

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2014年10月2日(02.10.2014)



(10) 国際公開番号
WO 2014/157565 A1

- (51) 国際特許分類:
C07D 209/86 (2006.01) C08F 230/02 (2006.01)
C07H 19/06 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2014/058988
- (22) 国際出願日: 2014年3月27日(27.03.2014)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2013-070381 2013年3月28日(28.03.2013) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人北陸先端科学技術大学院大学(JAPAN ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒9231292 石川県能美市旭台一丁目1番地 Ishikawa (JP).
- (72) 発明者: 藤本 健造(FUJIMOTO, Kenzo); 〒9231292 石川県能美市旭台一丁目1番地 国立大学法人北陸先端科学技術大学院大学 マテリアルサイエンス研究科内 Ishikawa (JP). 坂本 隆(SAKAMOTO, Takashi); 〒9231292 石川県能美市旭台一丁目1番地 国立大学法人北陸先端科学技

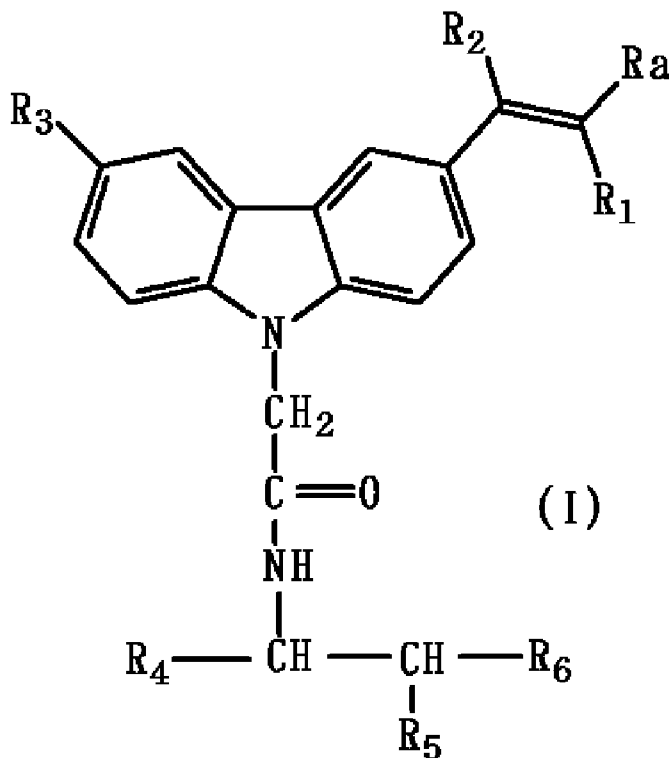
術大学院大学 マテリアルサイエンス研究科内 Ishikawa (JP). 田中 佑弥(TANAKA, Yuya); 〒9231292 石川県能美市旭台一丁目1番地 国立大学法人北陸先端科学技術大学院大学 マテリアルサイエンス研究科内 Ishikawa (JP).

- (74) 代理人: アクシス国際特許業務法人, 外 (AXIS PATENT INTERNATIONAL et al.); 〒1050004 東京都港区新橋二丁目6番2号 新橋アイマークビル Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, 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, IR, IS, JP, KE, KG, 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, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW,

[続葉有]

(54) Title: PHOTORESPONSIVE NUCLEOTIDE ANALOGUE HAVING PHOTOCROSSLINKING ABILITY

(54) 発明の名称: 光クロスリンク能を有する光応答性ヌクレオチドアナログ



(57) Abstract: Provided are a new photoreactive compound which is usable in a technique of photoreaction of nucleic acids and a photoreactive crosslinking agent which comprises the photoreactive compound. This photoreactive compound is represented by formula I.

(57) 要約: 核酸の光反応技術に使用可能な新しい光反応性化合物、及び該光反応性化合物を使用した光反応性架橋剤を提供する。式 I : によって表される光反応性の化合物を使用することができる。

WO 2014/157565 A1



MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラ
シア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッ
パ (AL, 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, RS, SE, SI, SK, SM, TR),

OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称：

光クロスリンク能を有する光応答性ヌクレオチドアナログ

技術分野

[0001] 本発明は、核酸類と架橋可能な光反応性の核酸塩基類似構造、及びデオキシリボース代替構造を有する光反応性架橋剤、及び該核酸塩基類似構造を塩基部分として備えて該デオキシリボース代替構造をデオキシリボース部分として備えた、光クロスリンク（光架橋）能を有する光応答性ヌクレオチド類似化合物（光応答性ヌクレオチドアナログ）に関する。

背景技術

[0002] 分子生物学の分野の基本的な技術に、核酸の連結及び核酸の架橋がある。核酸の連結や架橋は、例えば、ハイブリダイゼーションと組みあわせて、遺伝子の導入や、塩基配列の検出のために使用され、あるいは、例えば、遺伝子発現の阻害に使用される。そのために、核酸の連結及び架橋の技術は、分子生物学の基礎研究だけではなく、例えば、医療分野における診断や治療、あるいは治療薬や診断薬等の開発や製造、工業及び農業分野における酵素や微生物等の開発や製造に使用される極めて重要な技術である。

[0003] このような核酸の連結あるいは架橋の技術として、酵素類を使用しない、光反応を利用した技術が、反応の時間的空間的な制御が自由であること、一般的な有機化学反応よりも緩和な条件で反応可能であること等の利点から、注目されるようになってきた。

[0004] このような核酸の光反応技術として、5-シアノビニルデオキシウリジンを使用した光連結技術（特許文献1：特許第3753938号、特許文献2：特許第3753942号）、3-ビニルカルバゾール構造を塩基部位に持つ修飾ヌクレオチドを使用した光架橋技術（特許文献3：特許第4814904号、特許文献4：特許第4940311号）がある。

先行技術文献

特許文献

- [0005] 特許文献1：日本国特許第3753938号公報
特許文献2：日本国特許第3753942号公報
特許文献3：日本国特許第4814904号公報
特許文献4：日本国特許第4940311号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0006] 核酸の光反応技術の重要性から、核酸の光反応技術に使用可能な新しい化合物が、さらに求められている。本発明の目的は、核酸の光反応技術に使用可能な新しい光反応性化合物、及び該光反応性化合物を使用した光反応性架橋剤を提供することにある。

課題を解決するための手段

- [0007] 本発明者は、核酸の光反応技術に使用可能な光反応性架橋剤となる光反応性化合物を鋭意探索してきたところ、核酸塩基の塩基部分に代えてビニルカルバゾール骨格構造を備えて、リボース及びデオキシリボース部分に代えて後述の式1で表される骨格構造を備えた化合物が、このような核酸の光反応技術に使用可能な光反応性架橋剤となることを見いだして、本発明に到達した。
- [0008] 本発明に係る化合物は、後述の式1で表される骨格構造を備えており、天然のヌクレオシド及びヌクレオチドが備えているべきリボースあるいはデオキシリボースによる糖構造を備えていない。さらに、本発明に係る化合物は、天然のヌクレオシド及びヌクレオチドが備えているべきプリン塩基あるいはピリミジン塩基による塩基構造を備えていない。つまり、本発明に係る化合物は、天然のヌクレオシド及びヌクレオチドとは、構造的に全く類似するように思われない化学構造となっている。それにもかかわらず、本発明に係る化合物は、1本鎖の核酸として形成されると、これと相補的な1本鎖の核酸と二重らせんを形成することができ、ビニルカルバゾール部分が光反応に

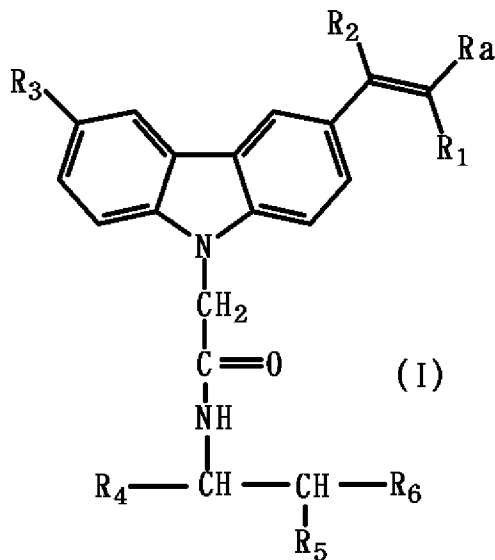
よって架橋を形成すると、二重らせんの一方の鎖からもう一方の鎖へと形成された光架橋（光クロスリンク）となるので、本発明に係る光反応性の化合物は、所望の配列に特異的に反応可能な二重らせんの光クロスリンク剤（光架橋剤）として使用することができる。

[0009] したがって、本発明は、次の（１）～ にある。

（１）

次の式 I :

[化1]



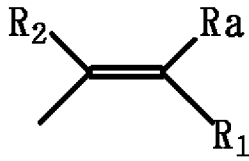
（ただし、式 I 中、

R a は、シアノ基、アミド基、カルボキシル基、C 2～C 7 のアルコキシカルボニル基、ホスホノ基、スルホ基、又は水素原子を表し、

R 1 及び R 2 は、それぞれ独立に、シアノ基、アミド基、カルボキシル基、C 2～C 7 のアルコキシカルボニル基、又は水素原子を表し、

R 3 は、水素原子、水酸基、C 1～C 3 のアルコキシ基、C 1～C 3 のアルキルスルファニル基、ニトロ基、フッ素原子、フッ化メチル基、C 6～C 1 2 の単環式又は二環式の芳香族化合物の 1 価基、C 6～C 1 2 の単環式又は二環式の複素環系芳香族化合物の 1 価基、又は、次の式：

[化2]



(ただし、上記式中、 R_a 、 R_1 及び R_2 は、式1について上述した R_a 、 R_1 及び R_2 とは独立に、式1について上述した R_a 、 R_1 及び R_2 として挙げられた基から選択された基を表す)

で表される1価基を表し、

R_4 は、水素原子、又は Q_1-O-CH_2- 基を表し、

R_5 は、 $-O-Q_1$ 基、水素原子、メチル基、又はエチル基を表し、

(ただし、 R_4 が水素原子である場合には、 R_5 は $-O-Q_1$ 基を表し、

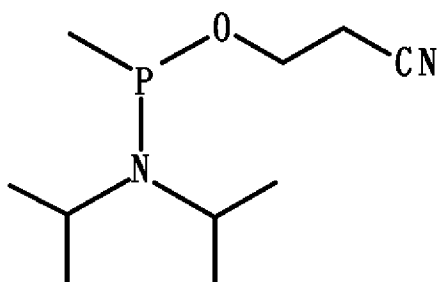
R_4 が Q_1-O-CH_2- 基である場合には、 R_5 は水素原子、メチル基、又はエチル基を表す)

R_6 は、 $-O-Q_2$ 基、 $-CH_2-O-Q_2$ 基、又は $-CH(CH_3)-O-Q_2$ 基を表し、

Q_1 は、水素原子、 Q_1 に結合するOと一体となって形成されるリン酸基、 Q_1 に結合するOと一体となって形成されるリン酸基によって形成されるリン酸ジエステル結合を介して連結されるヌクレオチド又は核酸、又はDMTr基を表し、

Q_2 は、水素原子、 Q_2 に結合するOと一体となって形成されるリン酸基、 Q_2 に結合するOと一体となって形成されるリン酸基によって形成されるリン酸ジエステル結合を介して連結されるヌクレオチド又は核酸、次の式：

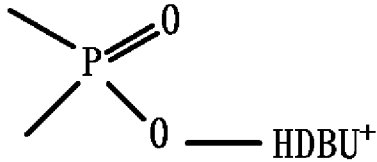
[化3]



(ただし、上記式は、Pに遊離原子価を有する1価の基を表す)

によって表される基、又は次の式：

[化4]



(ただし、上記式は、Pに遊離原子価を有する1価の基を表す)

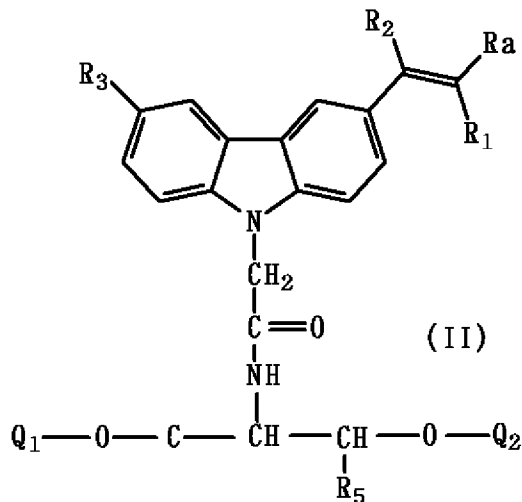
によって表される基、を表す)

によって表される、光反応性の化合物。

(2)

次の式(II)：

[化5]



(ただし、式(II)中、

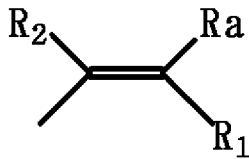
Raは、シアノ基、アミド基、カルボキシル基、C2～C7のアルコキシカルボニル基、ホスホノ基、スルホ基、又は水素原子を表し、

R1及びR2は、それぞれ独立に、シアノ基、アミド基、カルボキシル基、C2～C7のアルコキシカルボニル基、又は水素原子を表し、

R3は、水素原子、水酸基、C1～C3のアルコキシ基、C1～C3のアルキルスルファニル基、ニトロ基、フッ素原子、フッ化メチル基、C6～C

12の単環式又は二環式の芳香族化合物の1価基、C6~C12の単環式又は二環式の複素環系芳香族化合物の1価基、又は、次の式：

[化6]



(ただし、上記式中、Ra、R1及びR2は、式1について上述したRa、R1及びR2とは独立に、式1について上述したRa、R1及びR2として挙げられた基から選択された基を表す)

