

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02005/085271

発行日 平成19年12月13日 (2007.12.13)

(43) 国際公開日 平成17年9月15日 (2005.9.15)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>CO7H 19/06 (2006.01)</b>	CO7H 19/06 CSP	4C057
<b>CO7H 19/16 (2006.01)</b>	CO7H 19/16	4H049
<b>CO7F 9/6558 (2006.01)</b>	CO7F 9/6558	4H050
<b>CO7F 9/6561 (2006.01)</b>	CO7F 9/6561 Z	
<b>CO7H 21/02 (2006.01)</b>	CO7H 21/02	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 35 頁) 最終頁に続く

出願番号 特願2006-510680 (P2006-510680)	(71) 出願人 503360115 独立行政法人科学技術振興機構 埼玉県川口市本町4丁目1番8号
(21) 国際出願番号 PCT/JP2005/003459	(74) 代理人 100100181 弁理士 阿部 正博
(22) 国際出願日 平成17年3月2日 (2005.3.2)	(72) 発明者 関根 光雄 神奈川県横浜市青葉区あざみ野1-26-46
(31) 優先権主張番号 特願2004-60261 (P2004-60261)	(72) 発明者 清尾 康志 神奈川県横浜市青葉区しらとり台48-5 第2パークサイド内田102
(32) 優先日 平成16年3月4日 (2004.3.4)	(72) 発明者 実吉 尚郎 神奈川県横浜市青葉区千草台10-20
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	Fターム(参考) 4C057 AA18 LL18 LL31

最終頁に続く

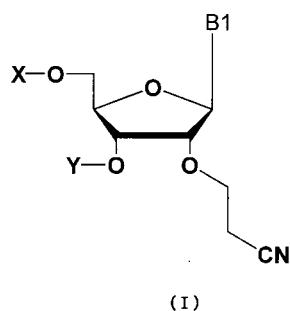
(54) 【発明の名称】 2 ‘水酸基を修飾された新規人工RNA

(57) 【要約】

本発明の目的は、穏やかな条件で効率的にシアノエチルエーテルを構築する系、及び機能性官能基としての可能性を開拓し新規機能性核酸の創製に寄与することである。

本発明は、一般式 ( I ) で表されるヌクレオシドもしくはそのヌクレオチド：

【化 1】



(式 I 中、X 及び Y は同一または異なって、水素、置換基を有していてもよいシリル基、4 - メトキシトリチル基、4 , 4 ' - ジメトキシトリチル基、又は一般式 ( II ) :

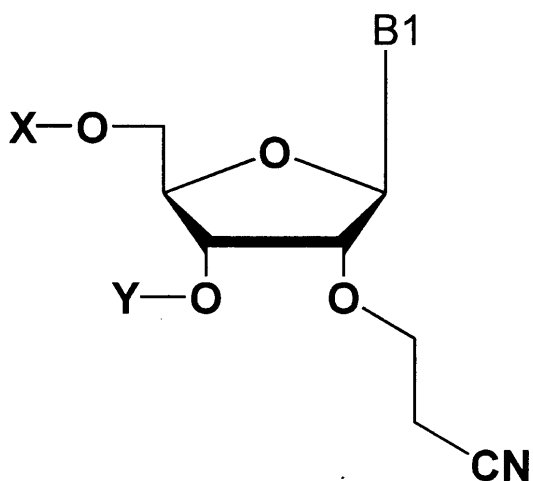
【化 2】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

一般式 (I) で表されるヌクレオシド又はそのヌクレオチド：

【化 1】



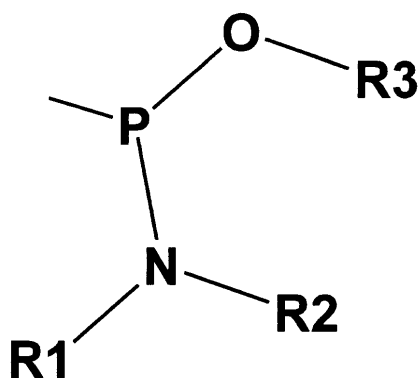
(I)

10

20

(式 I 中、X 及び Y は同一または異なって、水素、置換基を有していてもよいシリル基、4 - メトキシトリチル基、4 , 4 ' - ジメトキシトリチル基、又は一般式 (II) :

【化 2】



(II)

30

40

(式 (II) 中、R1 および R2 は同一または異なって、炭素数 1 から 7 のアルキル基を表すか、又は、R1 および R2 が互いに結合して環構造を形成し、R3 はリン酸の保護基を表す) を表し、B1 は置換基を有していてもよいピリミジン塩基又はプリン塩基を表す。)

