

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4281976号  
(P4281976)

(45) 発行日 平成21年6月17日(2009.6.17)

(24) 登録日 平成21年3月27日(2009.3.27)

(51) Int.Cl.

F I

<b>C07D</b> 405/04 (2006.01)	<b>C07D</b> 405/04	<b>CSP</b>
<b>C07F</b> 9/6558 (2006.01)	<b>C07F</b> 9/6558	
<b>C07H</b> 21/00 (2006.01)	<b>C07H</b> 21/00	
<b>C12N</b> 15/09 (2006.01)	<b>C12N</b> 15/00	<b>A</b>
<b>C12Q</b> 1/68 (2006.01)	<b>C12Q</b> 1/68	<b>Z</b>

請求項の数 21 (全 18 頁)

(21) 出願番号 特願平10-513261  
 (86) (22) 出願日 平成9年9月11日(1997.9.11)  
 (65) 公表番号 特表2001-502665(P2001-502665A)  
 (43) 公表日 平成13年2月27日(2001.2.27)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP1997/004972  
 (87) 国際公開番号 W01998/011104  
 (87) 国際公開日 平成10年3月19日(1998.3.19)  
 審査請求日 平成16年7月30日(2004.7.30)  
 (31) 優先権主張番号 19637042.6  
 (32) 優先日 平成8年9月12日(1996.9.12)  
 (33) 優先権主張国 ドイツ(DE)

(73) 特許権者 591215177  
 ロシュ ダイアグノスティックス ゲーエム  
 ムペーハー  
 ドイツ連邦共和国 68298 マンハイム,  
 サンドホファーシュトラッセ 116  
 (74) 代理人 100091096  
 弁理士 平木 祐輔  
 (74) 代理人 100096183  
 弁理士 石井 貞次  
 (74) 代理人 100118773  
 弁理士 藤田 節  
 (72) 発明者 ミュルガー, クラウス  
 ドイツ連邦共和国 デイー—82398  
 ポーリン, レーメルシュトラッセ 7

最終頁に続く

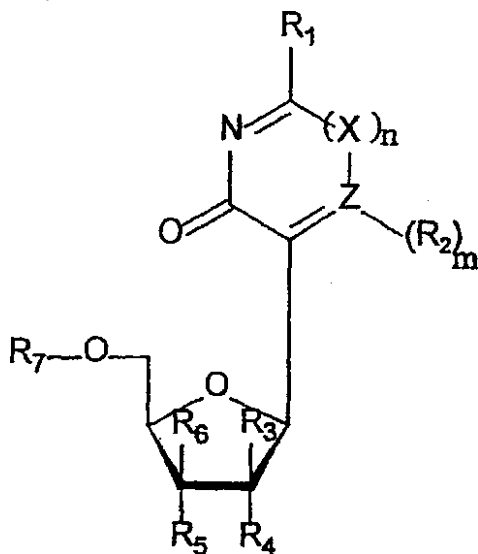
(54) 【発明の名称】 複素環式化合物および核酸検出におけるその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

一般式：

【化1】



〔式中、

$R_1$ および $R_2$ は、同一でも異なってもよく、水素、酸素、ハロゲン、ヒドロキシ、チオ、アミノ、カルボキシ、低級アルキル、低級アルケニル、低級アルキニル、アリール、低級アルキルオキシ、アリールオキシ、アラルキル、アラルキルオキシ、またはリポーター基を表し、

$R_3$ および $R_4$ は、それぞれが水素、ヒドロキシ、チオ、アミノ、低級アルキルオキシ、低級アルケノキシ、低級アルキノキシ、またはリポーター基を表し、

$R_5$ は、水素、ヒドロキシ、チオ、アミノ基、反応性の3価もしくは5価リン基、またはリポーター基を表し、

$R_4$ と $R_5$ は、一緒になって、C - 2' とC - 3' 間の追加の結合またはアセタール基を形成していてもよく、

$R_6$ は、水素、ヒドロキシ、チオ、またはアミノ基を表し、

$R_7$ は、水素、モノホスフェート、ジホスフェートまたはトリホスフェート基を表し、

Xは、ハロゲン、ヒドロキシ、チオ、アミノ、カルボキシ、低級アルキル、低級アルケニル、低級アルキニル、アリール、低級アルキルオキシ、アリールオキシ、アラルキル、アラルキルオキシまたはリポーター基で置換されたメチンもしくはメチレン、あるいは酸素を表し、そしてnは0または1であり、

Zは窒素または炭素を表す、ただし、Zが窒素を表すときはmはゼロ(0)であり、Xがメチレン、置換メチレンまたは置換メチンを表すときZは炭素であることはなく、Xが酸素を表すときZは窒素であることはなく、

化合物はリポーター基で修飾されており、かつ該リポーター基はジゴキシゲニン、フルオレセインまたはローダミンである]

で表される化合物、並びにその可能な互変異性体および塩。

【請求項2】

$R_1$ が酸素を表し、 $R_2$ が水素またはリポーター基を表し、 $R_3$ と $R_4$ が水素を表し、 $R_5$ がヒドロキシ、水素、反応性の3価もしくは5価リン基を表し、 $R_6$ が水素を表し、そして $R_7$ が水素、モノホスフェート、ジホスフェートまたはトリホスフェート基を表す、請求項1に記載の化合物。

【請求項3】

$R_1$ が水素、ヒドロキシ、アミノ基、またはリポーター基を表し、 $R_2$ がアミノ基、またはリポーター基を表し、 $R_3$ が水素を表し、 $R_4$ が水素、ヒドロキシ、アミノ、低級アルキルオキシ、低級アルケノキシ、低級アルキノキシを表し、 $R_5$ が水素、ヒドロキシ、チオ、ホスホルアミダイト、またはリポーター基を表し、または $R_4$ と $R_5$ が一緒になってアセタール基を表し、 $R_6$ が水素を表し、そして $R_7$ がトリホスフェート基を表す、請求項1に記載の化合物。

【請求項4】

Xが酸素を表しかつ同時にZが $R_2$ で置換された炭素を表すか、Zが窒素を表しかつ同時にXがアミノにより、カルボキシにより、またはリポーター基により置換されたメチンもしくはメチレンを表す、請求項1に記載の化合物。

【請求項5】

Xが酸素で、Zがアミノにより、カルボキシにより、またはリポーター基により置換されたメチンを表す、請求項1に記載の化合物。

【請求項6】

基 $R_4$ および $R_5$ のアセタール基がリポーター基で置換されている、請求項1に記載の化合物。

【請求項7】

DNAおよびRNAポリメラーゼの基質としての化合物、並びにその可能な互変異性体および塩、の使用であって、該化合物は、以下の一般式：

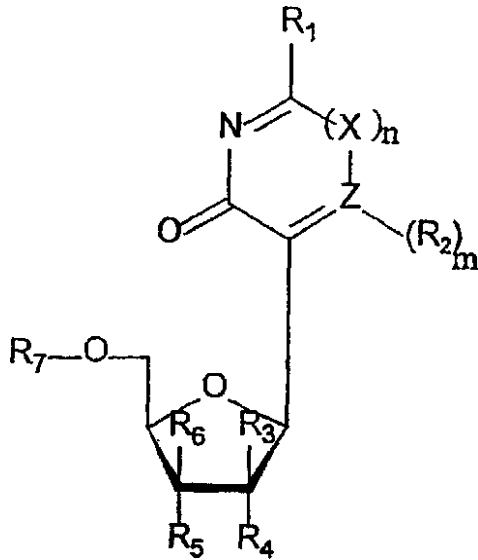
10

20

30

40

## 【化2】



10

〔式中、

$R_1$ および $R_2$ は、同一でも異なってもよく、水素、酸素、ハロゲン、ヒドロキシ、チオもしくは置換チオ、アミノもしくは置換アミノ、カルボキシ、低級アルキル、低級アルケニル、低級アルキニル、アリール、低級アルキルオキシ、アリールオキシ、アラルキル、アラルキルオキシ、またはリポーター基を表し、

