

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2012-175975  
(P2012-175975A)

(43) 公開日 平成24年9月13日(2012.9.13)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B 0 2 4
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	4 B 0 6 3

審査請求 有 請求項の数 26 O L (全 95 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2012-93428 (P2012-93428)</p> <p>(22) 出願日 平成24年4月16日 (2012. 4. 16)</p> <p>(62) 分割の表示 特願2001-544376 (P2001-544376) の分割</p> <p>原出願日 平成12年12月8日 (2000. 12. 8)</p> <p>(31) 優先権主張番号 09/457, 616</p> <p>(32) 優先日 平成11年12月8日 (1999. 12. 8)</p> <p>(33) 優先権主張国 米国 (US)</p>	<p>(71) 出願人 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 150 2172023RD DRIVE, S. E. . , SUITE 150, BOTHELL , WASHINGTON 98021, U NITED STATES OF AME R I C A</p> <p>(74) 代理人 100107308 弁理士 北村 修一郎</p>
--	--

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 蛍光消光検出試薬及び方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】ハイブリダイゼーション用途において、レポータフルオロフォアを、レポータノクエンチャ対に使用する際に、望ましくない特性、分離が困難な混合物、正電荷、合成の困難、オリゴヌクレオチド合成中の不安定性、又は、他の望ましいレポータとの発光波長のオーバーラップ等の問題を解決する、オリゴヌクレオチドプローブ用の試薬を提供する。

【解決手段】フルオロフォア部分が約(300)~約(800)nmの範囲の発光波長を有し、及び/又は、クエンチャが置換4-(フェニルジアゼニル)フェニルアミン構造を有するオリゴヌクレオチド-フルオロフォア-クエンチャ接合体。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

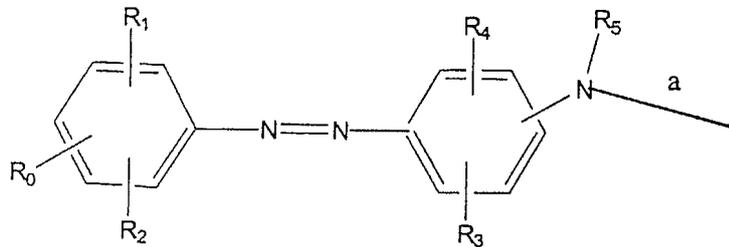
式 FL - ODN - Q を有するオリゴヌクレオチド接合体。

〔ここで、ODN は、オリゴヌクレオチド又は核酸、

FL は、0 ~ 30 原子の長さを有するリンカを介して前記 ODN に共有結合付着されたフルオロフォア部分、そして

Q は、0 ~ 30 原子の長さを有するリンカを介して前記 ODN に共有結合付着されたクエンチャ部分であり、当該クエンチャ部分は下記の構造を有する、

## 【化 1】



10

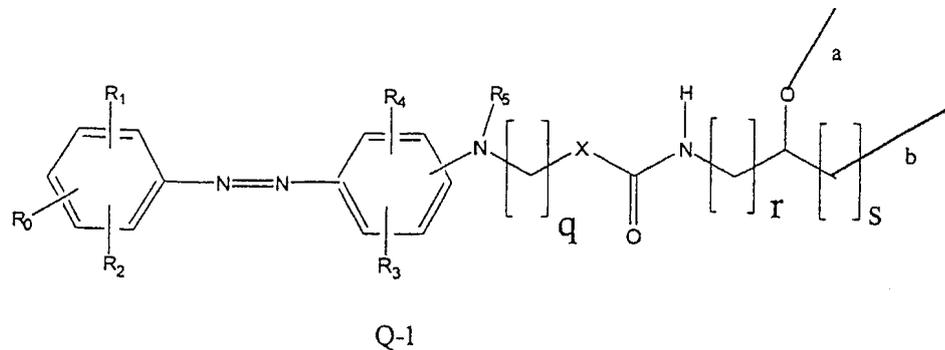
〔ここで、 $R_0$ 、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$  及び  $R_4$  は、それぞれ独立的に、 $-H$ 、ハロゲン、 $n = 0 \sim 5$  である  $-O(CH_2)_nCH_3$ 、 $-(CH_2)_nCH_3$ 、 $-NO_2$ 、 $-SO_3$ 、 $n' = 1 \sim 5$  である  $-N[(CH_2)_nCH_3]_2$ 、又は  $-CN$ 、ただし、 $R_0$  が  $-H$ 、 $R_1$  がベンゼン核の 4 位の  $-NO_2$ 、 $R_2$  がベンゼン核の 2 位の  $-H$  又は  $-Cl$ 、そして  $R_3$  及び  $R_4$  が  $-H$  である組み合わせではない、及び  $R_5 = -H$ 、 $n^* = 1 \sim 20$  であり、 $X_2$  は  $-H$ 、ジメトキシトリチル、メトキシトリチル、トリチル、酸不安定性ブロッキング基である  $-(CH_2)_{n^*} - OX_2$ 、又は  $n'' = 0 \sim 5$  である  $-(CH_2)_{n''} - CH_3$ 、そして、前記クエンチャ部分は、 $a$  によって表わされる原子価結合を介して前記リンカに付着している。〕

20

## 【請求項 2】

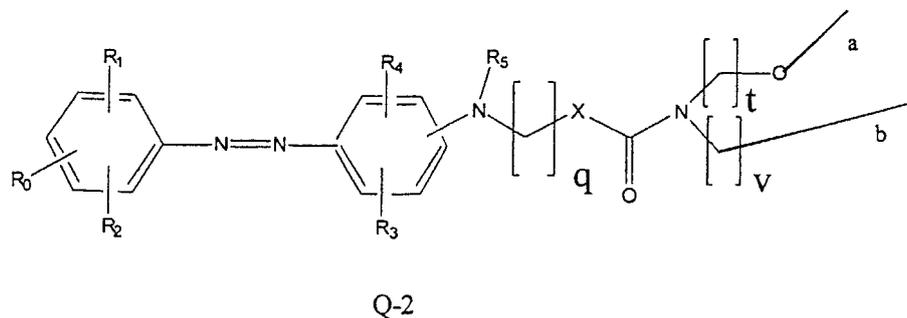
前記クエンチャ部分と、それを前記 ODN に付着する前記リンカとは、下記の式 Q - 1、Q - 2、Q - 3 及び、Q 3 a に図示された部分から選択される構造を有する請求項 1 に記載のオリゴヌクレオチド接合体。

## 【化 2】



30

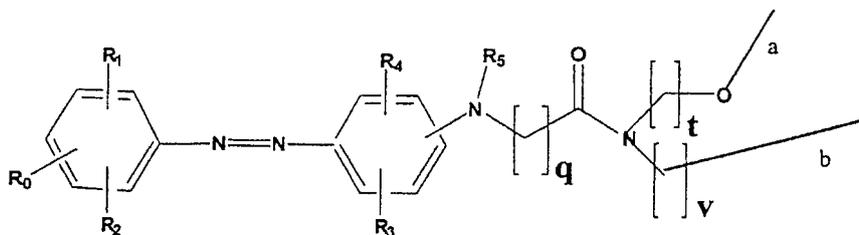
## 【化 3】



40

50

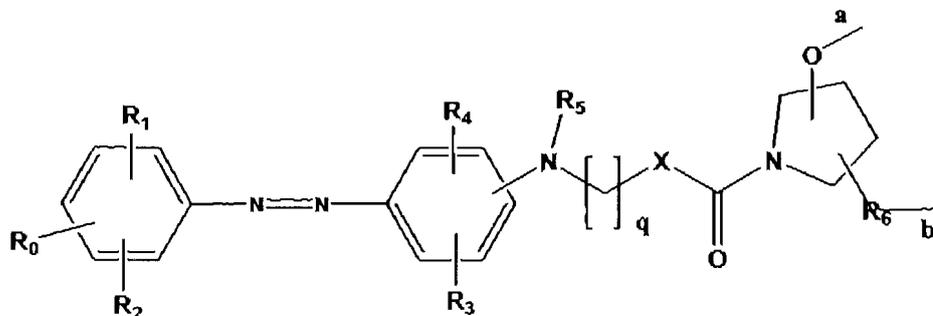
## 【化4】



Q-3

10

## 【化5】



Q3a

20

〔ここで、 $R_6$  は  $n^*$  が 1 ~ 20 である  $-(CH_2)_{n^*}$  であり、 $q$  は 1 ~ 20、 $X$  は  $-O-$ 、 $-OCH_2-$  又は  $-CH_2-$  であり、 $t$  と  $v$  とは、独立的に、1 ~ 20、 $r$  と  $s$  は、独立的に 1 ~ 20、そして前記接合クエンチャとリンカ部分は、 $a$  又は  $b$  によって示される原子価結合の一つを介して前記ODNに付着されている。〕

## 【請求項3】

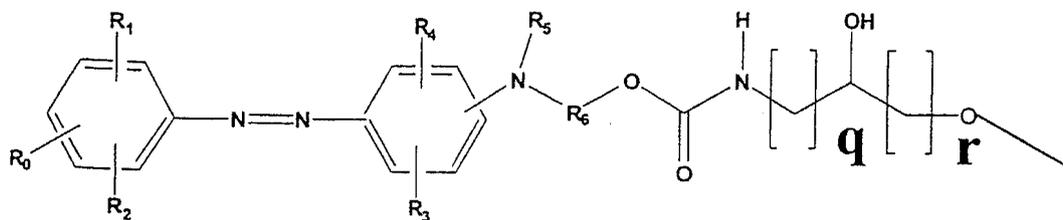
更に、 $a$  又は  $b$  によって示される原子価結合の一つを介して前記クエンチャ-リンカ接合体に付着する小溝バインダ部分を有する請求項2に記載のオリゴヌクレオチド接合体。

## 【請求項4】

前記クエンチャ部分と、それを前記ODNに付着するリンカとは、下記の式Q-4及びQ-5に図示された部分から選択される構造を有する請求項1に記載のオリゴヌクレオチド接合体。

30

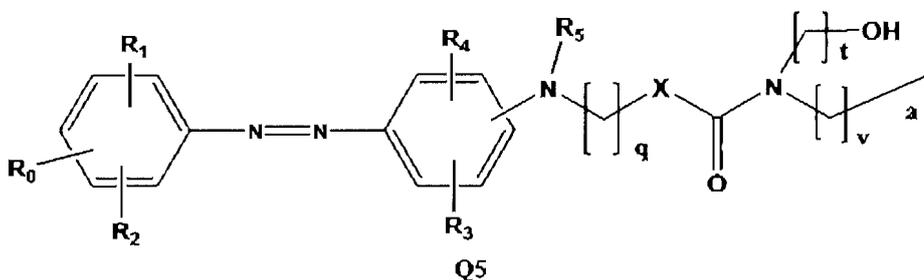
## 【化6】



Q-4

40

## 【化7】



Q5

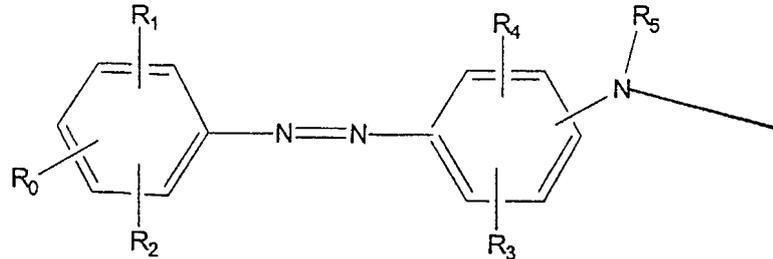
50

〔ここで、 $R_6$ は $n^*$ は1~20である $-(CH_2)_n^*$ であり、 $q, r, t$ および $v$ は、独立的に、1~20、そして前記クエンチャ部分は、 $a$ によって示される原子価結合を介して前記ODNに付着されている。〕

【請求項5】

下記の部分を有するオリゴヌクレオチド-フルオロフォア-クエンチャ接合体を作成するためのホスホルアミダイト試薬。

【化8】



10

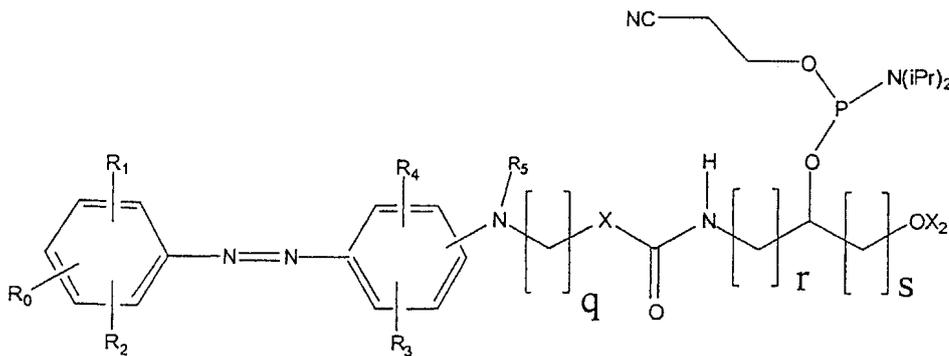
〔ここで、 $R_0, R_1, R_2, R_3$ 及び $R_4$ は、それぞれ独立に、 $-H$ 、ハロゲン、 $n = 0 \sim 5$ である $-O(CH_2)_nCH_3$ 、 $-(CH_2)_nCH_3$ 、 $-NO_2$ 、 $-SO_3$ 、 $n^* = 1 \sim 5$ である $-N[(CH_2)_n^*CH_3]_2$ 、又は $-CN$ 、ただし、 $R_0$ が $-H$ 、 $R_1$ がベンゼン核の4位の $-NO_2$ 、 $R_2$ がベンゼン核の2位の $-H$ 又は $-Cl$ 、そして $R_3$ 及び $R_4$ が $-H$ である組み合わせではない、及び $R_5 = -H$ 又は $n^* = 0 \sim 5$ である $-(CH_2)_n^*CH_3$ 、そして、それに共有結合されたビス(メチルエチル)アミノ](2-シアノエトキシ)ホスフィノオキシ部分である。〕

20

【請求項6】

PA-1、PA-2及びPA-3として示された式から成るグループから選択される式を有する請求項5に記載のホスホルアミダイト試薬。

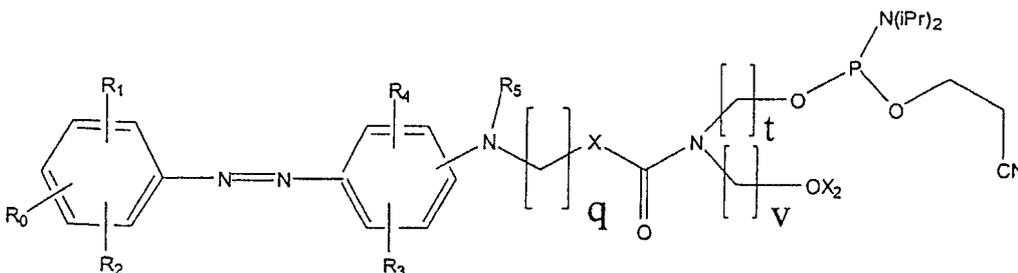
【化9】



PA-1

30

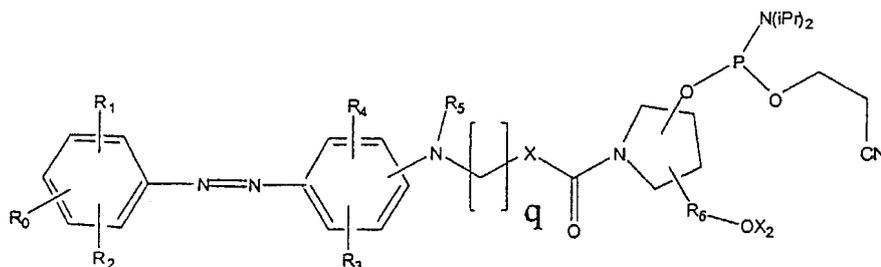
【化10】



PA-2

40

## 【化 1 1】



PA-3

10

〔ここで、 $R_0$ 、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 及び $R_4$ は、それぞれ独立的に、 $-H$ 、ハロゲン、 $n = 0 \sim 5$ である $-O(CH_2)_nCH_3$ 、 $-(CH_2)_nCH_3$ 、 $-NO_2$ 、 $-SO_3$ 、 $n' = 1 \sim 5$ である $-N[(CH_2)_nCH_3]_2$ 、又は $-CN$ 、ただし、 $R_0$ が $-H$ 、 $R_1$ がベンゼン核の4位の $-NO_2$ 、 $R_2$ がベンゼン核の2位の $-Cl$ 、そして $R_3$ 及び $R_4$ が $-H$ である組み合わせではない、及び $R_5 = -H$ 又は $n'' = 0 \sim 5$ である $-(CH_2)_nCH_3$ 、 $R_6$ は $n^*$ が $1 \sim 20$ である $-(CH_2)_n$ であり、 $q$ は $1 \sim 20$ 、 $X$ は $-O-$ 又は $-CH_2-$ 、 $t$ 、 $v$ 、 $r$ 及び $s$ は、独立的に、 $1 \sim 20$ であり、そして、 $X_2$ は、 $-H$ 又はジメトキシトリチル、メトキシトリチル、トリチル又は酸不安定ブロック基である。〕

## 【請求項 7】

PA-1として示された式を有する請求項 6 に記載のホスホルアミダイト試薬。

20

## 【請求項 8】

PA-2として示された式を有する請求項 6 に記載のホスホルアミダイト試薬。

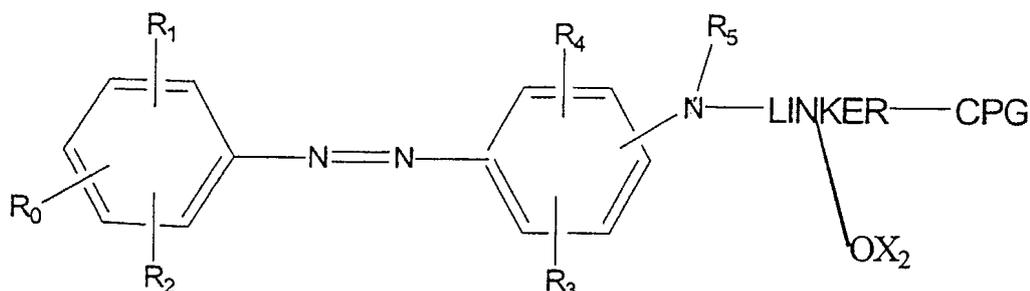
## 【請求項 9】

PA-3として示された式を有する請求項 6 に記載のホスホルアミダイト試薬。

## 【請求項 10】

下記の構造を有するオリゴヌクレオチド合成に適した、共有結合した固体支持体とクエンチャとの接合体。

## 【化 1 2】



30

〔ここで、CPGは、ポリマ固体支持体を示し、

リンカは、 $1 \sim 30$ 原子の長さを有し、ジフェニルアゾ部分を前記CPGに結合する部分、

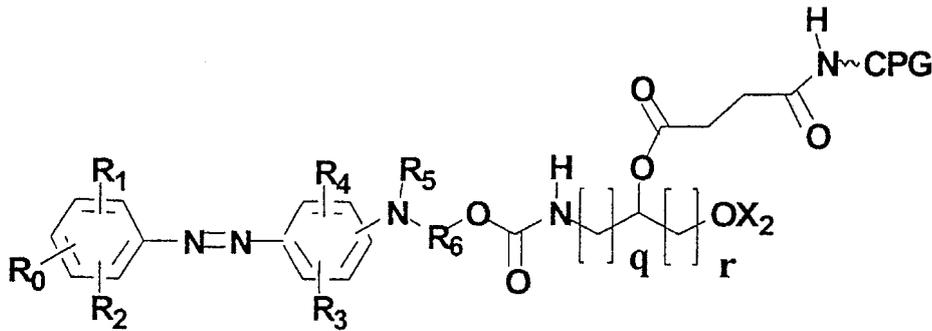
$X_2$ は、 $OH$ 又はジメトキシトリチル、メトキシトリチル、トリチル又は酸不安定ブロック基、 $R_0$ 、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 及び $R_4$ は、それぞれ独立的に、 $-H$ 、ハロゲン、 $n = 0 \sim 5$ である $-O(CH_2)_nCH_3$ 、 $-(CH_2)_nCH_3$ 、 $-NO_2$ 、 $-SO_3$ 、 $n' = 1 \sim 5$ である $-N[(CH_2)_nCH_3]_2$ 又は $-CN$ であり、ただし、 $R_0$ が $-H$ 、 $R_1$ がベンゼン核の4位の $-NO_2$ 、 $R_2$ がベンゼン核の2位の $-H$ 又は $-Cl$ 、そして $R_3$ 及び $R_4$ が $-H$ である組み合わせではない、 $R_5 = -H$ 又は $n'' = 0 \sim 5$ である $-(CH_2)_nCH_3$ である。〕

40

## 【請求項 11】

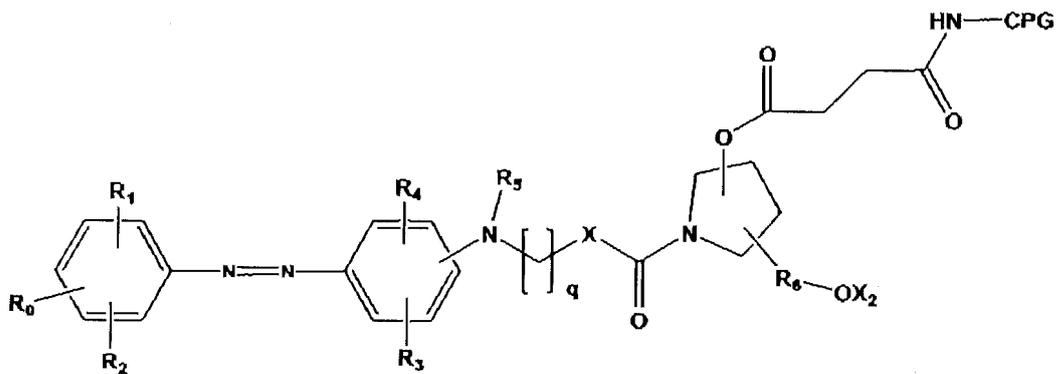
下記の構造から選択される構造を有する請求項 10 に記載の共有結合した固体支持体とクエンチャとの接合体。

## 【化 1 3】



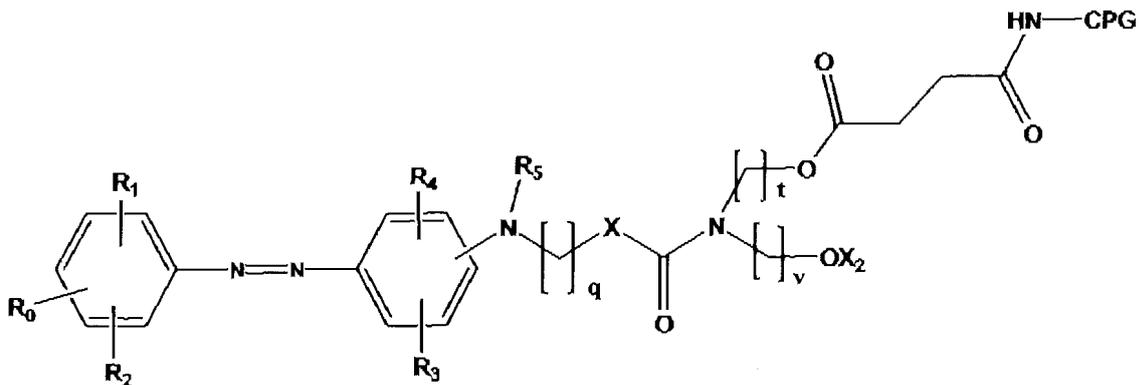
10

## 【化 1 4】



20

## 【化 1 5】



30

〔ここで、 $R_6$ は $n^*$ が1~20である $-(CH_2)_{n^*}$ であり、そして $q$ 、 $r$ 、 $t$ 及び $v$ は、独立的に、1~20である。〕

## 【請求項 1 2】

式 FL - ODN - Q - MGB を有するオリゴヌクレオチド接合体。

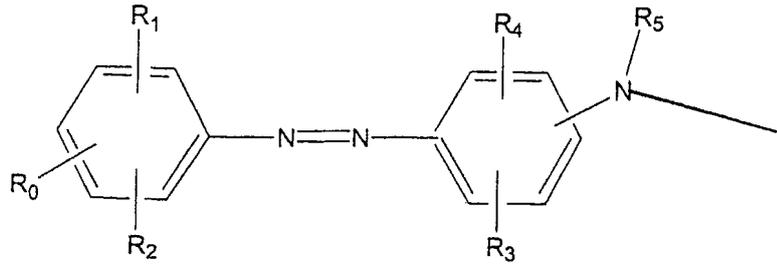
〔ここで、ODN はオリゴヌクレオチド又は核酸、

FL は、0~30 原子の長さを有するリンカを介して前記 ODN に共有結合付着されたフルオロフォア、そして、

Q は、0~30 原子の長さを有するリンカを介して前記 ODN に共有結合付着されたクエンチャ部分であり、当該クエンチャ部分は下記の構造を有する、

40

## 【化 16】



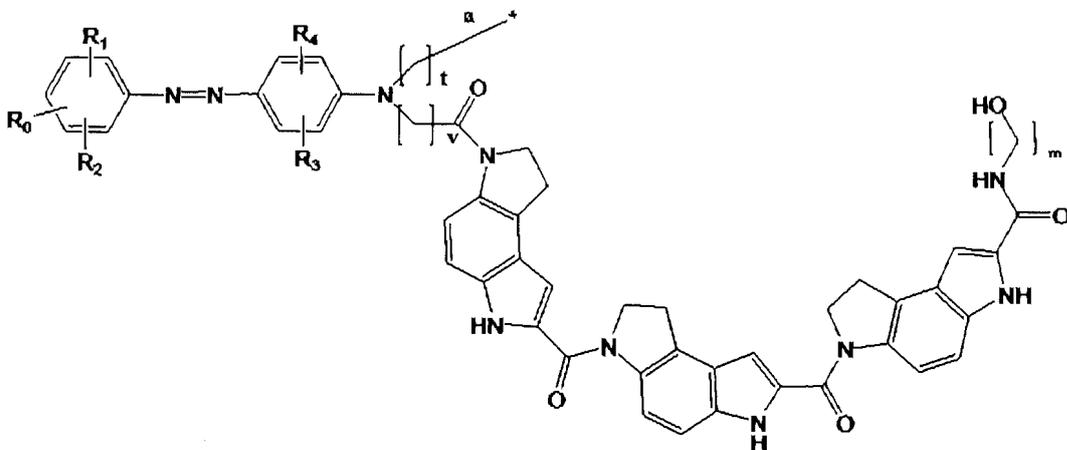
〔ここで、 $R_0$ 、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 及び $R_4$ は、それぞれ独立的に、 $-H$ 、ハロゲン、 $n = 0 \sim 5$ である  $-O(CH_2)_nCH_3$ 、 $-(CH_2)_nCH_3$ 、 $-NO_2$ 、 $-SO_3$ 、 $n' = 1 \sim 5$ である  $-N[(CH_2)_nCH_3]_2$ 又は $-CN$ であり、ただし、 $R_0$ が $-H$ 、 $R_1$ がベンゼン核の4位の $-NO_2$ 、 $R_2$ がベンゼン核の2位の $-H$ 又は $-Cl$ 、そして $R_3$ 及び $R_4$ が $-H$ である組み合わせではない、 $R_5 = -H$ 又は $n'' = 0 \sim 5$ である  $-(CH_2)_nCH_3$ である〕、そして、

MGBは、 $0 \sim 30$ 原子の長さを有するリンクを介して、前記ODN部分又は前記クエンチャ部分に共有結合付着された小溝バインダ部分である。〕

## 【請求項 13】

前記MGB部分は前記クエンチャ部分に付着し、前記共有結合MGB-Q部分は以下の構造を有する請求項12に記載のオリゴヌクレオチド接合体。

## 【化 17】

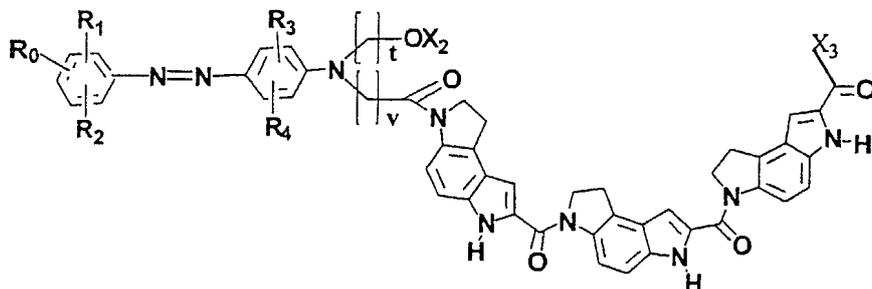


〔ここで、 $t$ と $v$ とは、独立的に $1 \sim 20$ であって、 $a$ によって示される原子価結合が前記MGB-Q部分を前記ODN部分に付着させている。〕

## 【請求項 14】

以下の構造を有するオリゴヌクレオチド合成用の共有結合した小溝バインダ・クエンチャ試薬。

## 【化 18】



〔ここで、 $R_0$ 、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 及び $R_4$ は、それぞれ独立的に、 $-H$ 、ハロゲン、 $n = 0 \sim 5$ である  $-O(CH_2)_nCH_3$ 、 $-(CH_2)_nCH_3$ 、 $-NO_2$ 、 $-SO_3$ 、 $n' = 1 \sim 5$ で

ある - N [ ( C H <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> · C H <sub>3</sub> ] <sub>2</sub> 又は - C N であり、ただし、R<sub>0</sub>が - H、R<sub>1</sub>がベンゼン核の4位の - N O<sub>2</sub>、R<sub>2</sub>がベンゼン核の2位の - H 又は - C l、そしてR<sub>3</sub>及びR<sub>4</sub>が - H である組み合わせではない、そしてtとvとは、独立的に1~20である、

X<sub>2</sub>は、- H 又はジメトキシトリチル、メトキシトリチル、トリチル又は酸不安定ブロック基、そして

X<sub>3</sub>は、ペンタフルオロフェニルオキシ、又はNH - L I N K E R - C P G 又はO - L I N K E R - C P G であり、ここで、C P G はポリマ固体支持体であり、リンカは0~30原子の長さを有し前記三環性部分を前記C P G に結合する結合部分である。]

【請求項15】

X<sub>3</sub>は、ペンタフルオロフェニルオキシである請求項14に記載の共有結合した小溝バインダ・クエンチャ試薬。

10

【請求項16】

X<sub>3</sub>は、NH - L I N K E R - C P G 又はO - L I N K E R - C P G である請求項14に記載の共有結合した小溝バインダ・クエンチャ試薬。

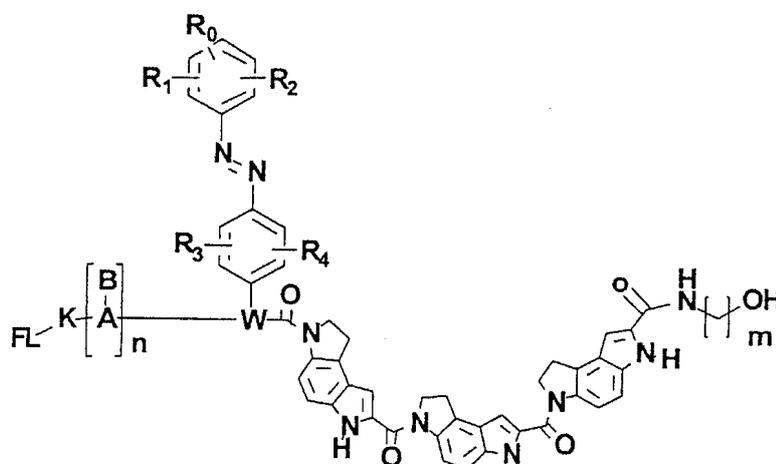
【請求項17】

v = t = 3 である請求項14の共有結合した小溝バインダ・クエンチャ試薬。

【請求項18】

下記の式のオリゴヌクレオチド接合体。

【化19】



20

30

【ここで、R<sub>0</sub>、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>及びR<sub>4</sub>は、それぞれ独立的に、- H、ハロゲン、n<sup>\*</sup> = 0~5である - O ( C H <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> · C H <sub>3</sub>、- ( C H <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> · C H <sub>3</sub>、- N O<sub>2</sub>、- S O<sub>3</sub>、n<sup>'</sup> = 1~5である - N [ ( C H <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> · C H <sub>3</sub> ] <sub>2</sub>、又は - C N、ただし、R<sub>0</sub>が - H、R<sub>1</sub>がベンゼン核の4位の - N O<sub>2</sub>、R<sub>2</sub>がベンゼン核の2位の - H 又は - C l、そしてR<sub>3</sub>及びR<sub>4</sub>が - H である組み合わせではない、F L は、300~800 nmの帯域の発光波長を有するフルオロフォア部分、

Kは、C、O、N、S、P及びHから成るグループから選択される1~30原子を含むリンカ、

40

[ A - B ] <sub>n</sub> は、O D N、D N A、R N A 又はP N A 或いはそれらの組み合わせを示し、ここで、Aは、糖とリン酸とが独立的に修飾され得る糖リン酸骨格鎖、Bは、複素環塩基、ここで、Bは、独立的に、プリン、ピリミジン、ピラゾロ[3、4-d]ピリミジン、7-置換ピラゾロ[3、4-d]ピリミジン、7-デアザプリン、7-置換7-デアザプリン、及び修飾プリン及びピリミジン塩基であり、D N A、R N A、P N A 又はO D N は、これらの塩基のすべての組み合わせを含むことができる、そして、nは、前記D N A、R N A、P N A 又はO D N のヌクレオチド単位の数、Wは、C、O、N、S、P及びHから成るグループから選択される0~30原子の長さのリンカ、そして、mは、1~20の値を有する整数である。]

【請求項19】

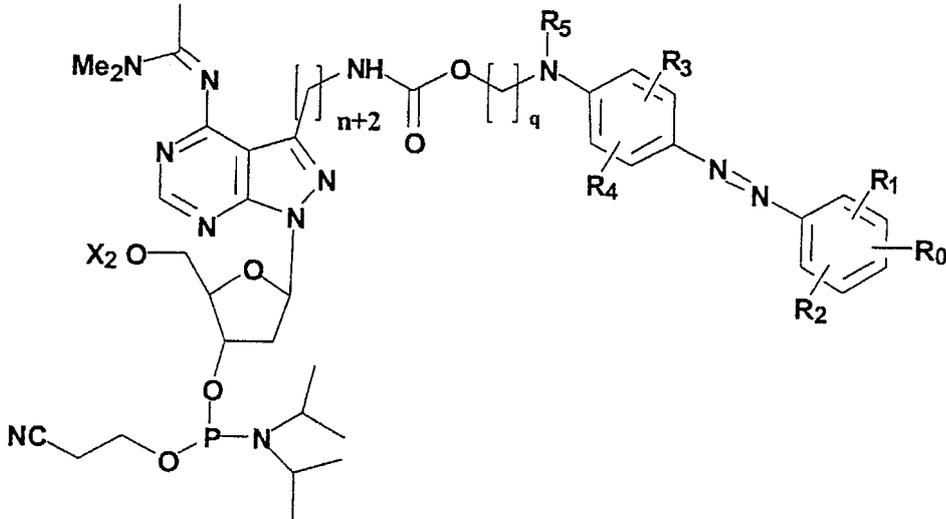
50

前記フルオロフォア部分は 300 ~ 800 nm の発光波長を有する請求項 18 に記載のオリゴヌクレオチド接合体。

【請求項 20】

下記の式を有するオリゴヌクレオチド - フルオロフォア - クエンチャ接合体を作成するためのホスホルアミダイト試薬。

【化 20】



10

20

〔ここで、 $R_0$ 、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$  及び  $R_4$  は、それぞれ独立的に、 $-H$ 、ハロゲン、 $n^* = 0 \sim 5$  である  $-O(CH_2)_nCH_3$ 、 $-(CH_2)_nCH_3$ 、 $-NO_2$ 、 $-SO_3$ 、 $n' = 1 \sim 5$  である  $-N[(CH_2)_nCH_3]_2$ 、又は  $-CN$ 、ただし、 $R_0$  が  $-H$ 、 $R_1$  がベンゼン核の 4 位の  $-NO_2$ 、 $R_2$  がベンゼン核の 2 位の  $-H$  又は  $-Cl$ 、そして  $R_3$  及び  $R_4$  が  $-H$  である組み合わせではない、そして、 $R_5 = -H$  又は  $n'' = 0 \sim 5$  である  $-(CH_2)_nCH_3$  であり、

$n$  は  $1 \sim 10$ 、

$q$  は  $1 \sim 20$ 、そして、

$X_2$  は、 $-H$  又はジメトキシトリチル、メトキシトリチル、トリチル又は酸不安定プロック基である。〕

30

【請求項 21】

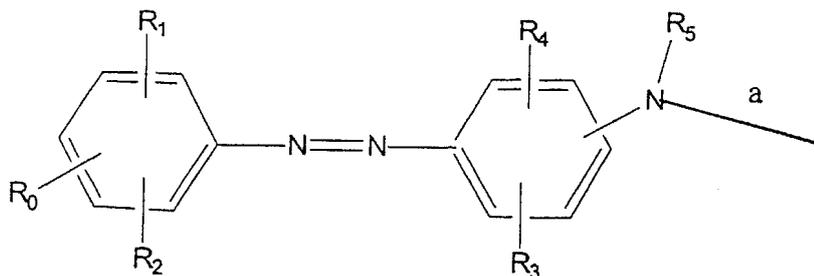
以下の工程を有する核酸をハイブリダイズする方法。

(a) 第 1 核酸と第 2 核酸を提供する

(b) 前記両核酸をハイブリダイゼーション条件下でインキュベートする

(c) ハイブリダイズした核酸を同定する、ここで、前記核酸の少なくとも一つは、FL-核酸-Q 接合体を有し、ここで FL は、 $0 \sim 30$  原子の長さを有するリンカを介して前記核酸に共有結合付着されたフルオロフォア部分、そして、Q は、 $0 \sim 30$  原子の長さを有するリンカを介して前記核酸に共有結合付着されたクエンチャ部分であり、当該クエンチャ部分は下記の構造を有する

【化 21】



40

〔ここで、 $R_0$ 、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$  及び  $R_4$  は、それぞれ独立的に、 $-H$ 、ハロゲン、 $n = 0 \sim 5$  である  $-O(CH_2)_nCH_3$ 、 $-(CH_2)_nCH_3$ 、 $-NO_2$ 、 $-SO_3$ 、 $n' = 1 \sim 5$

50

である - N [ ( C H <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> · C H <sub>3</sub> ] <sub>2</sub> 又は - C N 、ただし、R<sub>0</sub> が - H 、 R<sub>1</sub> がベンゼン核の 4 位の - N O <sub>2</sub> 、 R<sub>2</sub> がベンゼン核の 2 位の - H 又は - C l 、そして R<sub>3</sub> 及び R<sub>4</sub> が - H である組み合わせではない、そして R<sub>5</sub> = - H 又は n' = 0 ~ 5 である - ( C H <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> · C H <sub>3</sub> であり、そして、前記クエンチャ部分は、 a によって表わされる原子価結合を介して前記リンカに付着されている。]

【請求項 2 2】

下記の工程を有する単一のヌクレオチドが異なるポリヌクレオチド間を識別する方法。

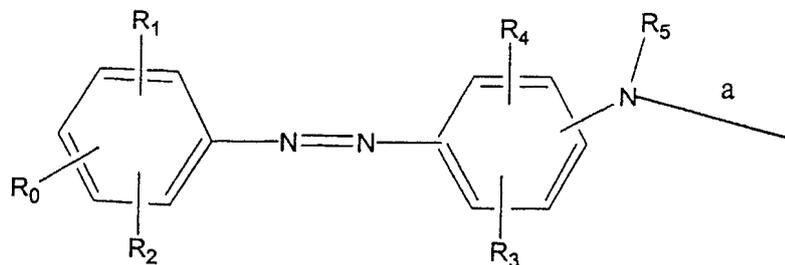
( a ) 標的配列を有するポリヌクレオチドを提供する

( b ) 少なくとも二つの F L - O D N - Q 接合体を提供する、ここで、O D N はオリゴヌクレオチド部分を示す、前記少なくとも二つの F L - O D N - Q 接合体の一方は、前記標的配列に対して完全に相補的な配列を有し、前記少なくとも二つの F L - O D N - Q 接合体の他方は、前記標的配列に対して単一のヌクレオチドミスマッチを有する

( c ) ハイブリダイゼーション条件下で、前記 F L - O D N - Q 接合体のそれぞれを、別々に、前記ポリヌクレオチドとインキュベートする

( d ) 前記 F L - O D N - Q のそれぞれと前記ポリヌクレオチドとの間のハイブリダイゼーション強度を測定する、ここで F L は、0 ~ 3 0 原子の長さを有するリンカを介して前記核酸に共有結合付着されたフルオロフォア部分であり、そして Q は、0 ~ 3 0 原子の長さを有するリンカを介して前記核酸に共有結合付着されたクエンチャ部分であり、当該クエンチャ部分は下記の構造を有する

【化 2 2】



〔ここで、R<sub>0</sub>、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub> 及び R<sub>4</sub> は、それぞれ独立的に、- H 、ハロゲン、n = 0 ~ 5 である - O ( C H <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> C H <sub>3</sub> 、 - ( C H <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> C H <sub>3</sub> 、 - N O <sub>2</sub> 、 - S O <sub>3</sub> 、 n' = 1 ~ 5 である - N [ ( C H <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> · C H <sub>3</sub> ] <sub>2</sub> 又は - C N 、ただし、R<sub>0</sub> が - H 、 R<sub>1</sub> がベンゼン核の 4 位の - N O <sub>2</sub> 、 R<sub>2</sub> がベンゼン核の 2 位の - H 又は - C l 、そして R<sub>3</sub> 及び R<sub>4</sub> が - H である組み合わせではない、及び R<sub>5</sub> = - H 又は n' = 0 ~ 5 である - ( C H <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> · C H <sub>3</sub> であり、そして、前記クエンチャ部分は、 a によって表わされる原子価結合を介して前記リンカに付着されている。]

【請求項 2 3】

以下の工程を有する核酸をハイブリダイズする方法。

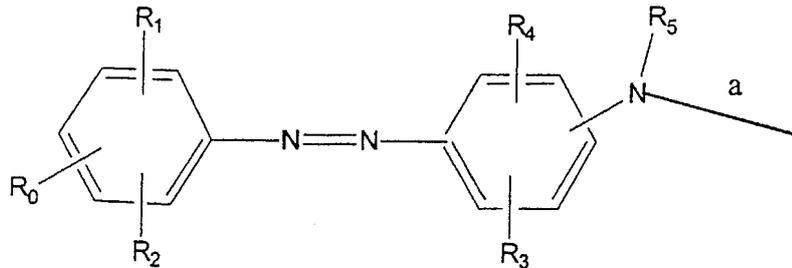
( a ) 第 1 核酸と第 2 核酸を提供する

( b ) 前記両核酸をハイブリダイゼーション条件下でインキュベートする

( c ) ハイブリダイズした核酸を同定する、ここで、前記核酸の少なくとも一つは、F L - 核酸 - Q - M G B 接合体を有する

〔ここで、F L は、0 ~ 3 0 原子の長さを有するリンカを介して前記核酸に共有結合付着されたフルオロフォアであり、M G B は、0 ~ 3 0 原子の長さを有するリンカを介して前記 O D N 部分又はクエンチャ部分に共有結合付着された小溝バインダ部分であり、そして、Q は、0 ~ 3 0 原子の長さを有するリンカを介して前記核酸に共有結合付着されたクエンチャ部分であり、当該クエンチャ部分は下記の構造を有する、

## 【化23】



〔ここで、 $R_0$ 、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 及び $R_4$ は、それぞれ独立的に、 $-H$ 、ハロゲン、 $n = 0 \sim 5$ である $-O(CH_2)_nCH_3$ 、 $-(CH_2)_nCH_3$ 、 $-NO_2$ 、 $-SO_3$ 、 $n' = 1 \sim 5$ である $-N[(CH_2)_nCH_3]_2$ 又は $-CN$ 、ただし、 $R_0$ が $-H$ 、 $R_1$ がベンゼン核の4位の $-NO_2$ 、 $R_2$ がベンゼン核の2位の $-H$ 又は $-Cl$ 、そして $R_3$ 及び $R_4$ が $-H$ である組み合わせではない、及び $R_5 = -H$ 又は $n'' = 0 \sim 5$ である $-(CH_2)_nCH_3$ であり、そして、前記クエンチャ部分は、 $a$ によって表わされる原子価結合を介して前記リンカに付着されている。〕

## 【請求項24】

核酸をハイブリダイズする方法であって、以下の工程を有する、

(a) 第1核酸と第2核酸を提供する、

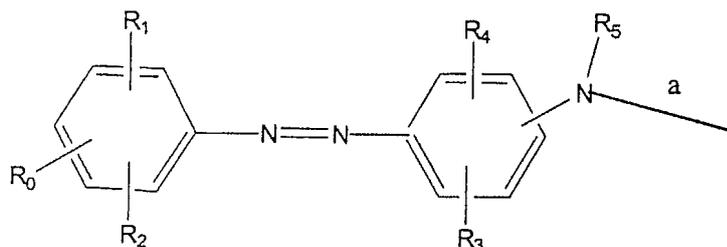
(b) 前記両核酸をハイブリダイゼーション条件下でインキュベートする、そして

(c) ハイブリダイズした核酸を同定する、

ここで、前記核酸の少なくとも一つは、FL-核酸-Q-MGB接合体を有する

〔ここで、MGBは、 $0 \sim 30$ 原子の長さを有するリンカを介して前記ODN部分又は前記クエンチャ部分に共有結合付着された小溝バインダ部分、Qは、 $0 \sim 30$ 原子の長さを有するリンカを介して前記核酸に共有結合付着されたクエンチャ部分であり、当該クエンチャ部分は下記の構造を有する、

