

(19) 日本国特許庁(JP)

**再公表特許(A1)**

(11) 国際公開番号

**W02010/021344**

発行日 平成24年1月26日 (2012. 1. 26)

(43) 国際公開日 **平成22年2月25日 (2010. 2. 25)**

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 P 19/34 (2006.01)</b>	C 1 2 P 19/34 Z N A A	4 B O 2 4
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 6 4
<b>C O 7 H 19/10 (2006.01)</b>	C O 7 H 19/10 C S P	4 C O 5 7
<b>C O 7 H 19/20 (2006.01)</b>	C O 7 H 19/20	
<b>C O 7 H 21/00 (2006.01)</b>	C O 7 H 21/00	

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 43 頁)

出願番号 特願2010-525700 (P2010-525700)	(71) 出願人 503360115 独立行政法人科学技術振興機構 埼玉県川口市本町四丁目1番8号
(21) 国際出願番号 PCT/JP2009/064522	
(22) 国際出願日 平成21年8月19日 (2009. 8. 19)	
(31) 優先権主張番号 特願2008-214016 (P2008-214016)	(74) 代理人 100163647 弁理士 進藤 卓也
(32) 優先日 平成20年8月22日 (2008. 8. 22)	(72) 発明者 ▲桑▼原 正靖 日本国群馬県桐生市境野町四丁目634-4 カラーズリーフ11
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(72) 発明者 小比賀 聡 日本国大阪府箕面市小野原西3丁目21-1
	Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA80 CA01 HA13 HA20 4B064 AF27 CA21 CB30 CD12 CD15 DA01 DA13
	最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規核酸誘導体およびそれを用いたヌクレアーゼ耐性核酸の調製方法

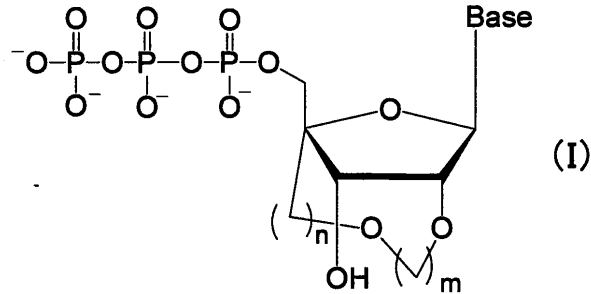
## (57) 【要約】

本発明のヌクレアーゼ耐性核酸の調製方法は、少なくとも3つの塩基からなる核酸と、末端デオキシヌクレオチド転移酵素と、2'，4'-架橋型ヌクレオシド三リン酸とを混合してインキュベートする工程を含む。本発明の方法に用いられる2'，4'-架橋型ヌクレオシド三リン酸としては、例えば、5-メチル-2'-O，4'-C-(メチレンオキシメチレン)ウリジン-5'-三リン酸、5-メチル-2'-O，4'-C-(アミノメチレン)ウリジン-5'-三リン酸、および5-メチル-2'-O，4'-C-(ベンジルオキシメチレン)ウリジン-5'-三リン酸が挙げられる。本発明の方法によれば、既存の機能性核酸に対して、後から簡単に優れたヌクレアーゼ耐性を付与することができる。

## 【特許請求の範囲】

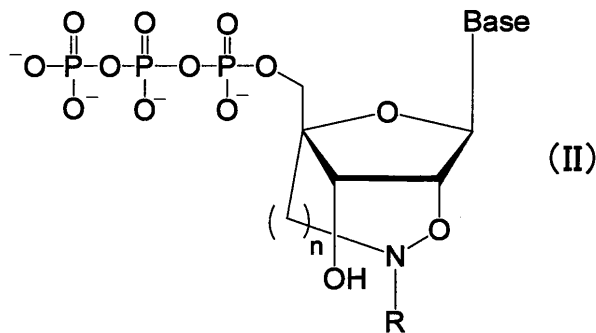
## 【請求項 1】

ヌクレアーゼ耐性核酸の調製方法であって、  
 少なくとも3つの塩基からなる核酸と、末端デオキシヌクレオチド転移酵素と、2',  
 4'-架橋型ヌクレオシド三リン酸とを混合してインキュベートする工程を含み、  
 該2', 4'-架橋型ヌクレオシド三リン酸が、以下の式 I、式 II または式 III：  
 【化 1】



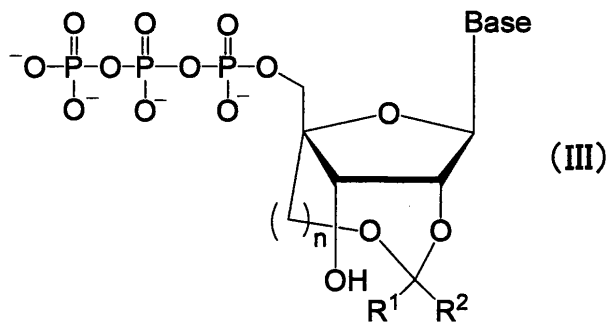
10

## 【化 2】



20

## 【化 3】



30

40

(式中、

Baseは、以下の群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいプリン-9-イル基または2-オキソ-1,2-ジヒドロピリミジン-1-イル基を表し、ここで、該群は、水酸基、炭素数1から6の直鎖アルキル基、炭素数1から6の直鎖アルコキシ基、メルカプト基、炭素数1から6の直鎖アルキルチオ基、アミノ基、炭素数1から6の直鎖アルキルアミノ基、およびハロゲン原子からなり；

Rは、水素原子、分岐または環を形成していてもよい炭素数1から7のアルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数2から7のアルケニル基、該群から選択される

50

任意の置換基を1以上有していてもよいアシル基、該群から選択される任意の置換基を有するスルホニル基、該群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数3から12のアリール基、または該群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数3から12のアリール部分を有するアラルキル基を表し；

R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は、それぞれ独立して、水素原子、分岐または環を形成していてもよい炭素数1から7のアルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数2から7のアルケニル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数2から7のアルキニル基、該群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいアシル基、該群から選択される任意の置換基を有するスルホニル基、該群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数3から12のアリール基、該群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数3から12のアリール部分を有するアラルキル基を表すか、あるいはR<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は一緒になって、該群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよい炭素数2から10のアルキレン基またはアルケニレン基を表し、ただし、R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は同時に水素原子ではなく；

mは、1から5の整数であり；そして

nは、1から5の整数である）

で表される構造を有する、方法。

【請求項2】

前記式I、式IIまたは式IIIにおいて、前記Baseが、6-アミノプリン-9-イル基、2,6-ジアミノプリン-9-イル基、2-アミノ-6-クロロプリン-9-イル基、2-アミノ-6-フルオロプリン-9-イル基、2-アミノ-6-プロモプリン-9-イル基、2-アミノ-6-ヒドロキシプリン-9-イル基、6-アミノ-2-メトキシプリン-9-イル基、6-アミノ-2-クロロプリン-9-イル基、6-アミノ-2-フルオロプリン-9-イル基、2,6-ジメトキシプリン-9-イル基、2,6-ジクロロプリン-9-イル基、6-メルカプトプリン-9-イル基、2-オキソ-4-アミノ-1,2-ジヒドロピリミジン-1-イル基、4-アミノ-2-オキソ-5-フルオロ-1,2-ジヒドロピリミジン-1-イル基、4-アミノ-2-オキソ-5-クロロ-1,2-ジヒドロピリミジン-1-イル基、2-オキソ-4-メトキシ-1,2-ジヒドロピリミジン-1-イル基、2-オキソ-4-メルカプト-1,2-ジヒドロピリミジン-1-イル基、2,4-ジヒドロキシピリミジン-1-イル基、2,4-ジヒドロキシ-5-メチルピリミジン-1-イル基、または4-アミノ-5-メチル-2-オキソ-1,2-ジヒドロピリミジン-1-イル基である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記式IIにおいて、前記Rが、水素原子、メチル基、エチル基、n-プロピル基、イソプロピル基、フェニル基、またはベンジル基である、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

前記式I、式IIまたは式IIIにおいて、前記mが1であり、そして前記nが1である、請求項1から3のいずれかの項に記載の方法。

【請求項5】

前記式I、式IIまたは式IIIにおいて、前記Baseが、2,4-ジヒドロキシ-5-メチルピリミジン-1-イル基である、請求項1から4のいずれかの項に記載の方法。

【請求項6】

前記式IIIにおいて、前記R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>のいずれか一方が、水素原子である、請求項1から5のいずれかの項に記載の方法。

【請求項7】

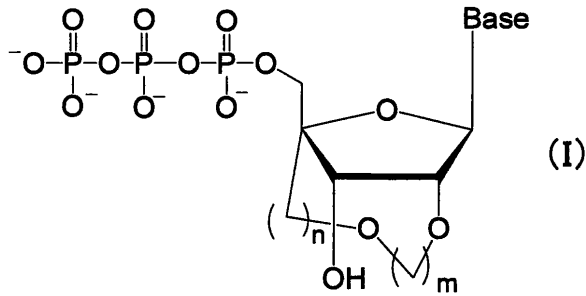
前記式IIIにおいて、前記R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>のいずれか一方が、フェニル基である、請求項1から6のいずれかの項に記載の方法。

## 【請求項 8】

末端デオキシヌクレオチド転移酵素、および 2', 4' - 架橋型ヌクレオシド三リン酸を含む、ヌクレアーゼ耐性核酸の調製用キットであって、

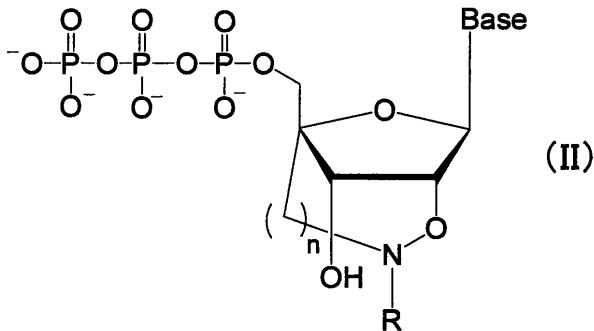
該 2', 4' - 架橋型ヌクレオシド三リン酸が、以下の式 I、式 II または式 III :

## 【化 4】



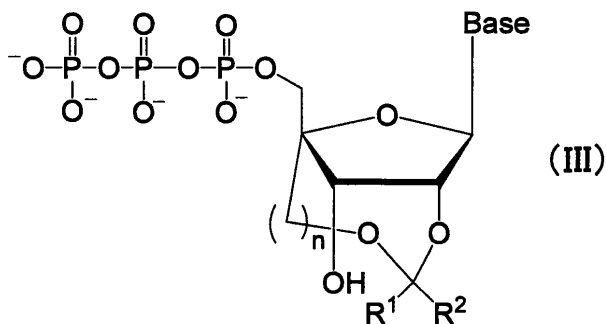
10

## 【化 5】



20

## 【化 6】



30

40

(式中、

Base は、以下の群から選択される任意の置換基を 1 以上有していてもよいプリン - 9 - イル基または 2 - オキソ - 1, 2 - ジヒドロピリミジン - 1 - イル基を表し、ここで、該群は、水酸基、炭素数 1 から 6 の直鎖アルキル基、炭素数 1 から 6 の直鎖アルコキシ基、メルカプト基、炭素数 1 から 6 の直鎖アルキルチオ基、アミノ基、炭素数 1 から 6 の直鎖アルキルアミノ基、およびハロゲン原子からなり；

R は、水素原子、分岐または環を形成していてもよい炭素数 1 から 7 のアルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数 2 から 7 のアルケニル基、該群から選択される任意の置換基を 1 以上有していてもよいアシル基、該群から選択される任意の置換基を有するスルホニル基、該群から選択される任意の置換基を 1 以上有していてもよいヘテ

50

口原子を含んでいてもよい炭素数3から12のアリール基、または該群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいヘテロ口原子を含んでいてもよい炭素数3から12のアリール部分を有するアラルキル基を表し；

R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は、それぞれ独立して、水素原子、分岐または環を形成していてもよい炭素数1から7のアルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数2から7のアルケニル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数2から7のアルキニル基、該群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいアシル基、該群から選択される任意の置換基を有するスルホニル基、該群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいヘテロ口原子を含んでいてもよい炭素数3から12のアリール基、該群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいヘテロ口原子を含んでいてもよい炭素数3から12のアリール部分を有するアラルキル基を表すか、あるいはR<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は一緒になって、該群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよい炭素数2から10のアルキレン基またはアルケニレン基を表し、ただし、R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は同時に水素原子ではなく；

mは、1から5の整数であり；そして

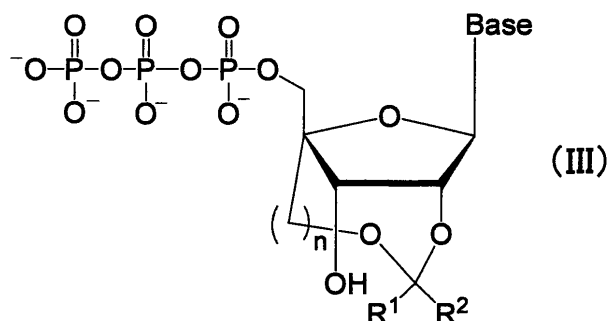
nは、1から5の整数である）

で表される構造を有する、キット。

【請求項9】

以下の式IIIで表される2', 4'-架橋型ヌクレオシド三リン酸；

【化7】



(式中、

Baseは、以下の群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいプリン-9-イル基または2-オキソ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル基を表し、ここで、該群は、水酸基、炭素数1から6の直鎖アルキル基、炭素数1から6の直鎖アルコキシ基、メルカプト基、炭素数1から6の直鎖アルキルチオ基、アミノ基、炭素数1から6の直鎖アルキルアミノ基、およびハロゲン原子からなり；

R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は、それぞれ独立して、水素原子、分岐または環を形成していてもよい炭素数1から7のアルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数2から7のアルケニル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数2から7のアルキニル基、該群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいアシル基、該群から選択される任意の置換基を有するスルホニル基、該群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいヘテロ口原子を含んでいてもよい炭素数3から12のアリール基、該群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいヘテロ口原子を含んでいてもよい炭素数3から12のアリール部分を有するアラルキル基を表すか、あるいはR<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は一緒になって、該群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよい炭素数2から10のアルキレン基またはアルケニレン基を表し、ただし、R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は同時に水素原子ではなく；

