

(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



(10) 国際公開番号

WO 2011/071078 A1

(43) 国際公開日

2011年6月16日(16.06.2011)

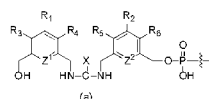
PCT

- (51) 国際特許分類:
 C07C 275/24 (2006.01) C07F 7/10 (2006.01)
 A61K 31/7088 (2006.01) C07F 9/09 (2006.01)
 A61K 31/7105 (2006.01) C07F 9/6558 (2006.01)
 A61K 31/711 (2006.01) C07H 21/00 (2006.01)
 A61K 31/713 (2006.01) C07H 21/02 (2006.01)
 A61K 48/00 (2006.01) C07H 21/04 (2006.01)
 C07C 335/12 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
 C07D 213/40 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2010/072020
- (22) 国際出願日: 2010年12月8日(08.12.2010)
- (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 2009-278456 2009年12月8日(08.12.2009) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人岐阜大学 (Gifu University) [JP/JP]; 〒5011193 岐阜県岐阜市柳戸1番1 Gifu (JP).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 北出 幸夫 (KITADE, Yukio) [JP/JP]; 〒5011193 岐阜県岐阜市柳戸1番1 国立大学法人岐阜大学内 Gifu (JP). 喜多村 徳昭 (KITAMURA, Yoshiaki) [JP/JP]; 〒5011193 岐阜県岐阜市柳戸1番1 国立大学法人岐阜大学内 Gifu (JP).
- (74) 代理人: 青山 陽 (AOYAMA, Yo); 〒4600012 愛知県名古屋市中区千代田5丁目14番27号 Aichi (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, 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, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, 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.

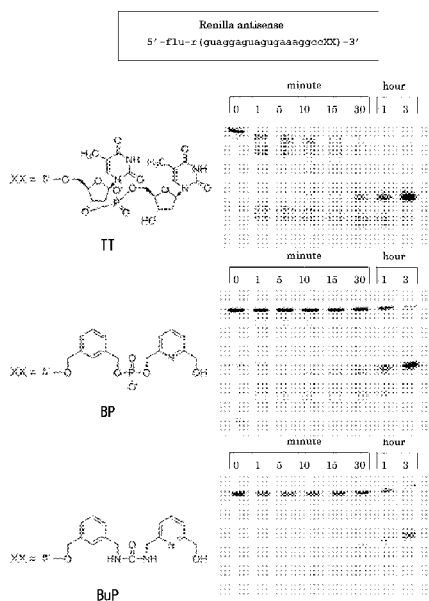
[続葉有]

(54) Title: AROMATIC COMPOUND, MODIFICATION CARRIER THAT USES SAME AND IS USED FOR SYNTHESIZING AN OLIGONUCLEOTIDE DERIVATIVE, OLIGONUCLEOTIDE DERIVATIVE, AND OLIGONUCLEOTIDE CONSTRUCT

(54) 発明の名称: 芳香族化合物、並びに、それを用いたオリゴヌクレオチド誘導体合成用修飾担体、オリゴヌクレオチド誘導体及びオリゴヌクレオチド構築物



[図8]



(57) Abstract: Provided is an oligonucleotide derivative, the 3' end of which is chemically modified with two skeletons selected from among benzene skeletons and pyridine skeletons. Said oligonucleotide derivative can be easily synthesized in a small number of steps. Also provided is an aromatic compound that serves as a precursor for preparing a modification carrier for synthesizing the oligonucleotide derivative. The oligonucleotide derivative and a provided oligonucleotide construct have good cell membrane permeability and excellent nuclease resistance. The aforementioned modification carrier is characterized in that the carrier is chemically modified, via a linker, with the unit represented by structural formula (a) (in which R₁ through R₆ each independently represent hydrogen or a non-hydrogen substituent, Z¹ and Z² each independently represent CH or nitrogen, and X represents oxygen or sulfur).

(57) 要約: 【課題】 3'末端にベンゼン骨格及びピリジン骨格のうち2つの骨格が化学修飾されたオリゴヌクレオチド誘導体を容易に合成することができるであり、しかも少ない工程数で容易に合成することができるオリゴヌクレオチド誘導体、及び、そのオリゴヌクレオチド誘導体合成用修飾担体を調製するための前駆体となる芳香族化合物を提供する。また、3'末端ダンケリングエンドにベンゼン骨格及びピリジン骨格のうち2つの骨格が化学修飾されたオリゴヌクレオチド誘導体であって、細胞膜への透過性が良好で、優れたヌクレアーゼ耐性を有するオリゴヌクレオチド誘導体及びオリゴヌクレオチド構築物を提供する。【解決手段】 下記構造式(a)で示されるユニットがリンカーを介して担体に化学修飾されていることを特徴とするオリゴヌクレオチド誘導体合成用修飾担体(ただし、式中のR₁~R₆はそれぞれ独立して水素又は水素以外の置換基を示す。また、式中Z¹及びZ²はそれぞれ独立してCH又は窒素を示し、Xは酸素又はイオウを示す)。

WO 2011/071078 A1

- (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, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
 - 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

明 細 書

発明の名称：

芳香族化合物、並びに、それを用いたオリゴヌクレオチド誘導体合成用修飾担体、オリゴヌクレオチド誘導体及びオリゴヌクレオチド構築物

技術分野

[0001] 本発明は、芳香族化合物、並びに、それを用いたオリゴヌクレオチド誘導体合成用ウレア修飾型担体、オリゴヌクレオチド誘導体、及びオリゴヌクレオチド構築物に関する。

背景技術

[0002] 近年、DNAやRNAなど各種のオリゴヌクレオチドが治療、診断等の用途に用いられるようになってきている。例えば、診断用途においては、DNAチップやDNAマイクロアレイが挙げられ、治療用途では、治療関連遺伝子の導入ほか、疾患関連遺伝子のノックダウンによる発現抑制等が挙げられる。また、特定の分子と特異的に結合する核酸分子やペプチドであるアプタマーを治療薬として用いる試みもなされている。

[0003] 特に注目される核酸技術としては、RNA干渉（RNAi）を利用した、特定遺伝子のノックダウン法が挙げられる。RNAiとは、二本鎖RNA（dsRNA）の働きによって、それと配列の相同な遺伝子の働きが抑制される現象をいう。RNAiによる遺伝子発現の抑制は、dsRNAがRNase IIIファミリーの一種であるDicerによって認識され、切断されて21～23量体のsiRNAs（short interfering RNAs）となり、このsiRNAがRISC（RNA-induced silencing complex）に取り込まれ、続いて取り込まれたsiRNAに相同的なmRNAが中央部で切断され、分解されることによる。

[0004] しかしながら、生体内において外来性のDNAやRNAは、各種のヌクレアーゼに曝されており、特にRNAはヌクレアーゼにより分解されやすいため、意図したノックダウン効果が充分得られなかったり、ノックダウン効果

を安定的に維持させるのが困難であったりするという問題があった。

[0005] この問題を解決するため、オリゴヌクレオチドを化学修飾してヌクレアーゼ耐性を向上させることが検討されている（非特許文献1～3）。例えば、*siRNA*についても、図1に示すように、糖や塩基やリン酸エステル的部位を様々な置換基で化学修飾することが試みられている（非特許文献4）。

[0006] こうした状況下、本発明者は、特許文献1に記載されているように、ベンゼン骨格やピリジン骨格を導入するためのアミダイト試薬をCPG樹脂に修飾し（例えば図2及び図3参照）、ヌクレオチドの3'末端にベンゼン骨格やピリジン骨格を有するユニットを2つ導入することに成功している。この技術は、以下に示すような、*RNAi*における3'末端ダングリングエンドの重要な役割を考慮して開発されたものであり、ノックダウンの効果を低下させることなく、オリゴヌクレオチドのヌクレアーゼ耐性を向上させることができる。

[0007] すなわち、*RNAi*の標的*mRNA*の分解の過程に関与するマルチドメインタンパクとしてRISCが知られているが、近年、RISC中のPAZドメインと*siRNA*の共結晶X線結晶構造解析が行われた（J. B. Ma., K. Ye and D. J. Patel., *Nature.*, 429, 318-322 (2004).）。その結果、PAZドメインは*siRNA*の3'末端ダングリングエンドを認識しており、3'末端ダングリングエンドの2つのヌクレオチドがPAZドメインの疎水性ポケットに入り込んで認識されていることが明らかとなった（J. J. Song., J. Liu., N. H. Tolia., J. Schneiderman., S. K. Smith., R. A. Martienssen., G. J. Hannon and L. Joshua-Tor., *Nat. Struct. Biol.*, 10, 1026-1032 (2003)、K. S. Yan., S. Yan., A. Farooq., A. Han., L. Zeng and M. M. Zhou., *Nature.*, 426, 468-474 (2003)、Zhang., F. A. Kolb., L. Jaskiewicz., E. Westhof and W. Filipowicz., *Cell.*, 118, 57-68 (2003)及びA. Lingel., B. Simon., E. Izaurralde and M. Sattler., *Nature.*, 426, 465-469 (2003)）。このため、3'末端ダングリングエンドの2つのヌクレオチドの代わりに、疎水性を有するベンゼン骨格やピリジン骨格を2つ化

学修飾すれば、ノックダウンの効果を高めることができるのではないかという発想のもと、特許文献1に記載されたオリゴヌクレオチド誘導体が開発されたのである。

- [0008] なお、本発明に関連する技術として、本発明者らは、siRNAの3'末端ダングリリングエンドのリン酸ジエステル結合部分をカルバメート結合やウレア結合に変換し、これによって結合部分の負電荷をなくし、細胞核の膜への透過性を良好にすることにより、siRNAのヌクレアーゼ耐性とサイレンシング活性とを高めることにも成功している（非特許文献5）。

先行技術文献

特許文献

- [0009] 特許文献1：WO2007/094135

非特許文献

- [0010] 非特許文献1：L. Beigelman., J. A. McSwiggen., K. G. Draper et al., *J Biolchem* 270, 25702–25708 (1995) 27
非特許文献2：S. P. Zinnen K. Domenico., M. Wilson et al., *RNA* 8, 214–228 (2002)
非特許文献3：S. Agrawal and E. R. Kandimalla., *Curr. Cancer Drug Targets.*, 1, 197–209 (2001)
非特許文献4：H. Hoshi, *FEBS Letters* 521, 197–199 (2002)
非特許文献5：Y. Ueno, T. Naito, K. Kawada, A. Shibata, Hye-Sook Kim Y. Wataya, Y. Kidade, *Biochem Biophys Res Commun* 330, 1168–1175 (2005)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0011] しかし、上記特許文献1に記載されている、3'末端にベンゼン骨格やピリジン骨格を2つ化学修飾させたオリゴヌクレオチド誘導体を合成する際に使用する担体の調製には多くの工程が必要であり、極めて手間がかかるものであった（例えば図2及び図3参照）。また、この担体の調製には、化学的

に不安定なアミダイト体と、リンカーを介して担体に結合したベンゼン骨格やピリジン骨格に結合しているヒドロキシメチル基とを反応させなければならず、この一連の反応を成功させるためには、高度に訓練された技術者によって注意深く行わなければならないという問題があった。

[0012] 本発明は、上記従来の実情に鑑みてなされたものであり、3'末端にベンゼン骨格及びピリジン骨格のうち2つの骨格が化学修飾されたオリゴヌクレオチド誘導体を容易に合成することが可能であり、しかも少ない工程数で容易に合成することができるオリゴヌクレオチド誘導体合成用修飾担体、及び、そのオリゴヌクレオチド誘導体合成用修飾担体を調製するための前駆体となる芳香族化合物を提供することを目的とする。

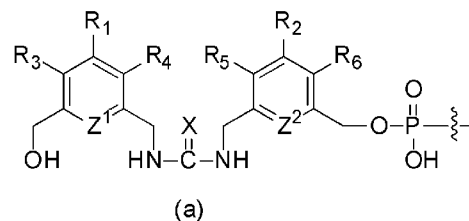
また、3'末端にベンゼン骨格及びピリジン骨格のうち2つの骨格が化学修飾されたオリゴヌクレオチド誘導体であって、細胞膜への透過性が良好で、優れたヌクレアーゼ耐性を有するオリゴヌクレオチド誘導体及びオリゴヌクレオチド構築物を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0013] 上記特許文献1に記載されている、3'末端にベンゼン骨格やピリジン骨格を2つ化学修飾させたオリゴヌクレオチド誘導体を合成する際に使用する担体の調製では、DNAやRNAの合成に用いられているアミダイト体と同様の手法により、芳香族環どうしがリン酸ジエステル結合によって連結される。このため、中間体として化学的に不安定なアミダイト体を用いることとなり、これが合成のための工程数の増加や合成の困難性の原因となっていた。このため、本発明者らは、芳香族環どうしをリン酸ジエステル結合で連結するのではなく、尿素結合により連結することとした。尿素結合による芳香族環どうしの連結はカルボニルジイミダゾールを用いてカップリングすることにより極めて容易かつ定量的に形成させることができるからである。また、チオ尿素結合による連結においても、同様の原料から対応するイソチオシアネートを経由して、極めて容易かつ定量的にチオ尿素結合を形成させることができる。

[0014] すなわち、本発明のオリゴヌクレオチド誘導体合成用修飾担体は、下記構造式 (a) で示されるユニットが直接又はリンカーを介して担体に化学修飾されていることを特徴とする (ただし、式中の $R_1 \sim R_6$ はそれぞれ独立して水素又は水素以外の置換基を示す。また、式中 Z^1 及び Z^2 はそれぞれ独立して CH 又は窒素を示し、 X は酸素又はイオウを示す)。 $R_1 \sim R_6$ において水素以外の置換基としては、例えばアルキル基、アリール基、ハロアルキル基及びハロゲン基等が挙げられる。

[0015] [化1]



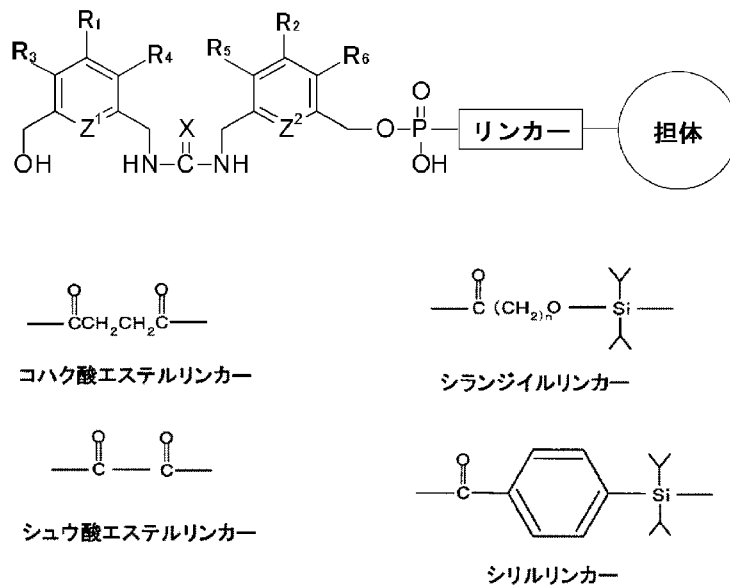
[0016] 本発明のオリゴヌクレオチド誘導体合成用修飾担体では、芳香族環どうしが尿素結合又はチオ尿素結合により連結しており、末端の芳香族環にはヒドロキシメチル基が結合している。このため、DNAやRNAの合成に多用されているアミダイト体を、このヒドロキシメチル基に結合させることにより、任意の配列のオリゴヌクレオチドを連結させることができる。また、この尿素結合による芳香族環どうしの連結は、カルボニルジイミダゾールを用いてカップリングすることにより極めて容易かつ定量的に形成させることができる。また、チオ尿素結合による連結においても、同様の原料から対応するイソチオシアネートを経由して、極めて容易かつ定量的にチオ尿素結合を形成させることができる。

[0017] ここで担体は、上記構造式 (a) (化1) で示されるユニットやリンカーと結合できる官能基を有するものであれば、特に限定はされない。このような担体として、例えば、微小多孔質ガラスやポーラスガラス等のガラス、プラスチック (例えば、ポリエステル樹脂、ポリエチレン樹脂、ポリプロピレン樹脂、アクリロニトリルブタジエンスチレン樹脂、ナイロン、アクリル樹

脂、フッ素樹脂、ポリカーボネート樹脂、ポリウレタン樹脂、メチルペンテン樹脂、フェノール樹脂、メラミン樹脂、エポキシ樹脂、塩化ビニル樹脂)等が挙げられる。担体の形状としては、ビーズ状、板状(基板状)、糸状、球状、多角形状、粉末状等、どのような形状のものであってもよい。

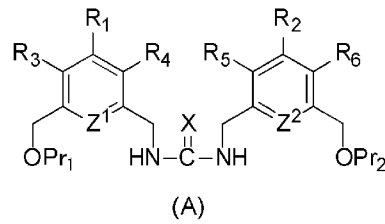
[0018] また、リンカーは、上記構造式(a)(化1)で示されるユニットと担体とをリンカーを介して化学結合できるものであれば、特に限定はされることはなく、例えば、DNAやRNAの自動合成において通常用いられているリンカーを用いることができる。さらに具体的には、以下に示すコハク酸エステルリンカー、シュウ酸エステルリンカー、シランジイルリンカー、シリルリンカーなどを用いることができる。

[0019] [化2]



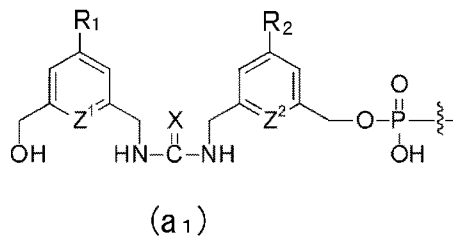
[0020] 上記本発明のオリゴヌクレオチド誘導体合成用修飾担体は、下記構造式(A)で示される芳香族化合物を前駆体として容易に調製することができる(ただし、式中の $\text{R}_1 \sim \text{R}_6$ はそれぞれ独立して水素又は水素以外の置換基を示す。また、式中 Z^1 及び Z^2 はそれぞれ独立して CH 又は窒素を示し、 X は酸素又はイオウを示す。 Pr_1 及び Pr_2 はそれぞれ独立して水酸基の保護基を示す。)

[0021] [化3]



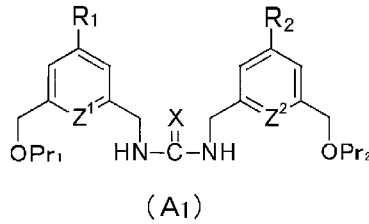
[0022] 本発明のオリゴヌクレオチド誘導体合成用修飾担体は、下記構造式 (a₁) で示されるユニットが直接又はリンカーを介して担体に化学修飾されていてもよい (ただし、式中の R₁ 及び R₂ はそれぞれ独立してアルキル基、アリール基、ハロアルキル基及びハロゲン基のいずれかであり、Z¹ 及び Z² はそれぞれ独立して CH 又は窒素を示し、X は酸素又はイオウを示す)。R₁ 及び R₂ において特に好ましいのはアルキル基又はフルオロアルキル機等のハロアルキル基である。本発明者らは、このようなオリゴヌクレオチド誘導体合成用修飾担体を用いれば、少ない工程数で容易かつ高い収率でオリゴヌクレオチド誘導体を合成できることを確認している。

[0023] [化4]



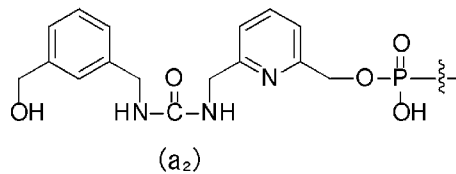
[0024] このオリゴヌクレオチド誘導体合成用修飾担体は、下記構造式 (A₁) で示される芳香族化合物を前駆体として容易に調製することができる (ただし、式中の R₁ 及び R₂ はそれぞれ独立アルキル基、アリール基、ハロアルキル基及びハロゲン基のいずれかであり、Z¹ 及び Z² はそれぞれ独立して CH 又は窒素を示し、X は酸素又はイオウを示す。また、P r₁ 及び P r₂ はそれぞれ独立して水酸基の保護基を示す。)。R₁ 及び R₂ において特に好ましいのはアルキル基又はフルオロアルキル機等のハロアルキル基である。