## 【化24】



〔ここで、 $R_0$ 、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 及び $R_4$ は、それぞれ独立的に、 $-H$ 、ハロゲン、 $n = 0 \sim 5$ である $-O(CH_2)_nCH_3$ 、 $-(CH_2)_nCH_3$ 、 $-NO_2$ 、 $-SO_3$ 、 $n' = 1 \sim 5$ である $-N[(CH_2)_nCH_3]_2$ 、又は $-CN$ 、ただし、 $R_0$ が $-H$ 、 $R_1$ がベンゼン核の4位の $-NO_2$ 、 $R_2$ がベンゼン核の2位の $-H$ 又は $-Cl$ 、そして $R_3$ 及び $R_4$ が $-H$ である組み合わせではない、及び $R_5 = -H$ 、 $n^* = 1 \sim 20$ であり、 $X_2$ は $-H$ 、ジメトキシトリチル、メトキシトリチル、トリチル、酸不安定性ブロック基である $-(CH_2)_{n^*} - OX_2$ 、又は $n'' = 0 \sim 5$ である $-(CH_2)_nCH_3$ であり、そして、前記クエンチャ部分は、 $a$ によって表わされる原子価結合を介して前記リンカに付着している。〕

そしてFLは、 $0 \sim 30$ 原子の長さを有するリンカを介して前記核酸に共有結合付着されたフルオロフォアであり、当該フルオロフォア部分は $300 \sim 800$  nmの発光波長を有する。〕

## 【請求項25】

以下の工程を有する核酸をハイブリダイズする方法。

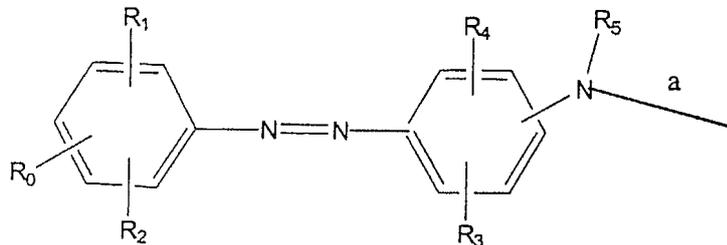
(a) 第1核酸と第2核酸を提供する

(b) 前記両核酸をハイブリダイゼーション条件下でインキュベートする

(c) ハイブリダイズした核酸を同定する、ここで、前記核酸の少なくとも一つは、FL-ODN-Q-MGB接合体を有する

[ここで、ODNは核酸又は修飾核酸であり、MGBは、0～30原子の長さを有するリンカを介して前記ODN部分又はクエンチャ部分に共有結合付着された小溝バインダ部分、Qは、0～30原子の長さを有するリンカを介して前記ODNに共有結合付着されたクエンチャ部分、当該クエンチャ部分は下記の構造を有する、

【化25】



10

[ここで、 $R_0$ 、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 及び $R_4$ は、それぞれ独立的に、-H、ハロゲン、 $n = 0 \sim 5$ である $-O(CH_2)_nCH_3$ 、 $-(CH_2)_nCH_3$ 、 $-NO_2$ 、 $-SO_3$ 、 $n' = 1 \sim 5$ である $-N[(CH_2)_n \cdot CH_3]_2$ 、又は-CN、ただし、 $R_0$ が-H、 $R_1$ がベンゼン核の4位の $-NO_2$ 、 $R_2$ がベンゼン核の2位の-H又は-Cl、そして $R_3$ 及び $R_4$ が-Hである組み合わせではない、及び $R_5 = -H$ 、 $n^* = 1 \sim 20$ であり、 $X_2$ は-H、ジメトキシトリチル、メトキシトリチル、トリチル、酸不安定性ブロッキング基である $-(CH_2)_{n^*} \cdot OX_2$ 、又は $n'' = 0 \sim 5$ である $-(CH_2)_{n''} \cdot CH_3$ であり、そして、前記クエンチャ部分は、aによって表わされる原子価結合を介して前記リンカに付着している。]

20

そして、FLは、0～30原子の長さを有するリンカを介して前記核酸に共有結合付着されたフルオロフォアであり、当該フルオロフォア部分は300～800nmの発光波長を有する。]

【請求項26】

以下の工程を有する核酸をハイブリダイズする方法。

30

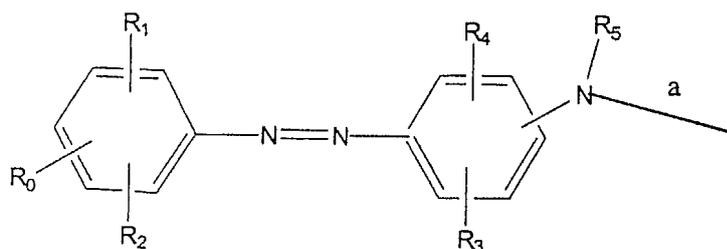
(a) 第1核酸と第2核酸を提供する

(b) 前記両核酸をハイブリダイゼーション条件下でインキュベートする

(c) ハイブリダイズした核酸を同定する、ここで、前記核酸の少なくとも一つは、FL-ODN-Q接合体を有する

[ここで、ODNは核酸又は修飾核酸であり、Qは、0～30原子の長さを有するリンカを介して前記ODNに共有結合付着されたクエンチャ部分、当該クエンチャ部分は下記の構造を有する、

【化26】



40

[ここで、 $R_0$ 、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 及び $R_4$ は、それぞれ独立的に、-H、ハロゲン、 $n = 0 \sim 5$ である $-O(CH_2)_nCH_3$ 、 $-(CH_2)_nCH_3$ 、 $-NO_2$ 、 $-SO_3$ 、 $n' = 1 \sim 5$ である $-N[(CH_2)_n \cdot CH_3]_2$ 、又は-CN、ただし、 $R_0$ が-H、 $R_1$ がベンゼン核の4位の $-NO_2$ 、 $R_2$ がベンゼン核の2位の-H又は-Cl、そして $R_3$ 及び $R_4$ が-Hで

50

ある組み合わせではない、及び  $R_5 = -H$ 、 $n^* = 1 \sim 20$  であり、 $X_2$  は  $-H$ 、ジメトキシトリチル、メトキシトリチル、トリチル、酸不安定性ブロック基である  $-(CH_2)_{n^*} - OX_2$ 、又は  $n^* = 0 \sim 5$  である  $-(CH_2)_{n^*} - CH_3$  であり、そして、前記クエンチャ部分は、 $a$  によって表わされる原子価結合を介して前記リンカに付着している。]

そして  $FL$  は、 $0 \sim 30$  原子の長さを有するリンカを介して前記核酸に共有結合付着されたフルオロフォア部分であり、当該フルオロフォア部分は  $300 \sim 800$  nm の発光波長を有する。]

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

発明の分野

本発明は、改善された特性を有するオリゴヌクレオチド - クエンチャ - 蛍光 - 染料接合体と、新規なクエンチャ及び蛍光染料部分をオリゴヌクレオチドに導入するのに適した試薬とに関する。本発明は、更に、オリゴヌクレオチド - クエンチャ - 蛍光 - 染料接合体の核酸標的の検出法における使用にも関する。

【背景技術】

【0002】

関連技術の簡単な説明

合成オリゴヌクレオチドが、相補的 DNA 及び RNA 標的用の配列特異的プローブとして長年使用されてきた。これらの方法は、特定の核酸標的の同定と定量化とを可能にするため、法廷科学、分子生物学、及び医学診断において広く利用されている。DNA プローブの初期の使用法は、標識としての放射性（通常  $^{32}P$ ）に基くものであった。これに対して最近の方法は、化学発光及び蛍光基を含むレポータ分子を使用している。装置の改良によって、これらの分光法的方法の感度が、前記放射標識法の感度に近づく又はそれを凌駕することが可能になった。最近開発された検出法は、プローブハイブリダイゼーションの検出のために、蛍光強度を直接検出する代りに、蛍光共鳴エネルギー転移 (FRET) のプロセスを使用する。このタイプのアッセイにおいて、FRET は、供与フルオロフォア (レポータ) と受容分子 (クエンチャ) 間において、そのクエンチャ分子の吸収スペクトルが供与フルオロフォアの発光スペクトルとオーバーラップし、それら二つの分子が互いに近接している時に、起こる。供与フルオロフォアの励起状態エネルギーは、共鳴ダイポール誘導ダイポール相互作用によって隣接する受容体へと転移され、その結果、供与蛍光の消光が起こる。もしも受容分子がフルオロフォアである場合、その蛍光発光は時に増大することがある。供与分子と受容分子との間のエネルギー転移の効率は、これら分子間の距離に大きく依存する。この関係を記載する等式は公知である。フォルスター (Forster) 距離 ( $R_0$ ) は、エネルギー転移が 50% の効率である場合の、供与分子と受容分子との間の距離として記載される。衝突及び電荷転移消光等の、蛍光消光のその他のメカニズムも公知である。

20

30

【0003】

通常、FRET に基く検出法は、その供与蛍光の消光を効率的にするため、供与フルオロフォアと受容分子とが互いに近接する状態になるように構成される。アッセイ中、供与分子と受容分子とは分離され蛍光発光が起こる。FRET に基く検出アッセイは、核酸ハイブリダイゼーション及び酵素学の分野で開発された。いくつかの形式の FRET ハイブリダイゼーションアッセイがレビューされている (非特許文献 1)。

40

【0004】

その発見以来、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) は、分子生物学を革新してきた。この技術は、特定の DNA 配列の増幅を可能にし、これによって、単一の DNA 標的コピーから DNA プローブアッセイを行うことを可能にする。PCR 式診断アッセイは、最初は、一般的には使用されなかった。その理由の一つは、サンプルの取り扱いと、非ソース DNA の混入の可能性の問題があるためである。最近、分光蛍光測定サーマルサイクラを使用

50

してPCRの進行をその発生している状態で検出する（「リアルタイム」PCR検出）ことが可能な、新しい均質な蛍光式DNAアッセイが記載されている。二つの一般的に使用されているアッセイ方式は、DNA増幅が起こる時に蛍光発光性となるDNAプローブを使用する（蛍光発生プローブ）。

#### 【0005】

「リアルタイム」PCRのための第1の方式は、「分子ビーコン」として知られているDNAプローブを使用する（非特許文献2）。分子ビーコンは、クエンチャ染料とレポータ染料とが、そのヘアピンの軸の端部において互いに密に接触しているヘアピン構造を有する。相補的配列とのハイブリダイゼーション時に、前記ヘアピン構造のループが二本鎖となり、クエンチャとレポータ染料とを互いに引き離し、これによって蛍光発光信号を発生する。非特許文献2は、ダブシル(dabcyl)（4 - { [ 4 - (ジメチルアミノ)フェニル] ジアゼニル } ベンゾイル部分、吸収最大 = 453 nm）を含む非蛍光発光クエンチャ染料を、広範囲の発光波長（475 - 615 nm）の蛍光発光レポータ染料と組み合わせて使用することを報告した。その当時、これは驚くべきことであった。というのは、FRETは、クエンチャの吸収スペクトルが、レポータの発光スペクトルと大幅にオーバーラップすることを必要とするからである。ダブシル部分含有（以後、「ダブシル」）クエンチャと或る種の蛍光発光染料の場合、そのスペクトルオーバーラップは、極めて低いものであったにも拘わらず、その消光効率は高かった。従って、前記ヘアピン式ビーコンの消光メカニズムはFRETではなく、衝突消光（collisional quenching）である、と提案された。事実、前記ヘアピン式ビーコンにおいてクエンチャのUVスペクトルが変化し、これは、分子接触、従って、衝突消光の証拠を提供している。関連する検出法は、蛍光発光プローブとしてヘアピンプライマを使用する（非特許文献3）。

10

20

#### 【0006】

「リアルタイム」PCR用の第2の方式は、「5'-ヌクレアーゼプローブ」と称されるDNAプローブを使用する（非特許文献4）。これらの蛍光発光プローブは、通常、単一DNA鎖の3'末端にクエンチャを備え、5'末端にフルオロフォアを備えて作成される。各PCRサイクル中、TaqDNAポリメラーゼの5'-ヌクレアーゼ活性によって、前記DNA鎖が開裂し、これによって、フルオロフォアをクエンチャから分離し、蛍光発光信号を放出する。前記5'-ヌクレアーゼアッセイは、プライマ伸長工程中（60 - 65）においてプローブがテンプレート鎖にハイブリダイズすることを必要とする。彼らは、又、一つ以上のフルオロフォア/クエンチャ対を使用して、同じアッセイにおいて一つ以上のポリヌクレオチド配列を同時に「リアルタイム」検出することも開示している。前記5'-ヌクレアーゼPCRアッセイは、図1に示されている。

30

40

#### 【0007】

当初、5'-ヌクレアーゼプローブは、効率的なFRETを得るためには、内部ヌクレオチドの、5'-フルオロフォア（通常は、フルオレセイン（FAM）又はテトラクロロフルオレセイン（TET））の間近にクエンチャ（通常は、テトラメチルローダミン（TAMRA））が位置する状態で作られなければならないと信じられていた。後に、これは不要であり、クエンチャとフルオロフォアとは、それぞれ、ODNの3'末端と5'末端とに位置することが可能であることが判った。溶液中でこれら蛍光発光プローブによって形成されるランダムコイル構造によって、分子が励起状態にある間に、3'-クエンチャ染料が、5'-フルオロフォアのForsster径の中を通過することが許容されると提案されている。

#### 【0008】

多数の供与/受容対が従来記載されているが、これらの内で本発明にとって重要であるのは、ダブシルであって、これは、例えば、化学センサにおいてダンシルスルホンアミドのクエンチャとして使用される（非特許文献5）。

#### 【0009】

驚くべきことに、ダブシルを、5'-ヌクレアーゼプローブや、波長の長いフルオロフォアを使用するその他のFRETプローブに使用することについての報告はこれまで公開

50

されていない。上述したように、ダブシルは、ビーコン式プローブに使用されたが、これは、ダブシルとフルオロフォアとが密接接触（衝突消光）状態にある別の消光メカニズムである。ダブシルは、短い（490 nm、青色）波長で発光するフルオロフォアEDANS（5 - [（2 - アミノエチル）アミノ]ナフタレン - 1 - スルホン酸）用のクエンチャとして蛍光発光ペプチドに使用された（非特許文献6）。EDANSは、又、ダブシルよりも消光係数が低いので、蛍光消光が効率的であったとしても驚くに値しない。本発明において、初めて、ダブシルをFRET式メカニズムにおいてフルオレセインを消光するのに使用可能であることが判ったのである。

#### 【0010】

前記5′ - ヌクレアーゼPCRアッセイの他に、FRETメカニズムを使用するその他の方式も開発されている。例えば、一本鎖シグナルプライマが、二つの染料へのリンクによって改変され、その第1染料の蛍光発光が第2染料によって消光されるような、供与/受容染料対が形成された。このシグナルプライマは、標的に対してハイブリダイズした時に、適当な制限酵素が切断する（nick）することを許容する制限部位（特許文献1）を含む。この開裂によって、二つの染料が分離され、消光の減少による蛍光発光の変化が観察される。オリゴヌクレオチドをリガンドに結合させるための非 - ヌクレオチド連結試薬も記載されている（特許文献2）。

#### 【0011】

FRETシステムは、又、酵素学においても用途を有する。供与/受容染料対が基質に組み込まれたプロテアーゼ開裂可能基質が開発された。酵素による基質の開裂によって供与/需要対が分離され、消光の減少による蛍光発光の変化が観察される。キモトリプシン用（非特許文献7）、アミノペプチダーゼP（非特許文献8）、ストロメリシン（非特許文献9）及びロイコトリエンD<sub>4</sub>ヒドラーゼ（非特許文献10）用に、開裂可能供与/受容基質が開発されている。リガンドの結合が供与/受容対を分離する化学センサが記載された（非特許文献11）。

#### 【0012】

特許文献3において、共有結合小溝バインダ（MGB）を備えたオリゴヌクレオチド（ODN）は、非修飾オリゴヌクレオチドよりも、それらの相補的標的に対してより配列特異的であることが開示された。更に、前記MGB - ODNは、非修飾オリゴヌクレオチドと比較した場合、相補的DNA標的鎖とのハイブリッド安定性の大幅な増加を示し、より短いオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションを可能にする。

#### 【0013】

上述したFRETアッセイを効率的に利用するためには、オリゴヌクレオチドの蛍光発光標識用の試薬が非常に重要である。DNAマイクロアッセイ等のその他の用途も、蛍光発光標識DNAプローブ又はプライマを使用するので、蛍光発光DNAの合成を容易にする改良式試薬が求められている。一般に、ODN合成には、ホスホルアミダイト試薬及び固体支持体が広く使用されている。しかし、当該技術の現状においては、蛍光発光基をODNに導入するためのホスホルアミダイト試薬として市販されているものは多くない。

#### 【0014】

種々のリガンド基をODNに付着させるリンカ基は、オリゴヌクレオチド接合体の合成に重要な役割を果す。3′ - アミノヘキシル尾オリゴヌクレオチドの合成法（非特許文献12）、三官能基性トランス - 4 - ヒドロキシ - L - プロリノール基（非特許文献13）、ジグリコール酸（非特許文献14）、1、3 - ジオール試薬（特許文献4及び特許文献5）そして、非ヌクレオチド三官能基性試薬（特許文献2）が報告されている。

#### 【0015】

レゾルフィン及びクマリン誘導体が、チトクロムP450のイソ酵素を識別するための酵素基質として広く使用されてきた（非特許文献15）。反応性レゾルフィン類似体が、特許文献6に開示されている。クマリン誘導体の活性化エステルは公知である（非特許文献16）。プローブに導入されたクマリン - 標識化dUTPがイン・サイチュハイブリダイゼーションに使用された（非特許文献17）。オリゴヌクレオチドに標識を導入するため

10

20

30

40

50

のホスホルアミダイトが特許文献7及び特許文献8に記載されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0016】

【特許文献1】米国特許第5、846、726号

【特許文献2】米国特許第5、696、251号

【特許文献3】米国特許第5、801、155号

【特許文献4】米国特許第5、942、610号

【特許文献5】米国特許第5、451、463号

【特許文献6】米国特許第5、304、645号

【特許文献7】米国特許第5、328、824号

【特許文献8】米国特許第5、824、796号

【非特許文献】

【0017】

【非特許文献1】Nonisotopic DNA Probe Techniques, Academic Press, Inc., San Diego 1992, pp.311-352

【非特許文献2】チアギ(Tyagi)等、Nat. Biotech.,16:49-53(1998)

【非特許文献3】ナザレンコ(Nazarenko)等、Nucl. Acid. Res., 25:2516-2521(1997)

【非特許文献4】リー(Lee)等、Nucl. Acid Res., 21:3761-3766(1993)

【非特許文献5】ロスマン(Rothman)及びスティル(Still)(1999) Med. Chem. Lett. 20  
.22,509-512

【非特許文献6】マトヨシ(Matayoshi)等Science 247:954-958(1990)

【非特許文献7】リー(Li)等、Bioconj. Chem., 10:241-245(1999)

【非特許文献8】ホーソン(Hawthorne)等、Anal. Biochem., 253:13-17(1997)

【非特許文献9】ビケット(Bickett)等、Ann. N. Y. Acad. Sci., 732: 351-355(1994)

【非特許文献10】ホワイト(White)等、Anal. Biochem., 268: 245-251(1999)

【非特許文献11】ロスマン(Rothman)等. Biorg. Med. Chem.Lett., 9: 509-512 (1999)

【非特許文献12】ペトリ(Petrie)等、Bioconj. Chem., 3: 85-87(1992)

【非特許文献13】リード(Reed)等、Bioconj. Chem., 2: 217-225 (1991)

【非特許文献14】ポン(Pon)等、Nucl.Acids.Res.,25:3629-3635(1997)

【非特許文献15】ホーランド(Haugland)等、Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, 第6版、Eugene, OR. pp.235-236. (1996)

【非特許文献16】ヒルシュバーグ(Hirshberg)等、Biochem., 37: 10391-5 (1998)

【非特許文献17】ウィーガント(Wiegant)等、Cytogenet. Cell Gnet., 63: 73-76 (1993)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0018】

多くの最近のハイブリダイゼーション用途は、一つ以上のレポータ分子を必要とする。更に、レポータフルオロフォアを、レポータ/クエンチャ対に使用することが可能ではあるが、その大半は、いくつかの望ましくない特性、分離が困難な混合物、正電荷、合成の困難、オリゴヌクレオチド合成中の不安定性、又は、他の望ましいレポータとの発光波長のオーバーラップ等の問題を有する。本発明は、これらの望ましくない特性に取り組み、これらの困難のいくつか又は全部を解決する、オリゴヌクレオチドプローブ用の試薬を提供するものである。

【課題を解決するための手段】

【0019】

発明の要旨

10

20

30

40

50

本発明は、4 - [ 4 - ニトロフェニル ] ジアジニル ] フェニルアミン及び / 又は 4 - [ 4 - ニトロフェニル ] ジアジニル ] - ナフチルアミン構造に基くクエンチャ分子を提供する。これらクエンチャ分子は、一般的に使用されている短い波長域 ( 約 4 0 0 ~ 5 0 0 n m ) で発光する蛍光発光レポータ基のみならず、中 ( 5 2 5 n m = 緑色 ) ~ 長 ( 6 7 0 = 赤色 ) の波長に渡る蛍光発光レポータ基に対しても改良されたUVスペクトルオーバーラップを有する。本発明のクエンチャ発色団 ( c h r o m o p h o r e ) は、非蛍光発光で、DNA合成試薬に容易に導入され、自動化DNA合成、及び保存中に安定しており、ハイブリダイゼーション特性に対する悪影響が無い。更に、より広範囲の波長域に渡って蛍光発光レポータ染料の信号対ノイズ率の改善が観察される。従って、本発明は、従来技術において使用されていたような、消光染料としてのダブシルの使用法(ナザレンコ (Nazerenko) 等, Nucl. Acids. res. 25: 2516-21 (1997)) に対して大きな利点を提供するものである。

10

**【 0 0 2 0 】**

本発明の一態様によれば、4 - [ 4 - ニトロフェニル ] ジアジニル ] フェニルアミン ( 及び / 又は 4 - [ 4 - ニトロフェニル ] ジアジニル ) - ナフチルアミン構造 ) に基く前記クエンチャは、自動化DNA合成中におけるそれらの蛍光発光DNAプローブへの容易な導入を可能にするリンカ構造によって修飾される。本発明は、自動化合成中に前記クエンチャ部分のオリゴヌクレオチドへの導入用の、前記新規なクエンチャ分子から誘導されるホスホルアミダイトの合成、更に、アミノ尾オリゴヌクレオチドへのポスト固相支持体付着用の、前記新規なクエンチャ分子から誘導される試薬の合成も含む。関連態様において、前記新規クエンチャ分子は、それぞれ3'位と5'位とに付着された前記クエンチャを含有する、ピラゾロ - [ 5, 4 - d ] ピリミジンとピリミジンホスホルアミダイトとを使用してオリゴヌクレオチドに導入される。

20

**【 0 0 2 1 】**

本発明の別の態様によれば、DNA合成に適合可能な三種類の蛍光発光試薬タイプが合成又は選択され、ODNへの導入に適したホスホルアミダイト試薬に変換される。具体的には、10 - フェニル - 1, 3, 5, 7, 9, 10 - ヘキサヒドロピリミジノ [ 5', 4' - 5, 6 ] ピリジノ [ 2, 3 - d ] ピリミジン - 2, 4, 6, 8 - テトラオン ( P P T ) 構造に基くバイオレット蛍光発光染料と、7 - ヒドロキシフェノキサジン - 3 - オン ( レゾルフィン ) に基く赤色蛍光発光染料と、クマリンの構造に基く青色蛍光発光染料とが、ホスホルアミダイト試薬に導入される。これらの蛍光発光染料は、他の染料 ( 例えば、フルオレセイン ) との組み合わせで、多色蛍光発光分析のための極めて優れた特性を有する。これらの試薬は、蛍光発光の直接検出又はFRET検出方式のいずれかを使用する種々の分析方法に有用である。本発明の関連態様において、前記PPT - 、クマリン - 及びレゾルフィン - ベースのフルオロフォア ( 蛍光発光染料 ) は、ODNの5'末端での「オリゴヌクレオチド - 合成後」共有結合付着に適した新規な試薬に変換される。別の態様において、前記新規蛍光発光染料は、それぞれ、3 - 位置及び5 - 位置に付着したフルオロフォアを含有する、ピラゾロ [ 5, 4 - d ] ピリミジンとピリミジンホスホルアミダイトを使用したオリゴヌクレオチドに導入される。

30

**【 0 0 2 2 】**

本発明の更に別の態様において、共有結合付着された蛍光発光部分と対合する、本発明の前記新規クエンチャ構造と共有結合連結されたODNが作成される。その結果得られるFL - ODN - Q接合体は、更に、診断アッセイ、特に、対立遺伝子特異的識別が、種々の蛍光発光レポータ分子を備えるプローブのみならず、効率的なクエンチャをも必要とする、一塩基多型 ( 等 ) のTaqMan PCRアッセイにおける、前記得られたFL - ODN - Q - MGB接合体の結合及び識別特性を改善する、小溝バインダ ( MGB ) も含むことができる。前記FL - ODN - Q - MGB接合体中で本発明によって使用される前記クエンチャは、広い消光波長域を提供し、本発明による或る種の新規なレポータ標識試薬は、改良式多色分析用の異なる発光波長を有する。

40

**【 0 0 2 3 】**

50

上に要約した原理の一用途において、汎用「3′-ヘキサノール」固体支持体（ここに参考文献として合体させるガンパー（Gamber）等、*Nucleic Acids Res.*, 21: 145-150 (1993)により入手可能）を使用して蛍光発光プローブが作成され、ここでは、本発明のクエンチャホスホルアミダイトが、前記ODN配列の第1結合工程（3′-末端）で添加され、フルオロフォア（FL）が、最終結合工程において付着され、5′-FL-ODN-Q-ヘキサノール接合体プローブが得られる。

【0024】

本発明のその他の用途として、前記新規クエンチャの合成方法、及び、前記新規クエンチャを、3′-小溝バインダ（MGB）を含む、又は含まない、ODN-フルオロフォア接合体へ付着させる方法が開示される。これらの方法は、開裂可能なリンカとともに、自動化オリゴヌクレオチド合成用の合成固体支持体を利用する。

10

【0025】

別の用途において、ルクタノフ（Lukhtanov）等*Bioconjugate Chem.*, 7: 564-567 (1996)の操作により、MGB修飾固体支持体から、蛍光発光オリゴヌクレオチドプローブが作られ、ここでは、本発明のクエンチャ-ホスホルアミダイトが、第1結合工程において前記MGBに添加され、フルオロフォア（FL）が最終結合工程においてODNに付着されて、5′-FL-ODN-Q-MGB接合体プローブが作られる。

【0026】

本発明の前記方法及び組成物のその他の用途は、最近、医療科学、法廷科学、農業及び水質制御等の多くの分野において重要になっている、核酸ベースの診断アッセイにおけるマイクロアレイとしてである。本発明の前記方法及び組成物のその他の関連用途は、遺伝子発現のアレイベースの分析等の、オリゴヌクレオチドのアレイを使用する操作である（アイセン（Eisen）, *Methods of Enzym.*, 303: 179-205 (1999)）。これらの操作において、多くの生物において遺伝子の全部又は多くの部分に対応するオリゴヌクレオチド又はDNAの秩序配列が、ハイブリダイゼーション用のプラットフォームとして使用される。マイクロアレイベース方法は、発現されたRNA種の相対的表象を測定するアッセイに使用される。各RNA種の豊富性の相違の定量化は、それらを、スペクトル的に異なる蛍光発光染料によって標識化し、同時ハイブリダイゼーション用の二つのプローブを一つのアレイに混合して、直接的に二つのサンプルを比較することによって達成される。

20

【0027】

本発明の前記組成物及び方法が核酸の検出に関連する程度において、本発明は、5′-ヌクレアーゼ、汎用エネルギー転移プライマ又はビーコンアッセイ等の、FRETが使用される方法を、非限定的に、含む。これらの方法は、通常、PCR-生成核酸配列の検出用であるが、それに限られるものではない。これらの方法の内のいくつかは、同じアッセイ中の一つ以上の核酸配列の同時検出を含む。同様に、本発明は、FRETが、タンパク質濃度又は酵素活性の検出に使用される方法に関する。

30

【0028】

本発明のその他の用途は、アミノ、ヒドロキシル、又はスルフィドリル基等の反応基における、薬剤、トキシン、細胞、微生物物質、粒子、ガラス又はポリマ表面等を含む、核酸、タンパク質、及びその他の物質の、発光PPT-、クマリン-、レゾルフィン-ベースの染料による標識化に関する。本発明は、一工程及び二工程プロセスに使用することができる。二工程標識プロセスにおいては、オリゴヌクレオチド等の第1成分が、ODNの反応基（アミン、ヒドロキシル、カルボキシル、アルデヒド、又はスルフィドリル基等）との反応によって、前記新規フルオロフォアPPT-、クマリン-、及びレゾルフィン-ベース染料を導入可能な前記試薬によって標識され、その標識が、オリゴヌクレオチド標的等の第2成分用のプローブとして使用される。

40

【0029】

即ち、本願発明は以下の発明を提供する。

次の式を有するオリゴヌクレオチド接合体、

FL-ODN-Q

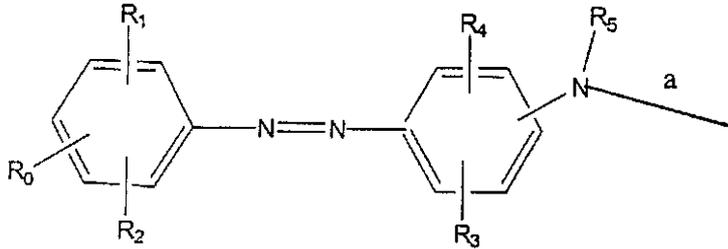
50

ここで、ODNはオリゴヌクレオチド又は核酸、

FLは、0～約30原子の長さを有するリンカを介して前記ODNに共有結合付着されたフルオロフォア部分、そして

Qは、0～約30原子の長さを有するリンカを介して前記ODNに共有結合付着されたクエンチャ部分であり、当該クエンチャ部分は下記の構造を有する、

【化1】



10

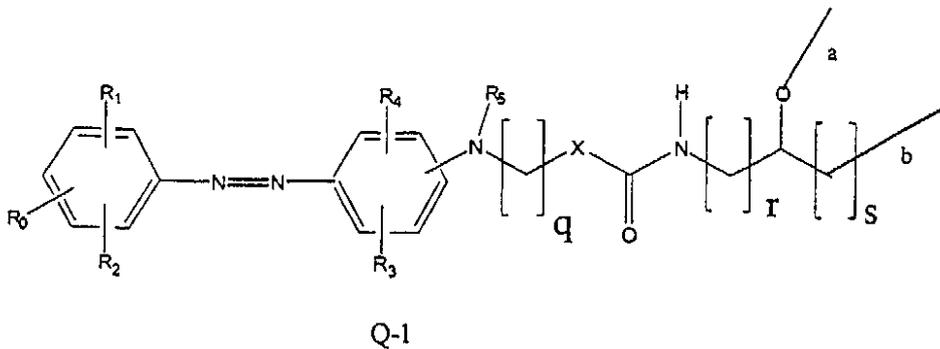
ここで、 $R_0$ 、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 及び $R_4$ は、それぞれ独立的に、 $-H$ 、ハロゲン、 $n = 0 \sim 5$ である $-O(CH_2)_nCH_3$ 、 $-(CH_2)_nCH_3$ 、 $-NO_2$ 、 $-SO_3$ 、 $n' = 0 \sim 5$ である $-N[(CH_2)_nCH_3]_2$ 、又は $-CN$ 、及び $R_5 = -H$ 又は $n'' = 0 \sim 5$ である $-(CH_2)_nCH_3$ 、そして、前記クエンチャ部分は、 $a$ によって表わされる原子価結合を介して前記リンカに付着している。

20

上記オリゴヌクレオチド接合体であって、 $R_0$ は $-H$ 、 $R_1$ はベンゼン核の4位の $-NO_2$ 、 $R_2$ はベンゼン核の2位の $-H$ 又は $-Cl$ 、そして $R_3$ 及び $R_4$ は $-H$ であり、 $R_5$ はエチルである。

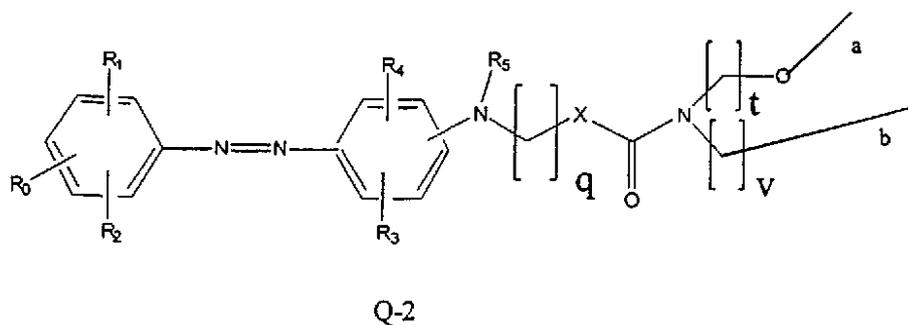
上記オリゴヌクレオチド接合体であって、前記クエンチャ部分と、それを前記ODNに付着する前記リンカとは、下記の式Q-1、Q-2及びQ-3に図示された部分から選択される構造を有する、

【化2】



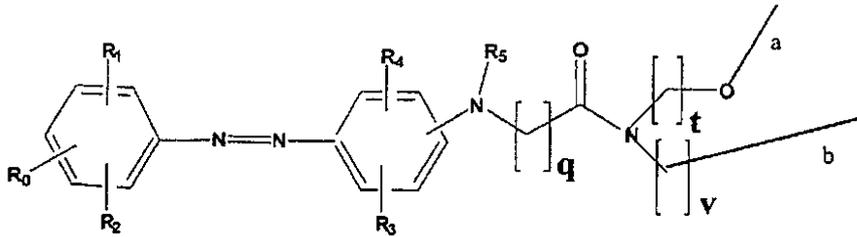
30

【化3】



40

## 【化4】



Q-3

10

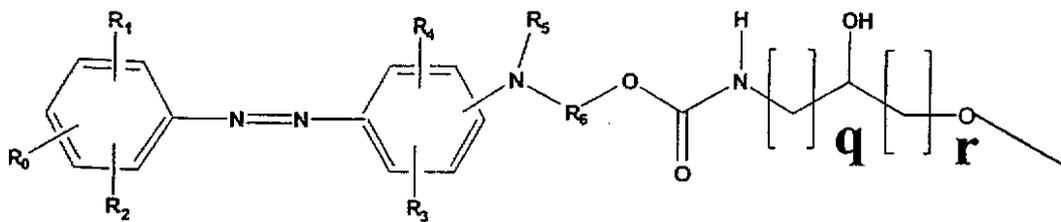
ここで、 $q$ は1~20、 $X$ は $-O-$ 、 $-OCH_2-$ 又は $-CH_2-$ であり、 $t$ と $v$ とは、独立的に、1~20、 $r$ と $s$ は、独立的に1~20、そして前記接合クエンチャとリンカ部分は、 $a$ 又は $b$ によって示される原子価結合の一つを介して前記ODNに付着されている。

上記オリゴヌクレオチド接合体であって、更に、 $a$ 又は $b$ によって示される原子価結合の一つを介して前記クエンチャ-リンカ接合体に付着する小溝バイнда部分を有する。

上記オリゴヌクレオチド接合体であって、前記クエンチャ部分と、それを前記ODNに付着するリンカとは、下記の式Q-4及びQ-5に図示された部分から選択される構造を有する、

20

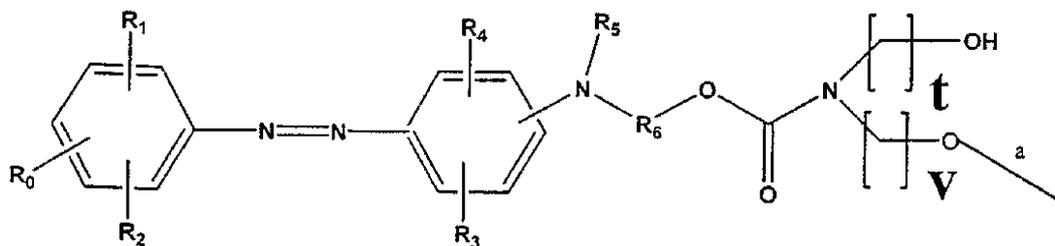
## 【化5】



Q-4

30

## 【化6】



Q-5

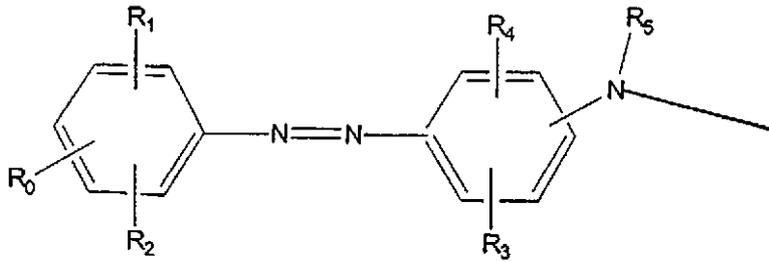
40

ここで、 $R_6$ は $n^*$ は1~20である $-(CH_2)_{n^*}$ であり、 $t$ と $v$ とは、独立的に、1~20、そして前記クエンチャ部分は、 $a$ によって示される原子価結合を介して前記ODNに付着されている。

## 【0030】

オリゴヌクレオチド-フルオロフォア-クエンチャ接合体を作成するためのホスホルアミダイト試薬であって、当該試薬は下記の部分

## 【化 7】

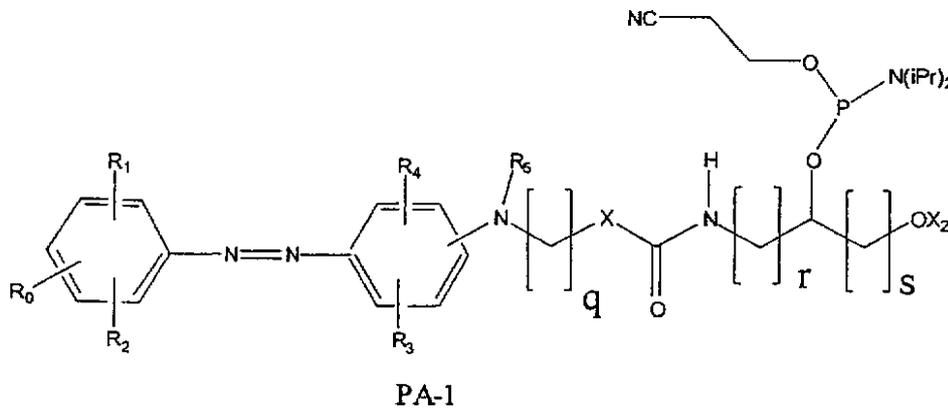


ここで、 $R_0$ 、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 及び $R_4$ は、それぞれ独立的に、 $-H$ 、ハロゲン、 $n = 0 \sim 5$ である $-O(CH_2)_nCH_3$ 、 $-(CH_2)_nCH_3$ 、 $-NO_2$ 、 $-SO_3$ 、 $n' = 0 \sim 5$ である $-N[(CH_2)_nCH_3]_2$ 、又は $-CN$ 、及び $R_5 = -H$ 又は $n'' = 0 \sim 5$ である $-(CH_2)_nCH_3$ 、そして、

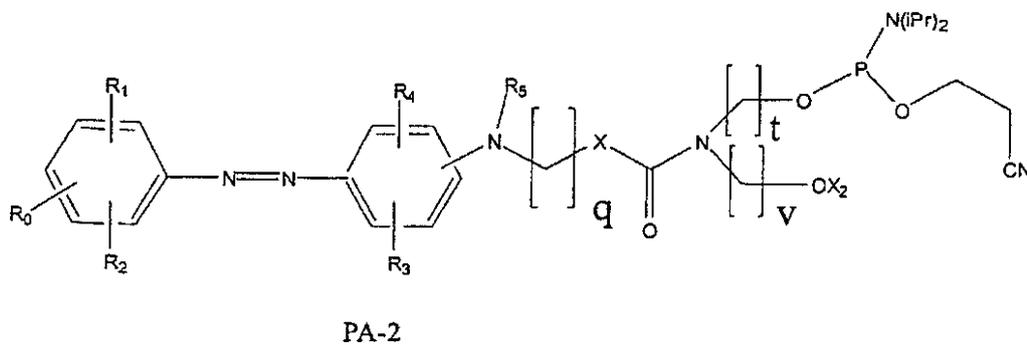
それに共有結合されたビス(メチルエチル)アミノ](2-シアノエトキシ)ホスフィノオキシ部分、を有する。

上記ホスホルアミダイト試薬であつて、PA-1、PA-2及びPA-3として示された式から成るグループから選択される式を有する、

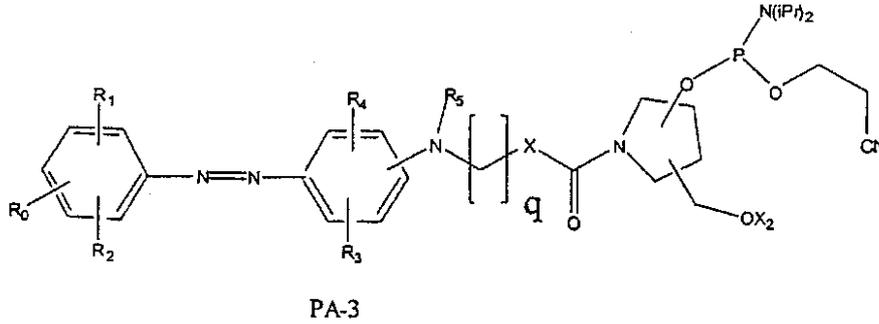
## 【化 8】



## 【化 9】



## 【化10】



10

ここで、 $R_0$ 、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 及び $R_4$ は、それぞれ独立的に、 $-H$ 、ハロゲン、 $n = 0 \sim 5$ である $-O(CH_2)_nCH_3$ 、 $-(CH_2)_nCH_3$ 、 $-NO_2$ 、 $-SO_3$ 、 $n' = 0 \sim 5$ である $-N[(CH_2)_n \cdot CH_3]_2$ 、又は $-CN$ 、及び $R_5 = -H$ 又は $n'' = 0 \sim 5$ である $-(CH_2)_n \cdot CH_3$ 、 $q$ は $1 \sim 20$ 、 $X$ は $-O-$ 又は $-CH_2-$ 、 $t$ 、 $v$ 、 $r$ 及び $s$ は、独立的に、 $1 \sim 20$ であり、そして、 $X_2$ は、 $-H$ 又はジメトキシトリチル、メトキシトリチル、トリチル又は酸不安定ブロック基である。

上記ホスホルアミダイト試薬であって、PA-1として示された式を有する。

上記ホスホルアミダイト試薬であって、PA-2として示された式を有する。

上記ホスホルアミダイト試薬であって、PA-3として示された式を有する。

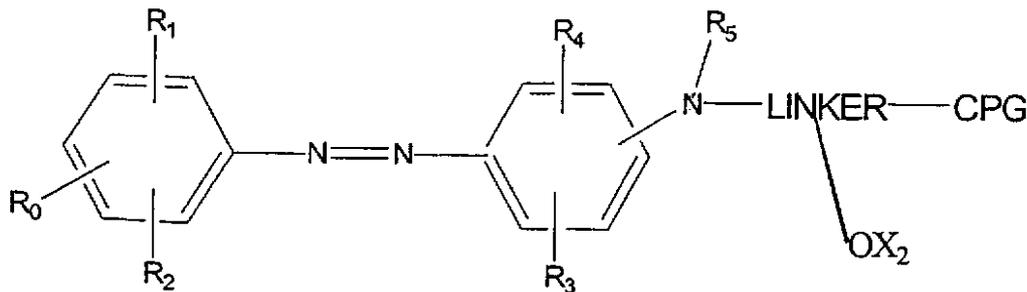
20

上記ホスホルアミダイト試薬であって、 $R_0$ は $-H$ 、 $R_1$ はベンゼン核の4位の $-NO_2$ 、 $R_2$ はベンゼン核の2位の $-Cl$ 、そして $R_3$ 及び $R_4$ は $-H$ であり、 $R_5$ はエチルである。

## 【0031】

オリゴヌクレオチド合成に適した、共有結合した固体支持体とクエンチャとの接合体であって、下記の構造を有する、

## 【化11】



30

ここで、CPGは、ポリマ固体支持体を示し、

リンカは、 $1 \sim$ 約30原子の長さを有し、ジフェニルアゾ部分を前記CPGに結合する部分、

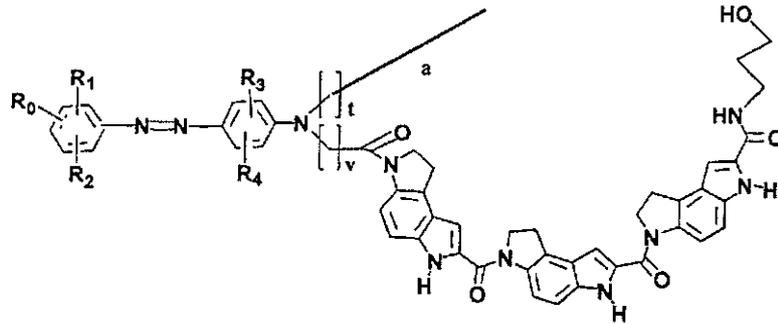
$X_2$ は、 $OH$ 又はジメトキシトリチル、メトキシトリチル、トリチル又は酸不安定ブロック基、 $R_0$ 、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 及び $R_4$ は、それぞれ独立的に、 $-H$ 、ハロゲン、 $n = 0 \sim 5$ である $-O(CH_2)_nCH_3$ 、 $-(CH_2)_nCH_3$ 、 $-NO_2$ 、 $-SO_3$ 、 $n' = 0 \sim 5$ である $-N[(CH_2)_n \cdot CH_3]_2$ 又は $-CN$ であり、 $R_5 = -H$ 又は $n'' = 0 \sim 5$ である $-(CH_2)_n \cdot CH_3$ である。