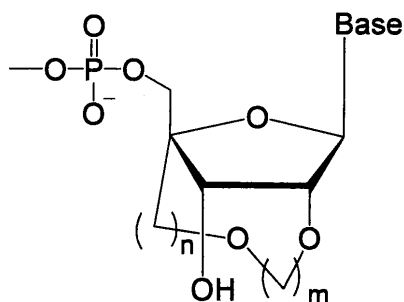
そして

nは、1から5の整数である）。

## 【請求項 10】

以下の式 I'、式 II' または式 III' で表される 2', 4'-架橋型ヌクレオチド

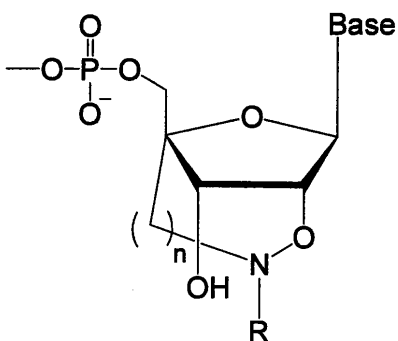
## 【化 8】



(I')

10

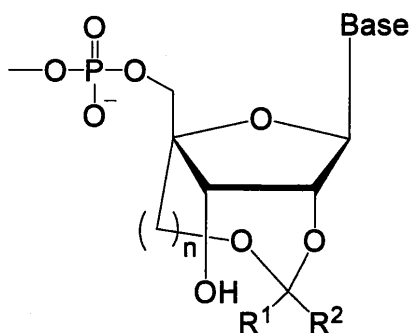
## 【化 9】



(II')

20

## 【化 10】



(III')

30

(式中、

Base は、以下の群から選択される任意の置換基を 1 以上有していてもよいプリン-9-イル基または 2-オキソ-1,2-ジヒドロピリミジン-1-イル基を表し、ここで、該群は、水酸基、炭素数 1 から 6 の直鎖アルキル基、炭素数 1 から 6 の直鎖アルコキシ基、メルカプト基、炭素数 1 から 6 の直鎖アルキルチオ基、アミノ基、炭素数 1 から 6 の直鎖アルキルアミノ基、およびハロゲン原子からなり；

40

R は、水素原子、分岐または環を形成していてもよい炭素数 1 から 7 のアルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数 2 から 7 のアルケニル基、該群から選択される任意の置換基を 1 以上有していてもよいアシル基、該群から選択される任意の置換基を有するスルホニル基、該群から選択される任意の置換基を 1 以上有していてもよいヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数 3 から 12 のアリール基、または該群から選択される任意の置換基を 1 以上有していてもよいヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数 3 から 12

50

のアリール部分を有するアラルキル基を表し；

R<sup>1</sup> および R<sup>2</sup> は、それぞれ独立して、水素原子、分岐または環を形成していてもよい炭素数 1 から 7 のアルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数 2 から 7 のアルケニル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数 2 から 7 のアルキニル基、該 群から選択される任意の置換基を 1 以上有していてもよいアシル基、該 群から選択される任意の置換基を有するスルホニル基、該 群から選択される任意の置換基を 1 以上有していてもよいヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数 3 から 12 のアリール基、該 群から選択される任意の置換基を 1 以上有していてもよいヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数 3 から 12 のアリール部分を有するアラルキル基を表すか、あるいは R<sup>1</sup> および R<sup>2</sup> は一緒になって、該 群から選択される任意の置換基を 1 以上有していてもよい炭素数 2 から 10 のアルキレン基またはアルケニレン基を表し、ただし、R<sup>1</sup> および R<sup>2</sup> は同時に水素原子ではなく；

そして

n は、1 から 5 の整数である )

を 3' 末端に有する、ヌクレアーゼ耐性核酸。

【請求項 11】

請求項 1 から 7 のいずれかの項に記載の方法により調製された、ヌクレアーゼ耐性核酸

。【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、新規核酸誘導体およびそれを用いたヌクレアーゼ耐性核酸の調製方法に関する。より詳細には、既存の機能性核酸に対して、後からヌクレアーゼ耐性を付与するための方法に関する。

【背景技術】

【0002】

核酸分子は、分子生物学や化学生物学などの種々の分野で使用され、医薬・診断薬への応用も盛んに検討されている。核酸分子をインピボで使用する場合、ヌクレアーゼ（核酸分解酵素）耐性を考慮しなくてはならない。そのため、インピトロで機能を十分に果たすという治験が得られた核酸分子であっても、改めて分子設計を行って、その核酸分子に耐性を付与しなければならない。

【0003】

これまでの研究で、架橋型ヌクレオチドを機能性核酸（アンチセンス、アプタマーなど）に導入することによって、ヌクレアーゼ耐性が向上することが知られている。例えば、二環系の糖部分を有するロックト核酸（Locked Nucleic Acid: LNA）が化学合成され、この LNA を有するオリゴヌクレオチドは、天然型のオリゴヌクレオチドよりもヌクレアーゼへの耐性が向上しており、したがって体内での安定性が改善される可能性が示唆されている（非特許文献 1）。さらに、ヌクレアーゼ耐性を付与することが可能な架橋型核酸（Bridged Nucleic Acid）が、種々設計および合成されている（非特許文献 2～4）。また、このような架橋型ヌクレオチドの三リン酸アナログを含むプライマーについて、DNA ポリメラーゼに対する影響が検討されており、糖部分の改変が、ポリメラーゼ反応に大きく影響を及ぼすことが報告されている（非特許文献 5）。

【0004】

しかし、これらの架橋型ヌクレオチドおよびそのアナログを核酸（オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド）中に付与または導入するためには、いずれも化学合成により（例えば、自動化 DNA 合成機を用いて）作成する必要がある。そのため、配列未知の DNA 鎖や 100 残基を超える長い塩基長の DNA 鎖について、従来法でヌクレアーゼ耐性を付与することは、非常に手間がかかる。

【0005】

上記架橋型ヌクレオチドである LNA については、末端デオキシヌクレオチド転移酵素

10

20

30

40

50

(TdT)によって認識され、DNAオリゴヌクレオチドに組込まれること、およびそれによってDNAオリゴヌクレオチドにヌクレアーゼ耐性が付与されることが知られている(特許文献1)。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】特表2002-521310号公報

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】C. Wahlestedtら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000年, 97巻, 10号, 5633-5638頁

10

【非特許文献2】Y. Hariら、Bioorg. Med. Chem., 2006年, 14巻, 1029-1038頁

【非特許文献3】K. Miyashitaら、Chem. Commun., 2007年, 3765-3767頁

【非特許文献4】S.M.A. Rahmanら、J. Am. Chem. Soc., 2008年, 130巻, 14号, 4886-4896頁

【非特許文献5】M. Kuwaharaら、Nucleic Acids Res., 2008年, 36巻, 13号, 4257-4265頁

【非特許文献6】S. Obikaraら、Bioorg. Med. Chem., 2001年, 9巻, 1001-1011頁

【非特許文献7】S. K. Singhら、Chem. Commun., 1998年, 455-456頁

【非特許文献8】R. D. Youssefyehら、J. Org. Chem.; 1979年, 44巻, 1301-1309頁

20

【非特許文献9】K. Morihiroら、ChemBioChem, 2009年, 10巻, 1784-1788頁

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明は、既存の機能性核酸に対して、後から簡単に優れたヌクレアーゼ耐性を付与する方法を提供すること、ならびにそれに用いるための新規な核酸誘導体を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者らは、末端デオキシヌクレオチド転移酵素(TdT)および2', 4'-架橋型ヌクレオシド三リン酸を用いることにより、一本鎖のデオキシリボヌクレオチド(DNA)の3'末端に架橋型ヌクレオチドを効率よく付加できること、ならびにこのようにして生成した3'末端修飾DNAが非常に高いヌクレアーゼ耐性を示すことを見だし、本発明を完成した。

30

【0010】

本発明は、ヌクレアーゼ耐性核酸の調製方法を提供し、該方法は、

少なくとも3つの塩基からなる核酸と、末端デオキシヌクレオチド転移酵素と、2', 4'-架橋型ヌクレオシド三リン酸とを混合してインキュベートする工程を含み、

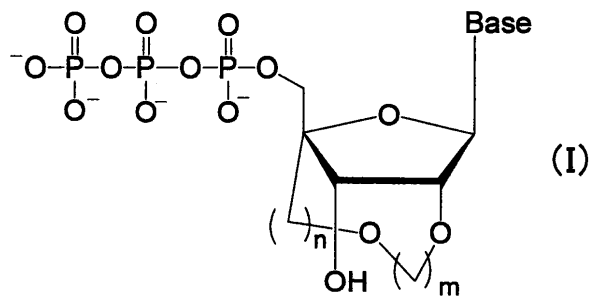
該2', 4'-架橋型ヌクレオシド三リン酸が、以下の式I、式IIまたは式III:

【0011】

40



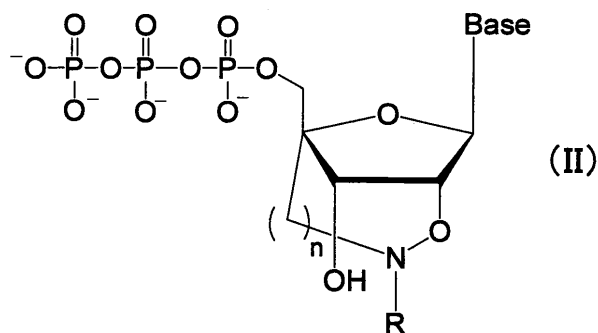
## 【化 1】



10

## 【 0 0 1 2】

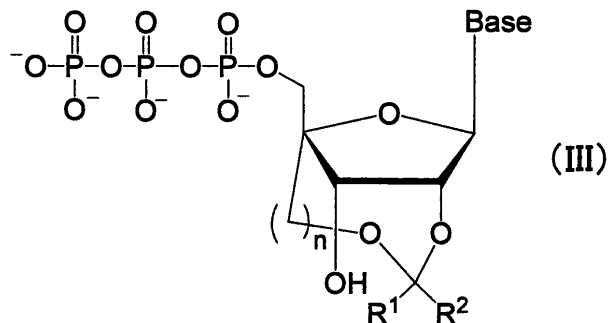
## 【化 2】



20

## 【 0 0 1 3】

## 【化 3】



30

## 【 0 0 1 4】

(式中、

40

Baseは、以下の群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいプリン-9-イル基または2-オキソ-1,2-ジヒドロピリミジン-1-イル基を表し、ここで、該群は、水酸基、炭素数1から6の直鎖アルキル基、炭素数1から6の直鎖アルコキシ基、メルカプト基、炭素数1から6の直鎖アルキルチオ基、アミノ基、炭素数1から6の直鎖アルキルアミノ基、およびハロゲン原子からなり；

Rは、水素原子、分岐または環を形成していてもよい炭素数1から7のアルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数2から7のアルケニル基、該群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいアシル基、該群から選択される任意の置換基を有するスルホニル基、該群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいヘテ

50

口原子を含んでいてもよい炭素数3から12のアリール基、または該群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数3から12のアリール部分を有するアラルキル基を表し；

R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は、それぞれ独立して、水素原子、分岐または環を形成していてもよい炭素数1から7のアルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数2から7のアルケニル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数2から7のアルキニル基、該群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいアシル基、該群から選択される任意の置換基を有するスルホニル基、該群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数3から12のアリール基、該群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数3から12のアリール部分を有するアラルキル基を表すか、あるいはR<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は一緒になって、該群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよい炭素数2から10のアルキレン基またはアルケニレン基を表し、ただし、R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は同時に水素原子ではなく；

mは、1から5の整数であり；そして

nは、1から5の整数である）

で表される構造を有する。

【0015】

1つの実施態様では、上記式I、式IIまたは式IIIにおいて、上記Baseは、6-アミノプリン-9-イル基、2,6-ジアミノプリン-9-イル基、2-アミノ-6-クロロプリン-9-イル基、2-アミノ-6-フルオロプリン-9-イル基、2-アミノ-6-プロモプリン-9-イル基、2-アミノ-6-ヒドロキシプリン-9-イル基、6-アミノ-2-メトキシプリン-9-イル基、6-アミノ-2-クロロプリン-9-イル基、6-アミノ-2-フルオロプリン-9-イル基、2,6-ジメトキシプリン-9-イル基、2,6-ジクロロプリン-9-イル基、6-メルカプトプリン-9-イル基、2-オキソ-4-アミノ-1,2-ジヒドロピリミジン-1-イル基、4-アミノ-2-オキソ-5-フルオロ-1,2-ジヒドロピリミジン-1-イル基、4-アミノ-2-オキソ-5-クロロ-1,2-ジヒドロピリミジン-1-イル基、2-オキソ-4-メトキシ-1,2-ジヒドロピリミジン-1-イル基、2-オキソ-4-メルカプト-1,2-ジヒドロピリミジン-1-イル基、2,4-ジヒドロキシピリミジン-1-イル基、2,4-ジヒドロキシ-5-メチルピリミジン-1-イル基、または4-アミノ-5-メチル-2-オキソ-1,2-ジヒドロピリミジン-1-イル基である。

【0016】

1つの実施態様では、上記式IIにおいて、上記Rは、水素原子、メチル基、エチル基、n-プロピル基、イソプロピル基、フェニル基、またはベンジル基である。

【0017】

1つの実施態様では、上記式I、式IIまたは式IIIにおいて、上記mは1であり、そして上記nも1である。

【0018】

1つの実施態様では、上記式I、式IIまたは式IIIにおいて、上記Baseは、2,4-ジヒドロキシ-5-メチルピリミジン-1-イル基である。

【0019】

1つの実施態様では、上記式IIIにおいて、上記R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>のいずれか一方は、水素原子である。

【0020】

1つの実施態様では、上記式IIIにおいて、上記R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>のいずれか一方は、フェニル基である。

【0021】

本発明はまた、末端デオキシヌクレオチド転移酵素、および2',4'-架橋型ヌクレオシド三リン酸を含む、ヌクレアーゼ耐性核酸の調製用キットを提供し、

10

20

30

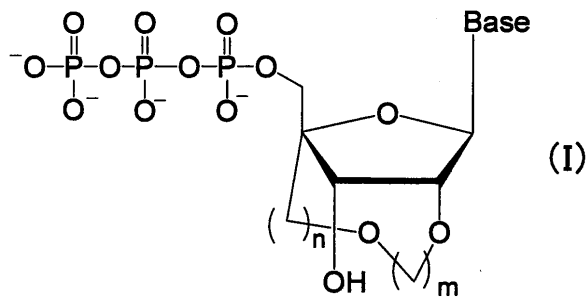
40

50

ここで、該 2', 4'-架橋型ヌクレオシド三リン酸は、以下の式 I、式 II または式 III :