[化5]



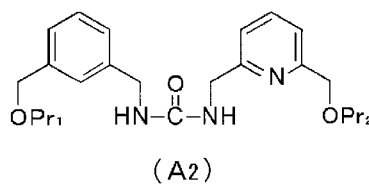
[0025] 本発明のオリゴヌクレオチド誘導体合成用修飾担体は、下記構造式 (a₂) で示されるユニットが直接又はリンカーを介して担体に化学修飾されていてもよい。本発明者らは、このようなオリゴヌクレオチド誘導体合成用修飾担体を用いても、少ない工程数で容易かつ高い収率でオリゴヌクレオチド誘導体を合成できることを確認している。

[0026] [化6]



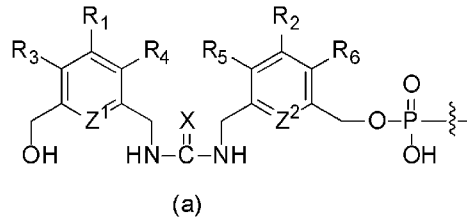
[0027] このオリゴヌクレオチド誘導体合成用修飾担体は、下記構造式 (A₂) で示される芳香族化合物を前駆体として容易に調製することができる。

[化7]



[0028] また、本発明のオリゴヌクレオチド誘導体は、オリゴヌクレオチドの3'末端が下記構造式 (a) で示されるユニット (ただし、式中の R₁ ~ R₆ はそれぞれ独立して水素又は水素以外の置換基を示す。また、式中 Z¹ 及び Z² はそれぞれ独立して CH 又は窒素を示し、X は酸素又はイオウを示す) で修飾されていることを特徴とする。

[0029] [化8]

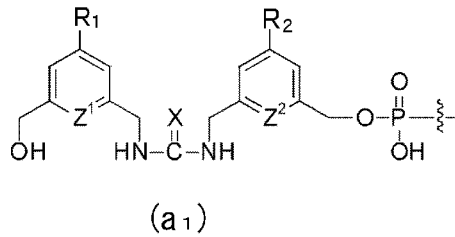


[0030] 本発明のオリゴヌクレオチド誘導体は、本発明のオリゴヌクレオチド誘導体合成用修飾担体を出発物質として、従来からDNAやRNAの合成に用いられているオリゴヌクレオチドの合成法によって、容易に合成することができる。また、このオリゴヌクレオチド誘導体は、3'末端に2つの芳香族環を有しており、尿素結合又はチオ尿素結合で芳香族環どうしが結合されている。このため、3'末端が疎水性を示すこととなり、細胞膜への透過性が良好となるとともに、優れたヌクレアーゼ耐性を有することとなる。このため、細胞内に本発明のオリゴヌクレオチド誘導体を入れた場合においても、その効果をより長い時間持続させることができる。さらには、RNAiに利用した場合、RISC中のPAZドメインの疎水性ポケットに入り込み易く、ノックダウンの効果を高めることができると考えられる。

[0031] 本発明のオリゴヌクレオチド誘導体は、オリゴヌクレオチドの3'末端が下記構造式(a₁)で示されるユニットで修飾されていてもよい(ただし、式中のR₁及びR₂はそれぞれ独立してアルキル基、アリール基、ハロアルキル基及びハロゲン基のいずれかであり、Z¹及びZ²はそれぞれ独立してCH又は窒素を示し、Xは酸素又はイオウを示す。また、Pr₁及びPr₂はそれぞれ独立して水酸基の保護基を示す。)。R₁及びR₂において特に好ましいのはアルキル基又はフルオロアルキル機等のハロアルキル基である。本発明者らは、このようなオリゴヌクレオチド誘導体が優れたヌクレアーゼ耐性を有し、細胞内に入れた場合において、RNAiにおけるノックダウン効果をより長い時間持続させることができることを確認している。

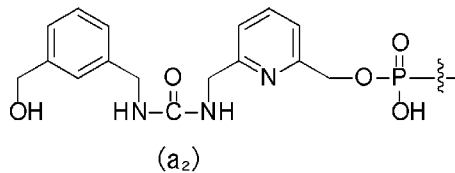
[0032]

[化9]



[0033] さらに、本発明のオリゴヌクレオチド誘導体は、オリゴヌクレオチドの3'末端が下記構造式(a₂)で示されるユニットで修飾されていてもよい。本発明者らは、このようなオリゴヌクレオチド誘導体が優れたヌクレアーゼ耐性を有し、細胞内に入れた場合において、RNAiにおけるノックダウン効果をより長い時間持続させることができることを確認している。

[0034] [化10]



[0035] また、本発明のオリゴヌクレオチド誘導体は、オリゴヌクレオチド部分が所定の遺伝子mRNAの部分配列又はその相補配列を有するものであってもよい。また、オリゴヌクレオチドの鎖長は、10以上35以下であってもよい。さらに、オリゴヌクレオチドはオリゴリボヌクレオチドであってもよい。

[0036] 本発明のオリゴヌクレオチド構築物は、遺伝子発現調節用オリゴヌクレオチド構築物であって、上記いずれかのオリゴヌクレオチド誘導体を有することを特徴とする。このオリゴヌクレオチド構築物は、1本鎖及び2本鎖DNA、1本鎖及び2本鎖RNA、DNA/RNAキメラ並びにDNA/RNAハイブリッドから選択されるオリゴヌクレオチド構築物とすることができ、また、その機能面からは、アンチジーン、アンチセンス、アプタマー、siRNA、miRNA、shRNA及びリボザイムから選択することができる。

。

[0037] また、本発明によれば、上記いずれかのオリゴヌクレオチド誘導体を有する遺伝子診断用オリゴヌクレオチド構築物とすることができる。さらに、本構築物はプローブ又はプライマーとすることができる。

発明を実施するための形態

[0038] (オリゴヌクレオチド誘導体合成用修飾担体)

本発明のオリゴヌクレオチド誘導体合成用修飾担体は、次のようにして調製することができる。なお、ここでいうヌクレオチドとは、改変されてもよいヌクレオチドである。

[0039] (オリゴヌクレオチド誘導体)

本発明のオリゴヌクレオチド誘導体を得るには、本発明のオリゴヌクレオチド誘導体合成用修飾担体を用い、アミダイト法をはじめとする各種核酸合成法によりオリゴヌクレオチド誘導体とする方法を用いることができる。水酸基の保護基としては、特に限定しないで従来公知の各種のヒドロキシル保護基を用いることができる。このような保護基としては、具体的にはベンジル基、アセチル基、ベンゾイル基等が挙げられ、特に好ましい保護基はベンジル基である。また、アミノ基の保護基として、具体的にはフタル酸基、ベンゾイル基等が挙げられ、特に好ましいのはフタル酸基である。

[0040] また、本発明のオリゴヌクレオチド誘導体を利用してアンチジーン、アンチセンス、アプタマー、miRNA及びリボザイムを構築するときには式(a)で表されるユニットを備えるようにすればよい。また、プローブが固相担体に固定化されている場合には、自由端側となる側に式(a)で表されるユニットを備えるようにすることができる。さらに、プライマーにおいては必要に応じて適宜式(a)で表されるユニットを備えていてもよい。

[0041] 本明細書においてオリゴヌクレオチドとは、一般にオリゴヌクレオチドやポリヌクレオチドを構成するモノマーであるヌクレオチドをモノマー単位として該モノマー単位を複数有するポリマーを意味するものとする。また、オリゴヌクレオチドとは、モノマー単位として、デオキシリボヌクレオチド及

び／又はリボヌクレオチドを意味するものである。一般に、ヌクレオチドとしてデオキシリボヌクレオチドをモノマー単位とするポリマーをDNAと称し、リボヌクレオチドをモノマー単位とするポリマーをRNAと称するが、本発明のオリゴヌクレオチド誘導体は、一般に挿されるDNA及びRNAのほか、これらのモノマー単位のオリゴマーを含むものとする。また、オリゴヌクレオチドは、RNA/DNAキメラも包含している。また、改変されていてもよいオリゴヌクレオチドとは、プリン及びピリミジンであるグアニン、シトシン、チミン、アデニン、ウラシル又はメチルシトシンなどの天然塩基を含むヌクレオチドのみからなるオリゴヌクレオチドのほか、オリゴヌクレオチドの各種部分、すなわち、塩基、糖部分及びリン酸エステル部分において何らかの化学修飾が施された1又は2以上のヌクレオチドを有するオリゴヌクレオチドを包含している。

[0042] 本発明のオリゴヌクレオチド誘導体は、所定の遺伝子のDNAのセンス鎖、そのアンチセンス鎖又はmRNAの部分配列若しくはその相補配列を有することができる。こうした相補性を有することにより各種の標的核酸にハイブリダイズさせ、それによりオリゴヌクレオチド誘導体に意図した機能を発現させることができる。本発明のオリゴヌクレオチド誘導体において、オリゴヌクレオチドの長さは特に限定しないで、用途に応じた長さとすることができるが、オリゴヌクレオチドの合成の容易性及び期待する効果の発揮を考慮すると、10以上35以下とすることが好ましい。また、アンチセンスの場合には、10以上30以下程度にすることができ、siRNAの場合には、A及びBの合計の鎖長は、好ましくは15以上35以下、より好ましくは30以下である。また、プライマーの場合には、10以上30以下であり、プローブの場合には10以上30以下であることが好ましい。

[0043] 本発明のオリゴヌクレオチド誘導体を、例えば、siRNA、shRNA、アンチセンス、リボザイム及びアプタマーに用いる場合には、モノマー単位は改変されていてもよいオリゴリボヌクレオチドとすることができる。

[0044] (オリゴヌクレオチド構築物)

本発明のオリゴヌクレオチド構築物は、本発明のオリゴヌクレオチド誘導体を有している。本オリゴヌクレオチド構築物における本オリゴヌクレオチド誘導体の種類により、本構築物は、1本鎖DNA、2本鎖DNA、1本鎖RNA、2本鎖RNA、DNA/RNAキメラ及びDNA/RNAハイブリッド等の形態をそれぞれあるいは組み合わせた形態とすることができる。なお、既に説明したように、本オリゴヌクレオチド誘導体を構成するオリゴヌクレオチド部分は、改変されたオリゴヌクレオチドを含んでいるため、本オリゴヌクレオチド構築物においても改変形態のオリゴヌクレオチドが含まれることがある。

[0045] 本発明のオリゴヌクレオチド構築物は、ヌクレアーゼ耐性が向上されているため、遺伝子発現調節用、又は研究用、診断用の各種用途に用いることができる。遺伝子発現調節用途としては、アンチジーン、アンチセンス、アプタマー、siRNA、miRNA、shRNA及びリボザイム等が挙げられる。特に、siRNA及びshRNAにおいて3'末端オーバーハング部位のdTに対し式(a)で表されるユニットを導入することでヌクレアーゼ耐性とサイレンシング活性の双方を向上させることができる。

[0046] 診断用途又は研究用途としては、プローブ及びプライマーが挙げられる。プローブは、設計又は選択により、ターゲット核酸に特異的に規定された配列を有しており、所定のストリンジェンシーの下で、それらがハイブリダイズするようにするに取得されたオリゴヌクレオチドである。プローブに本オリゴヌクレオチド誘導体を用いることでヌクレアーゼ耐性が向上されるため、ターゲット核酸を含有するサンプル中に混在するヌクレアーゼの影響を抑制又は回避して、ヌクレアーゼの除去程度が低くてもあるいはヌクレアーゼ除去処理を省略したサンプル調製が可能になる。これにより簡易に遺伝子診断や検査をすることができるようになる。なお、こうしたプローブとターゲットとのハイブリタイゼーションは、プローブを適当なガラス基板や、プラスチック製基板や、ビーズ等の固相担体に固定化して行なうことができる。本発明には、本オリゴヌクレオチド誘導体を含むプローブを固定化した固相

担体も含まれる。

[0047] (オリゴヌクレオチド誘導体の利用)

本発明のオリゴヌクレオチド誘導体は、s i R N Aやアンチセンス等として機能するように構築することで、遺伝子発現抑制剤として利用できる。また、本発明のオリゴヌクレオチド誘導体は、ヒト及び非ヒト動物における疾患の予防・治療用医薬組成物の有効成分として用いることができる。例えば、遺伝子発現に伴う疾患に対して、遺伝子発現抑制剤として構築した本発明のオリゴヌクレオチド誘導体はこうした疾患の予防や治療に有効である。

[0048] さらに、本発明のオリゴヌクレオチド誘導体は、そのハイブリダイゼーション機能を発揮させるように構築することで、プローブ、プライマー等の検査試薬や診断試薬として用いることができる。さらに、これらオリゴヌクレオチド構築物をチップやビーズ等の固体担体等に保持したものは、検査装置や診断装置又はこれらの一部として利用することができる。さらには、こうした検査試薬や診断薬は、他の試薬や診断薬あるいは装置等と組み合わせた検査用又は診断用キットとしても用いることができる。

[0049] 本発明のオリゴヌクレオチド誘導体は、本発明のオリゴヌクレオチド誘導体を含むオリゴヌクレオチド構築物の遺伝子発現抑制作用を利用した、遺伝子発現抑制方法にも利用できる。さらには、本発明のオリゴヌクレオチド構築物のハイブリダイゼーション機能を利用した遺伝子検出方法にも利用できる。

実施例

[0050] 以下、本発明を具体化した実施例を以下に詳細に示す。

なお、下記実施例において使用した機器は以下のとおりである。

(使用機器)

NMRスペクトル	JEOL JNM- α 400
GC/MS	SHIMADZU GCMS-QP 2010A
吸光度計	HITACHI U-2001 spectrophotometer,
GEヘルスサイエンス	Nano Vue

DNA/RNA synthesizer Applied Biosystems Model 3400
 T_m測定機 SHIMADZU UV 2400
 HPLC SPD-10AVP, SCL-10AVP, LC-10AVP, DGU-10
 A,
 CT0-10AVP, C-R8A
 MALDI-TOF/MS SHIMADZU AXIMA-GFR plus
 発光計測用プレートリーダー ATTO Luminescenser JNR11

[0051] また、本明細書の実施例の説明の中では、以下に示す略号を用いることがある。

(略 語)

APS ammonium peroxodisulfate
 CPG controlled pore glass
 DMAP 4-dimethylaminopyridine
 DMTrCl 4,4'-dimethoxytritylchloride
 EDC 1-ethyl-3- (3-dimethylaminopropyl) carbodiimide
 EDTA ethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid
 MALDI-TOF matrix assisted laser desorption ionization -
 time of flight
 PAGE polyacrylamide gel electrophoresis
 TBAF tetrabutylammonium fluoride
 TBE tris-borate-EDTA
 TEAA triethylammonium acetate
 TEMED N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine
 T_m melting temperature
 Tris tris(hydroxymethyl)aminomethane

[0052] (実施例 1)

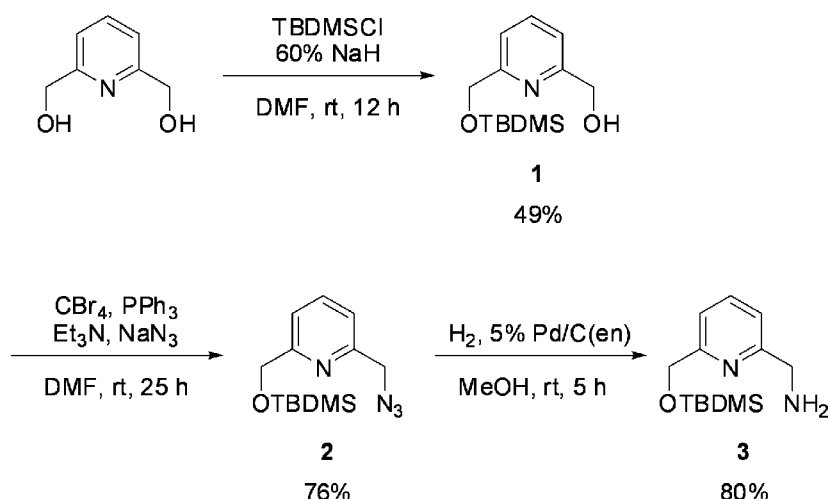
<ベンゼン環とピリジン環とが尿素結合したオリゴヌクレオチド誘導体合成

用修飾担体の合成>

実施例 1 では、以下のようにしてベンゼン-ピリジン骨格を母核としたオリゴヌクレオチド誘導体合成用修飾担体を合成した。

2, 6-ピリジンジメタノールを出発原料に用い、水素化ナトリウム存在下、tert-ブチルジメチルシリルクロリド (TBDMSCl) と反応させることにより、片方の水酸基を TBDMS 基で保護したシリル体 1 を収率 49% で合成した。さらに四臭化炭素、アジ化ナトリウムを共存させ、臭素化、アジド化を一工程で行いアジド体 2 を収率 76% で得た後、5%パラジウムエチレンジアミン複合体触媒を用いてアジド選択的に水素接触還元反応を行い、ピリジン誘導体 3 を収率 80% で合成した。

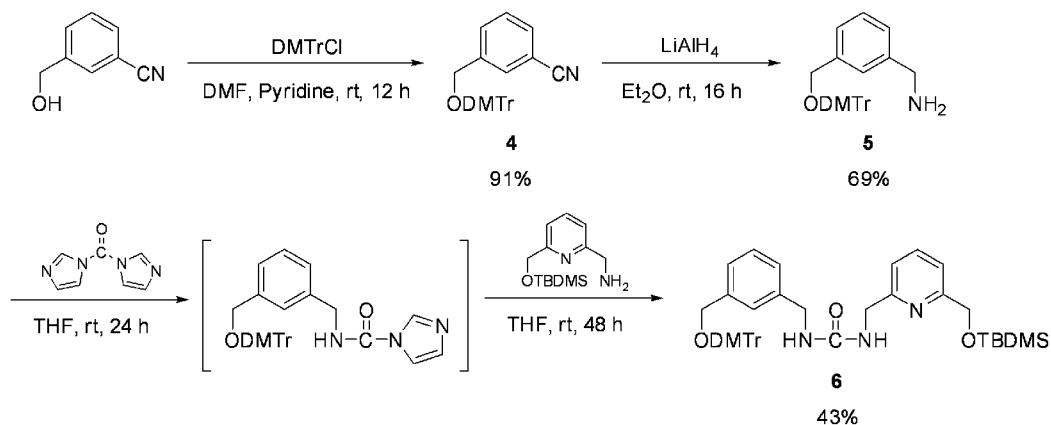
[0053] [化11]



[0054] 一方、下式に示すように、3-シアノベンジルアルコールを出発物質として4,4'-ジメトキシトリチルクロリド (DMTrCl) を用いてジメトキシトリチル化体 4 を収率 91% で得た後、水素化アルミニウムリチウムでシアノ基を還元し、ベンジルアミノ体 5 を収率 69% で得た。そして、上記のピリジン誘導体 3 とベンジルアミノ体 5 とをカルボニルジイミダゾールを用いてカップリングさせ、ウレア誘導体 6 を収率 43% で得た。なお、ここで同様の原料から対応するイソチオシアネートを経由して、対応するチオ尿素誘導体を容易かつ定量的に形成させることができる。そして、このチオ尿素誘導