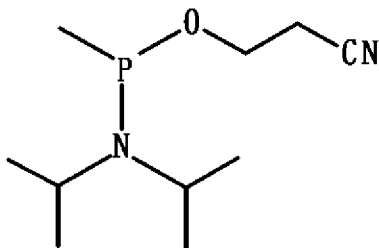
で表される1価基を表し、

R5は、水素原子、メチル基、又はエチル基を表し、

Q1は、水素原子、Q1に結合するOと一体となって形成されるリン酸基、Q1に結合するOと一体となって形成されるリン酸基によって形成されるリン酸ジエステル結合を介して連結されるヌクレオチド又は核酸、又はDMTr基を表し、

Q2は、水素原子、Q2に結合するOと一体となって形成されるリン酸基、Q2に結合するOと一体となって形成されるリン酸基によって形成されるリン酸ジエステル結合を介して連結されるヌクレオチド又は核酸、次の式：

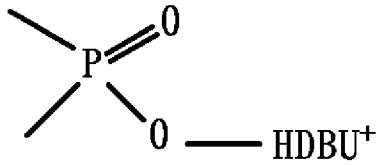
[化7]



(ただし、上記式は、Pに遊離原子価を有する1価の基を表す)

によって表される基、又は次の式：

[化8]



(ただし、上記式は、Pに遊離原子価を有する1価の基を表す)

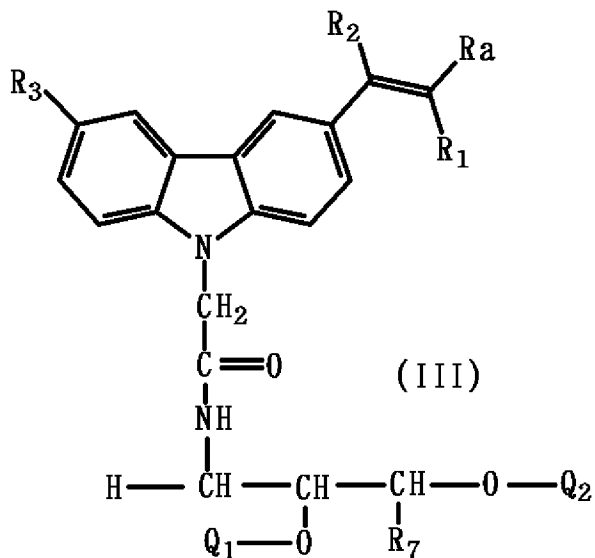
によって表される基、を表す)

によって表される、(1)に記載の化合物。

(3)

次の式III:

[化9]



(ただし、式III中、

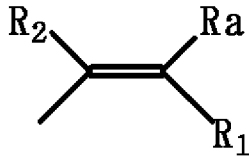
Raは、シアノ基、アミド基、カルボキシル基、C2~C7のアルコキシカルボニル基、ホスホノ基、スルホ基、又は水素原子を表し、

R1及びR2は、それぞれ独立に、シアノ基、アミド基、カルボキシル基、C2~C7のアルコキシカルボニル基、又は水素原子を表し、

R3は、水素原子、水酸基、C1~C3のアルコキシ基、C1~C3のアルキルスルファニル基、ニトロ基、フッ素原子、フッ化メチル基、C6~C12の単環式又は二環式の芳香族化合物の1価基、C6~C12の単環式又

は二環式の複素環系芳香族化合物の1価基、又は、次の式：

[化10]



(ただし、上記式中、Ra、R1及びR2は、式1について上述したRa、R1及びR2とは独立に、式1について上述したRa、R1及びR2として挙げられた基から選択された基を表す)

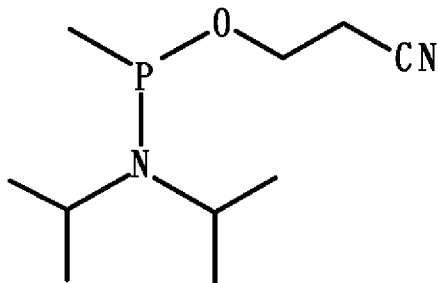
で表される1価基を表し、

R7は、水素原子、又はメチル基を表し、

Q1は、水素原子、Q1に結合するOと一体となって形成されるリン酸基、Q1に結合するOと一体となって形成されるリン酸基によって形成されるリン酸ジエステル結合を介して連結されるヌクレオチド又は核酸、又はDMTr基を表し、

Q2は、水素原子、Q2に結合するOと一体となって形成されるリン酸基、Q2に結合するOと一体となって形成されるリン酸基によって形成されるリン酸ジエステル結合を介して連結されるヌクレオチド又は核酸、次の式：

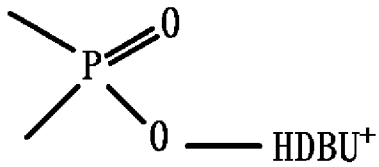
[化11]



(ただし、上記式は、Pに遊離原子価を有する1価の基を表す)

によって表される基、又は次の式：

[化12]



(ただし、上記式は、Pに遊離原子価を有する1価の基を表す)

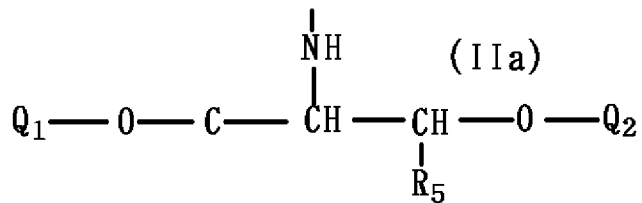
によって表される基、を表す)

によって表される、(1)に記載の化合物。

(4)

上記式IIによって表される(2)に記載の化合物であって、式II中の次の式IIa:

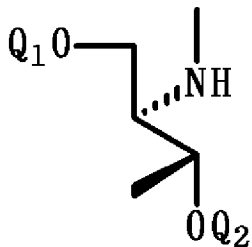
[化13]



で表される骨格構造が、

次の式:

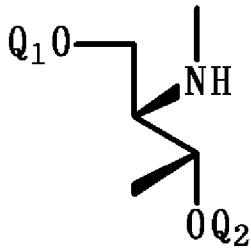
[化14]



で表されるD-トレオニノール構造、

次の式:

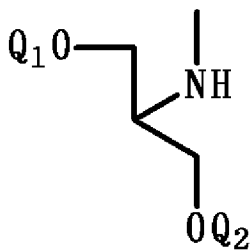
[化15]



で表されるL-トレオニノール構造、

又は、次の式：

[化16]



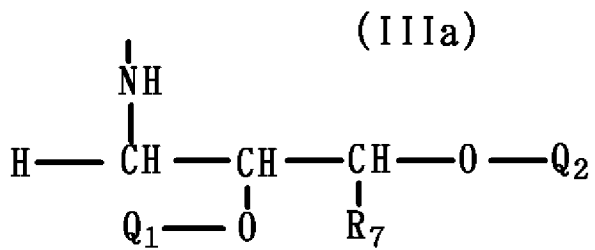
で表されるセリノール構造である、化合物。

(5)

上記式 III によって表される (3) に記載の化合物であって、式 III

中の次の式 III a :

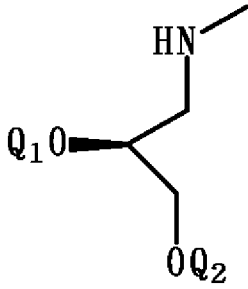
[化17]



で表される骨格構造が、

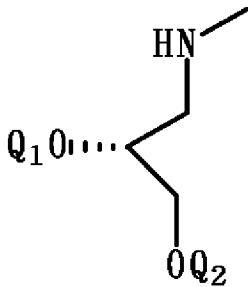
次の式：

[化18]



で表される (R) -3-アミノ-1, 2-プロパンジオール構造、
又は、次の式：

[化19]



で表される (S) -3-アミノ-1, 2-プロパンジオール構造である、化
合物。

(6)

R₃が、水素原子、水酸基、C₁~C₃のアルコキシ基、C₁~C₃のアルキルスルファニル基、ニトロ基、フッ素原子、トリフルオロメチル基、フェニル基、2-ナフチル基、2-インドリル基、ベンゾイミダゾール-2-イル基、又はベンゾチオフェン-2-イル基である、(1)~(5)のいずれかに記載の化合物。

(7)

(1)~(6)のいずれかに記載の化合物であって、

Q₁が、Q₁に結合するOと一体となって形成されるリン酸基によって形成されるリン酸ジエステル結合を介して連結されるヌクレオチド又は核酸であり

、

Q₂が、Q₂に結合するOと一体となって形成されるリン酸基によって形成さ

れるリン酸ジエステル結合を介して連結されるヌクレオチド又は核酸である、化合物。

(8)

(1) ~ (6) のいずれかに記載の化合物であって、

Q₁が、水素原子であり、Q₂が、水素原子である、化合物。

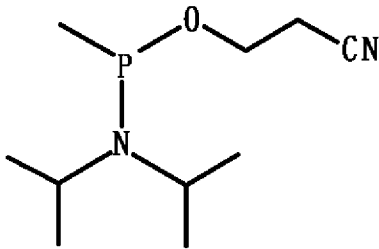
(9)

(1) ~ (6) のいずれかに記載の化合物であって、

Q₁が、DMTr基であり、

Q₂が、水素原子、Q₂に結合するOと一体となって形成されるリン酸基、次の式：

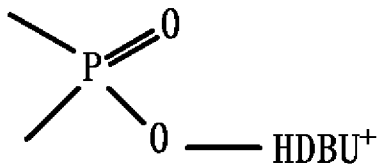
[化20]



(ただし、上記式は、Pに遊離原子価を有する1価の基を表す)

によって表される基、又は次の式：

[化21]



(ただし、上記式は、Pに遊離原子価を有する1価の基を表す)

によって表される基である、化合物。

(10)

(1) ~ (9) のいずれかに記載の化合物からなる、光反応性架橋剤。

[0010] さらに、本発明は、次の(11) ~ にもある。

(11)

(1) ~ (9) の何れかに記載の化合物を使用して、ピリミジン環を有する核酸塩基との間に光架橋を形成する方法。

(12)

(7) に記載の化合物と、ピリミジン環を核酸塩基として有する核酸を、ハイブリダイズして二重らせんを形成させる工程、

形成された二重らせんに光照射する工程、
を含む、光架橋の形成方法。

(13)

(1) ~ (9) の何れかに記載の化合物の、ピリミジン環を有する核酸塩基との間に光架橋を形成するための使用 (use)。

(14)

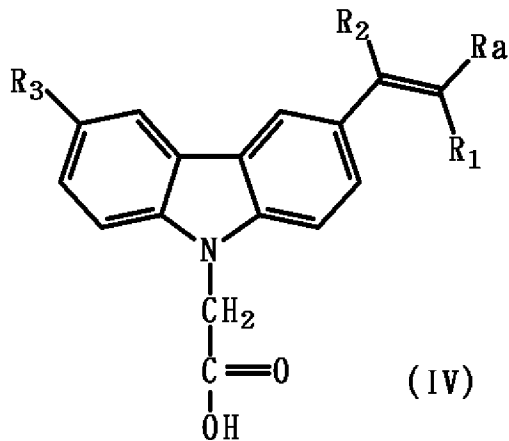
(7) に記載の化合物の、ハイブリダイズして形成された二重らせんにおいてピリミジン環を核酸塩基として有する他の核酸類との間に光架橋を形成するための使用。

[0011] さらに、本発明は、次の (21) ~ にもある。

(21)

次の式 I V :

[化22]



(ただし、式 I V 中、

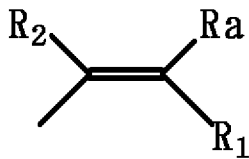
R a は、シアノ基、アミド基、カルボキシル基、C 2 ~ C 7 のアルコキシ

カルボニル基、ホスホノ基、スルホ基、又は水素原子を表し、

R₁ 及び R₂ は、それぞれ独立に、シアノ基、アミド基、カルボキシル基、C₂～C₇のアルコキシカルボニル基、又は水素原子を表し、

R₃ は、水素原子、水酸基、C₁～C₃のアルコキシ基、C₁～C₃のアルキルスルファニル基、ニトロ基、フッ素原子、フッ化メチル基、C₆～C₁₂の単環式又は二環式の芳香族化合物の1価基、C₆～C₁₂の単環式又は二環式の複素環系芳香族化合物の1価基、又は、次の式：

[化23]

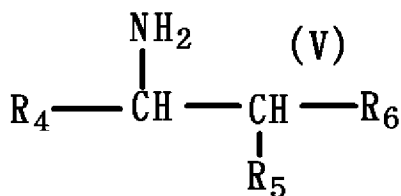


(ただし、上記式中、R_a、R₁ 及び R₂ は、式 I V について上述した R_a、R₁ 及び R₂ とは独立に、式 I V について上述した R_a、R₁ 及び R₂ として挙げられた基から選択された基を表す)

で表される1価基を表わす)

で表される化合物を、次の式 V :

[化24]



(ただし、式 V 中、

R₄ は、水素原子、又は Q₁-O-CH₂-基を表し、

R₅ は、-O-Q₁基、水素原子、メチル基、又はエチル基を表し、

(ただし、R₄ が水素原子である場合には、R₅ は-O-Q₁基を表し、

R₄ がQ₁-O-CH₂-基である場合には、R₅ は水素原子、メチル基、又はエチル基を表す)

