アミノ官能基を有する誘導体を、従来の合成法によって、ODN の 3' - ホスフェートまたは 5' - ホスフェート末端のどちらかに結合させる

30

40

50

ことができる。または、下記に示すような種々の二官能価の結合基を用いて、遊離アミノ官能基を有する誘導体を、オリゴヌクレオチドの3'または5'-OH末端に結合させることもできる。



10

### 【反応式3】

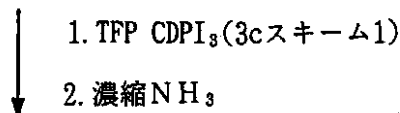
反応式3を参照すると、3'-アミノ末端または5'-アミノ末端ODNと、テトラフルオロフェニル(TFP)エステルで活性化された例示的小溝結合オリゴペプチドとを結合させる一般的な方法が示されている。この反応式は、反応式1によって得られるTFPで活性化された例示的小溝結合化合物の使用を示しているが、この一般的な方法は、他のTFP活性化小溝結合化合物とODNとの結合にも適している。反応式3における1a~3cの符号は、反応式1によって得られる例示的化合物を意味している。

20

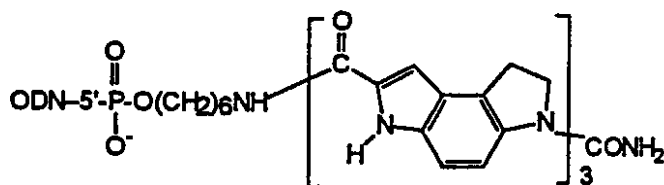
3'-または5'-アミノ末端ODNは、従来法によって合成することができ、例えば、商業的に入手可能なN-モノメトキシトリチルアミノヘキシルホスホロアミダイト(N-monomethoxytritylaminoethyl phosphoramidite)を用いることによって、ODNのどちらかの末端にアミノヘキシル残基を結合させることができる。または、すでに許可され登録料が支払われた1993年7月12日出願の出願第08/090408号に記載の方法によって、アミノ末端ODNを合成することもできる。出願第08/090408号に記載の内容は、本発明の開示の一部を構成するものとする。この反応式によればアミノ末端ODNがセチルトリメチルアンモニウム塩に変換されて、それを有機溶媒中において可溶性にし、テトラフルオロフェニルエステル活性小溝結合物質分子が、好ましくは溶媒としてのDMSO中で、それと縮合する。

30

### 5'-アミノ末端ODNを持つCPG



40

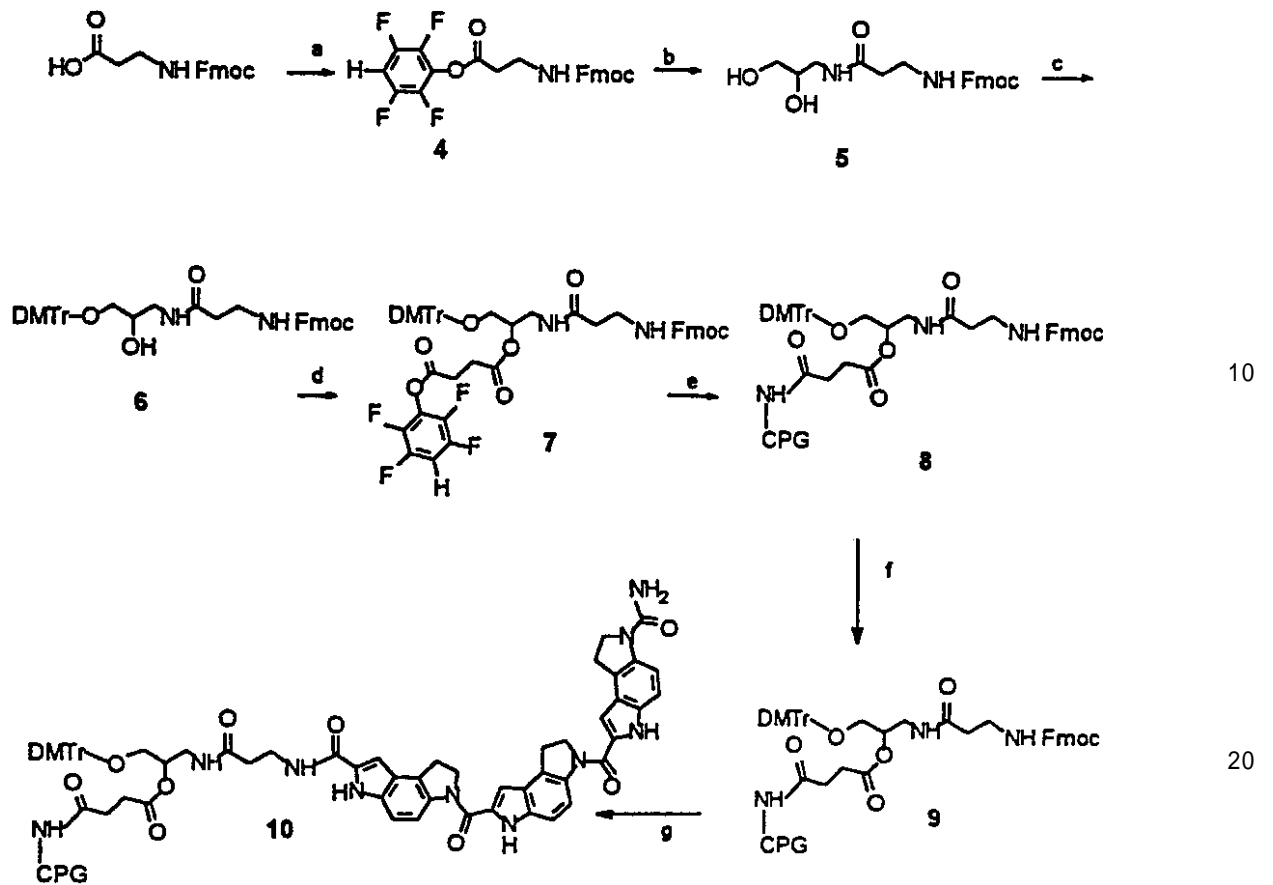


### 【反応式4】

反応式4は、小溝結合物質分子の活性エステルを、5'-アミノ末端ODNに結合させる

50

他の方法を開示している。この反応式に示されている例は、3 - カルバモイル - 1, 2 - ジヒドロ - 3 H - ピロロ [ 3, 2 - e ] インドール - 7 - カルボン酸残基から誘導されるトリペプチドのTFPEステル (TFPE - CDPI<sub>3</sub>) の例であるが、本反応式に関して開示されている一般原理は、他の小溝結合物質分子にも用いることができると理解すべきである。この方法においては、ODNがなおCPGサポートに結合しており、その「アミノ末端」に遊離アミノ基を有している。これは、前記のN - モノメトキシトリチルアミノヘキシルホスホロアミダイトを用いることによって得られる。モノメトキシトリチル基が、ホスホロアミダイトが結合した後に除去されて、所望のCPG担持「アミノ末端ODN」を得る。または、そのようなCPG - は、前記出願第08/090408号の開示およびその中の引用文献に従って得ることができる。簡単に言えば、ODNが、段階的に合成されてCPGに結合され、9 - フルオレニルメトキシカルボニル (Fmoc) 基で保護されたアミノ基を有する末端を有する。ヌクレオチドの所望の配列が形成された後に、ODNはなおCPGサポートに結合しているままにして、Fmoc基をアミノ基から除去する。本発明の反応式4によって、遊離アミノ基を有するこの「CPG担持アミノ末端ODN」を、活性エステル (TFPE - CDPI<sub>3</sub>, 3c)、または小溝結合物質の同様の活性形と、縮合させる。その後、ODB - MGB複合体を、従来法によって、最も好ましくはアンモニアでの処理によって、CPGサポートから除去する。



\*試剤：(a) TFP-TFA、 $\text{Et}_3\text{N}$ 、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ；(b) 3-アミノ-1,2-プロパンジオール、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ；(c) DMTrCl、ピリジン；(d) 無水琥珀酸、*N*-メチルイミダゾール、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 、TFP-TFA；(e) アルキルアミンCPG、ピリジン；(f) ピペリジン、DMF；(g) TFP-CDPIs (3c 反応式1)、DMF。

【反応式5】

反応式5は、本発明のODN-MGBを製造する他の好ましい方法を示している。特に、反応式5は、初めに結合分子をCPGサポートに結合させ、その後に小溝結合物質の活性形態を結合分子に結合させ、その後に前記改質CPGサポートを用いて、自動ODN合成装置中で所望配列のODNを段階的に形成することによって、ODN-MGBを製造する好ましい合成方法を示している。ODN-MGB複合体は、所望の配列のODN成分が形成された後にのみ、CPGサポートから除去される。この場合の結合分子は、各官能基が異なる反応性を有する三官能価分子であり、これによって、結合分子の異なる官能価をそれぞれ用いる、CPGへの結合、小溝結合物質成分の活性形態との反応、およびODN部分の形成が可能となる。この合成方法およびこの方法において用いられる三官能価結合分子についてのより一般적および詳細な説明が、出願第08/090408号に開示されているが、小溝結合物質に関しては何らの記載もされていない。反応式5は、三官能価結合

10

20

30

40

50

分子としての -アラニル - 3 - アミノ - 1, 2 - プロパンジオール、および小溝結合物質の活性形態としての T F P - C D P I<sub>3</sub> (化合物 3 c) の例を用いて、この合成法を例示している。

従って、反応式 5 によれば、F m o c 保護 - アラニンが、テトラフルオロフェニルトリフルオロアセテート ( T F P - T F A ) と反応して、2, 3, 5, 6 - テトラフルオロフェニル 3 - [ N - ( 9 - フルオレニルメトキシカルボニル ) ] アミノプロピオネート ( 4 ) を得る。活性エステル 4 が、3 - アミノ - 1, 2 - プロパンジオールと反応して、1 - [ 3 - [ N - ( 9 - フルオレニルメトキシカルボニル ) アミノ ] - 1 - オキソプロピル ] アミノ - ( R, S ) - 2, 3 - プロパンジオール ( 5 ) を得る。その後、5 の第一ヒドロキシル基が、ジメトキシトリチル基で保護されて、1 - [ 3 - [ N - ( 9 - フルオレニルメトキシカルボニル ) アミノ ] - 1 - オキソプロピル ] アミノ - ( R, S ) - 2 - [ [ ビス ( メトキシフェニル ) フェニルメトキシ ] メチル ] - 2 - エタノール ( 6 ) が得られる。化合物 6 の第二ヒドロキシル基が無水琥珀酸と反応し、その後、得られる化合物のカルボキシル基が、活性エステル、2, 3, 5, 6 - テトラフルオロフェニル 1 - [ 3 - [ N - ( 9 - フルオレニルメトキシカルボニル ) アミノ ] - 1 - オキソプロピル ] アミノ - ( R, S ) - 2 - [ [ ビス ( メトキシフェニル ) フェニルメトキシ ] メチル ] - 2 - エチルブタンジオエート ( 7 ) に変換される。化合物 7 を次に、商業的に入手可能であり、前記出願第 0 8 / 0 9 0 4 0 8 号に記載の、長鎖アミノアルキル制御孔ガラスサポート ( L C A A - C P G、またはアルキルアミン C P G ) に結合させる。得られる「改質 C P G」は、反応式 5 において化合物 8 として示されている。緩塩基 ( ジメチルホルムアミド中のピペリジン ) で処理することによって、F m o c 保護基を 8 から除去して、結合分子の一部として遊離第一級アミン官能基を有する「改質 C P G」9 を得る。次の段階において、活性小溝結合物質分子、この場合は T F P - C D P I<sub>3</sub> (化合物 3 c) を、9 の第一級アミン官能基と反応させて、小溝結合物質成分を含み、ジメトキシトリチル基で保護された結合基の第一ヒドロキシル基をなお有している改質 C P G 10 を得る。反応式 5 には示されていないが、次の段階で、ジメトキシトリチル基を除去し、現在この分野において慣習的であるとされている段階によって、ODN 合成を自動合成装置中で行う。合成が終了したら、ODN - M G B 複合体を、アンモニアでの処理によって、C P G サポートから除去する。前記段階は、3 - アミノ - 1, 2 - プロパンジオール成分の第二ヒドロキシル基を C P G サポートに結合させている結合を開裂させる。

#### 生物学的試験および考察

ODN - M G B 複合体が、一本鎖 DNA に結合する。それらはリコンビナーゼ酵素 ( recombinase enzyme ) の存在下に二本鎖 DNA にも結合し、ある場合には、一本鎖 RNA ならびに DNA および RNA ハイブリッドにも結合する。しかし、ODN 成分が、標的 DNA または RNA の標的配列に対して、相補的である、または Watson-Crick 意義において実質的に相補的である場合にのみ、結合が起こる。この条件が満たされるとき、ODN - M G B の標的配列への結合は、同じ ODN の小溝結合物質なしの結合よりも、かなり強い。前述のことは、下記に記載の試験によって明らかにされ、標的 DNA または RNA 配列のための分析的および診断的ハイブリッド形成プローブとしての、および治療的アンチセンス ( antisense ) およびアンチジーン ( anchi-gene ) 用途においての、本発明の ODN - M G B 複合体の有用性を与えるものである。