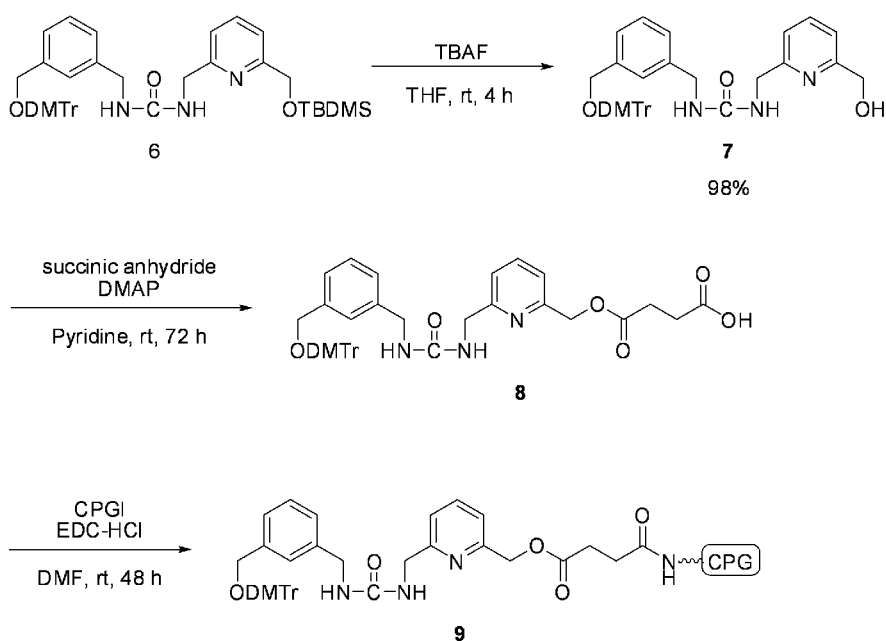
体から、以下に示す尿素結合を有するオリゴヌクレオチド誘導体合成用修飾担体と同様に、チオ尿素結合を有するオリゴヌクレオチド誘導体修飾担体を合成することができる。

[0055] [化12]



[0056] 上記のようにして得たウレア誘導体 6 を T B A F で処理し、下記に示す脱シリル体 7 を収率 98% で得た後、従来法に従い、無水コハク酸を用いてスクシニル化を行った後、脱水縮合剤存在下 C P G 樹脂と反応させることにより、実施例 1 のオリゴヌクレオチド誘導体合成用修飾担体 9 を 38.5 μm o l / g の活性で得た。

[0057] [化13]



[0058] さらに詳細なオリゴヌクレオチド誘導体合成用修飾担体 (9) の合成手順を以下に示す。

2-[(tert-Butyldimethylsilyloxy)methyl]-6-hydroxymethylpyridine (1) の合成

60%NaH (1.45 g, 35.9 mmol) をDMF (60 mL) に溶解し、氷冷下で撹拌しながら、2,6-pyridinedimethanol (5.00 g, 35.9 mmol) のDMF (30 mL) 溶液を滴下した。Ar雰囲気下室温で1時間撹拌した後、tert-butyldimethylchlorosilane (6.54 g, 43.3 mmol) のDMF (40 mL) 溶液を加え、さらに12時間撹拌した。TLCで原料の消失を確認した後、EtOAcと10%NaHCO₃ aqで抽出し、有機層をsat NaCl aqで洗浄、無水Na₂SO₄を加え乾燥させた。溶媒を減圧留去後、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (Hex : EtOAc = 5 : 1) にて精製し、2-[(tert-butyldimethylsilyloxy)methyl]-6-hydroxymethylpyridine (1) (4.46 g, 49%) を無色オイルとして得た。

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz)

δ = 7.66 (1H, d, J = 7.6Hz, Ar-H), 7.39 (1H, d, J = 7.6Hz, Ar-H), 7.10 (1H, d, J = 7.6Hz, Ar-H), 4.80 (2H, s, CH₂O), 4.71 (2H, s, CH₂O), 0.95 (9H, s, t-C₄H₉Si), 0.11 (6H, s, (CH₃)₂Si)

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz)

δ = 160.3, 157.9, 157.9, 137.3, 118.5, 65.8, 63.9, 25.9, 18.3, -5.4

[0059] 2-Azidomethyl-6-[(tert-butyldimethylsilyloxy)methyl]pyridine (2) の合成

予め真空乾燥させておいた2-[(tert-Butyldimethylsilyloxy)methyl]-6-hydroxymethylpyridine (1) (2.14 g, 8.42 mmol)、sodium azide (2.73 g, 42.0 mmol)、Triphenylphosphine (2.65 g, 10.10 mmol)、carbontetrabromide (3.07 g, 9.29 mmol) の混合物をDMF (64 mL) に溶解し、Triethylamine (2.64 mL) を加え、Ar雰囲気下で25時間撹拌した。TLC

で原料の消失を確認した後、EtOAcと水で抽出し、有機層をsat NaCl aqで洗淨、無水Na₂SO₄を加え乾燥させた。溶媒を減圧留去後、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (Hex : EtOAc = 50 : 1) にて精製し、2-azidomethyl-6-[(tert-butyl dimethylsilyloxy)methyl]pyridine (2) (1.77 g, 76%) を薄黄色オイルとして得た。

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz)

δ = 7.73 (1H, t, J = 7.6Hz, Ar-H), 7.47 (1H, d, J = 7.6 Hz, Ar-H), 7.20 (1H, d, J = 7.6Hz, Ar-H), 4.83 (2H, s, CH₂O), 4.44 (2H, s, CH₂O), 0.96 (9H, s, t-C₄H₉Si), 0.12 (6H, s, (CH₃)₂Si)

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz)

δ = 161.6, 154.4, 137.6, 120.0, 119.2, 65.9, 55.6, 25.9, 18.3, -5.4

[0060] 2-Aminomethyl-6-[(tert-butyl dimethylsilyloxy)methyl]pyridine (3) の合成

2-Azidomethyl-6-[(tert-butyl dimethylsilyloxy)methyl]pyridine (2) (0.83 g, 2.98 mmol)、5% Pd/C(en) (83.0 mg, 10 wt %) をMeOH (20 mL) に懸濁させ、水素雰囲気下室温で5時間激しく攪拌した。TLCで原料の消失を確認した後、触媒を桐山ロートで吸引濾去した。ろ液を減圧留去後、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (CHCl₃ : MeOH = 30 : 1 → 10 : 1) にて精製し、2-aminomethyl-6-[(tert-butyl dimethylsilyloxy)methyl]pyridine (3) (603 mg, 80%) を黄色オイルとして得た。

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz)

δ = 7.66 (1H, t, J = 7.8Hz, Ar-H), 7.37 (1H, d, J = 7.8 Hz, Ar-H), 7.13 (1H, d, J = 7.6Hz, Ar-H), 4.82 (2H, s, CH₂O), 3.94 (2H, s, CH₂N), 0.96 (9H, s, t-C₄H₉Si), 0.12 (6H, s, (CH₃)₂Si)

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz)

δ = 160.8, 160.7, 136.9, 119.0, 117.8, 65.9, 47.6, 25.7, 18.2, -5.4

[0061] 3-(4,4'-Dimethoxytrityloxymethyl)benzotrile (4) の合成

3-Hydroxymethylbenzotrile (1.12 g, 8.38 mmol) と4,4'-dimethoxytritylchloride (3.41 g, 10.06 mmol) をDMF (23 mL) 及びPyridine (23 mL) に懸濁し、Ar雰囲気下室温で12時間攪拌した。TLCで原料の消失を確認した後、氷水 (20 mL) を加えた後、EtOAcと水で抽出し、有機層をsat NaCl aqで洗浄、無水Na₂SO₄を加え乾燥させた。溶媒を減圧留去後、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (Hex : EtOAc = 10 : 1) にて精製し、3-(4,4'-dimethoxytrityloxymethyl)benzotrile (4) (3.31 mg, 91%) を無色オイルとして得た。

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz)

δ = 7.23-7.68 (17H, m, Ar-H), 6.84 (4H, d, J = 8.8Hz, Ar-H), 4.21 (2H, s, CH₂O), 3.79 (6H, s, CH₃O)

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz)

δ = 158.3, 144.4, 135.4, 130.5, 130.4, 129.5, 128.9, 128.5, 126.9, 118.6, 113.7, 112.1, 111.9, 111.8, 86.4, 56.9, 55.5, 54.0

[0062] 3-(4,4'-Dimethoxytrityloxymethyl)benzylamine (5) の合成

LiAlH₄ (238 mg, 6.28 mmol) をジエチルエーテル (30 mL) に懸濁し、氷冷下攪拌しながら、3-(4,4'-Dimethoxytrityloxymethyl)benzotrile (4) (0.86 g, 1.98 mmol) のジエチルエーテル (90 mL) 溶液を滴下した。Ar雰囲気下室温で16時間攪拌した。TLCで原料の消失を確認した後、水 (1.2 mL) 及びMeOH (7.2 mL) を加えた。さらに30分攪拌した後、塩を吸引濾去した。ろ液を減圧留去後、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (CHCl₃ : MeOH = 100 : 1) にて精製し、3-(4,4'-dimethoxytrityloxymethyl)benzylamine (5) を (0.58 g, 69%) を無色オイルとして得た。

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz)

δ = 7.21–7.52 (17H, m, Ar-H), 6.83 (4H, d, J = 8.8Hz, Ar-H), 4.16 (2H, s, CH₂O), 3.86 (2H, s, CH₂N), 3.79 (6H, s, C H₃O)

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz)

δ = 158.4, 145.0, 143.2, 139.6, 136.2, 130.0, 128.4, 128.2, 127.8, 126.7, 125.7, 125.6, 125.4, 113.1, 86.3, 65.5, 55.1, 46.5

[0063] N-[3-(4,4'-Dimethoxytrityloxymethyl)benzyl]-N'-[[6-(tert-butyl dimethylsilyloxy)methyl pyridin-2-yl]methyl]urea (6)の合成

3-(4,4'-Dimethoxytrityloxymethyl)benzylamine (5) (455 mg, 1.04 mmol)、1,1'-

carbonyldiimidazole (170 mg, 1.05 mmol) をTHF (52 mL) に懸濁し、Ar雰囲気下室温で24時間攪拌した。TLCで原料の消失を確認した後、2-aminomethyl-6-[(tert-butyl-dimethylsilyloxy)methyl]pyridine (3) (593 mg,

2.35 mmol) のTHF (13 mL) 溶液を滴下した後、さらに48時間攪拌した。

反応溶液を減圧留去後、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (CHCl₃: MeOH = 100:1) にて精製し、N-[3-(4,4'-Dimethoxytrityloxymethyl)benzyl]-N'-[[6-(tert-butyl dimethylsilyloxy)methylpyridin-2-yl]methyl]urea (6) (406 mg, 54%) を無色オイルとして得た。

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz)

δ = 7.61–7.07 (16H, m, Ar-H), 6.85–6.83 (4H, d, J = 8.8Hz, Ar-H), 4.71 (2H, s, CH₂) , 4.43 (2H, s, CH₂), 4.37 (2H, s, CH₂) , 4.16 (2H, s, CH₂) , 3.78 (6H, s, CH₃O) , 0.95 (9H, s, t-C₄H₉Si), 0.10 (6H, s, (CH₃)₂ Si)

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz)

δ = 160.6, 158.4, 158.2, 156.4, 145.0, 139.7, 139.1, 137.4, 136.2, 130.0, 128.5, 128.1, 127.8, 126.7, 126.2, 126.0, 125.9, 120.0, 118.3, 113.1, 86.4, 65.8, 65.4, 55.2, 45.6, 44.5,

25.9, 18.3, -5.4

Mass (EI) m/z : 717 (M⁺)

[0064] N-[3-(4,4'-Dimethoxytrityloxymethyl)benzyl]-N'-[(6-hydroxymethylpyridin-2-yl)methyl]urea (7) の合成

N-[3-(4,4'-Dimethoxytrityloxymethyl)benzyl]-N'-[[6-(tert-butyl dimethylsilyloxy)methylpyridin-2-yl]methyl]urea (6) (410 mg, 0.57 mmol) をTHF (2.2 mL) に懸濁し、攪拌しながら、TBAF-1.0M THF (0.64 mL) 溶液を滴下した後、Ar雰囲気下室温で4時間攪拌した。TLCで原料の消失を確認した後、反応溶液を減圧留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (クロロホルム : MeOH = 20 : 1) にて精製し、N-[3-(4,4'-Dimethoxytrityloxymethyl)benzyl]-N'-[(6-hydroxymethylpyridin-2-yl)methyl]urea (7) (336 mg, 98%) を無色結晶として得た。

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz)

δ = 7.52-7.02 (16H, m, Ar-H), 6.82-6.80 (4H, d, J = 8.8Hz, Ar-H), 4.59 (2H, s, CH₂), 4.39 (2H, s, CH₂), 4.29 (2H, s, CH₂), 4.13 (2H, s, CH₂), 3.76 (6H, s, CH₃O)

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz)

δ = 158.6, 158.4, 157.1, 144.9, 139.5, 139.2, 137.3, 136.1, 130.0, 128.5, 128.1, 127.8, 126.7, 126.0, 125.8, 125.7, 120.2, 118.9, 113.1, 86.4, 65.4, 64.1, 55.1, 45.3, 44.2

[0065] オリゴヌクレオチド誘導体合成用修飾担体 (9) の合成

N-[3-(4,4'-Dimethoxytrityloxymethyl)benzyl]-N'-[(6-hydroxymethylpyridin-2-yl)methyl]urea (7) (290 mg, 0.47 mmol) をpyridine (4.7 mL) に溶解し、DMAP (1.24 mg, 1.42 mmol) を加え、Ar雰囲気下室温で72時間攪拌した。TLCで原料の消失を確認した後、EtOAcとsat NaHCO₃ aqで抽出し、有機層をsat NaCl aqで洗浄、無水Na₂SO₄を加え乾燥させた。溶媒を減圧留去してスクシニル化合物 (8) を得た。一晚真空乾燥したスクシニル化合物 (8) をDMF (12 mL, CPGに対して0.01 M) に溶解し、CPG樹脂 (12

0 $\mu\text{mol/g}$ (979mg, 0.118 mmol) を加えて溶液となじませた。その後、EDC・HCl (90 mg, 0.47 mmol) を加え、室温下48時間振とうした。反応溶液をpyridineで洗浄した後、0.1 M DMAP溶液 (pyridine : Ac₂O = 9 : 1) (15 mL) を加え、さらに室温下12時間振とうした。反応溶液をpyridine、EtOH、MeCNで洗浄し、12時間真空乾燥した後、得られた樹脂の活性測定を行った。活性測定は乾燥したCPG樹脂6 mgをガラスフィルターにのせ、HClO₄ : EtOH = 3 : 2の溶液を流し込み、その濾液のUV 498 nmの波長 (DMTr基の波長) の吸光度を求め、以下の式に代入することにより算出した。その結果、活性値は38.5 $\mu\text{mol/g}$ であった。

[0066] [数1]

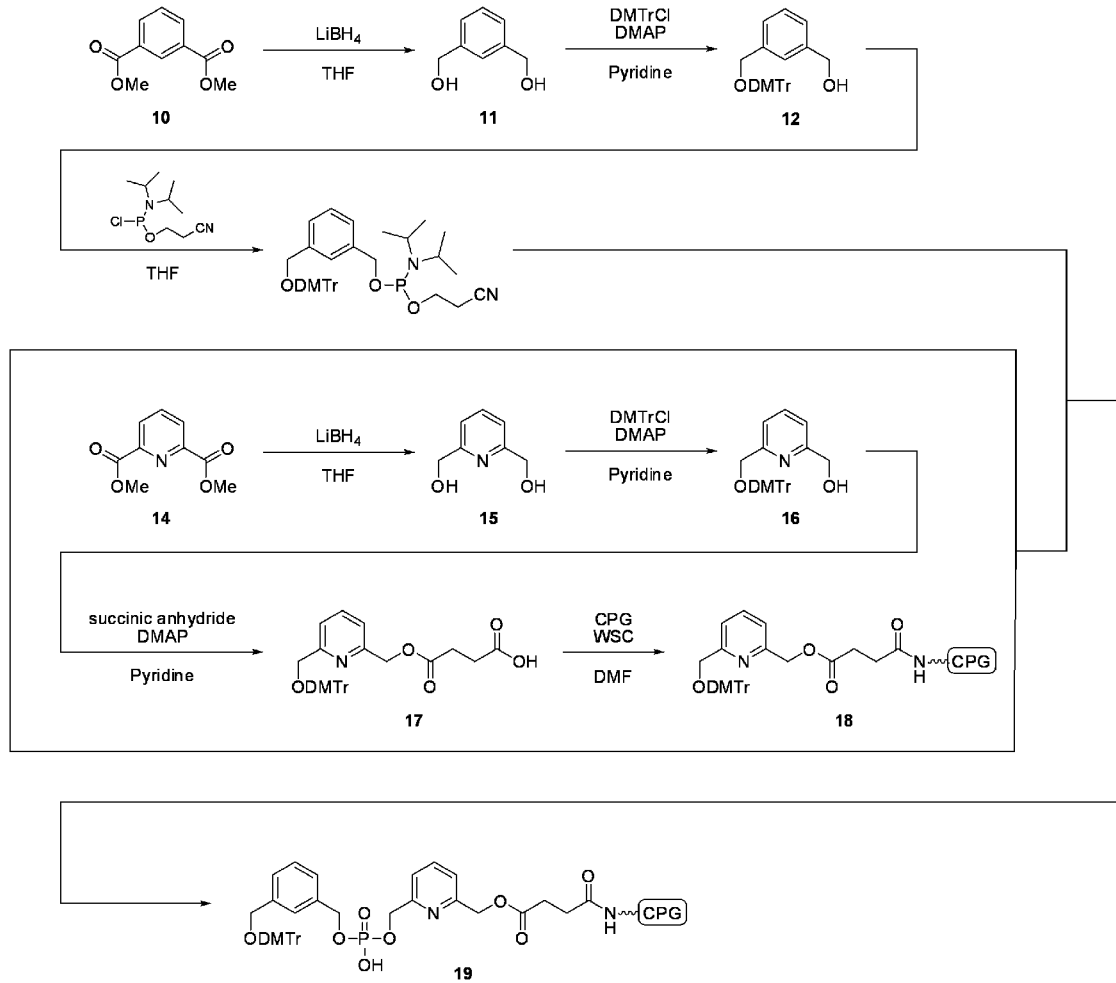
$$\frac{\text{Abs.}(498 \text{ nm}) \times \text{Vol.}(solution)(\text{mL}) \times 14.3}{\text{Weight (support)}(\text{mg})} = \text{活性}$$

[0067] (比較例 1)

本発明者らが以前に開発した、特許文献1に記載されている手法に基づき、下記化9の合成ルートに従って比較例1のオリゴヌクレオチド誘導体合成用修飾担体(19)を合成した。以下にその詳細を述べる。

[0068]

[化14]



[0069] (化合物 11 : 1,3-bis-hydroxymethylbenzene の製造例)

イソフタル酸ジメチル(2.00 g, 10.30mmol) にAr雰囲気下、dry THF (51.5mL, 0.2M solution) を加え、水素化ホウ素リチウム(1.12g, 51.5mmol, 5 eq) を加えた。23時間攪拌した後、氷浴で酢酸を数滴加えて反応液を中性にし、反応を停止した。しばらく攪拌した後、析出した結晶をMeOHで溶解した。反応中のTLC (Hex:EtOAc=1:1) では生成物は1スポットであったが、反応を停止すると2スポットに分かれた。溶媒を減圧留去後、シリカゲルクロマトグラフィー (EtOAc only) で単離し、化合物(11) (1.36g, 9.82mmol, 95%) を得た。

^1H NMR(400MHz, CDCl_3) δ [ppm] : 7.39–7.26 (4H, m, aromatic protons) , 4.71 (4H, s, $-\text{CH}_2-\text{O}-$) , 1.70 (2H, d, $J=76.8$ Hz, OH)

^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3) δ [ppm] : 139.28, 129.62, 128.47, 63.90

Mass (EI) m/z : 138 (M^+), 120, 107, 79, 65, 51.

HRMS (EI) Calcd for $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{O}_2$ 138.06808 Found 138.06765.

Anal. Calcd for $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{O}_2$: C, 69.54; H, 7.30. Found : C, 69.45; H, 7.23.