20

$R_3$ および $R_4$ は、それぞれが水素、ヒドロキシ、チオもしくは置換チオ、アミノもしくは置換アミノ、低級アルキルオキシ、低級アルケノキシ、低級アルキノキシ、保護基、またはリポーター基を表し、

$R_5$ は、水素、ヒドロキシ、チオもしくは置換チオ、アミノもしくは置換アミノ基、反応性の3価もしくは5価リン基、適当な方法で切断できるエステルもしくはアミド残基、またはリポーター基を表し、

$R_4$ と $R_5$ は、一緒になって、C-2'とC-3'間の追加の結合またはアセタール基を形成していてもよく、

$R_6$ は、水素、ヒドロキシ、チオもしくは置換チオ、アミノもしくは置換アミノ基を表し

30

$R_7$ は、水素、モノホスフェート、ジホスフェートもしくはトリホスフェート基、またはこのリン酸エステルの、もしくはチオホスフェート類似体、または保護基を表し、 $X$ は、ハロゲン、ヒドロキシ、チオもしくは置換チオ、アミノもしくは置換アミノ、カルボキシ、低級アルキル、低級アルケニル、低級アルキニル、アリール、低級アルキルオキシ、アリールオキシ、アラルキル、アラルキルオキシまたはリポーター基で置換されたメチンもしくはメチレン、あるいは酸素を表し、そして $n$ は0または1であり、

$Z$ は窒素または炭素を表す、ただし、 $Z$ が窒素を表すときは $m$ はゼロ(0)であり、 $X$ がメチレン、置換メチレンまたは置換メチンを表すとき $Z$ は炭素であることはなく、 $X$ が酸素を表すとき $Z$ は窒素であることはなく、

40

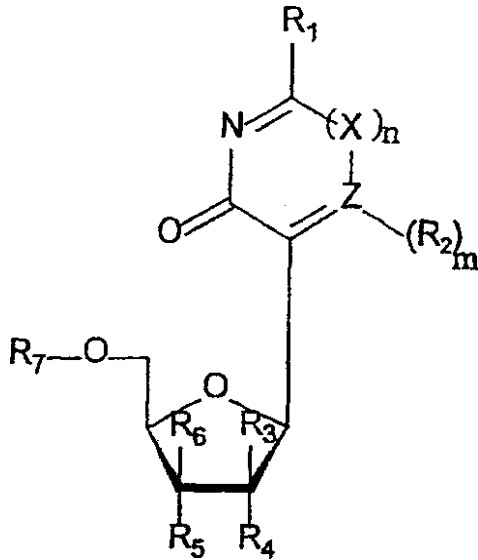
該化合物はリポーター基で修飾されている]

で表される、上記使用。

【請求項8】

核酸をラベルするための化合物、並びにその可能な互変異性体および塩、の使用であって、該化合物は、以下の一般式：

## 【化3】



10

〔式中、

$R_1$ および $R_2$ は、同一でも異なってもよく、水素、酸素、ハロゲン、ヒドロキシ、チオもしくは置換チオ、アミノもしくは置換アミノ、カルボキシ、低級アルキル、低級アルケニル、低級アルキニル、アリール、低級アルキルオキシ、アリールオキシ、アラルキル、アラルキルオキシ、またはリポーター基を表し、

20

$R_3$ および $R_4$ は、それぞれが水素、ヒドロキシ、チオもしくは置換チオ、アミノもしくは置換アミノ、低級アルキルオキシ、低級アルケノキシ、低級アルキノキシ、保護基、またはリポーター基を表し、

$R_5$ は、水素、ヒドロキシ、チオもしくは置換チオ、アミノもしくは置換アミノ基、反応性の3価もしくは5価リン基、適当な方法で切断できるエステルもしくはアミド残基、またはリポーター基を表し、

$R_4$ と $R_5$ は、一緒になって、C - 2' と C - 3' 間の追加の結合またはアセタール基を形成していてもよく、

$R_6$ は、水素、ヒドロキシ、チオもしくは置換チオ、アミノもしくは置換アミノ基を表し

30

、  
 $R_7$ は、水素、モノホスフェート、ジホスフェートもしくはトリホスフェート基、またはこのリン酸エステルの、もしくはチオホスフェート類似体、または保護基を表し、  
Xは、ハロゲン、ヒドロキシ、チオもしくは置換チオ、アミノもしくは置換アミノ、カルボキシ、低級アルキル、低級アルケニル、低級アルキニル、アリール、低級アルキルオキシ、アリールオキシ、アラルキル、アラルキルオキシまたはリポーター基で置換されたメチンもしくはメチレン、あるいは酸素を表し、そしてnは0または1であり、

Zは窒素または炭素を表す、ただし、Zが窒素を表すときはmはゼロ(0)であり、Xがメチレン、置換メチレンまたは置換メチンを表すときZは炭素であることはなく、Xが酸素を表すときZは窒素であることはなく、

40

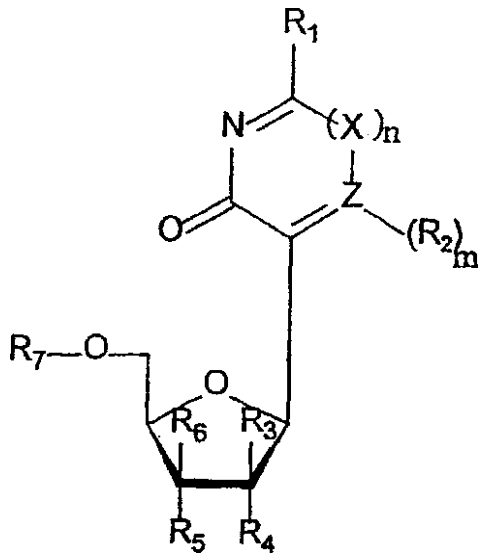
該化合物はリポーター基で修飾されている〕

で表される、上記使用。

【請求項9】

核酸を検出するための化合物、並びにその可能な互変異性体および塩、の使用であって、該化合物は、以下の一般式：

## 【化4】



10

〔式中、

$R_1$ および $R_2$ は、同一でも異なってもよく、水素、酸素、ハロゲン、ヒドロキシ、チオもしくは置換チオ、アミノもしくは置換アミノ、カルボキシ、低級アルキル、低級アルケニル、低級アルキニル、アリール、低級アルキルオキシ、アリールオキシ、アラルキル、アラルキルオキシ、またはリポーター基を表し、

20

$R_3$ および $R_4$ は、それぞれが水素、ヒドロキシ、チオもしくは置換チオ、アミノもしくは置換アミノ、低級アルキルオキシ、低級アルケノキシ、低級アルキノキシ、保護基、またはリポーター基を表し、

$R_5$ は、水素、ヒドロキシ、チオもしくは置換チオ、アミノもしくは置換アミノ基、反応性の3価もしくは5価リン基、適当な方法で切断できるエステルもしくはアミド残基、またはリポーター基を表し、