【請求項 2】

2' - O シアノエチルウリジン。

【請求項 3】

2' - O シアノエチルシチジン。

【請求項 4】

50

2' O シアノエチルアデノシン。

【請求項 5】

2' O シアノエチルグアノノシン。

【請求項 6】

N - 4 - ジメチルアミノメチレン - 2' O シアノエチルシチジン。

【請求項 7】

N 6 - ジメチルアミノメチレン - 2' O シアノエチルアデノシン。

【請求項 8】

N 2 ジメチルアミノメチレン 6 O トリイソプロピルベンゼンスルホニル 2' O シアノエチルグアノノシン。

10

【請求項 9】

N 4 アセチル 2' O ( 2 - シアノエチル ) シチジン。

【請求項 10】

N 2 ジメチルアミノメチレン 2' O シアノエチルグアノノシン。

【請求項 11】

請求項 1 ~ 10 の何れか一項に記載のヌクレオシドの合成方法であって、炭酸セシウム、DBU, 及び Triton B から成る群から選択される少なくとも一種の化合物とアクリロニトリルとヌクレオシド誘導体を合成原料として用い、t - ブチルアルコールの存在下又は非存在下で、2' 水酸基をシアノエチルエーテル化することを特徴とする、前記合成方法。

20

【請求項 12】

炭酸セシウム、DBU, 及び Triton B から成る群から選択される少なくとも一種の化合物をヌクレオシド誘導体に対して 0.1 ~ 30 equiv の範囲で反応系に存在させ、アクリロニトリルに対して、0.05 ~ 30 equiv の範囲の t - ブチルアルコールの存在下に反応を行う、請求項 11 記載の合成方法。

【請求項 13】

炭酸セシウムを用いる、請求項 11 又は 12 に記載の合成方法。

【請求項 14】

20 ~ 30 の温度範囲で反応させる、請求項 11 ~ 13 の何れか一項に記載の合成方法。

30

【請求項 15】

反応時間が 2 時間 ~ 3 時間の範囲である、請求項 11 ~ 14 の何れか一項に記載の合成方法。

【請求項 16】

請求項 1 ないし 10 のいずれか一項に記載のヌクレオシドを含む RNA オリゴマー。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、2' 水酸基をシアノエチルエーテル化したヌクレオシド、ヌクレオチド及びそれらのホスホロアミダイト化合物に関する。これらの化合物は、核酸合成試薬としてまた修飾 RNA として各々用いることができる。

40

【背景技術】

【0002】

化学的に合成されたオリゴリボヌクレオチド (オリゴ RNA) は、遺伝子解析用の RNA プローブ、RNA 医薬品素材 (アンチセンス RNA、リボザイム、iRNA を利用した遺伝子発現制御)、人工酵素、アプタマーとして利用することが可能である。

【0003】

2' 水酸基をメチルエーテル誘導体は市販されていることもあり、エーテル修飾体として汎用されている。しかしながらこの修飾 RNA では、遺伝子制御物質として用いる場合細胞内における酵素耐性の点で問題がある。一方、同様のエーテル型修飾としてメトキシ

50

エチルエーテル誘導体も汎用されている。こちらの化合物は、メチル修飾体と比較して酵素耐性の点で優れていると報告されている（非特許文献1）。しかし、それらの調製には、導入法や導入試薬に制限がつくためピリミジンヌクレオシド、プリンヌクレオシドに共通な合成法がないのが現状である。また、エーテル鎖中に存在する酸素原子の影響によりエーテル鎖の構造が制限されているためオリゴRNA合成の際、縮合効率の点で問題が生じる可能性が十分考えられる。

【0004】

これらの問題点を解決するには、炭素数が3炭素程度でエーテル鎖中に酸素原子を含まず末端に電子吸引性でかつ親水性置換を有するエーテル修飾体の開発を行うことが有用である。

10

【0005】

【非特許文献1】VonPierre Martin, ヘルベチカ チミカ アクタ, 1995, 78, 486-504

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

上記のような条件を満たすエーテル修飾体としてシアノエチルエーテルが考えられる。このエーテルはアクリロニトリルを導入試薬とすることで安価に修飾体を得られるという利点がある。しかし、導入には強塩基例えば水酸化ナトリウムなどを用いて加熱という過酷な条件を要する問題点があった。また、機能性官能基としての可能性は核酸化学において開拓されていない。

20

【0007】

本発明は、穏やかな条件で効率的にシアノエチルエーテルを構築する系、及び機能性官能基としての可能性を開拓し新規機能性核酸の創製に寄与することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0008】