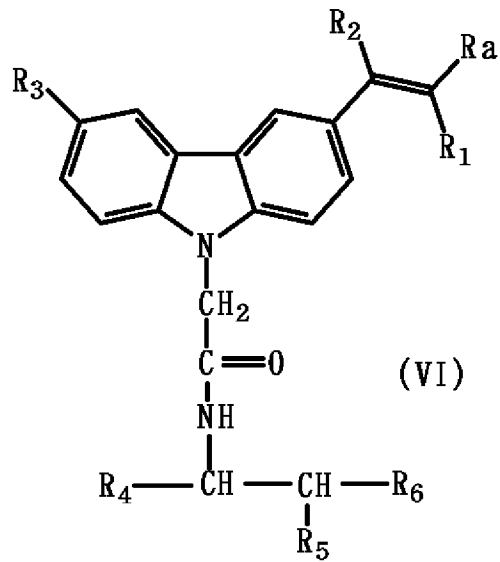
R₆ は、-O-Q₂基、-CH₂-O-Q₂基、又は-CH(CH₃)-O-Q₂

基を表し、

Q₁は、水素原子を表し、Q₂は、水素原子を表す)

で表される化合物と脱水縮合反応させることによって、次の式V I :

[化25]



(ただし、式V I中、

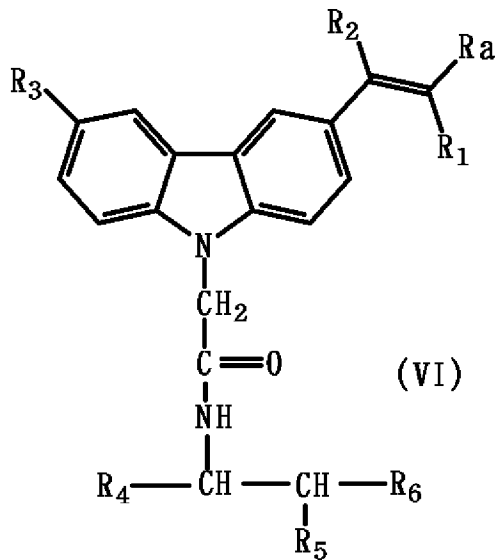
R a、R 1、R 2、R 3、R 4、R 5、R 6は、上記式I V及び式Vについて、上述した通りの基を表す)

で表される化合物を製造する方法。

(22)

次の式V I :

[化26]



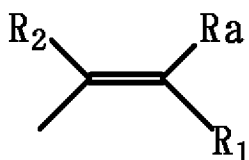
(ただし、式VI中、

Raは、シアノ基、アミド基、カルボキシル基、C2～C7のアルコキシカルボニル基、ホスホノ基、スルホ基、又は水素原子を表し、

R1及びR2は、それぞれ独立に、シアノ基、アミド基、カルボキシル基、C2～C7のアルコキシカルボニル基、又は水素原子を表し、

R3は、水素原子、水酸基、C1～C3のアルコキシ基、C1～C3のアルキルスルファニル基、ニトロ基、フッ素原子、フッ化メチル基、C6～C12の単環式又は二環式の芳香族化合物の1価基、C6～C12の単環式又は二環式の複素環系芳香族化合物の1価基、又は、次の式：

[化27]



(ただし、上記式中、Ra、R1及びR2は、式VIについて上述したRa、R1及びR2とは独立に、式VIについて上述したRa、R1及びR2として挙げられた基から選択された基を表す)

で表される1価基を表わし、

R₄は、水素原子、又は Q₁-O-CH₂-基を表し、

R₅は、-O-Q₁基、水素原子、メチル基、又はエチル基を表し、

(ただし、R₄が水素原子である場合には、R₅は-O-Q₁基を表し、

R₄がQ₁-O-CH₂-基である場合には、R₅は水素原子、メチル基、又はエチル基を表す)

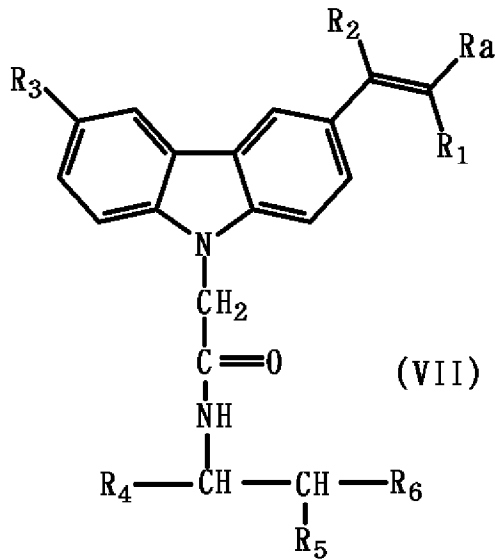
R₆は、-O-Q₂基、-CH₂-O-Q₂基、又は-CH(CH₃)-O-Q₂基を表し、

Q₁は、水素原子を表し、Q₂は、水素原子を表す)

で表される化合物を、ヌクレオシド分子の代替分子として使用して、次の式

V I I :

[化28]



(ただし、式V I I中、

R_a、R₁、R₂、R₃は、上記式V Iにおいて、上述した基を表し、

R₄は、水素原子、又は Q₁-O-CH₂-基を表し、

R₅は、-O-Q₁基、水素原子、メチル基、又はエチル基を表し、

(ただし、R₄が水素原子である場合には、R₅は-O-Q₁基を表し、

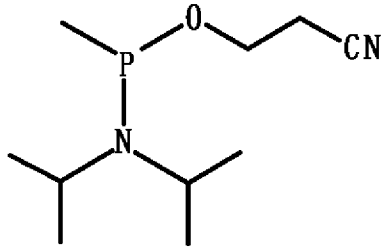
R₄がQ₁-O-CH₂-基である場合には、R₅は水素原子、メチル基、又はエチル基を表す)

R₆は、 $-O-Q_2$ 基、 $-CH_2-O-Q_2$ 基、又は $-CH(CH_3)-O-Q_2$ 基を表し、

Q₁は、DMTr基を表し、

Q₂は、Q₂に結合するOと一体となって形成されるリン酸基、次の式：

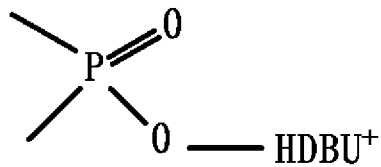
[化29]



(ただし、上記式は、Pに遊離原子価を有する1価の基を表す)

によって表される基、又は次の式：

[化30]



(ただし、上記式は、Pに遊離原子価を有する1価の基を表す)

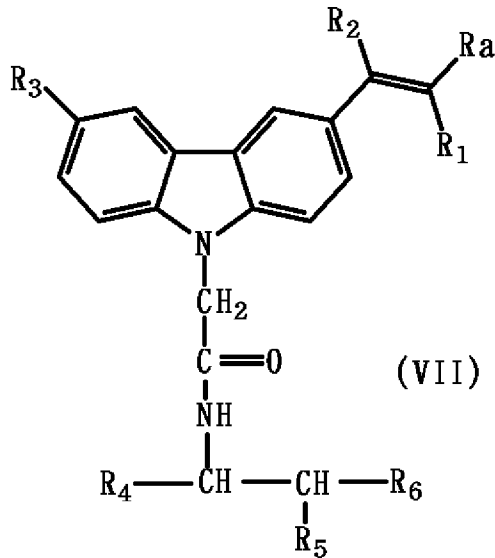
によって表される基、を表す)

によって表される、核酸合成用の化合物を製造する方法。

(23)

次の式V I I :

[化31]



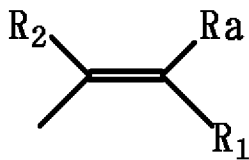
(ただし、式VII中、

Raは、シアノ基、アミド基、カルボキシル基、C2～C7のアルコキシカルボニル基、ホスホノ基、スルホ基、又は水素原子を表し、

R1及びR2は、それぞれ独立に、シアノ基、アミド基、カルボキシル基、C2～C7のアルコキシカルボニル基、又は水素原子を表し、

R3は、水素原子、水酸基、C1～C3のアルコキシ基、C1～C3のアルキルスルファニル基、ニトロ基、フッ素原子、フッ化メチル基、C6～C12の単環式又は二環式の芳香族化合物の1価基、C6～C12の単環式又は二環式の複素環系芳香族化合物の1価基、又は、次の式：

[化32]



(ただし、上記式中、Ra、R1及びR2は、式VIIについて上述したRa、R1及びR2とは独立に、式VIIについて上述したRa、R1及びR2として挙げられた基から選択された基を表す)

で表される1価基を表わし、

R₄は、水素原子、又は Q₁-O-CH₂-基を表し、

R₅は、-O-Q₁基、水素原子、メチル基、又はエチル基を表し、

(ただし、R₄が水素原子である場合には、R₅は-O-Q₁基を表し、

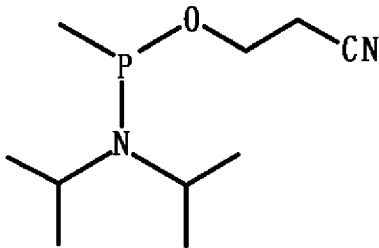
R₄がQ₁-O-CH₂-基である場合には、R₅は水素原子、メチル基、又はエチル基を表す)

R₆は、-O-Q₂基、-CH₂-O-Q₂基、又は-CH(CH₃)-O-Q₂基を表し、

Q₁は、DMTr基を表し、

Q₂は、Q₂に結合するOと一体となって形成されるリン酸基、次の式：

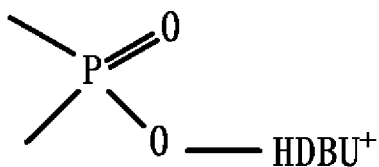
[化33]



(ただし、上記式は、Pに遊離原子価を有する1価の基を表す)

によって表される基、又は次の式：

[化34]

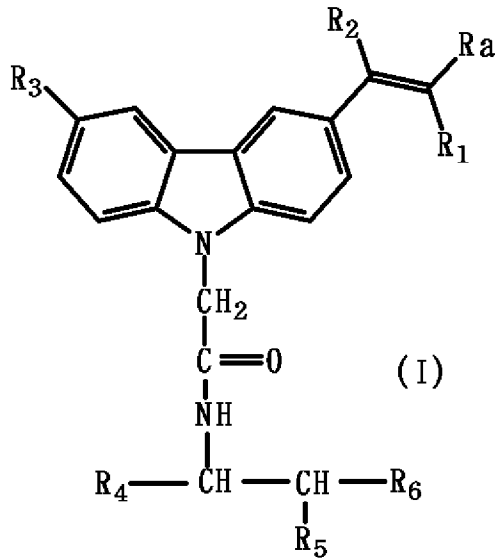


(ただし、上記式は、Pに遊離原子価を有する1価の基を表す)

によって表される基、を表す)

によって表される、核酸合成用の化合物を使用して、次の式I：

[化35]



(ただし、式 I 中、

R_a 、 R_1 、 R_2 、 R_3 は、上記式 V I I において、上述した基を表し、

R_4 は、水素原子、又は Q_1-O-CH_2- 基を表し、

R_5 は、 $-O-Q_1$ 基、水素原子、メチル基、又はエチル基を表し、

(ただし、 R_4 が水素原子である場合には、 R_5 は $-O-Q_1$ 基を表し、

R_4 が Q_1-O-CH_2- 基である場合には、 R_5 は水素原子、メチル基、又はエチル基を表す)

R_6 は、 $-O-Q_2$ 基、 $-CH_2-O-Q_2$ 基、又は $-CH(CH_3)-O-Q_2$ 基を表し、

Q_1 は、 Q_1 に結合するOと一体となって形成されるリン酸基によって形成されるリン酸ジエステル結合を介して連結されるヌクレオチド又は核酸を表し、

Q_2 は、 Q_2 に結合するOと一体となって形成されるリン酸基によって形成されるリン酸ジエステル結合を介して連結されるヌクレオチド又は核酸を表す

)

によって表される、光反応性の化合物を製造する方法。

発明の効果

[0012] 本発明は、核酸の光反応技術に使用可能な、新規な光反応性架橋剤を提供する。これは、天然の糖構造も塩基構造も備えていない、新規な化学構造によるものである。本発明によれば、従来よりも簡便で高収率の合成によって、短時間で高い転化率を示す光反応性架橋剤を得ることができる。

図面の簡単な説明

[0013] [図1]図 1 は光架橋による光二量体の形成実験の手順と結果を示す図である。

[図2]図 2 は合成ステップ数と総収率を説明する図である。

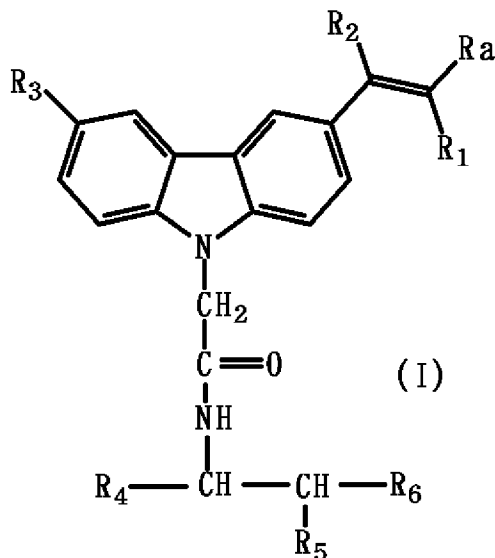
発明を実施するための形態

[0014] 具体的な実施の形態をあげて、以下に本発明を詳細に説明する。本発明は、以下にあげる具体的な実施他の形態に限定されるものではない。

[0015] [化合物の構造]

本発明は、次の式 I :

[化36]



によって表される、光反応性の化合物、にある。

[0016] 上記式 I において、

R a は、シアノ基、アミド基 ($-CO-NH_2$)、カルボキシル基、アルコキシカルボニル基、ホスホノ基 ($-PO(OH)_2$)、スルホ基 ($-SO_2(OH)$)、又は水素であり、好ましくは、シアノ基、アミド基、カルボキシル