$R_4$ と $R_5$ は、一緒になって、C - 2' と C - 3' 間の追加の結合またはアセタール基を形成していてもよく、

$R_6$ は、水素、ヒドロキシ、チオもしくは置換チオ、アミノもしくは置換アミノ基を表し

30

$R_7$ は、水素、モノホスフェート、ジホスフェートもしくはトリホスフェート基、またはこのリン酸エステルの、もしくはチオホスフェート類似体、または保護基を表し、 $X$ は、ハロゲン、ヒドロキシ、チオもしくは置換チオ、アミノもしくは置換アミノ、カルボキシ、低級アルキル、低級アルケニル、低級アルキニル、アリール、低級アルキルオキシ、アリールオキシ、アラルキル、アラルキルオキシまたはリポーター基で置換されたメチンもしくはメチレン、あるいは酸素を表し、そして $n$ は0または1であり、

$Z$ は窒素または炭素を表す、ただし、 $Z$ が窒素を表すときは $m$ はゼロ(0)であり、 $X$ がメチレン、置換メチレンまたは置換メチンを表すとき $Z$ は炭素であることはなく、 $X$ が酸素を表すとき $Z$ は窒素であることはなく、

40

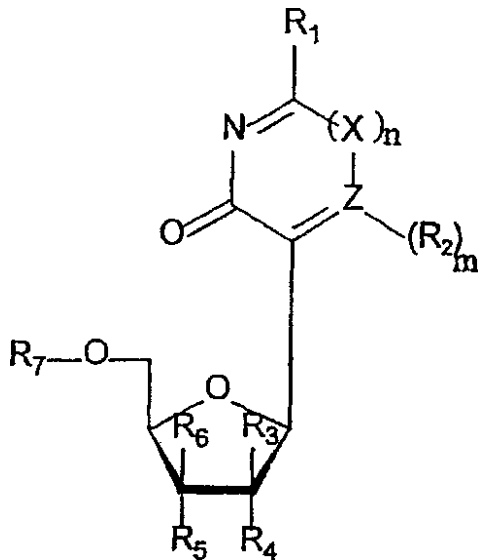
該化合物はリポーター基で修飾されている〕

で表される、上記使用。

【請求項10】

DNA塩基配列決定法における化合物、並びにその可能な互変異性体および塩、の使用であって、該化合物は、以下の一般式：

## 【化5】



10

〔式中、

$R_1$ および $R_2$ は、同一でも異なってもよく、水素、酸素、ハロゲン、ヒドロキシ、チオもしくは置換チオ、アミノもしくは置換アミノ、カルボキシ、低級アルキル、低級アルケニル、低級アルキニル、アリール、低級アルキルオキシ、アリールオキシ、アラルキル、アラルキルオキシ、またはリポーター基を表し、

20

$R_3$ および $R_4$ は、それぞれが水素、ヒドロキシ、チオもしくは置換チオ、アミノもしくは置換アミノ、低級アルキルオキシ、低級アルケノキシ、低級アルキノキシ、保護基、またはリポーター基を表し、

$R_5$ は、水素、ヒドロキシ、チオもしくは置換チオ、アミノもしくは置換アミノ基、反応性の3価もしくは5価リン基、適当な方法で切断できるエステルもしくはアミド残基、またはリポーター基を表し、

$R_4$ と $R_5$ は、一緒になって、C - 2' と C - 3' 間の追加の結合またはアセタール基を形成していてもよく、

$R_6$ は、水素、ヒドロキシ、チオもしくは置換チオ、アミノもしくは置換アミノ基を表し

30

、 $R_7$ は、水素、モノホスフェート、ジホスフェートもしくはトリホスフェート基、またはこのリン酸エステルの、もしくはチオホスフェート類似体、または保護基を表し、 $X$ は、ハロゲン、ヒドロキシ、チオもしくは置換チオ、アミノもしくは置換アミノ、カルボキシ、低級アルキル、低級アルケニル、低級アルキニル、アリール、低級アルキルオキシ、アリールオキシ、アラルキル、アラルキルオキシまたはリポーター基で置換されたメチンもしくはメチレン、あるいは酸素を表し、そして $n$ は0または1であり、

$Z$ は窒素または炭素を表す、ただし、 $Z$ が窒素を表すときは $m$ はゼロ(0)であり、 $X$ がメチレン、置換メチレンまたは置換メチンを表すとき $Z$ は炭素であることはなく、 $X$ が酸素を表すとき $Z$ は窒素であることはなく、

40

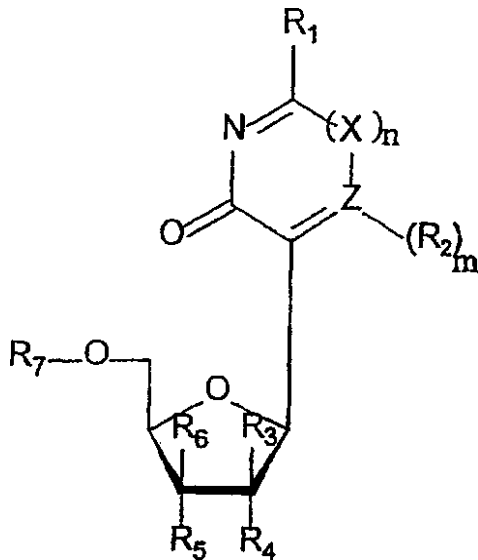
該化合物はリポーター基で修飾されている〕

で表される、上記使用。

【請求項11】

in situハイブリダイゼーションにおける化合物、並びにその可能な互変異性体および塩、の使用であって、該化合物は、以下の一般式：

## 【化6】



10

〔式中、

$R_1$ および $R_2$ は、同一でも異なってもよく、水素、酸素、ハロゲン、ヒドロキシ、チオもしくは置換チオ、アミノもしくは置換アミノ、カルボキシ、低級アルキル、低級アルケニル、低級アルキニル、アリール、低級アルキルオキシ、アリールオキシ、アラルキル、アラルキルオキシ、またはリポーター基を表し、

20

$R_3$ および $R_4$ は、それぞれが水素、ヒドロキシ、チオもしくは置換チオ、アミノもしくは置換アミノ、低級アルキルオキシ、低級アルケノキシ、低級アルキノキシ、保護基、またはリポーター基を表し、

$R_5$ は、水素、ヒドロキシ、チオもしくは置換チオ、アミノもしくは置換アミノ基、反応性の3価もしくは5価リン基、適当な方法で切断できるエステルもしくはアミド残基、またはリポーター基を表し、

$R_4$ と $R_5$ は、一緒になって、C - 2' と C - 3' 間の追加の結合またはアセタール基を形成していてもよく、

$R_6$ は、水素、ヒドロキシ、チオもしくは置換チオ、アミノもしくは置換アミノ基を表し

30

、  
 $R_7$ は、水素、モノホスフェート、ジホスフェートもしくはトリホスフェート基、またはこのリン酸エステルの、もしくはチオホスフェート類似体、または保護基を表し、  
Xは、ハロゲン、ヒドロキシ、チオもしくは置換チオ、アミノもしくは置換アミノ、カルボキシ、低級アルキル、低級アルケニル、低級アルキニル、アリール、低級アルキルオキシ、アリールオキシ、アラルキル、アラルキルオキシまたはリポーター基で置換されたメチンもしくはメチレン、あるいは酸素を表し、そしてnは0または1であり、