そこで、本発明者は、アクリロニトリルを2-シアノエチル化の合成原料に用いるとともに、水酸基を活性化する塩基として最適なものを探索した結果、本発明を完成した。

【0009】

即ち、本発明は、一般式(I)で表されるヌクレオシド又はそのヌクレオチド(式I中、X及びYは同一または異なって、水素、置換基を有していてもよいシリル基、4-メトキシトリチル基、4,4'-ジメトキシトリチル基、又は一般式(II)(式(II)中、R1およびR2は同一または異なって、例えば、ジソプロピルのような炭素数1から7のアルキル基を表すか、又は、R1およびR2が互いに結合して環構造を形成し、R3は、例えば、2-シアノエチルのようなリン酸の保護基を表す)を表し、B1は置換基を有していてもよいピリミジン塩基又はプリン塩基を表す。)に係る。

30

【0010】

更に、本発明は、上記一般式(I)で表されるヌクレオシドの合成方法であって、炭酸セシウム、DBU、及びTriton Bから成る群から選択される少なくとも一種の化合物とアクリロニトリルとヌクレオシド誘導体を合成原料として用い、t-ブチルアルコールの存在下又は非存在下で、2'水酸基をシアノエチルエーテル化することを特徴とする、前記合成方法に係る。

40

【0011】

本発明は又、これら合成方法で得られたヌクレオシドのホスホロアミダイト化合物にも係る。尚、本発明のホスホロアミダイト化合物は、当業者に公知のホスホロアミダイト法を用いて、当業者であれば容易に調製することが出来る。更に、本発明は上記ヌクレオシド(一般式(I)におけるX及びYを除いた部分)を含むRNAオリゴマーにも係る。

【発明の効果】

【0012】

本発明のシアノエチル化反応により種々の水酸基のシアノエチル化を効率よく実施することが可能となった。

50

## 【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】本発明で得られたRNAオリゴマーの陰イオン交換高速液体クロマトグラフィーによる分析プロファイルを示す。

【発明を実施するための最良の形態】

【0014】

本発明化合物において、ピリミジン塩基又はプリン塩基であるB1の置換基の具体例としては、当業者に公知の任意の基、例えば、N-ジメチルアミノメチレン、N-アセチル、及びトリイソプロピルベンゼンスルホニル基等の本明細書の実施例中に記載されたものを挙げることができる。

10

また、ホスホロアミダイト基(II)中、R1およびR2は同一または異なって、イソプロピル基等の炭素数1から7のアルキル基を表すか、又は、R1およびR2が互いに環構造を形成する。又、リン酸の保護基であるR3は、例えば、2-シアノエチル基、4-ニトロフェニルエチル基、N-(トリフルオロアセチル)アミノブチル基、又は、4-[N-メチル-N-(2,2,2-トリフルオロアセチル)アミノ]ブチル基を挙げることが出来、2-シアノエチル基が好適である。

【0015】

本発明の合成方法において、炭酸セシウム、DBU、及びTriton Bから成る群から選択される少なくとも一種の化合物、特に、好適には炭酸セシウムの存在下で、合成原料としてアクリロニトリル及びヌクレオシド誘導体を用いる合成方法であり、これら化合物はヌクレオシド誘導体に対して0.1~30equivの範囲で反応系に存在させ、更に、アクリロニトリルに対して0.05~30equivの範囲のt-ブチルアルコールの存在下に反応を行うことが好適である。通常、20~30の温度範囲で反応させることが好ましく、又、反応時間は2時間~3時間の範囲であることが好ましい。

20

【実施例】

【0016】

以下、実施例に則して本発明を更に詳しく説明する。尚、本発明の技術的範囲はこれらの記載によって何等制限されるものではない。

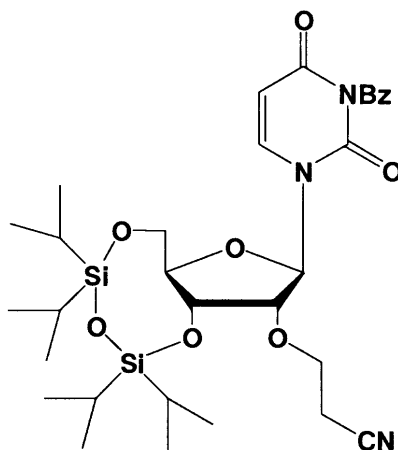
【0017】

実施例1：2'-O-(2-シアノエチル)-N<sup>3</sup>ベンゾイル 3',5'-Oテトライソプロピルジシロキサニリデン ウリジン(化合物1)