【0022】

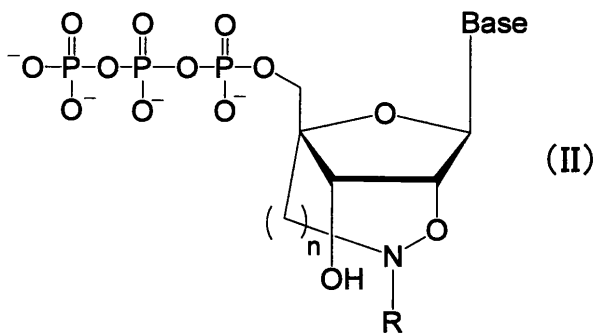
【化4】



10

【0023】

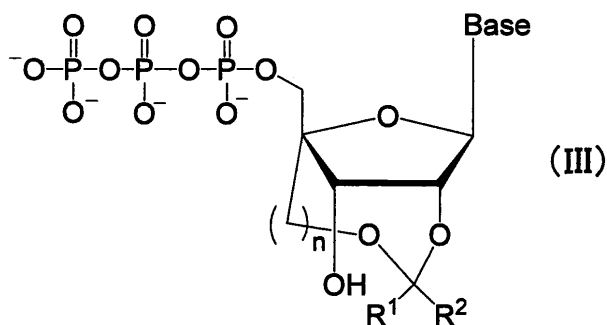
【化5】



20

【0024】

【化6】



30

40

【0025】

(式中、

Base は、以下の群から選択される任意の置換基を 1 以上有していてもよいプリン - 9 - イル基または 2 - オキソ - 1, 2 - ジヒドロピリミジン - 1 - イル基を表し、ここで、該群は、水酸基、炭素数 1 から 6 の直鎖アルキル基、炭素数 1 から 6 の直鎖アルコキシ基、メルカプト基、炭素数 1 から 6 の直鎖アルキルチオ基、アミノ基、炭素数 1 から 6 の直鎖アルキルアミノ基、およびハロゲン原子からなり；

R は、水素原子、分岐または環を形成していてもよい炭素数 1 から 7 のアルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数 2 から 7 のアルケニル基、該群から選択される任意の置換基を 1 以上有していてもよいアシル基、該群から選択される任意の置換基を

50

有するスルホニル基、該群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数3から12のアリール基、または該群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数3から12のアリール部分を有するアラルキル基を表し；

R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は、それぞれ独立して、水素原子、分岐または環を形成していてもよい炭素数1から7のアルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数2から7のアルケニル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数2から7のアルキニル基、該群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいアシル基、該群から選択される任意の置換基を有するスルホニル基、該群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数3から12のアリール基、該群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数3から12のアリール部分を有するアラルキル基を表すか、あるいはR<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は一緒になって、該群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよい炭素数2から10のアルキレン基またはアルケニレン基を表し、ただし、R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は同時に水素原子ではなく；

mは、1から5の整数であり；そして

nは、1から5の整数である）

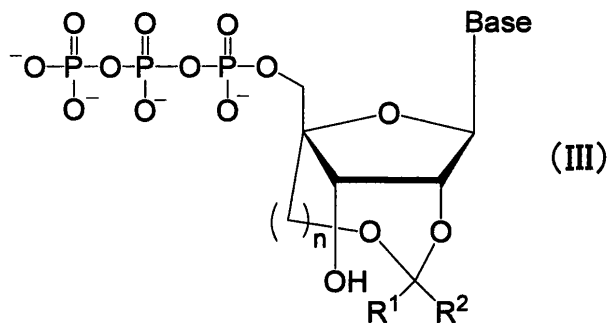
で表される構造を有する。

【0026】

本発明はまた、以下の式IIIで表される2',4'-架橋型ヌクレオシド三リン酸を提供する；

【0027】

【化7】



【0028】

(式中、

Baseは、以下の群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいプリン-9-イル基または2-オキソ-1,2-ジヒドロピリミジン-1-イル基を表し、ここで、該群は、水酸基、炭素数1から6の直鎖アルキル基、炭素数1から6の直鎖アルコキシ基、メルカプト基、炭素数1から6の直鎖アルキルチオ基、アミノ基、炭素数1から6の直鎖アルキルアミノ基、およびハロゲン原子からなり；

R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は、それぞれ独立して、水素原子、分岐または環を形成していてもよい炭素数1から7のアルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数2から7のアルケニル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数2から7のアルキニル基、該群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいアシル基、該群から選択される任意の置換基を有するスルホニル基、該群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数3から12のアリール基、該群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数3から12のアリール部分を有するアラルキル基を表すか、あるいはR<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は一緒

なって、該群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよい炭素数2から10のアルキレン基またはアルケニレン基を表し、ただし、 $R^1$ および $R^2$ は同時に水素原子ではなく；

そして

$n$ は、1から5の整数である）。

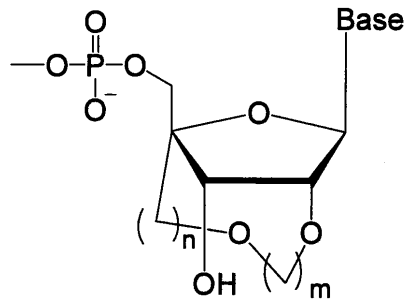
【0029】

本発明はまた、以下の式I'、式II'または式III'で表される2',4'-架橋型ヌクレオチド：

【0030】

【化8】

10

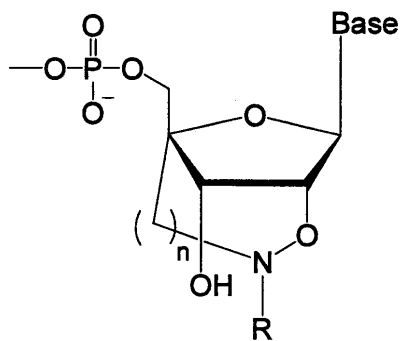


(I')

20

【0031】

【化9】

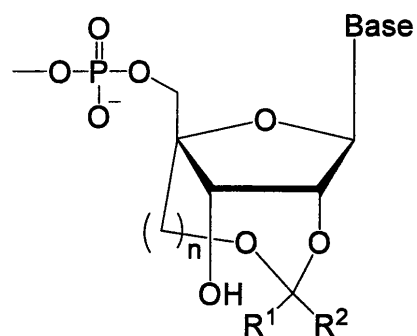


(II')

30

【0032】

【化10】



(III')

40

【0033】

(式中、

50

Base は、以下の群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいプリン-9-イル基または2-オキソ-1,2-ジヒドロピリミジン-1-イル基を表し、ここで、該群は、水酸基、炭素数1から6の直鎖アルキル基、炭素数1から6の直鎖アルコキシ基、メルカプト基、炭素数1から6の直鎖アルキルチオ基、アミノ基、炭素数1から6の直鎖アルキルアミノ基、およびハロゲン原子からなり；

R は、水素原子、分岐または環を形成していてもよい炭素数1から7のアルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数2から7のアルケニル基、該群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいアシル基、該群から選択される任意の置換基を有するスルホニル基、該群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数3から12のアリール基、または該群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数3から12のアリール部分を有するアラルキル基を表し；

R<sup>1</sup> および R<sup>2</sup> は、それぞれ独立して、水素原子、分岐または環を形成していてもよい炭素数1から7のアルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数2から7のアルケニル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数2から7のアルキニル基、該群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいアシル基、該群から選択される任意の置換基を有するスルホニル基、該群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数3から12のアリール基、該群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数3から12のアリール部分を有するアラルキル基を表すか、あるいは R<sup>1</sup> および R<sup>2</sup> は一緒になって、該群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよい炭素数2から10のアルキレン基またはアルケニレン基を表し、ただし、R<sup>1</sup> および R<sup>2</sup> は同時に水素原子ではなく；

そして

n は、1から5の整数である)

を3'末端に有する、ヌクレアーゼ耐性核酸を提供する。

【0034】

本発明はさらに、上記のいずれかの方法により調製された、新規なヌクレアーゼ耐性核酸を提供する。

【発明の効果】

【0035】

本発明によれば、既存の核酸に対してだけでなく、配列未知のDNA鎖や100残基を超える長い塩基長のDNA鎖に対しても、非常に簡便に高いヌクレアーゼ耐性を付与することが可能である。したがって、医薬および診断薬の分野、ゲノム研究の分野、特にゲノム研究用試薬の調製に有用である。

【図面の簡単な説明】

【0036】

【図1】架橋型ヌクレオシド三リン酸(KTP、LTPまたはMTP)とTdTとのインキュベーションにより得られた一本鎖DNAおよび未処理の一本鎖(ODN1)の電気泳動写真である。

【図2】架橋型ヌクレオチドが3'末端に付加された一本鎖DNA(ODN1#K、ODN1#L、ODN1#M、およびODN1#Q)および未処理の一本鎖(ODN1)の、ヌクレアーゼ処理による反応液の電気泳動写真である。

【図3】架橋型ヌクレオチドが3'末端に付加された一本鎖DNA(ODN1#K、ODN1#L、ODN1#M、およびODN1#Q)および未処理の一本鎖(ODN1)の、ヌクレアーゼ処理による残存率の経時変化を示すグラフである。

【図4】架橋型ヌクレオチドが3'末端に付加されたトロンピン結合アダプター(TBA1#K、TBA1#L、TBA1#M、およびTBA1#Q)および未処理のトロンピン結合アダプター(TBA1)の、ヌクレアーゼ処理による残存率の経時変化を示すグラフである。

10

20

30

40

50

【図5】架橋型ヌクレオチドが3'末端に付加されたトロンピン結合アダプター(TBA1#K、TBA1#L、TBA1#M、およびTBA1#Q)および未処理のトロンピン結合アダプター(TBA1)の、血清中での残存率の経時変化を示すグラフである。

【図6】架橋型ヌクレオチドが3'末端に付加されたトロンピン結合アダプター(TBA1#K、TBA1#L、TBA1#M、およびTBA1#Q)および未処理のトロンピン結合アダプター(TBA1)とトロンピンとをインキュベートした反応液についてのキャピラリー電気泳動によるエレクトログラムである。

【発明を実施するための形態】

【0037】

まず、本明細書中で用いられる用語を定義する。

10

【0038】

本明細書において、用語「炭素数1から6の直鎖アルキル基」は、炭素数1~6の任意の直鎖アルキル基をいい、具体的にはメチル基、エチル基、n-プロピル基、n-ブチル基、n-ペンチル基、またはn-ヘキシル基をいう。

【0039】

本明細書において、用語「炭素数1から6の直鎖アルコキシ基」は、炭素数1~6の任意の直鎖アルキル基を有するアルコキシ基を包含する。例えば、メチルオキシ基、エチルオキシ基、n-プロピルオキシ基などが挙げられる。

【0040】

本明細書において、用語「炭素数1から6の直鎖アルキルチオ基」は、炭素数1~6の任意の直鎖アルキル基を有するアルキルチオ基を包含する。例えば、メチルチオ基、エチルチオ基、n-プロピルチオ基などが挙げられる。

20

【0041】

本明細書において、用語「炭素数1から6の直鎖アルキルアミノ基」は、炭素数1~6の任意の直鎖アルキル基を有するアルキルアミノ基を1つまたは2つ有するアルキルアミノ基を包含する。例えば、メチルアミノ基、ジメチルアミノ基、エチルアミノ基、メチルエチルアミノ基、ジエチルアミノ基などが挙げられる。

【0042】

本明細書において、用語「分岐または環を形成していてもよい炭素数1から7のアルキル基」は、炭素数1~7の任意の直鎖アルキル基、炭素数3~7の任意の分岐鎖アルキル基、および炭素数3~7の任意の環状アルキル基を包含する。例えば、炭素数1~7の任意の直鎖アルキル基としては、メチル基、エチル基、n-プロピル基、n-ブチル基、n-ペンチル基、n-ヘキシル基、およびn-ヘプチル基が挙げられ、炭素数3~7の任意の分岐鎖アルキル基としては、イソプロピル基、イソブチル基、tert-ブチル基、イソペンチル基などが挙げられ、そして炭素数3~7の任意の環状アルキル基としては、シクロブチル基、シクロペンチル基、シクロヘキシル基などが挙げられる。

30

【0043】

本明細書において、用語「分岐または環を形成していてもよい炭素数2から7のアルケニル基」は、炭素数2~7の任意の直鎖アルケニル基、炭素数3~7の任意の分岐鎖アルケニル基、および炭素数3~7の任意の環状アルケニル基を包含する。例えば、炭素数2~7の任意の直鎖アルケニル基としては、エテニル基、1-プロペニル基、2-プロペニル基、1-ブテニル基、2-ブテニル基、1-ペンテニル基、2-ペンテニル基、3-ペンテニル基、4-ペンテニル基、1-ヘキセニル基などが挙げられ、炭素数3~7の任意の分岐鎖アルケニル基としては、イソプロペニル基、1-メチル-1-プロペニル基、1-メチル-2-プロペニル基、2-メチル-1-プロペニル基、2-メチル-2-プロペニル基、1-メチル-2-ブテニル基などが挙げられ、そして炭素数3~7の任意の環状アルケニル基としては、シクロブテニル基、シクロペンテニル基、シクロヘキセニル基などが挙げられる。

40

【0044】

本明細書において、用語「ヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数3から12のアリール

50

基」は、炭化水素のみで構成された炭素数 6 ~ 12 の任意の芳香族炭化水素および環構造にヘテロ原子（窒素原子、酸素原子、または硫黄原子）を含む炭素数 3 ~ 12 の任意の複素芳香族化合物を包含する。炭化水素のみで構成された炭素数 6 ~ 12 の芳香族炭化水素としては、フェニル基、ナフチル基、インデニル基、アズレニル基などが挙げられ、そして環構造にヘテロ原子を含む炭素数 3 ~ 12 の任意の複素芳香族化合物としては、ピリジル基、ピロリル基、キノリル基、インドリル基、イミダゾリル基、フリル基、チエニル基などが挙げられる。

【0045】

本明細書において、用語「ヘテロ原子を含んでもよい炭素数 3 から 12 のアリアル部分を有するアルキル基」の例としては、ベンジル基、フェネチル基、ナフチルメチル基、3 - フェニルプロピル基、2 - フェニルプロピル基、4 - フェニルブチル基、2 - フェニルブチル基、ピリジルメチル基、インドリルメチル基、フリルメチル基、チエニルメチル基、ピロリルメチル基、2 - ピリジルエチル基、1 - ピリジルエチル基、3 - チエニルプロピル基などが挙げられる。

10

【0046】

本明細書において、用語「炭素数 2 から 10 のアルキレン基またはアルケニレン基」の例としては、メチレン基、エチレン基、プロピレン基、ペンテニレン基、ヘキセニレン基、ビニレン基、プロペニレン基、ブタジエニレン基などが挙げられる。

【0047】

以下、本発明について詳述する。

20

【0048】

本発明のヌクレアーゼ耐性核酸の調製方法は、少なくとも 3 つの塩基からなる核酸と、末端デオキシヌクレオチド転移酵素と、2' , 4' - 架橋型ヌクレオシド三リン酸とを混合してインキュベートする工程を含む。