表1

インターカレーター (intercalators)、またはODN<sup>a</sup>の3'-末端に結合したオリゴ(1-メチル-2-カルボキシ-4-アミノ)ピロール残基、を担持する(dAp)<sub>8</sub>+(dTp)<sub>8</sub>二本鎖のT<sub>m</sub>のデータ。

複合体		T <sub>m</sub>	ΔT <sub>m</sub> <sup>b</sup>
(dAp) <sub>8</sub> +(dTp) <sub>8</sub>		21.1	-
(dAp) <sub>8</sub> +(dTp) <sub>8</sub> +ディスタマイシンA <sup>c</sup>		47.1	26.0
(dAp) <sub>8</sub> +(dTp) <sub>8</sub> -X <sub>m</sub>	m=2	39.4	18.3
	m=3	51.7	30.6
	m=4	60.2	39.1
	m=5	65.4	44.3
(dTp) <sub>8</sub> +(dAp) <sub>8</sub> -X <sub>m</sub>	m=2	29.1	8.0
	m=3	39.0	17.9
	m=4	42.7	21.6
	m=5	52.6	31.5
(dAp) <sub>8</sub> -Y+(dTp) <sub>5</sub>		30.5	9.4
(dAp) <sub>8</sub> -Y+(dTp) <sub>8</sub> -Y <sup>d</sup>		42.9	21.8

<sup>a</sup> 示されているパラメーターは少なくとも3つの試験の平均である。光学溶融は、0.2M NaCl、0.1mM EDTA、0.01M (±0.1℃) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>において、pH7.0、[(dTp)<sub>8</sub>·(dAp)<sub>8</sub>]=2.5·10<sup>-5</sup>Mで行われた。

<sup>b</sup> 改質二本鎖と未改質二本鎖とのT<sub>m</sub>における差。

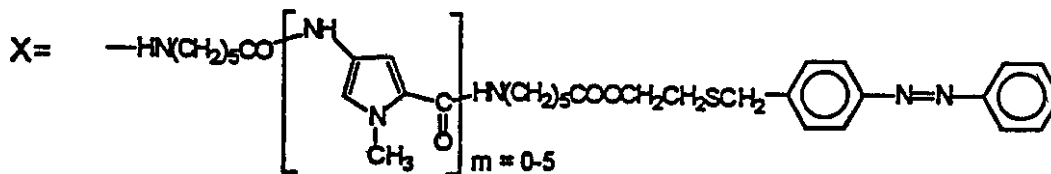
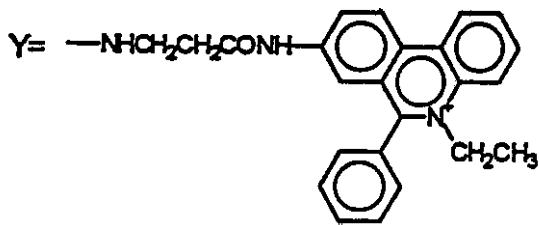
<sup>c</sup> ディスタマイシンAの濃度は、2.5·10<sup>-5</sup>Mであった。

<sup>d</sup> エチジウムブロミド(EtBr)を、ref12の方法によって、その8-NH<sub>2</sub>位によって、β-アラニンリンカーを介して、ODNの3'-末端ホスフェートに共役結合させた。

10

20

30



10

表1は、4 - アミノ - N - メチルピロール - 2 - カルボン酸残基から誘導される小溝結合物質成分を有する相補的オリゴヌクレオチドから形成されるいくつかの複合体の溶融温度を示す。小溝結合物質成分は特に、表1の下式によってラジカルXとして示されている。ラジカルXが、6 - アミノヘキサン酸から誘導される結合成分をも含むことに注意すべきである。ここで使用されるオリゴヌクレオチドは、2' - デオキシアデニル酸の8 - マー、およびチミジル酸の8 - マーである。小溝結合物質Xを、3' - ホスフェート末端においてODNに結合させ、これらのODNの5' - 末端はホスフェートを有していない。これに関して、ODNが、これらおよび他の表において、この分野において慣習的な方法で、略されていることに注意すべきである。基Yは、「 - アラニン」結合成分を介して、3' - ホスフェートに結合したエチジウムブロミド成分を表す。Y基は、挿入基 (intercalating group) を表し、小溝結合基との比較のための対照標準としての役割を持つ。記号mは、表の各ODN - MGB中に存在する4 - アミノ - N - メチル - ピロール - 2 - カルボン酸残基の数を表す。

20

この分野において既知であるように、オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド二本鎖の溶融温度 ( $T_m$ ) は、それぞれのオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの50%がその二本鎖、Watson Crick水素結合形から解離する温度であると意義される。溶融温度 ( $T_m$ ) が高ければ高いほど、より安定な二本鎖を意味する。既知であるように、オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの溶融温度は、溶融温度が測定される溶液中のヌクレオチドの濃度に依存し、より高い濃度は、より高い測定溶融温度となる。これらの表に示されている溶融温度は、表および試験部門に示されている条件下で測定された。 $T_m$  は、小溝結合物質成分を有さない ( $dAp$ )<sub>8</sub> · ( $dTp$ )<sub>8</sub> 複合体の溶融温度に対する、改質二本鎖の溶融温度の変化を表す。

30

表1から分かるように、共有結合小溝結合物質成分は、基X (小溝結合物質成分) が ( $dTp$ )<sub>8</sub> または ( $dAp$ )<sub>8</sub> オリゴヌクレオチドのどちらかに結合していても、複合体の安定性 (溶融温度  $T_m$ ) を顕著に増加させる。この場合、最大安定性 (最高溶融温度) は、小溝結合物質成分が、5 - マーオリゴペプチドであるときに得られる。挿入基Yが ( $dAp$ )<sub>8</sub> オリゴマーに結合される比較試験においては、比較的かなり低い程度の安定性が得られる。この試験において、挿入基Yをオリゴマーの2本の鎖のそれぞれに結合させても、5個の4 - アミノ - N - メチルピロール - 2 - カルボン酸残基を有する小溝結合物質成分よりも少なく溶融温度を上昇させる。

40

表2

0.2M NaCl、0.01M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.1mM EDTA (pH7.0)における、ヘキサデカン、オクタチミジレート、および、ポリデオキシリボアデニル酸を用いたそれらのオリゴ(1-メチル-2-カルボキシ-4-アミノ)ピロール誘導体によって形成される二本鎖のT<sub>m</sub>のデータ。Xは表1と同様である。

オリゴ誘導体		T <sub>m</sub> °C	ΔT <sub>m</sub> °C
(dTp) <sub>16</sub>		48.5	-
(dTp) <sub>16</sub> -NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> COOH		49	0.5
(dTp) <sub>16</sub> -X	m=1	49.3	0.8
	m=2	55.6	7.1
	m=3	61	12.5
	m=4	66	17.5
	m=5	68	19.5
(dTp) <sub>8</sub>		28	-
(dTp) <sub>8</sub> -X	m=1	28	0
	m=2	40	12
	m=3	52	24
	m=4	60	32
	m=5	66	38

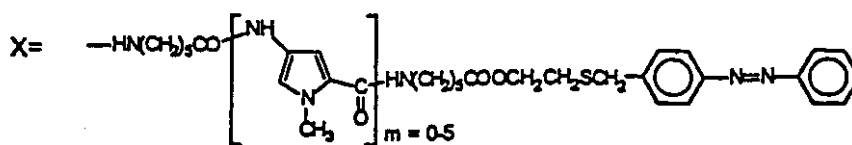


表2は、表1と同様の情報を示している。この表に示されている試験においては、X(Xは表1と同様である)によって表される小溝結合物質成分を有するチミジル酸の16-マーODNが、ポリデオキシリボアデニル酸と複合された。比較対照標準として、その3'-ホスフェート末端において6-アミノヘキサン酸に結合したチミジル酸の16マーODN(dTp)<sub>16</sub>も試験した。さらに、チミジル酸の8-マー(dTp)<sub>8</sub>、および種々のペプチド長さの小溝結合物質とそれとの複合体も試験した。これらの試験においても、ODNに結合した小溝結合物質が、ODN-MGBと相補DNA鎖との間の複合の有意な安定を生じさせる。最大の安定化は、小溝結合物質成分中の4-アミノ-N-メチルピロール-2-カルボン酸残基の数が5である場合に生じる。これと対照的に、16-マーODN上のアミノヘキサン酸末端は、事実上、複合体の安定化を生じさせない。



表 3

C D P I<sub>1-3</sub>およびB o c D P I<sub>1-2</sub>リガンド<sup>a</sup>に末端的に結合した(Tp)<sub>8</sub>鎖を有するポリ(dA)およびポリ(rA)によって形成される二本鎖の溶融温度(°C)。

オクタチミジレート誘導体	ポリ(dA)		ポリ(rA)	
	T <sub>m</sub>	ΔT <sub>m</sub>	T <sub>m</sub>	ΔT <sub>m</sub>
(dTp) <sub>7</sub> dTp-L1	25	-	13	-
(dTp) <sub>7</sub> dTp-L1-X m=1	34	9	18	5
(dTp) <sub>7</sub> dTp-L1-X m=2	50	25	- <sup>b</sup>	-
(dTp) <sub>7</sub> dTp-L1-X m=3	68(65)	43(40)	32(31)	19(18)
(dTp) <sub>7</sub> dTp-L1-Y m=1	26	1	12	-1
(dTp) <sub>7</sub> dTp-L1-Y m=2	43	18	17	4
L1-pdT(pdT) <sub>7</sub>	24	-	12	-
X-L1-pdT(pdT) <sub>7</sub> m=1	31	7	14	2
X-L1-pdT(pdT) <sub>7</sub> m=2	49	25	- <sup>b</sup>	-
X-L1-pdT(pdT) <sub>7</sub> m=3	68	44	35	23
Y-L1-pdT(pdT) <sub>7</sub> m=1	23	-1	9	-3
Y-L1-pdT(pdT) <sub>7</sub> m=2	41	17	19	7

<sup>a</sup> 括弧内のデータは、リンカーL2での誘導体に関して得た。

<sup>b</sup> 溶融転移は観察されなかった。

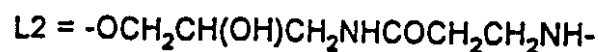
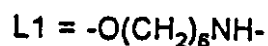
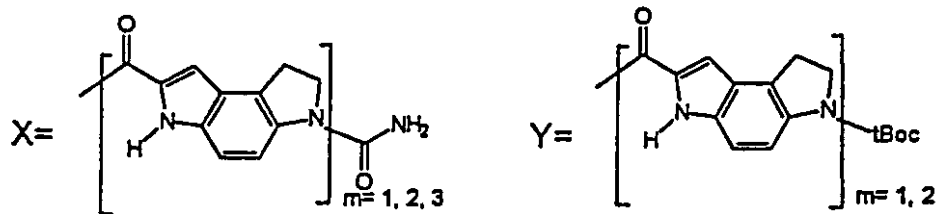


表3は、オリゴヌクレオチドが、表に示されているように、5'-ホスフェートまたは3'-ホスフェート末端のどちらかにおいて、それに結合している小溝結合物質成分を有するチミジルの8-マーである試験における、溶融温度(T<sub>m</sub>)および溶融温度の変化(ΔT<sub>m</sub>)のデータを示している。この表においてXおよびYで表されている小溝結合物質成分は、1,2-ジヒドロ-3H-ピロロ[3,2-e]インドール-7-カルボン酸の残基に基づく「オリゴペプチド」であり(C D P IまたはB o c D P I)、それらの構造が表に示されている。これらの小溝結合オリゴペプチドは、結合成分「L1またはL2」を

10

20

30

40

50

介してODNに結合し、それらの構造も表の下に示されている。ODN - MGB複合体を、相補的リボまたはデオキシリボホモポリマーで培養した。従って、チミジル酸のODNを含んで成るODN - MGB複合体に関しては、ポリAまたはポリ-dAが使用された。溶融温度の変化 ( $T_m$ ) が、ODNの対応する末端において対応する結合基L1またはL2を担持するが、小溝結合成分は担持していないODNとの複合体に比較して、示されている。表3から分かるように、これらのODN - MGB複合体もまた、相補的デオキシリボホモポリマーとの複合体の顕著な安定化を示し、最大安定化は、小溝結合成分が3CDPI単位を有する試験において生じる。驚くべきことに、複合体の安定化は、ODN - MGBが相補的リボホモポリマーで培養される場合でさえも生じる。先行技術において、フリースタンディング (free standing) 小溝結合分子がDNA - RNAハイブリッドに結合しないことが一般に観察されているので、このことは驚くべきことである。