30

【0018】

【化1】



40

【0019】

N<sup>3</sup>ベンゾイル 3',5'-Oテトライソプロピルジシロキサニリデン ウリジン化合物(591mg, 1mmol)をt-ブチルアルコール(5ml)に溶解させた。そ

50

こにアクリロニトリル ( 1 . 3 m l , 2 0 m m o l )、引き続き炭酸セシウム ( 3 5 3 m g , 1 m m o l ) を加え 2 時間激しく攪拌した。その後、セライトろ過により炭酸セシウムを取り除き、減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー ( ヘキサン : 酢酸エチル = 3 : 1 ) により精製し白色結晶として標題化合物 ( 5 9 3 m g , 0 . 9 2 1 m m o l ) を収率 9 2 % で得た。分析用サンプルにはクロロホルム - ジイソプロピルエーテルから結晶化したものを用いた。m . p . 1 5 9 。

【 0 0 2 0 】

<sup>1</sup>H-NMR(CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) 0.94 1.12(28H, m), 2.61 2.63(2H, m), 3.91 4.05(4H, m), 4.18 4.29(3H, m), 5.70(1H, s), 5.79(1H, d, J=8.30), 7.49-7.94(5H, m), 8.00(1H, d, J=8.30)

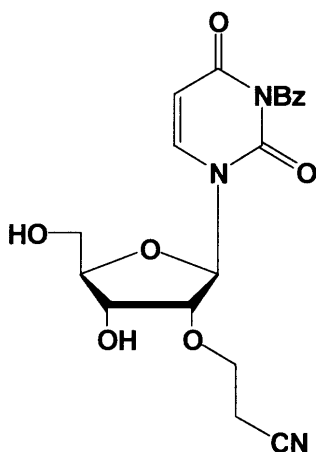
10

【 0 0 2 1 】

実施例 2 2' - O - ( 2 - シアノエチル ) - N<sup>3</sup> - ベンゾイルウリジン ( 化合物 2 )

【 0 0 2 2 】

【 化 2 】



20

【 0 0 2 3 】

得られた化合物 1 ( 3 2 2 m g , 0 . 5 4 5 m m o l ) をテトラヒドロフラン ( 3 m l ) に溶解させ、あらかじめ調製したテトラブチルアンモニウムフルオリド ( 3 2 7 m g , 1 . 2 5 m m o l ) と酢酸 ( 7 2 μ l , 1 . 2 5 m m o l ) のテトラヒドロフラン溶液 ( 2 m l ) をゆっくりと滴下した。1時間攪拌させた後、反応液をクロロホルムで希釈し飽和食塩水で 3 回洗浄した。有機層を分離後、水層をクロロホルムで抽出した。有機層を合わせて無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。乾燥剤をろ過後、減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー ( 酢酸エチル : アセトン = 1 0 : 1 ) により精製し白色泡状物質として標題化合物 ( 1 4 7 m g , 0 . 3 6 6 m m o l ) を収率 6 7 % で得た。

30

【 0 0 2 4 】

<sup>1</sup>H-NMR(CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) 2.63 2.66(2H, m), 3.83 3.90(2H, m), 4.04 4.09(4H, m), 4.31(1H, dd, J=5.37, 7.32), 5.81(1H, d, J=1.71), 5.83(1H, d, J=8.30), 7.50 7.94(5H, m), 8.10(1H, d, J=8.30)

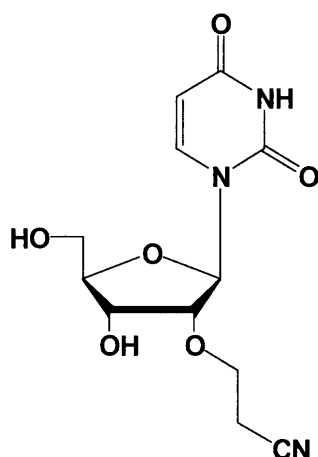
40

【 0 0 2 5 】

実施例 3 2' - O - ( 2 - シアノエチル ) ウリジン ( 化合物 3 )

【 0 0 2 6 】

## 【化3】



10

## 【0027】

得られた化合物2 (80 mg, 0.202 mmol) をエタノール：アンモニア水 (2 ml, 3 : 1, v / v) に溶解させ3時間攪拌した。その後、減圧濃縮して得られた残渣を1 mlのメタノールに溶かし10 mlのエーテルで希釈して3 mlの蒸留水で3回抽出した。水層を減圧濃縮し、得られた残渣を球状シリカゲルカラムクロマトグラフィー (ク口口ホルム：メタノール = 5 : 1) で精製し白色泡状物質として標題化合物 (57 mg, 0.191 mmol) を収率95%で得た。