基、アルコキシカルボニル基、又は水素であり、さらに好ましくは、シアノ基、アミド基、カルボキシル基、又はアルコキシカルボニル基である。アルコキシカルボニル基は、好ましくはC 2～C 7、さらに好ましくはC 2～C 6、さらに好ましくはC 2～C 5、さらに好ましくはC 2～C 4、さらに好ましくはC 2～C 3、特に好ましくはC 2のものを使用することができる。

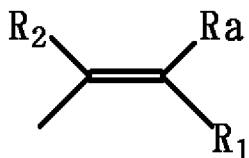
[0017] 上記式 I において、

R 1 及び R 2 は、それぞれ独立に、シアノ基、アミド基、カルボキシル基、アルコキシカルボニル基、又は水素であり、好ましくは、シアノ基、アミド基、カルボキシル基、アルコキシカルボニル基、又は水素であり、さらに好ましくは、シアノ基、アミド基、カルボキシル基、又はアルコキシカルボニル基である。アルコキシカルボニル基は、好ましくはC 2～C 7、さらに好ましくはC 2～C 6、さらに好ましくはC 2～C 5、さらに好ましくはC 2～C 4、さらに好ましくはC 2～C 3、特に好ましくはC 2のものを使用することができる。

[0018] 上記式 I において、

R 3 は、水素原子、水酸基、C 1～C 3のアルコキシ基、C 1～C 3のアルキルスルファニル基、ニトロ基、フッ素原子、フッ化メチル基、C 6～C 12の単環式又は二環式の芳香族化合物の1価基、C 6～C 12の単環式又は二環式の複素環系芳香族化合物の1価基、又は、次の式：

[化37]



(ただし、上記式中、R a、R 1 及び R 2 は、式 I について上述した R a、R 1 及び R 2 とは独立に、式 I について上述した R a、R 1 及び R 2 とし、て挙げられた基から選択された基を表す)

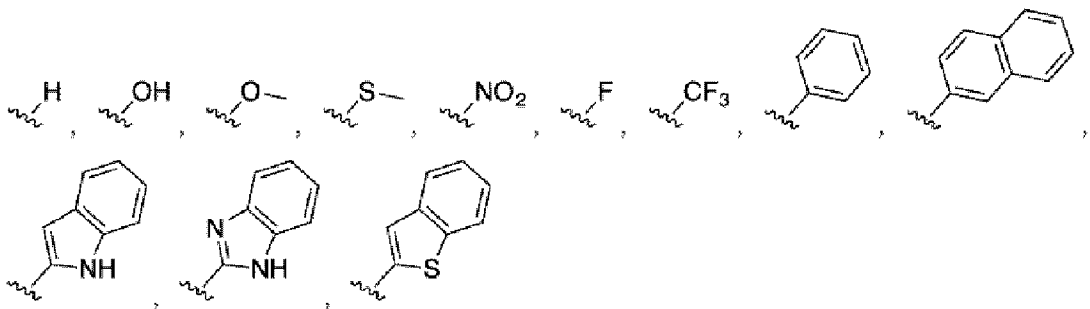
で表される1価基である。

[0019] 好適な実施の態様において、R 3 は、水素原子、水酸基、C 1～C 3のアル

ルコキシ基、C 1～C 3のアルキルスルファニル基、ニトロ基、フッ素原子、トリフルオロメチル基、フェニル基、2-ナフチル基、2-インドリル基、ベンゾイミダゾール-2-イル基、又はベンゾチオフェン-2-イル基とすることができる。

[0020] 好適な実施の態様において、例えば、R 3として、次に挙げる基を使用することができる。（ただし、波線は遊離原子価の位置を示している。）

[0021] [化38]



[0022] 上記式 I において、

R 4 は、水素原子、又は Q_1-O-CH_2- 基を表し、

R 5 は、 $-O-Q_1$ 基、水素原子、メチル基、又はエチル基を表し、

（ただし、R 4 が水素原子である場合には、R 5 は $-O-Q_1$ 基を表し、

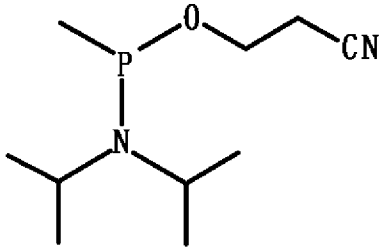
R 4 が Q_1-O-CH_2- 基である場合には、R 5 は水素原子、メチル基、又はエチル基を表す）

R 6 は、 $-O-Q_2$ 基、 $-CH_2-O-Q_2$ 基、又は $-CH(CH_3)-O-Q_2$ 基を表わす。

[0023] 上記 Q_1 は、水素原子、 Q_1 に結合する O と一体となって形成されるリン酸基、 Q_1 に結合する O と一体となって形成されるリン酸基によって形成されるリン酸ジエステル結合を介して連結されるヌクレオチド又は核酸、又は DMT r 基を表し、

Q_2 は、水素原子、 Q_2 に結合する O と一体となって形成されるリン酸基、 Q_2 に結合する O と一体となって形成されるリン酸基によって形成されるリン酸ジエステル結合を介して連結されるヌクレオチド又は核酸、次の式：

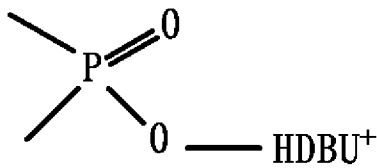
[化39]



(ただし、上記式は、Pに遊離原子価を有する1価の基を表す)

によって表される基、又は次の式：

[化40]

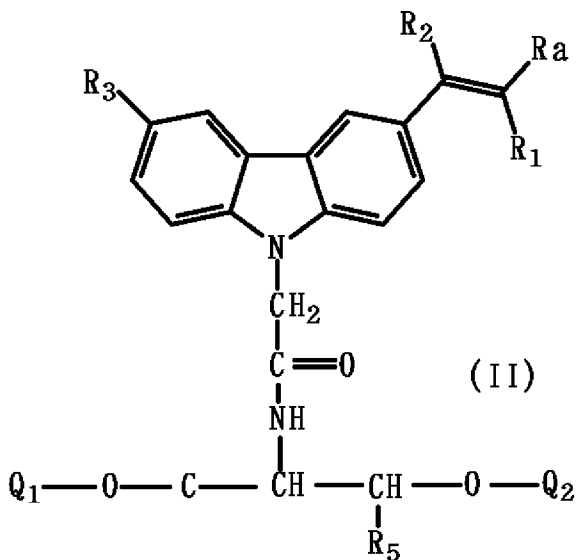


(ただし、上記式は、Pに遊離原子価を有する1価の基を表す)

によって表される基、を表す。

[0024] 好適な実施の態様において、上記式IのR4をQ₁-O-CH₂-基、R5を水素原子、メチル基又はエチル基、R6を-O-Q₂基とすることができる。この場合に、上記式Iで表される化合物は、次の式II：

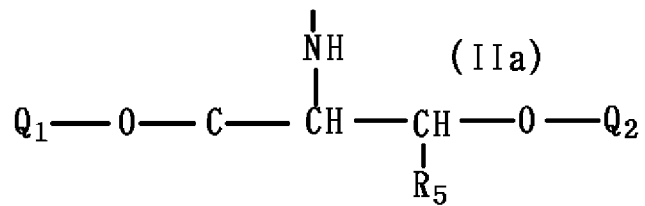
[化41]



で表される化合物である。

[0025] 上記式 I 中の部分構造である次の式 II a :

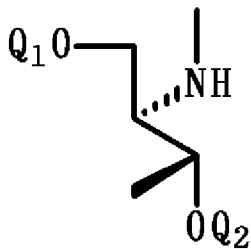
[化42]



で表される骨格構造は、好ましくは、

次の式 :

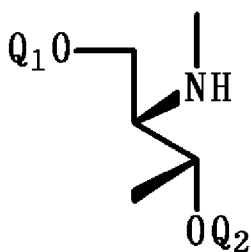
[化43]



で表されるD-トレオニノール構造、

次の式 :

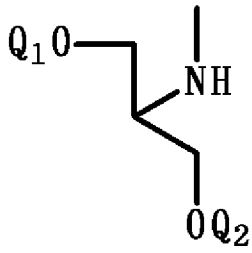
[化44]



で表されるL-トレオニノール構造、

又は、次の式 :

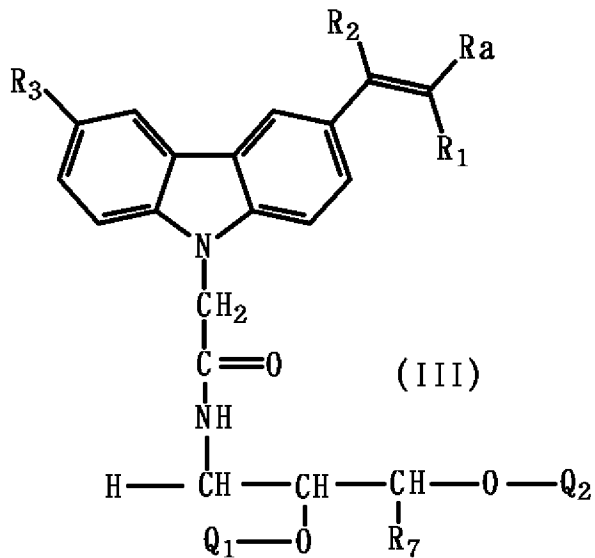
[化45]



で表されるセリノール構造とすることができる。

[0026] 好適な実施の態様において、上記式 I の R 4 を水素原子、R 5 を $-O-Q_1$ 基、R 6 を $-CH_2-O-Q_2$ 基又は $-CH(CH_3)-O-Q_2$ 基（すなわち、R 6 を $-CH(R_7)-O-Q_2$ 基、ただし R 7 は水素原子又はメチル基）とすることができる。この場合に、上記式 I で表される化合物は、次の式 II :

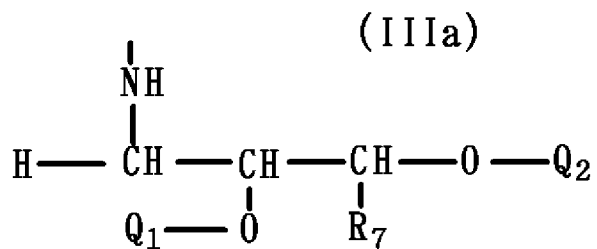
[化46]



で表される化合物である。

[0027] 上記式 III 中の部分構造である次の式 III a :

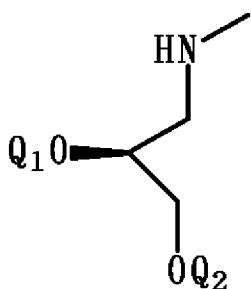
[化47]



で表される骨格構造は、好ましくは、

次の式：

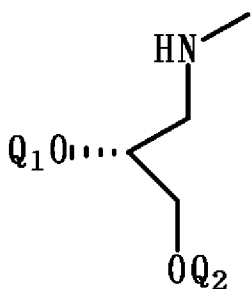
[化48]



で表される (R) - 3 - アミノ - 1, 2 - プロパンジオール構造、

又は、次の式：

[化49]



で表される (S) - 3 - アミノ - 1, 2 - プロパンジオール構造とすることができる。

[0028] [修飾核酸類]

好適な実施の態様において、 Q_1 を、 Q_1 に結合するOと一体となって形成されるリン酸基によって形成されるリン酸ジエステル結合を介して連結されるヌクレオチド又は核酸として、 Q_2 を、 Q_2 に結合するOと一体となって形成さ

れるリン酸基によって形成されるリン酸ジエステル結合を介して連結されるヌクレオチド又は核酸とすることができる。すなわち、上記式Iで表される化合物は、特徴的な構造を備えた光応答性人工ヌクレオチドアナログが配列中に取り込まれた核酸又はオリゴヌクレオチド（本発明に係る修飾核酸又は修飾オリゴヌクレオチド、本発明に係る修飾核酸類ということがある）とすることができる。また、本発明に係る修飾核酸類において、特徴的な構造を備えた光応答性人工ヌクレオチドアナログが配列中の末端に位置していてもよく、この場合には Q_1 又は Q_2 のいずれかの側のみが Q_1 又は Q_2 に結合するOと一体となって形成されるリン酸基によって形成されるリン酸ジエステル結合を介して連結されるヌクレオチド又は核酸となる。

[0029] [ヌクレオシドアナログ]

好適な実施の態様において、 Q_1 及び Q_2 を、水素原子とすることができる。すなわち、上記式Iで表される化合物は、特徴的な構造を備えた光応答性人工ヌクレオシドアナログ分子（本発明に係るヌクレオシドアナログということがある）とすることができる。

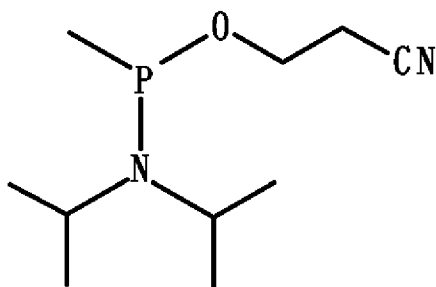
[0030] [ヌクレオチドアナログ]

好適な実施の態様において、 Q_1 を、 Q_1 に結合するOと一体となって形成されるリン酸基とすることができる、 Q_2 を、水素原子とすることができる。すなわち、上記式Iで表される化合物は、特徴的な構造を備えた光応答性人工ヌクレオチドアナログ分子（本発明に係るヌクレオチドアナログということがある）とすることができる。

[0031] [修飾核酸合成モノマー]

好適な実施の態様において、 Q_1 を、DMTr基とすることができ、 Q_2 を、 Q_2 に結合するOと一体となって形成されるリン酸基、 Q_2 に結合するOと一体となって形成されるリン酸基によって形成されるリン酸ジエステル結合を介して連結されるヌクレオチド又は核酸、次の式：

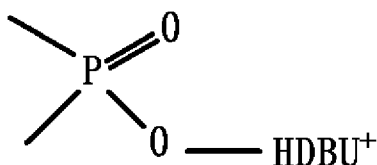
[化50]