表 4

ホスホジエステルおよびホスホロチオエート主鎖、ならびに、異なる位置に結合したオリゴ（ピロロインドールカルボキシアミド）ペプチド残基を担持するヘテロ二本鎖の  $T_m$  のデータ<sup>a</sup>。

CpApTpCpCpGpCpTの誘導体		ApGpCpGpCpApTpGの誘導体						
主鎖の種類	末端改質の種類	DNA		2'-DNA PS <sup>c</sup>				
		3'-L1-	3'-L2-X	5'-X-L1-	5'-X-L1- 無 <sup>b</sup> 5'-XX-L1 3'-L2-X			
DNA	3'-L1-	41	52	45	50	33	27	40
	3'-L2-X	57	81	78	77	50	73	77
	5'-X-L1-	58	79	76	76	49	70	75
	3'-L2-X5'-X-L1-	60	72	-	65	-	-	-
2'-DNA PS <sup>c</sup>	無 <sup>b</sup>	32	43	32	-	24	16	28
	5'-X-L1	38	69	67	-	28	62	63
	3'-L2-X	45	74	71	-	36	64	69

<sup>a</sup> 140 mM KCl、10 mM MgCl<sub>2</sub>、20 mM HEPES-HCl (pH 7.2) において、溶融混合物中のODNの濃度は  $2 \times 10^{-6}$  Mであった。

<sup>b</sup> ODNは、遊離3'-および5'-OH基を有する。

<sup>c</sup> PSは、ホスホロチオエート結合である。

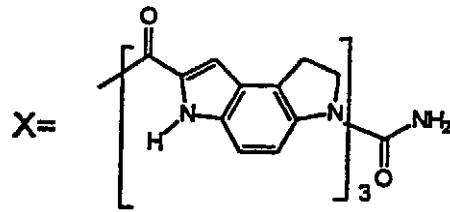


表4は、2つの相補的オクタマー：C p A p T p C p C p G p C p TおよびA p G p C p G p G p A p T p Gの誘導体間の二本鎖形成の試験結果を示す。各オクタマーを表に示すように改質し、それによって、対応するオリゴデオキシリボヌクレオチドおよびホスホリチオエート主鎖を有するオリゴデオキシリボヌクレオチドの、ハイブリッド形成について試験した。ODNは、構造L1またはL2（X、L1およびL2は表3と同様）の結合基を介して、3'または5'末端（示されている）のどちらかに結合した1,2-ジヒドロ-3H-ピロロ[3,2-e]インドール-7-カルボン酸（CDPI）の残基に基づくトリペプチドも有していた。対照標準として、ODNが結合基のみを担持している二本鎖についても溶融温度求めた。表から分かるように、二本鎖は、小溝結合物質成分の存在によって顕著に安定化され、二本鎖の各鎖が共有結合した小溝結合物質を有する場合に、より高い安定性が生じる。

表5

3'-オリゴ（ピロロインドールカルボキシアミド）ペプチド残基を担持するヘテロ二本鎖の $T_m$ のデータ（ $^{\circ}C$ ）。

相補的ODN	d(AGCGGATG)P		d(AICIIATI)p		
	3'-L1-	3'-L2-X	3'-L1-	3'-L1-X	
d(CATCCGCT)p	3'-L1-	41	52	11	-
	3'-L2-X	57	81	48	67
d(CATCCICT)p	3'-L1-	31	48	0	41
	3'-L1-X	54	79	48	63

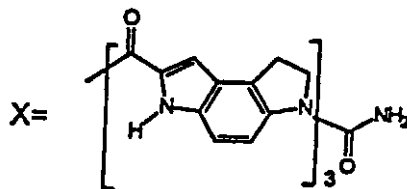


表5は、相補的または「準相補的（quasi complementary）」ODN-MGBを培養して、二本鎖形成に関して試験した場合に得られた溶融温度を示している。予想されるように、鎖中でグアニンがイノシン（I）と置き換えられる場合に、小溝結合成分が存在しなけ

10

20

30

40

50

れば、二本鎖の結合は非常に弱い ( $T_m$  が約 0 である)。しかし、オリゴヌクレオチド中で、グアニンがイノシンで置き換えられる場合に、1つの共有結合小溝結合物質 X がハイブリッドをほぼ 50 安定化させ、逆平行配向の2つのそのような小溝結合物質の存在は、63 の安定化を与えた。同じ鎖がグアニンを含む場合、1つの小溝結合物質は  $T_m$  を 15 増加させ、一方、2つの場合にはほぼ 45 増加させる。本発明の発明者らの知識によれば、8 - マーに関して 81 の  $T_m$  は、先行技術においては前例のないものである。

#### プライマー延長実験

ODN - MGB 複合体の ODN 部分の、Watson-Crick 意義における配列特異性が、ODN - MGB 複合体を標的配列に複合させるのに必要であることが、プライマー延長実験において示された。この実験において、鋳型鎖の 5' 末端から作用する酵素 T7 DNA ポリメラーゼを用いて、プライマー延長が生じる。Watson Crick 意義において鋳型ストランド上の標的配列に相補的な 16 - マー ODN - MGB を、長い一本鎖 DNA 鋳型および T7 DNA ポリメラーゼ酵素で培養した。プライマー延長の封鎖は、小溝結合成分が 16 - マー ODN の 5' 末端上にあった場合に、ODN - MGB との結合部位において、確認された。小溝結合物質は、本明細書の表 5 に示されるピロロインドールトリペプチドであった。16 - マーの配列特異性において、標的への単一不適合があった場合、プライマー延長は封鎖されなかった。小溝結合物質成分が 16 - マーの 3' 末端に結合された場合にも、プライマー延長は封鎖されなかった。配列特異的 16 - マーおよび遊離小溝結合物質分子 (化合物 3 d、ODN に共有結合していない) が、鋳型および酵素を用いて培養された場合にも、プライマー延長は封鎖されなかった。これらの実験は、ODN - MGB の配列特異性が複合体形成に重要であること、および小溝結合成分が、付随 (appended) ODN を他の鎖に非特異的に結合させる「アンカー」として単に作用するだけではないということを示している。プライマー延長を阻止する ODN - MGB 複合体の性能は、これらの複合体を、ポリメラーゼ鎖反応 (PCR) クランピング剤として診断的に使用できることを示している (Nucleic Acid Research (1993) 21:5332-5336 を参照)。

#### スロット - ブロット (Slot-blot) ハイブリッド形成分析

本発明の ODN - MGB 複合体は、ハイブリッド形成プローブとして有用である。このことは、 $^{32}P$  - 標識 ODN - MGB 複合体を診断プローブとして使用する下記実験の記載によって示される。共有結合小溝結合物質 (MGB) 成分を有さない同じ ODN と比較した場合、この複合体は、より優れた、強さ、効率、および特異性をもって、その補体にハイブリッド形成する。スロット - ブロットハイブリッド形成分析は、幅広く用いられている DNA プローブ診断分析であり、これらの MGB - ODN 複合体の特性が、分析の性能を向上させる。

特に、本明細書に記載されている実験においては、Protocols for Nucleic Acid Blotting and Hybridization, 1988, Amersham, United Kingdom に記載のように、標準プロトコールを後に続けた。固定化プラスミドにハイブリッド形成した標識試験 ODN を、1分当たりの計数 (cpm) として定量し、ハイブリッド形成の温度に対してプロットした。M13mp19 DNA (ファージ DNA) に対して相補的な4つの16 - マープローブを評価した。これらのプローブのうち2つは、ファージ DNA における部位に対して完全に相補的であり; これらうちの1つは、3' - 結合 CDP I<sub>3</sub> 成分を含有し、他の1つは未改質であった。プローブの第二の組は、M13mp19 DNA における同じ部位に対して標的とされたが、それぞれが単一不適合を含んでいた (図1において下線が付されている)。ここでもまた、1つの ODN は、CDP I<sub>3</sub> に 3' - 結合であったが、他方は未改質であった。

スロットハイブリッド形成試験の結果を図1に示す。未改質であるがそれ以外は同一である16 - マーと比較して、CDP I<sub>3</sub> 含有プローブは、33 のみに対して50 の溶融温度 ( $T_m$ ) でハイブリッドを形成した。このより高い溶融温度は、完全な適正のハイブリッドの収量を2倍以上にした。不適合がどちらかのプローブに導入されると、それぞれのハイブリッドの安定性が低下した。CDP I<sub>3</sub> - 改質プローブは、37 ~ 50 の間

10

20

30

40

50

の良好な配列識別を示した。さらに、ここで使用したバイブリッド形成条件下において、M 1 3 m p 1 9 DNA 標的における先存する二本鎖領域への、C D P I<sub>3</sub>成分の結合の形跡はなく、このことは、これらの複合体の完全に非特異的な結合が存在しないことを示すものである。

#### 培養ヒト細胞中の遺伝子の配列特異的アルキル化

共有結合アルキル化剤をも担持する本発明のODN-MGB複合体は、ODN-MGB複合体が標的遺伝子中の標的配列に相補的であることを条件として、望ましくない(疾患を引き起こす)遺伝子の発現の抑制のための「抗遺伝子(アンチジーン)」剤として使用することができる。そのような場合に、MGB成分が二本鎖遺伝子への結合を向上させ(リコンビナーゼ酵素の存在下)、アルキル化成分が、ODN-MGB複合体の標的配列への永久的な共有結合を生じるさせる。

例示的実験として、C D P I<sub>3</sub>基で3'-末端改質され、ナイトロジェンマスタード基(chlorambucil)で内部的に改質された前記50-マーODNを、生体ヒトBSM細胞(ヒトB-リンパ球細胞系)に存在する標的遺伝子(HLA DQ 1 0 3 0 2対立遺伝子)中の期待部位に、配列特異的に架橋した。ODN-MGB複合体を、最終濃度1-50 μMでBSM細胞の懸濁液に加えた。3.5時間後、ゲノムDNAを抽出し、熱ピロリジンで処理して、アルキル化事象(alkylation events)をニックに変換した。次に、0302対立遺伝子の標的領域を、単一塩基分解(single-base resolution)において開裂事象を検出するために使用できる方法であるLM-PCR(連結反応媒介ポリメラーゼ鎖反応(ligation mediated polymerase chain reaction))によって増幅した。配列ゲル上の生成物の分析は、改質ODNが、標的部位に結合し、標的部位をアルキル化したことを示した。C D P I<sub>3</sub>基を欠いた同様のODNは、標的のアルキル化効率がかかなり劣っていた。

前記実験において、ODN-MGB複合体の認識および相補的二本鎖DNAへの結合を、核リコンビナーゼの助けによって起こすことも可能である。同様の実験および用途において、内因性リコンビナーゼ酵素(endogenous recombinase enzymes)が、他の生体細胞中における、ODN-C D P I<sub>3</sub>複合体による二本鎖ゲノムDNAの配列特異的ターゲティングを、触媒することができる。これらのODNは付随する(appended)架橋剤を有し、それらは標的DNAをアルキル化することができる。リコンビナーゼの存在下に形成されるD-ループを安定化することによって、C D P I<sub>3</sub>が架橋反応を促進する。この架橋事象は、標的遺伝子の発現の強力なインヒビターである。従って、架橋ODN-C D P I<sub>3</sub>複合体を、抗遺伝子剤として使用することができる。

#### 特定の具体例、実験部門

##### 一般的実験

全ての空気および水感受性反応をアルゴンの微量正圧下で行った。無水溶媒をAldrich(Milwaukee, WI)から入手した。フラッシュクロマトグラフィーは、230-400メッシュシリカゲル上で行った。融点は、開放毛管中のMel-Temp融点装置で測定し、修正されていない。元素分析はQuantitative Technologies Inc.(Boundbrook, NJ)によって行った。UV可視吸収スペクトルは、200-400nmの範囲において、UV-2100(Shimadzu)またはLambda 2(Perkin Elmer)分光光度計によって記録した。<sup>1</sup>H NMRスペクトルは、Bruker WP-200またはVarian XL-200分光光度計で20で行った;化学シフトはMe<sub>4</sub>Siからのppmダウンフィールドで示す。

2, 3, 5, 6 - テトラフルオロフェニル 3 - カルバモイル - 1, 2 - ジヒドロ - 3 H - ピロロ [ 3, 2 - e ] インドール - 7 - カルボキシレート ( 1 a )。