## 【0028】

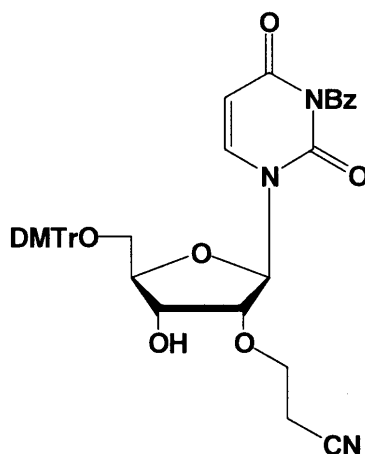
$^1\text{H-NMR}$  (D<sub>2</sub>O, 500 MHz) 2.70 2.72 (2H, m), 3.69 (1H, dd, J=4.15, 12.9 Hz), 3.82 3.85 (3H, m), 4.02 4.04 (1H, m), 4.08 (1H, dd, J=3.66, 5.23), 4.19 (1H, t, J=5.62, 6.10), 5.77 (1H, d, J=8.06), 5.87 (1H, d, J=3.66), 7.80 (1H, d, J=8.06)

## 【0029】

実施例4 5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2'-O-(2-シアノエチル)-N<sup>3</sup>-ベンゾイルウリジン (化合物4)

## 【0030】

## 【化4】



40

## 【0031】

化合物1 (2.70 g, 4.19 mmol) をテトラヒドロフラン (20 ml) に溶解させ、あらかじめ調製したテトラブチルアンモニウムフルオリド (2.75 g, 10.5

50

mmol)と酢酸(0.6ml, 10.5mmol)のテトラヒドフラン溶液(20ml)をゆっくりと滴下した。7時間攪拌させた後、反応液をクロロホルムで希釈し飽和食塩水で3回洗浄した。水層をクロロホルムで抽出し、有機層を合わせて無水硫酸ナトリウムで乾燥した。乾燥剤をろ過後、減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(酢酸エチル:アセトン=10:1)により精製し化合物2を得た。引き続き、乾燥ピリジンにて3回共沸脱水を行い、乾燥ピリジン(40ml)に溶解させた。塩化ジメトキシトリチル(1.71g, 5.04mmol)を加えて7時間攪拌させた後、反応系に水を加えて反応を停止した。減圧濃縮して得られた残渣をクロロホルムで希釈し、飽和重曹水及び飽和食塩水で洗浄した。得られた有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。乾燥剤をろ過後、減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン:酢酸エチル=1:1)で精製し白色泡状物質として標題化合物(2.07g, 2.84mmol)を収率70%で得た。

10

## 【0032】

<sup>1</sup>H-NMR(CDC13, 500 MHz)2.55 2.62(3H, m), 3.57 3.64(2H, m), 3.79 3.86(7H, m), 4.00(1H, d, J=5.13), 4.04 4.07(1H, m), 4.12 4.15(1H, m), 4.53(1H, ddd, J=5.13, 9.40, 9.52), 5.37(1H, d, J=8.30), 5.86(1H, s), 6.86(4H, dd, J=1.22, 8.79), 7.24-7.34(7H, m), 7.42(2H, br), 7.49(2H, br), 7.64(2H, br), 7.93(2H, br), 8.22(1H, J=8.30)

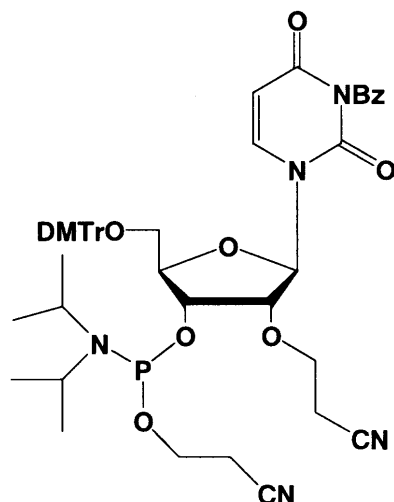
## 【0033】

実施例5 5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2'-O-(2-シアノエチル)-N<sub>3</sub>ベンゾイルウリジン(2-シアノエチルN,N-ジイソプロピルホスホロアミダイト)(化合物5)