(ただし、上記式は、Pに遊離原子価を有する1価の基を表す)

によって表される基、又は次の式：

[化51]



(ただし、上記式は、Pに遊離原子価を有する1価の基を表す)

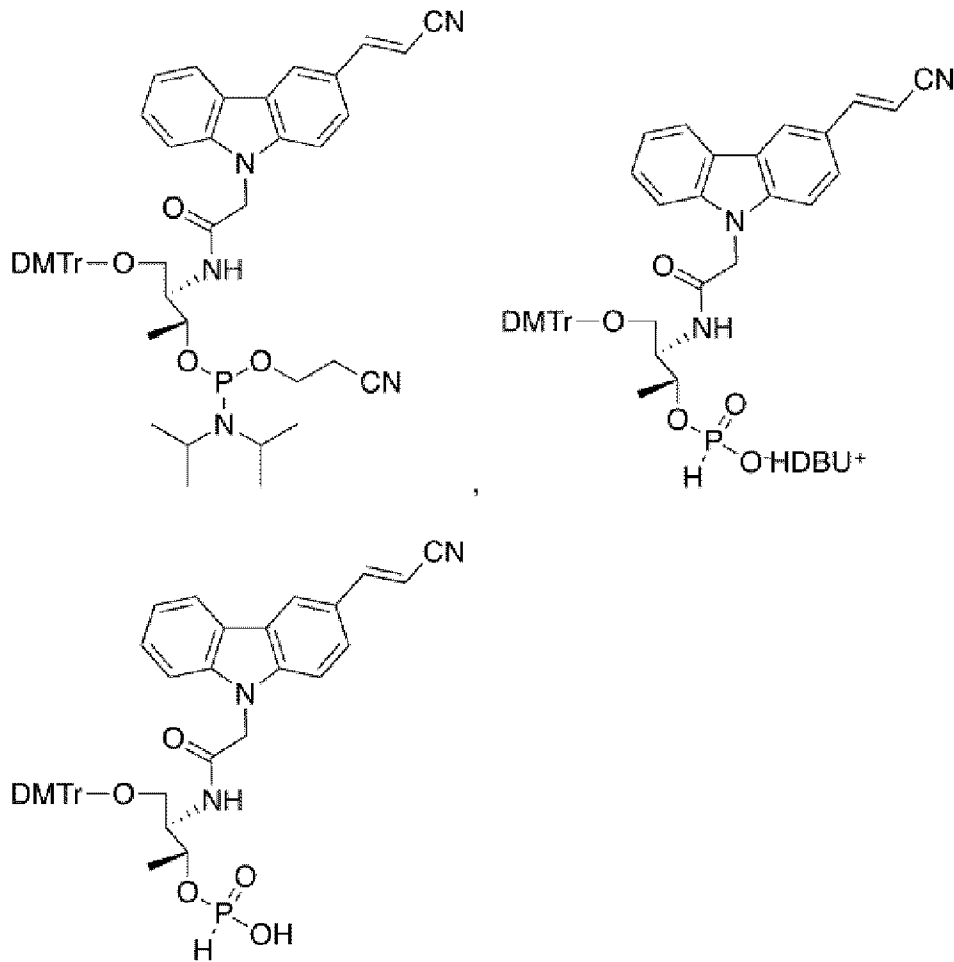
によって表される基、

とすることができる。すなわち、上記式1で表される化合物は、特徴的な構造を備えた光応答性修飾核酸合成用のモノマー（本発明に係る修飾核酸合成モノマーということがある）とすることができる。よく知られているように、このような構造のモノマーは、ホスホロアミダイト法、及びH-ホスホネート法によって使用可能な核酸合成試薬となる。

[0032] このような修飾核酸合成モノマーとして、次のようなモノマーを例示することができる。

[0033]

[化52]



[0034] [光架橋の形成]

本発明に係る修飾核酸類は、これを1本鎖核酸として使用すると、これと相補的な1本鎖核酸とハイブリダイズして二重らせんを形成することができる。二重らせんの形成にあたって、ビニルカルバゾール構造部分に対して、相補鎖中において塩基対を形成すべき位置にある核酸塩基については、特段の制約がなく、自由に選択できる。形成された二重らせんに光照射を行うと、二重らせんを形成する核酸鎖の間に、光反応によって架橋を形成することができる。この光架橋は、配列中でビニルカルバゾール構造部分が核酸塩基として位置する位置から配列中で1塩基分だけ5'末端側に位置する核酸塩基に対して、相補鎖中において塩基対を形成する位置にある核酸塩基と、ビニルカルバゾール構造との間に形成される。言い換えれば、この光架橋は、

ビニルカルバゾール構造部分に対して、相補鎖中において塩基対を形成すべき位置にある核酸塩基から、配列中で1塩基分だけ3'末端側に位置する核酸塩基と、ビニルカルバゾール構造との間に形成される。

[0035] 本発明に係る光反応性の化合物のビニルカルバゾール構造が光架橋を形成可能である相手方の塩基は、ピリミジン環を有する塩基である。一方で、本発明に係る光反応性の人工核酸塩基は、プリン環を有する塩基とは光架橋を形成しない。すなわち、本発明に係る光架橋性の化合物は、天然の核酸塩基としては、シトシン、ウラシル、及びチミンに対して光架橋を形成し、一方で、グアニン及びアデニンに対しては光架橋を形成しないという、強い特異性を有している。

[0036] 本発明に係る光反応性の化合物は、光反応性の修飾核酸類（光架橋性修飾核酸類）として使用することによって、その修飾核酸類と相補的な塩基配列を有する配列とハイブリダイズさせて二重らせんを形成させることができるために、目的とする特定の配列に対してのみ光クロスリンク反応（光架橋反応）を行わせることができる。すなわち、本発明に係る光架橋剤化合物は、非常に高い配列選択性を、所望に応じて配列設計して、付与することができる。

[0037] 光架橋のために照射される光は、一般に350～380nmの範囲、好ましくは360～370nmの範囲、さらに好ましくは366nmの波長を含む光が好ましく、特に好ましくは、366nmの単波長のレーザー光である。

[0038] 光架橋した後に、さらに光照射によって光開裂をすることができる。すなわち、本発明に係る光反応性の化合物は、可逆的な光架橋を可能とするものであり、可逆的な光架橋剤として使用することができる。

[0039] 光開裂のために照射される光は、一般に330～370nmの範囲、好ましくは330～360nmの波長を含む光を使用することができる。また、好適な実施の態様において、366nmの波長を含む光、特に好ましくは、366nmの単波長のレーザー光を使用することができる。

[0040] 好適な実施の態様において、これらの光架橋及び光開裂の光反応は、350～370 nmの範囲の波長を含む光の照射によって行うことができ、好ましくは366 nmの単波長のレーザー光を使用して行うことができる。この範囲の波長の光を使用すれば、同一の光源によって光架橋及び光開裂の光反応のいずれをも行うことができ、2種の光源を用意する必要がない点で有利である。この範囲の波長の光を使用する場合には、温度条件によって、光架橋、及び光開裂のいずれの光反応が進行するかを制御することができる。光架橋反応を進行させるためには、一般に0～50℃、好ましくは0～40℃、さらに好ましくは0～30℃、さらに好ましくは0～20℃、さらに好ましくは0～10℃、さらに好ましくは0～5℃の範囲の温度、特に好ましくは0℃で光照射を行う。光開裂反応を進行させるためには、一般に60～100℃、好ましくは60～90℃、さらに好ましくは70～90℃の範囲の温度で光照射を行う。

[0041] 本発明による光架橋及び光開裂は、光反応を利用しているために、pH、温度、塩濃度などに特段の制約がなく、核酸類等の生体高分子が安定に存在可能なpH、温度、塩濃度とした溶液中で、光照射によって行うことができる。

[0042] 本発明による光架橋及び光開裂は、極めて迅速に進行し、例えば、光反応性の化合物として知られるソラレンであれば数時間を要する条件（350 nm光照射）において、わずか1秒間（366 nm光照射）で光反応が進行する。すなわち、本発明に係る光架橋剤を使用すれば、数秒間、例えば、1～9秒間、1～7秒間、1～5秒間、又は1～3秒間の時間の光照射によって、光反応を進行させて光架橋を形成させることができる。

[0043] [糖構造を備えた従来型の光応答性人工ヌクレオチドとの対比]

本発明者は、光応答性人工ヌクレオチドとして、リボース又はデオキシリボースの構造を備えた人工ヌクレオチド構造を、長年にわたって研究してきた（特許文献1～4参照）。ところが、上述のように、本発明に係る化合物は、リボース及びデオキシリボースの構造を備えていないにもかかわらず、

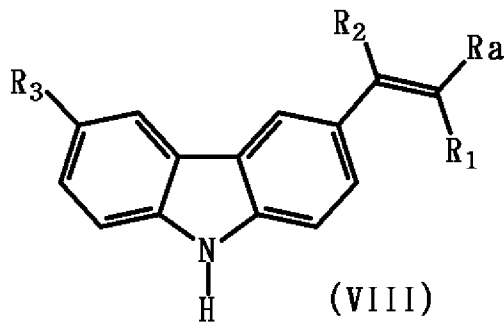
光応答性人工ヌクレオチドと同様に使用して、光架橋反応を進行させることができるものであった。つまり、本発明者による特許文献4（日本国特許第4940311号）で開示した優れた特性を、リボース及びデオキシリボースの構造を備えていないにもかかわらず、同様に発揮することができるものとなっていた。それどころか、本発明による化合物は、同一のビニルカルバゾール構造を備えた場合であっても、デオキシリボースの構造を備えた従来型の光応答性人工ヌクレオチド（光架橋剤）と比較して、より短い光照射時間で、より高い転化率（すなわち、光架橋の形成の割合）を示すという、優れた効果を奏するものとなっていた。

[0044] [光応答性人工ヌクレオシドアナログ分子の合成]

本発明に係る光応答性人工ヌクレオシドアナログ分子は、後述するスキーム1（Scheme 1）に示す合成経路に沿って、合成することができる。

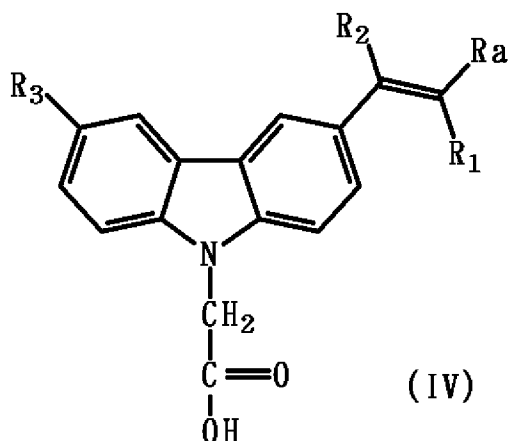
このスキーム1の合成経路は、次の式V I I I :

[化53]



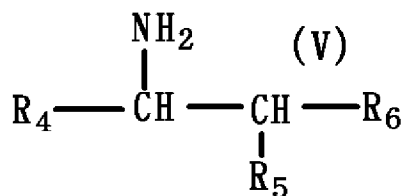
で表される修飾ビニルカルバゾール分子（V I I I）から、次の式I V :

[化54]



で表されるカルボン酸を合成して、これを、次の式V：

[化55]



(ただし、式V中、

R₄は、水素原子、又は Q₁-O-CH₂-基を表し、

R₅は、-O-Q₁基、水素原子、メチル基、又はエチル基を表し、

(ただし、R₄が水素原子である場合には、R₅は-O-Q₁基を表し、

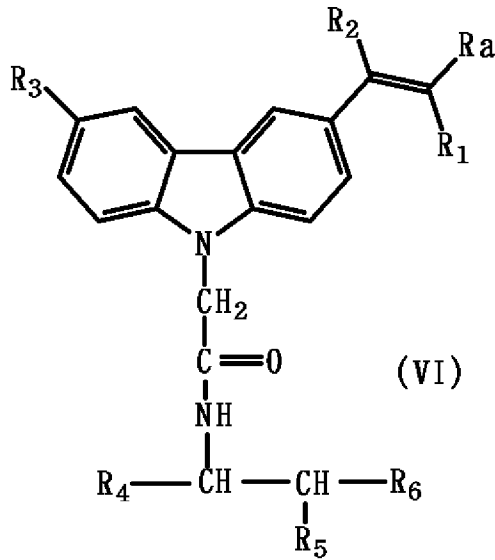
R₄がQ₁-O-CH₂-基である場合には、R₅は水素原子、メチル基、又はエチル基を表す)

R₆は、-O-Q₂基、-CH₂-O-Q₂基、又は-CH(CH₃)-O-Q₂基を表し、

Q₁は、水素原子を表し、Q₂は、水素原子を表す)

で表されるアミンと脱水縮合反応させることによって、次の式VI：

[化56]



(ただし、式VI中、R4、R5、R6は、上記式Vについて上述した通りの基を表す)

で表される光応答性人工ヌクレオシドアナログ分子を得るというものである。

[0045] 上記の合成経路においては、得られる光応答性人工ヌクレオシドアナログ分子(VI)のなかの糖構造に対応するべき部分の骨格構造は、使用されるアミン(V)の構造をそのまま反映したものとなる。

[0046] そこで、光応答性人工ヌクレオシドアナログ分子(VI)のなかの糖構造に対応するべき部分の骨格構造を、例えば、D-トレオニール構造としたい場合には、アミン(V)として、D-トレオニールを用いればよく、例えば、L-トレオニール構造としたい場合には、アミン(V)として、L-トレオニールを用いればよく、例えば、セリニール構造としたい場合には、アミン(V)として、セリニールを用いればよく、例えば、(R)-3-アミノ-1,2-プロパンジオール構造としたい場合には、アミン(V)として、(R)-3-アミノ-1,2-プロパンジオールを用いればよく、例えば、(S)-3-アミノ-1,2-プロパンジオール構造としたい場合には、アミン(V)として、(S)-3-アミノ-1,2-プロパンジオール