2, 3, 5, 6 - テトラフルオロフェニルトリフルオロアセテート(2.6g、10mmol、H. B. Gamper, N. W. Reed, T. Cox, J. S. Virosco, A. D. Adams, A. A. Gall, J. K. SchollerおよびR. B. Meyer, Jr. Nucleic Acids Res., 1993, Vol. 21, No. 1, 145-150)を、無水DMF 15mL中の3 - カルバモイル - 1, 2 - ジヒドロ - 3 H - ピロロ [ 3, 2 - e ] インドール - 7 - カルボン酸(1.4g、6.1mmol、D. L. Boger, R. S. Coleman, およびB. J. Invergo. J. Org. Chem., 1987, Vol. 52, 1521-1530)およびトリエチルアミン(1.4mL、10mmol)の溶液に滴下し

た。1時間後、反応混合物を真空下に濃縮した(0.2mm)。残留物を乾燥ジクロロメタン2mLですり碎いた。エチルエーテル(50mL)を加え、混合物を0 で一夜置いた。沈殿物を、焼結ガラス漏斗で濾過することによって集め、初めに50%エーテル/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(10mL)、次にエーテル(50mL)で洗浄し、真空乾燥した。生成物を黄色固形物として得た(1.8g、75%)。

<sup>1</sup>H NMR (Me<sub>2</sub>SO - d<sub>6</sub> 200MHz, ppm) 12.32 (s, 1H, NH)、8.13 (d, 1H, J = 9Hz, C4 - H)、8.01 (m, 1H, C<sub>6</sub>F<sub>4</sub>H)、7.41 (s, 1H, C8 - H)、7.26 (d, 1H, J = 9Hz, C5 - H)、6.17 (s, 2H, CONH<sub>2</sub>)、3.99 (t, 2H, J = 9Hz, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)、3.30 (t, 2H, J = 9Hz, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)。

分析、C<sub>18</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>F<sub>4</sub> × 2H<sub>2</sub>Oの計算値：C、50.3；H、3.52；N、9.7。実測値：C、50.81；H、3.60；N、9.95。

2, 3, 5, 6 - テトラフルオロフェニル 3 - (t - ブチルオキシカルボニル) - 1, 2 - ジヒドロ - 3H - ピロロ [3, 2 - e] インドール - 7 - カルボキシレート (1b)。

2, 3, 5, 6 - テトラフルオロフェニルトリフルオロアセテート(2.6g、10mmol)を、無水CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>10mL中の3 - (t - ブチルオキシカルボニル) - 1, 2 - ジヒドロ - 3H - ピロロ [3, 2 - e] インドール - 7 - カルボン酸(1.0g、3.7mmol、D.L. Boger, R.S. Coleman, および B.J. Invergo. J. Org. Chem., 1987, Vol. 52, 1521-1530) およびトリエチルアミン(1.5mL、10mmol)の溶液に滴下した。4時間後、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>を減圧下に留去した。フラッシュクロマトグラフィー(4 × 20cm、ヘキサン - 酢酸エチル、1 : 2)にかけて、1bを黄色結晶質固形物として得た(1.25g、75%)。

<sup>1</sup>H NMR (Me<sub>2</sub>SO - d<sub>6</sub> 200MHz, ppm) 12.39 (d, 1H, J = 1.4Hz, NH)、8.02 (m, 1H, C<sub>6</sub>F<sub>4</sub>H)、7.9 (br s, 1H, C4 - H)、7.45 (d, 1H, J = 1.4Hz, C8 - H)、7.33 (d, 1H, J = 9Hz, C5 - H)、4.02 (t, 2H, J = 9Hz, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)、3.26 (t, 2H, J = 9Hz, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)、1.51 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)。

分析、C<sub>22</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>F<sub>4</sub>の計算値：C、58.67；H、4.03；N、6.22。実測値：C、58.45；H、4.09；N、6.13。

3 - カルバモイル - 1, 2 - ジヒドロ - 3H - ピロロ [3, 2 - e] インドール - 7 - カルボン酸ダイマーメチルエステル (2a)。

無水DMF 10mL中の、メチル 1, 2 - ジヒドロ - 3H - ピロロインドール - 7 - カルボキシレート(0.6g、1.5mmol)、1a(0.45g、2.25mmol)、およびトリエチルアミン(0.2mL、1.4mmol)の溶液を、室温で24時間、次に0 で12時間で培養した。得られる不溶性固形物を濾過によって集め、DMF(10mL)およびエーテル(20mL)で洗浄した。真空乾燥によって2a(0.61g、91%)を淡黄色固形物として得た。

<sup>1</sup>H NMR (Me<sub>2</sub>SO - d<sub>6</sub>、200MHz、ppm) 12.00 (s, 1H, J = 1.8Hz, NH')、11.54 (s, 1H, NH)、8.28 (d, 1H, J = 9Hz, C4' - H)、7.97 (d, 1H, J = 9Hz, C4 - H)、7.33 (d, 1H, J = 9Hz, C5' - H)、7.22 (d, 1H, J = 9Hz, C5 - H)、7.13 (d, 1H, J = 1.4Hz, C8' - H)

、6.94 (d, 1H, J = 1.1Hz, C8 - H)、6.01 (s, 2H, CONH<sub>2</sub>)、4.62 (t, 2H, J = 8Hz, (NH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)')、3.98 (t, 2H, J = 8Hz, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)、3.88 (s, 3H, CH<sub>3</sub>)、3.41 (t, 2H, J = 8Hz, (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)')、3.29 (t, 2H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, 部分的に水によって曇っている)。

分析、C<sub>24</sub>H<sub>21</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub> × 1H<sub>2</sub>O × 1DMFの計算値：C、58.69；H、5.84；N、15.21。実測値：C、58.93；H、5.75；N、15.82。

3 - (t - ブチルオキシカルボニル) - 1, 2 - ジヒドロ - 3H - ピロロ [3, 2 - e] インドール - 7 - カルボン酸ダイマーメチルエステル (2c)。

無水DMF 10mL中の、メチル 1, 2 - ジヒドロ - 3H - ピロロインドール - 7 - カ

10

20

30

40

50

ルボキシレート (0.5 g、2.5 mmol)、1 b (1.0 g、2.2 mmol)、およびトリエチルアミン (0.1 mL、0.7 mmol) の溶液を、室温で 10 時間、および 0 で 12 時間培養した。得られる不溶性固形物を濾過によって集め、DMF (5 mL) およびエーテル (40 mL) で洗浄した。真空乾燥によって 2 c (0.81 g、74%) を灰色がかった白色の固形物として得た。

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$ , 200 MHz, ppm) 12.01 (s, 1H, NH'), 11.64 (s, 1H, NH), 8.28 (d, 1H,  $J = 9\text{ Hz}$ , C4' - H), 7.8 (br s, 1H, C4 - H), 7.32 (明白な t, 2H, C5' - H + C5 - H), 7.13 (d, 1H,  $J = 1.1\text{ Hz}$ , C8' - H), 6.98 (d, 1H,  $J = 1.1\text{ Hz}$ , C8 - H), 4.62 (t, 2H,  $J = 8\text{ Hz}$ ,  $(\text{NH}_2\text{CH}_2)$ '), 4.02 (t, 2H,  $J = 8\text{ Hz}$ ,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2$ '), 3.88 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3.41 (t, 2H,  $J = 8\text{ Hz}$ ,  $(\text{NCH}_2\text{CH}_2)$ '), 3.25 (t, 2H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2$ ), 1.52 (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)$ )。 10

分析、 $\text{C}_{28}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_5$  の計算値：C、67.19；H、5.64；N、11.19。実測値：C、66.72；H、5.69；N、11.31。

2, 3, 5, 6 - テトラフルオロフェニル 3 - カルバモイル - 1, 2 - ジヒドロ - 3 H - ピロロ [3, 2 - e] インドール - 7 - カルボキシレートダイマー (2 e)。

2, 3, 5, 6 - テトラフルオロフェニルトリフルオロアセテート (2.6 g、10 mmol) を、無水 DMF 15 mL 中の 2 b の懸濁液 (1.2 g、2.8 mmol、D.L. Boger, R.S. Coleman, および B.J. Invergo. J. Org. Chem., 1987, Vol. 52, 1521-1530) に滴下した。トリエチルアミン (1.4 mL、10 mmol) を加え、混合物を 3 時間攪拌した。回転蒸発器を用いて、混合物を真空濃縮した (0.2 mm)。残留物を、乾燥ジクロロメタン 20 mL を用いてすり砕いた。得られる生成物を濾過し、ジクロロメタン (10 mL)、エーテル (20 mL) で洗浄し、真空乾燥して、2 e を黄色固形物として得た (1.5 g、93%)。 20

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$ , 200 MHz, ppm) 12.51 (d, 1H,  $J = 1.8\text{ Hz}$ , NH'), 11.58 (s, 1H, NH), 8.39 (d, 1H,  $J = 8.9\text{ Hz}$ , C4' - H), 8.04 (m, 1H,  $\text{C}_6\text{F}_4\text{H}$ ), 7.98 (d, 1H,  $J = 8.8\text{ Hz}$ , C4 - H), 7.58 (s, 1H, C8'), 7.42 (d, 1H,  $J = 9\text{ Hz}$ , C5' - H), 7.22 (d, 1H,  $J = 9\text{ Hz}$ , C5 - H), 6.98 (s, 1H, C8 - H), 6.11 (s, 2H,  $\text{CONH}_2$ ), 4.66 (t, 2H,  $J = 7.8\text{ Hz}$ ,  $(\text{NCH}_2\text{CH}_2)$ '), 3.94 (t, 2H,  $J = 9.1\text{ Hz}$ ,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2$ ), 3.47 (t, 2H,  $J = 8\text{ Hz}$ ,  $(\text{NCH}_2\text{CH}_2)$ '), 3.29 (t, 2H,  $J = 9.1\text{ Hz}$ ,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2$ )。 30

分析、 $\text{C}_{29}\text{H}_{19}\text{N}_5\text{O}_4\text{F}_4 \times 1.5\text{H}_2\text{O}$  の計算値：C、57.62；H、3.67；N、11.59。実測値：C、57.18；H、3.31；N、11.54。

2, 3, 5, 6 - テトラフルオロフェニル 3 - (t - ブチルオキシカルボニル) - 1, 2 - ジヒドロ - 3 H - ピロロ [3, 2 - e] インドール - 7 - カルボキシレートダイマー (2 f)。

2, 3, 5, 6 - テトラフルオロフェニルトリフルオロアセテート (0.75 g、2.9 mmol) を、無水  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (8 mL) と DMF (2 mL) との混合物中の、2 d (0.25 g、0.5 mmol、D.L. Boger, R.S. Coleman, および B.J. Invergo. J. Org. Chem., 1987, Vol. 52, 1521-1530) およびトリエチルアミン (0.5 mL、3.5 mmol) の懸濁液に滴下した。この混合物を 20 時間攪拌した。得られる清澄な溶液を真空濃縮し、1 M 酢酸ナトリウム (pH 7.5) 40 mL に滴下した。沈殿物を遠心分離にかけ、水 (2 x 40 mL)、エーテル中の 10% MeOH (2 x 40 mL)、エーテル (40 mL)、およびヘキサン (40 mL) で洗浄した。最終的に、真空乾燥して 2 f を淡黄色固形物として得た (0.29 g、91%)。 40

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$ , 200 MHz, ppm) 12.51 (s, 1H, NH'), 11.66 (s, 1H, NH), 8.37 (d, 1H,  $J = 8.8\text{ Hz}$ , C4' - H), 8.03 (m, 1H,  $\text{C}_6\text{F}_4\text{H}$ ), 7.8 (br s, 1H, C4 - H), 7.58 (s, 1H, C8' - H), 7.40 (d, 1H,  $J = 9.1\text{ Hz}$ , C5' - H), 7.27 (d, 1H,  $J = 8.6\text{ Hz}$ , C5 - H), 7.1 (s, 1H, C8 - H), 4.65 (t, 2H,  $J = 8\text{ Hz}$ ,  $(\text{NCH}_2\text{CH}_2)$ ) 50



' )、4.02 ( t, 2 H, J = 9 Hz, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> )、3.46 ( t, 2 H, J = 8 Hz, ( NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> ) ' )、3.25 ( t, 2 H, J = 8.9 Hz, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> )、1.51 ( s, 9 H, C ( CH<sub>3</sub> )<sub>3</sub> )。

分析、C<sub>33</sub>H<sub>26</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>F<sub>4</sub> × 0.5 H<sub>2</sub>O の計算値：C、61.59；H、4.23；N、8.71。実測値：C、61.73；H、4.12；N、8.61。

3 - カルバモイル - 1, 2 - ジヒドロ - 3 H - ピロロ [ 3, 2 - e ] インドール - 7 - カルボキシレートトリマーメチルエステル ( 3 a )。