40

上記共有結合した固体支持体とクエンチャとの接合体であって、下記の構造から選択される構造を有する、



## 【化15】



10

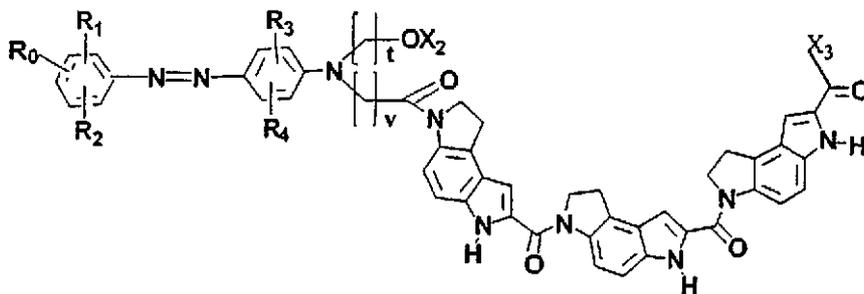
ここで、 $t$ と $v$ とは、独立的に1~20であって、 $a$ によって示される原子価結合が前記MGB-Q部分を前記ODN部分に付着させている。

上記オリゴヌクレオチド接合体であって、 $R_0$ は-H、 $R_1$ はベンゼン核の4位の-NO<sub>2</sub>、 $R_2$ はベンゼン核の2位の-H又は-Cl、そして $R_3$ 及び $R_4$ は-Hである。

## 【0033】

オリゴヌクレオチド合成用の、共有結合した小溝バインダ・クエンチャ試薬であって、以下の構造を有する、

## 【化16】



20

ここで、 $R_0$ 、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 及び $R_4$ は、それぞれ独立的に、-H、ハロゲン、 $n = 0 \sim 5$ である- $O(CH_2)_nCH_3$ 、- $(CH_2)_nCH_3-NO_2$ 、- $SO_3$ 、 $n' = 0 \sim 5$ である- $N[(CH_2)_nCH_3]_2$ 又は-CNであり、そして $t$ と $v$ とは、独立的に1~20である、

30

$X_2$ は、-H又はジメトキシトリチル、メトキシトリチル、トリチル又は酸不安定ブロック基、そして

$X_3$ は、ペンタフルオロフェニルオキシ、又はNH-LINKER-CPG又はO-LINKER-CPGであり、ここで、CPGはポリマ固体支持体であり、リンカは約0~30原子の長さを有し前記三環性部分を前記CPGに結合する結合部分である。

上記共有結合した小溝バインダ・クエンチャ試薬であって、 $X_3$ はペンタフルオロフェニルオキシである。

上記共有結合した小溝バインダ・クエンチャ試薬であって、 $X_3$ は、NH-LINKER-CPG又はO-LINKER-CPGである。

40

上記共有結合した小溝バインダ・クエンチャ試薬であって、 $R_0$ は-H、 $R_1$ はベンゼン核の4位の-NO<sub>2</sub>、 $R_2$ はベンゼン核の2位の-H又は-Cl、そして $R_3$ 及び $R_4$ は-Hであり、 $v = t = 3$ である。

## 【0034】

次の式を有するオリゴヌクレオチド接合体、



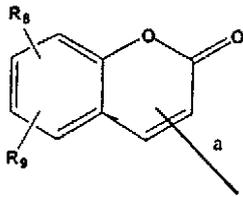
ここで、ODNはオリゴヌクレオチド又は核酸、

Qは、0~約30原子の長さを有するリンカを介して前記ODNに共有結合付着されたクエンチャ部分、

50

FLは、0～約30原子の長さを有するリンクを介して前記ODNに共有結合付着されたフルオロフォアであり、当該フルオロフォア部分はFL-1、FL-2及びFL-3として示すグループから選択される構造を有する、

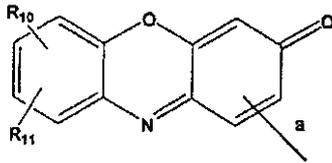
【化17】



FL-1

10

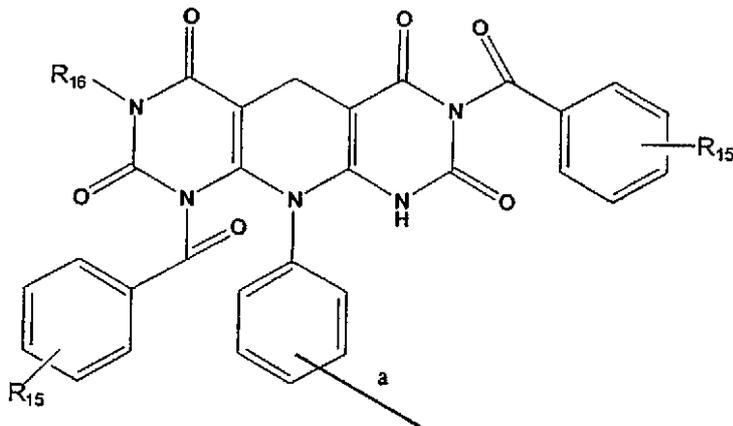
【化18】



FL-2

20

【化19】



FL-3

30

ここで、 $R_8$ 及び $R_9$ は、独立的に、 $-H$ 、ハロゲン、 $-NO_2$ 、 $-SO_3$ 、 $-C(=O)NH_2$ 又は $-CN$ ； $-OR_{nn}$ 、 $-SR_{nn}$ 、 $-OR_{nn}$ 、 $-NHR_{nn}$ 、 $-N[R_{nn}]_2$ であり、ここで $R_{nn}$ は、独立的に、 $-H$ 、1～10炭素のアルキル基又は1～10炭素のアルカノイル基、

40

$R_{10}$ 及び $R_{11}$ は、独立的に、 $-H$ 、 $-CH$ 、 $-OR_{12}$ 、 $-N(R_{12})_2$ 、ハロゲン、 $n=0\sim 5$ である $-O(CH_2)_nCH_3$ 、 $-(CH_2)_nCH_3$ 、 $-NO_2$ 、 $-SO_3$ 、 $-C(=O)NH_2$ 、 $-N[(CH_2)_nCH_3]_2$ であり、又は $R_{12}$ は、1～10炭素のアルキル、1～10炭素のアルカノイル、

$R_{15}$ は、 $-H$ 又は1～10炭素のアルキル、

$R_{16}$ は、1～10炭素のアルキル、そして

$a$ として示された原子価結合は、前記フルオロフォアの前記リンクに対する共有結合付着を示す。

上記オリゴヌクレオチド接合体であって、前記フルオロフォアはFL-1として示され

50

た式を有する。

上記オリゴヌクレオチド接合体であって、 $R_8$ は、 $-OC(O)CH(CH_3)_2$ であり  
 $R_9$ は  $-H$ である。

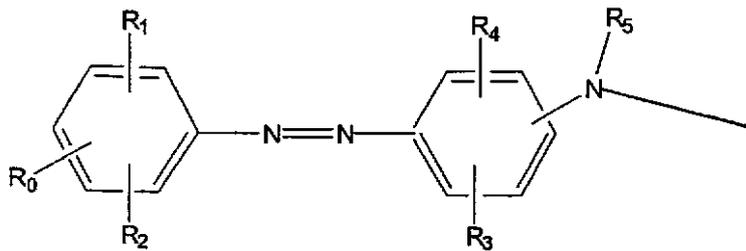
上記オリゴヌクレオチド接合体であって、前記フルオロフォアは FL - 2 として示され  
 た式を有する。

上記オリゴヌクレオチド接合体であって、 $R_{10}$ は、 $-OC(O)CH(CH_3)_2$ であり  
 $R_{11}$ は  $-H$ である。

上記オリゴヌクレオチド接合体であって、前記フルオロフォアは FL - 3 として示され  
 た式を有する。

上記オリゴヌクレオチド接合体であって、 $R_{15}$ はメチルであり、 $R_{16}$ は  $n$ -プロピルで  
 ある。 10

上記オリゴヌクレオチド接合体であって、前記クエンチャ部分は下記の構造を有する、  
 【化 2 0】



20

ここで、 $R_0$ 、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 及び $R_4$ は、それぞれ独立的に、 $-H$ 、ハロゲン、 $n = 0$   
 $\sim 5$ である  $-O(CH_2)_nCH_3$ 、 $-(CH_2)_nCH_3$ 、 $-NO_2$ 、 $-SO_3$ 、 $n' = 0 \sim 5$   
 である  $-N[(CH_2)_n \cdot CH_3]_2$ 又は  $-CN$ であり、 $R_5 = -H$ 又は $n'' = 0 \sim 5$ で  
 ある  $-(CH_2)_n \cdot CH_3$ である。

上記オリゴヌクレオチド接合体であって、更に、 $0 \sim$ 約 30 原子の長さを有するリンカ  
 を介して前記クエンチャ部分に付着された別の小溝バインダ部分 (MGB) を有し、これ  
 により、前記オリゴヌクレオチド接合体は以下の式を有する、

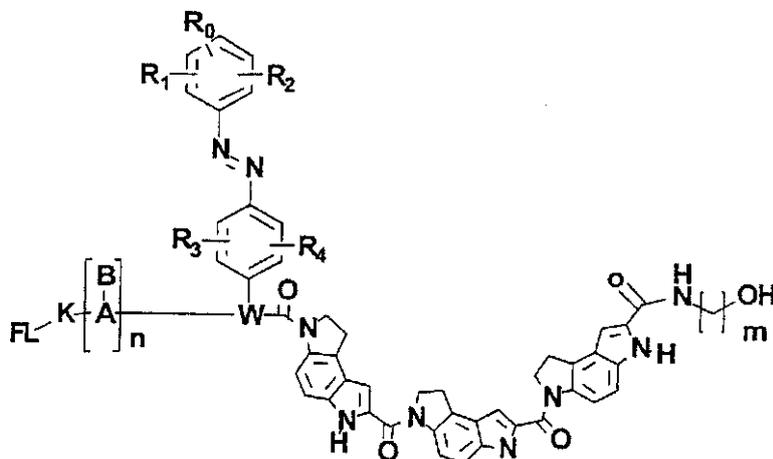
FL - ODN - Q - MGB。

【0035】

30

下記の式のオリゴヌクレオチド接合体、

【化 2 1】



40

ここで、 $R_0$ 、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 及び $R_4$ は、それぞれ独立的に、 $-H$ 、ハロゲン、 $n^* = 0$   
 $\sim 5$ である  $-O(CH_2)_n \cdot CH_3$ 、 $-(CH_2)_n \cdot CH_3$ 、 $-NO_2$ 、 $-SO_3$ 、 $n' = 0 \sim$   
 $5$ である  $-N[(CH_2)_n \cdot CH_3]_2$ 、又は  $-CN$ 、

FL は、約 300 ~ 約 800 nm の帯域の発光波長を有するフルオロフォア部分、

50

Kは、C、O、N、S、P及びHから成るグループから選択される1～約30原子を含むリンカ、

[A - B]<sub>n</sub>は、ODN、DNA、RNA又はPNA或いはそれらの組み合わせを示し、ここで、Aは、糖とリン酸とが独立的に修飾され得る糖リン酸骨格鎖、Bは、複素環塩基、ここで、Bは、独立的に、プリン、ピリミジン、ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン、7-置換ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン、7-デアザプリン、7-置換7-デアザプリン、及び修飾プリン-及びピリミジン-塩基であり、DNA、RNA、PNA又はODNは、これらの塩基のすべての組み合わせを含むことができる、そして

nは、前記DNA、RNA、PNA又はODNのヌクレオチド単位の数、

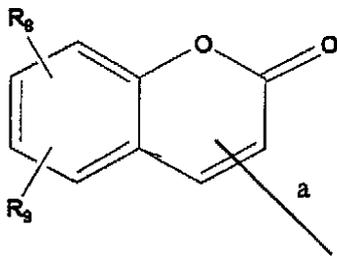
Wは、C、O、N、S、P及びHから成るグループから選択される0～約30原子の長さのリンカ、そして

mは、1～20の値を有する整数である。

上記オリゴヌクレオチド接合体であって、R<sub>0</sub>は-H、R<sub>1</sub>はベンゼン核の4位の-NO<sub>2</sub>、R<sub>2</sub>はベンゼン核の2位の-H又は-Cl、そしてR<sub>3</sub>及びR<sub>4</sub>は-Hである。

上記オリゴヌクレオチド接合体であって、前記フルオロフォア部分はFL-1、FL-2及びFL-3として示すグループから選択される構造を有する、

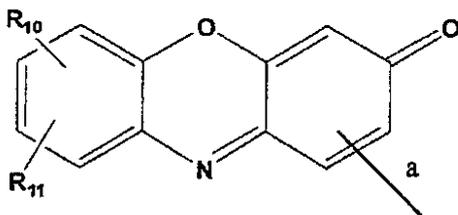
【化22】



FL-1

20

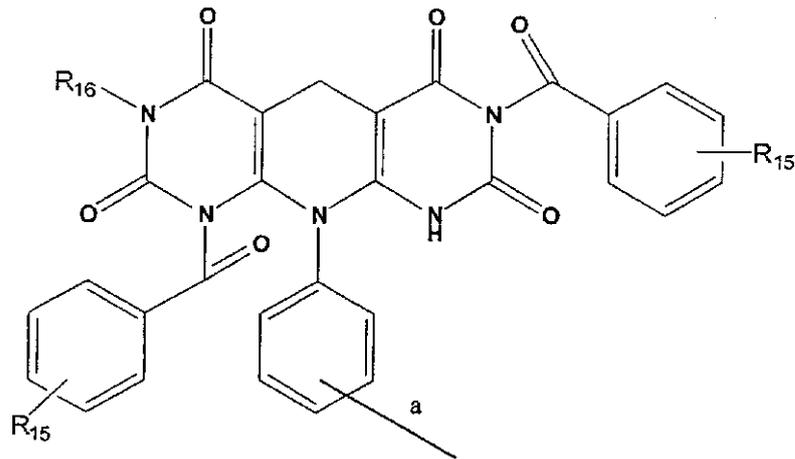
【化23】



FL-2

30

## 【化24】



FL-3

10

ここで、 $R_8$ は、 $-OH$ 又は $-O-$ アルカノイルであり、ここで、アルカノイル基は1  
~ 10の炭素を有する、

$R_9$ は、 $-H$ 又は1~10炭素のアルキル、

20

$R_{10}$ 及び $R_{11}$ は、独立的に、 $-H$ 、 $-OR_{12}$ 、 $-NHR_{13}$ 、ハロゲン、 $n=0\sim 5$ である  
 $-O(CH_2)_nCH_3$ 、 $-(CH_2)_nCH_3$ 、 $-NO_2$ 、 $-SO_3$ 、 $-C(=O)NH_2$ 、  
 $-N[(CH_2)_nCH_3]_2$ 又は $-CN$ であり、

$R_{15}$ は、 $-H$ 又は1~10炭素のアルキル、

$R_{16}$ は、1~10炭素のアルキル、そして

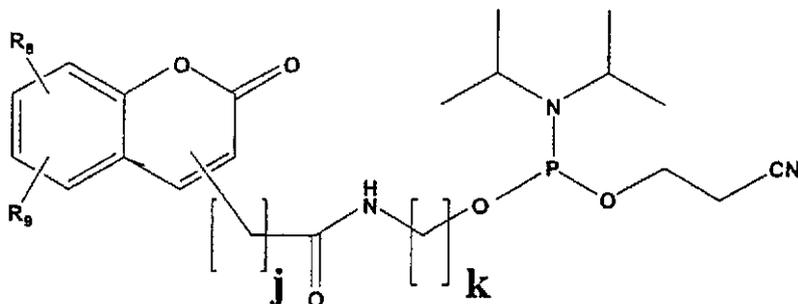
$a$ として示された原子価結合は、前記フルオロフォアの前記リンカKに対する共有結合  
付着を示す。

## 【0036】

オリゴヌクレオチド-フルオロフォア-クエンチャ接合体を作成するためのホスホルア  
ミダイト試薬であって、前記試薬は、PA-4、PA-5及びPA-6として示された構  
造から成るグループから選択される、

30

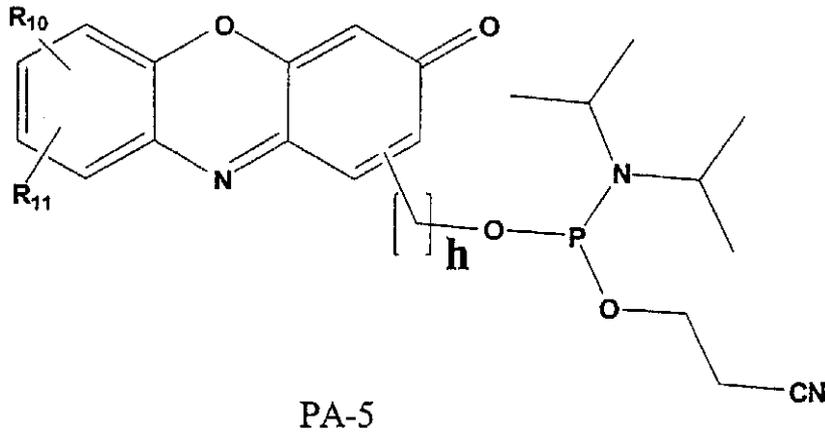
## 【化25】



PA-4

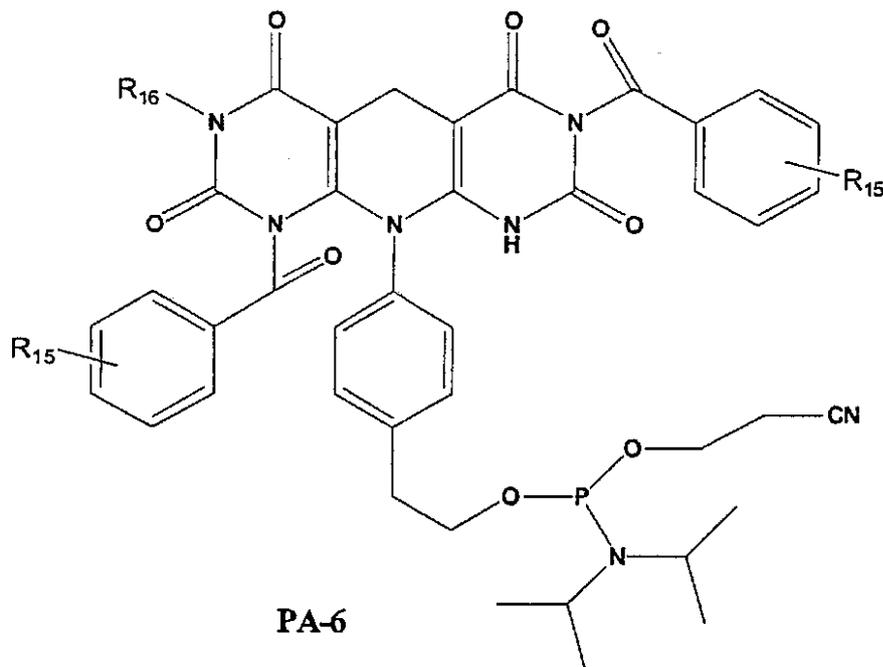
40

## 【化26】



10

## 【化27】



20

30

ここで、 $R_8$ 及び $R_9$ は、独立的に、 $-H$ 、ハロゲン、 $-NO_2$ 、 $-SO_3$ 、 $-C(=O)NH_2$ 又は $-CN$ ； $-OR_{nn}$ 、 $-SR_{nn}$ 、 $-OR_{nn}$ 、 $-NHR_{nn}$ 、 $-N[R_{nn}]_2$ であり、ここで $R_{nn}$ は、独立的に、 $-H$ 、オリゴマ合成に適用可能で酸又はアルカリ条件下で除去可能なブロック基、又は1~10炭素のアルキル又はアルカノイル基、

$j$ 及び $k$ は、独立的に1~10、

$R_{10}$ 及び $R_{11}$ は、独立的に、 $-H$ 、 $-OR_{12}$ 、 $-NHR_{13}$ 、ハロゲン、 $-O(CH_2)_nCH_3$ 、 $-(CH_2)_nCH_3$ 、 $-NO_2$ 、 $-SO_3$ 、 $-C(=O)NH_2$ 、 $-N[(CH_2)_nCH_3]_2$ 、又はアルキル又はアルカノイル基が1~10の炭素を有するO-アルキル又はO-アルカノイル基、又は $-CN$ であり、ここで、 $n=0\sim 5$ 、 $h=1\sim 20$ 、 $R_{12}$ 及び $R_{13}$ は、ODN合成に適用可能なブロック基、

40

$R_{15}$ は、 $-H$ 又は1~10炭素のアルキル、

$R_{16}$ は、1~10炭素のアルキルである。

PA-4として示す式を有する、上記ホスホルアミダイト試薬。

上記ホスホルアミダイト試薬であつて、 $R_8$ は、 $-OC(O)CH(CH_3)_2$ であり、 $R_9$ は $-H$ 、 $j$ は2、そして $k$ は6である。

PA-5として示す式を有する、上記ホスホルアミダイト試薬。

上記ホスホルアミダイト試薬であつて、 $R_{10}$ は、 $-OC(O)CH(CH_3)_2$ であり、

50

$R_{11}$ は - H、そして  $h$  は 3 である。

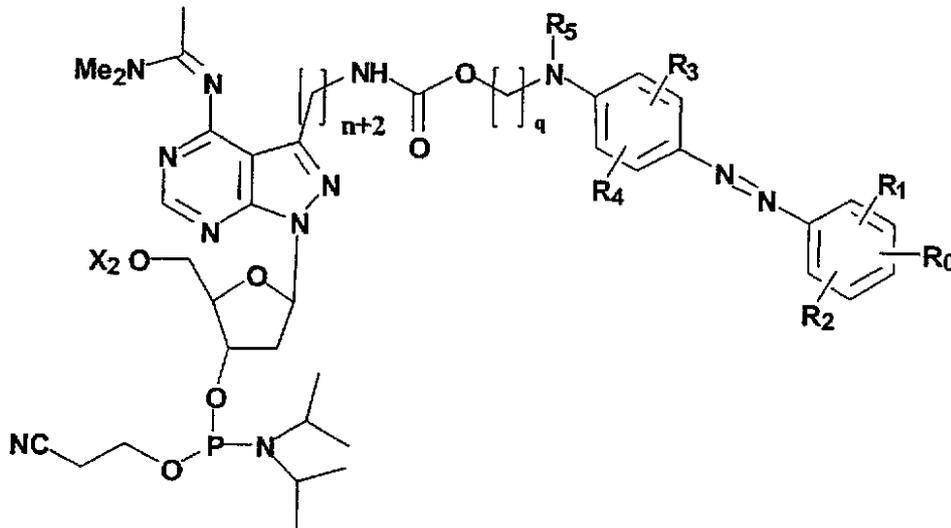
PA - 6 として示す式を有する、上記ホスホルアミダイト試薬。

上記ホスホルアミダイト試薬であって、 $R_{15}$ はメチル、そして  $R_{16}$ は  $n$  - プロピルである。

【0037】

オリゴヌクレオチド - フルオロフォア - クエンチャ接合体を作成するためのホスホルアミダイト試薬であって、当該試薬は下記の式を有する、

【化28】



10

20

ここで、 $R_0$ 、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 及び  $R_4$ は、それぞれ独立的に、- H、ハロゲン、 $n^* = 0 \sim 5$ である -  $O(CH_2)_n \cdot CH_3$ 、-  $(CH_2)_n \cdot CH_3$ 、-  $NO_2$ 、-  $SO_3$ 、 $n' = 0 \sim 5$ である -  $N[(CH_2)_n \cdot CH_3]_2$ 、又は - CN、そして  $R_5 = - H$ 又は  $n'' = 0 \sim 5$ である -  $(CH_2)_n \cdot CH_3$ であり、

$n$ は 1 ~ 10、

$q$ は 1 ~ 20、そして

$X_2$ は、- H又はジメトキシトリチル、メトキシトリチル、トリチル又は酸不安定プロ

30

ック基である。  
上記ホスホルアミダイト試薬であって、 $R_0$ は - H、 $R_1$ はベンゼン核の4位の -  $NO_2$ 、 $R_2$ はベンゼン核の2位の - Cl、そして  $R_3$ 及び  $R_4$ は - H、 $R_5$ はエチル、 $n$ は 1、そして  $q$ は 2 である。

【0038】

下記の式を有するオリゴヌクレオチド接合体、

FL - ODN - MGB

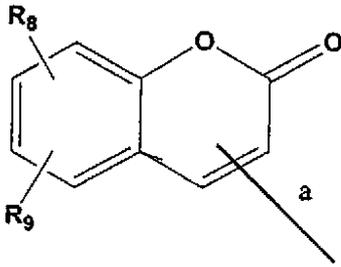
ここでODNはオリゴヌクレオチド又は核酸、

MGBは、0 ~ 約30原子の長さを有するリンカを介して、前記ODN部分又は前記ク

40

エンチャ部分に共有結合付着された小溝バインダ部分、  
FLは、0 ~ 約30原子の長さを有するリンカを介して前記ODNに共有結合付着されたフルオロフォアであり、当該フルオロフォア部分はFL - 1、FL - 2及びFL - 3として示すグループから選択される構造を有する、

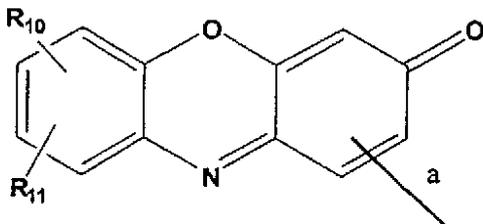
【化 2 9】



FL-1

10

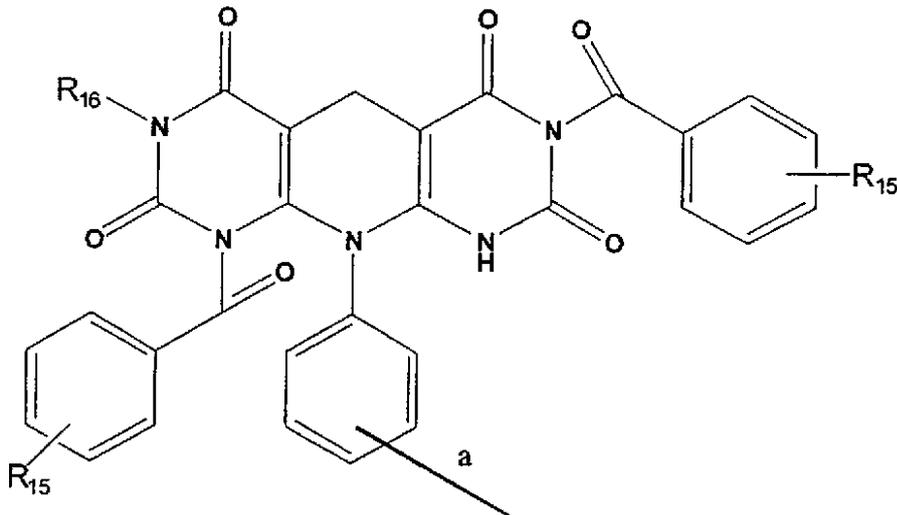
【化 3 0】



FL-2

20

【化 3 1】



FL-3

30

40

ここで、 $R_8$ 及び $R_9$ は、独立的に、 $-H$ 、ハロゲン、 $-NO_2$ 、 $-SO_3$ 、 $-C(=O)NH_2$ 又は $-CN$ ； $-OR_{nn}$ 、 $-SR_{nn}$ 、 $-OR_{nn}$ 、 $-NHR_{nn}$ 、 $-N[R_{nn}]_2$ であり、ここで $R_{nn}$ は、独立的に、 $-H$ 、1～10炭素のアルキル基又は1～10炭素のアルカノイル基、

$R_{10}$ 及び $R_{11}$ は、独立的に、 $-H$ 、 $-CN$ 、 $-OR_{12}$ 、 $-N(R_{12})_2$ 、ハロゲン、 $n=0\sim 5$ である $-O(CH_2)_nCH_3$ 、 $-(CH_2)_nCH_3$ 、 $-NO_2$ 、 $-SO_3$ 、 $-C(=O)NH_2$ 、 $-N[(CH_2)_nCH_3]_2$ であり、又は $R_{12}$ は、1～10炭素のアルキル、

50

1 ~ 10 炭素のアルカノイル、

$R_{15}$  は、-H 又は 1 ~ 10 炭素のアルキル、

$R_{16}$  は、1 ~ 10 炭素のアルキル、そして

a として示された原子価結合は、前記フルオロフォアの前記リンカに対する共有結合付着を示す。

上記オリゴヌクレオチド接合体であって、前記フルオロフォアは FL - 1 として示された式を有する。

上記オリゴヌクレオチド接合体であって、 $R_8$  は、 $-OC(O)CH(CH_3)_2$  であり、 $R_9$  は -H である。

上記オリゴヌクレオチド接合体であって、前記フルオロフォアは FL - 2 として示された式を有する。 10

上記オリゴヌクレオチド接合体であって、 $R_{10}$  は、 $-OC(O)CH(CH_3)_2$  であり、 $R_{11}$  は -H である。

上記オリゴヌクレオチド接合体であって、前記フルオロフォアは FL - 3 として示された式を有する。

上記オリゴヌクレオチド接合体であって、 $R_{15}$  はメチルであり、 $R_{16}$  は n - プロピルである。

【0039】

下記の式を有するオリゴヌクレオチド接合体、

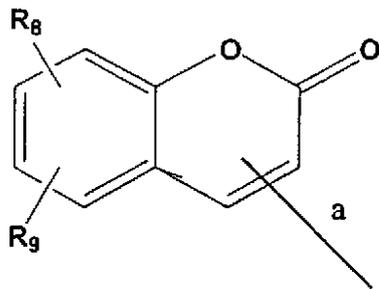
FL - ODN

20

ここで ODN はオリゴヌクレオチド又は核酸、

FL は、0 ~ 約 30 原子の長さを有するリンカを介して前記 ODN に共有結合付着されたフルオロフォアであり、当該フルオロフォア部分は FL - 1、FL - 2 及び FL - 3 として示すグループから選択される構造を有する、

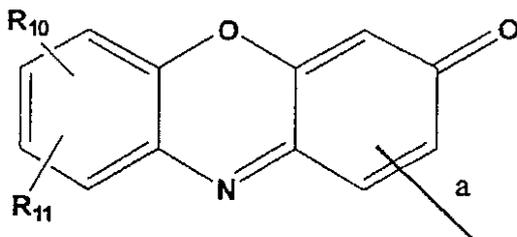
【化 3 2】



30

FL-1

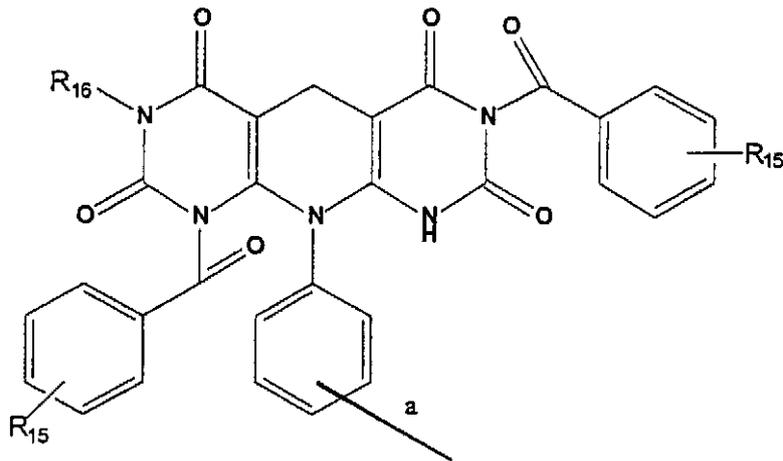
【化 3 3】



40

FL-2

## 【化 3 4】



## FL-3

ここで、 $R_8$ 及び $R_9$ は、独立的に、 $-H$ 、ハロゲン、 $-NO_2$ 、 $-SO_3$ 、 $-C(=O)NH_2$ 又は $-CN$ ； $-OR_{nn}$ 、 $-SR_{nn}$ 、 $-OR_{nn}$ 、 $-NHR_{nn}$ 、 $-N[R_{nn}]_2$ であり、ここで $R_{nn}$ は、独立的に、 $-H$ 、1～10炭素のアルキル基又は1～10炭素のアルカノイル基、

$R_{10}$ 及び $R_{11}$ は、独立的に、 $-H$ 、 $-CN$ 、 $-OR_{12}$ 、 $-N(R_{12})_2$ 、ハロゲン、 $n=0\sim 5$ である $-O(CH_2)_nCH_3$ 、 $-(CH_2)_nCH_3$ 、 $-NO_2$ 、 $-SO_3$ 、 $-C(=O)NH_2$ 、 $-N[(CH_2)_nCH_3]_2$ であり、又は $R_{12}$ は、1～10炭素のアルキル、1～10炭素のアルカノイル、

$R_{15}$ は、 $-H$ 又は1～10炭素のアルキル、

$R_{16}$ は、1～10炭素のアルキル、そして

$a$ として示された原子価結合は、前記フルオロフォアの前記リンカに対する共有結合付着を示す。

上記オリゴヌクレオチド接合体であって、前記フルオロフォアはFL-1として示された式を有する。

上記オリゴヌクレオチド接合体であって、 $R_8$ は $-OC(O)CH(CH_3)_2$ であり、 $R_9$ は $-H$ である。

上記オリゴヌクレオチド接合体であって、前記フルオロフォアはFL-2として示された式を有する。

上記オリゴヌクレオチド接合体であって、 $R_{10}$ は $-OC(O)CH(CH_3)_2$ であり、 $R_{11}$ は $-H$ である。

上記オリゴヌクレオチド接合体であって、前記フルオロフォアはFL-3として示された式を有する。

上記オリゴヌクレオチド接合体であって、 $R_{15}$ はメチルであり、 $R_{16}$ は $n$ -プロピルである。

## 【0040】

核酸をハイブリダイズする方法であって、以下の工程を有する、

(a) 第1核酸と第2核酸を提供する、

(b) 前記両核酸をハイブリダイゼーション条件下でインキュベートする、そして

(c) ハイブリダイズした核酸を同定する、ここで、前記核酸の少なくとも一つは、FL-核酸-Q接合体を有し、ここでFLは、0～約30原子の長さを有するリンカを介して前記核酸に共有結合付着されたフルオロフォア部分、そして、Qは、0～約30原子の長さを有するリンカを介して前記核酸に共有結合付着されたクエンチャ部分であり、当該クエンチャ部分は下記の構造を有する、

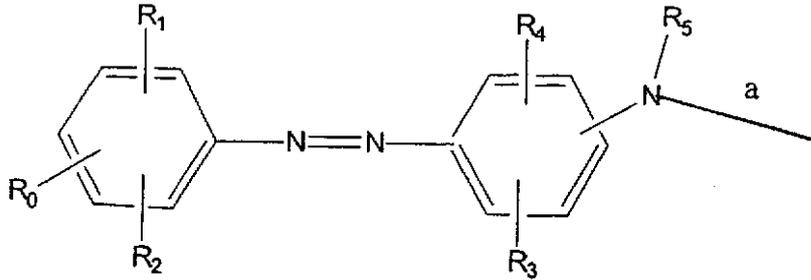
10

20

30

40

## 【化 3 5】



10

ここで、 $R_0$ 、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 及び $R_4$ は、それぞれ独立的に、 $-H$ 、ハロゲン、 $n = 0 \sim 5$ である $-O(CH_2)_nCH_3$ 、 $-(CH_2)_nCH_3$ 、 $-NO_2$ 、 $-SO_3$ 、 $n' = 0 \sim 5$ である $-N[(CH_2)_nCH_3]_2$ 又は $-CN$ 、そして $R_5 = -H$ 又は $n'' = 0 \sim 5$ である $-(CH_2)_nCH_3$ であり、そして、前記クエンチャ部分は、 $a$ によって表わされる原子価結合を介して前記リンカに付着されている。

上記の方法であって、前記クエンチャ部分の式 $Q$ において、 $R_0$ は $-H$ 、 $R_1$ はベンゼン核の4位の $-NO_2$ 、 $R_2$ はベンゼン核の2位の $-Cl$ 、そして $R_3$ 及び $R_4$ は $-H$ であり、 $R_5$ はエチルである。

## 【0041】

核酸をハイブリダイズする方法であって、以下の工程を有する、

20

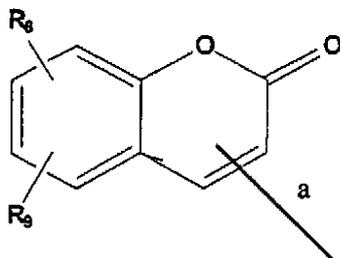
(a) 第1核酸と第2核酸を提供する、

(b) 前記両核酸をハイブリダイゼーション条件下でインキュベートする、そして

(c) ハイブリダイズした核酸を同定する、ここで、前記核酸の少なくとも一つは、FL-核酸-Q接合体を有し、 $Q$ は、 $0 \sim$ 約30原子の長さを有するリンカを介して前記核酸に共有結合付着されたクエンチャ部分であり、そして

FLは、 $0 \sim$ 約30原子の長さを有するリンカを介して前記ODNに共有結合付着されたフルオロフォアであり、当該フルオロフォア部分はFL-1、FL-2及びFL-3として示すグループから選択される構造を有する、

## 【化 3 6】

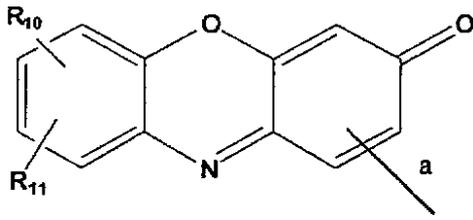


FL-1

30

40

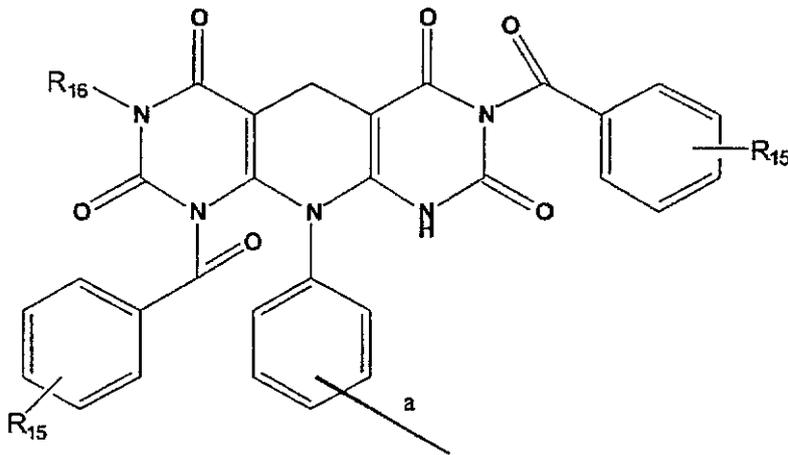
## 【化 3 7】



FL-2

10

## 【化 3 8】



FL-3

20

ここで、 $R_8$ 及び $R_9$ は、独立的に、 $-H$ 、ハロゲン、 $-NO_2$ 、 $-SO_3$ 、 $-C(=O)NH_2$ 又は $-CN$ ； $-OR_{nn}$ 、 $-SR_{nn}$ 、 $-NR_{nn}$ 、 $-NHR_{nn}$ 、 $-N[R_{nn}]_2$ であり、ここで $R_{nn}$ は、独立的に、 $-H$ 、1～10炭素のアルキル基又は1～10炭素のアルカノイル基、

30

$R_{10}$ 及び $R_{11}$ は、独立的に、 $-H$ 、 $-CN$ 、 $-OR_{12}$ 、 $-N(R_{12})_2$ 、ハロゲン、 $n=0\sim 5$ である $-O(CH_2)_nCH_3$ 、 $-(CH_2)_nCH_3$ 、 $-NO_2$ 、 $-SO_3$ 、 $-C(=O)NH_2$ 、 $-N[(CH_2)_nCH_3]_2$ であり、又は $R_{12}$ は、1～10炭素のアルキル、1～10炭素のアルカノイル、

$R_{15}$ は、 $-H$ 又は1～10炭素のアルキル、

$R_{16}$ は、1～10炭素のアルキル、そして

$a$ として示された原子価結合は、前記フルオロフォアの前記リンカに対する共有結合付着を示す。

上記の方法であって、前記フルオロフォアはFL-1として示された式を有する。

40

上記の方法であって、 $R_8$ は $-OC(O)CH(CH_3)_2$ であり、 $R_9$ は $-H$ である。

上記の方法であって、前記フルオロフォアはFL-2として示された式を有する。

上記の方法であって、 $R_{10}$ は $-OC(O)CH(CH_3)_2$ であり、 $R_{11}$ は $-H$ である。

上記の方法であって、前記フルオロフォアはFL-3として示された式を有する。

上記の方法であって、 $R_{15}$ はメチルであり、 $R_{16}$ は $n$ -プロピルである。

## 【0042】

単一のヌクレオチドが異なるポリヌクレオチド間を識別する方法であって、当該方法は下記の工程を有する、

(a) 標的配列を有するポリヌクレオチドを提供する、

(b) 少なくとも二つのFL-ODN-Q接合体を提供する、ここで、ODNはオリゴ

50

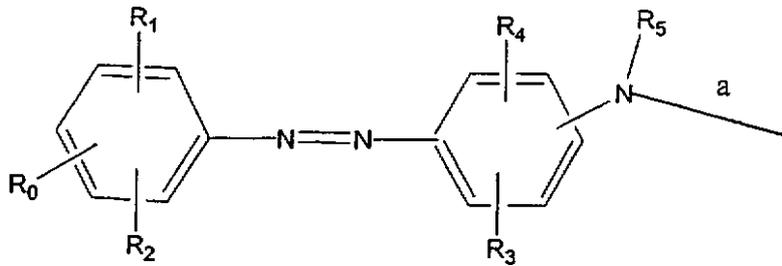
ヌクレオチド部分を示す、前記少なくとも二つのFL-ODN-Q接合体の一方は、前記標的配列に対して完全に相補的な配列を有し、前記少なくとも二つのFL-ODN-Q接合体の他方は、前記標的配列に対して単一のヌクレオチドミスマッチを有する、

(c) ハイブリダイゼーション条件下で、前記FL-OND-Q接合体のそれぞれを、別々に、前記ポリヌクレオチドとインキュベートする、そして

(d) 前記FL-ODN-Qのそれぞれと前記ポリヌクレオチドとの間のハイブリダイゼーション強度を測定する、ここでFLは、0~約30原子の長さを有するリンカを介して前記核酸に共有結合付着されたフルオロフォア部分であり、そしてQは、0~約30原子の長さを有するリンカを介して前記核酸に共有結合付着されたクエンチャ部分であり、当該クエンチャ部分は下記の構造を有する、

10

【化39】



20

ここで、R<sub>0</sub>、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>及びR<sub>4</sub>は、それぞれ独立的に、-H、ハロゲン、n = 0~5である-O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>、-NO<sub>2</sub>、-SO<sub>3</sub>、n' = 0~5である-N[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>]<sub>2</sub>又は-CN、及びR<sub>5</sub> = -H又はn'' = 0~5である-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>であり、そして、前記クエンチャ部分は、aによって表わされる原子価結合を介して前記リンカに付着されている。

上記の方法であって、前記クエンチャ部分の式Qにおいて、R<sub>0</sub>は-H、R<sub>1</sub>はベンゼン核の4位の-NO<sub>2</sub>、R<sub>2</sub>はベンゼン核の2位の-Cl、そしてR<sub>3</sub>及びR<sub>4</sub>は-Hであり、R<sub>5</sub>はエチルである。

【0043】

単一のヌクレオチドが異なるポリヌクレオチド間を識別する方法であって、当該方法は下記の工程を有する、

30

(a) 標的配列を有するポリヌクレオチドを提供する、

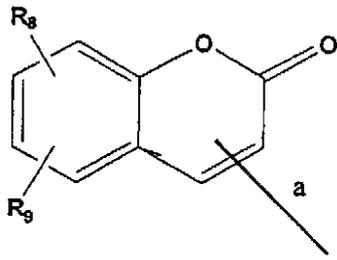
(b) 少なくとも二つのFL-ODN-Q接合体を提供する、ここで、ODNはオリゴヌクレオチド部分を示し、前記少なくとも二つのFL-ODN-Q接合体の一方は、前記標的配列に対して完全に相補的な配列を有し、前記少なくとも二つのFL-ODN-Q接合体の他方は、前記標的配列に対して単一のヌクレオチドミスマッチを有する、

(c) ハイブリダイゼーション条件下で、前記FL-OND-Q接合体のそれぞれを、別々に、前記ポリヌクレオチドとインキュベートする、そして

(d) 前記FL-ODN-Qのそれぞれと前記ポリヌクレオチドとの間のハイブリダイゼーション強度を測定する、ここでQは、0~約30原子の長さを有するリンカを介して前記核酸に共有結合付着されたクエンチャ部分であり、FLは、0~約30原子の長さを有するリンカを介して前記核酸に共有結合付着されたフルオロフォアであり、当該フルオロフォア部分はFL-1、FL-2及びFL-3として示すグループから選択される構造を有する、

40

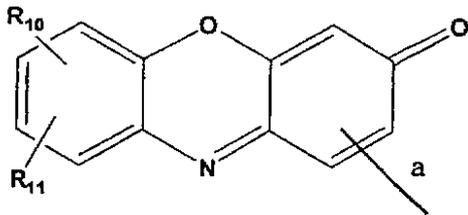
【化 4 0】



FL-1

10

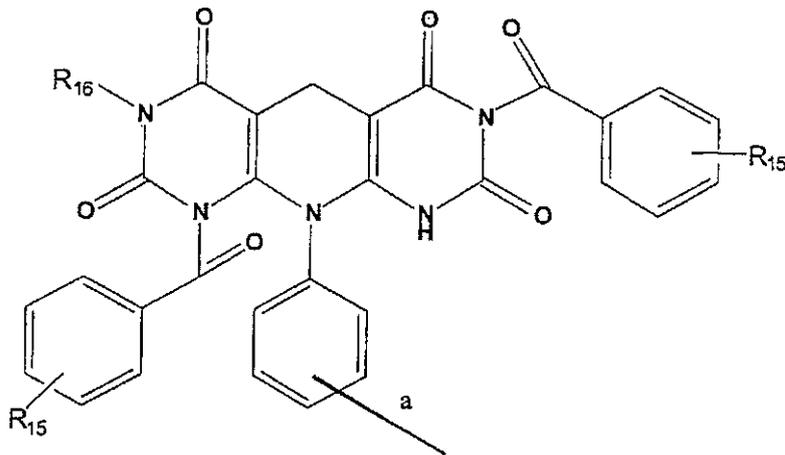
【化 4 1】



FL-2

20

【化 4 2】



FL-3

30

ここで、 $R_8$ 及び $R_9$ は、独立的に、 $-H$ 、ハロゲン、 $-NO_2$ 、 $-SO_3$ 、 $-C(=O)NH_2$ 又は $-CN$ ； $-OR_{nn}$ 、 $-SR_{nn}$ 、 $-OR_{nn}$ 、 $-NHR_{nn}$ 、 $-N[R_{nn}]_2$ であり、ここで $R_{nn}$ は、独立的に、 $-H$ 、1～10炭素のアルキル基又は1～10炭素のアルカノイル基、