ルを用いればよい。

[0047] 上記の合成経路によれば、修飾ビニルカルバゾール分子（V111）から光応答性人工ヌクレオシドアナログ分子（V1）を得るまでのステップは少なく、簡便であり、総収率を非常に高く維持できるという点で、優れたものとなっている。さらに、合成経路中には、塩化水素による活性化のステップなど、操作に注意と熟練を要するステップを含んでいないという点で、有利なものとなっている。これに対して、従来型の光反応性の修飾ヌクレオシド分子の合成においては、その構造中にデオキシリボースまたはリボースを備えているために、上記本発明の合成経路と比較すると、合成経路中のステップは多く、複雑であり、総収率は、上記本発明の合成経路による総収率の数分の一程度であり、低い。また、従来型の光反応性の修飾ヌクレオシド分子の合成においては、その構造中にデオキシリボースまたはリボースを備えているために、糖の水酸基の保護と活性化のために、塩化水素による活性化のステップなど、操作に注意と熟練を要するステップを含むものとなっている。したがって、本発明に係る化合物は、上記合成の簡便さと総収率の高さの点でも、優れたものである。また、本発明は、上記の優れた合成方法（製造方法）にもある。

[0048] [修飾核酸合成モノマー及び修飾核酸類の合成]

上記の合成経路によって得られる光応答性人工ヌクレオシドアナログ分子（V1）を用いて、後述するスキーム1に記載の手法、あるいは当業者に公知の手法を使用して、本発明に係る修飾核酸合成モノマーを得ることができる。本発明に係る修飾核酸合成モノマーの構造は上述した通りであり、これを、ホスホロアミダイト法、及びH-ホスホネート法等の公知の手法によって核酸合成試薬として使用すれば、光応答性人工ヌクレオシドアナログ分子（V1）が配列中に取り込まれた核酸又はオリゴヌクレオチド（本発明に係る修飾核酸類）を得ることができる。このように、本発明に係る修飾核酸合成モノマーは、ホスホロアミダイト法、及びH-ホスホネート法等の公知の手法において核酸合成試薬として使用できる点で、優れたものである。

実施例

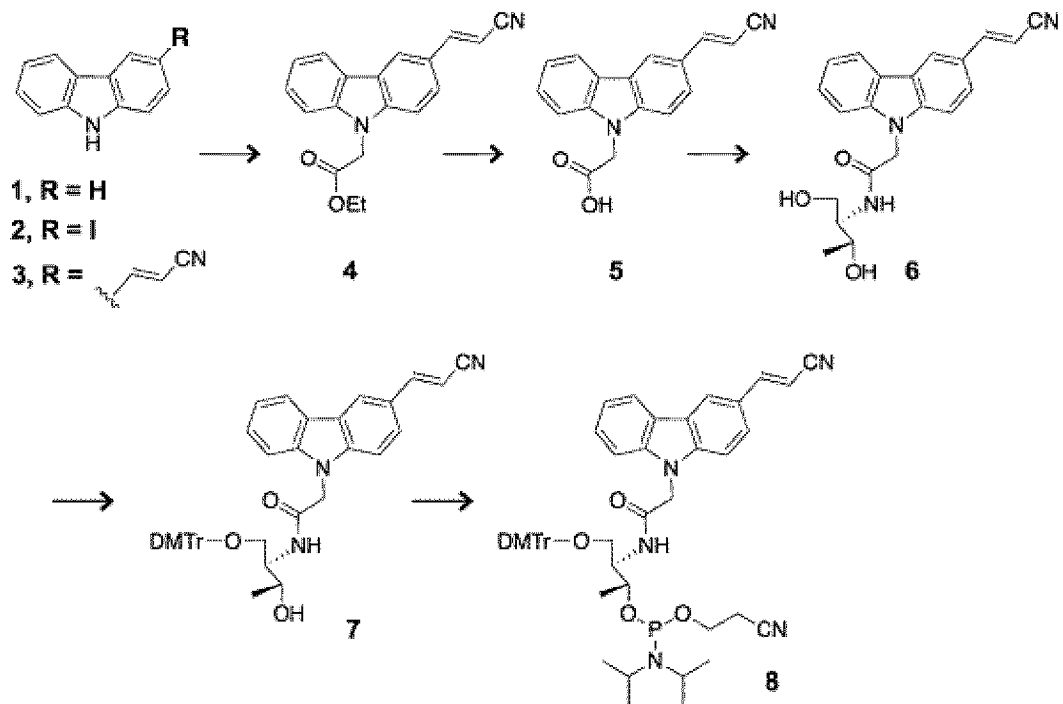
[0049] 以下に実施例をあげて、本発明を詳細に説明する。本発明は、以下に例示する実施例に限定されるものではない。

[0050] [製造例 1]

[ヌクレオシドアナログ（光反応性素子）の合成]

次のスキーム 1 に示す合成経路に沿って、光応答性人工ヌクレオシドアナログ分子（ヌクレオシドアナログ、あるいは光反応性素子ということがある）、さらに修飾核酸合成モノマーの合成を行った。

[0051] [化57]



(Scheme 1)

[0052] (1) 化合物 2 の合成

1 L の 3 つ口フラスコ中で Carbazole (化合物 1、4.0 g、23.6 mmol) をエタノール (800 mL) に溶解しヨウ素 (3.0 g)、 NaIO_4 (1.28 g) をフラスコに加え、濃硫酸エタノール溶液 (2.5 mL/100 mL) 添加後、60°C で 2 時間攪拌

した。TLC（ヘキサン：酢酸エチル、4:1）で反応の終了を確認後、水酸化ナトリウムのエタノール溶液で中和し、溶媒を除去した。残渣をクロロホルムに溶解し水・飽和炭酸水素ナトリウム溶液・飽和食塩水で洗浄後、エバポレータにより溶媒を除去した。残渣をエタノールに溶解し、再結晶により化合物2を得た。（収量：3.4 g、収率：49%）

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): δ 11.40 (s, 1H, NH), 8.51 (d, 1H, $J=1.7$ Hz, H-4), 8.14 (d, 1H, $J=7.8$ Hz, H-5), 7.62 (dd, 1H, $J=8.5, 1.7$ Hz, H-2), 7.51 (d, 1H, $J=8.1$ Hz, H-8), 7.40 (m, 1H, H-7), 7.36 (d, 1H, $J=8.5$ Hz, H-1), 7.19 (m, 1H, H-6)

[0053] (2) 化合物3の合成

化合物2 (3.4 g、12 mmol) のDMF溶液 (6 mL) に酢酸パラジウム (269 mg、1.2 mmol)、アクリロニトリル (2.0 mL、31 mmol)、トリブチルアミン (2.9 mL、12 mmol) を加え、マイクロウェーブ照射下 (60 W)、 160° で10分撹拌した。TLC（ヘキサン：酢酸エチル、4:1）で反応の終了を確認後、クロロホルムに溶解し水・飽和炭酸水素ナトリウム溶液・飽和食塩水で洗浄後、エバポレータにより溶媒を除去した。硫酸ナトリウムで乾燥後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（クロロホルム）にて精製を行い、化合物3を得た。（収量：2.2 g、収率：83%）

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): δ 11.60 (s, 1H, NH), 8.44 (s, 1H, H-4), 8.12 (d, 1H, $J=7.6$ Hz, H-5), 7.77 (d, 1H, $J=16.6$ Hz, vinyl), 7.69 (dd, 1H, $J=14.3, 1.7$ Hz, H-8), 7.53 (m, 1H, H-1), 7.51 (d, 1H, $J=3.5$ Hz, H-2), 7.45 (m, 1H, H-7), 7.24 (m, 1H, H-6), 6.38 (d, 1H, $J=16.6$ Hz, vinyl)

[0054] (3) 化合物4の合成

化合物3 (0.6 g、2.8 mmol)、KOH (0.46 g、8.3 mmol)、テトラブチルアンモニウムブロマイド (28 mg、0.09 mmol) をアセトン (15 mL) に溶解し、 85°C で30分間撹拌した。Ethyl bromoacetate (0.8 mL、3.3 mmol) を反応溶液に滴下した後、12時間還流した。TLC（クロロホルム：メタノール、9:1

)で原料の消失を確認した後、溶媒を除去、クロロホルムに再溶解後、水で洗浄した。有機層をエバポレータにより濃縮しシリカゲルカラムクロマトグラフィー（クロロホルム）により精製を行った。（収量：0.72 g、2.4 mmol、収率：85 %）

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 8.03–7.03 (m, 8H, ArH, ArCH), 5.87 (d, 0.85H, trans-CNCH), 5.35 (d, 1H, 0.15H, cis-CNCH), 5.00 (s, 2H, CH_2CO), 4.22 (q, 2H, CH_3CH_2), 1.24 (t, 3H, CH_3). MALDI-TOF-MS: calcd.; 305.12 ($[(\text{M}+\text{H})^+]$), found; 304.68.

[0055] (4) 化合物5の合成

化合物4 (0.12 g, 0.41 mmol) をクロロホルム (6 mL) に溶解し、メタノール (7 mL)、水 (3 mL) を加え攪拌した。さらに水酸化ナトリウム (0.39 g, 1 mmol) を加え、室温で4時間攪拌を行った。TLCで原料の消失を確認した後、反応混合物に塩酸のメタノール溶液を加え、pHを2に調整した。濃縮後、酢酸エチルに溶解させ、水で洗浄、硫酸マグネシウムで乾燥させた後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（クロロホルム：メタノール、7:3）により精製した。（収量：0.1 g、0.34 mmol、収率：92%）

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6): δ 8.4 (s, 1H, OH), 8.08–7.26 (m, 8H, Ar-H, ArCH), 6.4 (d, 0.92H, trans-CNCH), 5.7 (d, 0.08H, cis-CNCH), 4.8 (s, 2H, CH_2CO).

[0056] (5) 化合物6の合成

化合物5 (0.75 g、2.7 mmol)、WSC (0.5 g、2.7 mmol)、HOBt (0.35 g、2.7 mmol) のDMF溶液 (20 mL) にD-トレオニノール (0.27 g、2.7 mmol) を加え、室温で24時間攪拌した。TLC（クロロホルム：メタノール、9:1）で原料の消失を確認した後、反応液をクロロホルムで希釈した。この溶液を水および飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（クロロホルム：メタノール、9:1）により精製した。（収量：0.92 g、2.6 mmol、収率：94%）

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6): δ 8.5 (s, 1H, NHC=O), 8.0–7.2 (m, 8H, Ar-H,

ArCH), 6.4 (d, 0.78H, trans-CNCH), 5.7 (d, 0.21H, cis-CNCH), 5.1 (t, 2H, CH₂CO), 4.7 (m, 2H, CH₂OH), 3.9 (m, 1H, NCH), 3.6 (q, 1H, CH₂OH), 3.5 (m, 1H, CHOH), 3.4 (m, 1H, CHOH), 1.0 (d, 3H, CH₃). MALDI-TOF-MS: calcd.; 363.15 [(M+H)⁺], found; 364.71.

[0057] (6) 化合物7の合成

100 mL二口ナスフラスコに化合物6 (0.95 g, 2.4 mmol) を加え窒素置換した後、DMTrCl (0.90 g, 2.7 mmol)、DMAP (60 mg, 0.49 mmol)のピリジン溶液 (20 mL) を滴下し室温で一晩攪拌した。反応溶液にメタノールを加えた後、炭酸水素ナトリウム水溶液を加え溶液をクロロホルムで抽出後、有機層をエバポレートし濃縮した。シリカゲルカラムクロマトグラフィー (0.2% triethylamine, 1% MeOH in CHCl₃) により目的物を精製した。(収量: 0.86 g, 1.3 mmol、収率: 54%)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.1 (s, 1H, NHCO), 7.5-6.3 (m, 21H, Ar-H, ArCH), 5.8 (d, 0.9H, trans-CNCH), 5.3 (d, 0.1H, cis-CNCH), 4.9 (t, 2H, CH₂CO), 3.9 (m, 1H, CHOH), 3.8 (m, 1H, NCH), 3.74 (s, 6H, OCH₃), 3.1-3.2 (m, 2H, CH₂O), 2.7 (m, 1H, CHOH), 0.9 (d, 3H, CH₃).