Zは窒素または炭素を表す、ただし、Zが窒素を表すときはmはゼロ(0)であり、Xがメチレン、置換メチレンまたは置換メチンを表すときZは炭素であることはなく、Xが酸素を表すときZは窒素であることはなく、

40

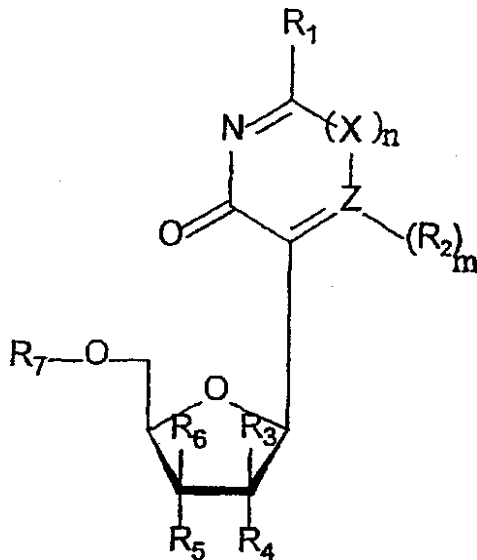
該化合物はリポーター基で修飾されている〕

で表される、上記使用。

【請求項12】

オリゴヌクレオチドの化学合成のための化合物、並びにその可能な互変異性体および塩、の使用であって、該化合物は、以下の一般式：

## 【化7】



10

〔式中、

$R_1$ および $R_2$ は、同一でも異なってもよく、水素、酸素、ハロゲン、ヒドロキシ、チオもしくは置換チオ、アミノもしくは置換アミノ、カルボキシ、低級アルキル、低級アルケニル、低級アルキニル、アリール、低級アルキルオキシ、アリールオキシ、アラルキル、アラルキルオキシ、またはリポーター基を表し、

20

$R_3$ および $R_4$ は、それぞれが水素、ヒドロキシ、チオもしくは置換チオ、アミノもしくは置換アミノ、低級アルキルオキシ、低級アルケノキシ、低級アルキノキシ、保護基、またはリポーター基を表し、

$R_5$ は、水素、ヒドロキシ、チオもしくは置換チオ、アミノもしくは置換アミノ基、反応性の3価もしくは5価リン基、適当な方法で切断できるエステルもしくはアミド残基、またはリポーター基を表し、

$R_4$ と $R_5$ は、一緒になって、C - 2' と C - 3' 間の追加の結合またはアセタール基を形成していてもよく、

$R_6$ は、水素、ヒドロキシ、チオもしくは置換チオ、アミノもしくは置換アミノ基を表し

30

$R_7$ は、水素、モノホスフェート、ジホスフェートもしくはトリホスフェート基、またはこのリン酸エステルの、もしくはチオホスフェート類似体、または保護基を表し、 $X$ は、ハロゲン、ヒドロキシ、チオもしくは置換チオ、アミノもしくは置換アミノ、カルボキシ、低級アルキル、低級アルケニル、低級アルキニル、アリール、低級アルキルオキシ、アリールオキシ、アラルキル、アラルキルオキシまたはリポーター基で置換されたメチンもしくはメチレン、あるいは酸素を表し、そして $n$ は0または1であり、

$Z$ は窒素または炭素を表す、ただし、 $Z$ が窒素を表すときは $m$ はゼロ(0)であり、 $X$ がメチレン、置換メチレンまたは置換メチンを表すとき $Z$ は炭素であることはなく、 $X$ が酸素を表すとき $Z$ は窒素であることはなく、

40

$R_7$ がホスホルアミダイトまたはH - ホスホネートを表し、

該化合物はリポーター基で修飾されている〕

で表される、上記使用。

【請求項13】

$R_1$ が酸素を表し、 $R_2$ が水素またはリポーター基を表し、 $R_3$ と $R_4$ が水素を表し、 $R_5$ がヒドロキシ、水素、反応性の3価もしくは5価リン基を表し、 $R_6$ が水素を表し、そして $R_7$ が水素、モノホスフェート、ジホスフェートまたはトリホスフェート基を表す、請求項7～12のいずれか1項に記載の使用。

【請求項14】

$R_1$ が水素、ヒドロキシ、アミノ基、場合により置換されたアミノ基、またはリポーター

50

基を表し、 $R_2$ が場合により置換されたアミノ基、またはリポーター基を表し、 $R_3$ が水素を表し、 $R_4$ が水素、ヒドロキシ、アミノもしくは置換アミノ、低級アルキルオキシ、低級アルケノキシ、低級アルキノキシを表し、 $R_5$ が水素、ヒドロキシ、チオ、場合により置換されたアミノ基、ホスホルアミダイト、またはリポーター基を表し、または $R_4$ と $R_5$ が一緒になってアセタール基を表し、 $R_6$ が水素を表し、そして $R_7$ がトリホスフェート基を表す、請求項7～12のいずれか1項に記載の使用。

【請求項15】

Xが酸素を表しかつ同時にZが $R_2$ で置換された炭素を表すか、Zが窒素を表しかつ同時にXがアミノもしくは置換アミノにより、カルボキシにより、またはリポーター基により置換されたメチンもしくはメチレンを表す、請求項7～12のいずれか1項に記載の使用

10

【請求項16】

Xが酸素で、Zがアミノもしくは置換アミノにより、カルボキシにより、またはリポーター基により置換されたメチンを表す、請求項7～12のいずれか1項に記載の使用。

【請求項17】

基 $R_4$ および $R_5$ のアセタール基がリポーター基で置換されている、請求項7～12のいずれか1項に記載の使用。

【請求項18】

リポーター基がハプテン、発蛍光団、金属キレート基、発光団、タンパク質またはインターカラーを表す、請求項7～12のいずれか1項に記載の使用。

20

【請求項19】

リポーター基がリンカー基を介して結合されている、請求項7～12のいずれか1項に記載の使用。

【請求項20】

請求項1～6に記載の化合物を1個または数個含有するオリゴヌクレオチド。

【請求項21】

請求項1～6に記載の化合物を1個または数個含有する核酸。

【発明の詳細な説明】

本発明は、核酸のラベリング、検出および配列決定に使用することができる複素環式化合物に関するものである。

30

核酸は遺伝情報の運搬および伝達物質として生物界で非常に重要なものである。F. Miescherによる核酸の発見以来、核酸は広範囲の科学的興味を喚起し、こうした興味が核酸の機能、構造および作用機序の解明へと導いた。

これらの関連性を説明しかつ諸問題を解決するための重要なツールは核酸の検出であり、すなわち、それらの配列（つまり、一次構造）に関してばかりでなくそれらの特異的検出に関しての核酸検出である。

核酸の特異的検出可能性は、核酸分子が他の核酸と相互作用して（すなわち、ハイブリダイズして）水素橋により塩基対を形成するというこれらの分子の性質に基づいている。したがって、相補的核酸（標的）を検出するためには、適当な方法でラベルした（すなわち、指示基を有する）核酸（プローブ）が用いられる。

40

核酸の一次構造（配列）、すなわち複素環式塩基の配列、の決定は塩基配列決定技術により達成される。その後、その配列の知識は、分子生物学的課題および実用的な技法のために核酸を特定の用途での基本的な要件となる。塩基配列決定にも、最終的に核酸同士の特異的ハイブリダイゼーションの原理が利用される。上述したように、そのためには、ラベルした核酸断片がやはり用いられる。