無水DMF 15 mL 中の、メチル 1, 2 - ジヒドロ - 3 H - ピロロインドール - 7 - カルボキシレート ( 1.0 g、5 mmol )、2 e ( 1.2 g、2.1 mmol )、およびトリエチルアミン ( 0.1 mL、mmol ) の溶液を、室温で24時間、および0 で12時間培養した。得られる不溶性固形物を濾過によって集め、DMF ( 10 mL )、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ( 20 mL )、およびエーテル ( 20 mL ) で洗浄した。真空乾燥によって3 a ( 1.1 g、83% ) を淡黄色固形物として得た。

<sup>1</sup>H NMR ( Me<sub>2</sub>SO - d<sub>6</sub>, 200 MHz, ppm) 12.02 ( s, 1 H, NH " )、11.75 ( s, 1 H, NH ' )、11.56 ( s, 1 H, NH )、8.28 ( 明白な t, 2 H, J = 8.3 Hz, C4 - H " + C4 ' - H )、7.98 ( d, 1 H, J = 9.4 Hz, C4 - H )、7.98 ( d, 1 H, J = 9 Hz, C4 - H )、7.39 - 7.33 ( 2 d, 2 H, C5 " - H + C5 ' - H )、7.23 ( d, 1 H, J = 8.7 Hz, C5 - H )、7.14 ( d, 1 H, J = 1.6 Hz, C8 " - H )、7.10 ( d, 1 H, J = 1 Hz, C8 ' - H )、6.97 ( s, 1 H, C8 - H )、6.11 ( s, 2 H, CONH<sub>2</sub> )、4.65 ( t, 4 H, ( NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> ) " + ( NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> ) ' )、3.98 ( t, 2 H, J = 8.7 Hz, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> )、3.88 ( s, 3 H, CH<sub>3</sub> )、3.48 - 3.25 ( m, 6 H, ( NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> ) " + ( NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> ) ' + NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>部分的にH<sub>2</sub>Oによって曇っている)。

分析、C<sub>35</sub>H<sub>29</sub>N<sub>7</sub>O<sub>5</sub> × 4.5 H<sub>2</sub>O の計算値：C、59.32；H、5.0；N、13.03。実測値：C、58.9；H、5.06；N、13.77。

2, 3, 5, 6 - テトラフルオロフェニル 3 - カルバモイル - 1, 2 - ジヒドロ - 3 H - ピロロ [ 3, 2 - e ] インドール - 7 - カルボキシレートトリマー ( 3 c )。

2, 3, 5, 6 - テトラフルオロフェニルトリフルオロアセテート ( 2.6 g、10 mmol ) を、無水DMF 15 mL およびトリエチルアミン ( 1.4 mL、10 mmol ) 中の3 b ( 1.1 g、1.8 mmol ) の懸濁液に滴下した。この混合物を3時間攪拌した。混合物を真空濃縮した ( 0.2 mm )。残留物を、乾燥ジクロロメタン ( 20 mL ) とメタノール ( 2 mL ) との混合物ですり砕いた。得られる生成物を濾過によって集め、ジクロロメタン ( 20 mL )、エーテル ( 20 mL ) で洗浄し、真空乾燥して、黄緑色固形物1.3 g ( 95% ) を得た。

<sup>1</sup>H NMR ( Me<sub>2</sub>SO - d<sub>6</sub>, 200 MHz, ppm) 12.54 ( d, 1 H, J = 1 Hz, NH " )、11.79 ( s, 1 H, NH ' )、11.56 ( s, 1 H, NH )、8.41 ( d, 1 H, J = 9.3 Hz, C4 - H " )、8.27 ( d, 1 H, J = 9.4 Hz, C4 ' - H )、8.03 ( m, 1 H, C<sub>6</sub>F<sub>4</sub>H )、7.98 ( d, 1 H, J = 9 Hz, C4 - H )、7.56 ( s, 1 H, C8 " - H )、7.45 - 7.35 ( m, 2 H, C5 " - H + C5 ' - H )、7.23 ( d, 1 H, J = 9.2 Hz, C5 - H )、7.13 ( s, 1 H, C8 ' - H )、6.97 ( s, 1 H, C8 - H )、6.11 ( s, 2 H, CONH<sub>2</sub> )、4.65 ( m, 4 H, ( NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> ) " + ( NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> ) ' )、3.98 ( t, 2 H, J = 8.7 Hz, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> )、3.45 ( m, 4 H, ( NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> ) " + ( NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> ) ' )、3.25 ( t, 2 H, J = 8.7 Hz, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> )。

分析、C<sub>40</sub>H<sub>27</sub>N<sub>7</sub>O<sub>5</sub>F<sub>4</sub> × 2 H<sub>2</sub>O の計算値：C、61.59；H、4.23；N、8.71。実測値：C、61.73；H、4.12；N、8.61。

[ 3 - カルバモイル - 1, 2 - ジヒドロ - 3 H - ピロロ [ 3, 2 - e ] インドール - 7 - カルボキシ ] - 1 - アミド - 3 - プロパノールトリマー ( 3 d )。

無水DMF 2.5 mL 中の、3 - アミノ - 1 - プロパノール ( 70 μL、1.4 mmol )、3 c ( 75 mg、0.1 mmol )、およびトリエチルアミン ( 0.1 mL、mmol ) の溶液を、

室温で10時間攪拌した。得られる不溶性固形物を濾過によって集め、DMF (2 mL)、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 mL) およびエーテル (20 mL) で洗浄した。真空乾燥して3 d (55 mg、89%) を淡黄色固形物として得た。

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$ , 200 MHz, ppm) 11.76 (s, 1H, NH"), 11.65 (s, 1H, NH'), 11.57 (s, 1H, NH), 8.47 (m, 1H, C4-H), 8.24 (m, 1H, C4-H), 7.99 (d, 1H,  $J = 8.4$  Hz, C4-H), 7.40 - 7.32 (2d, 2H, C5"-H + C5'-H), 7.23 (d, 1H,  $J = 8.9$  Hz, C5-H), 7.12 (s, 1H, C8"-H), 7.10 (s, 1H, C8'-H), 6.99 (s, 1H, C8-H), 6.12 (s, 3H,  $\text{CONH}_2 + \text{NHCO}$ ), 4.66 (t, 4H,  $(\text{NCH}_2\text{CH}_2)'' + (\text{NCH}_2\text{CH}_2)'$ ), 3.98 (t, 2H,  $J = 8.7$  Hz,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2$ ), 3.51 - 3.25 (m, 10H,  $(\text{NCH}_2\text{CH}_2)'' + (\text{NCH}_2\text{CH}_2)'$  +  $\text{NCH}_2\text{CH}_2 + \text{NHCH}_2 + \text{CH}_2\text{OH}$  部分的に $\text{H}_2\text{O}$ によって曇っている), 1.70 (p, 2H,  $J = 6.6$  Hz,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ )。 10

2, 3, 5, 6 - テトラフルオロフェニル 3 - [ N - ( 9 - フルオレニルメトキシカルボニル ) ] アミノプロピオネート ( 4 )。

2, 3, 5, 6 - テトラフルオロフェニルトリフルオロアセテート (1.7 g、6.5 mmol) を、無水 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  20 mL中の、Fmoc - アラニン (2.0 g、6.4 mmol) およびトリエチルアミン (1.0 mL、7 mmol) の溶液に滴下した。1時間後、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ を、回転蒸発器を用いて減圧下に蒸発によって除去し、30 mLエチルアセテート/ヘキサン (1 : 1) 中に再度溶解した。フラッシュクロマトグラフィー (4 x 20 cm、ヘキサン/酢酸エチル、3 : 1) によって、4を白色固形物として得た。ヘキサン/酢酸エチルから再結晶して、4を白色結晶質固形物として得た (2.3 g、78%)。 20

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz, ppm) 7.73 (d, 2H,  $J = 7.1$  Hz, 芳香族プロトン)、7.75 (d, 2H,  $J = 7.7$  Hz, 芳香族プロトン)、7.24 - 7.42 (m, 4H, 芳香族プロトン)、7.01 (m, 1H,  $\text{C}_6\text{F}_4\text{H}$ )、5.21 (br s, 1H, -CO-NH-), 4.38 (d, 2H,  $J = 7.1$  Hz, - $\text{CH}_2\text{OCO}$ -), 4.20 (m, 1H, ベンジルプロトン)、3.58 (m, 2H,  $\text{NCH}_2$ )、2.93 (t, 2H,  $J = 5.4$  Hz, - $\text{CH}_2\text{CO}$ -)。

分析、 $\text{C}_{24}\text{H}_{17}\text{NO}_4\text{F}_4$ の計算値：C、62.75；H、3.73；N、3.05。実測値：C、62.52；H、3.59；N、3.01。 30

1 - [ 3 - [ N - ( 9 - フルオレニルメトキシカルボニル ) ] アミノ ] - 1 - オキソプロピル ] アミノ - ( R, S ) - 2, 3 - プロパンジオール ( 5 )。

無水 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  20 mL中の4 (2.0 g、4.35 mmol) の溶液を、10 mL MeOH中の3 - アミノ - 1, 2 - プロパンジオール (0.6、mmol) の攪拌溶液に加えた。10分後、酢酸 (3 mL) を加え、混合物を蒸発乾燥した。残留物を水100 mLですり碎いた。得られる固形物を濾過し、水で洗浄し、減圧下にトルエン (2 x 50 mL) と共に同時蒸発させることによって乾燥した。酢酸エチル50 mLで洗浄し、続いて、一夜真空乾燥して、5を白色結晶質固形物として得た (1.65 g、99%)。

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3 + \text{MeOD}-d_4$ , 200 MHz, ppm,  $\text{Me}_4\text{Si}$ ) 7.77 (d, 2H,  $J = 7.7$  Hz, 芳香族プロトン)、7.61 (d, 2H,  $J = 7.3$  Hz, 芳香族プロトン)、7.45 - 7.29 (m, 4H, 芳香族プロトン)、4.35 (d, 2H,  $J = 7.1$  Hz, - $\text{CH}_2\text{OCO}$ -), 4.22 (m, 1H, ベンジルプロトン)、3.72 (m, 1H,  $\text{NHCH}_2\text{CHOHCH}_2\text{OH}$ からの-1H-), 3.52 - 3.27 (m, 6H,  $\text{OCONHCH}_2 + \text{CH}_2\text{CHOHCH}_2\text{OH}$ )、2.44 (t, 2H,  $J = 6.6$  Hz, - $\text{CH}_2\text{CO}$ -)。

分析、 $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_5$ の計算値：C、56.1；H、6.29；N、7.29%。実測値：C、55.43；H、6.28；N、7.21。 40

1 - [ 3 - [ N - ( 9 - フルオレニルメトキシカルボニル ) アミノ ] - 1 - オキソプロピル ] アミノ - ( R, S ) - 2 - [ [ ビス ( メトキシフェニル ) フェニルメトキシ ] メチル ] - 2 - エタノール ( 6 )。

無水ピリジン30 mL中の5 (1.6 g、4.2 mmol) の攪拌溶液に、DMTrCl (1. 50

6 g、4.7 mmol)を加えた。アルゴン下に3時間攪拌後、混合物を蒸発乾燥した。残留ピリジンを、トルエンと共に同時蒸発させることよって除去した。残留物を $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  100 mLに溶解し、水 $2 \times 100$  mLで洗浄し、硫酸ナトリウム上で乾燥し、蒸発乾燥した。残留物を、溶離剤として酢酸エチルを用いるフラッシュクロマトグラフィー(4 x 20 cm、シリカ)で精製した。純生成物を含む画分を集め、蒸発乾燥して、1.9 g (66%)の6を無色泡状物として得た。

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz, ppm,  $\text{Me}_4\text{Si}$ ) 7.72 (d, 2H,  $J = 7.2$  Hz, 芳香族プロトン)、7.56 (d, 2H,  $J = 7$  Hz, 芳香族プロトン)、7.40 - 7.20 (m, 13H, 芳香族プロトン)、6.80 (d, 4H,  $J = 9$  Hz, DMTrプロトン)、5.76 (br s, 1H, NH)、5.42 (br s, 1H, NH)、4.35 (d, 2H,  $J = 6.6$  Hz,  $-\text{CH}_2\text{OCO}-$ )、4.17 (m, 1H, ベンジルプロトン)、3.83 (m, 1H,  $\text{NHCH}_2\text{CHOHCH}_2\text{OH}$ からの $-\text{CH}-$ )、3.75 (s, 6H,  $\text{OCH}_3$ )、3.60 - 3.30 (m, 4H,  $\text{OCONHCH}_2 + \text{CH}_2\text{CHOHCH}_2\text{OH}$ )、3.13 (d, 2H,  $J = 5.4$  Hz,  $\text{CH}_2\text{ODMTr}$ )、2.30 (t, 2H,  $J = 5.4$  Hz,  $-\text{CH}_2\text{CO}-$ )。

分析、 $\text{C}_{42}\text{H}_{42}\text{N}_2\text{O}_7$ の計算値：C、73.45；H、6.16；N、4.08。実測値：C、65.43；H、6.28；N、7.21。