[0058] (7) 化合物8の合成

ゴムシールボトル (25 mL) に化合物7 (0.37 g, 0.55 mmol) の無水アセトニトリル溶液を加え、密栓後、2回共沸させた。その後容器内を窒素置換し、無水アセトニトリル (5.0 mL)、2-cyanoethyl-N,N,N',N'-tetraisopropyl phosphordiamidite (0.17 g, 0.55 mmol)、0.25 M BTT in MeCN (2.2 mL, 0.55 mmol) を添加し、室温で1時間攪拌した。TLCにより原料の消失を確認後、反応混合物を脱酢酸処理した酢酸エチルで希釈し、炭酸水素ナトリウム水溶液と塩化ナトリウム水溶液で洗浄した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥後、濾過、溶媒の除去を行い、化合物8を得た。(収量: 0.48 g, 0.52 mmol、収率: 94%)

[0059] [製造例2]

[光反応性素子を含むオリゴDNAの合成]

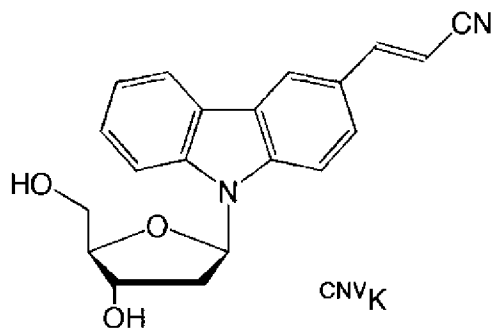
一般的なシアノエチルホスホロアミダイト法に従い、DNA自動合成機により光反応性素子（核酸光反応性素子ということがある）を含むオリゴDNAを合成した。化合物8の固相縮合反応のみ反応時間を999秒に設定した。トリチリルモニターによる化合物8のカップリング収率は97%以上であった。28%アンモニア水溶液による固相からの切出し・脱保護を行った後、逆相HPLCによる精製を行い目的の核酸光反応性素子を含むオリゴDNA（5'-TGCAXCCGT-3'、Xは核酸光反応性素子）を得た。オリゴDNAの同定はMALDI-TOF-MS解析により行った。([M+H]⁺); Calcd. 2809.55, Found 2809.35)

[0060] [製造例3]

[従来型の光反応性修飾ヌクレオシドを含むオリゴDNAの合成]

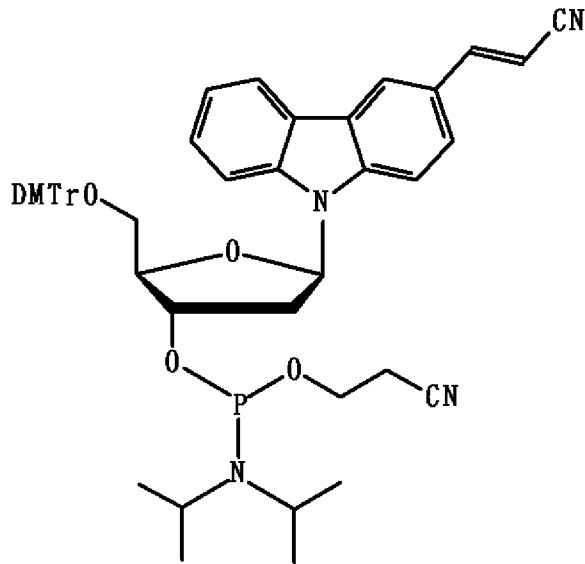
対照実験のために、核酸塩基の塩基部分に代えてビニルカルバゾール骨格構造を備えて、デオキシリボース部分にはデオキシリボースを備えた、従来型の光反応性修飾ヌクレオシドとして、次式：

[化58]



の3-シアノビニルカルバゾール-1'-β-デオキシリボシド (CNVK)を合成した。この化合物から、次式：

[化59]



の核酸合成試薬を合成した。これらの合成は、特許文献4（日本国特許第4940311号）の実施例のスキーム1の手順に沿って行った。その後、上記と同様に、一般的なシアノエチルホスホロアミダイト法に従い、DNA自動合成機により、従来型の光反応性修飾ヌクレオシドを含むオリゴDNA（5′-TGCA^{CNV}CCGT-3′、Xは^{CNV}K）を合成した。

[0061] [光反応性の評価]

製造例2で得られた光反応性素子を含むオリゴDNAと、相補的オリゴDNA（5′-ACGGGTGCA-3′）の等量混合液（5 μM in 50 mM Na-Cacodylate buffer（pH 7.4）、100 mM NaCl）に内部標準としてデオキシウリジン（25 μM）を添加し、0℃にて光照射（366 nm、1,600 mW/cm²）を行った。この溶液をUPLC（溶離液：アセトニトリル／50 mMギ酸アンモニウム、1~20% アセトニトリル／10 min、流速：0.2 mL/min）により分析することで、光反応性を評価した。

[0062] 図1の（a）は、この操作の内容を示す説明図である。図中の修飾ODNには、配列中のXの位置に、本発明に係るヌクレオシドアナログ（光反応性素子）が、改良型光反応性素子として導入されている（製造例2）。また、比較対象実験として、製造例3で得られた、従来型の光反応性修飾ヌクレオシドを含むオリゴDNAを使用した。この場合には、配列中のXの位置に、^{CNV}

Kが導入されている。

[0063] 図1の(b)は、製造例2のオリゴDNAと相補的オリゴDNAを使用して、光照射した後に、UPLCによって分析した結果を示す図である。縦軸方向に並べられたチャートはそれぞれ光照射時間(0.0秒、0.2秒、0.5秒、1.0秒、3.0秒、5.0秒)に対応しており、横軸は保持時間(分)を示す。光照射前(0.0秒)の時点で存在していた2種類の1本鎖ODN(単量体)が、光照射によって減少し、同時に1本鎖ODNの光2量体が形成されて、光照射によって増大している。図1の(c)は、この変化をグラフにしたものである。図1の(c)の横軸は光照射時間(秒)、縦軸は転化率(%)である。白抜きのマル(○)は従来型を表し、黒塗りの四角(■)は改良型を表す。この転化率、すなわち単量体から二量体へと変化した割合は、完全に二量体と変化した場合を転化率100%とした。本発明に係るヌクレオシドアナログ、すなわち改良型光反応性素子は、0.2秒後に約57%、0.5秒後に約83%、1.0秒後に96%という、高い転化率を示した。一方、比較例である従来型の光反応性修飾ヌクレオシドでは、0.2秒後に約35%、0.5秒後に約71%、1.0秒後に90%という、転化率を示した。この従来型による転化率であっても、光化学反応であることを反映して十分に高い転化率が短時間で達成されているが、改良型による転化率は、従来型と比較して、例えば0.2秒で約1.6倍という、高い転化率を示すものとなっていた。

[0064] [合成収率の比較]

本発明に係るヌクレオシドアナログ(改良型)は、上述したスキーム1で示した通りの経路で合成可能であり、これは入手容易な出発材料から、5ステップでの合成となり、総収率は30%であった。一方、従来型の光反応性修飾ヌクレオシドは、上述した通りの経路で合成可能であり、これは入手容易な出発材料から、7ステップでの合成となり、総収率は17%であった。図2は、これらの合成のステップと総収率を対比させた説明図である。このように、本発明に係るヌクレオシドアナログの合成は、糖構造を保持した従

来型の光反応性修飾ヌクレオシドの合成と比較して、少ない合成ステップ数
でよく、約2.3倍という高い総収率を達成できるものであった。さらに、
本発明に係るヌクレオシドアナログの合成は、糖構造を保持した従来型の光
反応性修飾ヌクレオシドの合成において必要となる、塩化水素による活性化
のステップなど、操作に注意と熟練を要するステップを合成経路中に含んで
いないという点で、有利なものとなっていた。

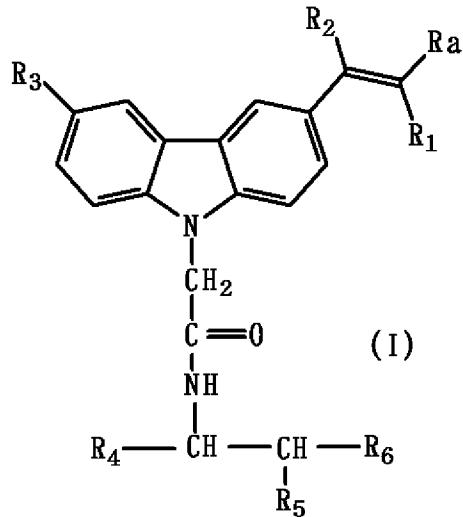
産業上の利用可能性

[0065] 本発明は、核酸の光反応技術に使用可能な、新規な光反応性架橋剤を提供
する。本発明は産業上有用な発明である。

請求の範囲

[請求項1] 次の式 I :

[化1]



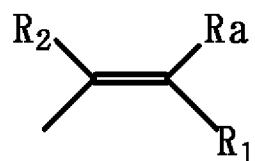
(ただし、式 I 中、

R a は、シアノ基、アミド基、カルボキシル基、C 2 ~ C 7 のアルコシカルボニル基、ホスホノ基、スルホ基、又は水素原子を表し、

R 1 及び R 2 は、それぞれ独立に、シアノ基、アミド基、カルボキシル基、C 2 ~ C 7 のアルコシカルボニル基、又は水素原子を表し、

R 3 は、水素原子、水酸基、C 1 ~ C 3 のアルコシ基、C 1 ~ C 3 のアルキルスルファニル基、ニトロ基、フッ素原子、フッ化メチル基、C 6 ~ C 1 2 の単環式又は二環式の芳香族化合物の 1 価基、C 6 ~ C 1 2 の単環式又は二環式の複素環系芳香族化合物の 1 価基、又は、次の式：

[化2]



(ただし、上記式中、R a、R 1 及び R 2 は、式 I について上述し

た R a、R 1 及び R 2 とは独立に、式 1 について上述した R a、R 1 及び R 2 として挙げられた基から選択された基を表す)

で表される 1 価基を表し、

R 4 は、水素原子、又は Q_1-O-CH_2- 基を表し、

R 5 は、 $-O-Q_1$ 基、水素原子、メチル基、又はエチル基を表し、

、

(ただし、R 4 が水素原子である場合には、R 5 は $-O-Q_1$ 基を表し、

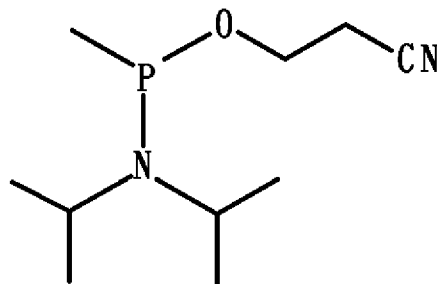
R 4 が Q_1-O-CH_2- 基である場合には、R 5 は水素原子、メチル基、又はエチル基を表す)

R 6 は、 $-O-Q_2$ 基、 $-CH_2-O-Q_2$ 基、又は $-CH(CH_3)-O-Q_2$ 基を表し、

Q_1 は、水素原子、 Q_1 に結合する O と一体となって形成されるリン酸基、 Q_1 に結合する O と一体となって形成されるリン酸基によって形成されるリン酸ジエステル結合を介して連結されるヌクレオチド又は核酸、又は DMT r 基を表し、

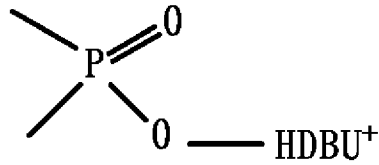
Q_2 は、水素原子、 Q_2 に結合する O と一体となって形成されるリン酸基、 Q_2 に結合する O と一体となって形成されるリン酸基によって形成されるリン酸ジエステル結合を介して連結されるヌクレオチド又は核酸、次の式：

[化3]



(ただし、上記式は、P に遊離原子価を有する 1 価の基を表す) によって表される基、又は次の式：

[化4]



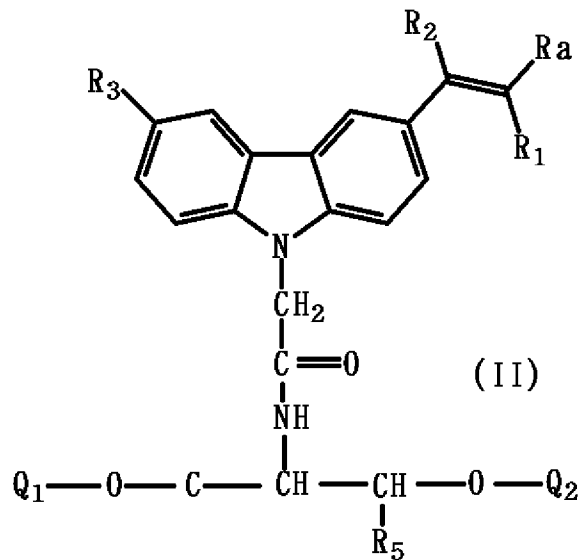
(ただし、上記式は、Pに遊離原子価を有する1価の基を表す)
 によって表される基、を表す)

によって表される、光反応性の化合物。

[請求項2]

次の式 I I :

[化5]



(ただし、式 I I 中、

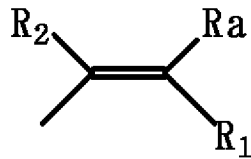
R a は、シアノ基、アミド基、カルボキシル基、C 2 ~ C 7 のアルコキシカルボニル基、ホスホノ基、スルホ基、又は水素原子を表し、

R 1 及び R 2 は、それぞれ独立に、シアノ基、アミド基、カルボキシル基、C 2 ~ C 7 のアルコキシカルボニル基、又は水素原子を表し、

R 3 は、水素原子、水酸基、C 1 ~ C 3 のアルコキシ基、C 1 ~ C 3 のアルキルスルファニル基、ニトロ基、フッ素原子、フッ化メチル基、C 6 ~ C 1 2 の単環式又は二環式の芳香族化合物の1価基、C 6

～C 1 2 の単環式又は二環式の複素環系芳香族化合物の 1 価基、又は、次の式：

[化6]



(ただし、上記式中、R a、R 1 及びR 2 は、式 1 について上述した R a、R 1 及びR 2 とは独立に、式 1 について上述した R a、R 1 及びR 2 として挙げられた基から選択された基を表す)

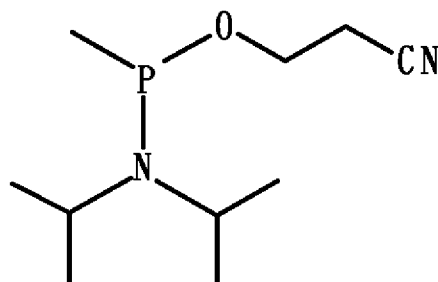
で表される 1 価基を表し、

R 5 は、水素原子、メチル基、又はエチル基を表し、

Q₁ は、水素原子、Q₁ に結合する O と一体となって形成されるリン酸基、Q₁ に結合する O と一体となって形成されるリン酸基によって形成されるリン酸ジエステル結合を介して連結されるヌクレオチド又は核酸、又は DMT r 基を表し、