【0049】

本発明において、ヌクレアーゼ耐性を付与する対象となる核酸は、デオキシリボ核酸 (DNA) およびリボ核酸 (RNA) のいずれであってもよい。核酸の塩基長は、少なくとも 3 つの塩基長であれば、特に限定されない。核酸は、天然物から単離した核酸、組換え発現させた核酸、化学的に合成した核酸、酵素的に合成した核酸のいずれの由来であってもよい。また、核酸中に、人工的に改変された塩基および修飾塩基 (メチル化など) を含んでもよい。また、蛍光物質などの標識物質が結合されていてもよい。本発明においては、好適な対象となり得る核酸としては、アンチセンス DNA 分子、アンチジーン DNA 分子、DNA アプタマー、DNA ザイム、siRNA などの種々の機能性核酸が挙げられる。

30

【0050】

本発明においてヌクレアーゼとは、DNA または RNA の糖とリン酸の間のホスホジエステル結合を加水分解してヌクレオチドとする核酸分解酵素をいう。ヌクレアーゼは、生体内または細胞中に遍在するため、外因性の核酸が生体内または細胞中に入ると、この酵素によって分解され得る。本発明においては、このようなヌクレアーゼによる分解を防止するために、核酸にヌクレアーゼ耐性を付与する。

40

【0051】

ヌクレアーゼとしては、DNA 特異的なデオキシリボヌクレアーゼ、RNA 特異的なリボヌクレアーゼ、ならびに DNA および RNA のいずれにも作用するヌクレアーゼが挙げられる。また、一本鎖 DNA、二本鎖 DNA、一本鎖 RNA、ならびに DNA - RNA ハイブリッドのいずれに作用するヌクレアーゼも挙げられる。本発明においては、好ましくは、核酸配列の外側から、すなわち、核酸の 5' 末端または 3' 末端から分解するエキソヌクレアーゼ、より好ましくは 3' 末端から分解するエキソヌクレアーゼに対して、耐性が付与され得る。

【0052】

本発明の方法に用いられる末端デオキシヌクレオチド転移酵素 (TdT) は、鋳型に依

50



存せずに、二本鎖および一本鎖 DNA の 3' - OH 末端へ、デオキシリボースを有するヌクレオチドを連結させる（付加する）反応を触媒する酵素である。TdT は、放射性標識ヌクレオチドやジゴキシゲニンやビオチンのようなハプテンで標識されたヌクレオチドも基質として利用し得る。本発明において用いる TdT の由来は、特に限定されず、市販の TdT を用い得る。

【0053】

TdT の 1 ユニットは、通常、 $d(pT)_6$  をプライマーとして用いて、 $120 \mu\text{L}$  の反応液（ $120 \text{ mM}$  のカコジル酸カリウム、 $1 \text{ mM}$  の  $\text{CoCl}_2$ 、 $1 \text{ mM}$  の  $d\text{TTP}$ 、 $0.1 \text{ OD}$  の  $d(pT)_6$ 、および  $6.25 \text{ pmol}$  の  $[^3\text{H}] - d\text{TTP}$ ）中、 $37^\circ\text{C}$  にて 30 分間の反応させた場合に、 $1 \text{ nmol}$  の  $d\text{AMP}$  を酸沈殿産物に取り込む活性量として表される。

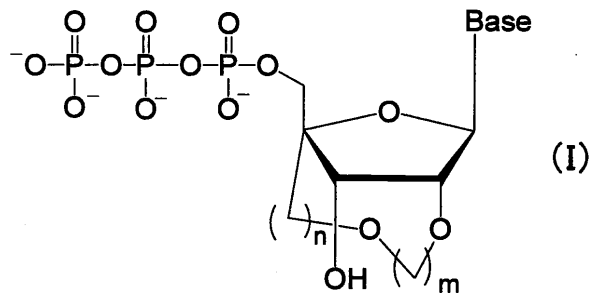
10

【0054】

本発明の方法で用いられる 2', 4' - 架橋型ヌクレオシド三リン酸は、以下の式 I、式 II または式 III :

【0055】

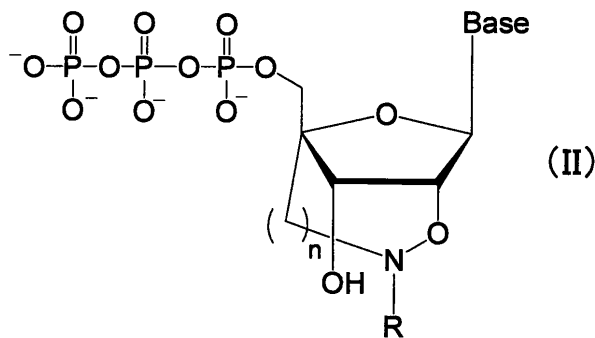
【化 1 1】



20

【0056】

【化 1 2】

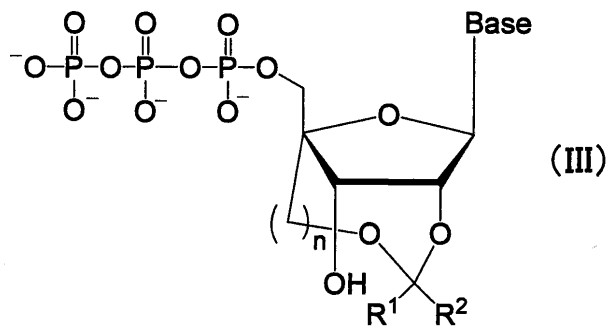


30

【0057】

40

## 【化 1 3】



10

## 【0058】

(式中、

Baseは、以下の群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいプリン-9-イル基または2-オキソ-1,2-ジヒドロピリミジン-1-イル基を表し、ここで、該群は、水酸基、炭素数1から6の直鎖アルキル基、炭素数1から6の直鎖アルコキシ基、メルカプト基、炭素数1から6の直鎖アルキルチオ基、アミノ基、炭素数1から6の直鎖アルキルアミノ基、およびハロゲン原子からなり;

20

Rは、水素原子、分岐または環を形成していてもよい炭素数1から7のアルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数2から7のアルケニル基、該群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいアシル基、該群から選択される任意の置換基を有するスルホニル基、該群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数3から12のアリール基、または該群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数3から12のアリール部分を有するアラルキル基を表し;

30

R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は、それぞれ独立して、水素原子、分岐または環を形成していてもよい炭素数1から7のアルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数2から7のアルケニル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数2から7のアルキニル基、該群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいアシル基、該群から選択される任意の置換基を有するスルホニル基、該群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数3から12のアリール基、該群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数3から12のアリール部分を有するアラルキル基を表すが、あるいはR<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は一緒になって、該群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよい炭素数2から10のアルキレン基またはアルケニレン基を表し、ただし、R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は同時に水素原子ではなく;

mは、1から5の整数であり;そして

nは、1から5の整数である)

40

で表される構造を有する。

## 【0059】

上記式I、式IIまたは式IIIにおいて、Baseは、プリン塩基(すなわち、プリン-9-イル基)またはピリミジン塩基(すなわち、2-オキソ-1,2-ジヒドロピリミジン-1-イル基)である。これらの塩基は、水酸基、炭素数1から6の直鎖アルキル基、炭素数1から6の直鎖アルコキシ基、メルカプト基、炭素数1から6の直鎖アルキルチオ基、アミノ基、炭素数1から6の直鎖アルキルアミノ基、およびハロゲン原子からなる群より選択される任意の置換基を1以上有していてもよい。

## 【0060】

上記の塩基(Base)の具体例としては、6-アミノプリン-9-イル基(アデニニ

50

ル基)、2,6-ジアミノプリン-9-イル基、2-アミノ-6-クロロプリン-9-イル基、2-アミノ-6-フルオロプリン-9-イル基、2-アミノ-6-ブロモプリン-9-イル基、2-アミノ-6-ヒドロキシプリン-9-イル基(グアニニル基)、6-アミノ-2-メトキシプリン-9-イル基、6-アミノ-2-クロロプリン-9-イル基、6-アミノ-2-フルオロプリン-9-イル基、2,6-ジメトキシプリン-9-イル基、2,6-ジクロロプリン-9-イル基、6-メルカプトプリン-9-イル基、2-オキソ-4-アミノ-1,2-ジヒドロピリミジン-1-イル基(シトシニル基)、4-アミノ-2-オキソ-5-フルオロ-1,2-ジヒドロピリミジン-1-イル基、4-アミノ-2-オキソ-5-クロロ-1,2-ジヒドロピリミジン-1-イル基、2-オキソ-4-メトキシ-1,2-ジヒドロピリミジン-1-イル基、2-オキソ-4-メルカプト-1,2-ジヒドロピリミジン-1-イル基、2,4-ジヒドロキシピリミジン-1-イル基(ウラシニル基)、2,4-ジヒドロキシ-5-メチルピリミジン-1-イル基(チミニル基)、および4-アミノ-5-メチル-2-オキソ-1,2-ジヒドロピリミジン-1-イル基が挙げられる。

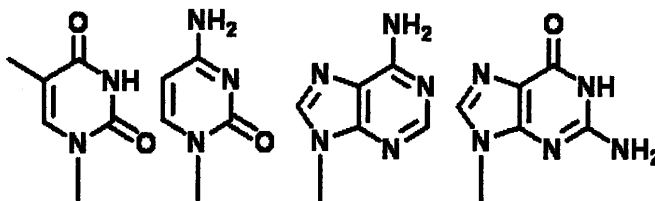
10

【0061】

中でも、Baseは、TdTのより好適な基質となり得る点で、以下の構造式：

【0062】

【化14】



20

【0063】

でそれぞれ表される、2,4-ジヒドロキシ-5-メチルピリミジン-1-イル基(チミニル基)、2-オキソ-4-アミノ-1,2-ジヒドロピリミジン-1-イル基(シトシニル基)、6-アミノプリン-9-イル基(アデニル基)、および2-アミノ-6-ヒドロキシプリン-9-イル基(グアニニル基)が好適であり、特に、2,4-ジヒドロキシ-5-メチルピリミジン-1-イル基(チミニル基)が好適である。

30

【0064】

上記式I Iにおいて、Rは、水素原子、分岐または環を形成していてもよい炭素数1から7のアルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数2から7のアルケニル基、該群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいアシル基、該群から選択される任意の置換基を有するスルホニル基、該群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数3から12のアリール基、または該群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数3から12のアリール部分を有するアラルキル基である。より好適には、Rは

40

【0065】

上記式I I Iにおいて、R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は、それぞれ独立して、水素原子、分岐または環を形成していてもよい炭素数1から7のアルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数2から7のアルケニル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数2から7のアルキニル基、該群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいアシル基、該群から選択される任意の置換基を有するスルホニル基、該群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数3から12のアリール基、該群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいヘテロ原子を含ん

50

でいてもよい炭素数 3 から 12 のアリール部分を有するアラルキル基を表すか、あるいは  $R^1$  および  $R^2$  は一緒になって、該群から選択される任意の置換基を 1 以上有していてもよい炭素数 2 から 10 のアルキレン基またはアルケニレン基を表し、ただし、 $R^1$  および  $R^2$  は同時に水素原子ではない。より好適には、上記  $R^1$  および  $R^2$  のいずれか一方は、水素原子であり、他方は、フェニル基である。

【0066】

上記式 I、式 II または式 III において、 $n$  は、1 から 5 の整数であり、好ましくは 1 または 2 であり、より好ましくは 1 である。

【0067】

上記式 I において、 $m$  は、1 から 5 の整数であり、好ましくは 1 または 2 であり、より好ましくは 1 である。

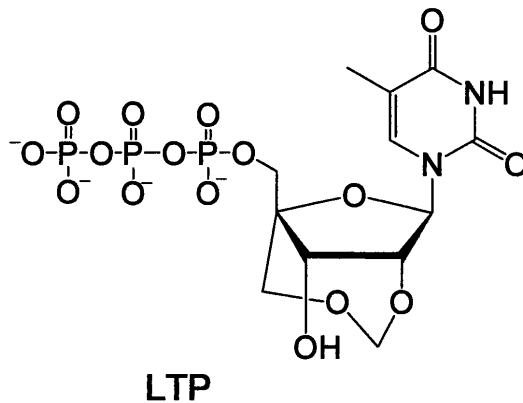
10

【0068】

上記式 I、式 II および式 III で表される 2', 4'-架橋型ヌクレオシド三リン酸の代表的な例として、Base がチミン基であり、R が水素原子であり、 $R^1$  および  $R^2$  がそれぞれ水素原子およびフェニル基であり、そして  $m$  および  $n$  がいずれも 1 である場合のそれぞれの構造式（それぞれ LTP、MTP、QTP と称する）を以下に示す。

【0069】

【化15】

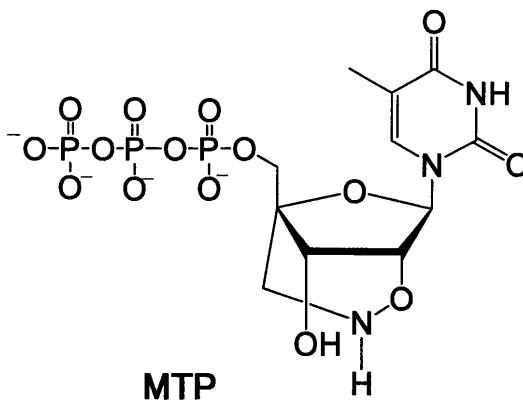


20

30

【0070】

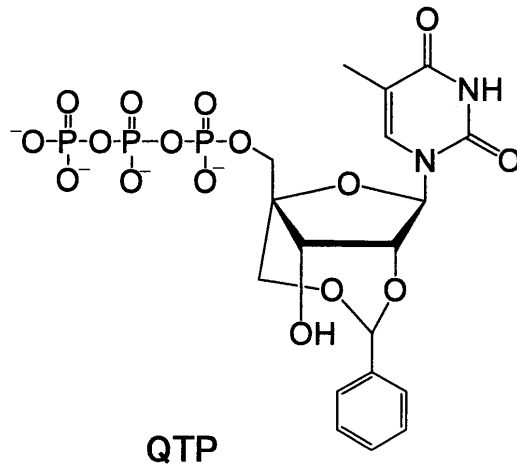
【化16】



40

【0071】

## 【化 17】



10

## 【0072】

このような2',4'-架橋型ヌクレオシド三リン酸は、非特許文献1~4または6に記載の方法によって任意のヌクレオシド(天然型あるいは非架橋型)から2',4'-架橋型ヌクレオシドを調製し、さらに非特許文献5に記載の方法に従って三リン酸化することによって調製することができる。2',4'-架橋型ヌクレオシドは、市販のものを用いてもよい。

20

## 【0073】

本発明の方法では、少なくとも3つの塩基からなる核酸と、末端デオキシヌクレオチド転移酵素(TdT)と、2',4'-架橋型ヌクレオシド三リン酸とを混合してインキュベートする工程により、ヌクレアーゼ耐性核酸を調製することができる。