[0070] (化合物 12 : 1-(4,4'-dimethoxytrityloxy) methyl-3-hydroxymethylbenzeneの製造例) 予め真空乾燥させておいた化合物 (11) (0.5g, 3.62mmol) をpyridine (18mL)に溶解し、DMAP (22.1mg, 0.18mmol, 0.05eq) と4,4'-Dimethoxytrityl chloride (1.23g, 3.62mmol, 1eq)を加え、Ar雰囲気下で17時間攪拌した。TLC (Hex:EtOAc=3:1)により原料の消失を確認した。EtOAcとsat NaHCO_3 aqで抽出し、有機層をsat NaCl aqで洗浄、無水 Na_2SO_4 を加え乾燥させた。溶媒を減圧留去後、シリカゲルクロマトグラフィー (Hex:EtOAc=4:1)で単離し、化合物(12) (0.82g, 1.86mmol, 51%)を得た。

^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ [ppm] : 7.52–6.82 (17H, m, DMTr and aromatic protons), 4.70 and 4.18 (4H, s, $-\text{CH}_2-\text{O}-$), 3.80 (6H, t, $J=4.0$ Hz, H-methoxy), 1.62 (2H, s, OH)

^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3) δ [ppm] : 158.42, 145.00, 140.76, 139.68, 136.24, 130.06, 128.50, 128.16, 127.83, 126.73, 126.31, 125.71, 125.55, 113.10, 86.39, 65.43, 55.20

Mass (EI) m/z : 440 (M^+), 303, 273, 227, 138, 121, 107, 79, 45.

HRMS (EI) Calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{28}\text{O}_4$ 440.19876

Found 440.19806. Anal. Calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{28}\text{O}_4 \cdot 1/5\text{H}_2\text{O}$: C, 78.27; H, 6.45. Found : C, 78.33; H, 6.59.

[0071] (化合物 13 : 1-(4,4'-dimethoxytrityloxy) methyl-3-O-[(2-cyanoethyl) - (N,N-diisopropyl)]-phosphoamidicmethyl-hydroxymethylbenzeneの製造例)

予め真空乾燥させておいた化合物(12) (0.35g, 0.80mmol) をdry THF (8mL)に溶解し、DIPEA(0.4mL, 4.00mmol, 5eq)と亜リン酸化試薬(0.29mL

, 1.60mmol, 2eq)を加え、Ar雰囲気下で1.5時間攪拌した。TLC (EtOAc only)により原料の消失を確認した。EtOAcとsat NaHCO₃aqで抽出し、有機層をsat NaCl aqで洗浄、無水Na₂SO₄を加え乾燥させた。溶媒を減圧留去後、中性シリカゲルクロマトグラフィー (Hex:EtOAc=1:1)で単離し、化合物(13) (0.48g, 0.75mmol, 94%)を得た。

³²P NMR (162MHz, CDCl₃) δ [ppm] : 148.8

Mass (FAB) m/z : 641 ([M⁺+H]), 303, 201, 154.

HRMS (FAB) Calcd for C₃₈H₄₆N₂O₅P 641.31443 Found 641.31292.

[0072] (化合物15 : 2,6-bis-hydroxymethylpyridineの製造例)

2,6ピリジンカルボン酸ジメチル(14) (2.00 g, 10.25mmol)にAr雰囲気下、無水THF (51.3mL, 0.2M solution)を加え、水素化ホウ素リチウム(1.16g, 51.3mmol, 5eq)を加えた。16時間攪拌した後、氷浴で酢酸を数滴加えて反応液を中性にし、反応を停止した。しばらく攪拌した後、析出した結晶をメタノールで溶解した。反応中のTLC (クロロホルム : メタノール=3:1)では生成物は1スポットであったが、反応を停止すると2スポットに分かれた。溶媒を減圧留去後、シリカゲルクロマトグラフィー (クロロホルム : メタノール=10:1~3:1)で単離し、化合物(15) (0.40g, 2.88mmol, 28%)を得た。

¹H NMR(400MHz, CDCl₃) δ [ppm] : 7.72-7.00 (3H, m, aromatic protons), 4.79

(4H, s, -CH₂-)

¹³C NMR(100MHz, CDCl₃) δ [ppm] : 158.37, 137.44, 119.12, 64.33

Mass (FAB) m/z : 140 ([M⁺+H]), 277, 185, 93, 57.

HRMS (FAB) Calcd for C₇H₁₀NO₂

140.07115 Found 140.07054.

Anal. Calcd for C₇H₁₀NO₂:

C, 60.42; H, 6.52; N, 10.07. Found : C, 60.28; H, 6.50; N, 9.95.

[0073] (化合物16 : 2-(4,4'-dimethoxytrityloxy) methyl-6-hydroxymethylpyr

idineの製造例)

予め真空乾燥させておいた化合物(15)(0.5g, 3.60mmol)をピリジン(18mL)に溶解し、DMAP(22.1mg, 0.18mmol, 0.05eq)と4,4'-ジメトキシトリチルクロライド(1.22g, 3.60mmol, 1eq)を加え、Ar雰囲気下で16時間攪拌した。TLC(Hex:EtOAc=1:1)により原料の消失を確認した。酢酸エチルとsat NaHCO₃ aqで抽出し、有機層をsat NaCl aqで洗浄、無水Na₂SO₄を加え乾燥させた。溶媒を減圧留去後、シリカゲルクロマトグラフィー(ヘキサン:酢酸エチル=4:1~3:1)で単離し、化合物(16)(0.27g, 0.61mmol, 43%)を得た。

¹H NMR(400MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 7.76-6.82 (16H, m, DMTr and aromatic protons), 4.69 and 4.34 (4H, s, -CH₂-O-), 3.79 (6H, s, H-methoxy), 1.58 (2H, s, OH)

¹³C NMR(100MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 158.51, 158.38, 157.59, 144.77, 137.27, 135.93, 130.01, 128.07, 127.89, 126.85, 119.35, 118.56, 113.18, 86.67, 66.56, 63.62, 55.20

Mass (FAB) m/z: 442 ([M⁺⁺H]), 303, 277, 185, 93, 57.

HRMS (FAB) Calcd for C₂₈H₂₈NO₄

442.20183 Found 442.20332.

[0074] (化合物17、18:ピリジンカルボン酸ジメチル誘導体のCPG樹脂の製造例)

化合物(16)(0.20g, 0.45mmol)をピリジン(4.5mL)に溶解し、そこにDMAP(1.1mg, 0.009mmol, 0.02eq)と無水コハク酸(136mg, 1.36mmol, 3eq)を加えAr雰囲気下で攪拌した。17時間攪拌した後、TLC(ヘキサン:酢酸エチル=1:1)により反応の進行を確認し、酢酸エチルとsat NaHCO₃ aqで抽出し、有機層をsat NaCl aqで洗浄、無水硫酸ナトリウムを加え乾燥させた。溶媒を減圧留去後、真空乾燥させた。この濃縮物(17)(0.16g, 0.30mmol, 66%)にdry DMF(7.5mL)を加え溶解させ、CPG(338mg, 0.075mmol)を加え30分間静置して反応液となじませた。その後、WSC(71mg, 0.37mmol, 4.9eq)

を加え室温で一日振とうさせた。後処理として、ピリジンで洗浄した後に0.1 M DMAP ピリジン溶液：無水酢酸（9:1）溶液（6mL）を加え、16時間振とうさせた。こうして比較例1のオリゴヌクレオチド誘導体合成用修飾担体（18）を得た。このものをメタノール、アセトンで洗浄し乾燥させ活性を測定し結果、活性は73.94 $\mu\text{mol/g}$ であった。

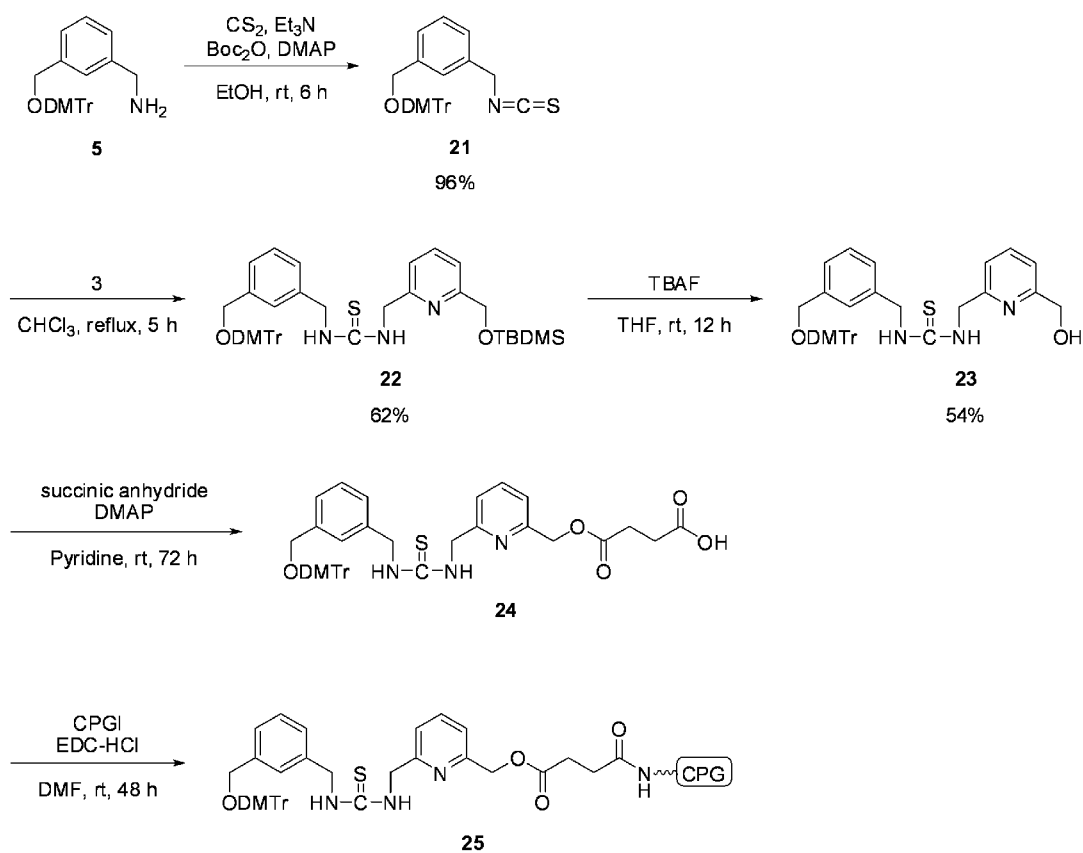
[0075]（実施例2）

<ベンゼン環とピリジン環とがチオ尿素結合したオリゴヌクレオチド誘導体合成用修飾担体の合成>

実施例2では、次に示す合成ルートにしたがってベンゼン環とピリジン環とがチオ尿素結合したオリゴヌクレオチド誘導体合成用修飾担体を合成した。

。

[0076] [化15]



[0077] 3-(4,4'-Dimethoxytrityloxymethyl)benzyl isothiocyanate (21) の合成
3-(4,4'-Dimethoxytrityloxymethyl)benzylamine (5) (613 mg, 1.39

mmol), carbon disulfide (0.85 mL, 13.9 mmol, 10 eq), triethylamine (0.20 mL, 1.39 mmol) をEtOH (2 mL) で溶解し、脱気後、Ar置換して室温下2時間攪拌した。その後、氷浴下di-tert-butyl dicarbonate (3.06 mg, 1.40 mmol) のEtOH (0.6 mL) 溶液、DMAP (6.12 mg, 6 mol%) のEtOH (0.6 mL) 溶液を滴下し、室温下さらに攪拌した。4時間後、TLCにより原料の消失を確認した後、反応溶液を減圧留去した。残渣をカラムクロマトグラフィー (Hexane : EtOAc = 10 : 1) で単離精製し、3-(4,4'-dimethoxytrityloxymethyl)benzylisothiocyanate (21) (640 mg, 96%) を薄黄色オイルとして得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz)

δ = 7.23–7.68 (17H, m, Ar-H), 6.84 (4H, d, J = 8.8Hz, Ar-H), 4.67 (2H, s, CH_2), 4.15 (2H, s, CH_2), 3.79 (6H, s, CH_3O)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz)

δ = 158.3, 144.4, 135.4, 130.5, 130.4, 129.5, 128.9, 128.5, 126.9, 118.6, 113.7, 112.1, 111.9, 111.8, 86.4, 56.9, 55.5, 54.0

[0078] N-[3-(4,4'-Dimethoxytrityloxymethyl)benzyl]-N'-[[6-(tert-butyl dimethylsilyloxymethyl)pyridin-2-yl]methyl]thiourea (22) の合成

3-(4,4'-Dimethoxytrityloxymethyl)benzylisothiocyanate (21) (332 mg, 0.69 mmol) を CDCl_3 (4.6 mL) で溶解し、2-aminomethyl-6-[(tert-butyl dimethylsilyloxy)methyl]pyridine (3) (63.10 mg, 0.39 mmol) の CDCl_3 (3 mL) 溶液を加え、脱気後、Ar置換してrefluxした。5時間後 TLCで原料の消失を確認した後、反応溶液を減圧留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (Hexane : EtOAc = 3 : 1~2 : 1) にて精製し、N-[3-(4,4'-dimethoxytrityloxymethyl)benzyl]-N'-[[6-(tert-butyl dimethylsilyloxymethyl)pyridin-2-yl]methyl]thiourea (22) (316 mg, 62%) を黄色オイルとして得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz)

δ = 7.08–7.69 (17H, m, Ar-H), 6.82 (4H, d, J = 6.8Hz, Ar-H), 4.69 (4H, s, CH₂), 4.51 (2H, s, CH₂), 4.16 (2H, s, CH₂), 3.78 (6H, s, CH₃O), 0.92 (9H, s, t-C₄H₉Si), 0.05 (6H, s, (CH₃)₂Si)

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz)

δ = 160.6, 158.3, 154.3, 144.8, 140.0, 137.7, 136.0, 129.9, 128.5, 128.0, 127.7, 126.6, 126.3, 126.2, 126.1, 120.3, 118.8, 113.0, 86.3, 65.3, 65.2, 55.1, 49.3, 25.7, 18.1, -5.4

[0079] N-[3-(4,4'-Dimethoxytrityloxymethyl)benzyl]-N'-[(6-hydroxymethylpyridin-2-yl)methyl]thiourea (23) の合成

N-[3-(4,4'-Dimethoxytrityloxymethyl)benzyl]-N'-[[6-(tert-butyl dimethylsilyloxymethyl)pyridin-2-yl]methyl]thiourea (22) (316 mg, 0.43 mmol) をTHF (2.2 mL) に懸濁し、脱気後、Ar置換して室温下攪拌した。TBAF 1.0M THF (0.48 mL) を滴下し、さらに攪拌した。12時間後TLCで原料の消失を確認した後、反応溶液を減圧蒸留した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (CDCl₃ : MeOH = 200 : 1~50 : 1) にて精製し、N-[3-(4,4'-dimethoxytrityloxymethyl)benzyl]-N'-[(6-hydroxymethylpyridin-2-yl)methyl]thiourea (13) (141 mg, 54%) を黄色結晶として得た。

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz)

δ = 7.04–7.55 (17H, m, Ar-H), 6.75 (4H, d, J = 9.0Hz, Ar-H), 4.60 (4H, s, CH₂), 4.38 (2H, s, CH₂), 4.08 (2H, s, CH₂), 3.71 (6H, s, CH₃O)

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz)

δ = 183.4, 158.8, 158.4, 155.0, 144.8, 139.8, 137.7, 136.0, 130.0, 128.7, 128.0, 127.8, 126.7, 126.3, 126.1, 120.8, 119.4, 113.1, 86.4, 65.34, 64.3, 59.5, 55.1, 49.3

[0080] ベンゼン-ピリジン骨格を有するチオウレア型CPG樹脂(25) の合成

N-[3-(4, 4' -Dimethoxytrityloxymethyl)benzyl]-N' -[(6-hydroxymethylpyridin-2-yl)methyl]thiourea (23) (141 mg, 0.23 mmol) をpyridine (3 mL) に溶解した後、succinic anhydride (71 mg, 3 eq) 、DMAP (0.62 mg, 0.02 eq) を加え、室温下攪拌した。72時間後TLCで原料の消失を確認した後、EtOAc×2、H₂O×1、sat NaHCO₃ aq×1で抽出した。有機層をsat NaCl aqで洗浄し、無水Na₂SO₄で乾燥後、溶媒を減圧留去してスクシニル化合物 (24) を得た。一晩真空乾燥したスクシニル化合物 (14) をDMF (6 mL, CPGに対して0.01 M) に溶解した後、CPG樹脂 (119 μmol/g) (480mg, 0.058 mmol) を加えて溶液となじませた。その後、EDC-HCl (44 mg, 0.23 mmol) を加え、48時間振とうした。反応溶液をpyridine×3で洗浄した後、0.1 M DMAP溶液 (pyridine : Ac₂O = 9 : 1) (15 mL) を加え、室温下12時間振とうした。

反応溶液をPyridine、EtOH、MeCNで洗浄し、12時間真空乾燥した後、得られたチオウレア型CPG樹脂(25)の活性測定を行った。その活性値は48.3 μmol/gであった。

乾燥したCPG樹脂6 mgをガラスフィルターにのせ、HClO₄ : EtOH = 3 : 2の溶液を流し込み、その濾液のUV 498 nmの波長 (DMTr基の波長)の吸光度を求め、以下の式に代入することにより算出した。

[0081] [数2]

$$\frac{Abs.(498\text{ nm}) \times Vol.(solution)(\text{mL}) \times 14.3}{Weight(\text{support})(\text{mg})} = \text{活性}$$

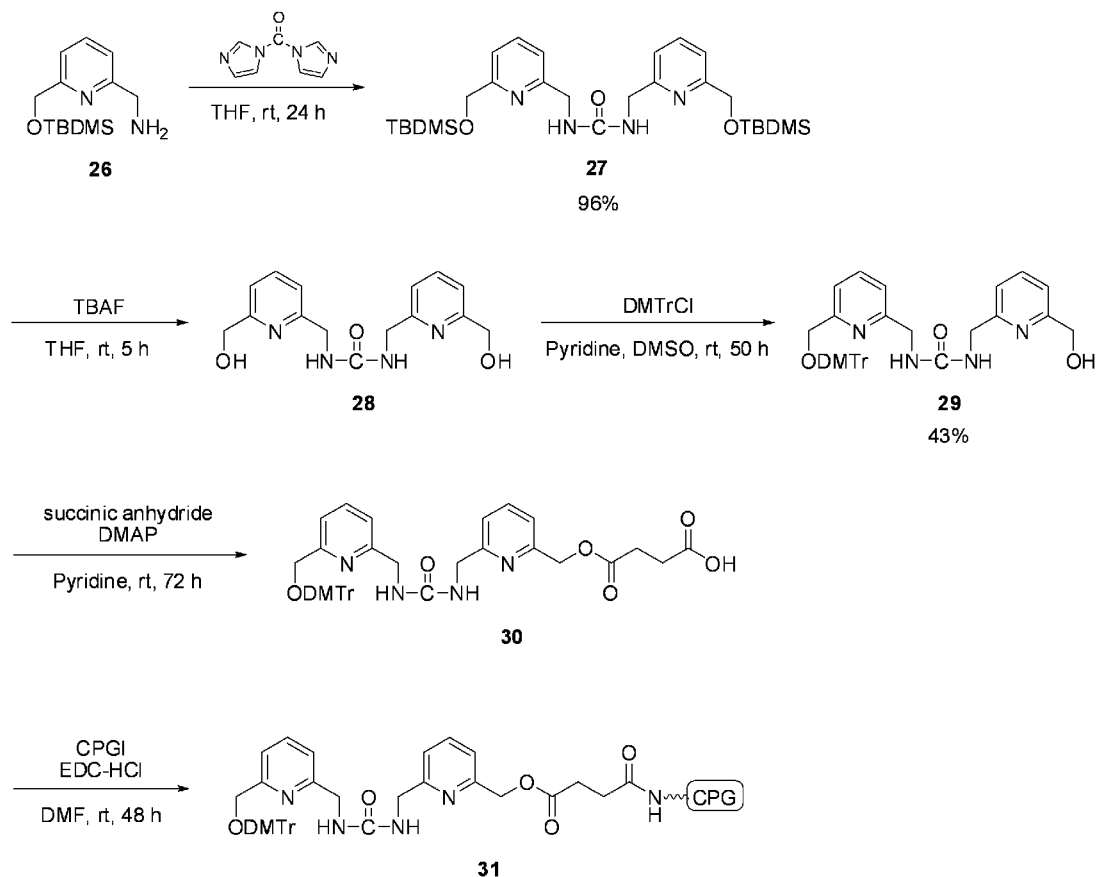
[0082] (実施例3)