それゆえ、核酸の適切なラベリングはあらゆる検出法にとって不可欠の前提条件となっている。

初期の頃は、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ などの適当なアイソトープを用いた放射性ラベリングが主に用いられた。しかし、放射性試薬を用いることの欠点は明らかである。すなわち、この種の作業には特殊な設備と免許が必要なだけでなく、放射性廃棄物の管理された入念な処分が必

50

要である。放射性ラベリング用の試薬は高価である。また、ラベルしたプローブは上記核種の半減期が短いため長期間保存することが不可能である。

したがって、近年、これらの重大な欠点を回避するために、すなわち、放射性ラベルの使用から離れるために、多くの試みがなされている。しかし、この種のラベルの高感度は可能な限り高く保持されるべきである。

実際、すでに大きな進歩を遂げている [ 例えば、Nonradioactive Labeling and Detection of Biomolecules (Kessler, C. 編) Springer Verlag Berlin, Heidelberg 1992を参照のこと ]。

どのような核酸検出にあっても、必須要件は前もっておこなわれるラベリングである。上で示したように、それは非放射性の方法でおこなうことが望ましい。核酸の放射性ラベリングは通常、適切な放射性ヌクレオシド三リン酸の酵素触媒による組み込みによりおこなわれるが、非放射性ラベリングは適当なシグナルまたはリポーター基の組み込みによって達成する必要がある。

10

ハプテン (ピオチン、ジゴキシゲニンなど)、酵素 (アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼなど)、または蛍光色素 (フルオレセイン、ローダミンなど) は非放射性の指示分子として特に適していることが知られている。これらのシグナル発生基はいろいろなやり方で核酸に結合させたり、組み込ませたりすることができる。

比較的簡単な方法は例えば、上記のタイプの活性化された指示分子を用いて、末端アミノ基を有するオリゴヌクレオチドの5'末端をラベルすることである。しかし、この方法は1個または数個の指示分子を低分子オリゴマーに導入することを可能とするにすぎない。しかし、通常は、高感度を達成する目的で、より長鎖の高分子核酸のより濃密なラベリングを、ポリメラーゼを用いて、例えばde novo合成で、リポーター基をもつヌクレオシド三リン酸を組み込むことで達成する必要がある。

20

このような現在の方法はニック・トランスレーション [ Rigby, P.W.ら, (1977), J. Mol. Biol. 113, 237 ] およびランダム・プライムド・ラベリング [ random primed labeling; Feinberg, A.P. & Vogelstein, B. (1984) Anal. Biochem. 137, 266 ] として当業者には公知である。別の方法はターミナルトランスフェラーゼ酵素を用いるいわゆる3'末端付加反応である [ 例えば、Schmitz, G.ら (1991) Anal. Biochem. 192, 222 ]。

以前に使用されたヌクレオシド三リン酸は、ほとんど例外なく、デオキシリボヌクレオチド系列の複素環式塩基アデニン、グアニン、シトシンおよびチミン、またはリボヌクレオチド系列のアデニン、グアニン、シトシンおよびウラシルの適切に修飾された誘導体である。この種の誘導体は例えば、Langerら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 6635 (1981)、Muhleggerら, Biol. Chem. Hoppe-Seyler 371, 953 (1990) およびEP 0 063 879に記載されている。その場合、DNAおよびRNA中にもともと存在するビルディングブロックがラベルされた形 (すなわち、シグナル発生基をもつ形) で使用されている。

30

これらのN-ヌクレオシドの主な欠点は、N-グリコシド結合が酸性pH条件に対して感受性で、ヌクレアーゼにより分解されやすいということである。

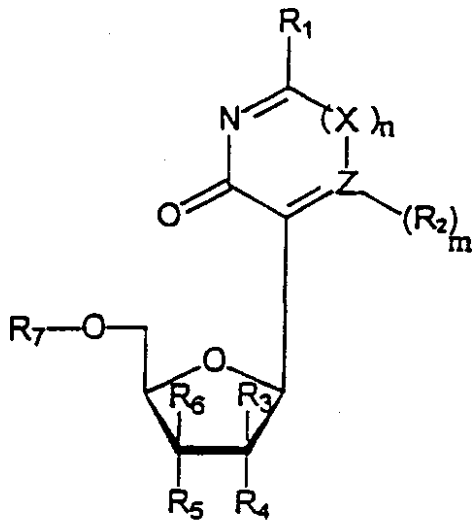
さらに、個々のC-ヌクレオシド (例えば、Suhadolnik, R.J., "Nucleoside Antibiotics", Wiley-Interscience, New York 1970を参照) および治療 (抗ウイルスまたは静癌) 分野におけるその使用も久しく知られている。また、蛍光C-ヌクレオシド誘導体とDNAおよびRNAオリゴヌクレオチドへのその組み込みがWO 93/16094に記載されている。しかし、これらヌクレオシドのいわゆる固有の蛍光は、フルオレセインや対応するローダミン誘導体のような特殊な蛍光体よりも量子効率の点で何倍も低いものである。自己蛍光C-ヌクレオシドの更なる欠点は、その励起および発光波長が比較的低いことである。その結果、このような誘導体に基づく検出系は検出感度が低だけでなく、スペクトル的に干渉する測定環境の影響 (生物学的物質、ゲルマトリックスの自己蛍光など) がきわめて大きく作用することとなる。それゆえ、既知のヌクレオシドおよびヌクレオシド誘導体は、核酸の検出に悪影響を及ぼす一連の欠点を抱えている。

40

したがって、本発明の課題は、上記の欠点のない、すなわち、特により安定であると同時に酵素的にプロセッシングされ、かつ実施可能な波長での核酸の検出に適している、核酸検

50

出用のシグナル発生基により修飾されたヌクレオシド誘導体を提供することである。  
この課題は、一般式 I の複素環式化合物並びにその可能な互変異性体および塩により解決される：



I

式中、

R<sub>1</sub>およびR<sub>2</sub>は、同一でも異なってもよく、水素、酸素、ハロゲン、ヒドロキシ、チオもしくは置換チオ、アミノもしくは置換アミノ、カルボキシ、低級アルキル、低級アルケニル、低級アルキニル、アリール、低級アルキルオキシ、アリールオキシ、アラルキル、アラルキルオキシ、またはリポーター基を表し、

R<sub>3</sub>およびR<sub>4</sub>は、それぞれが水素、ヒドロキシ、チオもしくは置換チオ、アミノもしくは置換アミノ、低級アルキルオキシ、低級アルケノキシ、低級アルキノキシ、保護基、またはリポーター基を表し、

R<sub>5</sub>は、水素、ヒドロキシ、チオもしくは置換チオ、アミノもしくは置換アミノ基、反応性の3価もしくは5価リン基（例えば、ホスホルアミダイト、H-ホスホネート基）、適当な方法で切断できるエステルもしくはアミド残基、またはリポーター基を表し、

R<sub>4</sub>とR<sub>5</sub>は、一緒になって、C-2'とC-3'の間の追加の結合またはアセタール基を形成し、

R<sub>6</sub>は、水素、ヒドロキシ、チオもしくは置換チオ、アミノもしくは置換アミノ基を表し、

R<sub>7</sub>は、水素、モノホスフェート、ジホスフェートもしくはトリホスフェート基、またはこのリン酸エステルの、もしくはチオホスフェート類似体、または保護基を表し、