2, 3, 5, 6 - テトラフルオロフェニル 1 - [ 3 - [ N - ( 9 - フルオレニルメトキシカルボニル) アミノ ] - 1 - オキソプロピル ] アミノ - ( R, S ) - 2 - [ [ ビス(メトキシフェニル) フェニルメトキシ ] メチル ] - 2 - エチルブタンジオエート ( 7 )。

無水 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  10 mL中の、6 (1.2 g、1.75 mmol)、トリエチルアミン(0.2 g、2 mmol)、1 - メチルイミダゾール(20  $\mu\text{L}$ )の溶液に、無水琥珀酸0.2 g (2 mmol)を加えた。この溶液を20時間攪拌した。トリエチルアミン(60  $\mu\text{L}$ )を溶液に加え、続いて、0.6 g (2.2 mmol)の2, 3, 5, 6 - テトラフルオロフェニルトリフルオロアセテートを加えた。1時間後、回転蒸発器を用いて $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ を減圧下に蒸発によって除去し、残留物を15 mLエチルアセテート/ヘキサン(1 : 2)に溶解した。フラッシュクロマトグラフィー(4 x 20 cm、ヘキサン/酢酸エチル、2 : 1)によって、1bを淡黄色泡状物(1.2 g、73%)として得た。

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz, ppm,  $\text{Me}_4\text{Si}$ ) 7.71 (d, 2H,  $J = 7.2$  Hz, 芳香族プロトン)、7.54 (d, 2H,  $J = 7$  Hz, 芳香族プロトン)、7.40 - 7.20 (m, 13H, 芳香族プロトン)、7.00 (m, 1H,  $\text{C}_6\text{F}_4\text{H}$ )、6.78 (d, 4H,  $J = 7$  Hz, DMTrプロトン)、5.71 (br s, 1H, NH)、5.42 (br s, 1H, NH)、5.15 (m, 1H,  $\text{NHCH}_2\text{CHOHCH}_2\text{OH}$ からの $-\text{CH}-$ )、4.31 (d, 2H,  $J = 6.2$  Hz,  $-\text{CH}_2\text{OCO}-$ )、4.16 (d, 5.5 Hz, 1H, ベンジルプロトン)、3.74 (s, 6H,  $\text{OCH}_3$ )、3.60 - 3.30 (m, 4H,  $\text{OCONHCH}_2 + \text{CH}_2\text{CHOHCH}_2\text{OH}$ )、3.20 (br s, 2H,  $\text{CH}_2\text{ODMTr}$ )、2.98 (br s, 2H,  $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ )、2.72 (br s, 2H,  $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ )、2.20 (br s, 2H,  $-\text{CH}_2\text{CO}-$ )。

分析、 $\text{C}_{42}\text{H}_{42}\text{N}_2\text{O}_7$ の計算値：C、66.80；H、4.96；N、3.00。実測値：C、66.18；H、4.98；N、2.86。

C P G 誘導体の製造 8。

無水ピリジン20 mL中の、長鎖アミノアルキル制御孔ガラス(LCAA - CPG) 5.0 g、1 - メチルイミダゾール0.5 mL、および0.45 g (0.5 mmol)の7の混合物を、100 mLフラスコ(オービタルミキサー、150 rpm)中で渦を巻かせた。3時間後、CPGを焼結ガラス漏斗で濾過し、それぞれ100 mLのDMF、アセトン、およびジエチルエーテルで洗浄した。CPGを真空乾燥し、ピリジン(20 mL)、無水酢酸(2 mL)、および1 - メチルイミダゾール(2 mL)の混合物で処理した。30分間渦を巻かせた後に、CPGをピリジン、メタノール、およびジエチルエーテルで洗浄し、次に真空乾燥した。文献に記載の方法(T. AtkinsonおよびM. Smithによる, M. Gait (ed.), Oligonucleotide Synthesis, A Practical Approach, IRL Press, 1984, Oxford, UK, pp. 35-81)に

10

20

30

40

50

よってジメトキシトリチル (DMTr) 含有量を分析し、 $28 \mu\text{mol/g}$ の荷重を有することを見い出した。

#### CPG誘導体の製造 9。

CPG誘導体8 (3.0 g)を、乾燥DMF中の20%ピペリジン20 mLで2回、各回ごとに5分間で処理した。CPGを、それぞれ100 mLのDMF、メタノール、およびジエチルエーテルで洗浄し、真空乾燥した。

#### CPG誘導体の製造 10。

無水DMSO 7.5 mL中の、2.5 gの9、7.5 mLのトリエチルアミン、および0.38 g (0.5 mmol)の3cの混合物を、50 mLフラスコ(オービタルミキサー、150 漏斗rpm)中で渦を巻かせた。2日後、CPGを焼結ガラス漏斗で濾過し、それぞれ10 10  
0 mLのDMSO、アセトン、およびジエチルエーテルで洗浄した。CPGを真空乾燥し、ピリジン(10 mL)、無水酢酸(1 mL)、および1-メチルイミダゾール(1 mL)の混合物で処理した。30分間渦を巻かせた後に、CPGをDMSO、ピリジン、メタノール、およびジエチルエーテルで洗浄し、次に真空乾燥した。

#### 2-[4-(フェニルアゾ)ベンジルチオ]エチル 5-[ (t-ブチルオキシ)カルボキシアミド]ペンチルカルボキシレート(11)。

6-[ (t-ブチルオキシカルボキシアミド)ヘキサノ酸(4.16 g、18 mmol)を、乾燥DMFと共に、同時蒸発させることによって乾燥した(70 )。残留物を乾燥DMF(25 mL)中に再度溶解し、2-[4-(フェニルアゾ)-ベンジルチオ]-エタノール(4.0 g、15 mmol)、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(3.71 g、18 mmol)、4-ジメチルアミノピリジン(1.83 g、15 mmol)を0 で加えた。0 で2時間、20 で12時間攪拌後、反応混合物を、酢酸ブチルと共に同時蒸発させることによって蒸発乾燥し、追加の酢酸エチル(150 mL)を加えた。この溶液を、0.7 M HCl(1×30 mL)、5% NaHCO<sub>3</sub>、およびH<sub>2</sub>O(2×50 mL)で抽出した。有機層をNa<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>上で乾燥し、回転蒸発器で濃縮した。エーテル20 mLで洗浄し、濾過して、化合物11(6.91 g、89%)を得た。

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz, ppm) 7.91 (m, 4H)、7.52 (m, 5H)、4.48 (t, 2H)、4.34 (s, 2H)、3.20 (t, 2H)、3.08 (m, 2H)、2.35 (t, 2H)、1.64 - 1.2 (m, 7H)、1.41 (s, 9H)。

#### 1,2,3-ベンゾトリアゾール-1-イル 1-メチル-4-(t-ブチルオキシ)カルボキシアミド-ピロール-2-カルボキシレート。

N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(1.1 g、5.3 mmol)を、1-メチル-4-[t-ブチルオキシ)カルボキシアミド]ピロール-2-カルボン酸<sup>4</sup>(1.2 g、5.2 mmol)および1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(0.63 g、4.7 mmol)の溶液に加えた。1時間攪拌後、混合物を焼結ガラスフィルターで濾過して、沈降N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミドを分離した。濾液を蒸発乾燥し、CHCl<sub>3</sub>およびペンタン(1:1)の混合物に溶解し、シリカゲルカラムに装填した。純生成物を含む画分を集め、蒸発乾燥して、所望生成物1.45 g(80%)を白色固形物として得た。

m.p. = 138 ~ 138.5 。

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) 8.04 (d, 1H)、7.49 - 7.40 (m, 4H)、7.09 (d, 1H)、3.87 (s, 3H)、1.50 (s, 9H)。

#### 2-[4-(フェニルアゾ)ベンジルチオ]エチル 5-[1-メチル-4-(t-ブチルオキシ)カルボキシアミド]ピロール-2-カルボキシアミド]ペンチルカルボキシレート(12)。

トリフルオロ酢酸(5 mL)を、0 で、11(0.73 g、1.5 mmol)に加えた。0 で20分間攪拌後、反応混合物を、CHCl<sub>3</sub>と共に同時蒸発させることによって蒸発乾燥した。残留物を、乾燥CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(15 mL)中に溶解し、1,2,3-ベンゾトリアゾール-1-イル 1-メチル-4-(t-ブチルオキシ)カルボキシアミド-ピロール-2-カルボキシレート(0.59 g、1.65 mmol)、乾燥トリエチルアミン(0.23 g、2.3 mmol)を加えた。周囲温度で15分間攪拌後、CHCl<sub>3</sub>を加えた(100 mL) 50

。反応混合物を、5%  $\text{NaHCO}_3$  (2 x 20 mL)、 $\text{H}_2\text{O}$  (2 x 20 mL) で抽出した。有機層を  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  上で乾燥し、回転蒸発器で濃縮した。 $\text{CHCl}_3$  を用いてシリカゲル (100 g) でクロマトグラフィーにかけて、0.88 g (91.8%) の12を得た。 $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz, ppm) 7.88 (m, 4 H)、7.46 (m, 5 H)、6.74 (s, 1 H)、6.38 (s, 1 H)、6.26 (s, 1 H)、5.87 (t, 1 H)、4.18 (t, 2 H,  $J = 6\text{ Hz}$ )、3.82 (s, 3 H)、3.79 (s, 2 H)、3.3 (m, 2 H)、2.63 (t, 2 H,  $J = 6\text{ Hz}$ )、2.30 (t, 2 H,  $J = 6\text{ Hz}$ )、1.64 - 1.2 (m, 6 H)、1.46 (s, 9 H)。

2 - [4 - (フェニルアゾ)ベンジルチオ]エチル 5 - [1 - メチル - 4 - (1 - メチル - 4 - (t - ブチルオキシ)カルボキシアミドピロール - 2 - カルボキシアミド]ピロール - 2 - カルボキシアミド]ペンチルカルボキシレート (13)。

乾燥  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (8 mL) 中の12 (2.43 g, 4 mmol) の溶液を、トリフルオロ酢酸 (4 mL) で0 で処理した。得られる溶液を、栓をしたフラスコ中、周囲温度で1時間置き、次に30%水性  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (30 mL) と  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (30 mL) との間に分配した。下部層を集めた。水性相を、ジクロロメタン (2 x 20 mL) で抽出し、集めた有機抽出物を、 $\text{H}_2\text{O}$  (1 x 20 mL) で洗浄した後に、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$  上で乾燥し、蒸発させた。残留物を、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 mL) 中に溶解し、1, 2, 3 - ベンゾトリアゾール - 1 - イル 1 - メチル - 4 - (t - ブチルオキシ)カルボキシアミドピロール - 2 - カルボキシレート (1.43 g, 4 mmol)、乾燥トリエチルアミン (0.8 g, 8 mmol) を加えた。周囲温度で30分間攪拌した後、 $\text{CHCl}_3$  (100 mL) を加えた。反応混合物を5%  $\text{NaHCO}_3$  (2 x 20 mL)、 $\text{H}_2\text{O}$  (2 x 20 mL) で抽出した。有機層を  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  上で乾燥し、回転蒸発器で濃縮した。 $\text{CHCl}_3$  を用いてシリカゲル (100 g) でクロマトグラフィーにかけて、1.95 g (66.8%) の13を得た。

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz, ppm) 7.87 (m, 4 H)、7.46 (m, 5 H)、7.04 (d, 1 H,  $J = 1.5\text{ Hz}$ )、6.77 (br s, 1 H)、6.52 (br s, 1 H)、6.50 (d, 1 H,  $J = 1.5\text{ Hz}$ )、6.31 (br s, 1 H)、5.95 (t, 1 H)、4.19 (t, 2 H,  $J = 6\text{ Hz}$ )、3.85 (s, 6 H)、3.78 (s, 2 H)、3.32 (m, 2 H)、2.64 (t, 2 H,  $J = 6\text{ Hz}$ )、2.31 (t, 2 H,  $J = 6\text{ Hz}$ )、1.64 - 1.2 (m, 6 H)、1.48 (s, 9 H)。

2 - [4 - (フェニルアゾ)ベンジルチオ]エチル 5 - [1 - メチル - 4 - (1 - メチル - 4 - [1 - メチル - 4 - (t - ブチルオキシ)カルボキシアミドピロール - 2 - カルボキシアミド]ピロール - 2 - カルボキシアミド]ピロール - 2 - カルボキシアミド]ペンチルカルボキシレート (14)。