40

$R_{10}$ 及び $R_{11}$ は、独立的に、 $-H$ 、 $-CH$ 、 $-OR_{12}$ 、 $-N(R_{12})_2$ 、ハロゲン、 $n=0\sim 5$ である $-O(CH_2)_nCH_3$ 、 $-(CH_2)_nCH_3$ 、 $-NO_2$ 、 $-SO_3$ 、 $-C(=O)NH_2$ 、 $-N[(CH_2)_nCH_3]_2$ であり、又は $R_{12}$ は、1～10炭素のアルキル、1～10炭素のアルカノイル、

$R_{15}$ は、 $-H$ 又は1～10炭素のアルキル、

$R_{16}$ は、1～10炭素のアルキル、そして

$a$ として示された原子価結合は、前記フルオロフォアの前記リンカに対する共有結合付

50

着を示す。

上記の方法であって、前記フルオロフォアはFL-1として示された式を有する。

上記の方法であって、 $R_8$ は $-OC(O)CH(CH_3)_2$ であり、 $R_9$ は $-H$ である。

上記の方法であって、前記フルオロフォアはFL-2として示された式を有する。

上記の方法であって、 $R_{10}$ は、 $-OC(O)CH(CH_3)_2$ であり、 $R_{11}$ は $-H$ である。

。

上記の方法であって、前記フルオロフォアはFL-3として示された式を有する。

上記の方法であって、 $R_{15}$ はメチルであり、 $R_{16}$ はn-プロピルである。

【0044】

核酸をハイブリダイズする方法であって、以下の工程を有する、

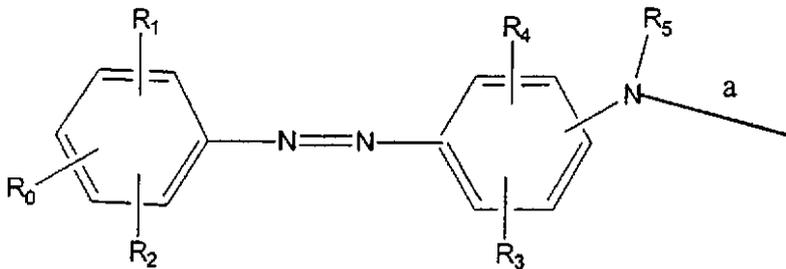
(a) 第1核酸と第2核酸を提供する、

(b) 前記両核酸をハイブリダイゼーション条件下でインキュベートする、そして

(c) ハイブリダイズした核酸を同定する、

ここで、前記核酸の少なくとも一つは、FL-核酸-Q-MGB接合体を有し、FLは、0~約30原子の長さを有するリンカを介して前記核酸に共有結合付着されたフルオロフォアであり、MGBは、0~約30原子の長さを有するリンカを介して前記ODN部分又はクエンチャ部分に共有結合付着された小溝バインダ部分であり、そして、Qは、0~約30原子の長さを有するリンカを介して前記核酸に共有結合付着されたクエンチャ部分であり、当該クエンチャ部分は下記の構造を有する、

【化43】



ここで、 $R_0$ 、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 及び $R_4$ は、それぞれ独立的に、 $-H$ 、ハロゲン、 $n = 0 \sim 5$ である $-O(CH_2)_nCH_3$ 、 $-(CH_2)_nCH_3$ 、 $-NO_2$ 、 $-SO_3$ 、 $n' = 0 \sim 5$ である $-N[(CH_2)_n \cdot CH_3]_2$ 又は $-CN$ 、及び $R_5 = -H$ 又は $n'' = 0 \sim 5$ である $-(CH_2)_n \cdot CH_3$ であり、そして、前記クエンチャ部分は、aによって表わされる原子価結合を介して前記リンカに付着されている。

【0045】

核酸をハイブリダイズする方法であって、以下の工程を有する、

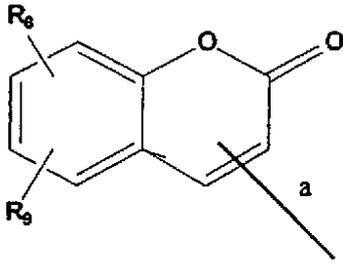
(a) 第1核酸と第2核酸を提供する、

(b) 前記両核酸をハイブリダイゼーション条件下でインキュベートする、そして

(c) ハイブリダイズした核酸を同定する、

ここで、前記核酸の少なくとも一つは、FL-ODN-Q-MGB接合体を有し、ここで、ODNは核酸又は修飾核酸であり、MGBは、0~約30原子の長さを有するリンカを介して前記ODN部分又は前記クエンチャ部分に共有結合付着された小溝バインダ部分、Qは、0~約30原子の長さを有するリンカを介して前記ODNに共有結合付着されたクエンチャ部分、そしてFLは、0~約30原子の長さを有するリンカを介して前記核酸に共有結合付着されたフルオロフォアであり、当該フルオロフォア部分はFL-1、FL-2及びFL-3として示すグループから選択される構造を有する、

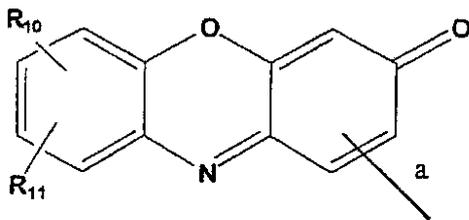
【化 4 4】



FL-1

10

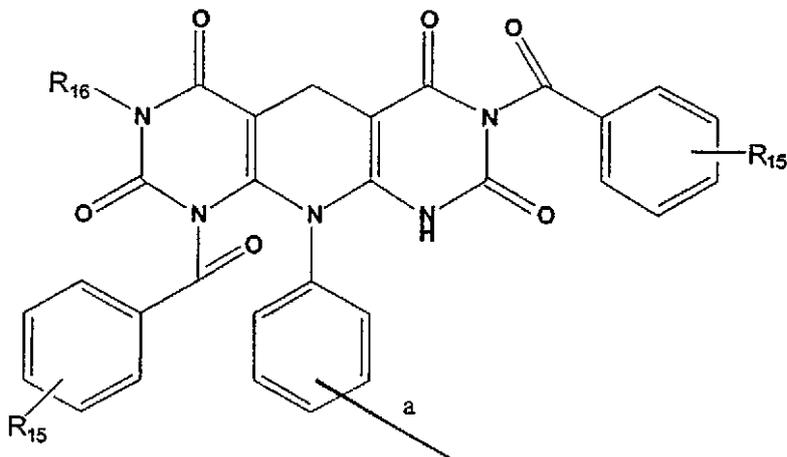
【化 4 5】



FL-2

20

【化 4 6】



FL-3

30

40

ここで、 $R_8$ 及び $R_9$ は、独立的に、 $-H$ 、ハロゲン、 $-NO_2$ 、 $-SO_3$ 、 $-C(=O)NH_2$ 又は $-CN$ ； $-OR_{nn}$ 、 $-SR_{nn}$ 、 $-OR_{nn}$ 、 $-NHR_{nn}$ 、 $-N[R_{nn}]_2$ であり、ここで $R_{nn}$ は、独立的に、 $-H$ 、1～10炭素のアルキル基又は1～10炭素のアルカノイル基、

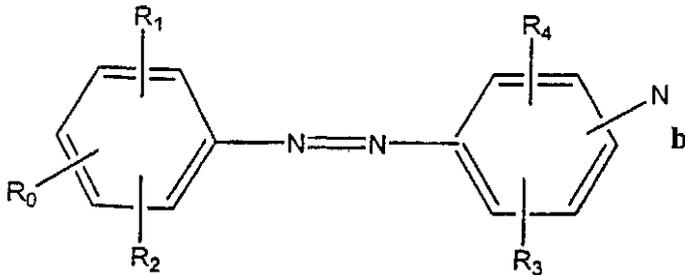
$R_{10}$ 及び $R_{11}$ は、独立的に、 $-H$ 、 $-CN$ 、 $-OR_{12}$ 、 $-N(R_{12})_2$ 、ハロゲン、 $n = 0 \sim 5$ である $-O(CH_2)_nCH_3$ 、 $-(CH_2)_nCH_3$ 、 $-NO_2$ 、 $-SO_3$ 、 $-C(=O)NH_2$ 、 $-N[(CH_2)_nCH_3]_2$ であり、又は $R_{12}$ は、1～10炭素のアルキル、1～10炭素のアルカノイル、

$R_{15}$ は、 $-H$ 又は1～10炭素のアルキル、

50

R<sub>16</sub>は、1～10炭素のアルキル、そして  
aとして示された原子価結合は、前記フルオロフォアの前記リンカに対する共有結合付着を示し、そして

Qは、下記の式を有するジアゾ部分を有する、  
【化47】



10

ここで、前記リンカへの共有結合付着は、bとして示す窒素原子を介している。

【0046】

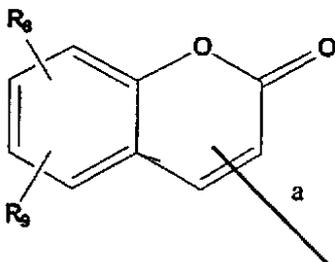
核酸をハイブリダイズする方法であって、以下の工程を有する、

- (a) 第1核酸と第2核酸を提供する、
- (b) 前記両核酸をハイブリダイゼーション条件下でインキュベートする、そして
- (c) ハイブリダイズした核酸を同定する、

20

ここで、前記核酸の少なくとも一つは、FL-ODN-Q-MGB接合体を有し、ここで、ODNは核酸又は修飾核酸であり、MGBは、0～約30原子の長さを有するリンカを介して前記ODN部分又はクエンチャ部分に共有結合付着された小溝バインダ部分、Qは、0～約30原子の長さを有するリンカを介して前記ODNに共有結合付着されたクエンチャ部分、そしてFLは、0～約30原子の長さを有するリンカを介して前記核酸に共有結合付着されたフルオロフォアであり、当該フルオロフォア部分はFL-1、FL-2及びFL-3として示すグループから選択される構造を有する、

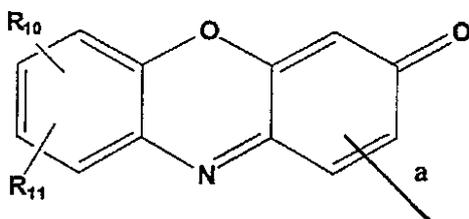
【化48】



FL-1

30

【化49】

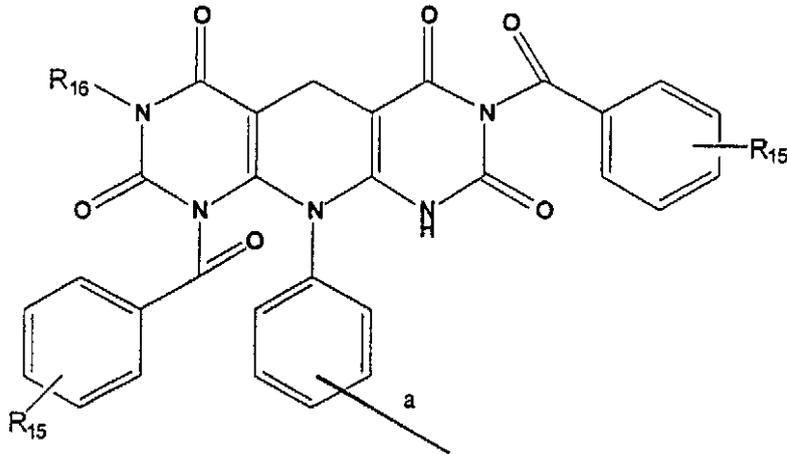


FL-2

40

50

【化50】



10

FL-3

ここで、 $R_8$ 及び $R_9$ は、独立的に、 $-H$ 、ハロゲン、 $-NO_2$ 、 $-SO_3$ 、 $-C(=O)NH_2$ 又は $-CN$ ； $-OR_{nn}$ 、 $-SR_{nn}$ 、 $-OR_{nn}$ 、 $-NHR_{nn}$ 、 $-N[R_{nn}]_2$ であり、ここで $R_{nn}$ は、独立的に、 $-H$ 、1～10炭素のアルキル基又は1～10炭素のアルカノイル基、

20

$R_{10}$ 及び $R_{11}$ は、独立的に、 $-H$ 、 $-CN$ 、 $-OR_{12}$ 、 $-N(R_{12})_2$ 、ハロゲン、 $n=0\sim 5$ である $-O(CH_2)_nCH_3$ 、 $-(CH_2)_nCH_3$ 、 $-NO_2$ 、 $-SO_3$ 、 $-C(=O)NH_2$ 、 $-N[(CH_2)_nCH_3]_2$ であり、又は $R_{12}$ は、1～10炭素のアルキル、1～10炭素のアルカノイル、

$R_{15}$ は、 $-H$ 又は1～10炭素のアルキル、

$R_{16}$ は、1～10炭素のアルキル、そして

$a$ として示された原子価結合は、前記フルオロフォアの前記リンカに対する共有結合付着を示す。

【0047】

核酸をハイブリダイズする方法であって、以下の工程を有する、

30

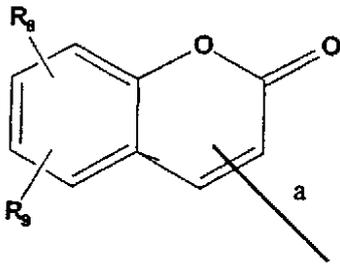
(a) 第1核酸と第2核酸を提供する、

(b) 前記両核酸をハイブリダイゼーション条件下でインキュベートする、そして

(c) ハイブリダイズした核酸を同定する、

ここで、前記核酸の少なくとも一つは、FL-ODN-Q接合体を有し、ここで、ODNは核酸又は修飾核酸であり、Qは、0～約30原子の長さを有するリンカを介して前記ODNに共有結合付着されたクエンチャ部分、そしてFLは、0～約30原子の長さを有するリンカを介して前記核酸に共有結合付着されたフルオロフォア部分であり、当該フルオロフォア部分はFL-1、FL-2及びFL-3として示すグループから選択される構造を有する、

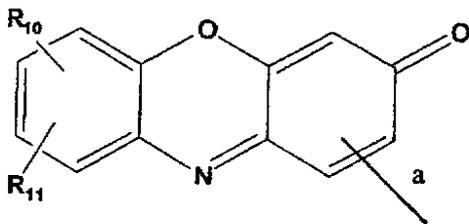
## 【化 5 1】



FL-1

10

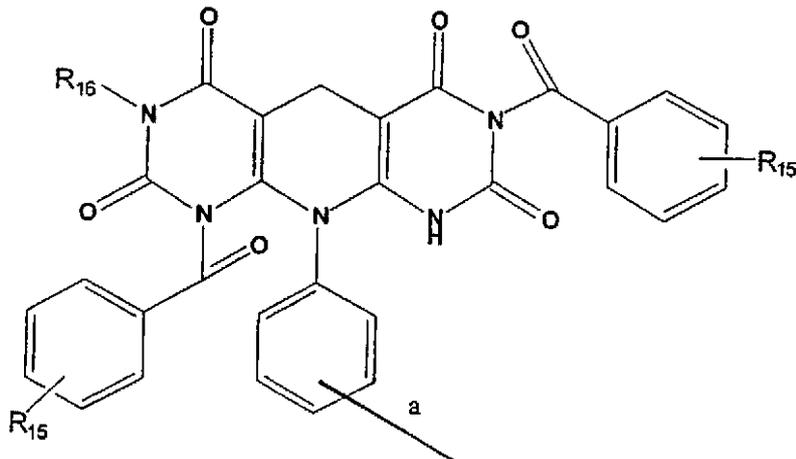
## 【化 5 2】



FL-2

20

## 【化 5 3】



FL-3

30

ここで、 $R_8$ 及び $R_9$ は、独立的に、 $-H$ 、ハロゲン、 $-NO_2$ 、 $-SO_3$ 、 $-C(=O)NH_2$ 又は $-CN$ ； $-OR_{nn}$ 、 $-SR_{nn}$ 、 $-NHR_{nn}$ 、 $-N[R_{nn}]_2$ であり、ここで $R_{nn}$ は、独立的に、 $-H$ 、1～10炭素のアルキル基又は1～10炭素のアルカノイル基、

$R_{10}$ 及び $R_{11}$ は、独立的に、 $-H$ 、 $-CN$ 、 $-OR_{12}$ 、 $-N(R_{12})_2$ 、ハロゲン、 $n=0\sim 5$ である $-O(CH_2)_nCH_3$ 、 $-(CH_2)_nCH_3$ 、 $-NO_2$ 、 $-SO_3$ 、 $-C(=O)NH_2$ 、 $-N[(CH_2)_nCH_3]_2$ であり、又は $R_{12}$ は、1～10炭素のアルキル、1～10炭素のアルカノイル、

$R_{15}$ は、 $-H$ 又は1～10炭素のアルキル、

$R_{16}$ は、1～10炭素のアルキル、そして

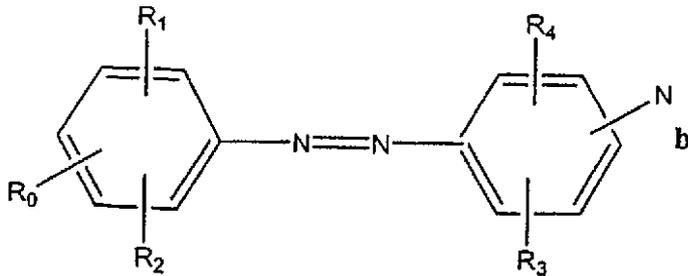
40

50

aとして示された原子価結合は、前記フルオロフォアの前記リンカに対する共有結合付着を示し、そして

Qは、下記の式を有するジアゾ部分を有する、

【化54】



10

ここで、前記リンカへの共有結合付着は、bとして示す窒素原子を介している。

【図面の簡単な説明】

【0048】

【図1】リアルタイム5'-ヌクレアーゼPCRアッセイの略図である。

【図2】ダブル-及びレッド13染料修飾DNAプローブのUVスペクトルを示すグラフである。

【図3】「リアルタイム」PCRアッセイにおける蛍光発光MGBプローブの性能を示すグラフである。

20

【図4】DNAプローブを含有する、バイオレット、FAM及びレゾルフィン染料の蛍光発光スペクトルを示すグラフである。

【発明を実施するための最良の形態】

【0049】

発明の詳細説明

オリゴヌクレオチド合成用のクエンチャ試薬

自動化DNA合成機を使用して、オリゴヌクレオチドに、置換4-(フェニルジアゼニル)フェニルアミン・クエンチャ部分を導入するための二つの試薬が、以下の開示において例示される。ここ及び反応スキームにおいて、略称MGB、FL、Q、CPG及びODNは、それぞれ、又、その文脈から明らかなように、「小溝バインダ」、「蛍光剤又はフルオロフォア」、「クエンチャ」、「制御細孔ガラス(controlled pore glass)」、及び「オリゴヌクレオチド」部分又は分子を示す。

30

【0050】

ジメトキシトリチル保護クエンチャホスホルアミダイト

ここに開示される第1のタイプの試薬は、クエンチャ分子(Q)と、更に、後続のオリゴヌクレオチド合成中において成長するオリゴデオキシヌクレオチド(ODN)のための付着ポイントを提供する、ジメトキシトリチル(DMTT) (メトキシトリチル、トリチル等の酸不安定性ブロッキング基)保護第一級アルコールとを有する、ホスホルアミダイトである。これらの試薬の具体例が式1、2及び3、さらに、反応スキーム1及び2に示されている。

40

【0051】

反応スキーム1において、出発化合物は、第1級(primary)ヒドロキシル基を有する、置換4-(フェニルジアゼニル)フェニルアミン1である。このような出発物質は、市販されており、或いは、実務有機化学者にとって利用可能な一般的技術を適用して、公知の方法で合成することも可能である。例えば、米国特許第2、264、303の教示内容によれば、4-ニトロベンゼンジアゾニウム塩が2-(2-クロロアニリノ)エタノールと反応して、2-[2-クロロ-4-(4-ニトロフェニルアゾ)アニリノ]エタノールを得る。2-[2-クロロ-4-(4-ニトロフェニルアゾ)アニリノ]エタノールは、反応スキーム1に示されている化合物1の範囲に含まれる。前記米国特許第2、2

50

64、303の明細書をここに参考文献として合体させる。

【0052】

市販されている出発物質（又はそれらの前駆物質）のその他の例としては、2 - (エチル{4 - [(4 - ニトロフェニル)ジアゼニル]フェニル}アミノ) - エタン - 1 - オールと2 - (エチル{4 - [(2 - メトキシ - 4 - ニトロフェニル)ジアゼニル]フェニル} - アミノ)エタン - 1 - オールがある。

【0053】

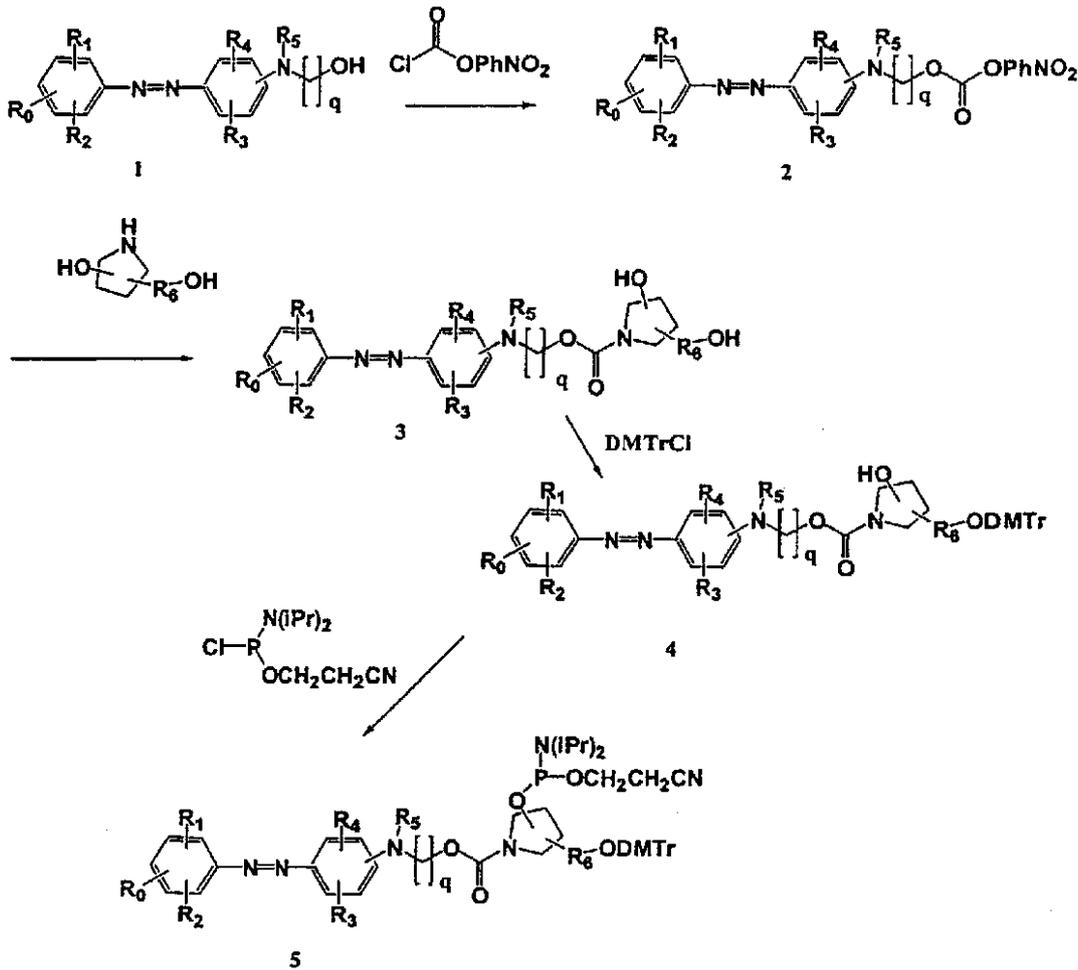
反応スキーム1に図示されているように、化合物1を、p - ニトロフェニルクロロフォルメートと反応させてカーボネート2を得る。カーボネート2と置換ピロリジンジオールとの反応によって、ジオール中間体3を得る。前記ピロリジンジオールは、アミノ、第1及び第2ヒドロキシル基を有する三官能基性試薬である。ピロリジンジオールの一例、及び、アミノ、第1及び第2ヒドロキシ基を有するその他の三官能基性試薬の具体例が、米国特許第5、512、667号に記載されており、その明細書をここに参考文献として合体させる。前記ジオール3は、先ず、ジメトキシトリチルクロライド(DMT r Cl)と反応して、前記三官能基性試薬の第1ヒドロキシル基をブロックし、中間体4を得る。まだ前記三官能基性試薬の自由な第2ヒドロキシル基を含んでいるこの中間体4を、次に、2 - シアノエチルジイソプロピルクロロホスホルアミダイトと反応させて、ジメトキシトリチル保護ホスホルアミダイト試薬5を得る。反応スキーム1に図示されている化合物において、その記号は次のように定義される。R<sub>0</sub>、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>及びR<sub>4</sub>は、それぞれ独立的に、-H、ハロゲン、-O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>であり、ここでn = 0 ~ 5、-NO<sub>2</sub>、-SO<sub>3</sub>、-N[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>]<sub>2</sub>、ここで、n' = 0 ~ 5、-CN、R<sub>5</sub> = -H又は-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>、ここで、n'' = 0 ~ 5；R<sub>6</sub> = -(CH<sub>2</sub>)<sub>n\*</sub>、ここでn\* = 1 ~ 5そしてq = 1 ~ 20である。前記ジメトキシトリチル保護ホスホルアミダイト試薬5は、その他の点において標準ODN合成において知られている工程においてオリゴヌクレオチドへの付着用に好適である。

10

20

【0054】

【化55】



10

20

## 反応スキーム1

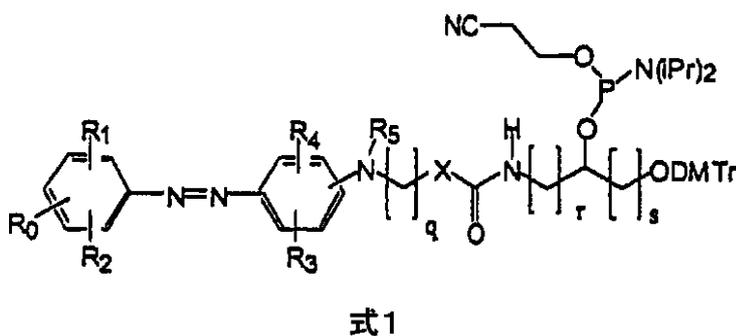
【0055】

30

その他の実施例においては、アミノと二つのヒドロキシル基を含むその他の三官能基性試薬から出発して、反応スキーム1に記載の反応を使用して（或いは、実務有機化学者の技術の範囲内のそのような修飾を使用して）、式1及び式2のホスホルアミダイトが合成され、ここで、 $q, R_0, R_1, R_2, R_3, R_4$ 及び $R_5$ は上記の定義通りであり、 $r$ と $s$ は、互いに独立的に1~20； $X$ は $-\text{O}-$ 又は $-\text{CH}_2-$ ； $t$ 及び $v$ は、互いに独立的に1~20である。

【0056】

【化56】

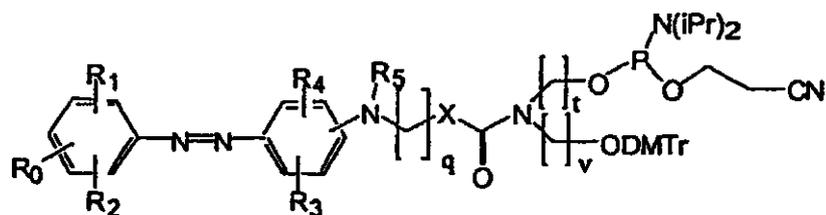


式1

40

【0057】

【化 5 7】



式2

10

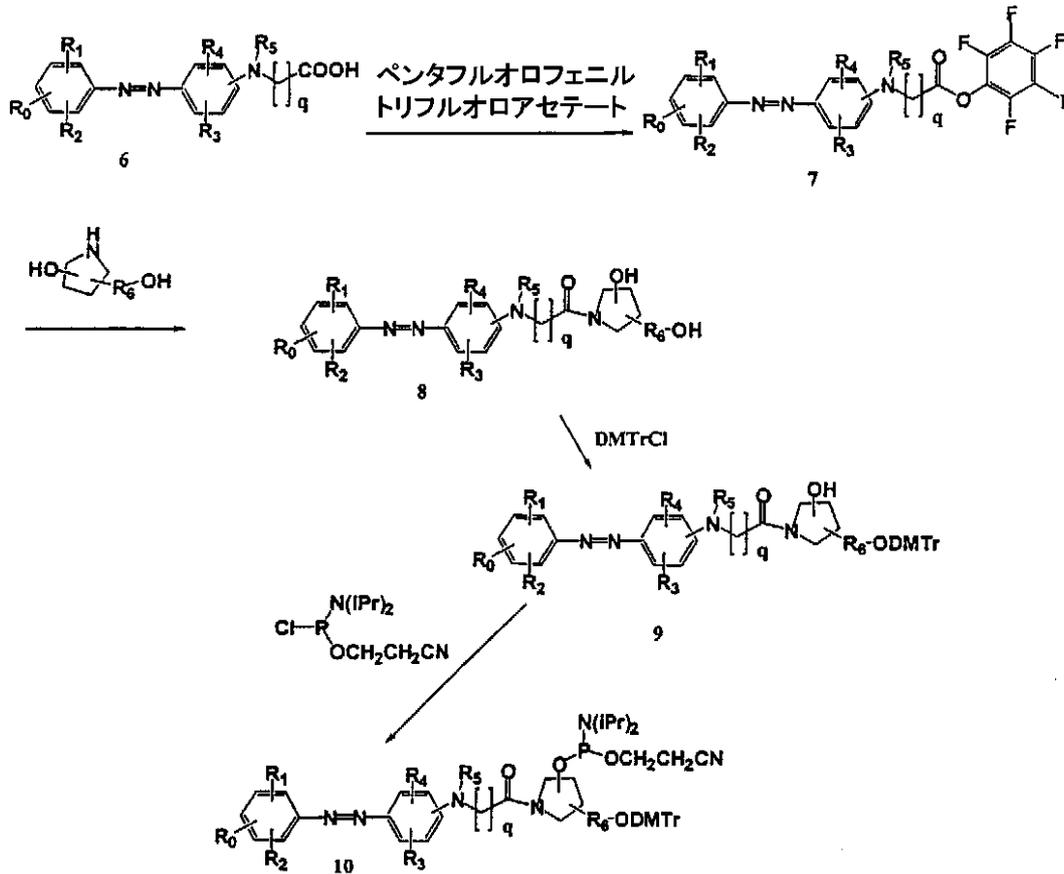
【 0 0 5 8】

反応スキーム 2 は、前記置換 4 - (フェニルジアゼニル) - フェニルアミン・クエンチヤ部分を備えるとともに、前記三官能基性ピロリジンジオール部分を含む、別例のホスホルアミダイト試薬 10 の合成を開示している。この合成スキームにおいて、出発物質は、自由なカルボキシル基を有する置換 4 - (フェニルジアゼニル) フェニルアミン化合物 6 である。この化合物 6 (市販又は、実務有機化学者の技術範囲無いにおいて化学文献によって製造される) を、ペンタフルオロフェニル トリフルオロアセテートと反応させて活性エステル 7 を得て、その後、これを反応させて、前記置換 4 - (フェニルジアゼニル) - フェニルアミン部分を、自由第 1 ヒドロキシル基と自由第 2 ヒドロキシル基とを有するピロリジンジオール部分の環窒素に結合させ、化合物 8 を得る。この化合物 8 を D M T r C 1 によって処理した、2 - シアノエチルジイソプロピルクロロホスホルアミダイトとの反応によって、ジメトキシトリチル保護ホスホルアミダイト試薬 10 を得る。反応スキーム 2 において、記号は、反応スキーム 1 と同様に定義される。

20

【 0 0 5 9】

【化58】



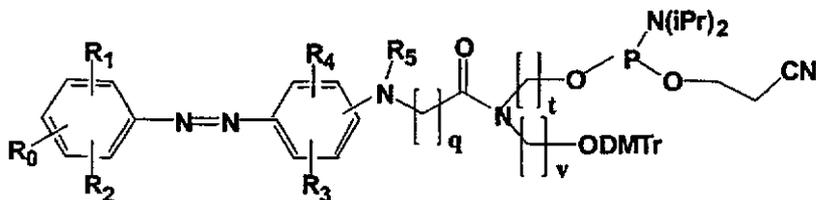
## 反応スキーム2

【0060】

更に別の例において、反応スキーム2に記載の反応を使用して、置換4-(フェニルジアゼニル)フェニルアミン(化合物6)から出発して、スキーム2に図示したピロリジンジオールの代りに、非環状三官能基性試薬(アミノと、二つのヒドロキシル官能基とを有する)を使用して、式3のジメトキシトリチル保護ホスホルアミダイトを合成する。ここで、ここで、q、R<sub>0</sub>、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>、R<sub>5</sub>及びR<sub>6</sub>は上記の定義通りであり、tとvは、それぞれ独立的に1~20である。

【0061】

【化59】



## 式3

【0062】

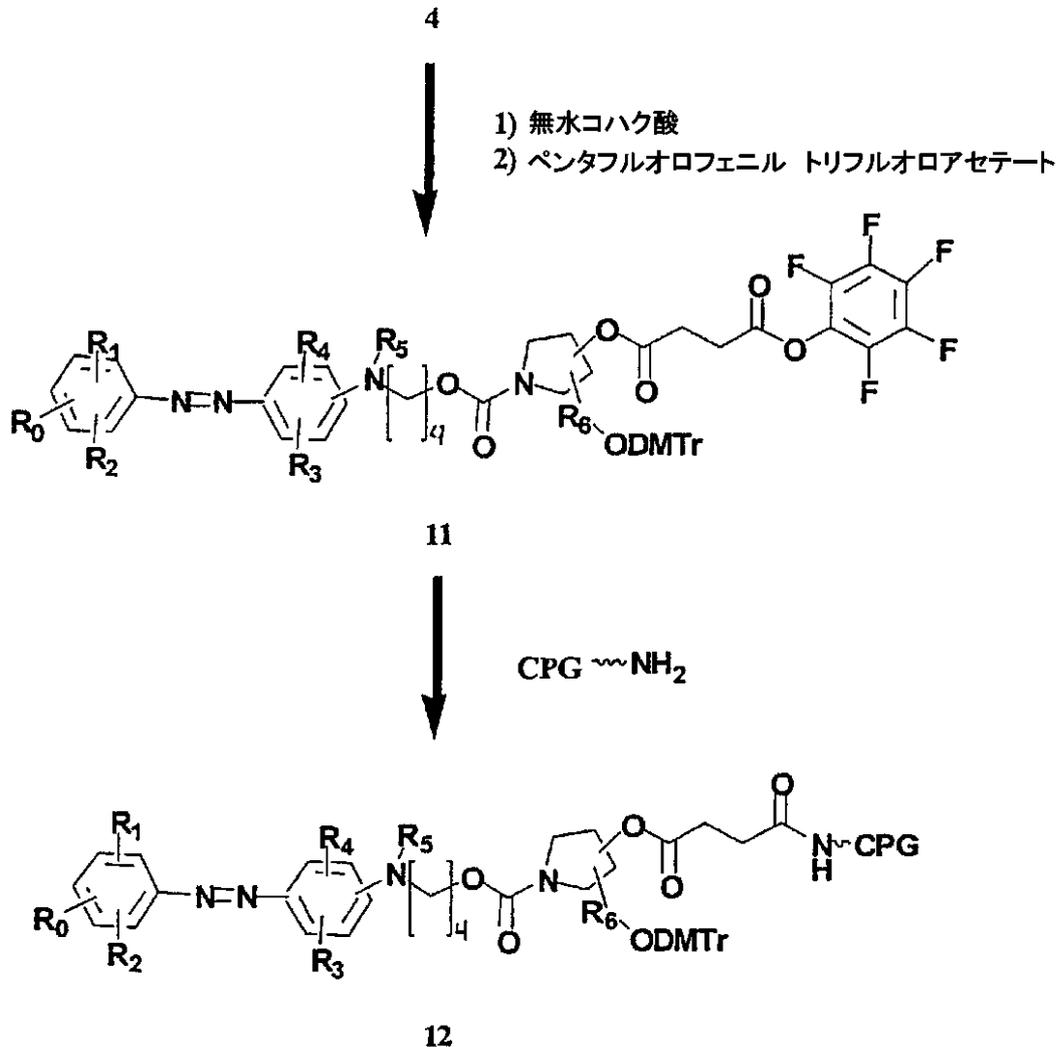
OND合成に適した、保護リンカ(又はその類似手段)によって固体支持体に付着したクエンチャ

ONDへ前記クエンチャ分子を導入するのに適した第2のクラスの化合物又は試薬は、OND合成に使用されるタイプの固体支持体(例えば、制御細孔ガラス(CPG))と、クエンチャをその固体支持体に付着させるリンカとを有する組成物を構成する。前記リンカは、通常は、合成中、前記第1ヌクレオチドが該リンカへ付着する時に除去されるジ

メトキシトリチル基によって保護されている、ヒドロキシル官能基を有する。一般に、反応スキーム 1 において上述したのと同じクエンチャ/リンカ中間体が、反応スキーム 3 に図示されている構造体例 1 2 を有するこれらの試薬 (CPG ビーズ) を作るのにも使用可能である。

【 0 0 6 3 】

【 化 6 0 】



### 反応スキーム3

【 0 0 6 4 】

このスキームにより、前記中間体 4 (スキーム 1 に図示) の第 2 ヒドロキシル基が、無水コハク酸と反応し、その後、ペンタフルオロフェニル トリフルオロアセテートと反応して、活性エステル 1 1 を得る。この活性エステル 1 1 を、次に、前記固体支持体 (CPG ビーズ) に付着した自由アミノ基と反応させて、改変固体支持体 1 2 が提供される。この例示改変固体支持体 1 2 は、ピロリジンジオールから誘導される「三官能基性リンカ」を含んでいるが、当業者には、式 1、2 及び 3 に図示されているリンカ等の、その他のリンカ及び関連構造を含む、類似の改変固体支持体も、実質的に反応スキーム 3 によって製造可能であり、式 4 及び式 5 に図示されているもののような、クエンチャ部分を含む改変固体支持体を得ることが可能であることが、容易に理解されるであろう。

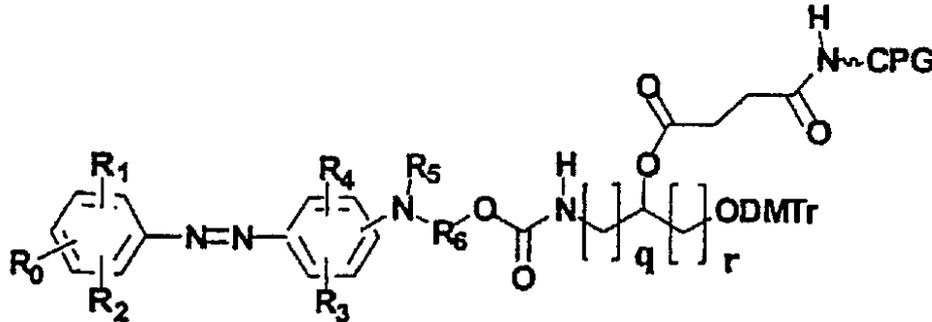
【 0 0 6 5 】

構造体 1 2 と式 4 及び 5 のクエンチャ部分を含む前記改変固体支持体組成物を、3' - クエンチャ接合体を作成するのに使用して、適当なホスホルアミダイトによる 5' - 末端へのフルオロフォアの導入、又は、反応基を含むフルオロフォアによる合成後の導入を可

能にする。反応スキーム 3 と式 4 及び式 5 とにおいて、記号は上述した通り定義される。その他の固体支持体（ポリスチレン等）や、その他の開裂可能リンカシステム（図示したコハク酸リンカ以外）も、これらの一般的教示内容により、作成することが可能であり、従って、それらも本発明の範囲に含まれる、と理解される。

【0066】

【化61】

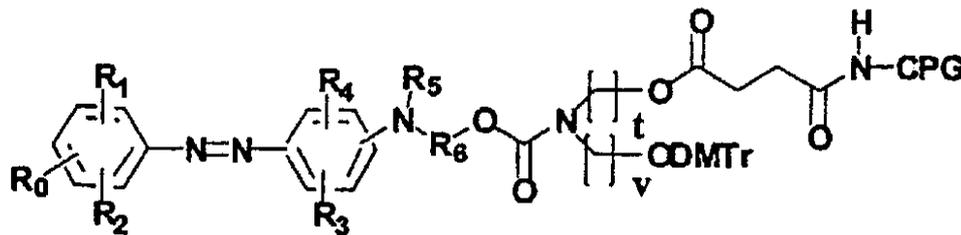


式4

10

【0067】

【化62】



式5

20

【0068】

30

#### オリゴヌクレオチド合成用の小溝バインダクエンチャ試薬

一実施例において、小溝バインダ（MGB）を、開裂可能リンカを介して制御細孔ガラス（CPG）に付着させる。前記 4 - （フェニルジアゼニル）フェニルアミン構造に基づくクエンチャ部分が、リンカ分子を介して前記 MGB に付着される。前記リンカ分子は、更に、DMTr（等）ブロック基によってブロックされたヒドロキシル基も含む。前記 DMTr 基の除去後、オリゴヌクレオチドを、ヌクレオチド単位の前記ヒドロキシル基への段階的付着によって、自動オリゴヌクレオチド合成機により合成する。フルオロフォアを、適当なホスホルアミダイトによって 5' 末端に導入するか、若しくは、合成後に、反応基を含むフルオロフォアを導入して、付着蛍光部分（FL）、クエンチャ（Q）及び MGB（FL - ODN - Q - MGB）を有する ODN を得る。この点に関して、MGB の合成と、それらの ODN への付着は周知であることが銘記される（例えば、米国特許第 5、801、155 号、09 / 539、097 号及び 09 / 141、764 号を参照、これらすべてをここに参考文献として合体させる）。

40

【0069】

一好適実施例において、前記 MGB は、3 - { [ 3 - （ピロロ [ 4、5 - e ] インドリン - 7 - イルカルボニル）ピロロ [ 4、5 - e ] インドリン - 7 - イル ] カルボニル } ピロロ [ 3、2 - e ] インドリン - 7 - カルボキシル酸（DPI<sub>3</sub>）である。前記共有結合「集合体」FL - ODN - Q - DPI<sub>3</sub> の合成は、後述するように 5 つの段階を必要とする。反応スキーム 4 に図示されているその第 1 段階は、中間体、2 - （4 - ニトロフェニル）エチル 3 - （ピロロ [ 4、5 - e ] インドリン - 7 - カルボニル）ピロロ [ 4、5 -

50

e ] インドリン - 7 - カルボキシレート (DPI<sub>2</sub> - NPC) 17、の合成である。その第2段階は、反応スキーム5に図示されているように、Q - DMTr - DPI - CO<sub>2</sub>PFPP 24の合成であり、ここでは、クエンチャが、リンカを介して、ピロロ[3, 2 - e] インドリン - 7 - カルボキシル酸単位 (DPI) に結合されている。ここで、及び、前記反応スキームにおいて、PFPPは、その文脈から、ペンタフルオロフェニル又はペンタフルオロフェニルオキシ基を表わす。その第3段階において、反応スキーム6に図示されているように、DMTr - Q - DPI<sub>3</sub> - PFPP 25aが、17及び24から合成される。第4段階において、25aがCPGに結合して、DMTr - Q - DPI<sub>3</sub> - CPG 29を得て、第5段階において、自動オリゴヌクレオチド合成機でDMTr - Q - DPI<sub>3</sub> - CPG 29を使用して、順次ヌクレオチド単位を付着させ、前記CPGからの除去後、前記生成物FL - 5' - ODN - 3' - Q - DPI<sub>3</sub> 30を得る。