20

## 【0034】

## 【化5】



30

40

## 【0035】

アルゴン雰囲気下、五酸化ニリンを乾燥剤としてデシケータにて減圧乾燥させた上記化合物4(1.06g, 1.51mmol)とテトラゾールジイソプロピルアンモニウム塩(193mg, 2.25mmol)を乾燥アセトニトリル(7ml)に溶解させた。2-シアノエチルN,N,N,N-テトライソプロピルホスホロジアミダイト(678mg, 2.25mmol)を乾燥アセトニトリル(3ml)の溶液として反応系に滴下した。5時間攪拌した後、反応液をクロロホルムで希釈し飽和食塩水で2回、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で2回洗浄した。水層をクロロホルムで抽出し、得られた有機層を合わせて無水硫酸マグネシウムで乾燥させた。乾燥剤をろ過後、減圧濃縮した。得られた残渣を球状

50



シリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン：酢酸エチル = 1 : 1 0.5% トリエチルアミン）で精製し白色泡状物質として標題化合物（1.27 g, 1.40 mmol）を収率 93% で得た。

【0036】

<sup>1</sup>H NMR(CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) 1.08 1.30(12H, m), 2.47 2.68(4H, m), 3.49 4.30(16H, m), 4.59 4.80(1H, br), 5.28 5.37(1H, m), 5.85(1H, m), 6.83 6.91(4H, m), 7.24 7.66(13H, m), 8.00 8.03(2H, m), 8.24 8.30(1H, m)

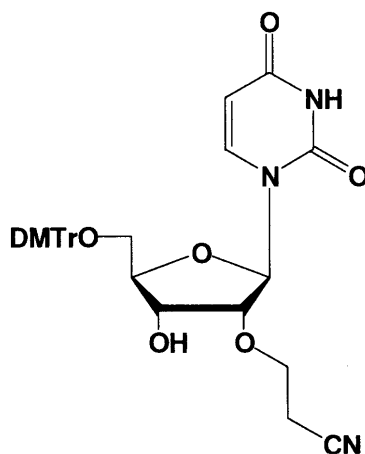
【0037】

実施例 6 5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2'-O-(2-シアノエチル)ウリジン（化合物 6）

10

【0038】

【化 6】



20

【0039】

2'-O-シアノエチルウリジン（化合物 3）（1.97 g, 6.63 mmol）をピリジン（70 ml）に溶解させ、ジメトキシトリチルクロリド（2.47 g, 7.29 mmol）を加え 4 時間攪拌する。その後、反応液を減圧濃縮してクロロホルムで希釈し飽和食塩水、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液にて洗浄し、得られた有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させる。減圧濃縮して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに吸着させクロロホルム：メタノール（100：0 から 20：1、含 0.5% トリエチルアミン）で精製し標題化合物（3.91 g, 99%）を得た。

30

【0040】

<sup>1</sup>H-NMR(CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) 2.68 2.71(2H, m), 3.53 3.58(2H, m), 3.78 3.79(6H, m), 3.90 3.98(2H, m), 4.03 4.06(1H, m), 4.17 4.22(1H, m), 4.49(1H, dd), 5.31(1H, d), 5.89(1H, s), 6.84(4H, d), 7.22-7.40(9H, m), 8.06(1H, d)

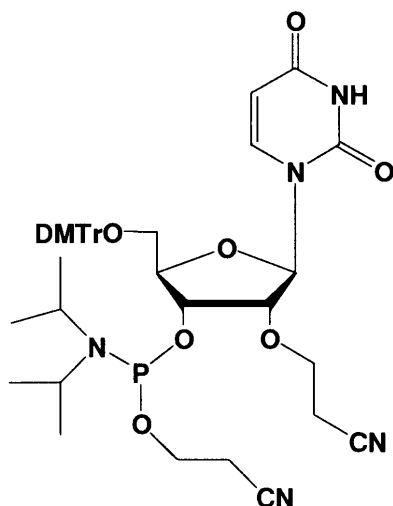
【0041】

実施例 7 5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2'-O-(2-シアノエチル)ウリジン 3'-(2-シアノエチル N,N-ジイソプロピルホスホロアミダイト)（化合物 7）

40

【0042】

## 【化 7】



10

## 【0043】

20

上記化合物6(1.20g, 2.00mmol)を脱水トルエンにて5回共沸脱水した後アルゴン置換した。乾燥ジクロロメタン(10ml)に溶解させ、ジイソプロピルエチルアミン(0.5ml, 2.87mmol)、2-シアノエチルN,N-ジイソプロピルアミノクロホスフィン(521mg, 2.20mmol)を乾燥ジクロロメタン(2ml)の溶液として反応系に滴下した。室温で2時間攪拌した後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で2回、飽和食塩水で2回洗浄した。得られた有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥させた。乾燥剤をろ過後、減圧濃縮した。得られた残渣をNHシリカゲルカラムクロマトグラフィーに吸着させクロロホルム：メタノール(100：050：1)で精製し標題化合物(1.33g, 83%)を得た。