乾燥  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (6 mL) 中の13 (1.90 g, 2.6 mmol) の溶液を、トリフルオロ酢酸 (3 mL) で0 で処理した。得られる溶液を、栓をしたフラスコ中、周囲温度で1時間置き、次に30%水性  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (30 mL) と  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (30 mL) との間に分配した。下部層を集めた。水性相を、ジクロロメタン (2 x 20 mL) で抽出し、集めた有機抽出物を、 $\text{H}_2\text{O}$  (1 x 20 mL) で洗浄した後に、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$  上で乾燥し、蒸発させた。残留物を、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2.5 mL) 中に溶解し、1, 2, 3 - ベンゾトリアゾール - 1 - イル 1 - メチル - 4 - (t - ブチルオキシ)カルボキシアミドピロール - 2 - カルボキシレート (1.4 g, 3.9 mmol)、乾燥トリエチルアミン (0.8 g, 8 mmol) を加えた。周囲温度で1時間攪拌した後、 $\text{CHCl}_3$  (100 mL) を加えた。反応混合物を5%  $\text{NaHCO}_3$  (2 x 20 mL)、 $\text{H}_2\text{O}$  (2 x 20 mL) で抽出した。有機層を  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  上で乾燥し、回転蒸発器で濃縮した。 $\text{CHCl}_3$  中の0% ~ 1.5%メタノールを用いてシリカゲル (100 g) でクロマトグラフィーにかけて、1.56 g (70.5%) の14を得た。

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz, ppm) 7.87 (m, 4 H)、7.68 (br s, 1 H)、7.60 (br s, 1 H)、7.46 (m, 5 H)、7.08 (br s, 2 H)、6.78 (br s, 1 H)、6.56 (d, 1 H,  $J = 1.5\text{ Hz}$ )、6.60 (br s, 1 H)、6.55 (d, 1 H,  $J = 1.5\text{ Hz}$ )、6.03 (t, 1 H)、4.18 (t, 2 H,  $J = 6$

10

20

30

40

50

H z)、3.86 (m, 9 H)、3.78 (s, 2 H)、3.32 (m, 2 H)、2.63 (t, 2 H, J = 6 Hz)、2.30 (t, 2 H, J = 6 Hz)、1.64 - 1.2 (m, 6 H)、1.48 (s, 9 H)。

2 - [ 4 - (フェニルアゾ)ベンジルチオ]エチル - 5 - [ 1 - メチル - 4 - [ 1 - メチル - 4 - [ 1 - メチル - 4 - [ 1 - メチル - 4 - [ 1 - メチル - 4 - (t - ブチルオキシ)カルボキシアミドピロール - 2 - カルボキシアミド]ピロール - 2 - カルボキシアミド]ピロール - 2 - カルボキシアミド]ピロール - 2 - カルボキシアミド]ペンチルカルボキシレート (15)

乾燥  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5 mL) 中の 14 (0.32 g、0.32 mmol) の溶液を、トリフルオロ酢酸 (2.5 mL) で 0 で処理した。得られる溶液を、栓をしたフラスコ中、周囲温度で 1 時間置き、次に 30% 水性  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (30 mL) と  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (30 mL) との間に分配した。下部層を集めた。水性相を、ジクロロメタン (2 x 20 mL) で抽出し、集めた有機抽出物を、 $\text{H}_2\text{O}$  (1 x 20 mL) で洗浄した後に、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$  上で乾燥し、蒸発させた。残留物を、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1 mL) 中に溶解し、1, 2, 3 - ベンゾトリアゾール - 1 - イル 1 - メチル - 4 - (t - ブチルオキシ)カルボキシアミドピロール - 2 - カルボキシレート (0.11 g、0.32 mmol)、乾燥トリエチルアミン (0.06 g、0.03 mmol) を加えた。周囲温度で 1.5 時間攪拌した後、 $\text{CHCl}_3$  (100 mL) を加えた。この懸濁液を濾過し、濾液を 5%  $\text{NaHCO}_3$  (2 x 20 mL)、 $\text{H}_2\text{O}$  (2 x 20 mL) で抽出した。有機層を  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  上で乾燥し、蒸発乾燥した。15 の収量は 0.25 g (80%) であった。

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz, ppm) 8.17 (br s, 1 H)、7.98 (br s, 1 H)、7.96 (br s, 1 H)、7.85 (m, 4 H)、7.44 (m, 5 H)、7.09 (br s, 2 H)、7.02 (s, 1 H)、6.78 (br s, 1 H)、6.74 (br s, 1 H)、6.66 (s, 1 H)、6.58 (s, 3 H)、6.29 (t, 1 H)、4.18 (t, 2 H, J = 6 Hz)、3.78 (m, 14 H)、3.28 (m, 2 H)、2.60 (t, 2 H, J = Hz)、2.26 (t, 2 H, J = 6 Hz)、1.64 - 1.2 (m, 6 H)、1.48 (s, 9 H)。

2 - [ 4 - (フェニルアゾ)ベンジルチオ]エチル 5 - [ 1 - メチル - 4 - [ 1 - メチル - 4 - [ 1 - メチル - 4 - [ 1 - メチル - 4 - [ 1 - メチル - 4 - (t - ブチルオキシ)カルボキシアミドピロール - 2 - カルボキシアミド]ピロール - 2 - カルボキシアミド]ピロール - 2 - カルボキシアミド]ピロール - 2 - カルボキシアミド]ペンチルカルボキシレート (16)。

乾燥  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 mL) 中の 15 (0.65 g、0.67 mmol) の溶液を、トリフルオロ酢酸 (5 mL) で 0 で処理した。得られる黄色がかった溶液を、栓をしたフラスコ中、周囲温度で 1 時間置き、次に 30% 水性  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (30 mL) と  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (30 mL) との間に分配した。下部層を集めた。水性相を、ジクロロメタン (2 x 20 mL) で抽出し、集めた有機抽出物を、 $\text{H}_2\text{O}$  (1 x 20 mL) で洗浄した後に、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$  上で乾燥し、蒸発させた。残留物を DMF (1 mL) 中に溶解し、1, 2, 3 - ベンゾトリアゾール - 1 - イル 1 - メチル - 4 - (t - ブチルオキシ)カルボキシアミドピロール - 2 - カルボキシレート (0.24 g、0.67 mmol)、乾燥トリエチルアミン (0.13 g、0.67 mmol) を加えた。周囲温度で 3 時間攪拌した後、反応混合物を酢酸ブチルと共に同時蒸発して蒸発乾燥した。残留物を、 $\text{CHCl}_3$  中の 2.5% DMF 3 mL に溶解した。 $\text{CHCl}_3$  (2.5% DMF) 中 0% ~ 2.5% メタノールを用いてシリカゲル (100 g) でクロマトグラフィーにかけて、0.67 g (45%) の 16 を得た。

2, 3, 5, 6 - テトラフルオロフェニル - 4' - [ビス(2 - クロロエチル)アミノ]フェニルブチレート (Chlorambucil 2, 3, 5, 6 - テトラフルオロフェニルエステル)。

乾燥ジクロロメタン 5 mL 中の、chlorambucil (Fluka A.G. によって供給) 0.25 g (0.82 mmol)、2, 3, 5, 6 - テトラフルオロフェニルトリフルオロアセテート 0.3 g (1.1 mmol) の溶液に、乾燥トリエチルアミン 0.2 mL を加えた。混合物をアルゴン下、室温で 0.5 時間攪拌し、蒸発させた。残留油を、溶離剤としてヘキサン/クロロホルム

10

20

30

40

50

(2 : 1) を用いてシリカゲルでカラムクロマトグラフィーにかけて精製し、エステルを油状物として得た (0.28 g (75%))。

シリカゲル上の TLC (CHCl<sub>3</sub>) R<sub>f</sub> 0.6 ; IR (CHCl<sub>3</sub> 中) 3010、1780、1613、1521、1485 cm<sup>-1</sup>。

#### オリゴヌクレオチドの第一アミノ基への、chlorambucil 残基の導入

オリゴヌクレオチドのセチルトリメチルアンモニウム塩の製造 :

一般にトリエチルアンモニウム塩のオリゴヌクレオチド (50 μg ~ 500 μg) の水溶液 100 μL を、セチルトリメチルアンモニウム形態の Dowex 50wx8 を装填され、水中の 50% のアルコールで予備洗浄されたカラムに注入した。カラムを 50% 水性エタノールで溶離した (0.1 mL/分)。オリゴヌクレオチドを含有する画分を、Speedvac で 2 時間かけて乾燥し、続く反応に使用した。

10

オリゴヌクレオチドのセチルトリメチルアンモニウム塩 (50 μg ~ 100 μg) のエタノール溶液 (50 μL) を、アセトニトリル (50 μL) およびジイソプロピルエチルアミン (3 μL) 中の、2, 3, 5, 6 - テトラフルオロフェニル - 4' - [ビス (2 - クロロエチル) アミノ] フェニルブチレート (chlorambucil のテトラフルオロフェニルエステル) の 0.08 M 溶液と混合した。室温で 3 時間攪拌した後、アセトン中 2% LiClO<sub>4</sub> (1.5 mL) を用いて、生成物を沈殿させた。生成物をアセトン中 2% LiClO<sub>4</sub> を用いて、水 (60 μL) から 3 回再度沈殿させた。最終的に、オリゴヌクレオチドの chlorambucil 誘導体を、逆相クロマトグラフィーにかけて約 50% ~ 80% の収率で精製した。生成物を含有する画分を概ねブタノールによって濃縮した。分離したオリゴヌクレオチドの chlorambucil 誘導体を、LiClO<sub>4</sub> のアセトン溶液中で沈殿させ、アセトンで洗浄し、油ポンプの真空下に乾燥した。集めたクロマトグラフィー画分以降は、生成物を氷冷溶液に入れて、反応性オリゴヌクレオチドの全ての操作を可能な限り素早く行った。

20

#### オリゴヌクレオチド合成

全てのオリゴヌクレオチドは、製造業者から供給されるプロトコールを用いて、ABM 394 上の適切な CPG サポート 1 μmol から製造した。- シアノエチルホスホロアミダイト結合化学の標準試薬は、Glen Research から購入した。5' - アミノヘキシル改質は、N - MMT - ヘキサノールアミンホスホロアミダイトリンカー (Glen Research) を用いて導入した。3' - アミノヘキシル改質は、C.R.Petrie, M.W.Reed, A.D.Adams, および R.B.Meyer, Jr. Bioconjugate Chemistry, 1992, 3, 85-87 に記載のように製造される CPG を用いて導入した。

30

#### 複合体の製造 (反応式 3)

40 μL の乾燥 DMSO 中の、アミノヘキシル改質オリゴヌクレオチドのセチルトリメチルアンモニウム塩 (30 nmol ~ 50 nmol, Jost, J.-P., Jiricny, J., および Saluz, H. (1989) Quantitative precipitation of short oligonucleotides with low concentrations of cetyltrimethylammonium bromide. Nucleic Acids Res. 17, 2143) および N, N - ジイソプロピルエチルアミン 1.5 μL の溶液を、TFP エステル (1a、1b、2e、2f、または 3c) の 4 mM 溶液 40 μL に加えた。反応混合物を室温で 12 時間置いた。オリゴヌクレオチド関連物質が、アセトン中 2% LiClO<sub>4</sub> (1.5 mL) を加えることによって、沈殿した。ペレットをアセトンで洗浄し、真空乾燥した。ペレットを H<sub>2</sub>O 中 50% DMF (60 μL) 中に再度溶解し、アセトン中 LiClO<sub>4</sub> の 2% 溶液を用いて、前記と同様に再度沈殿させた。この手順を 2 回繰り返した。残留物を、50 mM LiClO<sub>4</sub> の存在下の 20% ~ 75% のアセトニトリルの勾配を用いて HPLC (4.6 x 250 mm, C - 18, Dynamax-300A, Rainin) にかけて精製した。純生成物を含有する画分を、Speedvac を用いて真空乾燥した。残留物を、60 μL ~ 80 μL の H<sub>2</sub>O 中に溶解し、アセトン中 2% LiClO<sub>4</sub> (1.5 mL) を用いて沈殿させた。アセトン (2 x 1.5 mL) での洗浄および真空乾燥の後、ペレットを 100 μL の H<sub>2</sub>O に溶解した。最終生成物の収率は 20% ~ 50% であった。

40

4 - アミノ - N - メチルピロール - 2 - カルボン酸残基を担持するオリゴヌクレオチド複合体の製造に、Godovikova らの改良法 (T.S.Godovikova, V.F.Zarytova, T.V.Maltzeva, L.M