<ピリジン環どうしがチオ尿素結合したオリゴヌクレオチド誘導体合成用修飾担体の合成>

実施例3では、次に示す合成ルートにしたがってピリジン環どうしがチオ尿素結合したオリゴヌクレオチド誘導体合成用修飾担体31を合成した。

[0083]

[化16]



[0084] N, N' -Bis [[6-(tert-butyl dimethylsilyloxy)methyl]pyridin-2-yl]methyl] urea (27) の合成

2-Aminomethyl-6-[(tert-butyl dimethylsilyloxy)methyl]pyridine (26) (380 mg, 1.50 mmol)、1,1'-carbonyldiimidazole (150 mg, 0.92 mmol) を THF (10 mL) に懸濁し、脱気後、Ar 置換して室温下撈拌した。24時間後 TLC で原料の消失を確認した後、反応溶液を減圧留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (CHCl₃ : MeOH = 50 : 1) にて精製し、N, N' -bis [[6-(tert-butyl dimethylsilyloxy)methyl]pyridin-2-yl]methyl] urea (27) (384 mg, 96%) を黄色結晶として得た。

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz)

δ = 7.66 (2H, t, J = 8.0 Hz, Ar-H), 7.38 (2H, d, J = 7.6 Hz, Ar-H), 7.14 (2H, d, J = 7.2 Hz, Ar-H), 4.78 (4H, s, CH₂)

0), 4.49 (4H, s, CH₂N), 0.96 (18H, s, t-C₄H₉Si), 0.12 (12H, s, (CH₃)₂Si)

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz)

δ = 160.7, 158.2, 156.6, 137.3, 119.8, 118.3, 65.9, 45.6, 25.8, 18.3, -5.4

[0085] N, N' -Bis[[6-(hydroxymethyl)pyridin-2-yl]methyl]urea (28) の合成
N, N' -Bis[[6-(tert-butyl dimethylsilyloxy)methylpyridin-2-yl]methyl]urea (27) (855 mg, 1.61 mmol) をTHF (8.1 mL) に懸濁し、脱気後、Ar置換して室温下攪拌した。TBAF 1.0M THF (3.7 mL) を滴下し、さらに攪拌した。5時間後TLCで原料の消失を確認した後、反応溶液を減圧蒸留した。残渣を吸引ろ過し、N, N' -bis[[6-(hydroxymethyl)pyridin-2-yl]methyl]urea (28) (812 mg) を白色結晶として得た。

¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz)

δ = 7.73 (2H, t, J = 7.8Hz, Ar-H), 7.30 (2H, d, J = 7.8 Hz, Ar-H), 7.13 (2H, d, J = 7.6Hz, Ar-H), 6.72 (2H, t, J = 5.8Hz, NH), 5.38 (2H, t, J = 5.8Hz, OH), 4.53 (4H, d, J = 5.6Hz, CH₂), 4.28 (4H, d, J = 5.8Hz, CH₂)

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100 MHz)

δ = 161.1, 158.7, 158.0, 137.0, 118.7, 118.1, 64.1, 44.8

[0086] N-[[3-(4, 4' -Dimethoxytrityloxymethyl)pyridin-2-yl]methyl]-N' -[[6-(hydroxymethyl)pyridin-2-yl]methyl]urea (29) の合成
N, N' -Bis[[6-(hydroxymethyl)pyridin-2-yl]methyl]urea (28) (812 mg)、DMTrCl (271 mg, 0.8 mmol) をpyridine (6 mL)、DMSO (1.2 mL) を加え、加熱 (40°C) により懸濁し、脱気後、Ar置換して室温下攪拌した。12時間後、TLCにより反応がほとんど進行していない (原料がほぼ残っていた) のを確認した後、DMTrCl (405 mg, 1.2 mmol) を追加し、攪拌を続けた。さらに12時間後、TLCにて反応の進行を確認したが、原料の消失は確認できなかった。(生成物のスポットは濃くなったが、原料がまだ残ってい

た。)さらに、DMTrCl (405 mg, 1.2 mmol) を追加し、攪拌を続けた。26時間後、反応の進行が確認されたため反応を停止させた。反応溶液をsat NaHCO₃ aq×1, EtOAc×2, H₂O×1, sat NaCl aq×1で抽出した後、有機層を無水Na₂SO₄で乾燥させ、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl₃ : MeOH = 20 : 1) にて単離精製し、N-[[3-(4,4'-dimethoxytrityloxymethyl)pyridin-2-yl]methyl]-N'-[6-hydroxymethylpyridin-2-yl]methyl]urea (29) (424 mg, 43%) を薄黄色結晶として生成した。

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz)

δ = 7.62–6.96 (m, 15H, Ar-H), 6.74 (d, 4H, J=9.0Hz, Ar-H), 4.52 (s, 2H, CH₂), 4.33 (d, 4H, J=5.6Hz, CH₂), 4.20 (s, 2H, CH₂), 3.70 (s, 6H, CH₃O)

[0087] ピリジン環どうしがチオ尿素結合したオリゴヌクレオチド誘導体合成用修飾担体(31) の合成

N-[[3-(4,4'-Dimethoxytrityloxymethyl)pyridin-2-yl]methyl]-N'-[6-hydroxymethylpyridin-2-yl]methyl]urea (29) (363 mg, 0.60 mmol) をpyridine (7.8 mL) に溶解した後、succinic anhydride (185 mg, 3 eq)、DMAP (1.62 mg, 0.02 eq) を加え、室温下攪拌した。72時間後TLCで原料の消失を確認した後、EtOAc×2、H₂O×1、sat NaHCO₃ aq×1で抽出した。有機層をsat NaCl aqで洗浄し、無水Na₂SO₄で乾燥後、溶媒を減圧留去してスクシニル化合物 (24) を得た。一晩真空乾燥したスクシニル化合物 (30) をDMF (15.6 mL, CPGに対して0.01 M) に溶解した後、CPG樹脂 (119 μmol/g) (1.25 g, 0.15 mmol) を加えて溶液となじませた。その後、EDC-HCl (115 mg, 0.60 mmol) を加え、48時間振とうした。反応溶液をpyridine×3で洗浄した後、0.1 M DMAP溶液 (pyridine : Ac₂O = 9 : 1) (15 mL) を加え、室温下12時間振とうした。

反応溶液をpyridine、EtOH、MeCNで洗浄し、12時間真空乾燥した後、得られた樹脂の活性測定を行った。その活性値は79.91 μmol/gであった。

乾燥したCPG樹脂6 mgをガラスフィルターにのせ、 HClO_4 : EtOH = 3 : 2の溶液を流し込み、その濾液のUV 498 nmの波長 (DMTr基の波長)の吸光度を求め、実施例1において用いた前述の数式1より活性値を算出した。

[0088] < s i R N Aの合成 >

以上のようにして得られた、実施例1~3及び比較例1のオリゴヌクレオチド誘導体合成用修飾担体を用い、固相ホスホロアミダイト法により3'末端に擬似ダングリングエンドを有する下記表1に示した配列 (この配列はRenilla Luciferaseをターゲットにするものである) のオリゴヌクレオチド誘導体を核酸自動合成により合成した。また、3'末端にTTを有する天然型の s i R N Aも同様に合成した。合成したオリゴヌクレオチドの配列を図4に示す。

[0089] s i R N Aの合成におけるオリゴヌクレオチドの合成法及び精製法の詳細を以下に示す。

オリゴヌクレオチドの合成には、核酸自動合成機により、以下に示すホスホロアミダイト法を用いた。

- 1, オリゴヌクレオチド鎖 (3'末端の連結基を介し、支持固体CPGに固定しておく) の3'末端保護基、ジメトキシトリチル (DMTr) 基を酸で除去する。
- 2, 新たに遊離した5'末端に、デオキシヌクレオシドの3'-ホスホロアミダイト誘導体をつなぐ。アミダイト体活性化剤はテトラゾールを用いた。
- 3, 未反応の5'末端をアセチル化でふさぎ、以降のカップリングを阻止する。これで間違ったオリゴヌクレオチドは延びないと考えられる。
- 4, カップリングで生じた亜リン酸トリエステルを酸化し、リン酸トリエステルにすると、ヌクレオチドが1つ延びた鎖ができる。

[0090] 合成はホスホロアミダイト法に従い、1 μmol スケールで行った。3400DNA自動合成機を用いてAGCUの各ホスホロアミダイトは0.1MになるようMeCN溶液に溶解し、合成した擬似ダングリングエンド樹脂は0.12MになるようMeCN溶液に溶解させ調整した。オリゴヌクレオチドの 5'末端は DMTr 基を除去し

た状態で合成を終了した。Ar ガスを通してCPG 樹脂を乾燥させた。合成終了後、CPG樹脂に結合したオリゴヌクレオチドをエッペンドルフチューブに移し、EtOH : NH₄OH = 3 : 1水溶液1.2 mLを加えて室温で12時間振とうし、樹脂からの切り出し及びベンゾイル基などの脱保護処理を行った。その後、溶液を減圧下乾固した。残渣に1M TBAF in THF溶液1 mLを加え溶解させ、12時間振とうし、シリル基の脱保護を行った。この反応液を(*1)0.1M TEAA bufferで希釈して30 mLとし、平衡化したC-18逆相カラム (Sep-Pak) に通し、カラムに吸着させた。(最初にコンディショニングとしてCH₃CN 10 mL、0.1 M TEAA buffer 15 mLを流し、その後に濾液を流した。)

ここでカラムを滅菌水で洗浄して塩を取り除き50% CH₃CN in H₂O 3 mLで溶出し、減圧下乾固した。残渣にloading solution (1×TBE in 90% formamide) 200 μLを加え(*2)20%PAGE電気泳動 (500V, 20mA) を行った。目的のオリゴヌクレオチドのある部分のゲルを切り出し、溶出液 (2 N TEAA buffer 1mL、0.1 mM EDTA水溶液0.2 mLとH₂Oを加え20 mLとした。)に浸し、一晩振とうした。この濾液をもう一度平衡化したC-18逆相カラム (Sep-Pak) に通し、精製した。

(*1) 7 M尿素を含む20%ポリアクリルアミドゲルの調整

40%アクリルアミド溶液 (*1-1) 45 mL、尿素37.8 g、10×TBE buffer (*1-2) 8 mLを加えて溶かしH₂Oを加え、80 mLとした。最後にAPS 55 mgを加え溶かした後、TEMED 40 μLを加えて混ぜ合わせスぺーサー (1.5 mm) をはさんで固定させた2枚のガラス板の間に流し込み、1時間以上静置して固化させた。1×TBE buffer (*1-3) を泳道動用緩衝液として用いた。

(*1-1) 40%アクリルアミド; アクリルアミド190 g、N,N'-ビスアクリルアミド10 gをH₂Oに溶かして500 mLとした。

(*1-2) 10×TBE buffer; Tris 108 g、ホウ酸 55 g、EDTA・2Na 7.43 gをH₂Oに溶かして1 Lとした。

(*1-3) 10×TBE bufferを使用時10倍に希釈して用いた。

(*2)

・2N TEAA buffer (トリエチルアミン 277.6 mLを水に溶解させ、酢酸でpH 7.0に調整し1 Lとした。)

・0.1 M TEAA buffer (2N TEAA bufferを使用時20倍に希釈した。)

・0.1 M EDTA水溶液 (EDTA・4Na 1.81 gを水で40 mLに調整した。)を使用時100倍に希釈した。

[0091] こうして得られた各サンプルをH₂O 1 mLに溶解し、このものの希釈液の260 nmにおける吸光度を測定し、その収量を求めた。

また、各サンプルの分子量をMALDI-TOF/MASSにより確認した。結果を表1に示す。

[0092] [表1]

synthetic oligonucleotide	calculated	observed
TT-antisense	6808.9	6807.6
TT-sense	6499.8	6502.6
BuP-antisense	6563.9	6568.4
BuP-sense	6254.8	6254.0
PuP-antisense	6570.1	6567.3
PuP-sense	6260.8	6258.9
BtuP-antisense	6585.2	6581.7
BtuP-sense	6275.9	6273.1

[0093] そして、さらにHPLCにて単離精製した。bufferは以下の通り、カラムはC-18を用いた。

・buffer組成

A buffer : 5% MeCN in 0.1M TEAA (pH 7.0)

B buffer : 50% MeCN in 0.1M TEAA (pH 7.0)

[0094] < siRNAの評価 >

(熱的安定性)

上記のようにして実施例1のオリゴヌクレオチド誘導体合成用修飾担体(9)を用いて合成した*siRNA*(以下「*siRNA*(BuP)」という)鎖、及び比較例1のオリゴヌクレオチド誘導体合成用修飾担体(18)を用いて合成した*siRNA*鎖を相補鎖とアニーリングして二本鎖(TT-antisenseとTT-sense, BUP-antisenseとBUP-senseの二組)を組み、二組の二本鎖*siRNA*の50%融解温度 T_m (°C)を測定した。すなわち、合成したオリゴヌクレオチドの相補鎖同士を600 pmol分量り取り乾固させ、測定用緩衝液(10 mM NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 , 100 mM NaCl (pH 7.0)) 200 μL に溶解させ、3 μM とした。そして、90°Cで5分間加熱後、1時間以上放置しハイブリダイズさせた。その後、脱気を行い、得られたサンプルのうち170 μL を専用セルに入れ、 T_m 測定機で260 nmの吸光度の温度変化を測定した。測定終了後、得られたグラフから、50%融解温度(T_m)を中線法により算出した。その結果、結果を図5及び表2に示すように、BP、BuP、PuP及びBtuPは天然型とほぼ同程度の熱的安定性が示された。

[0095] [表2]

XX	T_m (°C)	ΔT_m (°C)
TT	80.15	—
BP	78.84	-1.31
BuP	78.60	-1.55
PuP	77.79	-2.36
BtuP	77.78	-2.37

[0096] (タンパク発現抑制効果の測定)

上記実施例1のオリゴヌクレオチド誘導体合成用修飾担体(9)を用いて合成した*siRNA*(*siRNA*(BuP))、比較例1のオリゴヌクレオチド誘導体合成用修飾担体(18)を用いて合成した*siRNA*(以下「*siRNA*(BP)」という)のタンパク発現抑制効果を評価するため、0.1nM, 1.0nM, 10nMの濃度でDual Luciferase Assayを行い、ノックダウン効

果を評価した。合成した s i R N A は Renilla Luciferase をターゲットにしており、この遺伝子とコントロール遺伝子 (firefly Luciferase) を発現するベクターと s i R N A を同時に HeLa 細胞にトランスフェクションすることで、そのノックダウン効果を測定した。

この方法は発光タンパクである Firefly luciferase、及び Renilla luciferase を発現するベクターを用いて、s i R N A による Renilla luciferase のタンパク発現抑制を、それぞれの発光の割合から算出して評価する方法である (図 6 参照)。

[0097] すなわち、HeLa細胞を4000 cell/mlになるように調整し、96 well plateの各wellに100 μ lずつ入れ、24時間培養した。合成した s i R N A のそれぞれの鎖を TE buffer (100 mM NaCl) に溶解し、アニーリングを行なった。この s i R N A 各量、培地 (OPTI-MEM) 各量、0.1 μ g/ μ L psi-CHECK (Firefly, Renilla 各々の sequence を持つベクター) 1 μ l、transfast (transfection 試薬) 1.5 μ l を総量 175 μ l になるように混合し、培地を吸い出した 96 well plate の各 well に 35 μ l ずつ入れ、1 時間後培地を 100 μ l 加えて 24 時間培養した。24 時間後、培地を吸い出し、冷凍保存した。測定時には、解凍後、Dual glo substrate (Firefly の基質) 24 μ l を加え 10 分放置後、サンプル 23 μ l を発光測定用の 96 well plate に移し、Firefly luciferase を測定した。その後、Stop and glo substrate 23 μ l を加え 10 分放置後、Renilla luciferase を測定した。Renilla luciferase の値を Firefly luciferase の値で割り、% of control を用いて比較した。なお、luciferase 測定には、Luminescenser JNR を使用した。

[0098] その結果、図 7 に示すように、s i R N A (B u P) はベンゼン-ピリジン部位を有する s i R N A (B P) と同程度のタンパク発現抑制能を有することがわかった。

[0099] (ヌクレアーゼ耐性の測定)

前述のようにして合成した s i R N A (B u P)、s i R N A (B P) 及び天然型の s i R N A (T T) の 5' 末端に蛍光性置換基を修飾し、その 3

3´エキソヌクレアーゼ耐性を調べた。蛍光性置換基はフルオレセインであり、フルオロセインのホスホロアミダイト体を、DNA/RNA自動合成機によりホスホロアミダイト法により5´末端に導入した。

[0100] こうして5´末端に蛍光性置換基を修飾したs i RNAのヌクレアーゼ耐性を調べた。

すなわち、Fluoresein で蛍光標識したオリゴヌクレオチド (s i RNA (TT), s i RNA (BP) 及びs i RNA (BuP) を300 pmol、SVP 5.0×10^{-3} unit / mLを100 μ L加え、37°Cでインキュベートし、0 min、1 min、5 min、10 min、15 min、30 min、1 h、3 hおきにあらかじめ別のエッペンドルフチューブに分注しておいた反応停止液 (0.1% BPB, XC in 7 M Urea) 15 μ L中に、反応液を5 μ L加え、各時間の反応溶液とした。なお、0minのサンプルは酵素を加えていないものとした。

これらを20% PAGEにて分離した後、蛍光スキャナ (ルミノ・イメージアナライザーLAS-4000) を用いてフルオロセインの蛍光強度を測定することにより、ヌクレアーゼ耐性の程度を調べた。

[0101] 結果を図8及び図9に示す。図9から、天然型s i RNA (TT) は1分後にヌクレアーゼ耐性活性がほぼ消失するのに対し、ベンゼン-ピリジン部位を有するs i RNA (BuP) 及びs i RNA (BP) は30分程度経過しても、まだヌクレアーゼ耐性活性は50%程度残っていた。このことから、ベンゼン-ピリジン部位を有するs i RNA (BuP) 及びs i RNA (BP) は天然型s i RNA (TT) と比較して優れた3´エキソヌクレアーゼ耐性を有していることが分かった。

[0102] また、以上の結果から、実施例1のオリゴヌクレオチド誘導体合成用修飾担体(9)を用いて合成したs i RNA (以下「s i RNA (BuP) を1本鎖及び2本鎖DNA、1本鎖及び2本鎖RNA、DNA/RNAキメラ並びにDNA/RNAハイブリッド等に利用した場合にも、同様のヌクレアーゼ耐性を有することが明白となった。

[0103] 以上のように、実施例のオリゴヌクレオチド誘導体合成用修飾担体は、3

末端にベンゼン骨格及びピリジン骨格のうち2つの骨格が化学修飾されたオリゴヌクレオチド誘導体を容易に合成することができる。また、ピリジン環とベンゼン環どうしが尿素結合によって連結しており、尿素結合による芳香族環どうしの連結はカルボニルジイミダゾールを用いてカップリングすることにより極めて容易かつ定量的に形成させることができる。このため、アミダイト試薬を用いてリン酸エステル結合させたオリゴヌクレオチド誘導体合成用修飾担体と比較して、合成が容易である。