## 【0044】

30

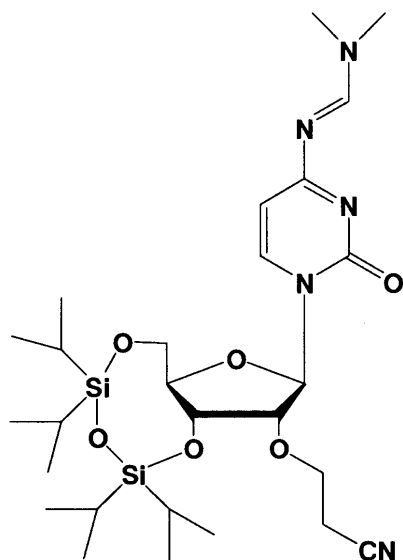
$^1\text{H NMR}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) 1.08 1.21(12H, m), 2.60 2.77(4H, m), 3.43 3.76(4H, m), 3.79 3.80(6H, m), 3.87-4.84(6H, m), 5.18-5.29(1H, m), 5.88-5.90(1H, m), 6.81-6.87(4H, m), 7.23-7.39(9H, m), 8.05-8.13(1H, m)

## 【0045】

実施例 8 N4 ジメチルアミノメチレン 3', 5' O テトライソプロピルジシロキサニリデン 2' O (2-シアノエチル)シチジン(化合物8)

## 【0046】

## 【化 8】



10

20

## 【0047】

N4 ジメチルアミノメチレン 3', 5' O テトライソプロピルジシロキサニリデン シチジン (541 mg, 1 mmol) を t-ブチルアルコール (5 ml) に溶解させた。そこにアクリロニトリル (1.3 ml, 20 mmol)、引き続き炭酸セシウム (353 mg, 1 mmol) を加え 3 時間激しく攪拌した。その後、セライトろ過により炭酸セシウムを取り除き、減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに吸着させクロロホルム：メタノール (40：1) で精製し標題化合物 (528 mg, 89%) を得た。

## 【0048】

$^1\text{H-NMR}$  (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) 0.85 1.06 (28H, m), 2.69 2.73 (2H, m), 3.10 (3H, s), 3.12 (3 H, s), 3.86 4.24 (7H, m), 5.74 (1H, s), 6.01 (1H, dd), 8.01 (1H, d), 8.76 (1H, s)

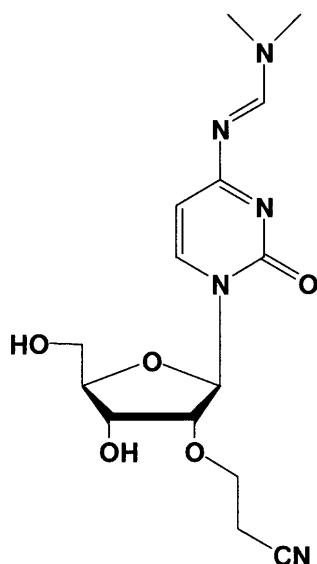
30

## 【0049】

実施例 9 N4 ジメチルアミノメチレン 2' O (2-シアノエチル) シチジン (化合物 9)

## 【0050】

## 【化 9】



10

20

## 【0051】

得られた化合物 8 (347 mg, 0.584 mmol) をテトラヒドロフラン 6 ml に溶解させた。そこにトリエチルアミン 3 フッ化水素 (332  $\mu$ l, 2.04 mmol)、引き続きトリエチルアミン (147  $\mu$ l, 1.05 mmol) を加え 1 時間攪拌する。反応液を減圧濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに吸着させクロロホルム：メタノール (100：0 から 50：1) で標題化合物 (184 mg、90%) を得た。

## 【0052】

$^1\text{H-NMR}$  (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) 0.85 1.06 (2H, m), 2.69 2.73 (2H, m), 3.10 (3H, s), 3.12 (3H, s), 3.86 4.24 (7H, m), 5.74 (1H, vs), 6.01 (1H, dd), 8.01 (1H, d), 8.76 (1H, s)