Xは、ハロゲン、ヒドロキシ、チオもしくは置換チオ、アミノもしくは置換アミノ、カルボキシ、低級アルキル、低級アルケニル、低級アルキニル、アリール、低級アルキルオキシ、アリールオキシ、アラルキル、アラルキルオキシ、またはリポーター基で置換されたメチンもしくはメチレン、または酸素を表し、そしてnは0または1であり、

Zは窒素または炭素を表す、ただし、Zが窒素を表すときmはゼロ(0)であり、Xがメチレン、置換メチレンまたは置換メチンを表すときZは炭素であることはなく、また、Xが酸素を表すときZは窒素であることはない。

リポーター基としては、特にハプテン、発蛍光団、金属キレート基、発光団、タンパク質またはインターカレーターなど、あらゆる検出可能な基が含まれる。

一般式 I において基R<sub>4</sub>とR<sub>5</sub>のアセタール基がリポーター基で置換されている化合物が好ましいものである。リポーター基は直接結合していても、間接的に、すなわちリンカー基を介して結合していてもよい。

さらに、R<sub>1</sub>が酸素を表し、R<sub>2</sub>が水素またはリポーター基を表し、R<sub>3</sub>とR<sub>4</sub>が水素を表し、R<sub>5</sub>がヒドロキシ、水素、反応性の3価もしくは5価リン基を表し、R<sub>6</sub>が水素を表し、そしてR<sub>7</sub>が水素、モノホスフェート、ジホスフェートまたはトリホスフェート基を表す一般式 I

10

20

30

40

50

の化合物が特に適しているとわかった。

また、リポーター基がいわゆるリンカー基によって複素環またはテトラヒドロフラン環に結合している一般式 I の化合物も好適である。適当なリンカー基は当業者に公知である（例えば、Muhlegger, K.ら（1990）*Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 371, 953-965またはLivak, K.J.ら（1992）*Nucl. Acids Res.* 20, 4831-4837を参照のこと）。

さらに、一般式 I において $R_1$ が水素、ヒドロキシ、アミノ基、場合により置換されたアミノ基、またはリポーター基を表し、 $R_2$ が場合により置換されたアミノ基、またはリポーター基を表し、 $R_3$ が水素を表し、 $R_4$ が水素、ヒドロキシ、アミノもしくは置換アミノ、低級アルキルオキシ、低級アルケノキシ、低級アルキノキシを表し、 $R_5$ が水素、ヒドロキシ、チオ、場合により置換されたアミノ基、ホスホルアミダイト、またはリポーター基を表し、 $R_4$ と $R_5$ が一緒になってアセタール基を表し、 $R_6$ が水素を表し、そして $R_7$ がトリホスフェート基を表す化合物も好適である。

Xが酸素を表し、同時にZが $R_2$ で置換された炭素を表すか、Zが窒素を表し、同時にXがアミノもしくは置換アミノにより、カルボキシにより、またはリポーター基により置換されたメチンもしくはメチレンを表す式 I の化合物も好適である。

さらに好ましい具体例は、Xが酸素で、Zがアミノもしくは置換アミノ、カルボキシ、またはリポーター基により置換されたメチンを表す式 I に従う化合物である。

本発明による化合物はいろいろな方法で合成することができる。いくつかの場合には、天然に存在する前駆体、例えば、3-(3,4-ジヒドロキシ-5-ヒドロキシメチル-テトラヒドロフラン-2-イル)-ピロール-2,5-ジオンまたは3-(3,4-ジヒドロキシ-5-ヒドロキシメチル-テトラヒドロフラン-2-イル)-オキサジン-2,6-ジオン、から出発することができる。重要な3-(3-デオキシ-4-ヒドロキシ-5-ヒドロキシメチル-テトラヒドロフラン-2-イル)誘導体は、好ましくはBartonの方法（Barton, D.H.R. & Motherwell, W.B.（1981）*Pure Appl. Chem.* 53, 15）に従って脱酸素化することによって、これらの前駆体から合成される。

さらに、新規な複素環式化合物の化学合成は、例えば、K.A. Watanabe, “*Chemistry of Nucleosides and Nucleotides*” 3, 421-535 (L.B. Townsend編) Plenum Press, New York & London, 1994に詳述されるように実施することができる。

前記出発化合物の他の合成法は、例えば、Hosmane, R.S.ら, *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* 3, 2847 (1993) およびTownsend, L.B.ら, *Tetrahedron Lett.* 36, 8363 (1995) に記載されている。

核酸を異なった特定のシグナル発生基でラベルするために、それゆえ、核酸を検出して配列決定をおこなうために、本発明による化合物を使用することは、特に有利であることがわかった。

一般式 I の本発明による物質は、アデノシン、グアノシン、シチジン、チミジン、ウリジンなど、およびそれらの対応するリン酸エステルといった、古典的なヌクレオシドおよびヌクレオチドと比べて、多くの利点を有する。

一つの利点は化学的安定性、すなわち、酸性pH条件に対する安定性である。別の大きな利点は、これらの化合物がエンドヌクレアーゼとエキソヌクレアーゼによる酵素分解に対して安定であることである。こうした酵素は生物学的材料中に存在して、核酸の検出を著しく妨害することがある。一方、DNAおよびRNAポリメラーゼは、多かれ少なかれ修飾されたヌクレオシド5'-三リン酸の受け入れに関して、すなわち、de novo合成における基質としての前記ヌクレオチドの認識および取り込みに関して、厳格であることが知られている。経験上、ヌクレオチドへのシグナル基の結合は、特にそれらの組み込みおよび組み込み速度に影響を与えることが明らかである。

本発明による誘導体が、例えば前記のニック・トランスレーションやランダム・プライムド・ラベリングの方法において、非常に効率的に適当なポリメラーゼにより核酸に組み込まれるという事実は、先行技術からは予測できず、それゆえ、当業者には意外であると見なされるにちがいない。

前記方法は核酸の検出においてごく一般的に用いられ、例えば、プロッティング技術を用

10

20

30

40

50

いて膜上で定量的に検出するために、あるいはまた、マイクロタイタープレートにおいて検出するために用いられる。

塩基配列決定、すなわち、核酸配列の検出においては、短鎖（出発）オリゴヌクレオチド（プライマー）を用いて、かつまたラベルしたヌクレオシド三リン酸とポリメラーゼを添加して、配列決定すべき核酸に対する相補鎖を新たに合成し、続いていわゆる終結反応をおこない、そしてこの方法で生成された核酸断片をゲルクロマトグラフィーで分離する。ある遺伝子または遺伝子部分、つまりラベルしたヌクレオチドの特異的取り込み、を検出するための *in situ* ハイブリダイゼーションでは、原理的に同じことが細胞内で起こる。上記のプライマー、すなわち短鎖オリゴヌクレオチドは、鑄型鎖との安定した塩基対を形成すべきであり、最適な機能を確保するために内因性ヌクレアーゼにより攻撃されるべきでない。

10

これは古典的なヌクレオシドの代わりに本発明の化合物をビルディングブロックとして含有するオリゴヌクレオチドにより達成される。

同じことが、この種のビルディングブロックを含有するより長鎖のオリゴヌクレオチドおよび核酸にも当てはまる。これらもまた本発明の主題である。

したがって、対応するオリゴヌクレオチドと、いわゆるホスホルアミダイトおよびH-ホスホネートの形のそれらの製造前駆体も本発明の主題である。

今日では、オリゴヌクレオチドは通常、自動DNA/RNA合成機を使って固相法により公知の方法で製造される。

かかる合成法は本質的に、上記のホスホルアミダイトまたはH-ホスホネートの段階的反応、それゆえ、オリゴマーを形成するためのこれら単量体ビルディングブロックの連続結合、に基づいている（例えば、T. Brown & D.J.S. Brown, *Oligonucleotides and Analogue s-A Practical Approach*, (1991) (Eckstein, F. 編, IRL Press at Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyoを参照のこと)。