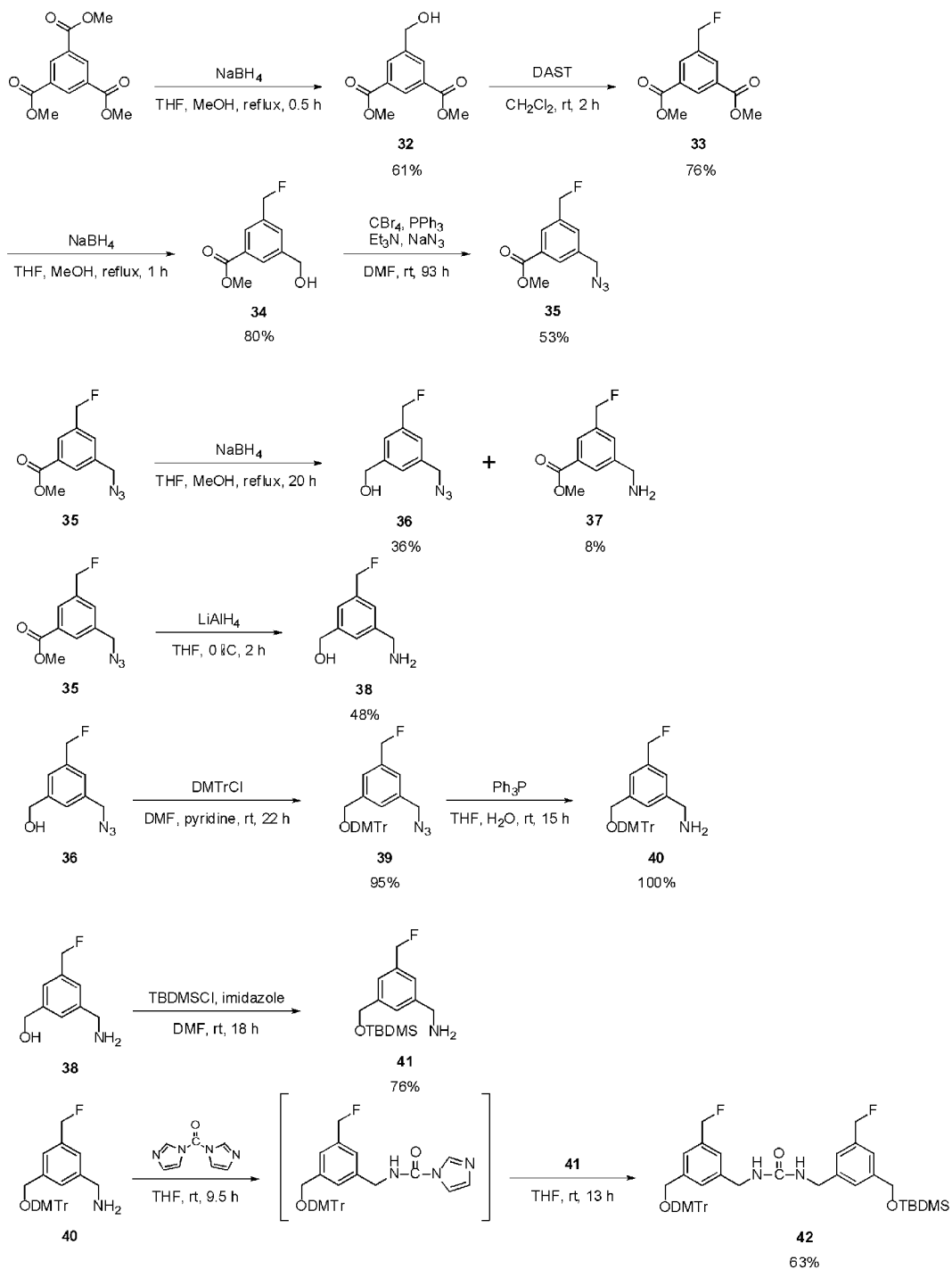
[0104] (実施例4)

<フルオロメチルベンゼン環どうしが尿素結合したオリゴヌクレオチド誘導体合成用修飾担体の合成>

実施例4では、次に示す合成ルートにしたがってフルオロメチルベンゼン環どうしが尿素結合したオリゴヌクレオチド誘導体合成用修飾担体を合成した。

[0105]

[化17]



[0106] Dimethyl 5-hydroxymethylisophthalate (32) の合成

Trimethyl 1,3,5-benzenetricarboxylate (5.02 g, 19.9 mmol) をTHF (15 mL) に溶解し、脱気後、Ar置換してさらに NaBH_4 (901 mg, 23.8 m

mol) を加えた後、THF : MeOH (12.5 mL : 3.7 mL) 溶液をゆっくり滴下しながら加え、30分間refluxした。TLCで反応の進行を確認した後、HCl (1 N, 20 mL) を加えて反応を停止した。酢酸エチルで抽出、飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。残渣を中性シリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane : EtOAc = 4 : 1 → 3 : 1) にて単離精製し、dimethyl 5-hydroxymethylisophthalate (32) (2.73 g, 61%) を白色結晶として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz)

δ = 8.60 (1H, s, Ar-H), 8.24 (2H, s, Ar-H), 4.82 (2H, d, J = 6.3 Hz, CH_2O), 3.95 (6H, s, CH_3CO_2), 1.98 (1H, t, J = 6.3 Hz, OH)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz)

δ = 166.2, 142.0, 131.9, 130.7, 129.7, 64.05, 52.37

[0107] Dimethyl 5-fluoromethylisophthalate (33) の合成

Dimethyl 5-hydroxymethylisophthalate (32) (3.36 g, 15.0 mmol) をAr雰囲気下、 CH_2Cl_2 (150 mL, 0.1M solution) に溶解し、氷冷下 (diethylamino)sulfur trifluoride (4.00 mL, 30.5 mmol) をゆっくり滴下しながら加え、室温で2時間攪拌した。TLCで反応の進行を確認した後、MeOH (150 mL) を加えて反応を停止した。溶媒を減圧留去した後、酢酸エチルと飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 ($\times 3$) で抽出、飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。残渣を中性シリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane : EtOAc = 10 : 1) で単離精製し、dimethyl 5-fluoromethylisophthalate (33) (2.57 g, 78%) を白色結晶として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz)

δ = 8.67 (1H, s, Ar-H), 8.24 (2H, s, Ar-H), 5.48 (2H, d, J = 48.1 Hz, CH_2F), 3.97 (6H, s, CH_3CO_2)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz)

δ = 165.8, 137.3 (d, J = 19.1 Hz), 132.2 (d, J = 6.7 Hz), 131.1, 130.8, 83.2 (d, J = 171.7 Hz), 52.5

[0108] Methyl 3-fluoromethyl-5-hydroxymethylbenzoate (34) の合成

Dimethyl 5-fluoromethylisophthalate (33) (3.16 g, 14.0 mmol) をTHF (10.5 mL) に溶解し、脱気後、Ar置換してさらにNaBH₄ (638 mg, 16.9 mmol) を加えた後、THF : MeOH (8.8 mL : 2.6 mL) 溶液をゆっくり滴下しながら加え、1時間refluxした。TLCで反応の進行を確認した後、HCl (1 N, 14 mL) を加えて反応停止した。酢酸エチルで抽出、飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。残渣を中性シリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane : EtOAc = 5 : 1 → 2 : 1) にて単離精製し、methyl 3-fluoromethyl-5-hydroxymethylbenzoate (34) (2.21 g, 80%) を白色結晶として得た。

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz)

δ = 7.93 (1H, s, Ar-H), 7.87 (1H, s, Ar-H), 7.52 (1H, s, Ar-H), 5.36 (2H, d, J = 48.6Hz, CH₂F), 4.67 (2H, s, CH₂O), 3.88 (3H, s, CH₃CO₂)

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz)

δ = 166.6, 141.9, 136.7 (d, J = 18.1 Hz), 130.3, 129.8 (d, J = 5.7 Hz), 127.8 (d, J = 1.9 Hz), 127.1 (d, J = 6.7 Hz), 83.6 (d, J = 169.8 Hz), 63.8, 52.1

[0109] Methyl 3-azidomethyl-5-fluoromethylbenzoate (35) の合成

Methyl 3-fluoromethyl-5-hydroxymethylbenzoate (34) (2.30 g, 11.6 mmol) を24時間乾燥させ、sodium azide (3.77 g, 58.1 mmol)、carbontetrabromide (4.24 g, 12.1 mmol)、triphenylphosphine (3.66 g, 13.9 mmol) を48時間乾燥させた。Ar雰囲気下、triethylamine (3.6 mL) を加えた後、DMF (88 mL) に溶解して、室温で93時間攪拌した。TLCにて反応の進行を確認した後、酢酸エチルで抽出、飽和食塩水で洗浄、無水

硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。残渣を中性シリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane : EtOAc = 10 : 1) にて単離精製し、methyl 3-azidomethyl-5-fluoromethylbenzoate (35) (1.37g, 53%) を淡黄色オイルとして得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz)

δ = 8.02 (1H, s, Ar-H), 8.00 (1H, s, Ar-H), 7.55 (1H, s, Ar-H), 5.45 (2H, d, J = 48.1Hz, CH_2F), 4.45 (2H, s, CH_2N_3), 3.95 (3H, s, CH_3CO_2)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz)

δ = 166.2, 137.5 (d, J = 18.1 Hz), 136.5, 131.2, 130.9 (d, J = 5.7 Hz), 129.3, 128.0 (d, J = 6.7 Hz), 84.0 (d, J = 171.7 Hz), 77.50, 54.1, 52.4

[0110] 3-Azidomethyl-5-fluoromethylbenzylalcohol (36) の合成

Methyl 3-azidomethyl-5-fluoromethylbenzoate (35) (468 mg, 2.10 mmol) をTHF (1.5 mL) に溶解し、脱気後、Ar置換してさらに NaBH_4 (97.5 mg, 2.58 mmol) を加えた後、THF : MeOH (1.3 mL : 0.4 mL) 溶液をゆっくり滴下しながら加え、20時間refluxした。TLCで反応の進行を確認した後、1 N塩酸 (2.5 mL) を加えて反応を停止した。その後、酢酸エチルで抽出、飽和食塩水で脱水、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。残渣を中性シリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane : EtOAc = 5 : 1 \rightarrow EtOAc) にて単離精製し、3-azidomethyl-5-fluoromethylbenzylalcohol (36) (149 mg, 36%) を無色透明オイルとして得た。また、抽出時の水層に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて塩基性にした後、酢酸エチルで抽出、飽和食塩水で脱水、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。そして、methyl 3-aminomethyl-5-fluoromethylbenzoate (37) (33.1 mg, 8%) を黄色透明オイルとして得た。

3-Azidomethyl-5-fluoromethylbenzylalcohol (36)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz)

δ = 7.36 (1H, s, Ar-H), 7.33 (1H, s, Ar-H), 7.26 (1H, s, Ar-H), 5.40 (2H, d, J = 48.6, CH₂F), 4.75 (2H, s, CH₂O), 4.38 (2H, s, CH₂N₃)

Methyl 3-aminomethyl-5-fluoromethylbenzoate (37)

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz)

δ = 7.99 (1H, s, Ar-H), 7.93 (1H, s, Ar-H), 7.56 (1H, s, Ar-H), 5.42 (2H, d, J = 48.1, CH₂F), 3.96 (2H, s, CH₂N), 3.93 (3H, s, CH₃CO₂)

[0111] 3-Aminomethyl-5-fluoromethylbenzylalcohol (38) の合成

Methyl 3-azidomethyl-5-fluoromethylbenzoate (35) (476 mg, 2.13 mmol) をTHF (21.3 mL) に溶解し、脱気後、Ar置換した。また、別のAr置換したナスフラスコにLiAlH₄ (408 mg, 10.7 mmol) を加え、氷冷下THF (21.3 mL) に懸濁し、先程の化合物(3) をゆっくり滴下しながら加え、0°Cで2時間攪拌した。TLCにて原料の消失を確認した後、MeOH (10 mL) を加えて反応を停止した。セライト濾過にて金属を除去した後、濾液を減圧留去した。残渣を中性シリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane : EtOAc = 1 : 1 → EtOAc : MeOH = 2 : 1) にて単離精製し、3-aminomethyl-5-fluoromethylbenzylalcohol (38) (172 mg, 48%) を黄色固体として得た。

¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz)

δ = 7.43 (2H, s, Ar-H), 7.39 (1H, s, Ar-H), 5.40 (2H, d, J = 49.0, CH₂F), 4.66 (2H, s, CH₂O), 4.11 (2H, s, CH₂N)

¹³C-NMR (CD₃OD, 100 MHz)

δ = 144.5, 139.0 (d, J = 17.2 Hz), 135.4, 128.6, 127.7 (d, J = 6.7 Hz), 127.3 (d, J = 5.7 Hz), 85.1 (d, J = 168.8 Hz), 64.4, 44.0

[0112] 3-(4,4'-Dimethoxytrityloxy)methyl-5-fluoromethylbenzylazide (39)

の合成

3-Azidomethyl-5-fluoromethylbenzylalcohol (36) (142 mg, 0.73 mmol) を脱気後、Ar置換し、DMTrCl (323 mg, 0.95 mmol) を加えた。これに、DMF (2.0 mL) およびピリジン (2.0 mL) をそれぞれ加え、室温で22時間攪拌した。TLCにて反応の進行を確認した後、真空中で溶媒を減圧留去した。酢酸エチルで抽出、飽和食塩水で脱水、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。残渣を中性シリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane : EtOAc = 20 : 1 → 5 : 1) にて単離精製し、3-(4,4'-dimethoxytrityloxy)methyl-5-fluoromethylbenzylazide (39) (346 mg, 95%) を無色透明オイルとして得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz)

δ = 7.51-7.21 (12H, m, Ar-H), 6.84 (4H, d, J = 9.2 Hz, Ar-H), 5.39 (2H, d, J = 48.6, CH_2F), 4.37 (2H, s, CH_2N_3), 4.21 (2H, s, CH_2O), 3.80 (6H, s, CH_3O)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz)

δ = 158.5, 144.8, 140.6, 136.9 (d, J = 18.1 Hz), 136.0, 135.9, 130.0, 128.1, 127.9, 126.8, 125.7, 125.7, 113.2, 86.6, 84.2 (d, J = 169.8 Hz), 65.1, 55.2, 54.5

[0113] 3-(4,4'-Dimethoxytrityloxy)methyl-5-fluoromethylbenzylamine (40)

の合成

3-(4,4'-Dimethoxytrityloxy)methyl-5-fluoromethylbenzylazide (39) (247 mg, 0.50 mmol) をTHF (5.00 mL) に溶解し、水(0.20 mL)、triphenylphosphine (264 mg, 1.01 mmol) を順に加え、脱気後、Ar置換し、室温で15時間攪拌した。TLCで反応の進行を確認した後、酢酸エチルで抽出、飽和食塩水で脱水、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。残渣を中性シリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc → EtOAc : $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$ = 2 : 1) にて単離精製し、3-(4,4'-dimethoxytrityloxy)methyl-5-fluoromethylbenzylamine (40) (234 mg, 100%) を白濁オイルとして

得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz)

$\delta = 7.51\text{--}7.20$ (12H, m, Ar-H), 6.84 (4H, d, $J = 8.7$ Hz, Ar-H), 5.38 (2H, d, $J = 49.0$, CH_2F), 4.18 (2H, s, CH_2O), 3.89 (2H, s, CH_2N), 3.79 (6H, s, CH_3O)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz)

$\delta = 158.5$, 144.9, 143.4, 140.1, 136.5 (d, $J = 17.2$ Hz), 136.1, 130.0, 128.1, 127.8, 126.8, 126.1, 125.0 (d, $J = 5.7$ Hz), 124.6 (d, $J = 6.7$ Hz), 113.1, 86.5, 84.6 (d, $J = 168.8$ Hz), 65.3, 55.2, 46.2

[0114] 3-(*t*-Butyldimethylsilyloxy)methyl-5-fluoromethylbenzylamine (41) の合成

3-Aminomethyl-5-fluoromethylbenzylalcohol (38) (520 mg, 3.07 mmol) およびimidazole (923 mg, 13.6 mmol) をDMF (15.5 mL) に溶解させ、脱気後、Ar置換した。これに、TBDMSCl (1.03 g, 6.83 mmol) を加えて溶解させ、脱気後、再度Ar置換して室温で18時間攪拌した。TLCにて反応の進行を確認した後、酢酸エチルで抽出、飽和食塩水で脱水、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。残渣を中性シリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane : EtOAc = 1 : 1) にて精製し、3-(*t*-butyldimethylsilyloxy)methyl-5-fluoromethylbenzylamine (41) (661 mg, 76%) を無色オイルとして得た。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400MHz)

$\delta = 7.21$ (1H, s, Ar-H), 7.19 (1H, s, Ar-H), 7.11 (1H, s, Ar-H), 5.35 (2H, d, $J = 49.0$ Hz, CH_2F), 4.73 (2H, s, CH_2O), 4.48 (2H, d, $J = 6.0$ Hz, CH_2N), 0.94 (9H, s, $\text{t-C}_4\text{H}_9\text{Si}$), 0.10 (6H, s, $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$)

[0115] N-3-(4,4'-Dimethoxytrityloxy)methyl-5-fluoromethylbenzyl-N'-3-(*t*-Butyldimethylsilyloxy)methyl-5-fluoromethylbenzylurea (42) の合成

3-(4,4'-Dimethoxytrityloxy)methyl-5-fluoromethylbenzylamine (40) (89.3 mg, 0.19 mmol) の入ったナスフラスコを脱気後、Ar置換してTHF (5.0 mL) を加え溶解した。また、1,1'-carbonyldiimidazole (33.0 mg, 0.20 mmol) をTHF (5.0 mL) に溶解し、化合物 (10) にゆっくり滴下しながら加え、室温で9.5時間攪拌した。TLCにて反応の進行を確認した。次に、3-(t-butyl dimethylsilyloxy)methyl-5-fluoromethylbenzylamine (41) (54.8 mg, 0.19 mmol) をTHF (1.6 mL) に溶解し、反応系内にゆっくり滴下した。室温で13時間攪拌し、TLCにて反応の進行を確認した。溶媒を減圧留去し、残渣を中性シリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane : EtOAc = 2 : 3 → EtOAc : CH₃OH = 2 : 1) にて精製し、N-3-(4,4'-Dimethoxytrityloxy)methyl-5-fluoromethylbenzyl-N'-3-(t-Butyl dimethylsilyloxy)methyl-5-fluoromethylbenzylurea (42) (93.5 mg, 63%) を無色オイルとして得た。

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz)

δ = 7.47-6.79 (19H, m, Ar-H), 5.28 (4H, d, J = 49.0 Hz, CH₂F), 4.34 (2H, s, CH₂), 4.15 (2H, s, CH₂), 3.75 (8H, s, C H₃O and CH₂), 3.72 (2H, s, CH₂), 0.93 (9H, s, t-C₄H₉Si), 0.09 (6H, s, (CH₃)₂Si)

[0116] こうして得られたN-3-(4,4'-Dimethoxytrityloxy)methyl-5-fluoromethylbenzyl-N'-3-(t-Butyl dimethylsilyloxy)methyl-5-fluoromethylbenzylurea (42)について、実施例1や実施例2と同様の方法により、実施例3のオリゴヌクレオチド誘導体合成用修飾担体を得ることができる。

[0117] この発明は上記発明の実施の態様及び実施例の説明に何ら限定されるものではない。特許請求の範囲を逸脱せず、当業者が容易に想到できる範囲で種々の変形態様もこの発明に含まれる。