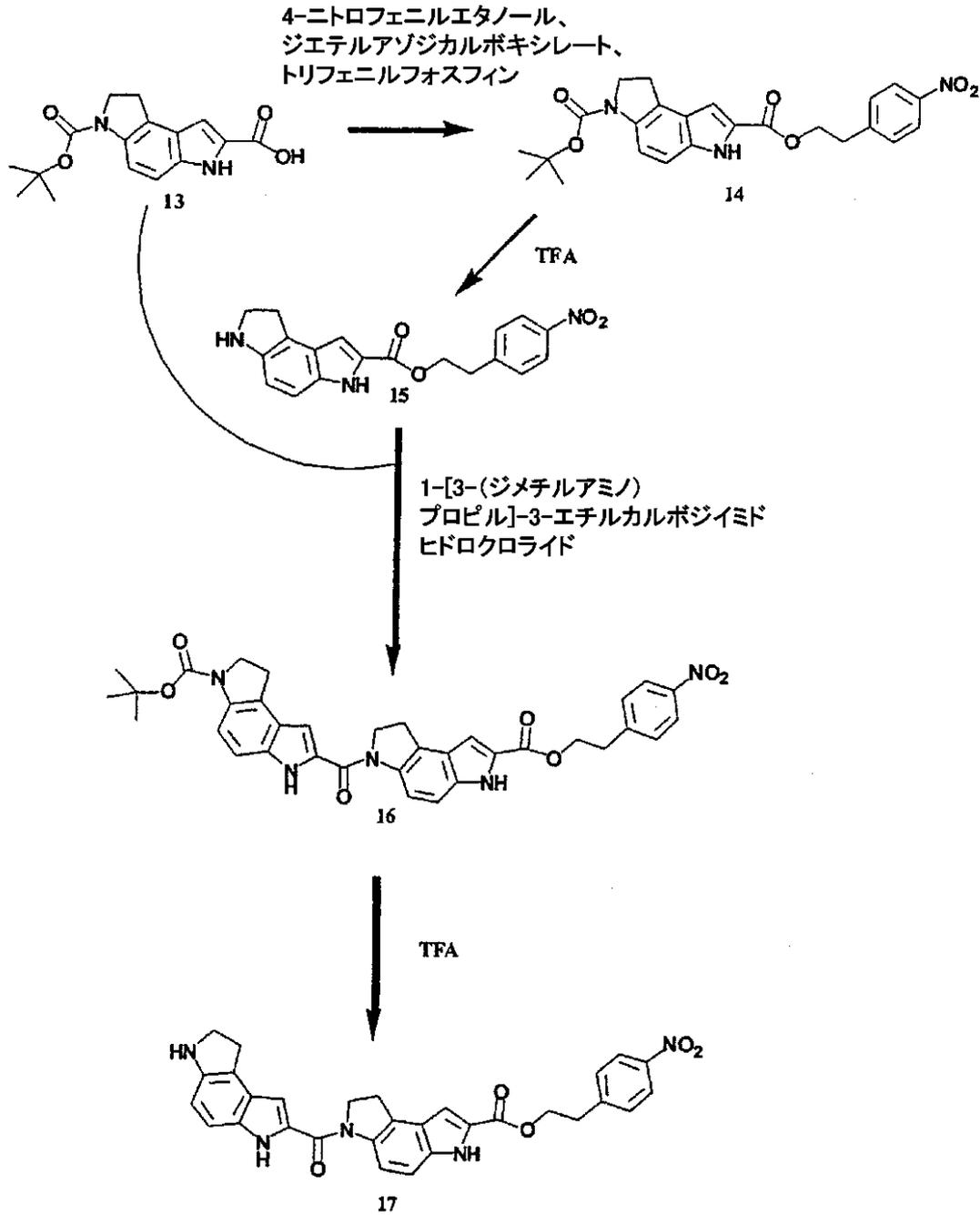
10

【0070】

これら合成プロセスの前記第4及び第5段階が反応スキーム7に図示されている。このシーケンス(段階1~5)のための実験条件を次に示す。

【0071】

【化63】



10

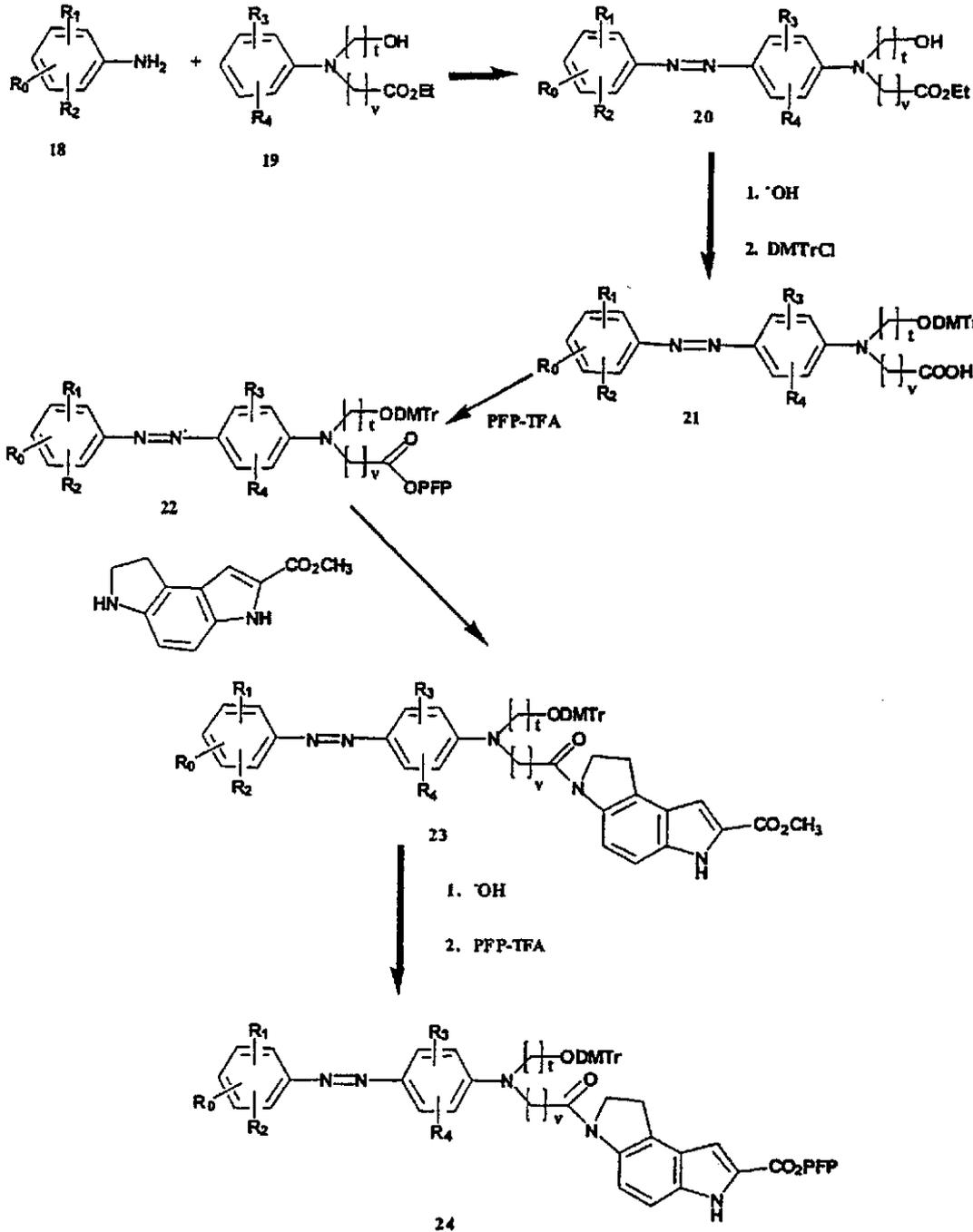
20

30

反応スキーム4

【0072】

【化64】



10

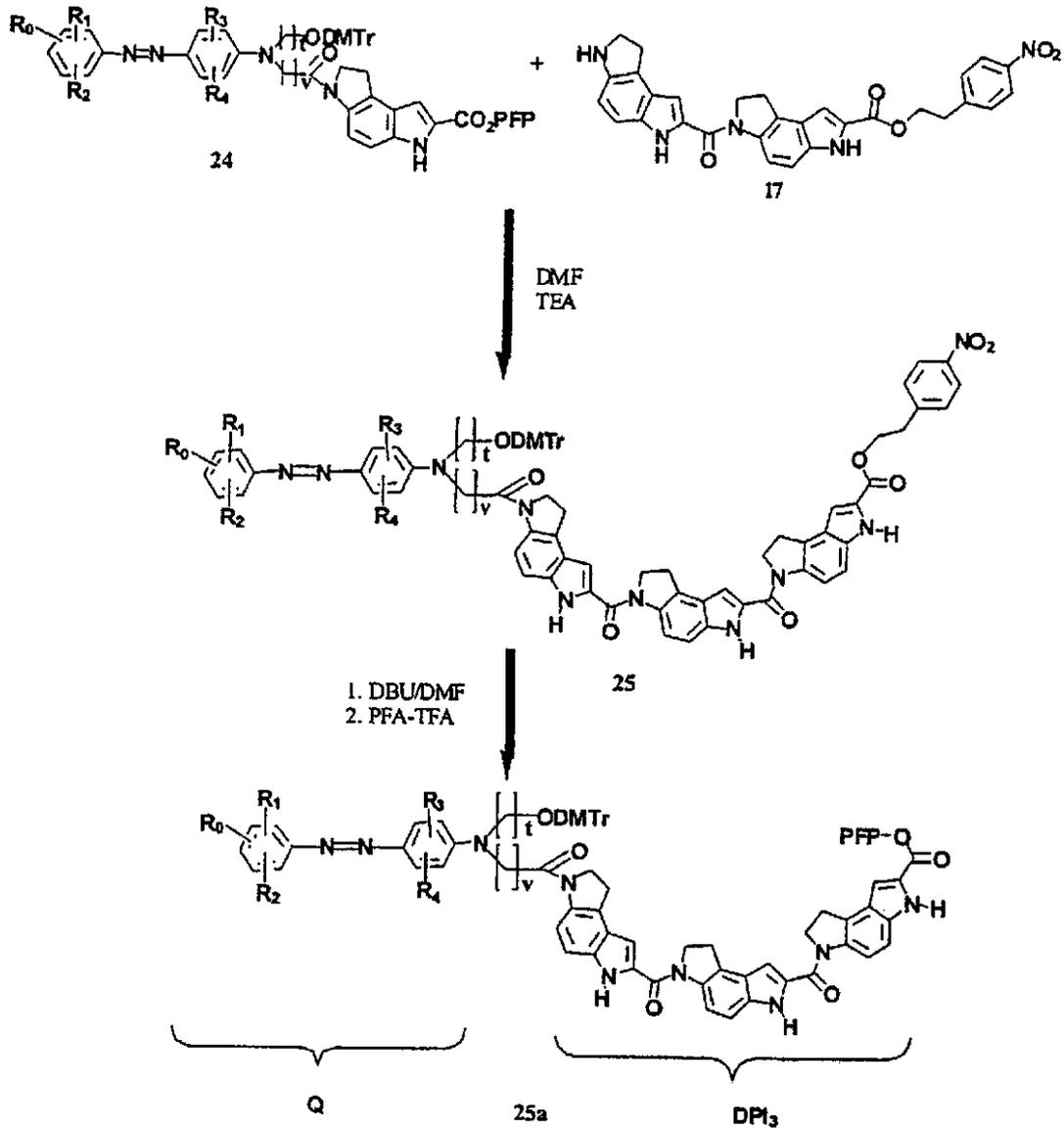
20

30

反応スキーム5

【0073】

【化65】



10

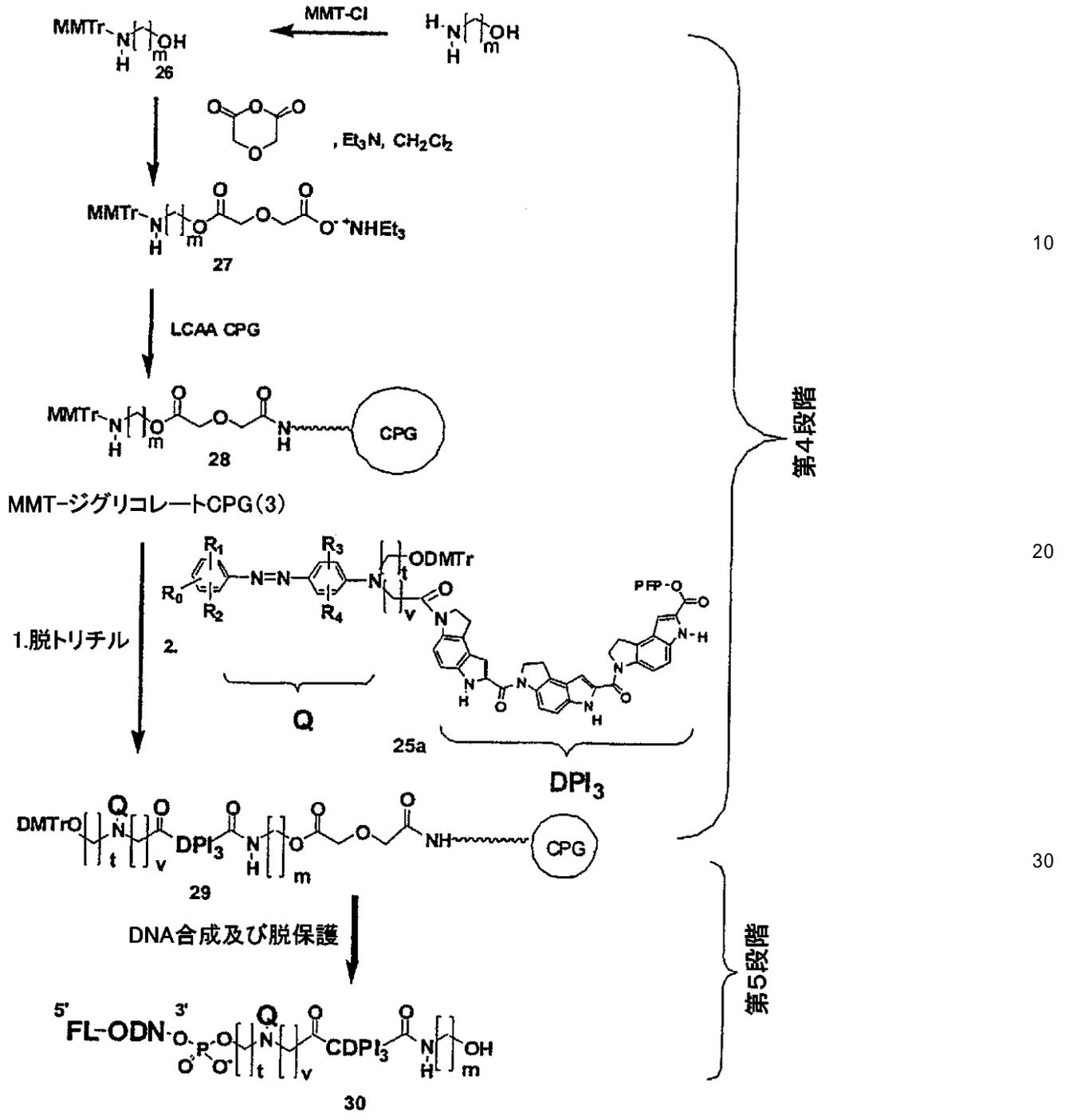
20

30

反応スキーム6

【0074】

【化66】



反応スキーム7

【0075】

次に、これらの段階又は反応をより詳細に説明すると、Q - DPI<sub>3</sub>部分25 (段階3) が、反応スキーム6に図示されているように、二つの中間体17及び24の反応によって合成される。第1の中間体DPI<sub>2</sub>-NPE 17は、スキーム4に図示されているように作られる。DPI-tBoc 13が、ジエチルアゾジカルボキシレート (DEAD) とトリフェニルフォスフィンとの存在下でp-ニトロフェニルエタノールと反応して、ジ-エステル14を得た。この化合物14を、先ず、トリフルオロ酢酸 (TFA) によって処理して15を得、次に、1-[3-(ジメチルアミノ)プロピル]-3-エチルカルボジイミドハイドロクロライドの存在下でDPI-tBoc 13と結合させて、多量のDPI<sub>2</sub>の4-トリフェニルエステル16を得た。16とTFAとの反応によって、DPI<sub>2</sub>のp-ニトロフェニルエチル (p-nitrophenethyl) エステル17を得る。

10

20

30

40

50

前記第2中間体DPI-Q24(段階2)を、反応スキーム5に図示されているように合成する。置換ニトロアニリン18(市販又は化学文献によって入手可能)を亜硝酸の存在下でジアゾ化し、置換アニリン19(市販又は化学文献によって入手可能)と結合させ、アゾ中間体クエンチャ分子20を形成する。前記エチルエステル20のアルカリ加水分解、その後の、DMTrClでの処理によって、DMTr-Q21を得て、これをその後、ペンタフルオロフェニルトリフルオロアセテートによって活性化して22を得る。22とDPI-メチルエステルとの反応によって、Q-DMTr-DPIメチルエステル23を得る。次に、この化合物23をアルカリによって処理してメチルエステルを加水分解し、次に、PFPTFAによって活性化してQ-DMTr-DPIPFPEster24を得る。反応スキーム5において、R<sub>0</sub>、R<sub>1</sub>~R<sub>4</sub>、v及びtは上述したように定義される。

10

## 【0076】

次に、ここでも記号は上述したように定義される反応スキーム6を参照すると、先ず、前記活性化クエンチャ24(DMTr-Q-DPIPFPEster)をDPI<sub>2</sub>-NPC17と反応させることによってp-ニトロフェニルエチルエステル25を得て、これを、先ず、1,8-ジアザパイシクロ[5,4,0]ウンデカ-7-エン(DBU)等の塩基による処理によって、p-ニトロフェニルエチル部分を除去し、次に、2,3,4,5,6-ペンタフルオロフェニルトリフルオロアセテート(PFPTFA)での処理によって、活性化エステル25aに変換し、DMTr-Q-DPI<sub>3</sub>-PFPEster25a(第3段階)を合成する。

20

## 【0077】

DMTr-Q-DPI<sub>3</sub>-CPG29(段階4)の合成を反応スキーム7に図示する。この合成シーケンスにおいて、前記改良クエンチャ分子は、開裂可能ジグリコレート・リンカを介して制御細孔ガラスビーズ(CPG)に付着する。具体的には、アミノプロパノール又はその同族体を、モノメトキシトリチル塩化物(MMTr-Cl)と、次に、ジグリコール酸塩無水物とによって連続に反応させて、MMT-ブロック・アミノプロパノール26(又は同族体)とMMT-ジグリコレート27とをそれぞれ得る。記号mは、2~20の整数値を有するものと定義される。現時点において好適なアミノプロパノールmは3である。このスキームの残りの記号は、上述したように定義される。27を活性化剤(HOBT及びHBTU)の存在下で長鎖アミノアルキルCPGとの反応させて、MMT-ジグリコレート-CPG28を得て、これを、脱トリチル及び25aとの反応後にDMTrO-Q-DPI<sub>3</sub>-CPG29に変換する。

30

## 【0078】

段階5において、まだ反応スキーム7に図示されているように、自動DNA合成機の補助によって、オリゴヌクレオチド合成を行い、フルオロフォア-ホスホルアミダイト又は反応基を含むフルオロフォアのいずれかを使用して、フルオロフォアをODNの5'末端に付着させて、FL-ODN-Q-DPI<sub>3</sub>30接合体を得る。

## 【0079】

前記FL-ODN-Q-DPI<sub>3</sub>30接合体は、又、これら反応スキームにおいては具体的に図示されない別の合成ルートでも合成することが可能である。この別のルートでは、DPI<sub>3</sub>-メチルエステル(ボジャー(Boger)等., J. Org. Chem., 52: 1521-(1987)ここに参考文献として合体させる、によって得られる)を、先ず、化合物22と反応させ、次に、アルカリと反応させて、Q-DPI<sub>3</sub>-メチルエステルと、Q-DPI<sub>3</sub>-COOHとをそれぞれ得る。後者の化合物を、次に、ペンタフルオロフェニルトリフルオロアセテートによって活性化し、25aを得て、次に、これをスキーム7に図示されている反応に使用して30を得る。

40

## 【0080】

FL-ODN-Q及びFL-ODN-Q-MGBプローブ

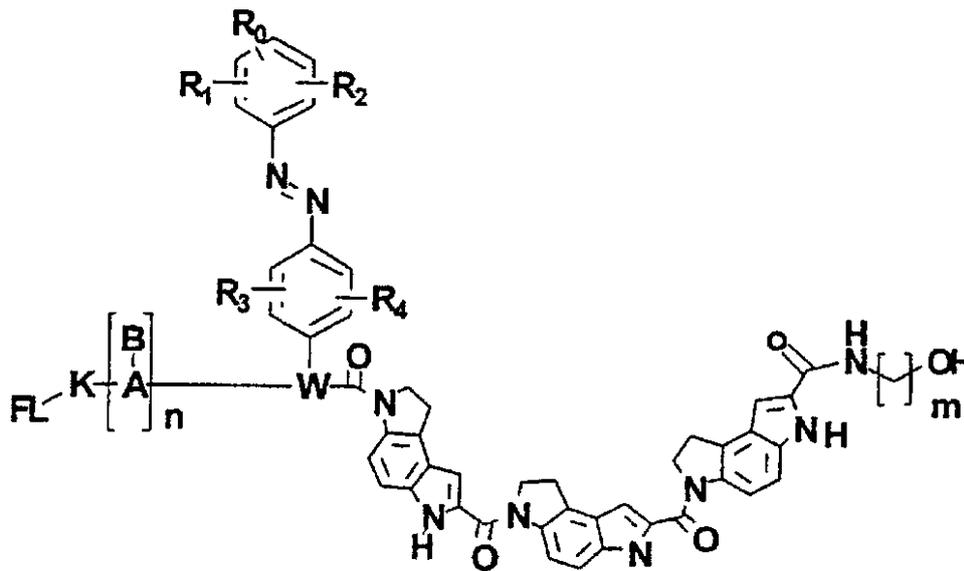
FL-ODN-Q-DPI<sub>3</sub>接合体の好適実施例の一般的構造を式6に図示する。ここで：

50

FLは、約300～約800nm、より好ましくは400～700nmの範囲の発光波長を有するフルオロフォアであり、Kは、C、O、N、S、P及びHのいずれかを含む、1～30原子を含むリンカであり、 $[A-B]_n$ は、DNA、RNA又はPNA或いはそれらの組み合わせを表わし、ここで、Aは糖リン酸骨格鎖（修飾糖及び修飾リン酸を含む）、Bは、複素環塩基、そしてnは、ヌクレオチド単位の数である。Bは、独立的に、プリン-とピリミジン-；ピラゾロ[3、4-d]ピリミジン-、7-置換ピラゾロ[3、4-d]ピリミジン-、7-デアザプリン-、7-置換7-デアザプリン-、修飾プリン-及びピリミジン-塩基とすることができ、前記オリゴヌクレオチド又は核酸は、これらの塩基の組み合わせを含むことができる。Wは、C、O、N、S、P及びHから成るグループから選択される0～約30原子の長さのリンカであり、更に、Wは、置換分枝脂肪族鎖、又は、置換環構造又は、置換脂肪族及び環構造の組み合わせであり、 $R_0$ 、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 及び $R_4$ は、前に記載された通りであり、 $m = 1 \sim 20$ である。

【0081】

【化67】



式6

【0082】

PNA及びPAN/DNAキメラの合成は公知であり、一般的には、ここに参考文献として合体させる刊行物ウールマン(Uhlmann)等, *Angew. Chem. Inter. Ed.*, 37:2796-2823(1998); メイフィールド(Mayfield)等, *Anal. Biochem.*, 401-404(1998)によって行うことができる。

【0083】

式6の範囲に含まれる更に別の好適実施例は、Wが $-(CH_2)_3N(-)-(CH_2)_3-$ ； $R_0 = NO_2$ ； $R_1 = -Cl$ ； $R_2 = R_3 = R_4 = H$ ；Kが6炭素リンカ、そして $m = 3$ である実施例である。

【0084】

蛍光発光レポーター-クエンチャ対を含む本発明の接合体プローブは、一般に、多くは、例えば、ここに参考文献として合体させるホルランド(Holland)等, *Proc. Acad. Sci.*, 88:7276-7280(1991)及びウィットワ- (Wittwer)等, *Biotechniques*, 22:176-181(1997)に記載されているようなPCRを利用する方法において、標的ポリヌクレオチドの増幅との組み合わせで使用される。前記接合体プローブの結合部位は、前記標的ポリヌクレオチドを増幅するために使用されるPCRプライマ間に位置する。

【0085】

10

20

30

40

50

本発明による前記接合体オリゴヌクレオチドプローブを標的オリゴヌクレオチド配列の検出のために使用することによって、従来技術のレポータクエンチャ基及び組み合わせに対していくつかの利点が提供される。例えば、本発明による4-[4-ニトロフェニル]ジアジニル]フェニルアミン構造を含むクエンチャは、クエンチャとしてのダブルシルよりも、レポータとしてのFAM又はTAMRAを有するプローブにおいてより高い信号対ノイズ比を提供した。更に、本発明のクエンチャは、ダブルシルよりも広い吸収帯域を示し、広範囲のフルオロフォアの効率的な消光を可能にする。加えて、MGBオリゴヌクレオチド接合体においては、ハイブリダイゼーション特性の改善を示し、改良式クエンチャは、ダブルシルを有する標準プローブ(DPI<sub>3</sub>無し)と比較して、TAMRAで約30倍のS/N比の増加を示した。本発明の試薬は、自動オリゴヌクレオチド合成中にクエンチャを導入することを可能にする(ダブルシル ホスホルアミダイトは、市販されている(Glen Research, Sterling, VA))。

10

## 【0086】

一般的に、本発明の目的の為に、オリゴヌクレオチドは、複数のヌクレオチド単位と、3'末端と5'末端とを有するものであることが理解されるであろう。前記オリゴヌクレオチドは、通常のプリン及びピリミジン塩基の代りに単数又は複数の修飾塩基と、更に、ワトソン-クリック塩基対合等を通じて標的ポリヌクレオチドに特異的に結合可能な修飾ヌクレオチド間結合とを含むことができる。更に、オリゴヌクレオチドは、ペプチドオリゴヌクレオチド(PNA)又はPNA/DNAキメラを含むことができ、その合成は、公知であり、例えば、ウールマン(Uhlmann)等, *Angew. Chem. Inter. Ed.*, 37:2796-2823(1998); メイフィールド(Mayfield)等, *Anal. Biochem.*, 401-404 (1998)によって行うことができる。これらのすべてをここに参考文献として合体させる。

20

## 【0087】

一般的に、本発明の前記オリゴヌクレオチドプローブは、5'-3'エクソヌクレアーゼ活性に、当該プローブ中のクエンチャとフルオロフォア分子との間の効率的な開裂を許容することを可能にさせるために、5'末端に隣接した十分な数のホスホジエステル結合を含む。この点に関する適切な数は、約1~100である。

## 【0088】

フルオロフォア試薬

クマリン ホスホルアミダイト試薬

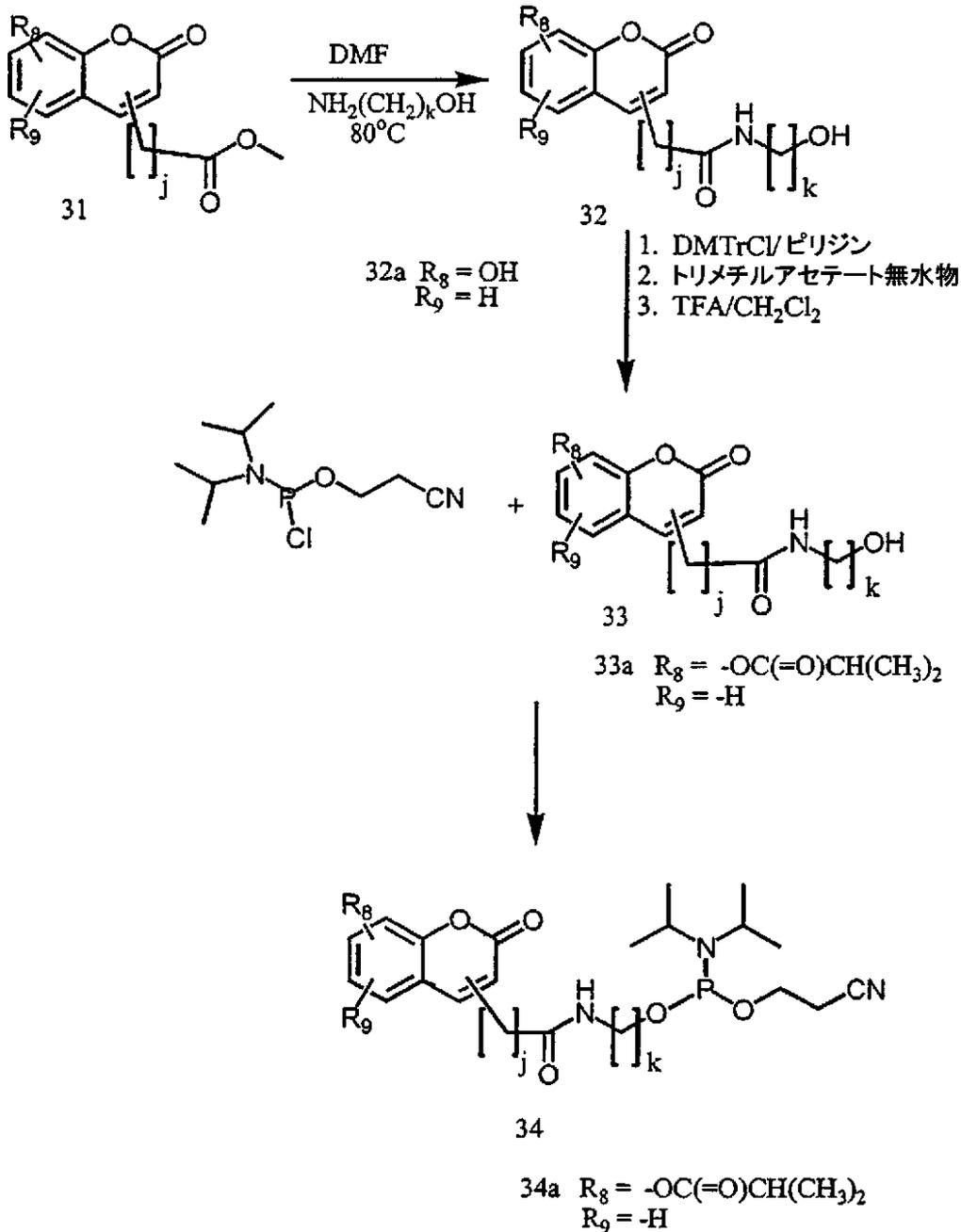
30

緑色染料FAMより短い発光波長を有する蛍光発光染料も、DNAベースのアッセイに利用可能である。しかしながら、従来技術においては、これらのプローブは、レーザ光源での消光が、より長い波長によるものよりも実用的でないことから、それほど一般的ではなかった。本発明者等が知る限りにおいて、青色蛍光発光染料を含むDNA合成試薬は今だ報告されていない。好適なクマリンフルオロフォアを含み、DNA合成に適したそのようなホスホルアミダイト試薬の一例が、化合物34として反応スキーム8に図示されている。このホスホルアミダイト試薬34において、R<sub>8</sub>及びR<sub>9</sub>は、独立的に、-H、ハロゲン、-NO<sub>2</sub>、-SO<sub>3</sub>、-C(=O)NH<sub>2</sub>、又は-CH; -OR<sub>nn</sub>、-SR<sub>nn</sub>、-OR<sub>n</sub>、-NHR<sub>nn</sub>、-N[R<sub>nn</sub>]<sub>2</sub>であり、ここで、R<sub>nn</sub>は、独立的にH、酸性又はアルカリ性条件下で除去可能でオリゴマ合成に使用可能なブロック基であり、又は1~10炭素原子を含む基であり、j及びkは、独立的に1~10である。図示されているように、前記試薬34は、458nmで光を放出する共役結合クマリン発色団を含む。このクマリン発色団を含むDNAプローブを作成したところ所望の蛍光発光特性が得られた。

40

## 【0089】

## 【化 6 8】



10

20

30

## 反応スキーム8

## 【0090】

次に、一般的条件及び、具体的なホスホルアミダイト試薬 34 a を提供する例におけるスキーム 8 を参照すると、ヒドロキシル置換 (2 - オキシ - 2 H - クロメン - 4 - イル) - アルキルカルボキシルメチルエステル (31) を、ここに参考文献として合体させる刊行物ベーカー (Baker) 等 (J. Chem. Soc.; 170、(1950)) によって得る。この化合物 31 を、アミノアルコールとの 80 での反応によってアルコール誘導体 32 (具体的には、 $R_8$  が - OH で  $R_9$  が - H である 32 a) に変換する。この 32 を先ず DMTrCl と、次に、トリメチルアセテート無水物と反応させ、その後、DMTr ブロック基を除去することによって、ピバロエート誘導体 33、具体例 33 a では、 $R_8$  が - OC(=O)CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> で  $R_9$  が - H である、を得る。この 33 を 2 - シアノエチル ジイソプロピルクロロホスホルアミダイトと反応させて試薬 34 (具体的には、 $R_8$  が - OC(=O)CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、 $R_9$  が - H である 34 a) を得る。この試薬 34 を使用して、前記クマリンフルオロフォアを DNA プローブの 5' 末端に導入する。尚、自動化オリゴヌク

40

50

レオチド合成中の前記保護基の除去は良好に行われ、高収率で得られることが銘記される。スキーム 8 中の記号  $j$  及び  $k$  は、それぞれ、 $0 \sim 20$  及び  $1 \sim 20$  と定義される。

【0091】

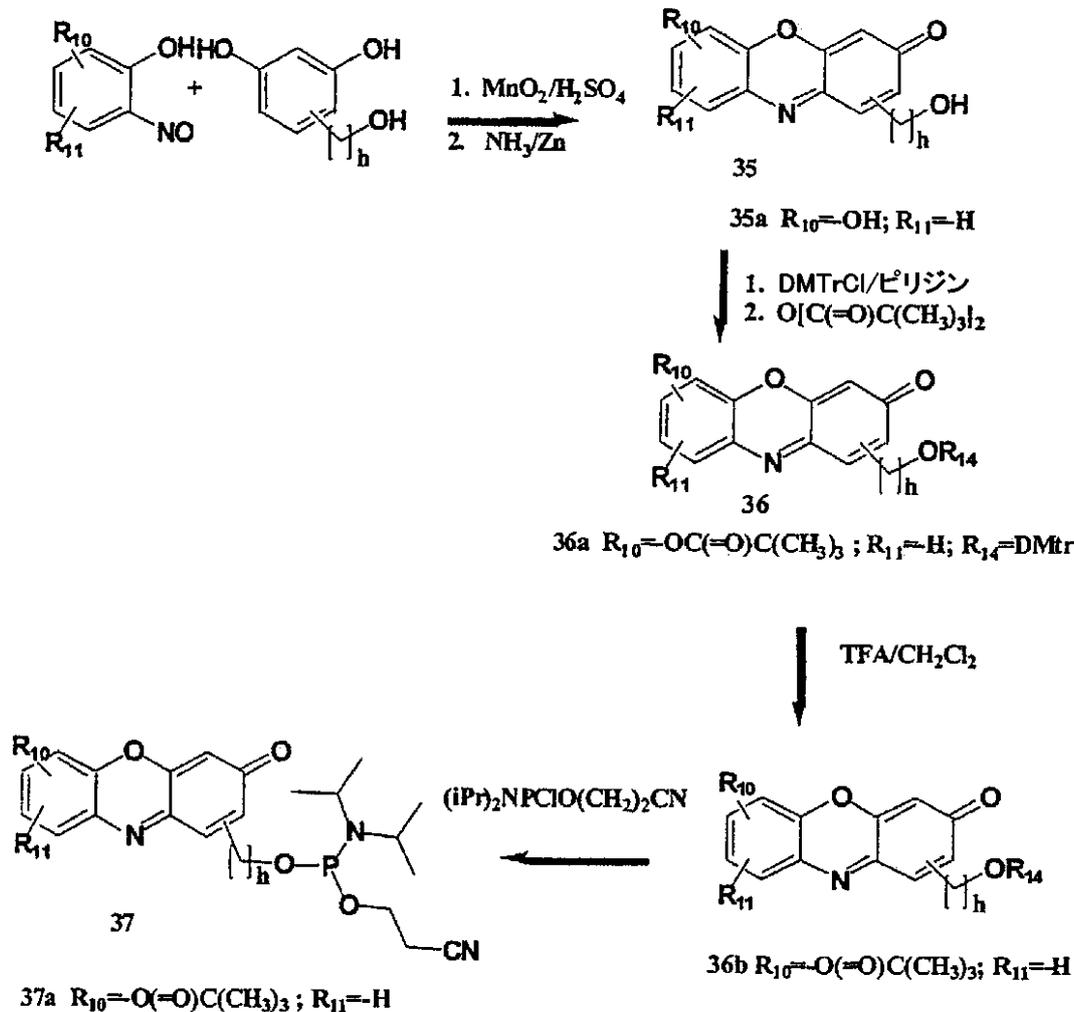
レゾルフィン ホスホルアミダイト

別の新規なクラスの DNA 合成試薬は、親化合物（レゾルフィン）中に存在する 7 - ヒドロキシ - 3 H - フェノキサジン - 3 - オン発光団に基き、FAM 発光から容易に区別される発光波長（595 nm）を有する。本発明によれば、前記発光団は、更なる官能化の為に、所望のホスホルアミダイト試薬にリンカ構造を導入するように合成される。DNA 合成に適したこれら試薬 37 の好適例の作成が反応スキーム 9 に図示されている。一般的に、試薬 37 において、 $R_{10}$  及び  $R_{11}$  は、独立的に、 $-H$ 、 $-OR_{12}$ 、 $-NHR_{13}$ 、ハロゲン、 $-O(CH_2)_nCH_3$ 、 $-(CH_2)_nCH_3$ 、 $-NO_2$ 、 $-SO_3$ 、 $-C(=O)NH_2$ 、 $-N[(CH_2)_nCH_3]_2$ 、 $O$ -アルキル又は  $O$ -アルカノイルであり、ここで、前記アルキル又は前記アルカノイル基は  $1 \sim 10$  炭素、又は  $-CN$  であり、ここで  $n = 0 \sim 5$ ； $h = 1 \sim 20$ 、そして、 $R_{12}$  及び  $R_{13}$  は、ODN 合成に使用可能なブロック基である。スキーム中の  $R_{14}$  は、 $-H$  又は  $DMTr$  である。

10

【0092】

【化 69】



20

30

40

### 反応スキーム 9

【0093】

一般条件及び具体例のスキーム 9 の例に図示されているように、ニトロソレコルシノール誘導体（市販もしくは、当該技術で入手可能）と、4 - (3 - ヒドロキシプロピル) ベンゼン - 1, 3 - ジオール（フォルチャシン（Forchiassin）等 J. Heterocyc. Chem. 2

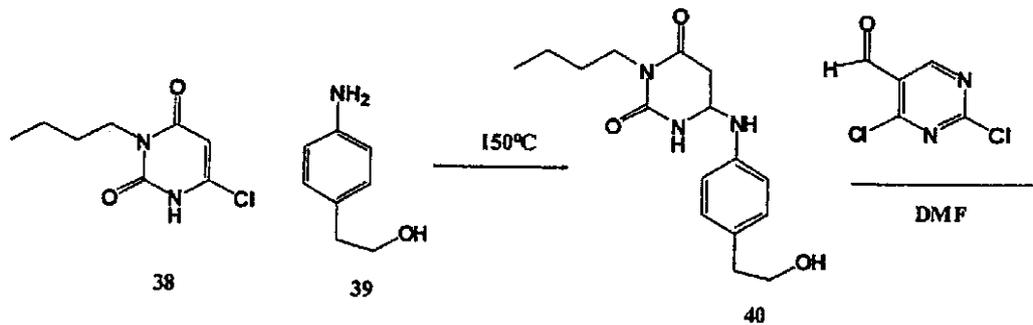
50

0, 1983, 493-494によって得られる)と $MnO_2$ との反応によって、いくらかのレゾルフィン誘導体が混入したりザスリン誘導体得られる。この混合物を、 $NH_4OH$ と $Zn$ ダストとによって処理して、主要不純物として2, 3, 4-トリヒドロ-2H-ピラノ[3, 2-b]フェノキサジン-9-オンが混入したレゾルフィン誘導体35(具体的には、 $R_{10}$ が-OHで $R_{11}$ が-Hである35a)を得る。後者の混合物を、DMTrClとピリミジンとで処理し、次に、トリメチル酢酸無水物によって処理する。その生成物36を、次に、シリカゲル上でのクロマトグラフィによって精製し、36a( $R_{10}$ は-OC(=O)C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>、 $R_{11}$ は-Hそして $R_{14}$ はDMTr)のDMTr保護誘導体を得た。前記純粋DMTr誘導体を、TFA/ $CH_2Cl_2$ で処理して、シリカゲルクロマトグラフィ後に単一生成物36bを得た。36( $R_{10}$ は-OC(=O)C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>、 $R_{11}$ 及び $R_{14}$ は-H)の2-シアノエチルジイソプロピルクロロホスホルアミダイトでの処理によって、所望のODNへのフルオロフォアの導入に使用される所望のホスホルアミダイト試薬37(具体的には37a)を得た。

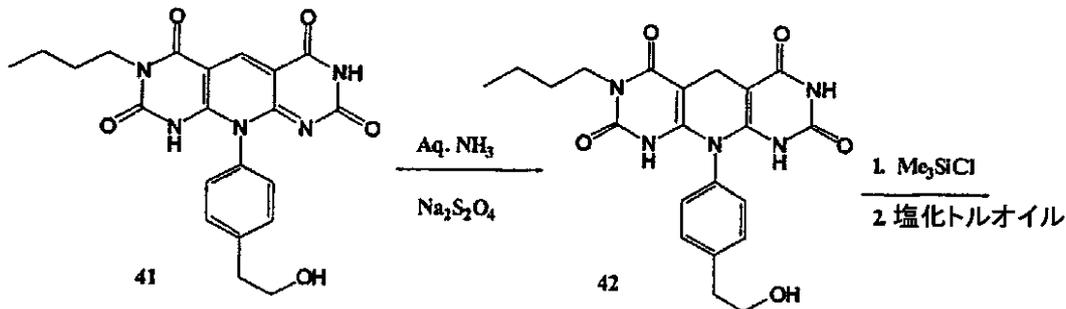
10

【0094】

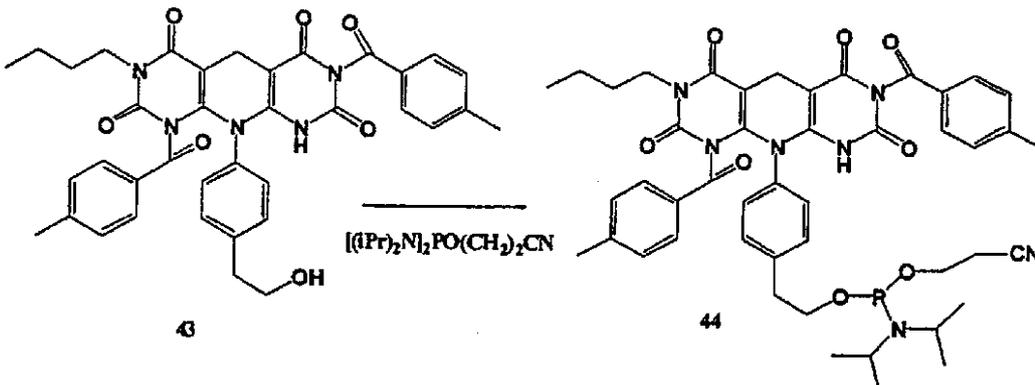
【化70】



20



30



40

反応スキーム10

50

## 【0095】

## PPTホスホルアミダイト

それぞれ384nmと400nmとに励起及び発光波長を有する紫色蛍光発光染料PPT44を導入したホスホルアミダイト試薬の合成を、反応スキーム10と例Xとに示す。このスキームによると、6-クロロ-3-n-ブチルウラシル38と2-(4-アミノフェニル)エタノール39とを反応させて、フェニル置換ウラシル誘導体40を得る。前記化合物38及び39は、当該技術及び化学文献によって得ることが可能である。室温でのDMF中での40と5-フォルミル-4、6-ジクロロピリミジンとの反応によって、三環性複素環式化合物41が得られる。NH<sub>3</sub>/Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>中での41の還元によって42を得て、これをその後、トルオイル誘導体43としてブロックする。最後の段階で43を2-シアノエチルジイソプロピルクロロホスホルアミダイトと反応させて、ODNへのPPTフルオロフォアの導入に使用される試薬PPTシアノエチルホスホルアミダイト44を得る。

10

## 【0096】

更に別の実施例においては、フルオロフォアである、アルキルカルボキシル基によって置換された、クマリン、レゾルフィン及びPPTは、対応のホスホルアミダイト試薬の合成用の出発物質として作用する。フルオロフォアである、アルキルカルボキシル基によって置換された、クマリン、レゾルフィン及びPPTは、市販、又は、当該技術によって合成可能である。これらの化合物は、ペンタフルオロフェニルエステルとしてアルキルカルボキシル基上で活性化される。これらの活性化されたエステルを使用して、これらの染料をアミン修飾オリゴヌクレオチドに付着させる。

20

## 【0097】

同様に、更に別の実施例において、dUTP標識クエンチャ又はフルオロフォアが、例えば、米国特許第5、328、824号)の教示に基いて得られる。更に、7-標識ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン標識クエンチャ又はフルオロフォアは、5、824、796(ここに参考文献として合体させる)によって合成され、オリゴヌクレオチドの標識に使用することができる。