20

図面の説明

図1:

IおよびIIは、DIG-dUTPの組み込みによりラベルしたpBR 328-DNA（標準）を示し、IIIは、実施例6に従って合成した化合物3-(4-ヒドロキシ-5-トリホスホリル-テトラヒドロフラン-2-イル)-4-(ジゴキシゲニル-3-0-スクシニル-アミノカプロイルアミノ-ペンチル)-アミノ-ピロール-2,5-ジオンによりラベルしたpBR 328-DNAを示す。これらは10~0.01pgの濃度でゲルにアプライした。

30

以下の実施例により本発明をさらに詳しく説明する。

実施例1:

3-(4-ヒドロキシ-5-ヒドロキシメチル-テトラヒドロフラン-2-イル)-ピロール-2,5-ジオン

この化合物は、Hosmane, R.S.ら, *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* 3, 2847 (1993)に従って *de novo* 合成で製造した。

あるいはまた、この化合物は、発酵により得られる3,4-ジヒドロキシ誘導体（ショードマイシン: showdomycin）からBarton脱酸素化 [Barton, D.H.R. & Motherwell, W.B. (1981) *Pure Appl. Chem.* 53, 15] により得ることもできる。

40

実施例2:

3-(4-ヒドロキシ-5-ヒドロキシメチル-テトラヒドロフラン-2-イル)-4-プロモ-ピロール-2,5-ジオン

実施例1から得られた3-(4-ヒドロキシ-5-ヒドロキシメチル-テトラヒドロフラン-2-イル)-ピロール-2,5-ジオン213mg (1mmol)を、臭素を室温で飽和させた水25ml中に溶解し、室温で3時間攪拌した。その後ほんの少量の出発物質がTLCで観察された。この溶液から真空下で過剰の臭素を除去し、pH7に調整した後蒸発させて油状物を得た。この油状物を少量のメタノールに取り上げ、クロロホルム/メタノール8:2の混合物を用いてシリカゲルカラムで分離した。画分を蒸発させた後に淡黄色の油状物140mg (48%)を得た。

元素分析: C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>NO<sub>5</sub>Br (MW 292.2) として:

50

計算値 C 36.9 ; H 3.4 ; N 4.8 ; Br 27.4 ;

実測値 C 37.35 ; H 3.6 ; N 4.5 ; Br 27.8。

実施例 3 :

3-(4-ヒドロキシ-5-ヒドロキシメチル-テトラヒドロフラン-2-イル)-4-(1,5-ジアミノペンチル)-ピロール-2,5-ジオン

実施例 2 から得られた臭素化合物140mg (約0.5mmol) をエタノール50ml中に溶解し、ジアミノペンタン二塩酸塩1.75g (約10mmol) と混合し、還流下で5時間加熱した。TLC (シリカゲル、クロロホルム/メタノール8:2) により、変換反応は (ニンヒドリン陽性の臭素化合物のより低いスポットと対比して) ほぼ定量的であった。この反応混合物を真空下で蒸発させ、それ以上精製せずに実施例 4 で使用した。

10

実施例 4 :

3-(4-ヒドロキシ-5-ヒドロキシメチル-テトラヒドロフラン-2-イル)-4-(N-トリフルオロアセトアミドペンチル)-アミノ-ピロール-2,5-ジオン

実施例 3 からの油状残留物 (約2g) を無水ピリジン50ml中に溶解し、未溶解物質を吸引濾過で除き、濾液を真空下で蒸発乾固させた。これを無水ピリジン50mlに取り、無水トリフルオロ酢酸0.75ml (約5mmol) を加えた。室温に5時間放置した後、TLCで調べるとアシル化が完了していた。次に、この反応溶液を真空下で蒸発させ、メタノールと共に3回蒸発させた。これをエタノール約20mlに取り、濾過し、クロロホルム/メタノール9:1の混合物を用いてシリカゲルでクロマトグラフィーにかけた。画分を合わせ、蒸発させ、残留物をジオキサンに取って凍結乾燥させた。目的化合物が110mg (理論量の53%) 得られた。

20

元素分析 : C<sub>16</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>F<sub>3</sub> (MW 410.4) として :

計算値 C 46.8 ; H 5.6 ; N 10.2 ; F 13.9 ;

実測値 C 47.35 ; H 5.9 ; N 10.5 ; F 13.8。

実施例 5 :

3-(4-ヒドロキシ-5-トリホスホリル-テトラヒドロフラン-2-イル)-4-(N-トリフルオロアセトアミドペンチル)-アミノ-ピロール-2,5-ジオン

実施例 4 からの保護ヌクレオシド40mg (0.1mmol) を、Yoshikawaらの方法 [Tetrahedron Lett. 50, 5065 (1967)] に従って、POCl<sub>3</sub>でリン酸化して5'-モノホスフェートに変換した。この化合物を、Hoard & Ottの方法 [J. Am. Chem. Soc. 87, (1965)] に従って、カルボニルジイミダゾールで活性化してリン酸と反応させ、その後DEAE Sephadexによるイオン交換クロマトグラフィーにかけて、30mg (46%) の収量で目的のトリホスフェートを得た。

30

<sup>31</sup>P-NMR (0.1M EDTA/D<sub>2</sub>O/Eth<sub>3</sub>N) : -5.2 (d, P- ) ; -10.3 (d, P- ) ; -21.0 (t, P- )。

実施例 6 :

3-(4-ヒドロキシ-5-トリホスホリル-テトラヒドロフラン-2-イル)-4-(N-フルオレセイニル-カルボキサミド-ペンチル)-アミノ-ピロール-2,5-ジオン

実施例 5 からのトリフルオロアセチル保護化合物25mg (0.038mmol) を濃アンモニア液5ml中に室温で1時間放置し、その後真空下で蒸発させた。残留物を5mlの0.1Mホウ酸緩衝液pH8.5に取り、アミン不含のジメチルホルムアミド5mlに5(6)-カルボキシ-フルオレセイン-N-ヒドロキシ-スクシンイミドエステル25mg (0.05mmol) を溶解した溶液と混合した。これを室温で一夜放置した。この反応混合物をDEAE Sephadexカラム (30x1cm) にかけて、直線状のLiCl勾配 (200ml H<sub>2</sub>Oから0.4M LiCl) を用いて溶出した。相応の画分を合わせて蒸発させ、濃縮物をアセトン/エタノール (2:1) 中で沈殿させ、乾燥した後に、表題物質を25mg (約50%) 得た。

40

分光分析データ (0.1Mリン酸緩衝液pH9.0) :

励起<sub>max</sub> [nm] : 495 ;

発光<sub>max</sub> [nm] : 521

3-(4-ヒドロキシ-5-トリホスホリル-テトラヒドロフラン-2-イル)-4-(ジゴキシゲニル-3-0-スクシニル-アミノカプロイルアミノ-ペンチル)-アミノ-ピロール-2,5-ジオンは

50

、同様の方法で、実施例 5 からの化合物をジゴキシゲニン-3-0-スクシニル-アミノカプロン酸-N-ヒドロキシ-スクシンイミドエステルと反応させることにより製造した。