## 【0074】

このインキュベートする工程において、耐性を付与すべき核酸に対する、2',4'-架橋型ヌクレオシド三リン酸の量は特に限定されないが、効率よく確実に核酸の3'末端に付加するために過剰量であることが好ましい。また、TdTの使用量も特に限定されず、核酸の量に応じて適宜設定され得る。反応液の組成も、TdTの活性が発揮されれば特に限定されない。市販のTdTを用いる場合は、TdTに添付されているバッファー溶液を用いることが好ましい。

30

## 【0075】

また、インキュベート条件も、通常TdTの活性を発揮させるに適する条件であれば、特に限定されず、用いるTdTに応じて適宜設定される。例えば、インキュベート温度は、30~40、好適には37であり得る。インキュベート時間も、TdTの量、核酸および2',4'-架橋型ヌクレオシド三リン酸の量に応じて適宜設定される。

## 【0076】

このようにして、入手の容易なTdTと、2',4'-架橋型ヌクレオシド三リン酸とを用いて、当業者が一般的に用いる条件下でインキュベートするという極めて簡単な操作により、任意の核酸の3'末端に2',4'-架橋型ヌクレオチドを付加することができる。

40

## 【0077】

また、ヌクレアーゼ耐性核酸の調製のために、2',4'-架橋型ヌクレオシド三リン酸とTdTとは、キットの形態で提供されてもよい。このようなキットには、上記のインキュベートを行うために適切なバッファー溶液、使用指示書なども含まれ得る。

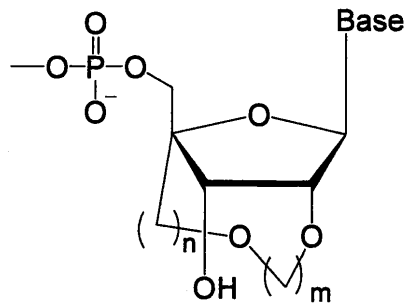
## 【0078】

上記方法により得られる生成物は、以下の式I'、式II'または式III'

## 【0079】

50

【化 1 8】

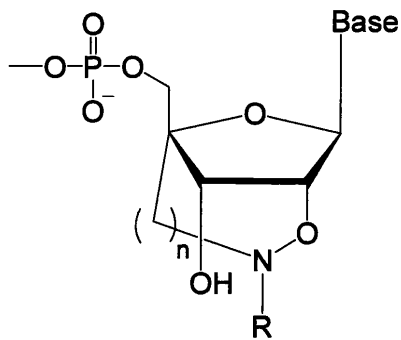


(I')

10

【 0 0 8 0】

【化 1 9】

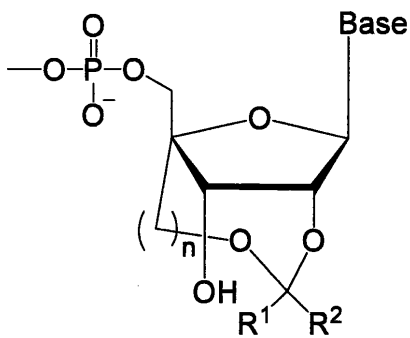


(II')

20

【 0 0 8 1】

【化 2 0】



(III')

30

【 0 0 8 2】

を 3' 末端に有する核酸である。

40

【 0 0 8 3】

これらの 2', 4' - 架橋型ヌクレオチドが付加した核酸は、ヌクレアーゼに対する耐性が付与された新規な核酸である。したがって、ヌクレアーゼが存在するインビボにおいて、所望の核酸の機能をより効果的に発揮させることができる。

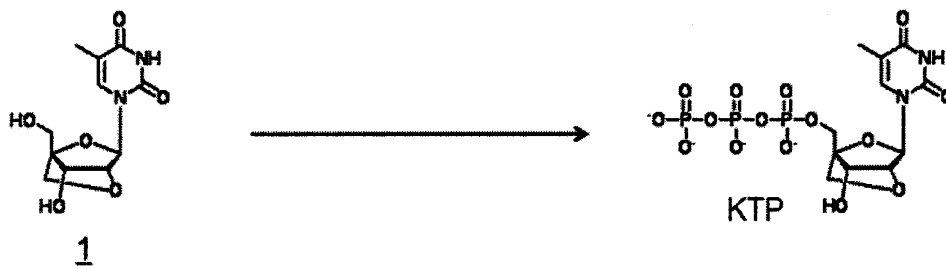
【実施例】

【 0 0 8 4】

(参考調製例 1 : 5 - メチル - 2' - O , 4' - C - メチレンウリジン - 5' - 三リン酸 (KTP) の調製)

【 0 0 8 5】

## 【化 2 1】



10

## 【0086】

非特許文献5の記載に従ってKTPを調製した。まず、5-メチル-2'-O, 4'-C-メチレンウリジン(ヌクレオシド1:非特許文献6に従って合成)(100mg, 0.370mmol)およびN,N,N',N'-テトラメチル-1,8-ナフタレンジアミン(Proton Sponge(登録商標):119mg;0.555mmol;1.5当量)をフラスコに入れ、真空下で一晩乾燥させた。次いで、トリメチルリン酸(2.6mL)をアルゴン雰囲気下でフラスコに入れ、混合物を0℃まで冷却した。次いで、オキシ塩化リン(42μL;0.444mmol;1.2当量)を滴下し、反応混合物を0℃にて攪拌した。45分後、n-トリブチルアミン(328μL;1.37mmol;3.7当量)およびn-ピロリン酸n-トリブチルアミン(0.5MのDMF溶液を3.7mL;1.85mmol;5当量)を0℃にて添加し、反応混合物を室温まで温め、さらに1時間攪拌した後、炭酸水素トリエチルアンモニウム(1.0M水溶液)で反応をクエンチした。溶媒を真空下で除去し、そして残渣を水に溶解した。この残渣を、0.05~1.0Mの炭酸水素トリエチルアンモニウム緩衝液(pH8)の直線グラジエントでSephadex(登録商標)DEAE A-25カラムを用いて精製した。対応する画分を合わせ、減圧下でエバポレートした。過剰のピロリン酸を除去するために、残渣を、10mM酢酸トリエチルアンモニウム緩衝液(pH7)中0%(v/v)~20%(v/v)アセトニトリルの直線グラジエントでの逆相MPLCにより精製した。さらなる精製を、50mM酢酸トリエチルアンモニウム緩衝液中0%(v/v)~4.9%(v/v)アセトニトリルの直線グラジエントでの逆相HPLC(20×250mm)で行い、架橋型ヌクレオシド三リン酸KTPを得た(24.8μmol:収率6.7%)。

20

30

## 【0087】

得られたKTPのスペクトルデータは、以下のとおりであった:<sup>1</sup>H NMR(500 MHz, D<sub>2</sub>O) 7.55(s, 1H), 5.48(s, 1H), 4.36-4.12(m, 4H), 3.95-3.75(m, 2H), 1.75(s, 3H);<sup>31</sup>P NMR(500 MHz, D<sub>2</sub>O) -10.35(d), -11.17(d), -22.81(t);ESI-MS(ネガティブイオンモード)m/z, 実測値=508.8, 計算値[(M-H)<sup>-</sup>]=508.98。

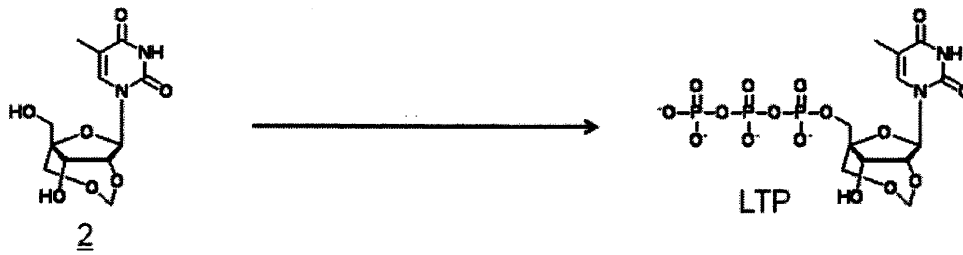
## 【0088】

(調製例1:5-メチル-2'-O, 4'-C-(メチレンオキシメチレン)ウリジン-5'-三リン酸(LTP)の調製)

40

## 【0089】

## 【化22】



10

## 【0090】

非特許文献5の記載に従ってLTPを調製した。ヌクレオシド1の代わりに5-メチル-2'-O, 4'-C-(メチレンオキシメチレン)ウリジン(ヌクレオシド2:非特許文献2に従って合成)(106mg, 0.353mmol)を用いたこと以外は、上記参考調製例1と同様の手順で、架橋型ヌクレオシド三リン酸LTPを得た(18.7μmol:収率5.3%)。

## 【0091】

得られたLTPのスペクトルデータは、以下のとおりであった:<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O) 7.67 (s, 1H), 5.84 (s, 1H), 5.06-4.99 (m, 2H), 4.49-4.48 (m, 1H), 4.30-4.23 (m, 1H), 4.30-4.23 (m, 1H), 4.13-3.97 (m, 2H), 3.73-3.65 (m, 2H), 1.75 (s, 3H);<sup>3</sup>P NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O) -12.42 (d), -14.44 (d), -25.39 (t); ESI-MS (ネガティブイオンモード) m/z, 実測値 = 538.8, 計算値 [(M-H)<sup>-</sup>] = 538.99。

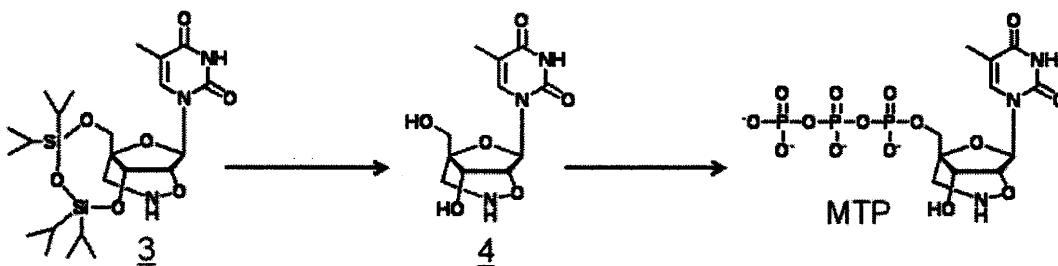
20

## 【0092】

(調製例2:5-メチル-2'-O, 4'-C-(アミノメチレン)ウリジン-5'-三リン酸(MTP)の調製)

## 【0093】

## 【化23】



30

## 【0094】

非特許文献5の記載に従ってMTPを調製した。まず、トリエチルアミン三フッ化水素(313μL; 1.91mmol; 5当量)を、ヌクレオシド3(非特許文献4に従って合成)(201mg; 0.381mmol)のTHF溶液(4.1mL)に攪拌しながら加えた。反応混合物を、室温で3時間攪拌した。エバポレーション後、残渣を、逆相カラムクロマトグラフィー(0%(v/v)~5%(v/v)のアセトニトリル水溶液)により精製した。ヌクレオシド4を含む残渣を、メタノールに溶解し、結晶化して、ヌクレオシド4を定量的収率で得た(108mg; 0.379mmol)。

40

## 【0095】

得られたヌクレオシド4のスペクトルデータは、以下のとおりであった:<sup>1</sup>H NMR (300MHz, CD<sub>3</sub>OD) 8.13 (d, J = 1 Hz, 1H), 6.24 (s, 1H), 4.23 (d, J = 3 Hz, 1H), 4.16 (d, J = 3 Hz, 1H), 3.71 (q, J = 13 Hz, 2H), 3.55 (d, J = 12 Hz, 1H), 2.51 (d, J =

50



13 Hz, 1H), 1.87 (d, J = 1 Hz, 3H); ESI-MS (ポジティブイオンモード) m/z, 実測値 = 308.1, 計算値 [(M+Na)<sup>+</sup>] = 308.1。

【0096】

次いで、ヌクレオシド1の代わりにヌクレオシド4 (57.8 mg, 0.203 mmol) を用いたこと以外は、上記参考調製例1と同様の手順で、架橋型ヌクレオシド三リン酸MTPを得た (3.19 μmol; 収率1.6%)。

【0097】

得られたMTPのスペクトルデータは、以下のとおりであった: <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O) 7.75 (s, 1H), 6.06 (s, 1H), 4.36-4.33 (m, 1H), 4.14-3.95 (m, 3H), 3.50 (d, J = 13 Hz, 1H), 2.71 (d, J = 14 Hz, 1H), 1.75 (s, 3H); <sup>31</sup>P NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O) -13.51 (d), -14.46 (d), -25.90 (t); ESI-MS (ネガティブイオンモード) m/z, 実測値 = 523.9, 計算値 [(M-H)<sup>-</sup>] = 524.0。

10

【0098】

(実施例1: 末端デオキシヌクレオチド転移酵素 (TdT) による架橋型ヌクレオチドのDNA 3'末端への付加反応)

5'末端を蛍光標識化した26merの一本鎖DNA (ggcgttgagtgagtgaatgagtgagt: 配列番号1) (ODN1; 0.4 μM) (株式会社日本バイオサービスより購入)、末端デオキシヌクレオチド転移酵素 (TdT; 0.125、0.150、または0.175 ユニット/μL) (タカラバイオ株式会社より購入)、この酵素に添付のバッファー溶液 (1×) および200 μMの上記調製例1~3で得た架橋型ヌクレオシド三リン酸 (KTP、LTPまたはMTP) を含む20 μLの反応液をそれぞれ調製し、37°Cで60分間インキュベートした。反応終了後、反応液に0.4 μLの色素液 (0.1% (v/v) プロモフェノールブルー) および2.4 μLの7Mの尿素溶液 (3mMのEDTA) を加えた後、94°Cで熱変性させ、20% (w/v) ポリアクリルアミド変性ゲルを用いて電気泳動を行った (変性PAGE; 300V、49、150分)。泳動後、モレキュラー・イメージャー (BioRad社製) を用いてレーザー照射 (488nm) し、ゲルを可視化した。得られたゲルの写真を図1に示す。

20

【0099】

図1からわかるように、一本鎖DNA (ODN1) を架橋型ヌクレオシド三リン酸とTdTとで処理することにより、分子量がわずかに大きなDNA、すなわち、架橋型ヌクレオチドが付加されたDNAが得られることがわかった。また、この付加されたDNAは、酵素TdTの用量依存的に生じることもわかった。