図面の簡単な説明

[0118] [図1] siRNAの化学修飾の例を示す図である。

[図2]特許文献1に記載されている、CPG樹脂にリン酸ジエステル結合で連

結された2つのベンゼン骨格がリンカーを介して化学修飾されているオリゴヌクレオチド誘導体合成用修飾担体の合成経路を示す図である。

[図3]特許文献1に記載されている、CPG樹脂にリン酸ジエステル結合で連結された2つのピリジン骨格がリンカーを介して化学修飾されているオリゴヌクレオチド誘導体合成用修飾担体の合成経路を示す図である。

[図4]実施例及び比較例で合成したオリゴヌクレオチドの配列を示す図である。

[図5]実施例 siRNA (BP、BuP、PuP、BtuP) 及び比較例 siRNA (TT) の熱的安定性を示すグラフである。

[図6] siRNAによるRenilla luciferaseのタンパク発現抑制効果を測定する方法を示す図である。

[図7]実施例 siRNA (BuP) 及び比較例 siRNA (BP) によるRenilla luciferaseのタンパク発現抑制を、それぞれの発光の割合から算出したグラフである。

[図8]ヌクレアーゼ耐性活性度測定における電気泳動の結果を示す図である。

[図9]ヌクレアーゼ耐性活性度と時間との関係を示すグラフである。

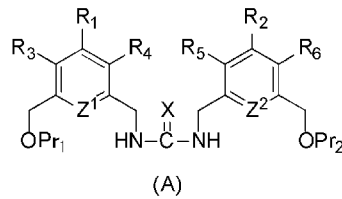
産業上の利用可能性

[0119] 本発明は、個別化医療への展開が期待されているRNA創薬等、核酸オリゴマーを用いた医療分野において有用な手段を提供することができる。

請求の範囲

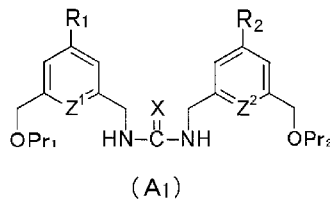
[請求項1] 下記構造式 (A) で示されることを特徴とする芳香族化合物 (ただし、式中の $R_1 \sim R_6$ はそれぞれ独立して水素又は水素以外の置換基を示す。また、式中 Z^1 及び Z^2 はそれぞれ独立して CH 又は窒素を示し、X は酸素又はイオウを示す。また、 $P r_1$ 及び $P r_2$ はそれぞれ独立して水酸基の保護基を示す。)

[化1]



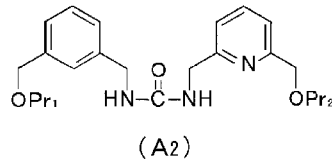
[請求項2] 下記構造式 (A_1) で示されることを特徴とする請求項1に記載の芳香族化合物 (ただし、式中の R_1 及び R_2 はそれぞれ独立してアルキル基、アリール基、ハロアルキル基及びハロゲン基のいずれかであり、 Z^1 及び Z^2 はそれぞれ独立して CH 又は窒素を示し、X は酸素又はイオウを示す。また、 $P r_1$ 及び $P r_2$ はそれぞれ独立して水酸基の保護基を示す。)

[化2]



[請求項3] 下記構造式 (A_2) で示されることを特徴とする請求項1に記載の芳香族化合物 (ただし、 $P r_1$ 及び $P r_2$ はそれぞれ独立して水酸基の保護基を示す。)

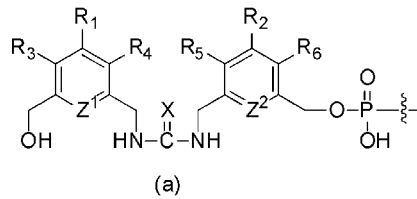
[化3]



[請求項4]

下記構造式 (a) で示されるユニットが直接又はリンカーを介して担体に化学修飾されていることを特徴とするオリゴヌクレオチド誘導体合成用修飾担体 (ただし、式中の $R_1 \sim R_6$ はそれぞれ独立して水素又は水素以外の置換基を示す。また、式中 Z^1 及び Z^2 はそれぞれ独立して CH 又は窒素を示し、 X は酸素又はイオウを示す)。

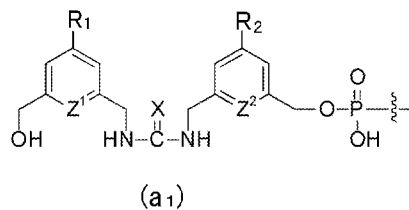
[化4]



[請求項5]

下記構造式 (a_1) で示されるユニットが直接又はリンカーを介して担体に化学修飾されていることを特徴とする請求項4に記載のオリゴヌクレオチド誘導体合成用修飾担体 (ただし、式中の R_1 及び R_2 はそれぞれ独立してアルキル基、アリール基、ハロアルキル基及びハロゲン基のいずれかであり、 Z^1 及び Z^2 はそれぞれ独立して CH 又は窒素を示し、 X は酸素又はイオウを示す)。

[化5]

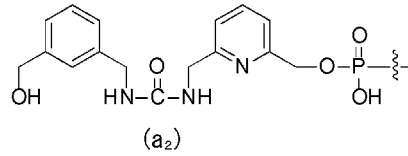


[請求項6]

下記構造式 (a_2) で示されるユニットが直接又はリンカーを介し

て担体に化学修飾されていることを特徴とする請求項4に記載のオリゴヌクレオチド誘導体合成用修飾担体。

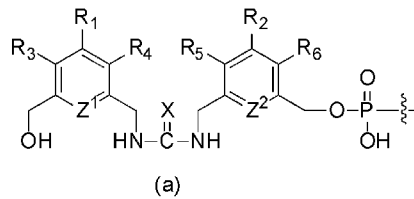
[化6]



[請求項7]

オリゴヌクレオチドの3'末端が下記構造式(a)で示されるユニット(ただし、式中のR₁~R₆はそれぞれ独立して水素又は水素以外の置換基を示す。また、式中Z¹及びZ²はそれぞれ独立してCH又は窒素を示し、Xは酸素又はイオウを示す)で修飾されていることを特徴とするオリゴヌクレオチド誘導体。

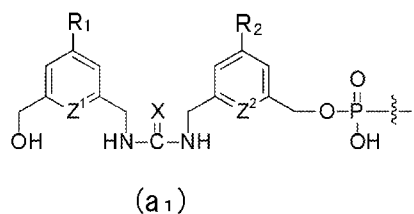
[化7]



[請求項8]

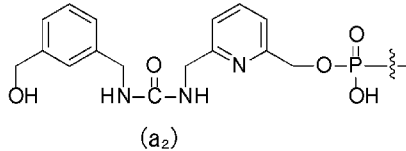
オリゴヌクレオチドの3'末端が下記構造式(a₁)で示されるユニット(ただし、式中のR₁及びR₂はそれぞれ独立してアルキル基、アリール基、ハロアルキル基及びハロゲン基のいずれかであり、Z¹及びZ²はそれぞれ独立してCH又は窒素を示し、Xは酸素又はイオウを示す)で修飾されていることを特徴とする請求項7に記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

[化8]



[請求項9] オリゴヌクレオチドの3'末端が下記構造式(a₂)で示されるユニットで修飾されていることを特徴とする請求項7に記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

[化9]



[請求項10] 前記オリゴヌクレオチドは所定の遺伝子mRNAの部分配列又はその相補配列を有する請求項7乃至9のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

[請求項11] 前記オリゴヌクレオチドの鎖長は10以上35以下である請求項7乃至10のいずれか1項記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

[請求項12] 前記オリゴヌクレオチドはオリゴリボヌクレオチドであることを特徴とする請求項7乃至11のいずれか1項記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

[請求項13] 遺伝子発現調節用オリゴヌクレオチド構築物であって、
請求項7乃至12のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド誘導体を有する構築物。

[請求項14] 1本鎖及び2本鎖DNA、1本鎖及び2本鎖RNA、DNA/RNAキメラ並びにDNA/RNAハイブリッドから選択される遺伝子発現調節用オリゴヌクレオチド構築物であって請求項12に記載の構築物。

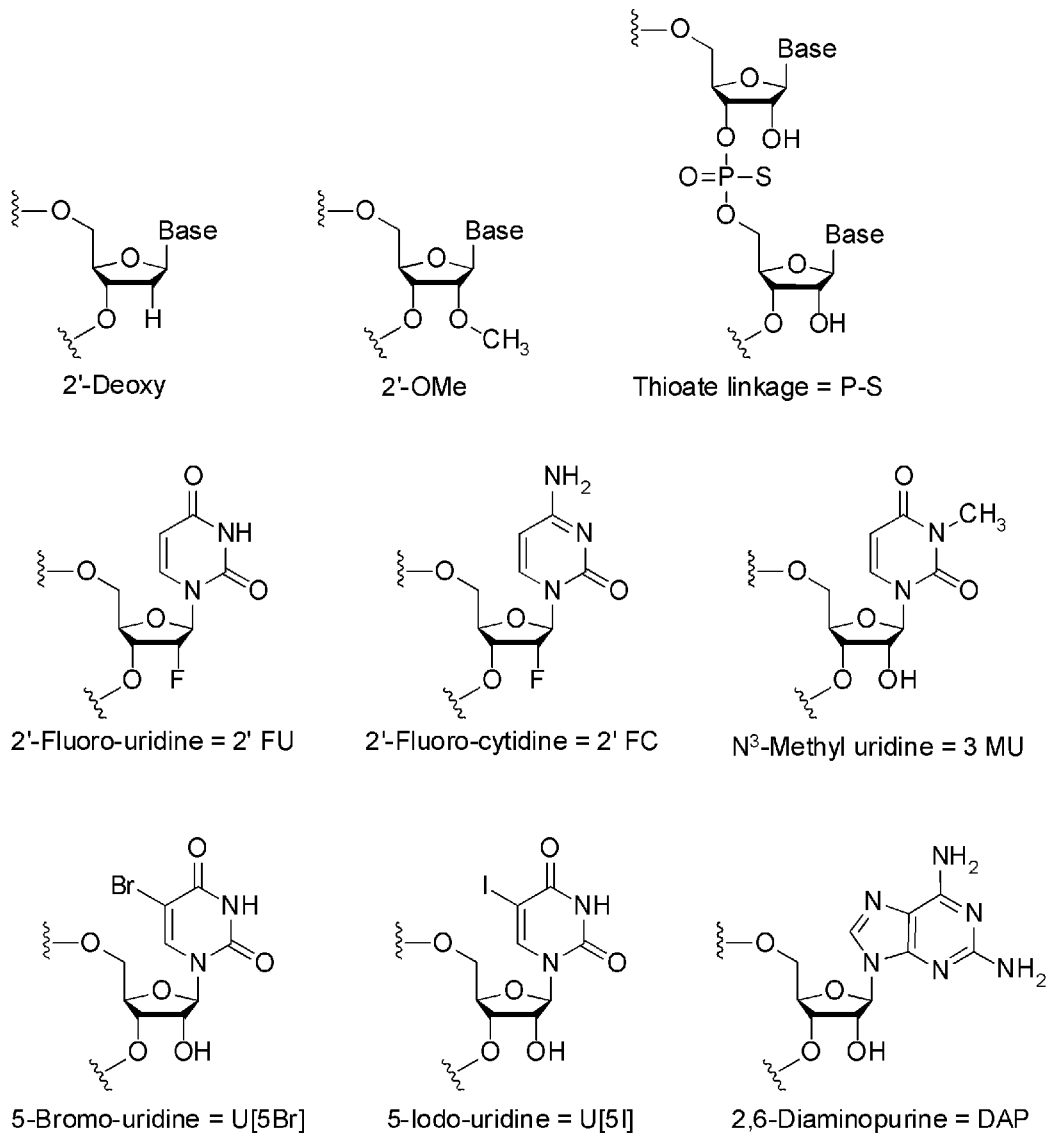
[請求項15] アンチジーン、アンチセンス、アプタマー、siRNA、miRNA、shRNA及びリポザイムから選択される請求項13又は14に記載の構築物。

[請求項16] 遺伝子診断用オリゴヌクレオチド構築物であって、請求項13乃至15のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド誘導体を有する構築物。

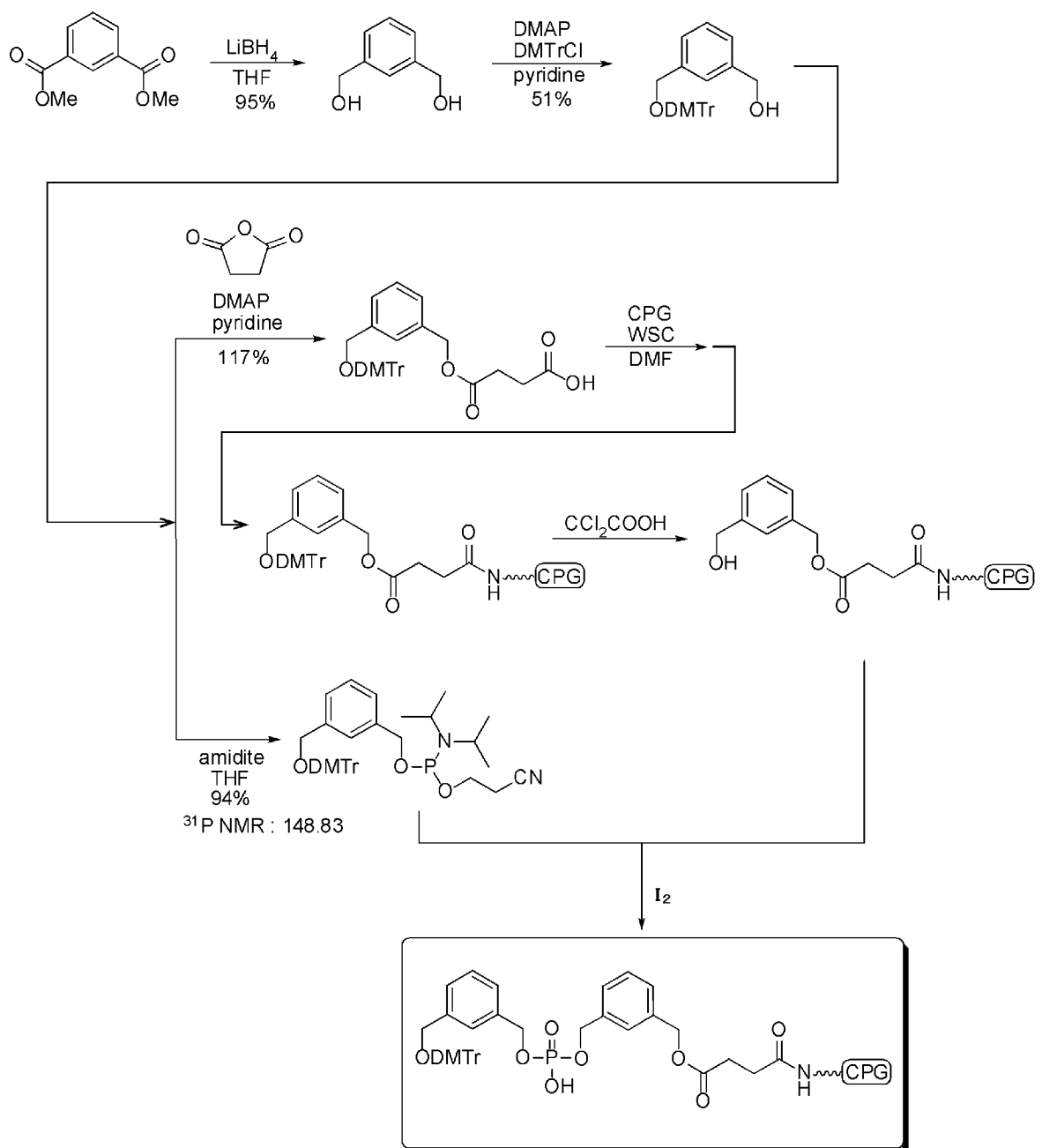
[請求項17] プローブ又はプライマーであることを特徴とする請求項16に記載

の構築物。

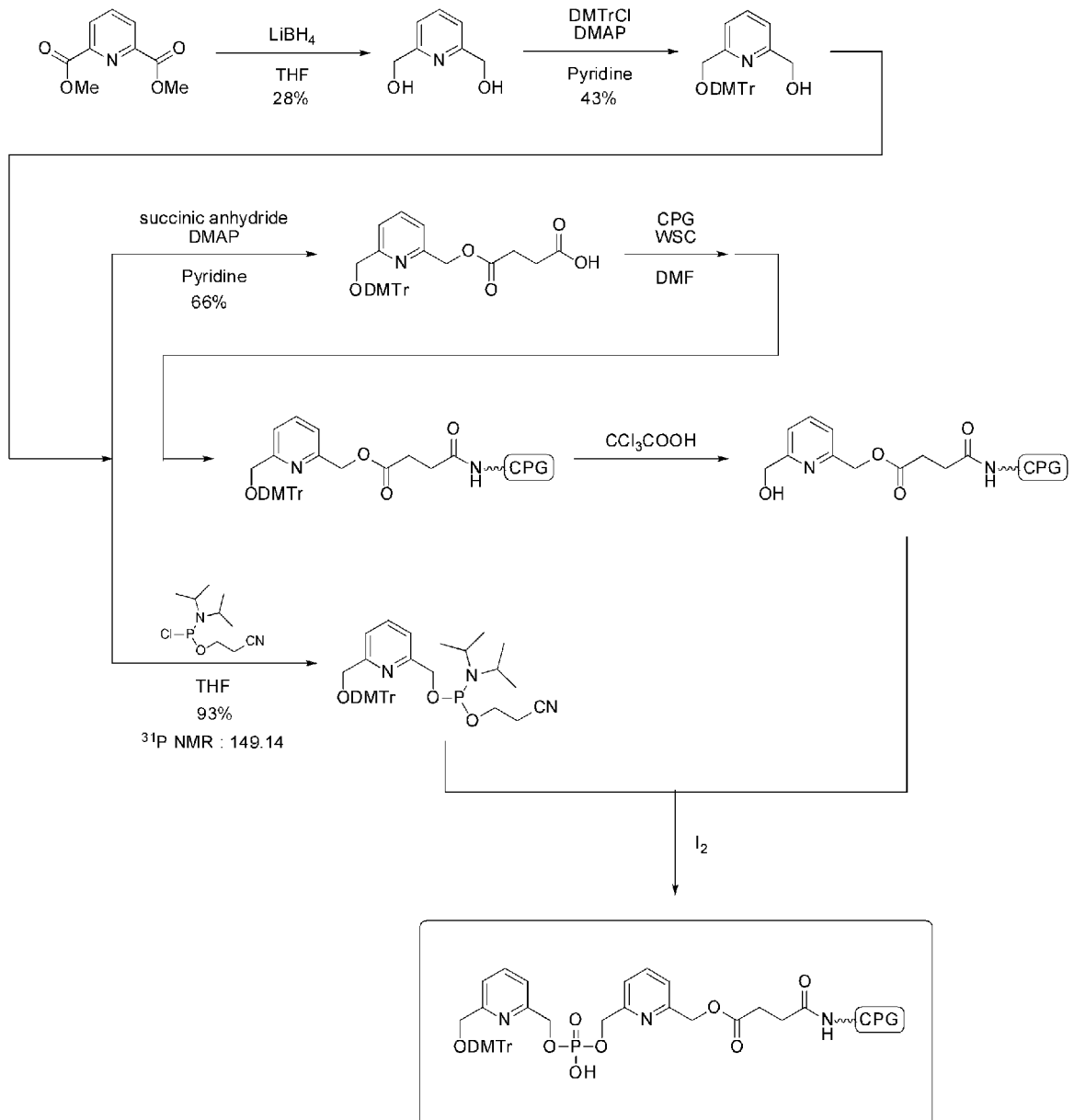
[圖1]