## 【0098】

オリゴヌクレオチド合成用の、PPGレッドダイ(red dye)ベース及びその他のホスホルアミダイト試薬

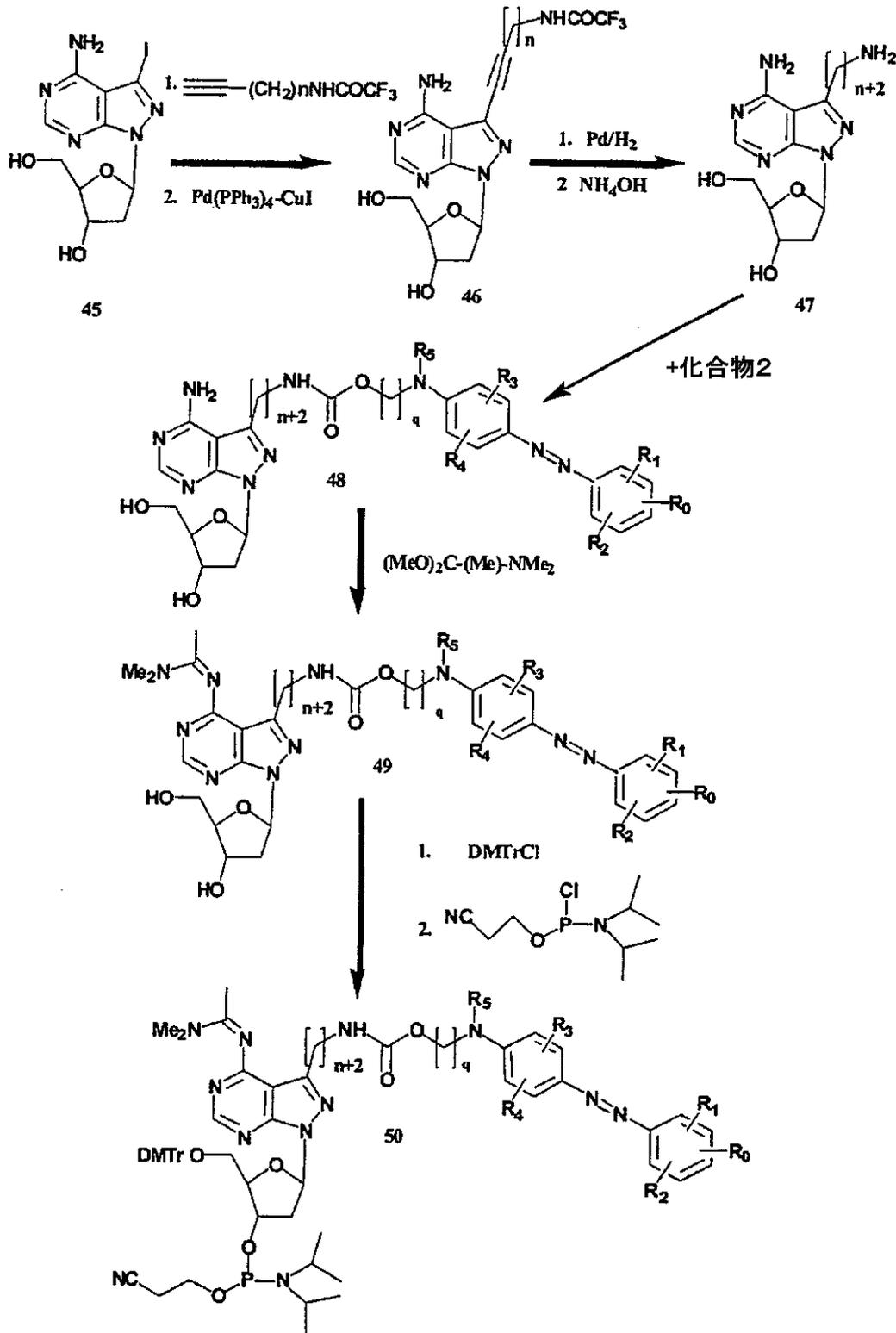
30

別の実施例において、レッドダイ13クエンチャを、ピラゾロ[5,4-d]ピリミジン(PP)の3位置、又は、ピリミジンの5位置に付着する。次にスキーム11自身を参照すると、出発物質は、5-(4-アミノ-3-ヨードピラゾロ[5,4-d]ピリミジニル)-2-(ヒドロキシメチル)オキサラン-3-オール45であり、これはここに参考文献として合体させる刊行物シーラ(Seela)等、J. Chem. Soc., Perkin, Trans., 1(1999, 479-488)によって入手可能である。化合物45を、先ず、N-プロピニル-2,2,2-トリフルオロアセテート(又は、前記スキームにおいてnが1~10である場合のその同族体)と反応させ、次に、Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>-CuIと反応させてアルキン誘導体46を得る。46のPd/H<sub>2</sub>還元と、その後の水酸化アンモニウム処理とによって、アミノアルキル誘導体47(PPA')が得られる。PPA'と化合物2(反応スキーム1との関連において開示したように入手可能)との反応によってPPA'-レッド1348が得られた。この48と(1,1-ジメトキシエチル)ジメチルアミンとの反応によって、ピラゾロ[5,4-d]ピリミジンのアミノ基をブロックし、49を得る。この49を先ず、DMTrClと反応させ、次に、2-シアノエチルジイソプロピルクロロホスホルアミダイトと反応させて、DMTrClブロックPPA'-レッド13ホスホルアミダイト50を得る。

40

## 【0099】

【化 7 1】



反応スキーム11

【0100】

6 - アミノ - 5 - ヒドロキシ - 3 - ヨード - ピラゾロ [ 5 , 4 - d ] ピリミジン - 4 - オン ( 3 - Iodo - PPG ) のデオキシリボシドから出発する更に別の実施例において、3 - Iodo - PPG 部分に共有結合されたレッド 13 染料を含有するホスホルアミダイト試薬が、反応スキーム 11 に図示されているものに類似の反応によって合成される。同様に、5 - アミノプロピルデオキシウリジンから出発して、5 - アミノプロピル - デオキシウリジンに共有結合されたレッド 13 染料を含有するホスホルアミダイト試薬が合成

10

20

30

40

50

される。

【0101】

当業者においては、上記開示から、本発明の範囲内の、前記ピラゾロピリミジン - レッド13 - 又はウリジン - レッド13 - ベースのホスホルアミダイトには、そのようなリンカが当該技術及び本開示内容から利用可能な限りにおいて、ピラゾロピリミジンとウラシル塩基とレッド13クエンチャとの間に種々のリンカを含むことが可能であることが明白であろう。

【実施例】

【0102】

例

本発明の方法及び組成物は、オリゴヌクレオチドの別の核酸へのハイブリダイゼーションが使用される、現在使用されているものと今後開発されるものとの両方の種々の技術に使用可能である。これらの技術は、非限定的に、オリゴヌクレオチドの標的核酸へのハイブリダイゼーションが最終目的である技術；単数又は複数のオリゴヌクレオチドの標的核酸へのハイブリダイゼーションが、そのオリゴヌクレオチドをプライマとして使用し、標的核酸をテンプレートとして使用する単数又は複数のポリメラーゼ伸介伸長工程に先立って行われる技術；オリゴヌクレオチドの標的核酸へのハイブリダイゼーションを、別のプライマの伸長を阻止するために使用する技術；オリゴヌクレオチドの標的核酸へのハイブリダイズ後に、そのオリゴヌクレオチドを加水分解して付着標識を解放する技術；及び、二つ以上のオリゴヌクレオチドが標的核酸にハイブリダイズして、これら複数のオリゴヌクレオチド間の相互作用を測定する技術、を含む。オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションの条件、及び、温度、イオン強度、溶媒組成等のハイブリダイゼーションの度合い及び特異性に影響を与える要因は、当該技術において周知である。例えば、サムブルック (Sambrook) 等、前出、オースベル (Ausubel) 等、前出、イニス (Innis) 等、前出 (eds) PCR Protocols, Academic Press, San Diego, 1990; ヘイムス (Hames) 等 (eds) Nucleic Acid Hybridisation: A Practical Approach, IRL Press, Oxford, 1985; 及びバン・ネス (van Ness) 等 (1991) Nucleic Acids Res. 19: 5143-5151を参照。

【0103】

ハイブリダイゼーションプローブ

本発明の一用途において、単数又は複数の FL - オリゴヌクレオチド接合体を、プローブ (単数又は複数) と標的核酸との間のハイブリダイゼーションを評価することによって、標的核酸を同定するプローブ (単数又は複数) として使用する。プローブは、本発明の検出可能な標識によって標識化することができ、或いは、標識との会合が可能な、又は、標的へのハイブリダイゼーション前又は後において第2の標識プローブにハイブリダイズすることが可能な、反応基を含ませることによって、ハイブリダイゼーション前又はハイブリダイゼーション後に標識化する能力を持たせることができる。この技術の基礎として、核酸プローブのハイブリダイゼーションの条件は当該技術において周知である。例えば、サムブルック (Sambrook) 等、MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); オースベル (Ausubel) 等、CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, ジョン・ウィリ及びサンズ (John Wiley & Sons) (1987, 1988, 1989, 1990, 1991, 1992, 1993, 1994, 1995, 1996); ヘイムス (Hames) 等 (eds) Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach, IRL Press, Oxford, 1985及びバン・ネス (van Ness) 等, Nucleic Acids Res. 19: 5143-5151 (1991)を参照。

【0104】

ハイブリダイゼーションは、当業者に周知のいくつかの方法の一つによって、ハイブリダイズしたプローブを遊離プローブから識別することによって、アッセイすることができる (即ち、ハイブリダイズした核酸を同定することができる)。これらの方法としては、非限定的に、直接的又は間接的な標的核酸の固体支持体への付着 (第2の支持体結合プローブへのハイブリダイゼーション、又は、表面結合したリガンドと、プローブ接合したり

10

20

30

40

50

グンドとの間の相互作用によって)、その後の、プローブとの直接的又は間接的なハイブリダイゼーション、そして、ハイブリダイズしなかったプローブを除去するための洗浄；ヌクレアーゼ抵抗性の測定；浮遊密度測定；核酸二体鎖に対して特異的なアフィニティ法（例えば、ヒドロキシアパタイト クロマトグラフィ）；同じ標的核酸にハイブリダイズした複数のプローブ間の相互作用；その他公知の方法が含まれる。例えば、ファルコウ（Falkow）等、米国特許第4、358、535号、ウルダー（Urdea）等、米国特許第4、868、105号及び第5、124、246号、フリーフェルダー（Freifelder）、Physical Biochemistry、第2版、Freeman & Co., San Francisco, 1982；サムブルック（Sambrook）等、前出、オースベル（Ausubel）等、前出、及びヘイムス（Hames）等、前出、を参照。

10

#### 【0105】

標識化プローブ、加水分解可能プローブ及び標識化プライマを利用するアッセイ

フルオロフォアとクエンチャを含むオリゴヌクレオチド接合体のその他の用途としては、標識プローブが標的及び/又は標的の伸長生成物にハイブリダイズし、ハイブリダイゼーションの結果としてその標識の物理的状态の変化が起こる、アッセイがある。プローブは、第2の核酸分子中の標的配列にハイブリダイズ可能な核酸分子である。例えば、このタイプのアッセイの一つである、加水分解可能プローブアッセイは、DNAポリメラーゼ等の多くの重合化酵素は、5' - 3' エキソヌクレアーゼ活性を本来的に有していることを利用する。従って、もしも、プローブが、重合化のためのテンプレートとして作用することが可能な配列にハイブリダイズするならば（例えば、もしもプローブが、増幅反応中において、二つの増幅プライマ間に位置するDNAの領域にハイブリダイズするならば）、上流側の増幅プライマで重合化を開始した重合化酵素は、そのプローブをエキソヌクレアーゼ的に消化可能である。もしもそのプローブがその標的にハイブリダイズして、もしも増幅がそのプローブがハイブリダイズした領域を横切って発生しているならば、そのようなプローブに付着したいかなる標識も解放される。解放された標識は標識化プローブから分離され、その標識の性質に応じて、当業者に周知の方法によって検出される。例えば、放射性標識されたフラグメントは薄層クロマトグラフィによって分離され、オートラジオグラフィによって検出可能であり；蛍光標識フラグメントは、適当な励起波長での放射と適当な発光波長での観察によって、検出することができる。この基本的技術は、例えば、ここに参考文献として合体させる米国特許第5、210、015号に記載されている。

20

30

#### 【0106】

この技術のバリエーションにおいて、プローブは、蛍光発光標識とこの蛍光発光標識の蛍光発光を消光するクエンチャ剤との両方を含有する。この場合、前記蛍光発光標識は、前記クエンチャ剤に対するその空間的關係が変化するまで、例えば、蛍光発光標識がプローブからエキソヌクレアーゼ的に解放されるまで、検出不能である。従って、標的配列へのハイブリダイゼーションの前は、前記デュアル フルオロフォア/クエンチャ標識プローブは、蛍光発光しない。前記フルオロフォア/クエンチャ標識プローブのその標的へのハイブリダイゼーション後、それは、上流側プライマにおいて重合化を開始した重合化酵素のエキソヌクレアーゼ活性のための基質となる。プローブのエキソヌクレアーゼ的分解によって、蛍光発光標識がプローブから、従って、クエンチャ剤の近傍から放出され、適当な励起波長における放射時における蛍光発光信号の検出を可能にする。この方法は、放出された標識を、インタクトなプローブから分離する必要がないという利点を有する。多重法は、複数のプローブを利用し、これらプローブのそれぞれは、異なる標的配列に対して相補的であって識別可能な標識を有し、これによって複数の標的配列の同時アッセイを可能にする。

40

#### 【0107】

この方法及びこれに関連する方法におけるFL-ODN-Q-DPI<sub>3</sub>接合体

の使用によって、これらのアッセイをより速度、感度及び識別力が高いものとすることができる。特に、MGB-オリゴヌクレオチド接合体の、完全なハイブリッドと、単一塩基

50

ミスマッチを含むハイブリッドとの間の識別を可能にする増大した能力によって、ここに参考文献として合体させる刊行物 W O 9 9 5 1 6 2 A 2 に記載されているような、一塩基多型等の同定において加水分解可能プローブアッセイを使用することが容易になる。例 1 3 及び 1 4 は、このタイプのアッセイにおける F L - O D N - Q - D P I<sub>3</sub> 接合体の有用性を例示している。当業者にとっては、単一ヌクレオチドミスマッチを識別可能な、本発明のもののような、組成物及び方法は、複数のミスマッチを含む配列間をそれぞれ識別することも可能であるということが理解されるであろう。

#### 【 0 1 0 8 】

別の用途実施例は、内在性の尾を備えた自己プローブプライマを使用し、ここで、クエンチャ/フルオロフォアはヘアピンに存在し、これは、プライマの伸長生成物をプローブすることができ、増幅後に蛍光発光する状態でアンプリコンにハイブリダイズする。これによって、標的配列のプロービングを、一分子事象に変換することができる(フィットコンベン D. (Whitcombe, D.) 等, Nat. Biotech., 17: 804-807 (1999))。

10

#### 【 0 1 0 9 】

##### 蛍光発光エネルギー転移

本発明の前記新規組成物の更に別の用途において、フルオロフォア/クエンチャ対 ( F L - O D N - Q ) を含むオリゴヌクレオチド接合体は、複数の蛍光発光標識プローブを使用する種々の技術に使用される。これらのアッセイの内のいくつかにおいて、蛍光発光標識の特性の変化を使用してハイブリダイゼーションをモニタする。例えば、蛍光発光共鳴エネルギー転移 ( F R E T ) が、オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションのインジケータとして使用されている。この技術の一実施例において、それぞれが、蛍光発光標識とクエンチャ分子とをそれぞれ含む、二つのプローブが使用される。前記蛍光発光標識は供与体であり、前記クエンチャは受容体であり、ここで、前記供与体の発光波長は、受容体の吸収波長とオーバーラップする。これらプローブの配列は、それらが標的核酸の隣接する領域に対してハイブリダイズし、これによって、もしも標的が存在しているならば、蛍光発光供与体と受容体とを互いに近接させるように選択される。標的核酸の存在時には、前記蛍光発光供与体の吸収波長に対応する波長の放射によって、蛍光発光受容体からの放出が起こる。これらのタイプのアッセイは、それらは均質アッセイであって、未反応プローブを除去する必要のない、明確な信号を提供するという利点を有する。それら自身公知である、これらのアッセイの更なる詳細及びその他の具体例については、例えば、共にここに参考文献として合体させるヨーロッパ特許公報 0 7 0 6 8 5 ; 及び刊行物カルデュロ (Cardullo) 等, (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 8790-8794を参照。本発明の前記新規組成物のその他の用途は、共に同じ標的核酸にハイブリダイズした二つの異なるオリゴヌクレオチド間の相互作用を測定する技術、及びそれらに関連の技術にある。適当な蛍光発光供与体/蛍光発光受容体対の選択は、所与の対について、蛍光発光供与体の発光波長が受容体の吸収波長にオーバーラップするという原則に基づいて、当業者には明らかであろう。D P I<sub>3</sub>-オリゴヌクレオチド接合体の、完全なハイブリッドと、単一塩基ミスマッチを含むハイブリッドとの間の識別を可能にする増大した能力によって、一塩基多型等の同定において F R E T - ベースの技術を使用することが容易になる。

20

30

#### 【 0 1 1 0 】

本発明の前記新規組成物の別の用途において、F L - O D N - Q 接合体の蛍光発光は、そのネイティブな状態で消光される。しかし、意図される標的とのハイブリダイゼーション後は、フルオロフォアとクエンチャ部分との空間配置が変化して蛍光発光が起こる。この基本的技術については、例えば、共にここに参考文献として合体させる、チアギ (Tyagi) 等, Nat. Biotech., 16: 49-53 (1998) 及び米国特第 5、8 7 6、9 3 0 号を参照。

40

#### 【 0 1 1 1 】

尚、本発明において、本発明のクエンチャと使用されるのに特に有用とされ、本発明によって O D N に導入される前記フルオロフォアの他に、当業者は、参考文献、ホーグランド (Haugland) Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, 第 6 版, Eugene, OR. pp.235-236. 1996; ベールマン (Berlman), Handbook of Fluorescence

50

Spectraof Aromatic Molecules, 2<sup>nd</sup>, Academic Press, New York, 1971; デウ (D u) 等, Photochem CAD. A Computer-Aided Design and Research Tool in Photochemistry, Photochem. Photobiol. 68: 141-142 (1998) 等の文献に記載されている光学特性に基き、本発明のクエンチャと組み合わせて使用されるその他のフルオロフォアを選択することができる と理解される。従って、これらの公知のフルオロフォアとの組み合わせでの、前記新規 O D N クエンチャ接合体の使用は本発明の範囲内に含まれると見なされる。

#### 【 0 1 1 2 】

別の用途において、前記小溝バインダ、D P I<sub>3</sub>は、F L - O D N - Q - C D P I<sub>3</sub>接合体においてクエンチャと結合されて、信号対ノイズ比を改良する(表 2 を参照)。好適なクエンチャは、式 6 のクエンチャであり、より好適なクエンチャは、8 - 1 1、1 2 - 1 6 及び 3 0 である。

#### 【 0 1 1 3 】

本発明の前記新規なフルオロフォア(3 4、3 7 及び 4 4)と組み合わせて使用されるその他のクエンチャとしては、ダブシルニトロチアゾール、T A M R A、6 - (N - [7 - ニトロベンズ - 2 - オクサ - 1、3 - ジアゾル - 4 - イル]アミノ)ヘキサン酸、6 - カルボキシ - X - ローダミン(R o x)及び Q S Y - 7 がある。

#### 【 0 1 1 4 】

本発明の前記新規なフルオロフォア/クエンチャ対のその他の用途は、前記対を酵素基質に導入することであり、ここで、蛍光発光は、そのフルオロフォアとクエンチャとの近接性によって消光される。しかしながら、酵素が基質を開裂した後は、フルオロフォアとクエンチャとが分離され、蛍光発光が観察される。この技術の一例を、以下、ホスホジエステラーゼ酵素を使用して説明する。当業者には、前記新規なクエンチャとフルオロフォアとの両方を含む適当な基質を、その基質を開裂する酵素のために構築することが可能であることが明白であろう。

#### 【 0 1 1 5 】

##### オリゴヌクレオチドアレイ

別の用途において、本発明の F L - O D N は、オリゴヌクレオチドのアレイを使用する操作に利用される。それ自身公知であるこの技術の具体例には、ハイブリダイゼーションによる配列決定と、遺伝子発現のアレイベースの分析が含まれる。これらの操作において、異なる既知の配列のオリゴヌクレオチドの秩序配列が、単数又は複数のテストポリヌクレオチド、核酸又は核酸集団(nucleic acid populations)へのハイブリダイゼーションのためのプラットフォームとして使用される。ハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドの測定とそれらの既知の配列とのアラインメントとによって、テストポリヌクレオチドを再構築することが可能である。これらの技術の説明については、米国特許第 5、4 9 2、8 0 6 号、第 5、5 2 5、4 6 4 号、第 5、5 5 6、7 5 2 号及び P C T 公報 W O 9 2 / 1 0 5 8 8 及び W O 9 6 / 1 7 9 5 7 を参照。これのすべてをここに参考文献として合体させる。アレイの構築のための材料としては、非限定的に、ニトロセルロース、ガラス、シリコンウエハ、及び光ファイバがある。

#### 【 0 1 1 6 】

##### 構造的考慮事項

オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド及び核酸という用語は、修飾又は非自然発生ヌクレオチドを含有する、D N A 又は R N A (或いはそれらの両方)の一本鎖又は二本鎖のポリマ、或いは、非限定的に、ニールセン(Nielsen)等(1991) Science 254: 1497-1500に開示されているペプチド核酸、バイシクロ D N A オリゴマ(ポリ(Bolli)等(1996) Nucleic Acids res. 24: 4660-4667)及びそれらに関連する構造を含む、D N A 又は R N A と安定な塩基対合を形成可能な如何なる他のタイプのポリマを、相互交換可能に意味する。単数又は複数の M G B 部分及び / 又は単数又は複数の蛍光発光標識、及びクエンチャ剤を、前記オリゴマの 5' 末端、3' 末端又はその内部に付着させることができる。本発明において好適な M G B は、D P I<sub>3</sub>であり、好適なクエンチャはレッド 1 3 アミドであ

10

20

30

40

50

る。

【0117】

本発明において好適であるのは、一本鎖で、100ヌクレオチド以下、好ましくは50ヌクレオチド以下、より好ましくは30ヌクレオチド以下、最も好ましくは、約5ヌクレオチドを下限として20ヌクレオチド以下の長さを有するDNAオリゴヌクレオチドである。

【0118】

フルオロフォア/クエンチャ対を含み、MGB有り又は無しのオリゴヌクレオチド接合体は、自然発生塩基であるアデニン、シトシン、グアニン、チミン、及びウラシルに加えて、単数又は複数の修飾塩基を含むことができる。修飾塩基は、単数又は複数の官能基の追加又は欠失、複素環構造の相違（即ち、炭素の複素原子による置換、あるいはその逆）、及び/又は塩基に対する単数又は複数のリンカアーム構造の付着によって、自然発生塩基とは異なるものと考えられる。本発明の前記ODN接合体に含ませることが可能な修飾ヌクレオチドとしては、7-デアザプリン及びそれらの誘導体、及び、ピラゾロピリミジン（ここに参考文献として合体させるPCT WO90/14353）、及び共有及び同時係属出願第09/054、630に記載がある。

【0119】

このタイプの好適な塩基類似体は、グアニン類似体である6-アミノ-1H-ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン-4(5H)-オン(ppG又はPPG)、及び、アデニン類似体である4-アミノ1H-ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン(ppA又はPPA)を含む。更に、キサンチン類似体である1H-ピラゾロ[5,4-d]ピリミジン-4(5H)-6(7H)-ジオン(ppX)も使用される。これらの塩基類似体は、オリゴヌクレオチド中に含まれる時、ハイブリダイゼーションを強化し、ミスマッチ識別を改善する。自然発生塩基、修飾塩基、及び塩基類似体のすべての互変体形状のものを本発明のオリゴヌクレオチド接合体に含ませることができる。

【0120】

同様に、本発明において、修飾糖又は糖類似体を、オリゴヌクレオチド接合体の単数又は複数のヌクレオチドサブユニット中に存在させることができる。糖修飾としては、非限定的に、糖の2'、3'及び/又は4'炭素原子への置換物の付着、異なるエピマー形状の糖、グリコシド結合の又は配置の違い、及びその他のアノマー的相違が挙げられる。糖部分は、非限定的に、ペントース、デオキシペントース、ヘキソース、デオキシヘキソース、リボース、デオキシリボース、グルコース、アラビノース、ペンタフラノース、キシロース、リキソース、及びシクロペンチルを含む。

【0121】

修飾ヌクレオチド間結合も、本発明のオリゴヌクレオチド接合体中に含ませることができる。そのような修飾結合は、非限定的に、ペプチド、ホスフェート、ホスフォジエステル、ホスフォトリエステル、アルキルホスフェート、アルカンホスホネート、チオホスフェート、ホスホロチオエート(phosphorothioate)、ホスホロジチオエート、メチルホスホネート、ホスホルアミダイト、置換ホスホルアミダイト等を含む。オリゴヌクレオチド中においてプローブ及び/又はプライマとして作用するべく適用可能な、その他いくつかの塩基、糖、及び/又はヌクレオチド間結合の修飾は、当業者にとって明白であろう。

【0122】

本発明のいくつかの好適実施例は、反応スキーム3に図示されているように、種々のクエンチャ発光団及びリンカを伴う種々のホスホルアミダイトの合成、及び、蛍光発光MGB ODNの3'末端におけるそれらの導入に関する。種々の蛍光発光レポータ基（反応スキーム7に図示）も、前記オリゴヌクレオチドプローブに導入された。これらは、実験の部に記載されている。これらOND接合体の蛍光発光特性は、表2に記載されている。他の実験において、MGB分子は、それらの望ましい改良されたハイブリダイゼーション特性により、ハイブリダイゼーション特異性、蛍光消光及び蛍光発光信号の損失無く、フ

10

20

30

40

50

ルオロフォアとクエンチャとの両方を有するオリゴヌクレオチドに導入された。隣接する芳香性DPI<sub>3</sub>残基に結合されたフラットな芳香性クエンチャは、厳格な幾何学的要件を有する。なぜなら、オリゴヌクレオチドとDPI<sub>3</sub>残基との間のリンカは、DNA二本鎖形成後における小溝中のDPI<sub>3</sub>の配置を可能にするのに十分にフレキシブルなものでなければならないからである。

【0123】

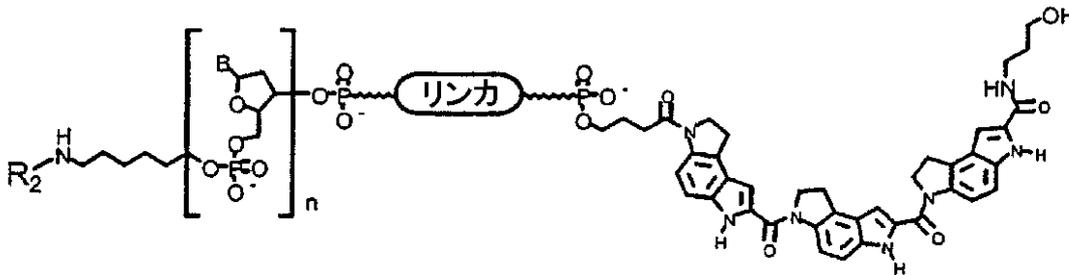
本発明の試薬の特性

本発明の試薬及び方法によって合成された様々なFL-ODN-Q-DPI<sub>3</sub>接合体が式7~16に図示されており、ここで、nは、オリゴヌクレオチド中の塩基を数を表わし、R<sub>2</sub>はFAM又はTAMRAである。“B”は、デオキシリボース糖部分に付着した複素環塩基を示す。

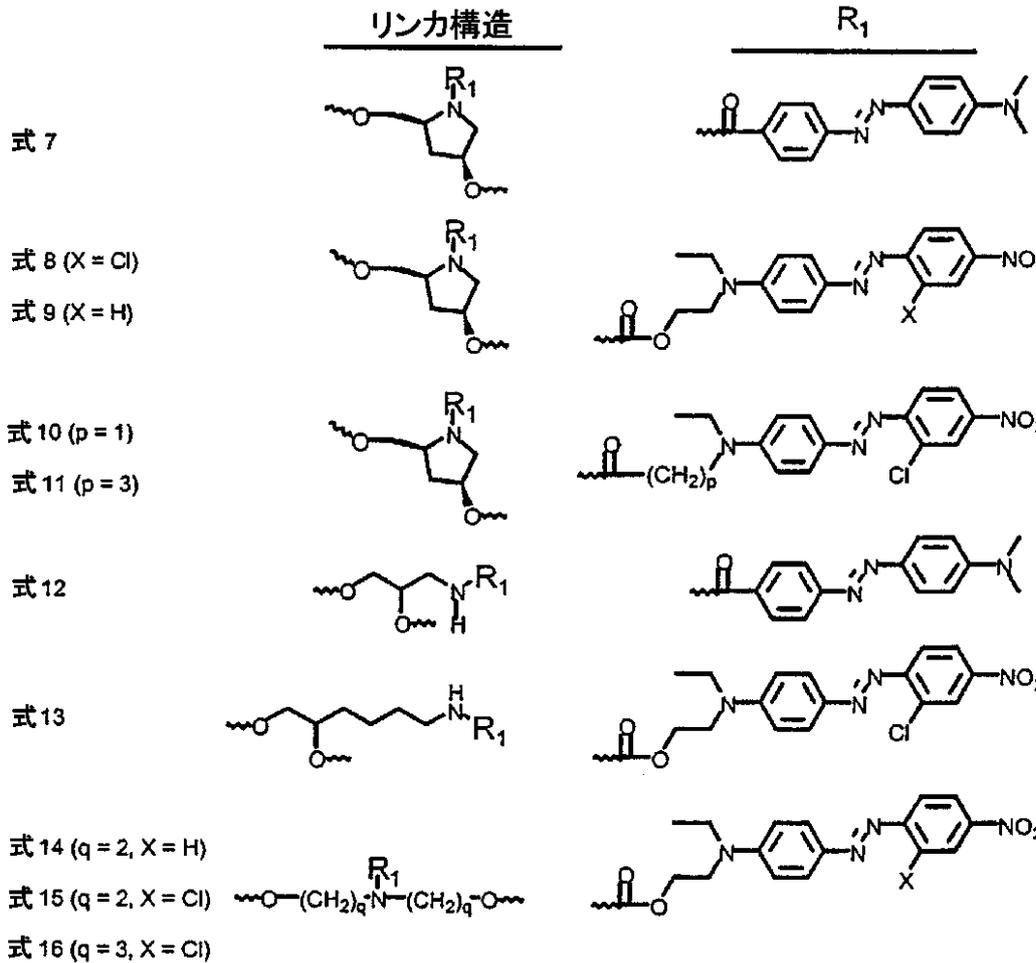
10

【0124】

【化72】



20



30

40

式7~16

【0125】

50

式 7 ~ 16 によって表わされる化合物に導入されたクエンチャは、本発明において、それぞれ、レッド 1 (Red 1)、レッド 13 (Red 13) 及びダブルシルとして示す、市販の 2 - [ 4 - ( 4 - ニトロフェニルアゾ ) - N - エチルフェニルアミノ ] エタノール ( ディスパーズ レッド 1 (Disperse Red 1) )、2 - [ 4 - ( 2 - クロロ - 4 - ニトロフェニルアゾ ) - N - エチルフェニルアミノ ] エタノール ( ディスパーズ レッド 13 (Disperse Red 13) ) 及び 2 - [ 4 - ( ジメチルアミノ ) フェニルアゾ ] 安息香酸、である。

【 0 1 2 6 】

レッド 13 及びダブルシルオリゴヌクレオチド接合体の UV 特性

図 2 は、ダブルシル (式 7、その他の点では非修飾の DNA プローブの 3' 末端に導入された場合は  $DP I_3$  無し) との比較で、レッド 13 発光団 (式 8、 $DP I_3$  無し) の吸収特性を図示している。レッド 13 発光団のより広範囲の吸収 (特に、長波長における) は、明らかな利点である。レッド 13 の  $\lambda_{max}$  が 522 nm であるのに対してダブルシルの  $\lambda_{max}$  が 479 nm であることに注目。レッド 13 の吸収は、フルオレセイン (発光最大 = 525 nm) の消光に理想的であるだけでなく、同時に、その他の一般的なレーザ染料の蛍光発光放射にオーバーラップしている。

【 0 1 2 7 】

種々のクエンチャ及びリンカを有する  $DP I_3$  プローブの消光特性

式 7 ~ 16 の 10 の蛍光発光プローブについて、各プローブの標準溶液の蛍光発光を、実験の部に記載されているように、ヘビ毒液ホスホジエステラーゼ (PDE) での消化の前と後とに、測定した。この PDE アッセイは、各プローブの消光特性を比較することを可能にする。消化されたプローブの蛍光発光 (信号) を初期蛍光発光 (ノイズ) で割ることによって、表 1 に示されている信号対ノイズ比 (S/N) が得られた。S/N の大きな数字は、インタクトプローブのより効果的な蛍光消光 (低い蛍光発光バックグラウンド) を表わす。

【 0 1 2 8 】

10

20

【表 1】

蛍光発光プローブに対する式7-16に図示の様々なクエンチャ及びリンカの作用

式 # (クエンチャ)	S/N <sup>a</sup> (R <sub>2</sub> =FAM)	S/N <sup>a</sup> (R <sub>2</sub> =TAMRA)
7(ダブルシル)	16	13
8(レッド13)	21	21
9(レッド1)	24	21
10(レッド13)	13	33
11(レッド13)	27	21
12(ダブルシル)	13	7
13(レッド13)	23	21
14(レッド1)	19	3
15(レッド13)	24	4
16(レッド13)	22	24

10

20

<sup>a</sup>信号対ノイズ(S/N)は、例13に記載のホスホジエステラーゼアッセイを使用して測定された。ODN配列は、5'-gagggatgtaaaaat(配列識別番号1(SEQ ID NO:1))であった。ここで調べたフルオロフォア(R<sub>2</sub>)は、6-カルボキシフルオレセイン(6-FAM)又は6-カルボキシテトラメチルローダミン(TAMRA)である。

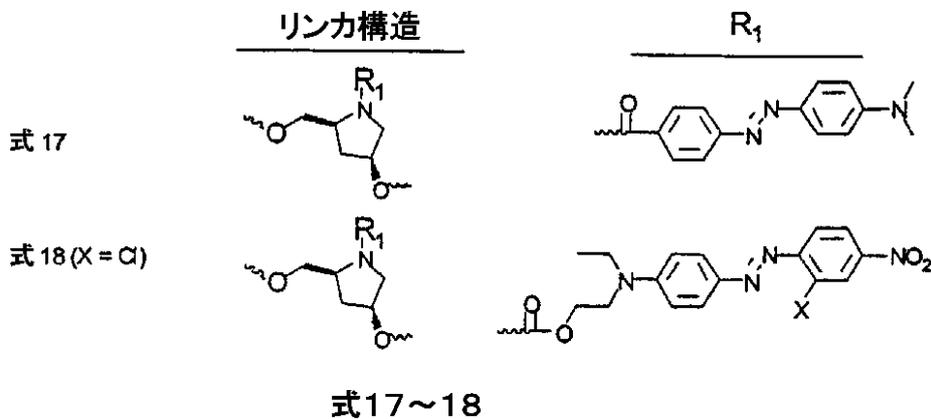
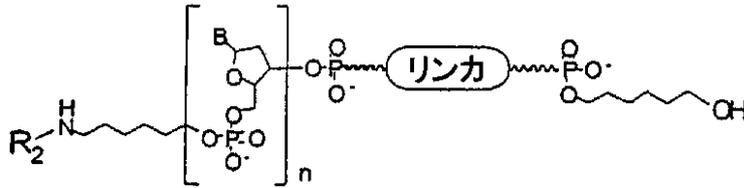
30

## 【0129】

表1のデータから、レッド13発光団と、それに密接に関連したレッド1発光団が、ダブルシルよりも、種々のリンカを伴うFAM及びTAMRAの両方に対して良好なクエンチャであることが明らかである。リンカは、レッド13発光団による消光に影響を与えない。例えば、式14及び式15は、FAMとは良好に作用したが、TAMRAでは消光効果が悪かった。ダブルシルが、特にTAMRAプローブに関して、非常に良好に作用したことは幾分意外である。後述するように、ダブルシルによる効果的なFRET消光は、MGBプローブの特定のケースである。

## 【0130】

## 【化 7 3】



10

20

## 【 0 1 3 1】

DPI<sub>3</sub>プローブとDPI<sub>3</sub>無しのプローブとの消光特性の比較

レッド13クエンチャ発光団の利点を更に示すために、3'-ヘキサノルブロック基(MGB無し)を備える蛍光発光プローブと比較した。同じ配列を有する13の蛍光発光プローブの構造と蛍光発光特性とを前記PEDアッセイを使用して比較した。この研究(表2)においては赤色感知検出器を使用し、表1に図示した研究においては青色感知検出器を使用した(検出器の違いによって、同じフルオロフォアに対する感度が異なる為、同じODNに対するS/Nは異なる)。次の構造上の変更を表2に要約する。プローブタイプ(MGB無し対MGB)、クエンチャ(ダブル対レッド13対レッド13アミド)、そしてレポータ染料(FAM対TAMRA)。

30

## 【 0 1 3 2】

[表 2]

種々のクエンチャ/フルオロフォアを備える  
オリゴヌクレオチドの蛍光発光特性<sup>1</sup>

式 #	プローブタイプ	クエンチャ	FAM (S/N)	TAMRA (S/N)
17	no-DPI <sub>3</sub>	ダブル	4.7	3.9
18	no-DPI <sub>3</sub>	レッド13	11.6	5.8
7	DPI <sub>3</sub>	ダブル	2.3	2.3.5
8	DPI <sub>3</sub>	レッド13	3.5	1.0.8
30 (R1=2-Cl、 t=v=3)	DPI <sub>3</sub>	レッド13 アミド	4.8	9.7

40

<sup>1</sup> 信号対ノイズ(S/N)は、上述したホスホジエステラーゼアッセイを使用して測定された。ODN配列は、5'-gagggatgtaaaaaat(配列識別番号1(SEQ ID NO:1))であった。ダブル又はレッド13クエンチャ(Q)の

50

リンカ構造は、それぞれ式 7 及び 8 に図示されている。レッド 13 アミドのリンカ構造は、反応スキーム 7 の 30 に図示され、ここで  $R_0$  は  $\text{NO}_2$ 、 $R_1 = 2\text{-Cl}$ 、 $R_2 = R_3 = R_4 = \text{H}$ ； $t = v = 3$  である。

【0133】

表 2 のデータから、 $\text{DPI}_3$  を含まないプローブにおいて、染料レッド 13 クエンチャは、FAM と TAMRA との両方においてダブルよりも良好に作用することが明白である。 $\text{DPI}_3$  含有プローブでは、染料レッド 13 は、TAMRA との組み合わせにおいてよりも、FAM との組み合わせで遥かに良好に作用する。8 と 30 とは共に、両方のフルオロフォアを含有する  $\text{DPI}_3$  含有プローブにおいてより良好に作用し、FAM の場合に最良の S/N 比を示す。従って、レッド 13 発光団は、長い波長の蛍光発光レポータ基に対してダブルよりもより効果的なクエンチャであるということが判った。大半の一般に使用されているフルオロフォア (FAM) に関して、S/N の 2.5 倍の増大が標準の ( $\text{DPI}_3$  無し) プローブで観察された。レッド 13 によるこの消光の改善は、図 2 に示すスペクトルのオーバーラップの増加と標準 FRET メカニズムとに一致している。 $\text{DPI}_3$  プローブに導入された時の、8 と 30 との両方の S/N の増大は、劇的であり驚異的である。レッド 13 クエンチャと  $\text{DPI}_3$  との組み合わせによって、と FAM 消光において 10 倍の S/N の増大と、TAMRA 消光において 2.8 倍の S/N の増大が得られた。

10

【0134】

$\text{DPI}_3$  残基がダブル及びレッド 13 発光団による蛍光消光を改善することは驚くべきことである。理論によって限定されることは望むものではないが、現時点においては、溶液中の蛍光発光プローブのランダムコイル形状が、 $\text{DPI}_3$  プローブ中において、フルオロフォアとクエンチャとの間の平均距離が MGB 無しのプローブにおいてよりも近くなるようにより構造化されるものと推定されている。この  $\text{DPI}_3$  プローブ中における平均距離の短縮 (よりタイトなコイル) によって、FRET がより効率的になるのであろう。この相互作用の性質は正確には判っていないが、クエンチャと染料発光団の UV スペクトルは  $\text{DPI}_3$  によって影響されない。これは、UV スペクトルが規制形状 (衝突消光) によって変化する蛍光発光ヘアピンプローブと対照的である。

20

【0135】

「リアルタイム」PCR アッセイにおける蛍光発光  $\text{DPI}_3$  プローブの性能 5'-フルオレセインとレッド 13 アミドリンカとを備えて作成された  $\text{DPI}_3$  プローブを、そのハイブリダイゼーション特性がリンカシステムと適合可能であるか否かを調べるために 5'-ヌクレアーゼアッセイにおいてテストした。図 3 に図示されているように、ダブルとレッド 13 との両方が、MGB プローブに使用された時に、5'-ヌクレアーゼアッセイにおいてフルオレセインに対するクエンチャとして作用した。レッド 13 は、初期蛍光発光 (バックグラウンド) が低いことと PCR 後のプラトーが高いことによって示されているように、ダブルよりも性能がよかった。現在市販されているサーマル-サイクル蛍光計では、リアルタイム PCR においてより長い波長は読み取ることはできないが、レッド 13 は、PCR 後のエンドポイントでの TAMRA 含有プローブと良好な S/N 比を提供することが示された。

30

【0136】

別の一般方法によれば、本発明の 5'-フルオロフォア-ODN-Q-MGB 接合体は、直接的ハイブリダイゼーションによって DNA 標的を検出するように構成されたアッセイにおいて性能を改善した。この方法の基本的説明は、ここに参考文献として合体させる米国特許第 5,876,930 号に見られる。このアッセイ方式において、非ハイブリダイズプローブ (FRET によって消光) が、リジッドな二本鎖構造を形成することによって蛍光発光性となり、これによって、クエンチャとフルオロフォアとを分離させる。

40

【0137】

レッド 13 発光団は広い範囲の蛍光発光レポータ基を消光する

消光の有効範囲を調べるために、複数種の蛍光発光レポータ基と、レッド 13 アミドを備える一連の  $\text{DPI}_3$  プローブを作成した。プローブを、通常通り PDE によって消化し

50

たところ、458 - 665 nmで発光する染料に対して良好なS/Nを示した。

【0138】

[表3]

種々のフルオロフォアを有する蛍光発生DPI<sub>3</sub>プローブの性能

フルオロフォア (FL)	Exc (nm)	Em (nm)	S/N
クマリン	378	458	32
FAM	488	522	63
Cy3	541	565	61
TAMRA	547	582	37
レゾルフィン	549	595	110
Cy5	641	665	36

10

蛍光発光プローブの構造は、FL-ODN-Q-CDPI<sub>3</sub>であり、ここで、Qはレッド13アミド、そしてODN配列は5'-GTCCTGATTTTA C(配列識別番号2(SEQ ID NO:2))であった。フルオロフォアであるFAM、TAMRA、Cy3及びCy5は、市販のホスホルアミダイト試薬を使用して導入された。クマリンとレゾルフィンフルオロフォアは、後述するように作成されたホスホルアミダイト34及び37を使用して導入された。

【0139】

20

蛍光発光放出は、図4のオーバーレイスペクトルに図示されているように、FAMから十分に分離されている。表3に図示されているように、レゾルフィン蛍光発光も、レッド13発光団によって消光される。このように、レゾルフィンホスホルアミダイトは、FRETプローブでの使用、及び、多色分析用のFAMとの組み合わせの使用において非常に優れた特性を有している。

【0140】

表3に図示されているように、クマリン蛍光発光は、レッド13発光団によっても消光される。従って、クマリンホスホルアミダイト試薬をFRETプローブに、特に、多色分析用にFAMと組み合わせて、導入することができる。

【0141】

30

FRET式酵素基質

前記改良式クエンチャ分子は、その他のFRET式アッセイシステムに使用することができる。本発明の別の一般的用途によれば、クエンチャ分子と、フルオロフォアとが、酵素基質に付着され、この基質は、このQ-基質-フルオロフォア接合体に対するその触媒作用によって、前記Qとフルオロフォア分子を開裂し分離する。例えば、反応スキーム3に図示されているペンタフルオロフェニル活性化エステル11は、タンパク質分解酵素の研究のために、ペプチドのリジン残基の標識化に使用することができる。

【0142】

実験手順

一般的実験

40

すべての空気及び水感応性反応は、僅かに正圧のアルゴン下で行われた。無水溶剤は、Aldrich (Milwaukee, WI)から入手した。フラッシュクロマトグラフィを230 - 400メッシュのシリカゲル上で行った。融点は、開放細管中でMel-Temp融点装置で測定し、補正しなかった。元素分析を、Quantitative Technologies Inc. (Boundbrook, NJ)によって行った。UV可視吸収スペクトルを、200 - 400 nmの帯域で、UV-2100 (Shimadzu)又はLambda 2 (Perkin Elmer)分光計によって記録した。<sup>1</sup>H NMRスペクトルを、Bruker WP-200又はVarian XL-200分光計上で20 ECで実行した。化学シフトは、Me<sub>4</sub>Siからダウンフィールドへppmで報告する。薄層クロマトグラフィを、シリカゲル60F-254 (EM Regents)アルミニウムバックのプレート上で実行した。

50

## 【0143】

## 例 1

2 - ( { 4 - [ ( 2 - クロロ - 4 - ニトロフェニル ) ジアゼニル ] フェニル } エチルアミノ ) エチル ( 2 S、4 R ) - 2 - { [ ビス ( 4 - メトキシフェニル ) フェニルメトキシ ] メチル } - 4 - { [ ビス ( メチルエチル ) アミノ ] ( 2 - シアノ - エトキシ ) ホスフィノオキシ } ピロリジンカルボキシレート ( 5 )。

2 - ( { 4 - [ ( 2 - クロロ - 4 - ニトロフェニル ) ジアゼニル ] フェニル } エチルアミノ ) エチル ( 5 S、3 R ) - 3 - ヒドロキシ - 5 - ( ヒドロキシメチル ) ピロリジンカルボキシレート ( 3 )。