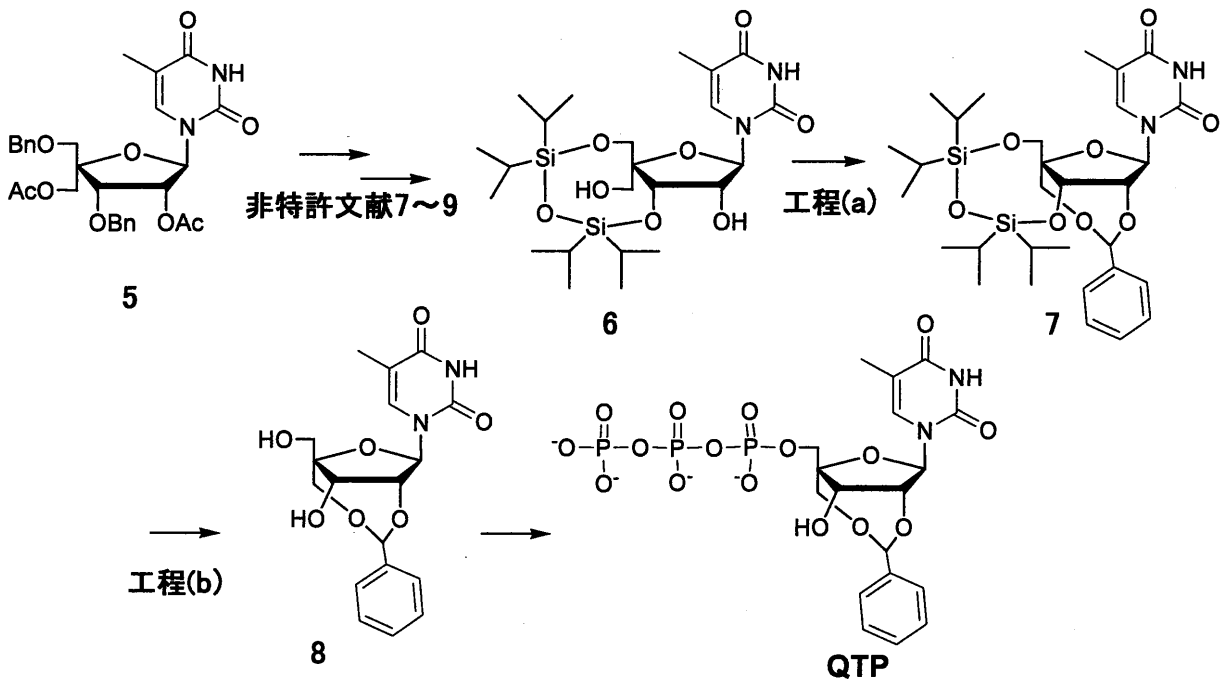
30

【0100】

(調製例3: 5-メチル-2'-O, 4'-C-(ベンジルオキシメチレン)ウリジン-5'-三リン酸 (QTP) の調製)

【0101】

## 【化 2 4】



10

20

工程(a): ベンズアルデヒド,  $ZnCl_2$ , 室温, 14時間 (収率78%);  $0^\circ C$ , 1時間 (収率96%)

工程(b): フッ化テトラブチルアンモニウム(TBAF), テトラヒドロフラン(THF)

## 【 0 1 0 2】

非特許文献7~9に従って、ヌクレオシド5からヌクレオシド6を合成した。窒素気流下、得られたヌクレオシド6 (370 mg; 0.698 mmol) の無水ベンズアルデヒド溶液 (3.7 mL) に塩化亜鉛 (114 mg; 0.838 mmol) を加え、室温で14時間攪拌した。氷冷下、飽和重曹水を加えて酢酸エチルで抽出し、有機層を水および飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒留去後、得られた粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー (n-ヘキサン: 酢酸エチル = 3:1 (v/v)) により精製し、ヌクレオシド7 (338 mg; 収率78%) を白色泡状物質として得た。

30

## 【 0 1 0 3】

得られたヌクレオシド7の物性データは、以下のとおりであった: 融点:  $103 \sim 105^\circ C$ ;  $[\alpha]_D^{26} -7.5$  (c 1.00,  $CHCl_3$ ); IR max (KBr): 1271, 1464, 1693, 2868, 2946, 3035, 3176  $cm^{-1}$ ;  $^1H$  NMR (270 MHz,  $CDCl_3$ ): 1.08-1.12 (28H, m), 1.92 (3H, d,  $J = 1$  Hz), 3.70 (1H, d,  $J = 13$  Hz), 3.76 (1H, d,  $J = 13$  Hz), 3.93 (1H, d,  $J = 12$  Hz), 4.05 (1H, d,  $J = 13$  Hz), 4.43 (1H, d,  $J = 6$  Hz), 4.71 (1H, d,  $J = 6$  Hz), 6.22 (1H, s), 6.24 (1H, s), 7.36-7.64 (6H, m), 8.02 (1H, brs);  $^{13}C$  NMR (67.8 MHz,  $CDCl_3$ ): 12.4, 12.6, 12.6, 12.7, 13.4, 16.9, 17.1, 17.2, 17.2, 17.3, 17.4, 60.2, 68.8, 70.6, 79.0, 88.9, 92.7, 103.9, 110.1, 126.1, 128.3, 128.9, 135.5, 139.1, 149.7, 163.9; MS (FAB):  $m/z$  619 (M+H)<sup>+</sup>; HRMS (FAB): 計算値  $C_{30}H_{47}N_2O_8Si_2$  [(M+H)<sup>+</sup>] = 619.2871, 実測値 = 619.2908。

40

## 【 0 1 0 4】

次いで、ヌクレオシド7 (22.0 mg; 0.0356 mmol) のテトラヒドロフラン溶液 (0.9 mL) に、テトラブチルアンモニウムフルオリド (テトラヒドロフラン中 1.0 M; 0.0712 mL; 0.0712 mmol) を加え、氷冷下で1時間攪拌した。溶媒留去後、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (酢酸エチル) により精製し、ヌク

50

レオシド 8 ( 1 2 . 9 m g : 収率 9 6 % ) を白色固体として得た。

【 0 1 0 5 】

得られたヌクレオシド 8 の物性データは、以下のとおりであった：融点：122 ~ 125 ;  
 $[\eta]_D^{24} + 17.9$  (c 1.00, メタノール) ; IR max (KBr) : 1273, 1470, 1694, 3348  $\text{cm}^{-1}$   
 ;  $^1\text{H}$  NMR (270 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) : 1.87 (3H, d, J = 1 Hz), 3.69 (1H, d, J = 12 Hz), 3.  
 77 (1H, d, J = 12 Hz), 3.78 (1H, d, J = 13 Hz), 3.97 (1H, d, J = 13 Hz), 4.30 (1  
 H, d, J = 6 Hz), 4.59 (1H, d, J = 6 Hz), 6.26 (1H, s), 6.32 (1H, s), 7.31-7.50 (5H, m),  
 7.95 (1H, d, J = 1 Hz) ;  $^{13}\text{C}$  NMR (67.8 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) : 12.6, 60.9, 69.3, 7  
 1.6, 81.2, 90.5, 93.2, 104.7, 110.8, 127.3, 129.1, 129.6, 137.8, 141.4, 152.2, 1  
 66.5 ; MS (FAB) : m/z 377 (M+H)<sup>+</sup> ; HRMS (FAB) : 計算値  $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_7$  [(M+H)<sup>+</sup>] = 377.1349,  
 実測値 = 377.1366。

10

【 0 1 0 6 】

次に、ヌクレオシド 1 の代わりにヌクレオシド 8 ( 1 0 6 m g ; 0 . 2 8 2 m m o l )  
 を用いたこと以外は、上記参考調製例 1 と同様の手順で、架橋型ヌクレオシド三リン酸 Q  
 T P を得た ( 6 . 5 8 0  $\mu\text{m o l}$  : 収率 2 . 3 % ) 。

【 0 1 0 7 】

得られた Q T P のスペクトルデータは、以下のとおりであった： $^{31}\text{P}$  NMR (500MHz,  $\text{D}_2\text{O}$   
 ) , -10.56(d), -11.369(d), -22.94(t) ; ESI-MS (ネガティブイオンモード) m/z, 実測値  
 = 615.1, 計算値 [(M-H)<sup>-</sup>] = 615.03。

【 0 1 0 8 】

( 実施例 2 : 架橋型ヌクレオチドが 3 ' 末端に付加された一本鎖 DNA のヌクレアーゼ  
 耐性の評価 )

上記実施例 1 と同様の手順で架橋型ヌクレオチド K T P、L T P、M T P、および Q T  
 P をそれぞれ 3 ' 末端に付加した一本鎖 DNA (それぞれ ODN 1 # K、ODN 1 # L、  
 ODN 1 # M および ODN 1 # Q という) および未処理の一本鎖 (ODN 1) のうち、い  
 ずれか 1 つの一本鎖 DNA を含む水溶液 ( 1  $\mu\text{M}$  ) を 2  $\mu\text{L}$  と、蛇毒ホスホジエステラー  
 ゼ I を含む水溶液 ( 2 5  $\mu\text{U}$  /  $\mu\text{L}$  ) を 2  $\mu\text{L}$  と、5 x 濃度の反応緩衝液 ( 2 5 0  
 mM の T r i s - H C l、5 0 mM の M g C l <sub>2</sub>、pH 8 . 0 ) を 1  $\mu\text{L}$  とを混ぜ合わせ  
 た反応液 ( 5  $\mu\text{L}$  ) を調製し、3 7 でインキュベートし、反応開始 1 0 分後、2 0 分後  
 、3 0 分後、6 0 分後、および 1 2 0 分後に反応液をそれぞれ取り出した。取り出した反  
 応液に色素液 ( 0 . 1 % (v/v) プロモフェノールブルー) および 7 M の尿素溶液 ( 3 mM  
 の E D T A ) を加えた後、9 4 で熱変性させ、2 0 % (w/v) ポリアクリルアミド変性ゲ  
 ルを用いて電気泳動を行った (変性 PAGE ; 3 0 0 V、4 9 、1 3 0 分)。泳動後、  
 モレキュラー・イメージャー ( B i o R a d 社製) を用いてレーザー照射 ( 4 8 8 n m )  
 し、ゲルを可視化した。得られたゲル写真 ( 図 2 ) におけるバンド強度より、未反応の一  
 本鎖 DNA の割合 ( % ) を算出し、反応時間に対してプロットした ( 図 3 ) 。

20

30

【 0 1 0 9 】

図 2 および 3 から明らかなように、架橋型ヌクレオチド L T P、M T P、および Q T P  
 が付加した DNA (それぞれ ODN 1 # L、ODN 1 # M および ODN 1 # Q ) はいずれ  
 も、未処理の ODN 1 および ODN 1 # K (特許文献 1 に記載のヌクレオチド) よりも残  
 存率が高く、エキソヌクレアーゼ (蛇毒ホスホジエステラーゼ I) によって分解されにく  
 かった。このように、DNA を架橋型ヌクレオチドと T d T とで処理することによって、  
 簡単に高いヌクレアーゼ耐性を付与することができることがわかった。

40

【 0 1 1 0 】

( 実施例 3 : 架橋型ヌクレオチドが 3 ' 末端に付加されたトロンビン結合 DNA アプタ  
 マーのヌクレアーゼ耐性の評価 )

上記実施例 1 と同様の手順で、トロンビン結合 DNA アプタマー ( T B A : Thrombin B  
 inding Aptamer、シグマ - アルドリッチ社より購入) に、架橋型ヌクレオチド K T P、L  
 T P、M T P、および Q T P をそれぞれ 3 ' 末端に付加した (それぞれ T B A 1 # K、T  
 B A 1 # L、T B A 1 # M、および T B A 1 # Q という)。なお、用いたトロンビン結合

50

DNA アプタマー ( agtccgtggtagggcaggttgggggtgact : 配列番号 2 ) は、5' 末端がカルボキシフルオレセインで標識化されている。

#### 【0111】

これらの架橋型ヌクレオチドが3'末端に付加されたトロンピン結合DNAアプタマー(それぞれTBA1#K、TBA1#L、TBA1#MおよびTBA1#Qという)および未修飾のトロンピン結合DNAアプタマー(TBA1)のうち、いずれか1つのDNAアプタマーを含む水溶液(1μM)を2μLと、蛇毒ホスホジエステラーゼIを含む水溶液(25μユニット/μL)を2μLと、5×濃度の反応緩衝液(250mMのTris-HCl、50mMのMgCl<sub>2</sub>、2.5%(w/v)のTween20、pH8.0)を1μLとを混ぜ合わせた反応液(5μL)を調製し、37℃でインキュベートし、反応開始10分後、20分後、30分後、60分後および120分後に反応液をそれぞれ取り出した。取り出した反応液に色素液(0.1%(v/v)プロモフェノールブルー)および7Mの尿素溶液(9mMのEDTA)を加えた後、94℃で熱変性させ、20%(w/v)ポリアクリルアミド変性ゲルを用いて電気泳動を行った(変性PAGE; 300V、49℃、130分)。泳動後、モレキュラー・イメジャー(BioRad社製)を用いてレーザー照射(488nm)し、ゲルを可視化した。得られたゲル写真におけるバンド強度より未反応の一本鎖DNAの割合(%)を算出し、反応時間に対してプロットした。結果を図4に示す。

10

#### 【0112】

図4から明らかなように、架橋型ヌクレオチドLTP、MTP、およびQTPとTdTとで処理したDNA(それぞれTBA1#L、TBA1#MおよびTBA1#Q)はいずれも、未処理のTBA1およびTBA#Kよりも残存率が高く、エキソヌクラーゼ(蛇毒ホスホジエステラーゼI)によって分解されにくかった。特に、MTPおよびQTPを用いて3'末端に架橋型ヌクレオチドを付加したDNA(TBA1#MおよびTBA1#Q)の残存率が高かった。

20

#### 【0113】

(実施例4:架橋型ヌクレオチドが3'末端に付加されたトロンピン結合DNAアプタマーの血清中における安定性の評価)

上記実施例3と同様に調製した架橋型ヌクレオチドが3'末端に付加されたトロンピン結合DNAアプタマー(TBA1#K、TBA1#L、TBA1#M、およびTBA1#Q)および未修飾のトロンピン結合DNAアプタマー(TBA1)のうちのいずれか1つのDNAアプタマーを含む水溶液(4μM)を0.5μLと、血清(ヒト男性AB型血漿:シグマ-アルドリッチ社)を4μLと、10×濃度の反応緩衝液(500mMのTris-HCl、100mMのMgCl<sub>2</sub>、pH8.0)を0.5μLとを混ぜ合わせた反応液(5μL)を調製し、37℃でインキュベートし、反応開始10分後、20分後、30分後、60分後、120分後、240分後、および480分後に反応液をそれぞれ取り出した。取り出した反応液に色素液(0.1%(v/v)プロモフェノールブルー)および7Mの尿素溶液(3mMのEDTA)を加えた後、94℃で熱変性させ、20%(w/v)ポリアクリルアミド変性ゲルを用いて電気泳動を行った(変性PAGE; 300V、49℃、130分)。泳動後、モレキュラー・イメジャー(BioRad社製)を用いてレーザー照射(488nm)し、ゲルを可視化した。得られたゲル写真におけるバンド強度より未反応の一本鎖DNAの割合(%)を算出し、反応時間に対してプロットした。結果を図5に示す。