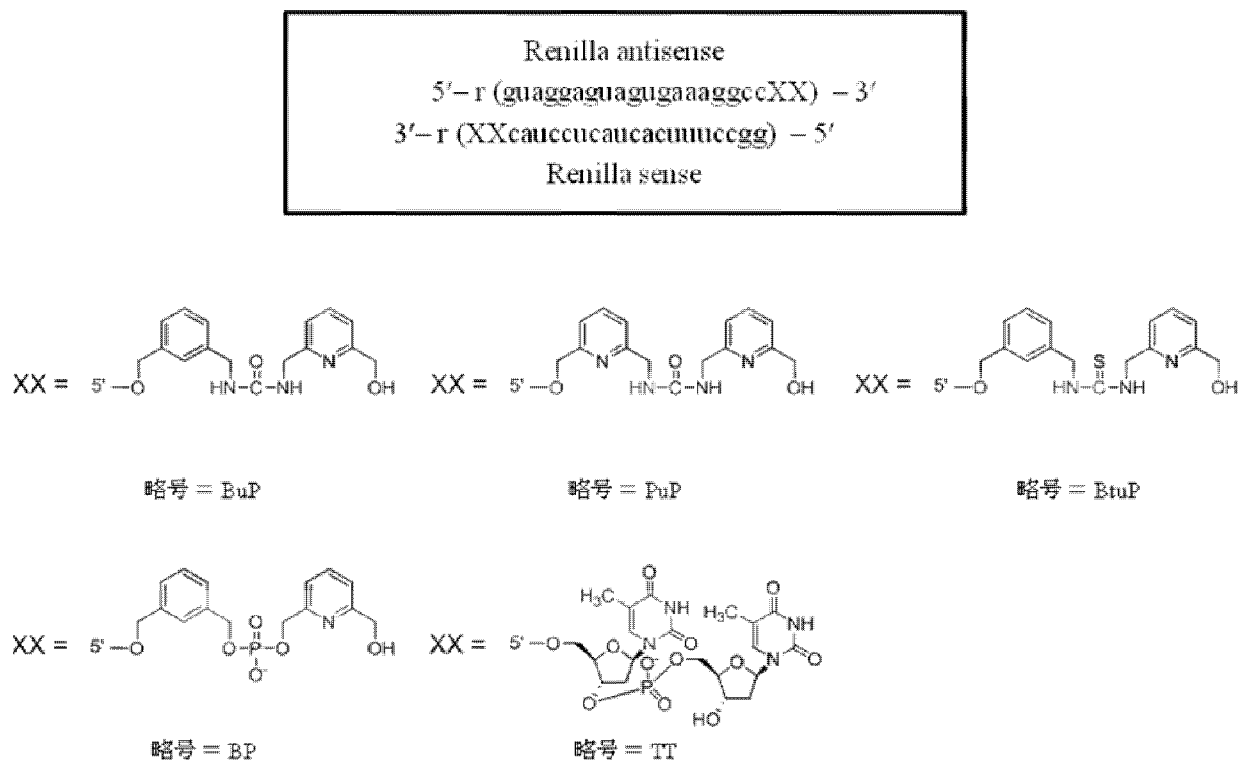
[圖2]



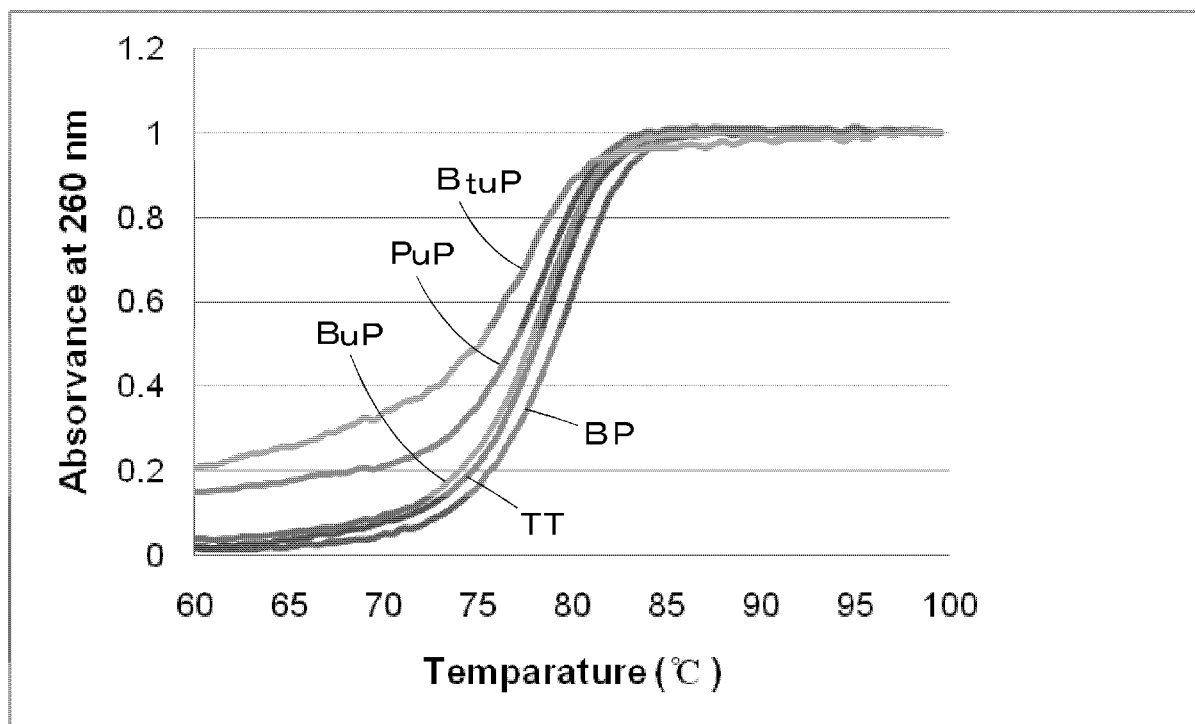
[圖3]



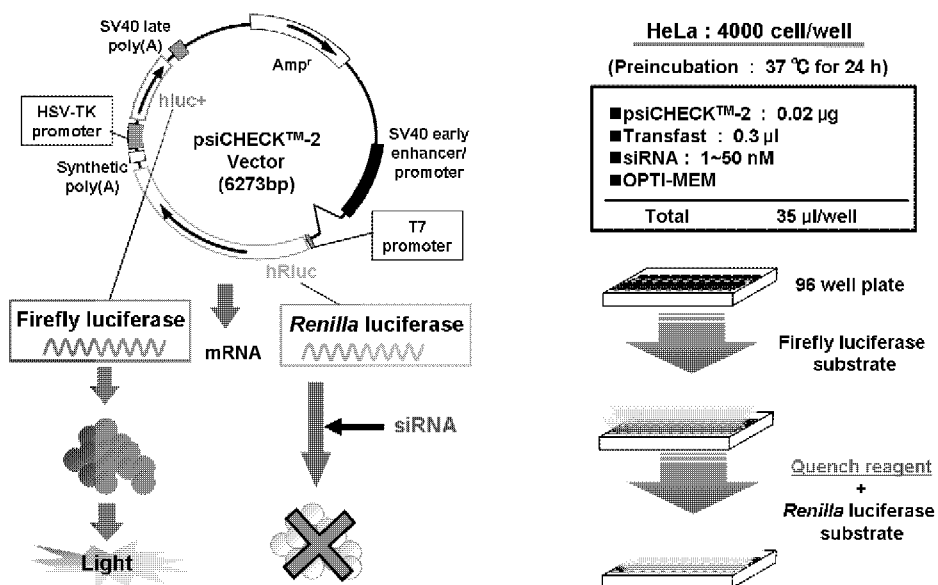
[图4]



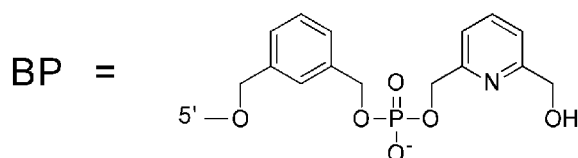
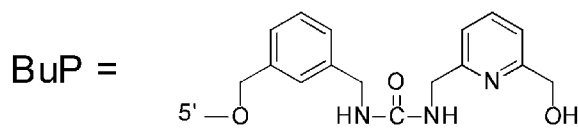
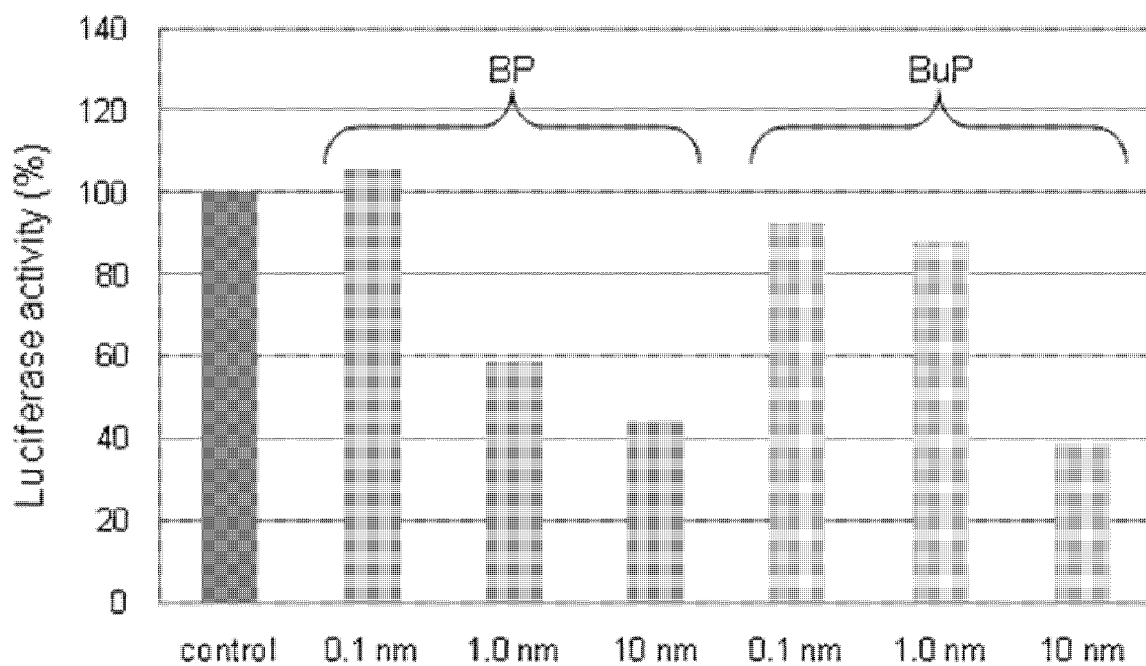
[图5]



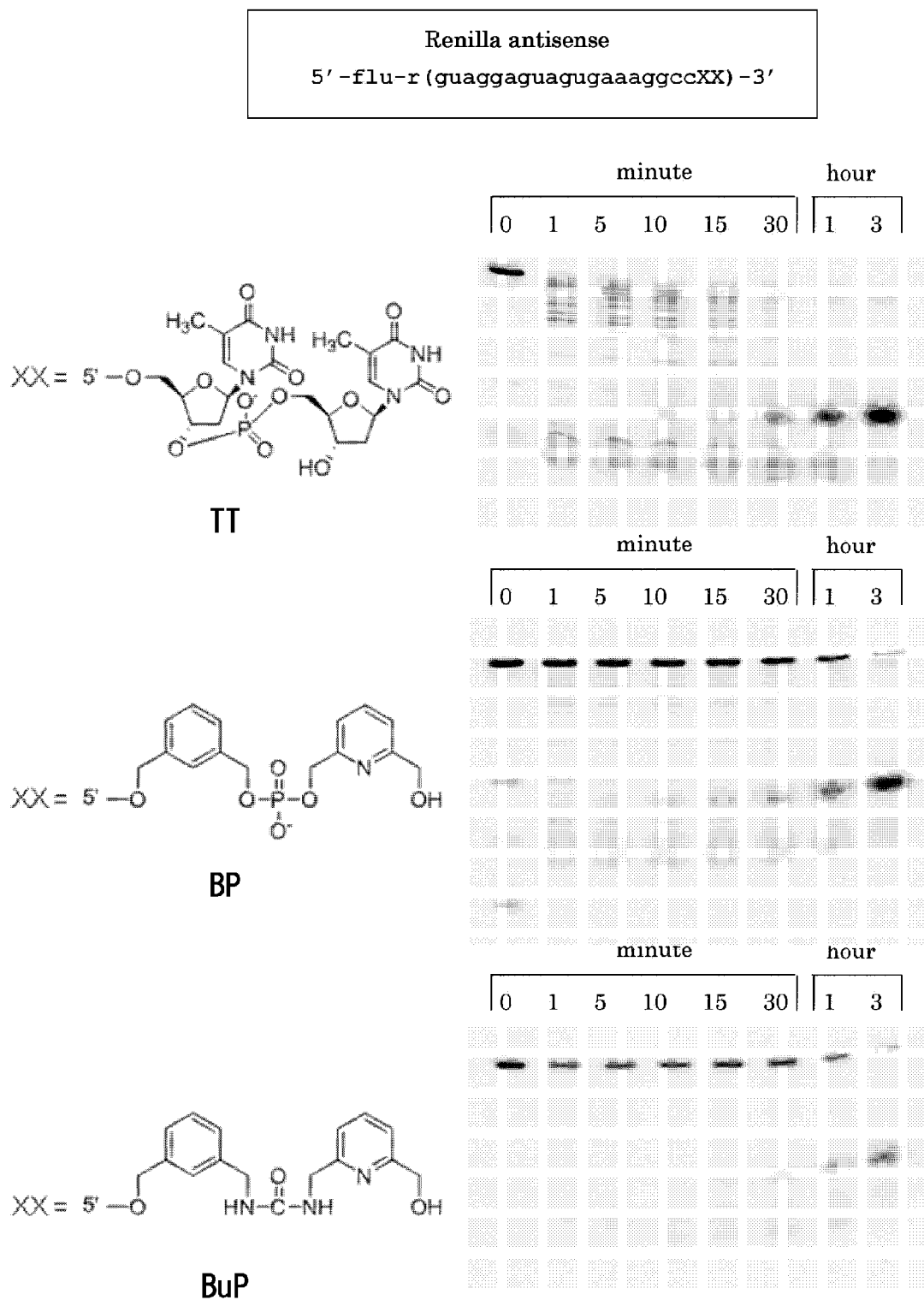
[6]



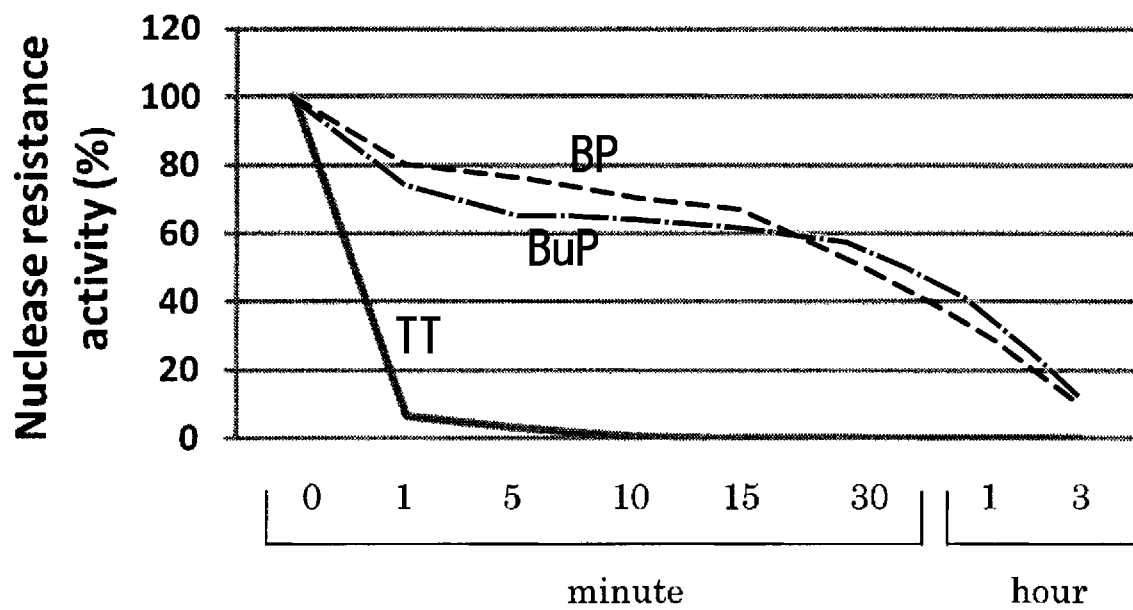
[7]



[圖8]



[9]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/072020

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet.

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)

C07C275/24, A61K31/7088, A61K31/7105, A61K31/711, A61K31/713, A61K48/00, C07C335/12, C07D213/40, C07F7/10, C07F9/09, C07F9/6558, C07H21/00, C07H21/02, C07H21/04, C12N15/09, C12Q1/68

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	1996-2011
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2011	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2011

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.
A	LEUNG, A.N. et al, Effect of spacer geometry on oxoanion binding by bis- and tetrakis-thiourea hosts, Tetrahedron, 2008, Vol.64, No.11, p.2530-2536	1-17
A	LEE, K.H. et al, C3-Symmetric metacyclophane-based anion receptors with three thiourea groups as linkers between aromatic groups, Tetrahedron Letters, 2000, Vol.41, No.32, p.6083-6087	1-17
A	SMITH, J. et al, Solid and Solution Phase Organic Syntheses of Oligomeric Thioureas, Journal of Organic Chemistry, 1996, Vol.61, No.25, p.8811-8818	1-17

 Further documents are listed in the continuation of Box C. 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
27 January, 2011 (27.01.11)Date of mailing of the international search report
08 February, 2011 (08.02.11)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/072020

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
(International Patent Classification (IPC))

*C07C275/24(2006.01) i, A61K31/7088(2006.01) i, A61K31/7105(2006.01) i,
A61K31/711(2006.01) i, A61K31/713(2006.01) i, A61K48/00(2006.01) i,
C07C335/12(2006.01) i, C07D213/40(2006.01) i, C07F7/10(2006.01) i,
C07F9/09(2006.01) i, C07F9/6558(2006.01) i, C07H21/00(2006.01) i,
C07H21/02(2006.01) i, C07H21/04(2006.01) i, C12N15/09(2006.01) i,
C12Q1/68(2006.01) i*

(According to International Patent Classification (IPC) or to both national
classification and IPC)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. 特別ページ参照

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. C07C275/24, A61K31/7088, A61K31/7105, A61K31/711, A61K31/713, A61K48/00, C07C335/12, C07D213/40, C07F7/10, C07F9/09, C07F9/6558, C07H21/00, C07H21/02, C07H21/04, C12N15/09, C12Q1/68

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	1971-2011年
日本国実用新案登録公報	1996-2011年
日本国登録実用新案公報	1994-2011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)

CAplus, REGISTRY (STN)

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
A	LEUNG, A. N. et al, Effect of spacer geometry on oxoanion binding by bis- and tetrakis-thiourea hosts, Tetrahedron, 2008, Vol. 64, No. 11, p. 2530-2536	1-17
A	LEE, K. H. et al, C3-Symmetric metacyclophane-based anion receptors with three thiourea groups as linkers between aromatic groups, Tetrahedron Letters, 2000, Vol. 41, No. 32, p. 6083-6087	1-17

C欄の続きにも文献が列挙されている。

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

の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

27. 01. 2011

国際調査報告の発送日

08. 02. 2011

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)

本堂 裕司

電話番号 03-3581-1101 内線 3443

4H

9049

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	SMITH, J. et al, Solid and Solution Phase Organic Syntheses of Oligomeric Thioureas, Journal of Organic Chemistry, 1996, Vol.61, No.25, p.8811-8818	1-17

発明の属する分野の分類

C07C275/24(2006.01)i, A61K31/7088(2006.01)i, A61K31/7105(2006.01)i,
A61K31/711(2006.01)i, A61K31/713(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i,
C07C335/12(2006.01)i, C07D213/40(2006.01)i, C07F7/10(2006.01)i, C07F9/09(2006.01)i,
C07F9/6558(2006.01)i, C07H21/00(2006.01)i, C07H21/02(2006.01)i, C07H21/04(2006.01)i,
C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i