90 ml の無水ピリミジン中の、2 - [ 4 - ( 2 - クロロ - 4 - ニトロフェニルアゾ ) - N - エチルフェニルアミノ ] エタノール (Disperse Red 13, Aldrich Chemical Co., 9.0 g, 28.80mmol) の溶液と 4 - ニトロフェニル クロロフォルメート (Aldrich Chemical Co., 9.4 g, 46.61 mmol) を、70 で 40 分間攪拌し、中間体 2 を得た。前記反応溶液に対してエタノール ( 5 . 0 ml ) を添加し、その後、トランス - ヒドロキシプロリノール (リード (Reed) 等、Bioog. Chem. 2: 217-225(1991) (エタノール中の 0 . 5 M 溶液 42 ml ) とトリエチルアミン ( 3 . 2 ml ) とを添加した。その結果得られた溶液を 30 分間 70 で攪拌した。その溶液を乾燥状態まで蒸発させ、その残渣を 1 リットルの水中に懸濁させ、エチルアセテート ( 3 x 500 ml ) によって抽出した。プールされた抽出物を硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過し、蒸発させた。その残渣を、エチルアセテート中における 0 ~ 10 % メタノールのグラジエント溶出によるシリカゲルクロマトグラフィによって精製した。その精製生成物フラクションを、蒸発させ、エチルアセテートエーテルから析出させた：9 . 2 g ( 59 % ) ; TLC (エチルアセテート)、 $R_f = 0 . 25$ 。 $^1\text{H NMR}$  (DMSO -  $d_6$ ) 8 . 43 ( 1 H、d、 $j = 2 . 5 \text{ Hz}$  )、8 . 25 ( 1 H、dd、 $j = 9 . 0$  及び  $2 . 4 \text{ Hz}$  )、7 . 86 ( 2 H、d、 $j = 9 . 1 \text{ Hz}$  )、7 . 78 ( 1 H、d、 $j = 9 . 0 \text{ Hz}$  )、6 . 96 ( 2 H、d、 $j = 9 . 3 \text{ Hz}$  )、4 . 88 ( 1 H、m )、4 . 67 ( 1 H、t、 $j = 5 . 7 \text{ Hz}$  )、4 . 19 ( 3 H、m )、3 . 80 ( 1 H、m )、3 . 73 ( 2 H、t、 $J = 5 . 4 \text{ Hz}$  )、3 . 56 ( 2 H、q )、3 . 46 ( 1 H、t、 $J = 4 . 7 \text{ Hz}$  )、3 . 27 ( 1 H、m )、1 . 94 ( 1 H、m )、1 . 79 ( 1 H、m )、1 . 17 ( 3 H、t、 $J = 6 . 8 \text{ Hz}$  )。分析、計算  $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{ClN}_5\text{O}_6 + 0 . 2 \text{ H}_2\text{O}$  : C、53 . 32 ; H、5 . 37 ; N、14 . 13。結果：C、53 . 24、H、5 . 25 ; N、13 . 99。

## 【0144】

2 - ( { 4 - [ ( 2 - クロロ - 4 - ニトロフェニル ) ジアゼニル ] フェニル } エチルアミノ ) エチル ( 5 S、3 R ) - 5 - { [ ビス ( 4 - メトキシフェニル ) フェニルメトキシ ] メチル } - 3 - ヒドロキシピロリジンカルボキシレート ( 4 )。

130 ml の無水ピリミジン中の 3 ( 9 . 1 g、18 . 53 mmol ) の溶液に対して、6 . 26 g の塩化ジメトキシトリチルを添加した。この溶液を室温で 3 時間攪拌し、次に、300 ml の 5 % 重炭酸ナトリウム溶液に注いだ。この混合物を、エチルアセテート ( 2 x 300 ml ) で抽出し、その組み合わせられた抽出物を、硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過し、蒸発させた。その残渣を、エチルアセテート中の 20 ~ 0 % ヘキサン・グラジエント、その後、0 ~ 2 % のメタノール・グラジエント溶出でシリカゲルクロマトグラフィによって精製した。このクロマトグラフィ溶離液も、1 % のトリエチルアミンを含有していた。前記精製生成物フラクションを組み合わせ、アモルファス固体 ( amorphous solid ) を得た：12 . 66 g ( 86 % ) ; TLC (エチルアセテート)、 $R_f = 0 . 44$ 。 $^1\text{H NMR}$  (DMSO -  $d_6$ ) 8 . 45 ( 1 H、s )、8 . 26 ( 1 H、d、 $J = 8 . 9 \text{ Hz}$  )、7 . 82 ( 3 H、m )、7 . 27 ( 4 H、m )、7 . 16 ( 5 H、m )、6 . 95 - 6 . 79 ( 6 H、m )、4 . 95 ( 1 H、m )、4 . 32 ( 1 H、m )、4 . 14 ( 1 H、m )、3 . 99 ( 2 H、m )、3 . 73 ( 1 H、m )、3 . 69 ( 6 H、m )、3 . 56 ( 1 H、m )、3 . 40 - 3 . 30 ( 2 H、m )、3 . 14 ( 1 H、m )、2 . 10 - 1 . 82 ( 2 H、m )、1 . 16 ( 3 H、m )、1 . 06 ( 3

10

20

30

40

50

H、t、J = 6.5 Hz)。分析、計算  $C_{43}H_{44}ClN_5O_8 + 0.2H_2O$  : C、64.73 ; H、5.61 ; N、8.78。結果 : C、65.08、H、5.70 ; N、8.31。

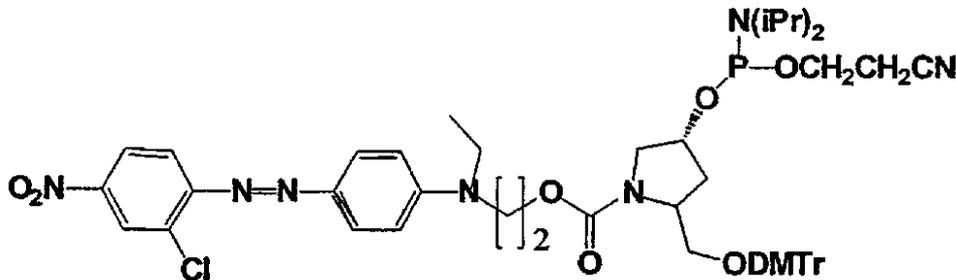
【0145】

2 - ( { 4 - [ ( 2 - クロロ - 4 - ニトロフェニル ) ジアゼニル ] フェニル } エチルアミノ ) エチル ( 2S、4R ) - 2 - { [ ビス ( 4 - メトキシフェニル ) フェニルメトキシ ] メチル } - 4 - { [ ビス ( メチルエチル ) アミノ ] ( 2 - シアノ - エトキシ ) ホスフィノオキシ } ピロリジンカルボキシレート ( 5 )。

【0146】

【化74】

10



5

20

【0147】

8.0 ml の N、N - ジイソプロピルエチルアミンを含有した 440 ml の無水塩化メチレン中に溶解した 4 ( 12.63 g、15.19 mmol ) の溶液に、5.94 ml の 2 - シアノエチルジイソプロピルクロロホスホルアミダイトを添加した。この溶液をアルゴン下で室温で 30 分間攪拌した。その反応混合物を 10 ml のメタノールで処理し、400 ml の 5 % 重炭酸ナトリウム溶液に注入した。有機相を硫酸ナトリウム上で乾燥させ、蒸発させた。その残渣を、エチルアセテート ( 2 % トリエチルアミン ) 中の 40 - 20 % ヘキサン・グラジエント溶出でシリカゲルクロマトグラフィによって精製した。精製生成物フラクションを、蒸発させてアモルファス固体を得た : 14.75 g ( 93 % 収量 )。 $^{31}P$  NMR ( DMSO -  $d_6$  ) 146.93 ( 一重項 )。分析、計算  $C_{52}H_{61}ClN_7O_9 + 1.0H_2O$  : C、61.68 ; H、6.27 ; N、9.68。結果 : C、61.44、H、6.47 ; N、9.35。

30

【0148】

例 2

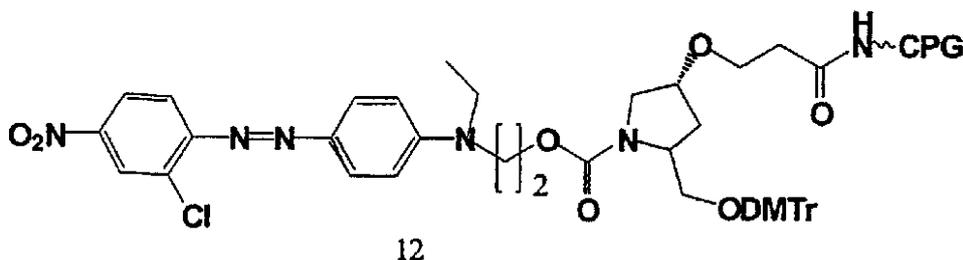
レッド 13 - ピロリジン - DMTr - CPG 12

ペンタフルオロフェニルエステル ( 11 ) とレッド 13 \_\_ピロリジン\_\_DMTr CPG ( 12 ) の合成 反応スキーム 3。

【0149】

【化75】

40



12

【0150】

ペンタフルオロフェニルエステル ( 11 ) を、例 4 と反応スキーム 5 に記載した、化合

50

物 2 2 の合成に使用したのと同じ方法によって合成する。

【 0 1 5 1 】

レッド 1 3 - ピロリジン - D M T r - C P G ( 1 2 )

1 0 g の L C A A \_ \_ C P G を、5 m l の D M F 中の 1 1 の 0 . 3 M 溶液と合せて、緩やかに一晚攪拌し、その時、それを濾過し、2 x 1 0 0 m l の D M F、2 x 1 0 0 m l のアセトニトリル、及び 2 x 1 0 0 m l のエーテルで洗浄した。微量のエーテルを真空除去した(オイルポンプ)。未反応アミノ基を、前記 C P G を 4 0 m l の乾燥ピリミジンと 5 m l の無水酢酸とによって処理することによってアセチル化した。1 . 5 時間の渦流 ( s w i r l i n g ) 後、C P G を濾過し、2 x 1 0 0 m l の D M F、2 x 1 0 0 m l のアセトニトリル、及び 2 x 1 0 0 m l のエーテルで洗浄した。微量のエーテルを真空除去した(オイルポンプ)。2 5 m l の 1 : 1 / 7 0 % 過塩素酸 : メタノール中で 3 \_ \_ 5 m g の C P G を処理することによって、前記 C P G の M M T ロードイングを、分析した。放出された M M T 陽イオンの吸収を 4 7 2 n m で記録し、ロードingleベルを、下記の等式を使用して 3 0 \_ \_ 4 0 m m o l / g の C P G に調節した。

M M T ロードイング ( m m o l / g ) = A 4 7 2 x 体積 ( m l ) x 1 4 . 3、C P G ( m g ) の w t

【 0 1 5 2 】

例 3

2 - ( 4 - ニトロフェニル ) エチル 3 - ( ピロロ [ 4、5 - e ] インドリン - 7 - イルカルボニル ) ピロロ [ 4、5 - e ] インドリン - 7 - カルボキシレート ( 1 7 )。(反応スキーム 4)

2 - ( 4 - ニトロフェニル ) エチル 3 - [ ( t e r t - ブチル ) オキシカルボニル ] ピロロ [ 4、5 - e ] インドリン - 7 - カルボキシレート ( 1 4 )。

1 0 グラム ( 3 3 . 1 m m o l ) の十分乾燥した 3 - [ ( t e r t - ブチル ) オキシカルボニル ] ピロロ [ 3、2 - e ] インドリン - 7 - カルボキシル酸 (ボジャー (Boger), D. L., コールマン (Coleman), R.S. インベルゴ (Invergo), B. J. (1987) J. Org. Chem. 52, 1521) をアルゴンを充填したフラスコに入れ、8 4 m l の T H F と 1 0 . 4 m l ( 6 6 . 2 m m o l ) のジエチルアゾカルボキシレート ( D E A D ) を添加する。次に、滴下漏斗をフラスコ (アルゴンでフラッシング) の上に載せ、ウォーターバス (フラスコを冷却するため) をその下に置く。1 6 0 m l のエチルエーテル中の、1 7 . 3 g ( 6 6 m m o l ) のトリフェニルホスフィンと 6 . 6 4 g ( 3 9 . 7 m m o l ) の 2 - ( p - ニトロフェニル ) エタノールの溶液を作る。この溶液を前記滴下漏斗に加え、その後、攪拌しながら、前記反応フラスコに滴下によって加える。反応を 1 時間進行させ、その時、反応が完全であるか否かを調べるために U V ( 2 5 4 n m ) によって調べる T L C 分析 ( 2 : 1 ヘキサン / 酢酸エチル ) を行う。もしも反応が完全であれば、その場合、ベースラインスポット (帯青) が消え、0 . 5 5 の R<sub>f</sub> で、生成物が暗色スポットとして現れる。多くの場合、特に反応物が完全に乾燥していない場合には、トリフェニルホスフィンと D E A D との追加ポーションが必要である。その場合には、通常、元の量の 1 / 1 0、即ち、1 . 7 3 g のトリフェニルホスフィンと 1 . 0 4 m l の D E A D で十分である。これらは、攪拌溶液に対してニート ( n e a t ) に添加することができる。更に 1 時間反応させ、その後、もう一回の T L C 分析によって通常、完全な反応が示される。生成物は、通常、一部が沈殿し、これを濾過によって収集し、メタノールで洗浄し、次に、最小量 (通常は 8 0 - 1 0 0 m l ) の温アセトン中に溶解させ、その 4 倍の量の温メタノールを添加することによって再結晶化させる。数時間、恐らく一晚で 4 まで冷却させる。もとの沈殿物の上澄みを取り、シロップ状態又は乾燥状態まで蒸発させる。これも、最小量の温アセトン、通常は約 1 0 0 - 1 2 0 m l の温アセトン、中で溶解させる。これら二回の再結晶化に使用されるアセトンの総量は、通常約 2 0 0 m l である。前と同様に、アセトンの量の 4 倍に等しい量の温メタノールを添加する。溶液を冷却すると、ほとんど即座に結晶化

10

20

30

40

50

が始まるが、これを数時間乃至一晚継続させる。再結晶化は極めて効率的であるが、前記反応上澄みからの生成物は、通常、十分に精製されていないので、再結晶化によって精製する。その収率は、約85%である。(mp 191 - 193) <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) 11.83 (s, 1H)、8.18 (d, J = 8.5 Hz, 2H)、7.84 (br s, 1H)、7.64 (d, J = 8.5 Hz, 2H)、7.25 (d, J = 8.3 Hz)、6.96 (s, 1H)、4.56 (t, J = 6 Hz, 2H)、4.00 (t, J = 8.8 Hz, 2H)、3.21 (m, 4H)、1.51 (s, 9H)。燃焼分析：結果：C、63.16%；H、5.56%；N、9.45%。計算0.4モル添加水：C、62.8%；H、5.7%；N、9.16%。

【0153】

2-(4-ニトロフェニル)エチル ピロロ[4,5-e]インドリン-7-カルボキシレート(15)。

2グラム(4.43 mmol)の14を、丸底フラスコ中に量って入れる。次に、換気フード内で、25 mL(325 mmol)のトリフルオロ酢酸を添加し、フラスコをキャップし、攪拌する。固体は約1分間で溶解する。この混合物を1時間攪拌し、その時、脱保護が行われる(HPLCをチェックとして使用することができる)。前記酸を、ロータリ・エバポレータ(トラップを使用)で蒸発させ、その生成物を、100 mLの塩化メチレン中に溶解させる。これを、100 mLの1/2乃至2/3飽和重炭酸ナトリウム溶液で2回抽出する。水性相を、~50 mLの塩化メチレンで一度逆抽出し、これを残りとは合せる。有機層を硫酸ナトリウム上で二回乾燥させ、蒸発させて茶色の固体を得る。所望の場合は、この物質を、塩化エチレン中に非常に濃縮された溶液として希釈し、メタノールによる冷却とによって再結晶化することができる。100%に近い収率が通常得られる。

mp 192 - 194。 <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) 11.51 (s, 1H)、8.18 (d, J = 8.5 Hz, 2H)、7.63 (d, J = 8.5 Hz, 2H)、7.11 (d, J = 8.5 Hz, 1H)、6.80 (s, 1H)、6.70 (d, J = 8.5 Hz)、5.03 (br s, 1H)、4.54 (t, J = 6.4 Hz, 2H)、3.46 (t, J = 8.6 Hz, 2H)、3.19 (m, 2H)、3.04 (t, J = 8.6 Hz, 2H)。燃焼分析：計算C<sub>19</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>；C、64.94%；H、4.88%；N、11.96%。結果：C、65.50%；H、4.70%；N、11.64%。

【0154】

2-(4-ニトロフェニル)エチル 3-( { 3-[ (tert-ブチル)オキシカルボニル]ピロロ[4,5-e]インドリン-7-イル } カルボニル)ピロロ[4,5-e]インドリン-7-カルボキシレート(16)。

3.09グラム(8.8 mmol)の15を、2.66グラム(8.8 mmol)の13(ボジャー(Boger), D. L. Coleman(コールマン), R. S. (インベルゴ) Invergo, B. J. (1987) J. Org. Chem. 52, 1521)と混合し、46 mLのDMFを添加する。次に、3.85グラム(8.77 mmol)の1-[3-(ジメチルアミノ)プロピル]-3-エチルカルボジイミド塩酸塩を添加する。この混合物を約3時間攪拌する。混合物は最初は均質であるが、攪拌が進むにつれて、生成物の沈殿物が形成される。前記溶媒DMFを高真空下で蒸発させ、約100 mLのメタノールを添加する。混合物を渦流し、焼結ガラス漏斗で濾過し、次に、3 X 50 mLポーションのメタノールで完全に洗浄する。次に、それを真空乾燥させる。100%に近い収率が通常得られる。mp 132 E - 134。 <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) \* : 11.93 (s, NH, 1H)、11.62 (s, NH, 1H)、8.30 (br s, 芳香族陽子, 1H)、8.27 (br s, 芳香族陽子, 1H)、8.19 (d, 芳香族陽子, J = 8.3 Hz, 2H)、7.65 (d, 芳香族陽子, J = 8.3 Hz, 2H)、7.34 (d, J = 9 Hz, 芳香族陽子, 1H)、7.29 (d, J = 9 Hz, 芳香族陽子, 1H)、7.07 (s, 芳香族陽子, 1H)、6.98 (s, 芳香族陽子, 1H)、4.60 (m, 脂肪族陽子, 4H)、4.02 (t, J = 8.5 Hz, 脂肪族陽子, 2H)、3.40 (t, J = 8 Hz, 脂肪族陽子, 2H)、3.24 (m, 脂肪族陽子, 4H)、1.52 (s, 3 x CH<sub>3</sub>, 9H)。燃焼

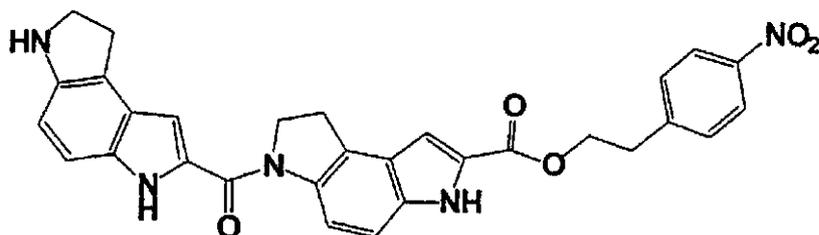
分析：計算：C、66.13%；H、5.23%；N、11.02%。結果：C、65.94%、H、5.19%；N、11.07%。

【0155】

2 - (4 - ニトロフェニル) エチル 3 - (ピロロ[4,5-e]インドリン - 7 - イルカルボニル) ピロロ[4,5-e]インドリン - 7 - カルボキシレート (17)

【0156】

【化76】



17

10

【0157】

5グラムの16をフラスコに入れる。100 mLのトリフルオロ酢酸を添加し、混合物を攪拌する。1時間後、酸をロータリ・エボレータで蒸発させ、100 mLの飽和重炭酸ナトリウム溶液と100 mLの水を添加する。この混合物を~1/2時間、攪拌又は超音波処理し、次に濾過し、水と、その後エタノールとで洗浄し、真空乾燥させる。この物質は再結晶化することができる。それを、最小量の温DMF中に溶解させ、次に、約3倍のポーションのエタノールを添加し、その溶液を2-3分間超音波処理する。クリーム色~茶色の物質が結晶析出される。これを、メタノールで洗浄し、真空乾燥させる。その収率は理論値に近づく。<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) 11.96 (s、NH、1H)、11.71 (s、NH、1H)、8.30 (br s、芳香族陽子、1H)、8.27 (br s、芳香族陽子、1H)、8.19 (d、芳香族陽子、J = 8.5 Hz、2H)、7.66 (d、芳香族陽子、J = 8.3 Hz、2H)、7.34 (m、芳香族陽子、2H)、7.08 (s、芳香族陽子、1H)、7.03 (s、芳香族陽子、1H)、4.60 (m、脂肪族陽子、4H)、3.68 (t、J = 8 Hz、脂肪族陽子、2H)、3.40 (t、J = 8 Hz、脂肪族陽子、2H)、3.24 (m、脂肪族陽子、4H)。燃焼分析：結果：C、63.55%、H、4.42%；N、11.95%。計算、1/2モルの重炭酸ナトリウム混入：C、63.43%；H、4.45%；N、12.13%。

20

30

【0158】

例4

2、3、4、5、6 - ペンタフルオロフェニル 3 - [4 - ( { 3 - [ビス(4 - メトキシフェニル)フェニルメトキシ]プロピル} { 4 - [ (2 - クロロ - 4 - ニトロフェニル)ジアゼニル]フェニル} アミノ)ブタノイル]ピロロ[4,5-e]インドリン - 7 - カルボキシレート (24) (反応スキーム5)

40

エチル 4 - [ (3 - ヒドロキシプロピル)フェニルアミノ]ブタノエート (19)

3 - (フェニルアミノ)プロパン - 1 - オール(フアン・ヤンデ (Huang, Yande); アリフ・アッタ M. (Arif, Atta M.); ベントルード・ウェスレイ G. (Bentrude, Weseley G.); J. Org. Chem.; 58 (23) 1993; 6235-6246) (65.6 g、0.43 mol)、エチル 4 - プロモブチレート (104.5 g、0.54 mol) と 100 mL のエチルジイソプロピルアミンとの混合物を、100 で1時間攪拌する。反応物を室温まで冷却し、水400 mLとエチルアセテート(500 mL)との間で分ける。有機層を、飽和NaHCO<sub>3</sub>、塩水(brine)で洗浄し、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>上で乾燥させる。濃縮後に得られるオイルを、シリカ上でクロマトグラフィにかけ、10% EtOH / CHCl<sub>3</sub>によって溶出する。適当なフラクションの濃縮によって、無色、粘性オイルとして115 g (1

50

00%)の所望の生成物が得られる。 $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) 7.23 (m、2H)、6.72 (m、3H)、4.14 (q、 $J = 7\text{ Hz}$ 、2H)、3.72 (t、 $J = 6\text{ Hz}$ 、2H)、3.43 (t、 $7\text{ Hz}$ 、2H)、3.34 (t、 $7\text{ Hz}$ 、2H)、2.35 (t、 $7\text{ Hz}$ )、1.88 (m、4H)、1.26 (t、 $7\text{ Hz}$ 、3H)。

## 【0159】

エチル4-({4-[(2-クロロ-4-ニトロフェニル)ジアゼニル]フェニル}(3-ヒドロキシプロピル)アミノ)ブタノエート(20)

2-クロロ-4-ニトロアニリン2.5g(10mmol)を、125mLのフラスコに入れ、6mLの水を添加する。攪拌と超音波処理とによって、黄色のクロロニトロアミンの一部が溶解する。次に、この攪拌溶液を換気フード内で氷によって冷却し、15.8mLの濃縮(~12M)HClを添加する。前記黄色物質の大半がこの時点で溶解する。前記フラスコに、滴下漏斗を取り付け、3-4mLの水中の1.51g(21.9mmol)の亜硝酸ナトリウムの溶液を前記滴下漏斗に添加し、約20分間に亘って攪拌しながら、フラスコ内の溶液にゆっくりと添加する。これが完了すると、0.6g(~21mmol)の尿素、その後、8.2mL酢酸中の溶液としての2.73gのエチル4-[(3-ヒドロキシプロピル)フェニルアミノ]ブタノエートを添加する。1分後、~50mLの水中の酢酸ナトリウムを添加する。この混合物を室温で1時間攪拌させる。生成物の大半は、エマルジョンとして分離する。この混合物を、酢酸エチルと水との間に分ける。有機層を $\text{NaHCO}_3$ (3x50ml)、塩水(brine)で洗浄し、無水硫酸ナトリウム上で乾燥させる。次に、有機溶媒を、シロップ状態まで蒸発させる。粗生成物を、シリカゲル(1.5x20インチ)上でクロマトグラフィにかけ、50%酢酸エチル/ヘキサンで溶出する。適当なフラクションを収集し、組み合わせ、蒸発させ(30-40度)、そして真空乾燥させる。その生成物は暗色のオイルである。収率は約68-70%である。 $^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ ) 8.42 (d、 $J = 2.5\text{ Hz}$ 、芳香族陽子、1H)、8.24 (dd、 $J_1 = 9\text{ Hz}$ 、 $J_2 = 2.5\text{ Hz}$ 、芳香族陽子、1H)、7.86 (d、 $J = 9\text{ Hz}$ 、2H)、7.77 (d、 $J = 9\text{ Hz}$ 、1H)、6.92 (d、 $J = 9\text{ Hz}$ 、芳香族陽子、2H)、4.67 (t、 $J = 6\text{ Hz}$ 、OH、1H)、4.07 (q、 $J = 7\text{ Hz}$ 、 $\text{CH}_2\text{O}$ 、2H)、3.5 (m、脂肪族陽子、6H)、2.40 (t、 $J = 7\text{ Hz}$ 、脂肪族陽子、2H)、1.84 (m、脂肪族陽子、2H)、1.72 (m、脂肪族陽子、2H)、1.18 (t、 $J = 7\text{ Hz}$ 、 $\text{CH}_3$ 、3H)。

## 【0160】

4-({4-[(2-クロロ-4-ニトロフェニル)ジアゼニル]フェニル}(3-ヒドロキシプロピル)アミノ)ブタン酸。

40mLのTHF中の20(4.48g、10mmol)の攪拌溶液に、40mLのエタノールを添加し、その後、20mLの水中のKOH(0.84g、15mmol)と20mLのエタノールの溶液を添加する。その混合物を一晩攪拌し、濃縮する。その残渣を、125mLの水中に懸濁させ、2.6mL(~3eqv.)の酢酸で処理し、4まで冷却する。その結果得られる固体を濾過し、水で洗い、乾燥させる。収率は定量である。

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ ) 8.42 (d、 $J = 2.5\text{ Hz}$ 、芳香族陽子、1H)、8.23 (dd、 $J_1 = 9\text{ Hz}$ 、 $J_2 = 2.5\text{ Hz}$ 、芳香族陽子、1H)、7.82 (d、 $J = 9\text{ Hz}$ 、2H)、7.90 (d、 $J = 9\text{ Hz}$ 、1H)、7.03 (d、 $J = 9\text{ Hz}$ 、芳香族陽子、1H)、4.8 (br s、OH、1H)、3.5 (m、脂肪族陽子、6H)、1.86 (t、 $J = 6\text{ Hz}$ 、脂肪族陽子、2H)、1.72 (m、脂肪族陽子、4H)。

## 【0161】

4-({3-[ビス(4-メトキシフェニル)フェニルメトキシ]プロピル}{4-[(2-クロロ-4-ニトロフェニル)ジアゼニル]フェニル}アミノ)ブタン酸(21)

前の工程からの4.21g(10mmol)の酸を、250mLの丸底フラスコに入れる。乾燥ピリジン(50-100ml)を添加し、ロータリ・エバポレータで蒸発させる(30-40度)。このプロセスを1回~2回繰返して、全ての水を除去する。前記フラ

スコの中身に乾燥ピリジン (80 ml) を添加する。次に、4.07 g (12 mmol) の塩化ジメトキシトリチルを添加する。1時間攪拌後、ピリジンを蒸発させ、その結果得られるシロップを数ミリリットルの18:1:1塩化メチレン/メタノール/トリエチルアミン中で溶解させる。18:1:1塩化メチレン/メタノール/トリエチルアミンの溶出液でシリカゲルカラム (~1.5" x 20") を準備し、生成物をカラムに通し、適切なフラクションを収集して合せる。溶媒が蒸発によって除去された後、その結果得られるアモルファス固体は、所望の生成物の他に、いくらかのトリエチルアンモニウム塩を含んでいる。不純度は、次の工程に干渉しないので、その生成物を追加の精製無しで使用する。

【0162】

2、3、4、5、6 - ペンタフルオロフェニル 4 - ( { 3 - [ ビス ( 4 - メトキシフェニル ) フェニルメトキシ ] - プロピル } { 4 - [ ( 2 - クロロ - 4 - ニトロフェニル ) ジアゼニル ] フェニル } アミノ ) ブタノエート ( 22 ) 。

21 ( 10 mmol ) を含むフラスコに、7 mL のトリエチルアミンを添加し、その後、100 mL の塩化メチレンを添加し、その後、2.05 mL のペンタフルオロフェニルトリフルオロアセテート ( PFP - TFA ) を添加する。この溶液を半時間攪拌する。この時の最後に、反応は通常完了している ( TLC : 2 : 1 ヘキサン / 酢酸エチル ) 。溶媒をロータリ・エバポレータで除去し、シロップを得て、これをシリカ上でクロマトグラフィにかけて 1 : 3 酢酸エチル / ヘキサンで溶出する。適当なフラクションを収集し、合せ、蒸発させ、真空乾燥させる。収率は 41 % である。<sup>1</sup>H NMR ( DMSO - d<sub>6</sub> ) 8.43 ( d、J = 2.5 Hz、芳香族陽子、1 H )、8.24 ( dd、J<sub>1</sub> = 9 Hz、J<sub>2</sub> = 2.5 Hz、芳香族陽子、1 H )、7.83 ( d、J = 9 Hz、芳香族陽子、1 H )、7.78 ( d、J = 9 Hz、芳香族陽子、1 H )、7.42 - 7.15 ( m、芳香族陽子、10 H )、7.07 ( m、芳香族陽子、2 H )、7.00 - 6.80 ( m、芳香族陽子、4 H )、3.72 ( s、2 x CH<sub>3</sub>、6 H )、3.56 ( m、脂肪族陽子、2 H )、3.48 ( t、J = 6.3 Hz、脂肪族陽子、2 H )、3.08 ( t、J = 5 Hz、脂肪族陽子、2 H )、2.89 ( t、J = 7 Hz、脂肪族陽子、2 H )、1.95 ( m、脂肪族陽子、2 H )、1.86 ( m、脂肪族陽子、2 H ) 。

【0163】

メチル 3 - [ 4 - ( { 3 - [ ビス ( 4 - メトキシフェニル ) フェニルメトキシ ] プロピル } { 4 - [ ( 2 - クロロ - 4 - ニトロフェニル ) ジアゼニル ] フェニル } アミノ ) ブタノイル ] ピロロ [ 4、5 - e ] インドリン - 7 - カルボキシレート ( 23 ) 。

15 mL の無水 DMF 中の 22 ( 3.0 g、3.37 mmol ) の溶液に、トリエチルアミン ( 0.75 mL ) を添加し、その後、メチル ピロロ [ 4、5 - e ] インドリン - 7 - カルボキシレート ( ボジャー ( Boger )、D. L.、コールマン ( Coleman )、R. S.、インベルゴ ( Invergo )、B. J. ( 1987 ) J. Org. Chem. 52, 1521 ) ( 0.8 g、3.7 mmol ) を添加する。その結果得られた溶液を室温で 20 時間保存する。その完了を確認するために、反応を HPLC によって分析する。DMF を、オイルポンプを備えたロータリ・エバポレータによって除去する。残渣である暗色シロップを、50% 酢酸エチル / ヘキサン ( ~ 25 mL ) 中に懸濁させる。この混合物を超音波処理して結晶化を開始させる。結晶を 15 分間攪拌し、焼結ガラス漏斗上での濾過によって収集し、メタノール ( 2 x 30 mL ) で洗浄し、真空乾燥させる。所望生成物の収量は、深紫色の固体として 2.7 g ( 87% ) である。<sup>1</sup>H NMR ( DMSO - d<sub>6</sub> ) 11.93 ( d、J = 1.7 Hz、インドール NH、1 H )、8.43 ( d、J = 2.5 Hz、芳香族陽子、1 H )、8.3 - 8.2 ( m、芳香族陽子、2 H )、7.85 - 7.75 ( m、芳香族陽子、3 H )、7.45 - 7.18 ( m、芳香族陽子、10 H )、7.05 ( d、J = 1.8 Hz、芳香族陽子、1 H )、6.97 ( d、J = 9 Hz、芳香族陽子、2 H )、6.87 ( d、J = 9 Hz、芳香族陽子、4 H )、4.12 ( t、J = 8 Hz、脂肪族陽子、2 H )、3.87 ( s、エステル CH<sub>3</sub>、3 H )、3.71 ( s、CH<sub>3</sub>、6 H )、3.60 ( br t、脂肪族陽子、2 H )、3.45 ( br t、脂肪族陽子、2 H )、3.29 ( br t

10

20

30

40

50

、脂肪族陽子、2 H)、3.08 (t、J = 5 Hz、脂肪族陽子、2 H)、2.5 (br t、DMSO信号によって不明瞭化、脂肪族陽子、2 H)、1.88 (br m、脂肪族陽子、4 H)。

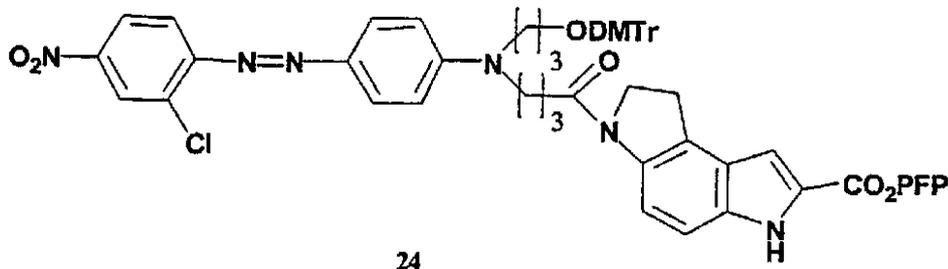
【0164】

2、3、4、5、6 - ペンタフルオロフェニル 3 - [4 - ( { 3 - [ビス(4 - メトキシフェニル)フェニルメトキシ] - プロピル} { 4 - [ ( 2 - クロロ - 4 - ニトロフェニル)ジアゼニル]フェニル}アミノ)ブタノイル] - ピロロ[4、5 - e]インドリン - 7 - カルボキシレート(24)

【0165】

【化77】

10



【0166】

1. メチルエステルの加水分解

25 mLのTHF中の23 (2.67 g、2.9 mmol)の溶液に、メタノール(25 mL)とH<sub>2</sub>O(10 mL)中の5% LiOH-水化物とを添加する

。その結果得られる懸濁液を50 (浴温度)で90分間攪拌すると、その時まで、透明な溶液が得られる。TLC分析は出発物質を示さない。溶媒を真空下で除去し、生成物をCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>と冷10%クエン酸との間に分ける。有機相をトリエチルアミンによって中和し、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>上で乾燥させ、濃縮する。その結果得られる生成物(アモルファス固体)を、高真空下で少なくとも3時間乾燥させ、追加の精製無しで次の工程に使用する。

【0167】

2. PFPエステルの作成

前の工程で得た生成物を10 mLの無水DMF中に溶解させる。トリエチルアミン(2 mL)を添加し、その後、PFP-TFA(2 mL、4.4 mmol)を添加する。その反応物を30分間攪拌し、HPLCによって分析する。出発物質、遊離酸は観察されないはずである。DMFを蒸発させ、その残渣である深紫色のシロップを100 mLのMeOH中に懸濁させる。30分間の攪拌後、暗色の析出物が形成され、これを焼結ガラス漏斗上での濾過によって収集し、メタノール(2 x 20 mL)で洗浄し、真空乾燥させる(15 - 30時間)。この操作によって、紫色の固体として所望の生成物が2.7 g(94%)得られる。<sup>1</sup>H NMR(DMSO-d<sub>6</sub>) 12.45 (d、J = 1.8 Hz、インドールNH、1 H)、8.43 (d、J = 2.5 Hz、芳香族陽子、1 H)、8.38 (d、J = 9 Hz、芳香族陽子、1 H)、8.24 (dd、J<sub>1</sub> = 9 Hz、J<sub>2</sub> = 2.5 Hz、芳香族陽子、1 H)、7.85 - 7.75 (m、芳香族陽子、3 H)、7.52 - 7.18 (m、芳香族陽子、11 H)、6.97 (d、J = 9 Hz、芳香族陽子、2 H)、6.88 (d、J = 9 Hz、芳香族陽子、4 H)、4.16 (t、J = 8.5 Hz、脂肪族陽子、2 H)、3.71 (s、CH<sub>3</sub>、6 H)、3.61 (br t、脂肪族陽子、2 H)、3.47 (br t、脂肪族陽子、2 H)、3.32 (br t、脂肪族陽子、2 H)、3.08 (t、J = 5 Hz、脂肪族陽子、2 H)、2.5 (br t、DMSO信号によって不明瞭化、脂肪族陽子、2 H)、1.88 (br m、脂肪族陽子、4 H)。

【0168】

例5

2、3、4、5、6 - ペンタフルオロフェニル 3 - { [ 3 - [ 4 - ( { 3 - [ビス(4 - メトキシフェニル) - フェニルメトキシ]プロピル} { 4 - [ ( 2 - クロロ - 4 - ニト

20

30

40

50

ロフェニル)ジアゼニル]フェニル} - アミノ)ブタノイル]ピロロ[4、5 - e]イン  
 ドリン - 7 - イル]カルボニル}ピロロ[4、5 - e]インドリン - 7 - イル}カルボニ  
 ル}ピロロ[4、5 - e]インドリン - 7 - カルボキシレート(25a)、ここでR1 =  
 2 - C1そしてt = v = 3(反応スキーム6)

2 - (4 - ニトロフェニル)エチル 3 - {[3 - ({3 - [4 - ({3 - [ビス(4  
 - メトキシフェニル)フェニルメトキシ]プロピル}{4 - [(2 - クロロ - 4 - ニトロ  
 フェニル)ジアゼニル]フェニル}アミノ)ブタノイル]ピロロ[4、5 - e]インドリ  
 ン - 7 - イル}カルボニル)ピロロ[4、5 - e]インドリン - 7 - イル]カルボニル}  
 ピロロ[4、5 - e]インドリン - 7 - カルボキシレート(25)。

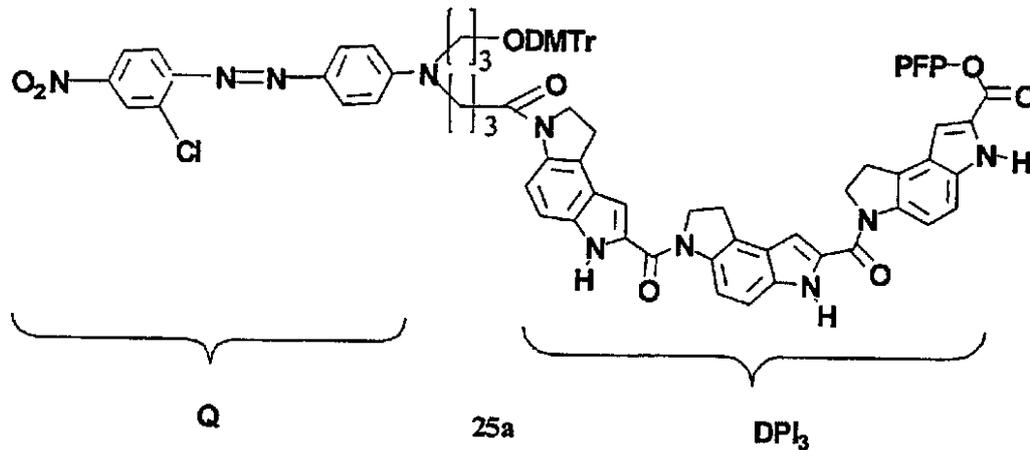
100 mLの丸底フラスコに、1.31 g (1.22 mmol)の24を量って入れる。  
 これを25 mLのジメチルホルムアミド中に溶解させる。次に0.81 mLのトリエチ  
 ルアミンを添加し、最後に0.623 g (1.162 mmol)の17を添加する。その  
 反応混合物を、一晚放置し、次に、溶液を~10 mLに濃縮し、その結果得られた沈殿物  
 を、焼結ガラス漏斗を使用して濾過する。その固体を、十分な量のメタノール(真空に晒  
 す前に、フィルタ中のスラッジをメタノールと攪拌する)で数回洗浄し、エーテルで洗浄  
 する。溶出液が透明で実質的に無色になったところで深紫色の沈殿物を真空乾燥して1.  
 5 g (90%)の所望生成物を得る。<sup>1</sup>H NMR (DMSO - d6) 11.96 (s  
 、インドールNH、1H)、11.76 (s、インドールNH、1H)、11.69 (s  
 、インドールNH、1H)、8.43 (d、J = 2.4 Hz、芳香族陽子、1H)、8.  
 35 - 8.20 (m、芳香族陽子、4H)、8.19 (d、J = 9 Hz、芳香族陽子、2  
 H)、7.85 - 7.75 (m、芳香族陽子、3H)、7.66 (d、J = 9 Hz、芳香  
 族陽子、2H)、7.45 - 7.18 (m、芳香族陽子、12H)、7.10 (s、芳香  
 族陽子、1H)、7.01 (s、芳香族陽子、1H)、6.99 (m、芳香族陽子、3H)  
 )、6.88 (d、J = 9 Hz、芳香族陽子、4H)、4.61 (m、脂肪族陽子、6  
 H)、4.14 (t、J = 8.5 Hz、脂肪族陽子、2H)、3.71 (s、2 x CH<sub>3</sub>  
 O、6H)、3.59 (m、脂肪族陽子、2H)、3.43 (m、脂肪族陽子、6H)、  
 3.34 (m、水信号によって不明瞭化、脂肪族陽子、2H)、3.22 (m、脂肪族陽  
 子、2H)、3.08 (t、J = 5 Hz、脂肪族陽子、2H)、2.5 (t、DMSO信  
 号によって不明瞭化、COCH<sub>2</sub> -、2H)、1.89 (br m、脂肪族陽子、4H)  
 。分析：計算：C、68.27%；H、4.95%；N、10.81%。結果：C、68  
 .08%；H、4.98%；N、10.63%。

【0169】

2、3、4、5、6 - ペンタフルオロフェニル 3 - {[3 - ({3 - [4 - ({3 -  
 [ビス(4 - メトキシフェニル) - フェニルメトキシ]プロピル}{4 - [(2 - クロロ  
 - 4 - ニトロフェニル)ジアゼニル]フェニル}アミノ)ブタノイル]ピロロ[4、5 -  
 e]インドリン - 7 - イル]カルボニル}ピロロ[4、5 - e]インドリン - 7 - イル}  
 カルボニル}ピロロ[4、5 - e]インドリン - 7 - カルボキシレート(25a)。

【0170】

【化 7 8】



10

【0171】

フラスコに、1.0 g (0.73 mmol) の前工程からの生成物と、40 mL の THF と、2.46 g の DBU とを入れる。この混合物を 50 度で 4 時間攪拌し、熱から離し、15 ~ 20 mL に蒸発させる。前記生成物に約 40 mL のエタノールを添加し、この混合物を攪拌し超音波処理する。次に、沈殿物を、焼結ガラス漏斗で濾過し、40 - 60 mL の追加のエタノールで洗浄し、その後、類似量のエチルエーテルで洗浄し、それぞれの洗浄時に、溶出液がすぐに透明になるように、真空に晒す前にフィルタ内の物質を攪拌する。その生成物を、次の工程に使用する前に、1 ~ 2 時間真空乾燥させる。その物質を、100 mL のフラスコ中で 20 mL の DMF 中に溶解させ、溶解するように攪拌する。次に、0.6 mL (4.3 mmol) のトリエチルアミンを添加し、その後、0.6 mL の PFP-TFA を添加する。この反応混合物をアルゴン下で一晩攪拌し、次に、ガム状態まで蒸発させ、~10 mL の DMF を添加し、その後、~80 mL のメタノールを添加する。この混合物を渦流し、超音波処理し、次に、析出した生成物を濾過し、真空乾燥する。収率は 85 - 90 % である。<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) 12.01 (s、インドール NH、1H)、11.76 (s、インドール NH、1H)、11.69 (s、インドール NH、1H)、8.43 (d、J = 2.4 Hz、芳香族陽子、1H)、8.40 (br s、芳香族陽子、1H)、8.35 - 8.20 (m、芳香族陽子、3H)、7.85 - 7.75 (m、芳香族陽子、3H)、7.59 (d、J = 1.2 Hz、芳香族陽子、1H)、7.45 - 7.18 (m、芳香族陽子、12H)、7.13 (s、芳香族陽子、1H)、6.99 (m、芳香族陽子、3H)、6.88 (d、J = 9 Hz、芳香族陽子、4H)、4.66 (m、脂肪族陽子、4H)、4.14 (t、J = 8.5 Hz、脂肪族陽子、2H)、3.71 (s、2 x CH<sub>3</sub>O、6H)、3.59 (m、脂肪族陽子、2H)、3.43 (m、脂肪族陽子、6H)、3.34 (m、水信号によって不明瞭化、脂肪族陽子、2H)、3.08 (t、J = 5 Hz、脂肪族陽子、2H)、2.5 (t、DMSO 信号によって不明瞭化、COCH<sub>2</sub>-、2H)、1.89 (br m、脂肪族陽子、4H)。分析：結果：C、63.58%；H、4.13%；N、9.53%。計算：2.3 モルの水；C、63.97%；H、4.21%；N、9.44%。

20

30

40

【0172】

例 6

DMTrO-レッド13-アミド-CDPI<sub>3</sub>-CPG(29)  
(反応スキーム7)

3-[ (4-メトキシフェニル)ジフェニルアミノ]プロパン-1-オール(26)。

オープン乾燥させた 250 mL の丸底フラスコ中で、攪拌によって、4 g (53 mmol) の 3-アミノプロパノールを、50 mL の塩化メチレン中に溶解させた。この溶液を栓止めし、放置した。7.7 g (24.9 mmol) の塩化モノメトキシトリチル (MMT-Cl, Aldrich 試薬グレード) を、別の 50 mL の塩化メチレン中に溶解させた。オ

50

ーブン乾燥させた滴下漏斗を前記フラスコに取り付け、前記MMT-Cl溶液を漏斗に添加した。次に、フラスコ中の前記溶液に、前記MMT-Cl溶液を、～10分間に渡って添加した(いくらか熱が発生)。1時間後、反応をTLC(1:1v/vヘキサン/酢酸エチル、 $R_f$  0.4)によって分析したところ、完了していることが判った。ニンヒドリンスプレー/熱によるTLCスポットの可視化によって、微量(高速移動)のビス-MMT副産物を示した。前記反応混合物を分液漏斗中の200mLの塩化メチレン上に静置された200mLの水に添加した。この混合物を振とうし、層に分離した。水層は捨て、有機層を別の200mLの水で洗浄した。この有機層を10-20gの硫酸ナトリウム上で乾燥させ、蒸発させて薄黄色のシロップとしての～7gのトリチル化アミンを得た。この化合物は、更なる精製を必要とせず、一晚乾燥された。数日間後、前記シロップは固化した。生成物を、エーテル-ヘキサンから再結晶化し、白色固体( $mp = 89.5 - 90.5$  EC)としての4.6g(53%収率)の26を得た。分析、計算 $C_{23}H_{25}NO_2$ : C、79.51; H、7.25; N、4.03。結果: C、79.48; H、7.18; N、3.98。