Q₂ は、水素原子、Q₂ に結合する O と一体となって形成されるリン酸基、Q₂ に結合する O と一体となって形成されるリン酸基によって形成されるリン酸ジエステル結合を介して連結されるヌクレオチド又は核酸、次の式：

[化7]



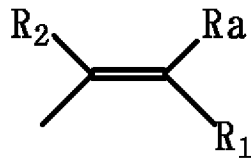
(ただし、上記式は、P に遊離原子価を有する 1 価の基を表す) によって表される基、又は次の式：

R a は、シアノ基、アミド基、カルボキシル基、C 2～C 7 のアルコキシカルボニル基、ホスホノ基、スルホ基、又は水素原子を表し、

R 1 及び R 2 は、それぞれ独立に、シアノ基、アミド基、カルボキシル基、C 2～C 7 のアルコキシカルボニル基、又は水素原子を表し、

R 3 は、水素原子、水酸基、C 1～C 3 のアルコキシ基、C 1～C 3 のアルキルスルファニル基、ニトロ基、フッ素原子、フッ化メチル基、C 6～C 1 2 の単環式又は二環式の芳香族化合物の 1 価基、C 6～C 1 2 の単環式又は二環式の複素環系芳香族化合物の 1 価基、又は、次の式：

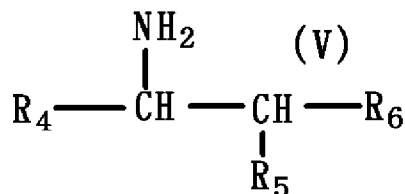
[化10]



(ただし、上記式中、R a、R 1 及び R 2 は、式 I V について上述した R a、R 1 及び R 2 とは独立に、式 I V について上述した R a、R 1 及び R 2 として挙げられた基から選択された基を表す) で表される 1 価基を表わす)

で表される化合物を、次の式 V :

[化11]



(ただし、式 V 中、

R 4 は、水素原子、又は Q₁-O-CH₂-基を表し、

R 5 は、-O-Q₁基、水素原子、メチル基、又はエチル基を表し、

(ただし、R₄が水素原子である場合には、R₅は-O-Q₁基を表し、

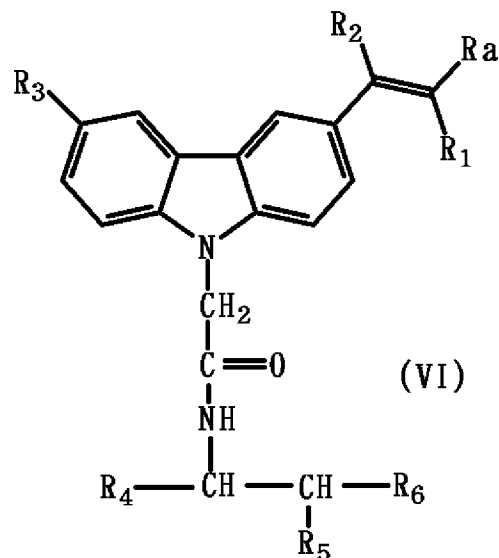
R₄がQ₁-O-CH₂-基である場合には、R₅は水素原子、メチル基、又はエチル基を表す)

R₆は、-O-Q₂基、-CH₂-O-Q₂基、又は-CH(CH₃)-O-Q₂基を表し、

Q₁は、水素原子を表し、Q₂は、水素原子を表す)

で表される化合物と脱水縮合反応させることによって、次の式V I :

[化12]

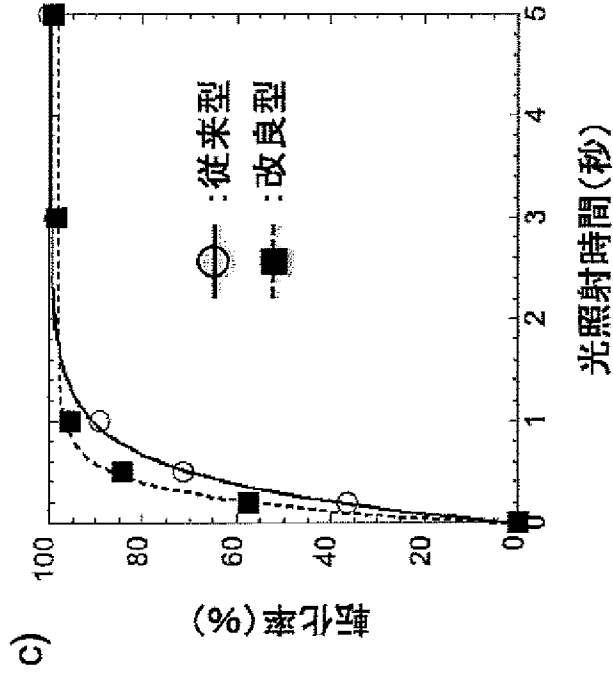
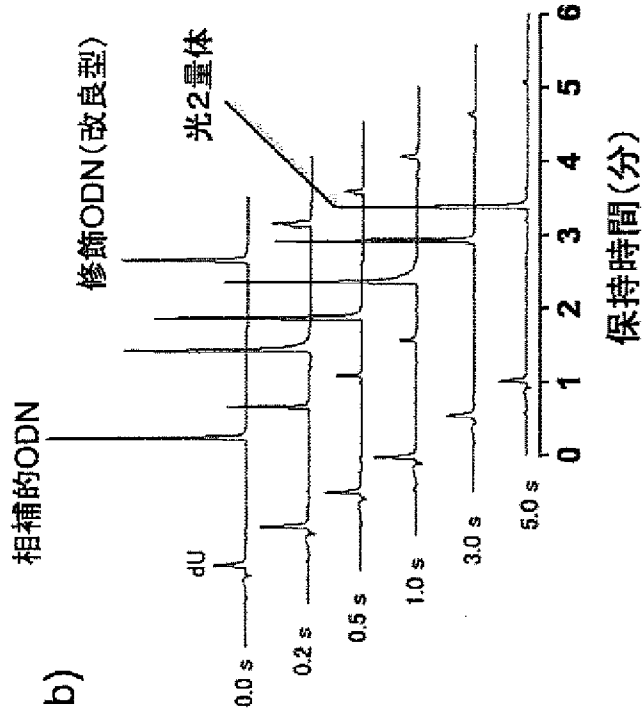
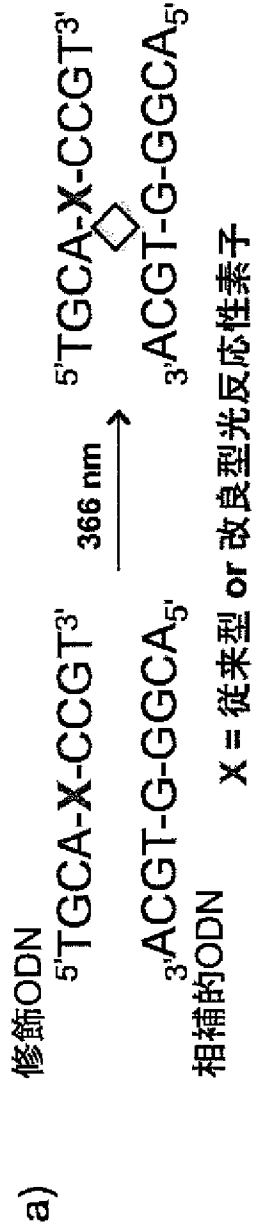


(ただし、式V I 中、

R_a、R₁、R₂、R₃、R₄、R₅、R₆は、上記式I V及び式Vについて、上述した通りの基を表す)

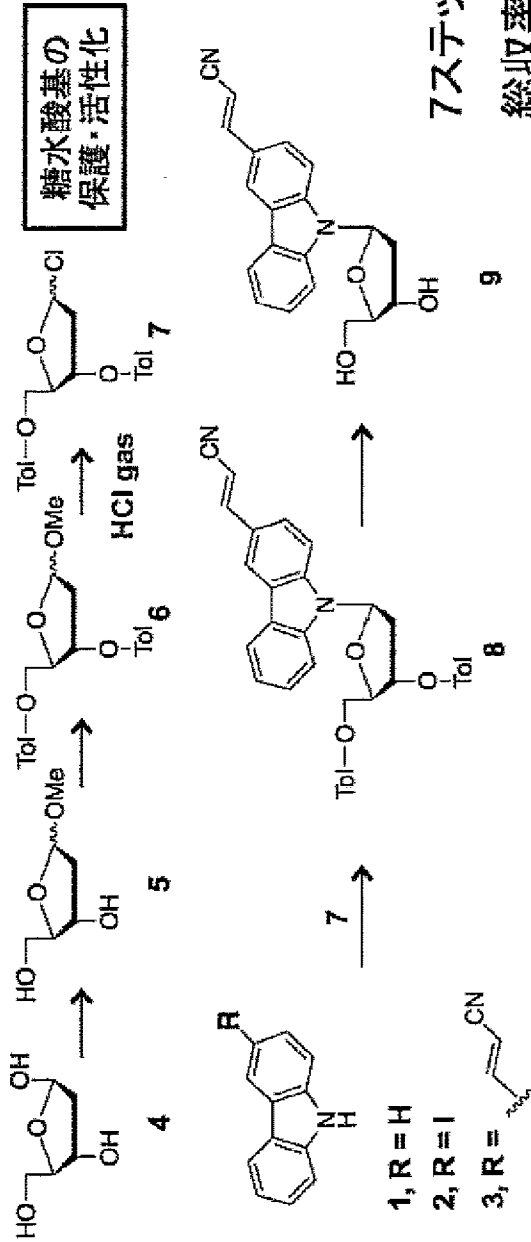
で表される、化合物を製造する方法。

[圖1]

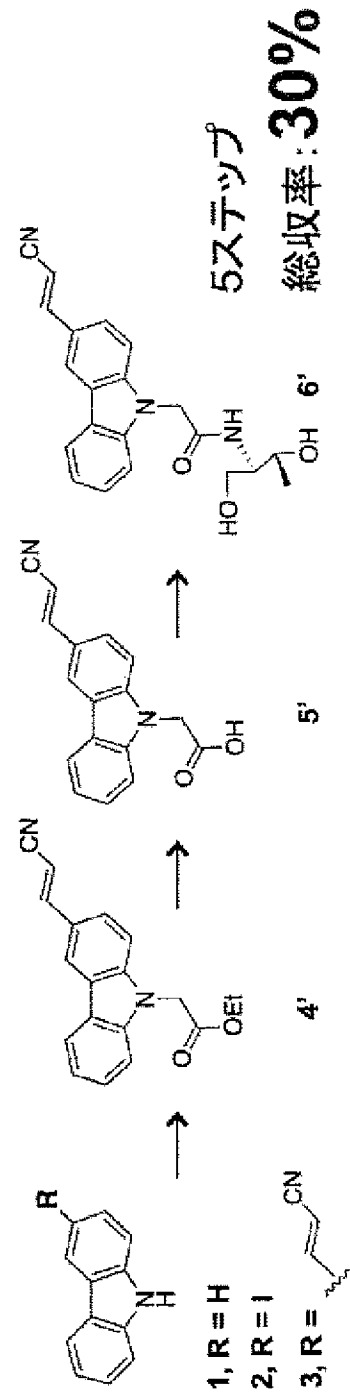


[図2]

従来型核酸光反応性素子の合成法



改良型核酸光反応性素子の合成法



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2014/058988

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C07D209/86(2006.01)i, C07H19/06(2006.01)i, C08F230/02(2006.01)i

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)
C07D209/86, C07H19/06, C08F230/02

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	1996-2014
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2014	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2014

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAplus/REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2009/066447 A1 (Japan Advanced Institute of Science and Technology), 28 May 2009 (28.05.2009), claim 1; examples & US 2010/0274000 A1 & EP 2216338 A1	1-6
Y	WO 2010/147673 A2 (UNIVERSITY OF FLORIDA RESEARCH FOUNDATION, INC.), 23 December 2010 (23.12.2010), fig. 5 to 6 (Family: none)	1-6

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 28 May, 2014 (28.05.14)	Date of mailing of the international search report 10 June, 2014 (10.06.14)
--------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/058988

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2005/083073 A1 (Japan Science and Technology Agency), 09 September 2005 (09.09.2005), synthesis example 1 & JP 4653080 B & US 2007/0203331 A1 & EP 1724343 A1	1-6
A	JP 5-507419 A (Genta Inc.), 28 October 1993 (28.10.1993), entire text & EP 542928 A1 & WO 1992/002532 A1	1-6

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） Int.Cl. C07D209/86(2006.01)i, C07H19/06(2006.01)i, C08F230/02(2006.01)i		
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. C07D209/86, C07H19/06, C08F230/02		
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 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2014年 日本国実用新案登録公報 1996-2014年 日本国登録実用新案公報 1994-2014年		
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） C A p l u s / R E G I S T R Y (S T N)		
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
Y	WO 2009/066447 A1（国立大学法人北陸先端科学技術大学院大学） 2009.05.28, 請求項1および実施例等 & US 2010/0274000 A1 & EP 2216338 A1	1-6
Y	WO 2010/147673 A2（UNIVERSITY OF FLORIDA RESEARCH FOUNDATION, INC.）2010.12.23, 図5～6等 （ファミリーなし）	1-6
Y	WO 2005/083073 A1（独立行政法人科学技術振興機構）2005.09.09,	1-6
<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 「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 「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 「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） 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「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 「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 「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 「&」同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 28.05.2014	国際調査報告の発送日 10.06.2014	
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） 早川 裕之 電話番号 03-3581-1101 内線 3492	4 P 4500

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
A	合成例 1 等 & JP 4653080 B & US 2007/0203331 A1 & EP 1724343 A1 JP 5-507419 A (ジンダ・インコーポレイテッド) 1993.10.28, 全文 & EP 542928 A1 & WO 1992/002532 A1	1-6