実施例 7 :

3-(4-ヒドロキシ-5-ヒドロキシメチル-テトラヒドロフラン-2-イル)-1,3-オキサジン-2,6-ジオン

発酵により得られた3,4-ジヒドロキシ誘導体(オキサジノマイシン: oxazinomycin)から Barton脱酸素化 [Barton, D.H.R. & Motherwell, W.B. (1981) Pure Appl. Chem. 53, 15] により、この化合物を得た。

実施例 8 :

3-(4-ヒドロキシ-5-ヒドロキシメチル-テトラヒドロフラン-2-イル)-4-ブromo-1,3-オキサジン-2,6-ジオン

10

実施例 2 に記載したとおりに実施例 7 からの出発化合物を臭素化することにより、この誘導体を得た。

実施例 9 :

3-(4-ヒドロキシ-5-ヒドロキシメチル-テトラヒドロフラン-2-イル)-4-(1,5-ジアミノペンチル)-1,3-オキサジン-2,6-ジオン

実施例 3 の方法に従って、実施例 8 からの臭素化合物150mg (0.5mmol) を表題化合物に変換した。これは、さらに精製することなく、実施例 4、5 および 6 の方法に従い、最終的にフルオレセインでラベルしたトリホスフェートと反応させた。

実施例 10 :

20

3-(4-ヒドロキシ-5-ヒドロキシメチル-テトラヒドロフラン-2-イル)-2,6-ジアミノ-5-クロロ-ピラジン

この誘導体は、Townsend, L.B.ら, Tetrahedron Lett. 36, 8363 (1995) に従って合成した。

実施例 11 :

3-(4-ヒドロキシ-5-ヒドロキシメチル-テトラヒドロフラン-2-イル)-2,6-ジアミノ-5-クロロ-ピラジン

実施例 10 からの3-(4-ヒドロキシ-5-ヒドロキシメチル-テトラヒドロフラン-2-イル)-2,6-ジヒドロキシ-5-クロロ-ピラジン264mg (1mmol) を、80%酢酸50ml とNaNO<sub>2</sub> 700mg (10mmol) の混合物中で脱アミノ化反応にかけた。室温で5時間放置した後TLCで調べると、この反応はほぼ完了していた。この反応混合物に尿素2gを添加して過剰の亜硝酸塩を分解し、室温でさらに3時間攪拌した。その後、この溶液を活性炭カラム(Carboraffin C, 容積約50ml) にかき、十分に洗浄し、目的生成物をエタノール/水/アンモニウムで溶出した。蒸発後に粘性の油状物230mg (約87%) を得、これはそれ以上精製せずに次の工程で使用した。

30

実施例 12 :

3-(4-ヒドロキシ-5-ヒドロキシメチル-テトラヒドロフラン-2-イル)-2,6-ジヒドロキシ-5-(1,8-ジアミノ-3,6-ジオキサ-オクチル)-ピラジン

実施例 11 からの油状物200mg (0.75mmol) をエタノール30ml 中に溶解し、1,8-ジアミノ-3,6-ジオキサ-オクタン555mg (3.75mmol) を添加し、これを約60℃で3時間加熱した。

40

続いて、溶媒とアミンをオイルポンプによる真空下で除き、残留物をそれ以上精製せずに、実施例 4 に記載したようにピリジン中で無水トリフルオロ酢酸と反応させた。

実施例 13 :

3-(4-ヒドロキシ-5-トリホスホリル-テトラヒドロフラン-2-イル)-2,6-ジヒドロキシ-5-[N-トリフルオロアセタミド-(3,6-ジオキサ)-オクチル]-アミノ-ピラジン

実施例 12 からのトリフルオールアセチル化誘導体150mgを、実施例 5 に記載したようにYoshikawaおよびHoard & Ottの方法に従って、表題化合物に変換した。DEAE Sephadexによるイオン交換クロマトグラフィー後に、目的のトリホスフェートを120mg (40%) の収量で得た。

<sup>31</sup>P-NMR (0.1M EDTA/D<sub>2</sub>O/Eth<sub>3</sub>N) : -5.1 (d, P- ) ; -10.6 (d, P- ) ; -20.8 (t, P-

50

)。

実施例14：

3-(4-ヒドロキシ-5-トリホスホリル-テトラヒドロフラン-2-イル)-2,6-ジヒドロキシ-5-[N-テトラメチル-ローダミニル-5,6-カルボキサミド-(3,6-ジオキサ)-オクチル]-アミノ-ピラジン

実施例13からのトリホスフェ-ト20mgを、(実施例6に記載したように)アンモニア液でトリフルオロアセチル保護基を切断した後に、実施例6に記載したとおりに0.1Mホウ酸ナトリウム緩衝液pH8.5/DMF中でテトラメチルローダミン-5(6)-カルボン酸-N-ヒドロキシ-スクシンイミドエステル20mgと反応させ、精製した。TMRでラベルした生成物12mgを得た。

10

分光分析データ(0.1Mホウ酸Na緩衝液pH8.5)：

励起<sub>max</sub> [nm]：551；

発光<sub>max</sub> [nm]：575

実施例15：

3-(4-ヒドロキシ-5-トリホスホリル-テトラヒドロフラン-2-イル)-4-(ジゴキシゲニル-3-0-スクシニル-アミノカプロイルアミノ-ペンチル)-アミノ-ピロール-2,5-ジオンの組み込みによる非放射性DNAラベリングおよび検出

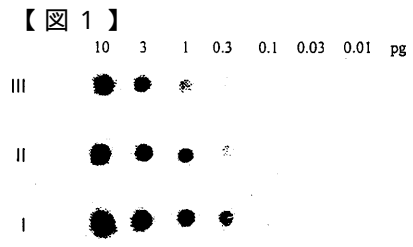
DNAラベリングおよびDNA検出は、Boehringer Mannheim社から販売されているキット(注文番号1093 657)を用いて実施した。重要な工程手順はすべて実施説明書に記載されている。

20

ラベリング反応のために、キットのdNTP混合物中のDIG-dUTPの代わりに3-(4-ヒドロキシ-5-トリホスホリル-テトラヒドロフラン-2-イル)-4-(ジゴキシゲニル-3-0-スクシニル-アミノカプロイルアミノ-ペンチル)-アミノ-ピロール-2,5-ジオン(実施例6に記載したとおりに合成した)を使用した。

免疫学的検出反応から、実施例6の本発明化合物を組み込むと、DIG-dUTPの使用と同程度の感度でラベルしたDNAを検出できることが判明した。

このシステムでの検出および達成された感度を示す結果を図1に示す。



---

フロントページの続き

(72)発明者 ボン デル エルツ,ハーバート  
ドイツ連邦共和国 デー 8 2 3 6 2 ヴァイルハイム,イン デル アオ 2 1

審査官 瀬下 浩一

(56)参考文献 特許第3 6 3 9 3 0 8 ( J P , B 2 )  
Ulrike von Krosigk et al., pH-Independent Triple Helix Formation by an Oligonucleotide  
Containing a Pyrazine Donor-Donor-Acceptor Base, Journal of the American Chemical Soc  
iety, 1 9 9 5 年, 117(19), 5361 - 5362

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C07D401/00 - 421/14

C07F 9/00 - 19/00

C07H 21/00 - 21/04

C12N 15/00 - 15/09

C12Q 1/00 - 1/70

REGISTRY(STN)

CAplus(STN)

MARPAT(STN)