30

40

#### 【0114】

図5から明らかなように、種々のヌクラーゼが存在している血清中においても、架橋型ヌクレオチドLTP、MTP、およびQTPとTdTとで処理したDNA(それぞれTBA1#L、TBA1#MおよびTBA1#Q)はいずれも、未処理のTBA1およびTBA#Kよりも残存率が高く、ヌクラーゼ耐性を示した。

#### 【0115】

(実施例5:架橋型ヌクレオチドが3'末端に付加されたトロンピン結合DNAアプタマーのトロンピンに対する結合親和性の評価)

50

上記実施例 3 と同様に調製した架橋型ヌクレオチドが 3' 末端に付加されたトロンピン結合 DNA アプタマー (TBA 1 # K、TBA 1 # L、TBA 1 # M、および TBA 1 # Q) および未修飾のトロンピン結合 DNA アプタマー (TBA 1) のうちのいずれか 1 つの DNA アプタマー (10 nM)、ヒト血漿由来トロンピン (40 nM : SIGMA 社) およびインキュベーションバッファー (20 mM の Tris - HCl、1 mM の MgCl<sub>2</sub>、pH 7.4) を含む反応液を調製し、37 °C で 30 分間インキュベートした。

【0116】

インキュベート後の反応液を、それぞれキャピラリー電気泳動にかけた。電気泳動の条件は、以下のとおりであった。キャピラリー電気泳動には、BECKMAN COULTER, P/ACE™ M DQ 装置を用いた。カートリッジの温度を 25 °C、そしてサンプルストレージを 15 °C に設定した。検出は蛍光検出器で行い、励起波長を 488 nm およびモニター波長を 520 nm に設定した。キャピラリーは、内径 75 μm (BECKMAN COULTER 社製) のキャピラリーを長さ 30.2 cm (ウィンドウまでの長さは 20 cm) に調整して用いた。ランニングバッファーは、0.4% (w/v) ホウ酸バッファー (0.3% (w/v) ホウ酸ナトリウム、pH 8.35 : BECKMAN COULTER 社製) を用いた。

10

【0117】

まず、キャピラリー内をランニングバッファーで置換 (20 psi、2 分) した後、サンプルをインジェクト (0.5 psi、3.9 秒、30.5 nL) し、12 kV で 4 分間泳動した。各トロンピン結合 DNA アプタマーについて得られたエレクトログラムを図 6 に示す。

20

【0118】

図 6 に示すエレクトログラムにおいて、移動時間が 2 分付近のピークは、各 TBA とトロンピンとの複合体であり、移動時間が 3 分付近のピークは、各 TBA の遊離体であった。なお、TBA 1 # M についてのみ、複合体と遊離体との間 (2.6 分付近) に第 3 のピークが出現したが、これは、泳動中にトロンピンから解離した遊離の TBA 1 # M が複合体との相互作用により何らかの高次構造をとっているためと考えられる。したがって、このピークについては、複合体とみなした。

【0119】

エレクトログラムから解離定数  $K_d$  を、M.V. Berezovski ら、Nature Protocols, 2006 年, 1 巻, 3 号, 1362 頁に記載のように、以下の式により算出した。また、算出した  $K_d$  を以下の表 1 に示す。

30

【0120】

【数 1】

$$K_d = \frac{[T]_{tot} \{ 1 + A_1 / (A_2 + A_3) \} - [DNA]_{tot}}{1 + (A_2 + A_3) / A_1}$$

40

【0121】

式中、

$[T]_{tot}$  : 総トロンピン濃度

$[DNA]_{tot}$  : 総 TBA 濃度

$A_1$  : 遊離の TBA のピーク面積

$A_2$  : 複合体から解離した TBA のピーク面積

$A_3$  : 複合体のピーク面積。

【0122】

【表 1】

アプタマー	Kd (nM)
TBA1	13.2±6.0
TBA1#K	14.5±6.2
TBA1#L	16.3±3.8
TBA1#M	21.1±6.0
TBA1#Q	21.3±8.0

10

## 【0123】

表 1 からわかるように、架橋型ヌクレオチドが 3' 末端に付加されていない TBA1 における Kd 値と、架橋型ヌクレオチドが 3' 末端に付加した TBA における Kd 値との間に大きな差はなく、ほぼ同等であることがわかった。したがって、3' 末端に架橋型ヌクレオチドが付加されても、アプタマーの機能にはほとんど影響がないことがわかった。

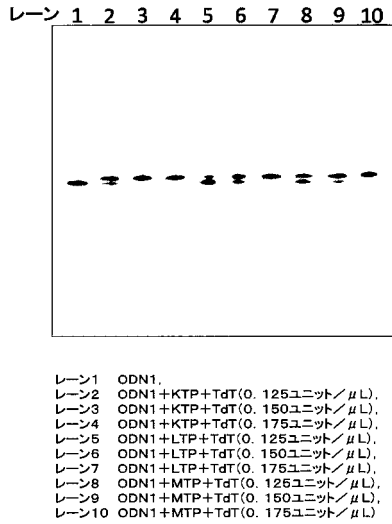
## 【産業上の利用可能性】

## 【0124】

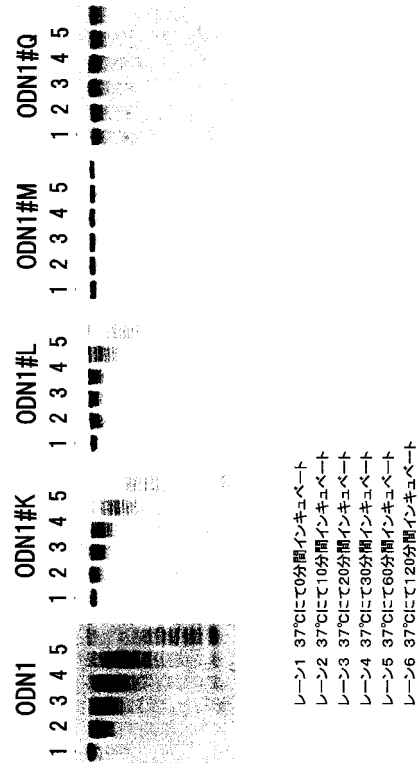
本発明によれば、アンチセンス DNA 分子、アンチジーン DNA 分子、DNA アプタマー、DNA ザイム、siRNA などの種々の機能性核酸への架橋型ヌクレオチドの酵素的付加によって、それらの核酸分子のヌクレアーゼ耐性を簡便に向上させることが可能である。そのため、RNA、一本鎖 DNA、および二本鎖 DNA を分子標的としたゲノムテクノロジー（アンチセンス法、アンチジーン法、RNAi、デコイ法、遺伝子相同組換え、リボザイム、DNA 酵素など）に有用である。したがって、核酸医薬品開発や診断システムなどの共通基盤材料として、基礎生物化学の研究用ツール、医薬品、診断薬、分析試薬などのゲノム研究試薬の開発・調製に利用され得る。

20

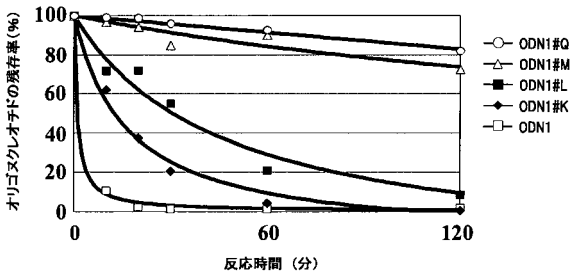
【 図 1 】



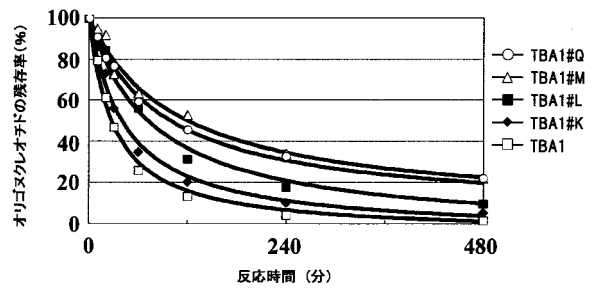
【 図 2 】



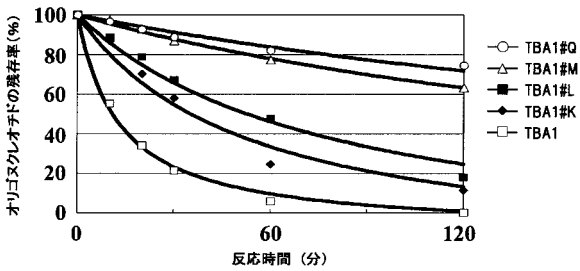
【 図 3 】



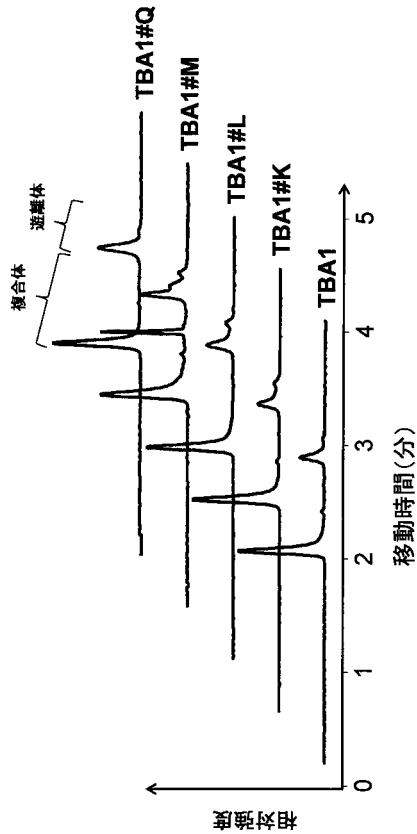
【 図 5 】



【 図 4 】



【 図 6 】



## 【 配列表 】

2010021344000001.app

## 【 手続補正書 】

【 提出日 】 平成22年1月27日 (2010.1.27)

## 【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】 特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】 全文

【 補正方法 】 変更

## 【 補正の内容 】

## 【 特許請求の範囲 】

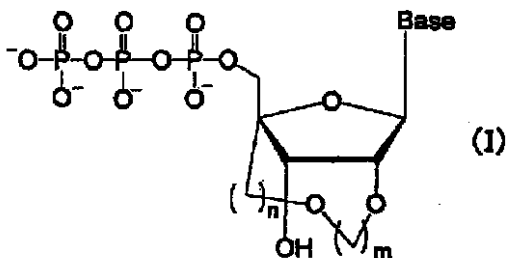
## 【 請求項 1 】

ヌクレアーゼ耐性核酸の調製方法であって、

少なくとも3つの塩基からなる核酸と、末端デオキシヌクレオチド転移酵素と、2' , 4' - 架橋型ヌクレオシド三リン酸とを混合してインキュベートする工程を含み、

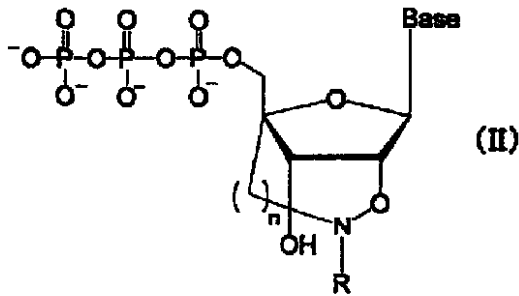
該2' , 4' - 架橋型ヌクレオシド三リン酸が、以下の式 I、式 II または式 III :

## 【 化 1 】

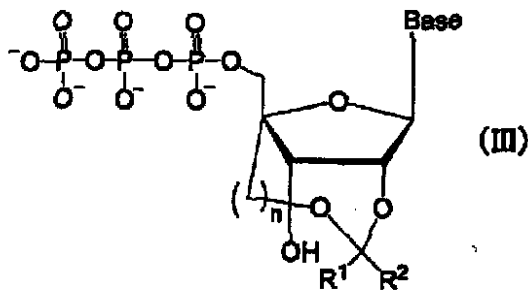




## 【化 2】



## 【化 3】



(式中、

Baseは、以下の群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいプリン-9-イル基または2-オキソ-1,2-ジヒドロピリミジン-1-イル基を表し、ここで、該群は、水酸基、炭素数1から6の直鎖アルキル基、炭素数1から6の直鎖アルコキシ基、メルカプト基、炭素数1から6の直鎖アルキルチオ基、アミノ基、炭素数1から6の直鎖アルキルアミノ基、およびハロゲン原子からなり；

Rは、水素原子、分岐または環を形成していてもよい炭素数1から7のアルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数2から7のアルケニル基、該群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいアシル基、該群から選択される任意の置換基を有するスルホニル基、該群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数3から12のアリール基、または該群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数3から12のアリール部分を有するアラルキル基を表し；

R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は、それぞれ独立して、水素原子、分岐または環を形成していてもよい炭素数1から7のアルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数2から7のアルケニル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数2から7のアルキニル基、該群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいアシル基、該群から選択される任意の置換基を有するスルホニル基、該群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数3から12のアリール基、該群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数3から12のアリール部分を有するアラルキル基を表すか、あるいはR<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は一緒になって、該群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよい炭素数2から10のアルキレン基またはアルケニレン基を表し、ただし、R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は同時に水素原子ではなく；

mは、1から5の整数であり；そして

nは、1から5の整数である)

で表される構造を有する、方法。

## 【請求項 2】

前記式 I、式 II または式 III において、前記 Base が、6-アミノプリン-9-

イル基、2, 6 - ジアミノプリン - 9 - イル基、2 - アミノ - 6 - クロロプリン - 9 - イル基、2 - アミノ - 6 - フルオロプリン - 9 - イル基、2 - アミノ - 6 - ブロモプリン - 9 - イル基、2 - アミノ - 6 - ヒドロキシプリン - 9 - イル基、6 - アミノ - 2 - メトキシプリン - 9 - イル基、6 - アミノ - 2 - クロロプリン - 9 - イル基、6 - アミノ - 2 - フルオロプリン - 9 - イル基、2, 6 - ジメトキシプリン - 9 - イル基、2, 6 - ジクロロプリン - 9 - イル基、6 - メルカプトプリン - 9 - イル基、2 - オキソ - 4 - アミノ - 1, 2 - ジヒドロピリミジン - 1 - イル基、4 - アミノ - 2 - オキソ - 5 - フルオロ - 1, 2 - ジヒドロピリミジン - 1 - イル基、4 - アミノ - 2 - オキソ - 5 - クロロ - 1, 2 - ジヒドロピリミジン - 1 - イル基、2 - オキソ - 4 - メトキシ - 1, 2 - ジヒドロピリミジン - 1 - イル基、2 - オキソ - 4 - メルカプト - 1, 2 - ジヒドロピリミジン - 1 - イル基、2, 4 - ジヒドロキシピリミジン - 1 - イル基、2, 4 - ジヒドロキシ - 5 - メチルピリミジン - 1 - イル基、または 4 - アミノ - 5 - メチル - 2 - オキソ - 1, 2 - ジヒドロピリミジン - 1 - イル基である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記式 I I において、前記 R が、水素原子、メチル基、エチル基、n - プロピル基、イソプロピル基、フェニル基、またはベンジル基である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記式 I、式 I I または式 I I I において、前記 m が 1 であり、そして前記 n が 1 である、請求項 1 から 3 のいずれかの項に記載の方法。