10

【0173】

2-[({3-[4-メトキシフェニル]ジフェニルアミノ}プロピル)オキシカルボニル)メトキシ]-酢酸、トリエチルアンモニウム塩(27)。

2.72g(7.83mmol)のアルコール(26)を、1.3mL(9.4mmol)のトリエチルアミンと1.1g(9.5mmol)のグリコール酸無水物(glycolic anhydride)とを含む20mLの塩化メチレン中に溶解させた。この混合物を、2時間攪拌した(均質になった)。TLCは、明白な反応(9:1/塩化メチレン:エタノール中の $R_f = 0.35$ )を示した。溶媒を蒸発によって除去し、93%塩化メチレン、5%メタノール、及び2%トリメチルアミンで充填した1.5x18インチのシリカゲルカラムで、残渣をクロマトグラフィにかけた。生成物を含むフラクションを合せ、溶媒を蒸発によって除去した。乾燥DMFによる同時蒸発によって、少量の水及び残渣の揮発性溶媒の除去を確実にした。無色シロップ(27)の収量は、100%であると見做された。このシロップを、乾燥DMF中に溶解させて、23.4mL(～0.33M溶液)の最終量を得た。

20

【0174】

N-MMTジグリコレートCPG(28)の合成

30

10gのLCAA-CPGを、100mLの丸底フラスコ中で、DMF(1.66mol)中の27の0.33M溶液の5mLと合せた。2.5mLのジイソプロピルエチルアミン、0.11g(0.8mmol)のHOBT及び0.63g(1.66mmol)のHBTUの溶液を準備し、これを前記CPGに添加した。この混合物を栓止めし、オービタルシェーカ(150rpm)で16時間渦流した。前記CPGを、中度空孔率(medium porosity)焼結ガラス漏斗で濾過し、2x100mLのDMF、2x100mLのアセトニトリル、及び2x100mLのエーテルで洗浄した。微量のエーテルを真空(オイルポンプ)除去した。40mLの乾燥ピリジン及び5mLの無水酢酸とでCPGを処理することによって、未反応アミノ基をアセチル化した。1.5時間の渦流後、CPGを濾過し、2x100mLのDMF、2x100mLのアセトニトリル、及び2x100mLのエーテルで洗浄した。微量のエーテルを真空(オイルポンプ)除去した。前記CPGのMMTローディングを、3-5mgのCPGを25mLの1:1/70%過塩素酸:メタノール中で処理することによって分析した。放出されたMMT陽イオンの吸光度を472nmで記録し、ローディング・レベルは、下記の等式を使用して95.7:mol/gのCPGとして計算した。

40

MMTローディング(:mmol/g)

$$= A_{472} \times \text{体積(mL)} \times 14.3 \div \text{CPGのwt(mg)}$$

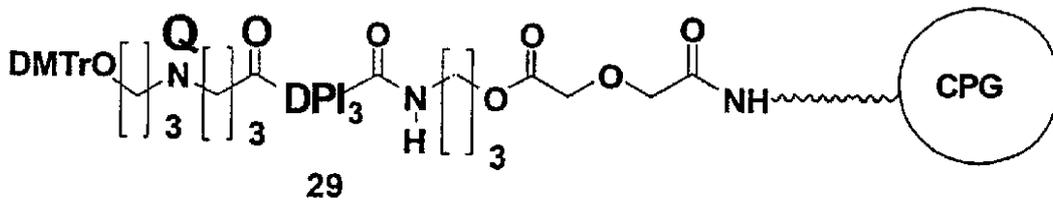
【0175】

CPG29の合成

50

【 0 1 7 6 】

【 化 7 9 】



【 0 1 7 7 】

10

4 g の N - MMTジグリコレート CPG ( 2 8 ) を、中度空孔率焼結ガラス漏斗に計量した。CPG を、25 mL の 3 % TCA / DCM で処理することによって脱トリチル化した。薬匙による短時間の攪拌後、混合物を、濾過の前に 5 分間反応させた (黄色になった)。このプロセスを、濾液が無色になるまで 4 回繰返した。前記 CPG を、4 x 40 mL の塩化メチレンで洗浄した。濾液を有機廃棄物として捨て、CPG を、40 mL のアセトニトリル中の 20 % トリエチルアミンでの処理によって中和した。薬匙による短時間の攪拌後、混合物を濾過し、2 x 40 mL のアセトニトリル、及び 2 x 40 mL のエーテルで洗浄した。微量のエーテルを真空 (オイルポンプ) 除去した。前記脱トリチル化 CPG をすぐに次の固定反応に使用した。

【 0 1 7 8 】

20

0.259 g ( 1 8 0 : m o l ) の 2 5 a を、15 mL のポリプロピレン試験管中で 1.2 mL の乾燥 DMSO と共に振とうした。15 分間後、その暗紫色の溶液を 4 g の脱トリチル化ジグリコレート CPG ( 5 0 mL の丸底フラスコ中 ) に添加した。これは、CPG グラム当たり、45 : m o l PFP エステルの提供比に対応する。追加の 5 mL の DMSO を前記ポリプロピレン試験管に追加して、残りの PFP エステルを溶解させ、この溶液を前記 CPG に添加した。2 mL のトリエチルアミンを前記混合物に添加し、この混合物を栓止めし、オービタルミキサで 14 時間渦流した。CPG を濾過し、2 x 50 mL の DMSO、2 x 50 mL のアセトニトリル、及び 2 x 50 mL のエーテルで洗浄した。微量のエーテルを真空 (オイルポンプ) 除去した。未反応アミノ基を、CPG を 10 mL の乾燥ピリジン、及び 3 mL の無水酢酸とで処理することによってアセチル化した。6 時間の渦流後、CPG を濾過し、2 x 50 mL の DMF、2 x 50 mL のアセトニトリル、及び 2 x 50 mL のエーテルで洗浄した。微量のエーテルを真空 (オイルポンプ) 除去した。前記 CPG の MMT ローディングを、3 - 5 mg の CPG を 25 mL の 1 : 1 / 70 % 過塩素酸 : メタノール中で処理することによって分析した。放出された MMT 陽イオンの吸光度を 498 nm で記録し、装填レベルは、下記の等式を使用して 45 : m o l / g の CPG と計算された。

30

MMT ローディング ( : m m o l / g )

=  $A_{498} \times \text{体積 (mL)} \times 14.3 \div \text{CPG (mg) の wt}$

【 0 1 7 9 】

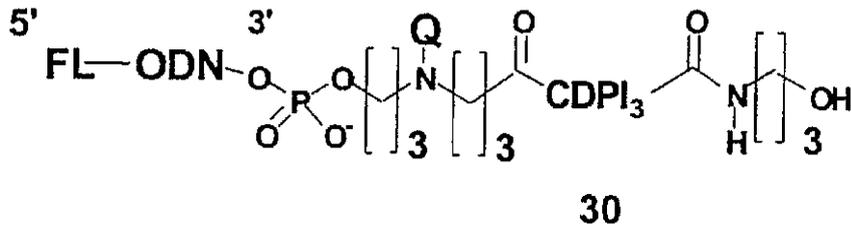
40

例 7

FL - ODN - レッド 13 - アミド - CDPI<sub>3</sub> ( 3 0 ) の合成

【 0 1 8 0 】

【化 8 0】



【 0 1 8 1】

10

MGB部分のヨウ素化を避ける為に、標準0.1 I<sub>2</sub>酸化溶液が0.01 - 0.015に希釈された以外は、標準ホスホルアミダイト結合化学反応を使用してCPG 29上でオリゴヌクレオチドを合成した。FAMとTETとを、Glen Research社から入手可能な対応のホスホルアミダイトを使用して5'末端に導入した。

【 0 1 8 2】

例 8

4 - { [ N - ( 6 - { [ ビス ( メチルエチル ) アミノ ] ( 2 - シアノエトキシ ) ホスフィノオキシ } ヘキシル ) カルバモイル ] メチル } - 2 - オキソ - 2 H - クロメン - 7 - イル 2、2 - ジメチルプロパノエート ( 3 4 a ) 。

N - ( 6 - ヒドロキシヘキシル ) - 2 - ( 7 - ヒドロキシ - 2 - オキソ ( 2 H - クロメン - 4 - イル ) ) アセトアミド ( 3 2 a ) 。

20

( 7 - ヒドロキシ - 2 - オキソ ( 2 H - クロメン - 4 - イル ) 酢酸メチルエステル ( 1 ) をベーカー ( Baker ) 等 ( J. Chem. Soc. ; 1950;170,173 ) に従って合成した。

15 mL の DMF 中の 3 1 ( 2.0 g、8.5 mmol ) と 6 - アミノヘキサノール ( 4.0 g、34.1 mmol ) との溶液を、80 で 24 時間加熱した。DMF を真空下で蒸発させ、生成物と過剰 6 - アミノヘキサノールとの混合物を粘性シロップとして得た。10% MeOH / CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>での溶出によるシリカ上のクロマトグラフィと精製生成物フラクションの蒸発とによって、白色固体を得て、これをエーテルで洗浄し、真空乾燥させた。収量は 2.05 g ( 75% ) であった。

【 0 1 8 3】

30

4 - { [ N - ( 6 - ヒドロキシヘキシル ) カルバモイル ] メチル } - 2 - オキソ - 2 H - クロメン - 7 - イル 2、2 - ジメチルプロパノエート ( 3 3 a ) 。

20 mL の乾燥ピリミジン中の 3 2 a ( 2.0 g、6.3 mmol ) の溶液に、4、4' - 塩化ジメトキシトリフェニルメチル ( 3.0 g、8.9 mmol ) を添加した。この溶液を、室温で 1 時間保存し、TLC 分析したところ ( 酢酸エチル、R<sub>f</sub> ~ 0.7 )、完全な反応 ( 第 1 ヒドロキシ基の保護 ) が示された。この溶液に、トリメチル無水酢酸 ( trimethyl acetic anhydride ) ( 2.0 mL、9.9 mmol ) を添加し、その後、トリエチルアミン ( 5 mL ) と 4 - ( ジメチルアミノ ) ピリジン ( 0.3 g ) を添加した。この混合物を 5 時間攪拌し、TLC 分析によって、フェノール基の完全な保護 ( R<sub>f</sub> ~ 0.9、酢酸エチル ) が示された。過剰の無水物をクエンチングするためにメタノールを添加した。真空下での蒸発とキシレンとの同時蒸発とによって、ピリジンを除去した。得られた生成物を、酢酸エチルと 2% NaHCO<sub>3</sub>との間で分け、有機相を真空下で濃縮して粗 DMT 保護 3 3 a を得た。

40

【 0 1 8 4】

前記 DMT 基を除去するために、DMT 誘導体を CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>中の 100 mL の 10% MeOH 中に溶解させ、0.5 mL のトリフルオロ酢酸で処理した。1 時間の攪拌後、反応混合物をトリエチルアミン ( 0.7 mL ) で中和し、濃縮した。その結果得られた粘性オイルを、酢酸エチルと水との間で分けた。有機層を Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>上で乾燥させ、濃縮した。得られた固体をエーテル ( 50 mL ) 中で懸濁させ 30 分間攪拌した。所望の生成物は、不溶性物質であり、これは濾過によって収集し、エーテルで洗浄し乾燥させた。表記生成

50

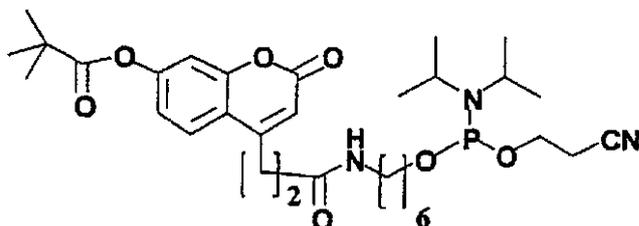
物 33 の収量は 1.6 g (64%) であった。

【0185】

4 - { [ N - ( 6 - { [ ビス ( メチル エチル ) アミノ ] ( 2 - シアノエトキシ ) ホスフィノオキシ } ヘキシル ) カルバモイル ] メチル } - 2 - オキソ - 2 H - クロメン - 7 - イル 2、2 - ジメチルプロパノエート ( 34 ) 。

【0186】

【化81】



34a

10

【0187】

10 mL の無水  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  中の 33 a ( 0.6 g、1.5 mmol ) の溶液に、トリエチルアミン ( 0.4 mL ) と、その後、2 - シアノエチル ジイソプロピルクロロホスホルアミダイト ( 0.35 mL、1.6 mmol ) を添加した。この溶液を室温で 1 時間保存し、0.1 mL の MeOH によって処理した。溶媒を蒸発させ、残渣を、酢酸エチルと飽和  $\text{NaHCO}_3$  との間で分けた。有機相を飽和  $\text{NaCl}$  で洗浄し、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$  上で乾燥させ、濃縮した。粗生成物を、シリカ上でクロマトグラフィにかけて、酢酸エチル中の 5% トリエチルアミンで溶出した。精製生成物フラクションの濃縮と真空下での乾燥とによって、無色粘性オイルとして 0.59 g (65%) の 34 を得た。

20

【0188】

例 9

8 - ( 3 - { [ ビス ( メチル エチル ) アミノ ] ( 2 - シアノエトキシ ) ホスフィノオキシ } プロピル ) - 7 - オキソフェノキサジン - 3 - イル 2、2 - ジメチルプロパノエート ( 37 a ) 。

30

( 反応スキーム 9 )  
7 - ヒドロキシ - 2 - ( 3 - ヒドロキシプロピル ) フェノキサジン - 3 - オン ( 35 a )

50 mL の MeOH 中の、4 - ニトロソレコルシノール ( 4 - nitrosorecorcinol ) ( 4.5 g、32.4 mmol )、4 - ( 3 - ヒドロキシプロピル ) ベンゼン - 1、3 - ジオール ( フォルチャシン ( Forchiassin ), M.; ロッソ ( Russo ), C., J. Heterocyc. Chem. 20, 1983, 493-494 ) ( 4.0 g、23.8 mmol ) と  $\text{MnO}_2$  ( 2.5 g、17.6 mmol ) との懸濁液を、 $\sim 0^\circ\text{C}$  ( 氷浴 ) まで冷却した。この懸濁液に、2.5 mL の濃  $\text{H}_2\text{SO}_4$  を滴下添加し、この反応物を室温で 5 時間攪拌した。沈殿した赤色リザズリン化合物を濾過によって収集し、メタノールで洗浄し、乾燥させた。

40

【0189】

前記粗リザズリン化合物を、200 mL の水と 50 mL の濃  $\text{NH}_4\text{OH}$  との混合物中に懸濁させた。亜鉛末 ( zinc dust ) ( 2.0 g ) を添加し、懸濁液を 20 分間攪拌した。得られた紫色混合物を濾過し、その濾液を、部分過剰還元生成物であるロイコレゾルフィンに酸化させるために空気を含ませて激しく攪拌した。その反応物を酢酸によって酸性化し、形成された茶色の固体を濾過によって収集し、水によって洗浄し、乾燥させた。収量は 2.1 g であった。その物質は、前記第 1 工程から行われていた分子内環形成の生成物である、 $\sim 50\%$  の 2、3、4 - トリヒドロ - 2 H - ピラノ [ 3、2

50

- b ] フェノキサジン - 9 - オンを含有していた。その物質の残りが前記所望表記化合物 35 であった。

【0190】

8 - (3 - ヒドロキシプロピル) - 7 - オキソフェノキサジン - 3 - イル 2、2 - ジメトキシプロパノエート (36b)。

50 mL のピリジン中の 35a (2.0 g) の懸濁液を、4、4' - 塩化ジメトキシトリフェニルメチル (5.0 g、14.8 mmol) で処理し、5 時間攪拌した。いくらかの不溶性物質を除去するために、その混合物を濾過し、濾液をトリメチル酢酸無水物 (2 mL) で処理した。その溶液を 15 時間攪拌し、過剰無水物をクエンチングするために MeOH (2 mL) を添加した。3 時間の攪拌後、その反応混合物を真空下で濃縮した。残渣ピリジンを、トリエチルアミンとキシレンとの同時蒸発によって除去した。得られた粗生成物 36a を、シリカ上でクロマトグラフィにかけ、50% 酢酸エチル / ヘキサンでの溶出でした。

10

【0191】

DMT 誘導体を 100 mL の 10% MeOH / CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 中に溶解させ、0.5 mL のトリフルオロ酢酸によって処理した。1 時間後、トリエチルアミン (2 mL) を添加し、その溶液を濃縮した。シリカ (酢酸エチル) 上でのクロマトグラフィと乾燥とによって、オレンジ色の固体として所望の生成物 0.38 g を得た。

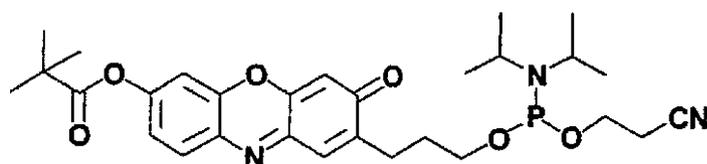
【0192】

8 - (3 - { [ビス (メチルエチル) アミノ] (2 - シアノエトキシ) ホスフィノオキシ} プロピル) - 7 - オキソフェノキサジン - 3 - イル 2、2 - ジメトキシプロパノエート (37a)。

20

【0193】

【化 82】



37a

30

【0194】

36b (0.38 g、1.1 mmol) を 6 mL の無水 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 中に溶解させた。トリエチルアミン (1.5 mL) を添加し、次に、2 - シアノエチル ジイソプロピルクロロホスホルアミダイト (0.29 mL、1.3 mmol) を添加した。その溶液を室温で 30 分間保存し、MeOH (0.1 mL) を添加し、その反応物を真空濃縮した。得られた残渣を酢酸エチルと NaHCO<sub>3</sub> との間で分けた。有機相を飽和 NaCl で洗浄し、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 上で乾燥させ、濃縮して粗アミダイトを得た。これを 2 mL のエーテル中に溶解させ、~ 50 mL のヘキサンに滴下添加した。得られたオレンジ色の固体を濾過によって収集し、ヘキサンで洗浄し、乾燥させた。収量は 0.4 g であった。

40

【0195】

例 10

3 - { [ (tert - ブチル) (メチルエチル) アミノ] [2 - (4 - {3 - ブチル - 7 - [(4 - メチルフェニル) - カルボニル] - 2、4、6、8 - テトラオキソ - 1 - (フェニルカルボニル) (1、3、5、7、9、10 - ヘキサヒドロ - ピリミジノ [5', 4' - 5、6] ピリジノ [2、3 - d] ピリミジン - 10 - イル) } フェニル) エトキシ] - ホスフィノオキシ] プロパニトリル (PPT) 44 (反応スキーム 10)

3 - n - ブチル - 6 - [4 - (2 - ヒドロキシエチル) アミノフェニル] ウラシル 40。

50

6 - クロロ - 3 - n - ブチルウラシル ( 10 . 4 g、51 . 3 mmol )、2 - ( 4 - アミノフェニル ) エタノール ( 10 . 0 g、72 . 9 mmol ) 及びエチルジイソプロピルアミン ( 18 ml、0 . 1 mol ) との混合物とを、150 ° オイル浴で1時間20分、アルゴン下で攪拌しながら加熱した。この混合物を室温まで冷却し、50 ml の水で希釈し、10 ml の酢酸で処理し、一晚結晶化のため攪拌した。沈殿した固体を濾過し、2 % 酢酸で洗浄し、フィルタ上で乾燥させ、100 ml の高温96 % エタノール中に溶解させた。この溶液に100 ml の熱水を添加し、その後1 . 0 g のチャコールを添加した。この混合物を高温濾過し、氷上で結晶化させた。黄色の固体を濾過によって収集し、真空乾燥させて10 . 7 g の40を得た。mp 207 - 208 。  $^1\text{H}$  NMR ( DMSO -  $d_6$  ) 0 . 88 ( t、3 H、J = 7 . 3 Hz、CH<sub>3</sub> )、1 . 25 ( m、2 H、CH<sub>2</sub> )、1 . 46 ( m、2 H、CH<sub>2</sub> )、2 . 70 ( t、2 H、J = 6 . 8 Hz、CH<sub>2</sub> )、3 . 60 ( dd、2 H、J = 11 . 8、6 . 8 Hz、CH<sub>2</sub> )、3 . 68 ( t、2 H、J = 7 . 3 Hz、CH<sub>2</sub> )、4 . 62 ( t、1 H、J = 5 . 3 Hz、OH )、4 . 73 ( d、1 H、J = 1 . 8 Hz、5 - H )、7 . 10 ( d、2 H、J = 8 . 4 Hz、ArH )、7 . 23 ( d、2 H、J = 8 . 4 Hz、ArH )、7 . 10 ( s、1 H、NH )、10 . 37 ( S、1 H、NH )。

【0196】

3 - n - ブチル - 10 - [ ( 2 - ヒドロキシエチル ) フェニル ] ピリド [ 2、3 - d ; 6、5 - d ' ] ジピリミジン - 2、4、6、8 - ( 3 H、7 H、9 H、10 H ) - テトロン 41。

80 ml の乾燥 DMF 中の40 ( 6 . 6 g、20 mmol ) と5 - フォルミル - 2、4 - 6 - トリクロロピリミジン ( 5 . 85 g、27 . 7 mmol ) の溶液を、室温で8時間攪拌し、80 ml の水でゆっくりと希釈した。その溶液は、2日間の冷蔵で固体を生成した。この生成物を濾過によって分離し、冷50 % エタノール ( 50 ml ) と25 % エタノール ( 50 ml ) とで洗浄し、真空乾燥させて、無色固体として8 . 16 g ( 96 % ) の41を得た、mp 205 - 215 ( 分解 ( decomp ) )。  $^1\text{H}$  NMR ( DMSO -  $d_6$  ) 0 . 88 ( t、3 H、J = 7 . 2 Hz、CH<sub>3</sub> )、1 . 27 ( m、2 H、CH<sub>2</sub> )、1 . 48 ( m、2 H、CH<sub>2</sub> )、2 . 81 - 2 . 90 ( m、2 H、CH<sub>2</sub> )、3 . 71 - 3 . 85 ( m、4 H、CH<sub>2</sub> )、4 . 50 ( br . s、5 H、OH、NH、H<sub>2</sub>O )、7 . 26 ( d、2 H、J = 8 . 4 Hz、ArH )、7 . 44 ( d、2 H、J = 8 . 4 Hz、ArH )、8 . 62 ( s、1 H、5 - H )。

【0197】

3 - n - ブチル - 5、10 - ジヒドロ - 10 - [ ( 2 - ヒドロキシエチル ) フェニル ] ピリド [ 2、3 - d ; 6、5 - d ' ] ジピリミジン - 2、4、6、8 - ( 1 H、3 H、7 H、9 H、10 H ) - テトロン。42

300 ml の25 % NH<sub>3</sub>水溶液中の41 ( 7 . 91 g、18 . 7 mmol ) の懸濁液に、Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> ( 13 . 8 g、85 %、67 mmol ) を添加し、攪拌しながら60 ° までゆっくりと加熱した。この混合物を60 ° で40分間攪拌し、水 ( 100 ml ) で希釈し、更に1時間同じ温度で攪拌した。透明な溶液が形成された。この溶液をその元の量の半分まで一部蒸発させ、氷で冷却し、50 ml の酢酸でpH 5まで中和させて、沈殿物を形成させた。混合物を完全な結晶化のため冷蔵庫で保存し、濾過し、冷水で洗浄した。その固体を真空乾燥させて白色固体として7 . 32 g ( 92 % ) の42を得た。mp 182 - 210 ( 分解 ( decomp ) )。  $^1\text{H}$  NMR ( DMSO -  $d_6$  ) 0 . 86 ( t、3 H、J = 7 . 3 Hz、CH<sub>3</sub> )、1 . 23 ( m、2 H、CH<sub>2</sub> )、1 . 42 ( m、2 H、CH<sub>2</sub> )、2 . 80 ( t、2 H、J = 6 . 6 Hz、CH<sub>2</sub> )、3 . 14 ( s、2 H、5 - CH<sub>2</sub> )、3 . 68 ( m、4 H、ArCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> )、4 . 64 ( t、1 H、OH )、7 . 25 ( d、2 H、J = 8 . 3 Hz、ArH )、7 . 33 ( d、2 H、J = 8 . 3 Hz、ArH )、7 . 73 ( br . s、3 H、NH )。

【0198】

PPT 44

10

20

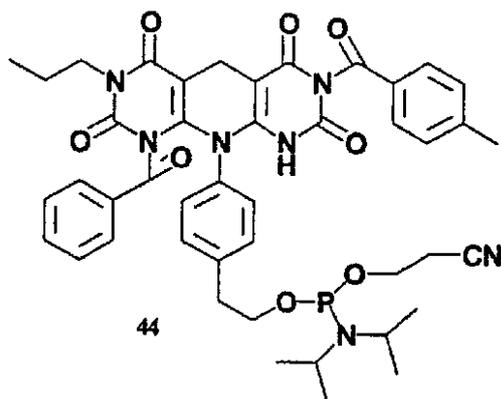
30

40

50

【0199】

【化83】



10

【0200】

固体42 (1.2 g、2.82 mmol) を、ピリジン (10 ml) と蒸発させ、ピリジン (13 ml) 中で懸濁させ、 $\text{Me}_3\text{SiCl}$  (2.2 ml、17.3 mmol) で処理し、アルゴン下、室温で30分間攪拌した。その反応混合物を氷で冷却し、塩化トルオイル (5 ml、28.8 mmol) でゆっくりと処理した。攪拌を室温で2時間継続し、溶媒を蒸発させた。残渣を酢酸 (10 ml) で処理し、その後、水 (10 ml) を添加した。沈殿したオイルをヘキサン (3 x 50 ml) で抽出し、ヘキサン中で不溶性の残渣を水と蒸発させた。残渣を96%エタノール (10 ml) 中に懸濁させ、濾過して0.3 gの出発物質を回収した。母液を水で希釈して、オイルとしてビス-トルオイル誘導体を沈殿させた。このオイルを真空乾燥させて固体泡まつとして0.96 g (52%) の43を得た。追加の精製無しでこの化合物を、以下の手順によってホスホルアミダイトに変換した。前記固体をアセトニトリルと蒸発させ、25 mlのジクロロメタン中に溶解させ、ジイソプロピルアンモニウム テトラゾリド (0.54 g、3.13 mmol) で処理し、その後、2-シアノエチル テトライソプロピルホスホルアミダイト (0.88 g、2.9 mmol) で処理した。その反応混合物をアルゴン下で1時間攪拌し、メタノール (1 ml) で処理し、 $\text{EtOAc}$  (100 ml) に入れ、飽和 $\text{NaCl}$ 溶液で洗浄し、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 上で乾燥させた。この溶液を蒸発させ、勾配システム0-50%B;  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -ヘキサン- $\text{NEt}_3$  (15:30:1) (A);  $\text{EtOAc}$  (B); 320 nmで検出、を使用してシリカゲルカラム上でのHPLCによって精製した。主要フラクションを蒸発させて、無色泡まつとして、0.79 g (33%) のAG1ホスホルアミダイト44を得た。

20

30

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) 0.92 (t, 3H,  $J = 7.3$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 1.07 - 1.42 (m, 14H, 4 x  $\text{CH}_3$  (i-Pr),  $\text{CH}_2$  (Bu)), 1.50 - 1.65 (m, 2H,  $\text{CH}_2$  (Bu)), 2.35 - 2.60 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CN}$ ), 2.40 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{Ar}$ ), 2.46 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{Ar}$ ), 2.95 - 3.13 (m, 4H, 2 x  $\text{CH}$  (i-Pr),  $\text{CH}_2$  (Bu)), 3.45 - 3.60 (m, 2H,  $\text{OCH}_2$ ), 3.80 - 4.02 (m, 4H,  $\text{ArCH}_2\text{CH}_2$ ), 3.82 (s, 2H, 5- $\text{CH}_2$ ), 7.15 - 7.35 (m, 8H,  $\text{ArH}$  (Tol)), 7.45 (s, 1H, NH), 7.73 (br. s, 3H, NH), 7.95 (d, 2H,  $J = 8.0$  Hz,  $\text{ArH}$ ), 8.05 (d, 2H,  $J = 8.0$  Hz,  $\text{ArH}$ )。  $^{31}\text{P}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) (ppm,  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) 143.2 (s)。

40

【0201】

例11

N - { 3 [ 4 - [ (1Z) - 1 - アザ - 2 - (ジメチルアミノ) プロブ - 1 - エニル ] - 1 - (5 - { [ビス(4-メトキシフェニル)フェニルメトキシ]メチル} - 4 - { [ビス(メチルエチル)アミノ] (2-シアノエチル) ホスフィノオキシ} オキシラン - 2 -

50

イル)ピラゾロ[5、4-d]ピリミジン-3-イル)プロピル)[2-( {4-[ (2-クロロ-4-ニトロフェニル)ジアゼニル]フェニル}エチルアミノ)-エトキシ]カルボキシアミド(50)(反応スキーム11)

4-アミノ-1-(2-デオキシ-D-エリスロ-ペントフラノシル)-3-(3-トリフルオロアセチミド-プロピン-1-イル)ピラゾロ[3、4-d]ピリミジン(46; n=1)。

10 mlの無水DMF中の45(1.96 g、5.20 mmol)と、CuI(103 mg、0.54 mmol)とテトラキス[トリフェニルホスフィン]パラジウム[0](317 mg、0.276 mmol)の混合物に、無水トリエチルアミン(1.1 ml)を添加し、その後、プロパルギル トリフルオロアセチミド(1.50 g、9.88 mmol)を添加した。この反応混合物をアルゴン下で4時間攪拌した。溶媒DMFを蒸発によって除去し、残渣オイルを、シリカゲルクロマトグラフィによって、酢酸エチル中の7%メタノールで溶出して精製した。生成物フラクションをプールし蒸発させて、泡沫: 2.16 g(99%)収量を得た。

【0202】

4-アミノ-1-(2-デオキシ-D-エリスロ-ペントフラノシル)-3-(3-アミノプロピル)ピラゾロ[3、4-d]ピリミジン(47; n=1)。

カーボン(ギ酸によって事前に活性化)上の0.300 mgの5%パラジウムを含有する、50 mlのエタノール中の46(2.10 g、5.25 mmol)の溶液に、1.0 mlの4M トリエチルアンモニウム フォルメート緩衝液(pH 6.5)を添加した。この混合物を40 psiの水素ガス下で18時間振とうした。この混合物をセライト(Celite)で濾過し、その濾液を蒸発させて、固体を得た。1.8 g(85%)収量。

【0203】

前記固体を、15 mlの濃縮水酸化アンモニウム中(封止フラスコ)で12時間攪拌し、次に乾燥状態まで蒸発させた。前記固体(47)を、乾燥アセトニトリルから蒸発させ、真空保存した: 1.74 g収量。

【0204】

48(n=1、q=2、R<sub>5</sub>=CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>-、R<sub>5</sub>、R<sub>5</sub>=H、R<sub>1</sub>=2-Cl、R<sub>5</sub>=4-NO<sub>2</sub>)の合成

47(0.90 g、2.92 mmol)と7(1.59 g、2.92 mmol)との溶液を、1.0 mlのトリエチルアミンを含有する5.0 mlの無水ジメチルホルムアミド中に、50 で1.0時間攪拌した。この溶液を、乾燥状態まで蒸発させ、その残渣を、シリカゲルクロマトグラフィによって、酢酸エチル中の0-20%メタノール・グラジエントで溶出して精製した。生成物フラクションを、蒸発させて、アモルファス固体: 0.74 g(37%)収量を得た。

【0205】

49(n=1、q=2、R<sub>5</sub>=CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>-、R<sub>5</sub>、R<sub>5</sub>=H、R<sub>1</sub>=2-Cl、R<sub>5</sub>=4-NO<sub>2</sub>)の合成

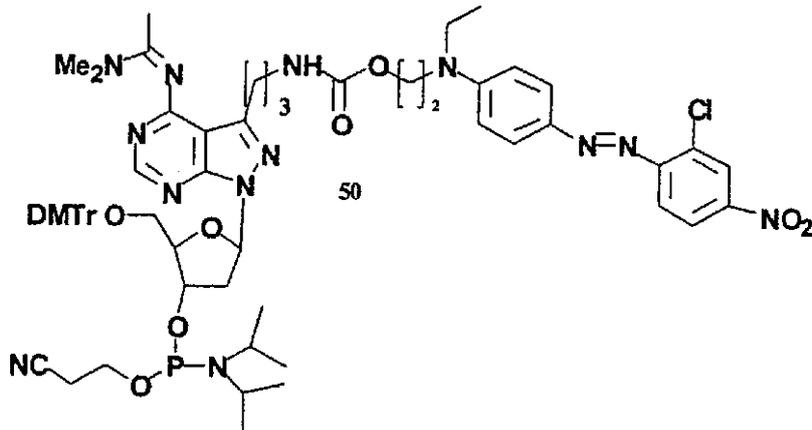
5.0 mlのジメチルアセタミド中の48(0.71 g、1.03 mmol)とN、N-ジメチルアセタミド ジメチルアセタール(1.9 ml)の溶液に、2.0 mlのトリエチルアミンを添加した。この溶液を18時間攪拌し、次に、乾燥状態まで蒸発させてオイルを得た: 0.75 g(100%)収量。

【0206】

50(n=1、q=2、R<sub>5</sub>=CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>-、R<sub>5</sub>、R<sub>5</sub>=H、R<sub>1</sub>=2-Cl、R<sub>5</sub>=4-NO<sub>2</sub>)の合成

【0207】

【化 8 4】



10

【0208】

塩化ジメトキシトリチル(0.42g)を、10mlの乾燥ピリジン中の49(0.75g、1.03mmol)の溶液に添加した。この溶液をアルゴン下で4.0時間攪拌して、次に、200mlの5%重炭酸ナトリウム溶液に注入した。その生成物を、300mlの酢酸エチルで抽出した。この抽出物を硫酸ナトリウム上で乾燥させ、蒸発させた。残渣を、シリカゲルクロマトグラフィによって、酢酸エチル(1%トリエチルアミン)中の10%メタノールで溶出して精製した。生成物フラクションを、蒸発させて、泡沫:556g(57%)収量を得た。

20

【0209】

0.30mlのジイソプロピルエチルアミンを含有した、15mlの無水塩化メチレン中の5'-ジメトキシトリチル誘導体(540mg、0.567mmol)の溶液に、2-シアノエチルN,N-ジイソプロピルクロロホスホルアミダイト(0.25ml)を添加した。アルゴン下で25℃での30分間の攪拌後、前記溶液を、1.0mlのメタノールで処理し、200mlの酢酸エチルで希釈した。この溶液を、200mlの5%重炭酸ナトリウム溶液で洗浄し、硫酸ナトリウム上で乾燥させ、蒸発させた。粗生成物を、シリカゲルクロマトグラフィによって、酢酸エチル(2%トリエチルアミン)中の5%メタノールで溶出して精製した。生成物フラクションを、蒸発させて、泡沫:453mg(76%)収量を得た。

30

【0210】

例12

蛍光発光オリゴデオキシヌクレオチドプローブの合成

3'-DPI<sub>3</sub>プローブを、前に記載した(ルクタノフ(Lukhtanov)等, Biorg. Chem., 7:564-567(1996))方法を使用して、DPI<sub>3</sub>-修飾ガラス支持体から自動DNA合成によって作成した。オリゴヌクレオチド合成を、CDPI<sub>3</sub>部分のヨウ素化を避けるために酸化工程において0.015M(標準の0.1Mの代りに)のヨウ素溶液を利用した以外は、製造業者によって供給されたプロトコルに従って、ABI394合成機で行った。PCR中の伸長を防止するために、3'-CDPI<sub>3</sub>無しのプローブを、前述したように(ガンパー(Gamper)等, Biochem. 36:14816-14826(1997))、3'-ヒドロキシヘキシルホスフェートを用いて作成した。前記クエンチャホスホルアミダイトを、CPGに添加し、標準-シアノエチルホスホルアミダイトと試薬(Glen Research, Sterling, VA)をオリゴヌクレオチド合成に使用した。6-カルボキシフルオレセイン(6-FAM)ホスホルアミダイト(Glen Research)を使用して、5'-レポート染料を導入した。或いは、TAMRA-dUホスホルアミダイト(Glen Research)、cy3又はcy5ホスホルアミダイト(Glen Research)、レゾルフィンホスホルアミダイト、クマリンホスホルアミダイト、又はAGホスホルアミダイトを使用して、5'-フルオロフォアを導入した。5'-ヘキシルアミンホスホルアミダイト(Glen Research)を、3'-クエンチャ染料テトラメチルローダミン(TAMRA)の合成後接合のために、いくつかのODNに導

40

50

入した。脱保護後、すべてのオリゴヌクレオチドを、逆相 H P L C 精製し、ブタノール濃縮 / 過塩素酸ナトリウム沈殿 (ミレシ (Milesi) 等, Methods Enzym. 313: 164-173(1999)) によってナトリウム塩として分離した。

#### 【 0 2 1 1 】

##### 例 1 3

T A M R A との O D N 合成後の接合

T A M R A N H S エステル (Glen Research) を、製造業者によって提供されたプロトコルに従って、或る種の O D N 中のヘキシルアミン リンカをアシル化するために使用した。その結果得られた二つの接合された染料を備えた C D P I<sub>3</sub> - プローブを、8 % ポリアクリルアミドを使用した変性ゲル電気泳動によって精製した。所望のバンドを切除し、ゲルスライスを、10 mL の 100 mM トリス - H C l、10 mM 塩化トリエチルアンモニウム、1 mM E D T A (p H 7 . 8) 中で、37 °C で、一晚、インキュベートした。生成物を逆相 H P L C、ブタノール濃縮、及び過塩素酸ナトリウム沈殿によって、前記抽出物から分離した。ペレットを水中で溶解させ、その濃度を、分光測光法によって測定した。最も近いモデル (カンター (Cantor) 等, Biopolymers 9:1059-1077(1970)) を使用して、O D N の消光係数 ( $\epsilon_{260}$ ) を計算した。前記接合体及びプローブについて、消光係数は、O D N 及び取り込まれた残基である D P I<sub>3</sub> ( $68,000 \text{ M}^{-1}, \text{ cm}^{-1}$ )、6 - F A M ( $22,800 \text{ M}^{-1}, \text{ cm}^{-1}$ )、T A M R A ( $34,000 \text{ M}^{-1}, \text{ cm}^{-1}$ ) 及びクエンチャ ( $11,300 \text{ M}^{-1}, \text{ cm}^{-1}$ ) の  $\epsilon_{260}$  の合計として計算された。

#### 【 0 2 1 2 】

##### 例 1 4

ヘビ毒液ホスホジエステラーゼによるオリゴヌクレオチドの消化

種々のクエンチャの蛍光消光能力を調べるために、オリゴヌクレオチドを、ヘビ毒液ホスホジエステラーゼ (P D E) によって消化した。200 nM のオリゴヌクレオチドを、40 mM の N a C l、20 mM の トリス (p H 8 . 9)、5 mM の M g C l<sub>2</sub> 及び 0 . 0 2 5 % の B S A を含む緩衝液に入れた。ホスホジエステラーゼ (Pharmacia, Piscataway, NJ) 5 4 単位の酵素を反応混合物に添加して 37 °C で 1 6 時間インキュベートする前に、初期蛍光発光を、L S 5 0 B 蛍光計 (Perkin-Elmer Corporation, Foster City CA) で読み取った。次に、最終蛍光発光を、前記 L S 5 0 B を使用して測定した。初期蛍光発光に対する最終蛍光発光の比率が、クエンチャの信号対ノイズ (S / N) 比を表わす。それとは別に、オリゴヌクレオチドの完全な消化に必要な時間を測定するために、消化反応の反応速度 (キネティクス) を前記 L S 5 0 B を使用してモニタした。

#### 【 0 2 1 3 】

##### 例 1 5

5'ヌクレアーゼ P C R アッセイ

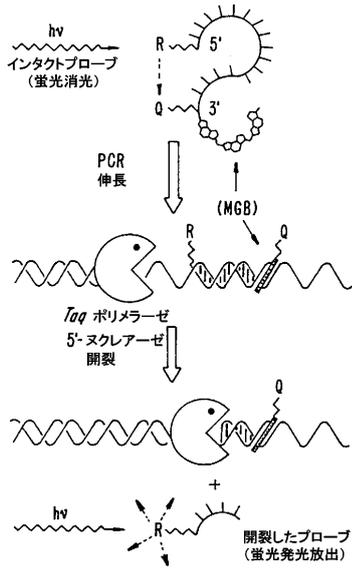
C D P I<sub>3</sub> - 結合オリゴヌクレオチドは、5'末端にフルオロフォアである F A M を結合させ、上述した方法によって 3'末端にリンカを介して種々のクエンチャを結合させた。調査中の種々のクエンチャの消光能力を調べるために、上記オリゴヌクレオチドで 5'ヌクレアーゼアッセイを行った。蛍光発光モニタを、Idaho Technologies LC-24Light Cycler によって行った。各反応物は、P C R 緩衝液 (40 mM N a C l、20 mM トリス H C l、p H 8 . 9、5 mM M g S O<sub>4</sub>、0 . 0 5 % ウシ血清アルブミン)、1 2 5 mM の各 d N T P、0 . 5 mM の各プライマ、0 . 1 mM 蛍光発光 C D P I<sub>3</sub> プローブ、0 . 5 U / 10 mL の T a q ポリメラーゼ及びテンプレートとしての 0 . 1 n g / 10 mL の合成 D N A を含んでいた。サイクリング プログラムは、9 5 °C で 2 秒間、次に、伸長温度 (5 5 - 7 0 °C) で 3 0 秒間を、5 0 サイクル (又は前述) であった。

#### 【 産業上の利用可能性 】

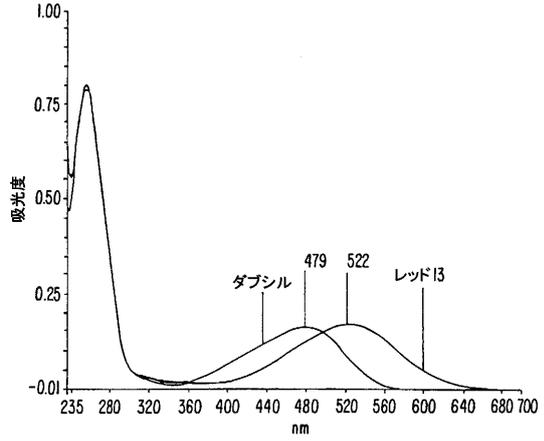
#### 【 0 2 1 4 】

医療科学、法廷科学、農業及び水質制御等の分野に利用可能である。

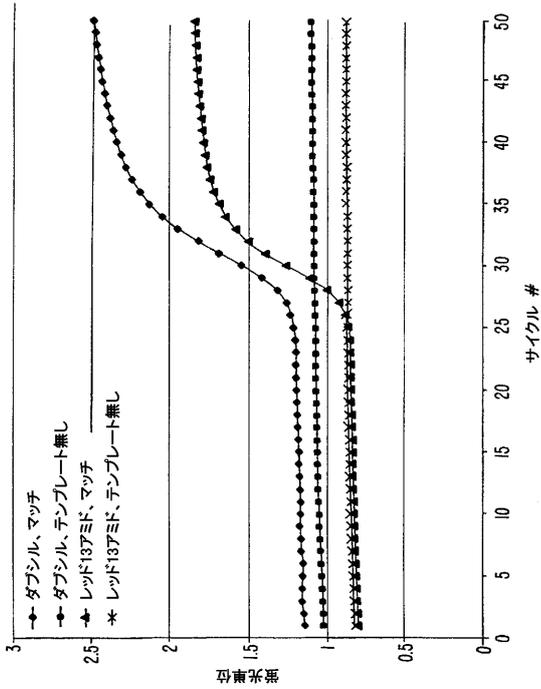
【 図 1 】



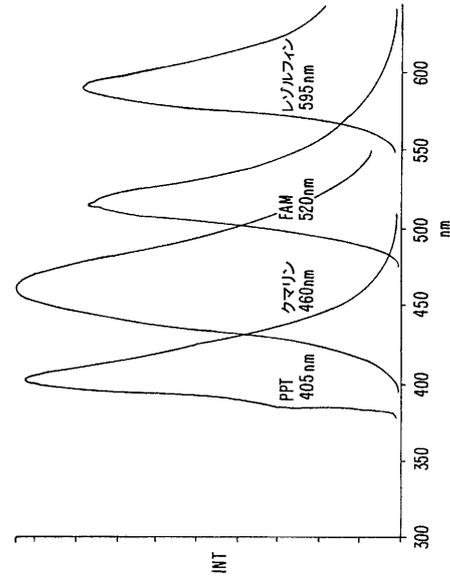
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



## フロントページの続き

- (72)発明者 リード, マイケル, ダブリュ  
アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 1 5 5 シアトル 1 8 0 ス・ストリート ノース・イースト  
3 5 7 5
- (72)発明者 ルクタノフ, ユージニー, アレクサンダー  
アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 0 1 2 ボセル 2 0 5 ス・ストリート サウス・イースト  
8 1 7
- (72)発明者 ゴール, アレクサンダー, エイ  
アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 0 1 2 ボセル 1 0 ス・ドライブ サウス・イースト 1 9  
7 0 1
- (72)発明者 デンプシー, ロバート, オー  
アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 0 3 3 カーランド 1 1 5 ス・コート ノース・イースト  
1 1 4 2 1
- (72)発明者 ベロウソウ, イェフゲニー, エス  
アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 0 1 2 ミル・クリーク 1 4 4 ス・コート サウス・イース  
ト 2 7 1 7

Fターム(参考) 4B024 AA11 AA20 CA09 HA14  
4B063 QA11 QA18 QQ41 QR32 QR56 QS34 QX02