50

.Khalimskaya.Bioorgan.Khim.,1989,15,1246-1259)を用いた。100 $\mu$ Lの乾燥DMF中の、3'-ホスフェート含有オリゴヌクレオチドのセチルトリメチルアンモニウム塩(50nmol~100nmol)、トリフェニルホスピン(10mg)、2,2'-ジピリジルジスルフィド(10mg)、N,N-ジメチルアミノピリジン(10mg)、および化合物11~16から選択される類似体のうちの1つの溶液を、室温で20分間培養した。アセトン中2%LiClO<sub>4</sub>(1.5mL)を加えることによって、オリゴヌクレオチド関連物質を沈殿させた。ペレットをアセトンで洗浄し、真空乾燥した。残留物を、50mM LiClO<sub>4</sub>の存在下の20%~75%のアセトニトリルの勾配を用いてHPLCによって精製した。純生成物を含有する画分を、Speedvacを用いて真空乾燥した。残留物を60 $\mu$ L~80 $\mu$ LのH<sub>2</sub>Oに溶解し、アセトン中2%LiClO<sub>4</sub>(1.5mL)で沈殿させた。アセトン(2x1.5mL)での洗浄および真空乾燥の後に、ペレットを100 $\mu$ LのH<sub>2</sub>Oに溶解した。最終生成物の収率は、30%~50%であった。

10

#### 複合体の製造(反応式4)

1 $\mu$ mol規模での合成において得られたCPG含有5'-アミノヘキシル誘導オリゴヌクレオチドを、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>中の2%ジクロロ酢酸で処理して、アミノ基から9-フルオレニルメトキシカルボニル(Fmoc)保護基を除去し、続いて、アセトニトリルで洗浄し、アルゴンでのフラッシングによって乾燥した。CPGを1.5mLプラスチック管に移し、無水DMSO中のTFPEステルの50mM溶液100 $\mu$ Lを加えた。プラスチック管を24時間シェークし、次に3x1.5mL DMSO、2x1.5mLアセトンで洗浄し、真空乾燥した。CPGを、濃アンモニアで処理して、標準条件を用いてオリゴヌクレオチドを脱保護した。得られる反応混合物を、前記と同様に逆相HPLCによって分離した。典型的な収率は約50%であった。

20

#### 熱変性試験

4-アミノ-N-メチルピロール-2-カルボン酸残基を担持するオリゴヌクレオチド複合体の光学溶解曲線を、200mM NaCl、10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.1mM EDTA(pH7.0)において、この目的のために特別にデザインされた温度調節セル中のMilichrom液体クロマトグラフのUV検出器で得た。データを集め、S.G.Lokhovらによって記載のように(S.G.Lokhov,M.A.Podyminogin,D.S.Sergeev,V.N.Silnikov,I.V.Kutyavin,G.V.Shishkin,V.F.Zarytova.Bioconjugate Chem.1992,3,414)、パソコンで処理した。

1,2-ジヒドロ-3H-ピロロ[3,2-e]インドール-7-カルボン酸(CDPI)残基を担持するオリゴヌクレオチド複合体を、140mM KCl、10mM MgCl<sub>2</sub>、20mM HEPES-HCl(pH7.2)において、PTP-6自動マルチセル温度プログラマーを有するLambda 2(Perkin Elmer)分光光度計上で、溶解させた。複合体の溶解温度(T<sub>m</sub>)を、最大誘導体(derivative maxima)から求めた。

30

#### プライマー延長反応

プライマー延長反応を、LeeらによってBiochemistry(1994)33:6024-6030に以前に記載されているように行った。鋳型、プライマー、および封鎖ODNの最終濃度は、それぞれ、5x10<sup>-10</sup>M、4x10<sup>-8</sup>Mおよび10<sup>-9</sup>Mであった。プライマー延長を、45で15分間で行い、前記文献に記載のように、変性ゲル電気泳動によって、生成物を分析した。

40

封鎖ODNの不存在下においては、プライマー延長反応が、配列ゲル中で未分解バンドとして移動する高分子量生成物を発生させた。休止部位(pause sites)または自発的終止事象(spontaneous termination events)に対応する弱いバンドは、全ての反応混合物中において再現的に観察された。標的に対して十分に相補的な、未改質の16-マーおよび32-マーODNは、プライマー延長を封鎖できなかった。また、それぞれCDPI<sub>3</sub>基に3'-結合された相補的8-マーおよび16-マーODNも活性がなかった。5'-結合CDPI<sub>3</sub>を有する十分に相補的な16-マーODNだけが、プライマー延長をT7 DNAポリメラーゼによって抑止した。同様の5'改質を有する相補的8-マーODNは、極微量の封鎖生成物を発生させたただであった。対照標準ODNは、プライマー延長の阻止に、相補的ODNおよび共有結合MGBの両方が必要であることを確認した。それぞれ

50



5' - 結合 C D P I<sub>3</sub> ペプチドを有する 2 つの単一不適正 16 - マー O D N は、完全に適正の O D N - M G B 複合体よりもかなり低い程度に抑止的であった。当モル量の遊離 C D P I<sub>3</sub> と一緒に未改質 16 - マー O D N を加えても、プライマー延長に何の効果もなく、このことは M G B と O D N の結合の重要性を強調するものである。5' アクリジン成分が、M G B の代わりに、十分に相補的な 16 - マー O D N に結合したとき、抑止活性の損失が見られた。

#### 細胞培養架橋実験

O D N - M G B 複合体は、D Q 1 対立遺伝子の鋳型鎖のヌクレオチド 8 1 5 - 8 6 4 に相補的であった (Proc.Natl.Acad.Sci.USA (1983) 80:7313-7317)。この実験で用いられたヒト BSM B - 細胞は、この対立遺伝子にホモ接合であり、それを構造的に発現する。O D N を加える前に、B S M 細胞を、25 mL フラスコ中で、培地 1 mL につき細胞  $4.5 \times 10^6$  個の密度に増殖させた。各処理のために、培養基の 2 mL アリコートからの細胞を、ペレット化し、0、1、10、または 50  $\mu$ M の 50 - マー chlorambucil 結合 O D N (3' 結合 C D P I<sub>3</sub> 基を有するか有さないかのいずれか) を含有する無血清培地 200  $\mu$ L に懸濁させた。各サンプルを、48 穴のマイクロタイタープレート中で、5% CO<sub>2</sub> で、37 °C で 3.5 時間で培養した。次に細胞を Eppendorf 0.5 mL 遠心分離管に移し、2000 rpm で 5 分間でペレット化し、500  $\mu$ L 燐酸緩衝溶液 (P B S) で 2 回洗浄し、プロテイナーゼ K/SDS を用いて 37 °C で一夜、除タンパク質化した。フェノール/クロロホルム抽出、および Rnase A 消化の後に、D N A を 1 M ピロリジンを用いて 90 °C で 30 分間で処理した。ピロリジンをエタノール沈殿によって除去し、連結反応媒介ポリメラーゼ鎖反応 (P C R) (ligation-mediated polymerase chain reaction (PCR)) を、Lee ら (Biochemistry (1994) 33:6024-6030) によって記載されているように行った。増幅された D N A を配列ゲルで分析し、chlorambucil 含有 O D N による標的のアルキル化から生じたと考えられる配列特異的ニックを視覚化した。結果は、O D N 上のクロスリンカーに近接する標的上のヌクレオチドにおいて開裂を示し、C D P I<sub>3</sub> 含有 50 - マーが、配列中に 0302 対立遺伝子の特異的にアルキル化する M G B を持たない同一の O D N よりも 10 倍有効であることを示した。

完全培地は下記の成分から調製された (HI-FCS が不足している無血清培地) :

L - グルタミン (2 mM) を含む 500 mL の RPMI 1640 (Gibco BRL Cat.No.11875-036)。

50 mL の HI-FCS (Gibco BRL Cat.No.26140, 55 °C で 30 分間の熱不活性化)。

5 mL の 100X Penn/Strep (Gibco BRL Cat.No.15070-022)。

5 mL の 200 mM L - グルタミン (Gibco BRL Cat.No.25030-024)。

5 mL の 100X ピルピン酸ナトリウム (11 mg/mL ; Gibco BRL Cat.No.11840-030 から製造)。

5 mL の 1 M HEPES、pH 7.3 (Gibco BRL Cat.No.15630-023)。

#### 配列リスト

(1) 一般情報

(i) 出願人 : Microprobe Corporation, Bothell WA 98021

(ii) 発明の名称 : 共有結合オリゴヌクレオチドマイナー

(iii) 配列の数 : 2

(iv) 通信住所 :

(A) 宛名 : KLEIN & SZEKERES

(B) 通り : 4199 Campus Drive, Suite 700

(C) 市 : Irvine

(D) 州 : CA

(E) 国 : USA

(F) 郵便番号 : 92715

(v) コンピューター読み出し形態 :

(A) 媒体種類 : フロッピーディスク

10

20

30

40

50

- ( B ) コンピューター : IBM PC互換性
- ( C ) 操作システム : PC-DOS/MS-DOS
- ( D ) ソフトウェア : PatentIn Release #1.0,Version #1.25
- ( vi ) 現在の出願データ :
- ( A ) 出願番号 : US 08/415,370
- ( B ) 出願日 : 1995年4月3日
- ( C ) 分類 :

- ( viii ) 弁理士/代理人情報 :
- ( A ) 氏名 : Szekeres,Gabor L
- ( B ) 登録番号 : 28,675
- ( C ) 参照/事件番号 : 491-09-PA

10

- ( ix ) 電気通信情報 :
- ( A ) 電話 : 714-854-5502
- ( B ) ファックス : 714-854-5502
- ( 2 ) 配列同定番号 1 の情報 :

- ( i ) 配列特徴 :
- ( A ) 長さ : 50塩基対
- ( B ) 種類 : 核酸
- ( C ) 鎖構造 : 1本鎖
- ( D ) トポロジー : 線状

20

- ( xi ) 配列記載 : 配列同定番号 1

GGTTATTTTT GAAGATACGA ATTCUCCAG AGACACAGCA GGATTTGTCA

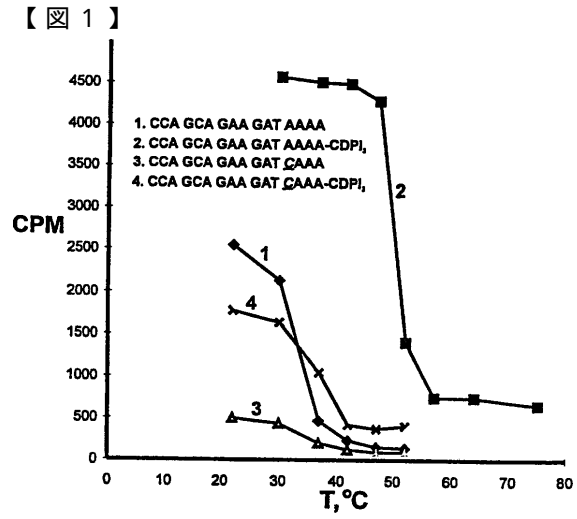
- ( 2 ) 配列同定番号 2 の情報 :

- ( i ) 配列特徴 :
- ( A ) 長さ : 16塩基対
- ( B ) 種類 : 核酸
- ( C ) 鎖構造 : 1本鎖
- ( D ) トポロジー : 線状

- ( xi ) 配列記載 : 配列同定番号 2

TTTTTTTTTT TTTTT

30



未改質ODNまたは3'-ODN-CDPI<sub>3</sub>結合体の、M13 mp19 (+) 鎖DNAへの、スロットプロットハイブリッド形成。下線が付されたヌクレオチドは、標的プラスミド配列との不適合を表す。

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
 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

(74)代理人 100068526

弁理士 田村 恭生

(74)代理人 100083356

弁理士 柴田 康夫

(72)発明者 カトヤビン, イゴール・ブイ

アメリカ合衆国 9 8 0 1 2 ワシントン州 ボゼル、ノース・ロード・ナンバー・ビー 1 0 1、1 6  
5 2 0 番

(72)発明者 ルクタノフ, ユージェニー・エイ

アメリカ合衆国 9 8 0 1 2 ワシントン州 ボゼル、ノース・ロード 1 6 5 2 0 番 アパートメント  
・ナンバー・イー - 2 0 6

(72)発明者 ガンパー, ハワード・ビー

アメリカ合衆国 9 8 0 7 8 ワシントン州 ウッディンビル、トゥハンドレッドトゥエルフス・ドラ  
イブ・ノース・イースト 1 4 0 4 8 番

(72)発明者 メイヤー, リッチ・ビー・ジュニア

アメリカ合衆国 9 8 0 1 1 ワシントン州 ボゼル、シックスティファースト・アベニュー・ノース  
・イースト 1 5 5 3 3 番

## 合議体

審判長 内田 淳子

審判官 上條 のぶよ

審判官 穴吹 智子

(56)参考文献 国際公開第 9 6 / 0 6 8 3 1 (WO, A 1)

JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, 1  
9 9 0, Vol. 1 1 2, No. 9, pp. 3 2 7 9 - 3 2 8 9

Bioconjugate Chemistry, 1 9 9 5, Vol. 6, No. 4,  
pp. 4 1 8 - 4 2 6

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K

C07H

CAPLUS(STN)

REGISTRY(STN)

MEDLINE(STN)

BIOSIS(STN)

EMBASE(STN)