【請求項 5】

前記式 I、式 I I または式 I I I において、前記 Base が、2, 4 - ジヒドロキシ - 5 - メチルピリミジン - 1 - イル基である、請求項 1 から 4 のいずれかの項に記載の方法。

【請求項 6】

前記式 I I I において、前記 R<sup>1</sup> および R<sup>2</sup> のいずれか一方が、水素原子である、請求項 1 から 5 のいずれかの項に記載の方法。

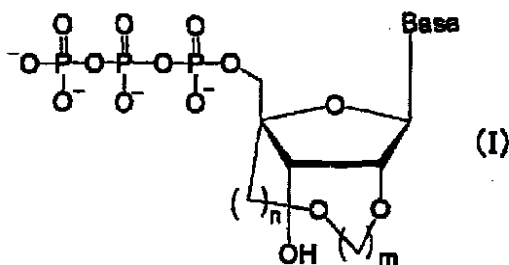
【請求項 7】

前記式 I I I において、前記 R<sup>1</sup> および R<sup>2</sup> のいずれか一方が、フェニル基である、請求項 1 から 6 のいずれかの項に記載の方法。

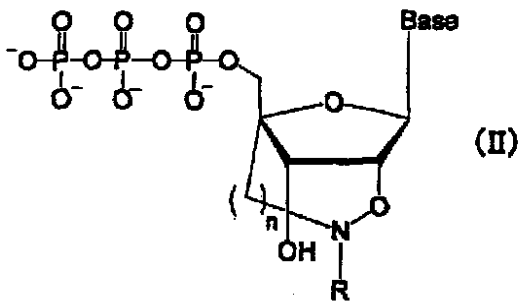
【請求項 8】

末端デオキシヌクレオチド転移酵素、および 2', 4' - 架橋型ヌクレオシド三リン酸を含む、ヌクレアーゼ耐性核酸の調製用キットであって、

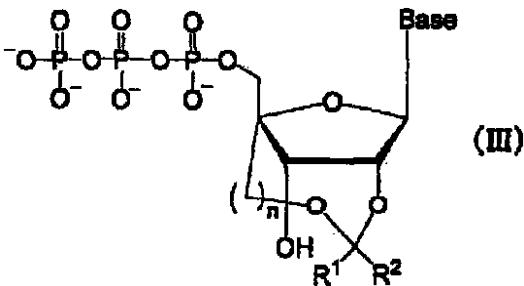
該 2', 4' - 架橋型ヌクレオシド三リン酸が、以下の式 I、式 I I または式 I I I :  
【化 4】



## 【化 5】



## 【化 6】



(式中、

Baseは、以下の群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいプリン-9-イル基または2-オキソ-1,2-ジヒドロピリミジン-1-イル基を表し、ここで、該群は、水酸基、炭素数1から6の直鎖アルキル基、炭素数1から6の直鎖アルコキシ基、メルカプト基、炭素数1から6の直鎖アルキルチオ基、アミノ基、炭素数1から6の直鎖アルキルアミノ基、およびハロゲン原子からなり；

Rは、水素原子、分岐または環を形成していてもよい炭素数1から7のアルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数2から7のアルケニル基、該群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいアシル基、該群から選択される任意の置換基を有するスルホニル基、該群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数3から12のアリール基、または該群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数3から12のアリール部分を有するアラルキル基を表し；

R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は、それぞれ独立して、水素原子、分岐または環を形成していてもよい炭素数1から7のアルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数2から7のアルケニル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数2から7のアルキニル基、該群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいアシル基、該群から選択される任意の置換基を有するスルホニル基、該群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数3から12のアリール基、該群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数3から12のアリール部分を有するアラルキル基を表すか、あるいはR<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は一緒になって、該群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよい炭素数2から10のアルキレン基またはアルケニレン基を表し、ただし、R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は同時に水素原子ではなく；

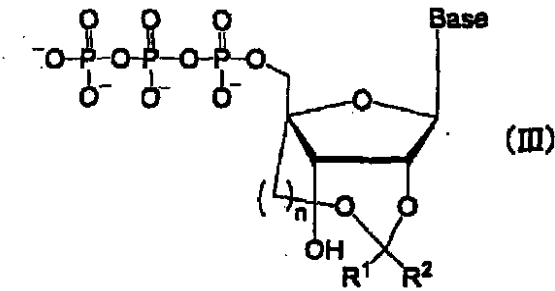
mは、1から5の整数であり；そして

nは、1から5の整数である)

で表される構造を有する、キット。

【請求項9】

以下の式 I I I で表される 2', 4'-架橋型ヌクレオシド三リン酸：  
【化 7】



(式中、

Base は、以下の群から選択される任意の置換基を 1 以上有していてもよいプリン - 9 - イル基または 2 - オキソ - 1, 2 - ジヒドロピリミジン - 1 - イル基を表し、ここで、該群は、水酸基、炭素数 1 から 6 の直鎖アルキル基、炭素数 1 から 6 の直鎖アルコキシ基、メルカプト基、炭素数 1 から 6 の直鎖アルキルチオ基、アミノ基、炭素数 1 から 6 の直鎖アルキルアミノ基、およびハロゲン原子からなり；

R<sup>1</sup> および R<sup>2</sup> は、それぞれ独立して、水素原子、分岐または環を形成していてもよい炭素数 1 から 7 のアルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数 2 から 7 のアルケニル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数 2 から 7 のアルキニル基、該群から選択される任意の置換基を 1 以上有していてもよいアシル基、該群から選択される任意の置換基を有するスルホニル基、該群から選択される任意の置換基を 1 以上有していてもよいヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数 3 から 12 のアリアル基、該群から選択される任意の置換基を 1 以上有していてもよいヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数 3 から 12 のアリアル部分を有するアラルキル基を表すか、あるいは R<sup>1</sup> および R<sup>2</sup> は一緒になって、該群から選択される任意の置換基を 1 以上有していてもよい炭素数 2 から 10 のアルキレン基またはアルケニレン基を表し、ただし、R<sup>1</sup> および R<sup>2</sup> は同時に水素原子ではなく；

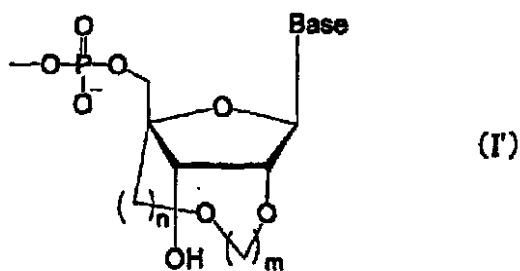
そして

n は、1 から 5 の整数である)。

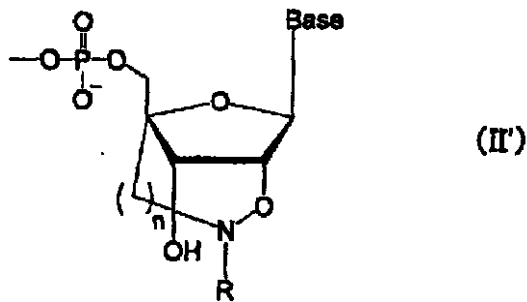
【請求項 10】

以下の式 I'、式 I I' または式 I I I' で表される 2', 4'-架橋型ヌクレオチド：

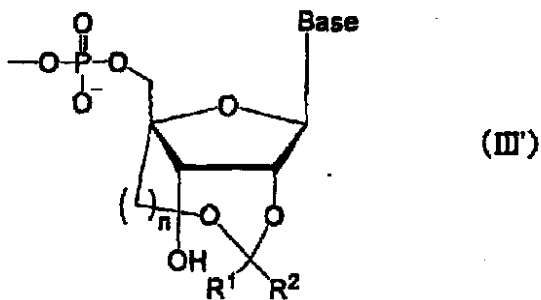
【化 8】



【化 9】



【化 10】



(式中、

Baseは、以下の群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいプリン-9-イル基または2-オキソ-1,2-ジヒドロピリミジン-1-イル基を表し、ここで、該群は、水酸基、炭素数1から6の直鎖アルキル基、炭素数1から6の直鎖アルコキシ基、メルカプト基、炭素数1から6の直鎖アルキルチオ基、アミノ基、炭素数1から6の直鎖アルキルアミノ基、およびハロゲン原子からなり；

Rは、水素原子、分岐または環を形成していてもよい炭素数1から7のアルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数2から7のアルケニル基、該群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいアシル基、該群から選択される任意の置換基を有するスルホニル基、該群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数3から12のアリール基、または該群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数3から12のアリール部分を有するアラルキル基を表し；

R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は、それぞれ独立して、水素原子、分岐または環を形成していてもよい炭素数1から7のアルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数2から7のアルケニル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数2から7のアルキニル基、該群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいアシル基、該群から選択される任意の置換基を有するスルホニル基、該群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数3から12のアリール基、該群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数3から12のアリール部分を有するアラルキル基を表すか、あるいはR<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は一緒になって、該群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよい炭素数2から10のアルキレン基またはアルケニレン基を表し、ただし、R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は同時に水素原子ではなく；

そして

nは、1から5の整数である)

を3'末端に有する、ヌクレアーゼ耐性核酸。

【請求項11】

請求項 1 から 7 のいずれかの項に記載の方法により調製された、ヌクレアーゼ耐性核酸

。

【請求項 1 2】

前記 2' , 4' - 架橋型ヌクレオシド三リン酸が、前記式 I I I で表される構造を有し、該式 I I I において、前記 R<sup>1</sup> および R<sup>2</sup> のいずれか一方がフェニル基であり、そして他方が水素原子であり、そして前記 n が 1 である、請求項 1 から 7 のいずれかの項に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記 2' , 4' - 架橋型ヌクレオシド三リン酸が、前記式 I I I で表される構造を有し、該式 I I I において、前記 R<sup>1</sup> および R<sup>2</sup> のいずれか一方がフェニル基であり、そして他方が水素原子であり、そして前記 n が 1 である、請求項 8 に記載のキット。

【請求項 1 4】

前記 R<sup>1</sup> および R<sup>2</sup> のいずれか一方がフェニル基であり、そして他方が水素原子であり、そして前記 n が 1 である、請求項 9 に記載の 2' , 4' - 架橋型ヌクレオシド三リン酸

。

【請求項 1 5】

前記 2' , 4' - 架橋型ヌクレオチドが、前記式 I I I ' で表される構造を有し、該式 I I I ' において、前記 R<sup>1</sup> および R<sup>2</sup> のいずれか一方がフェニル基であり、そして他方が水素原子であり、そして前記 n が 1 である、請求項 1 0 に記載のヌクレアーゼ耐性核酸

。

【請求項 1 6】

請求項 1 2 に記載の方法により調製された、ヌクレアーゼ耐性核酸。

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/064522

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12P19/34(2006.01)i, C07H19/10(2006.01)i, C07H19/20(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n  According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12P19/34, C07H19/10, C07H19/20, C12N15/09  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2009 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2009 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2009  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA/REGISTRY(STN), BIOSIS/WPIDS(STN), JSTPlus(JDreamII)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> <u>Y</u>	KUWAHARA, M. et al., Systematic analysis of enzymatic DNA polymerization using oligo-DNA templates and triphosphate analogs involving 2',4'-bridged nucleosides, Nucleic Acids Res., 2008.06.26, Vol.36, No.13, p.4257-4265	<u>9-11</u> 1-11
Y	JP 2002-521310 A (Exiqon A/S), 16 July 2002 (16.07.2002), examples 138 to 140 & US 2002/0068708 A1 & EP 1015469 A & AU 9063398 A	1-11
P, X	KUWAHARA, M. et al., Smart conferring of nuclease resistance to DNA by 3'-end protection using 2',4'-bridged nucleoside-5'-triphosphates, Bioorg.Med.Chem.Lett., 2009.06.01, Vol.19, No.11, p.2941-2943	1-11
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 13 October, 2009 (13.10.09)		Date of mailing of the international search report 20 October, 2009 (20.10.09)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/064522

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	Yoshihiko OGIHARA et al., "2',4'-Kakyogata Nucleoside no Kosoteki DNA Mattan Hyoshiki to Nuclease Taisei no Hyoka", CSJ: The Chemical Society of Japan Koen Yokoshu, 13 March 2009 (13.03.2009), vol.89th, no.2, page 1385	1-11



国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 9 / 0 6 4 5 2 2									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12P19/34(2006.01)i, C07H19/10(2006.01)i, C07H19/20(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12P19/34, C07H19/10, C07H19/20, C12N15/09											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2009年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2009年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2009年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2009年	日本国実用新案登録公報	1996-2009年	日本国登録実用新案公報	1994-2009年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2009年										
日本国実用新案登録公報	1996-2009年										
日本国登録実用新案公報	1994-2009年										
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CA/REGISTRY (STN), BIOSIS/WPIDS (STN), JSTPlus (JDreamII)											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号									
X Y	KUWAHARA, M. et al., Systematic analysis of enzymatic DNA polymerization using oligo-DNA templates and triphosphate analogs involving 2',4'-bridged nucleosides, Nucleic Acids Res., 2008.06.26, Vol.36, No.13, p.4257-4265	9-11 1-11									
Y	JP 2002-521310 A (エクシコン エ/エス) 2002.07.16, 実施例 138-140 & US 2002/0068708 A1 & EP 1015469 A & AU 9063398 A	1-11									
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。											
* 引用文献のカテゴリー		の日の後に公表された文献									
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの		「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの									
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの		「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの									
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)		「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの									
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」同一パテントファミリー文献									
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願											
国際調査を完了した日 13.10.2009		国際調査報告の発送日 20.10.2009									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 高堀 栄二	4 N 9 2 8 1								
		電話番号 03-3581-1101 内線 3488									

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 9 / 0 6 4 5 2 2
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
P, X	KUWAHARA, M. et al., Smart conferring of nuclease resistance to DNA by 3'-end protection using 2',4'-bridged nucleoside-5'-triphosphates, Bioorg. Med. Chem. Lett., 2009. 06. 01, Vol. 19, No. 11, p. 2941-2943	1-11
P, X	萩原 慶彦 他, 2', 4' -架橋型ヌクレオシドの酵素的DNA末端標識とヌクレアーゼ耐性の評価, 日本化学会講演予稿集, 2009. 03. 13, Vol. 89th, No. 2, p. 1385	1-11

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

Fターム(参考) 4C057 AA03 BB01 CC01 DD01 LL11 LL17 LL22 LL29 LL40 LL45  
MM01 MM09

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。