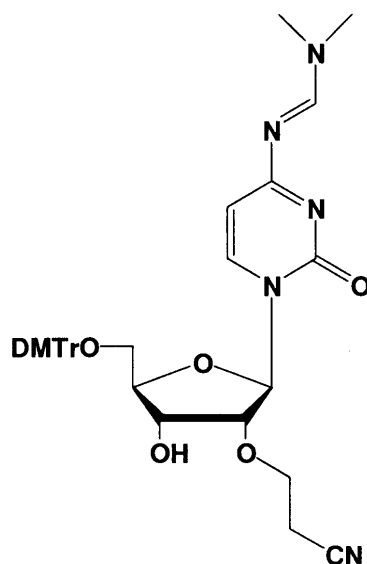
30

## 【0053】

実施例 10 N4 ジメチルアミノメチレン 5' O ジメトキシトリチル 2' O シアノエチルシチジン (化合物 10)

## 【0054】

## 【化 1 0】



10

20

## 【 0 0 5 5】

化合物 9 (192 mg, 0.546 mmol) をピリジン (5 ml) に溶解させた。そこにジメトキシトリチルクロリド (204 mg, 0.602 mmol) を加え 2 時間攪拌する。反応液を減圧濃縮し、クロロホルムで希釈し飽和食塩水並びに飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄した。さらに水層をクロロホルムで 3 回逆抽出し有機層とあわせて無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。乾燥剤をろ別した後、減圧濃縮し得られた残渣を得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに吸着させクロロホルム：メタノール (100 : 0 から 25 : 1) で精製し標題化合物 (157 mg, 45%) を得た。

## 【 0 0 5 6】

$^1\text{H-NMR}$  (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) 2.69 2.73 (2H, br), 3.10 (3H, s), 3.12 (3H, s), 3.49 (1H, dd), 3.57 3.59 (1H, m), 3.77 (6H, s), 3.94 4.07 (3H, m), 4.31 4.41 (2H, m), 5.76 (1H, d), 5.93 (1H, s), 6.82-6.85 (4H, m), 7.20 7.43 (9H, m), 8.16 (1H, dd), 8.76 (1H, s)

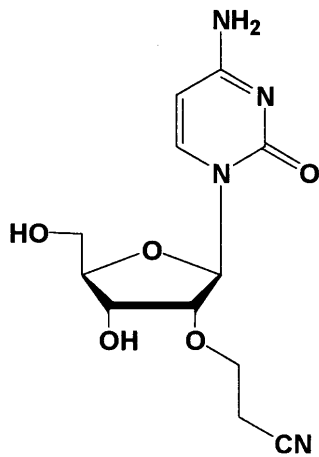
30

## 【 0 0 5 7】

実施例 11 2' - O (2 - シアノエチル) シチジン (化合物 11)

## 【 0 0 5 8】

## 【化 1 1】



10

## 【 0 0 5 9】

化合物 10 (351 mg、0.4 mmol) を濃アンモニア水 - エタノール (3 : 1, v/v、4 ml) に溶解し、1 時間攪拌する。反応液を減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに吸着させクロロホルム : メタノール (7 : 1) で精製し標題化合物 (109 mg, 92%) を得た。

20

## 【 0 0 6 0】

<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O, 500 MHz) 2.83 2.86 (2H, m), 3.84 (1H, dd, J = 13 Hz, 4.4 Hz), 3.95-4.03 (3H, m), 4.14-4.18 (2H, m), 4.27 (1H, dd, J=13 Hz, 1.7 Hz), 5.97 (1H, d, J = 3.2 Hz), 6.1 (1H, d, J=7.6 Hz), 7.89 (1H, d, J=7.6 Hz).

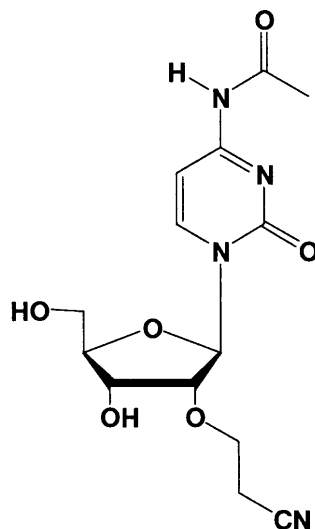
## 【 0 0 6 1】

実施例 12 N4 アセチル 2'-O-(2-シアノエチル) シチジン (化合物 12)

## 【 0 0 6 2】

## 【化 1 2】

30



40

## 【 0 0 6 3】

化合物 11 (1000 mg, 3.38 mmol) をエタノール (70 ml) に溶解させ

50

、無水酢酸 ( 1 . 6 m l , 1 6 . 9 6 m m o l ) を加えて 1 2 時間 攪拌する。系内で析出した結晶をろ別し、ジエチルエーテルにて洗浄し標題化合物 ( 1 0 5 5 m g , 3 . 1 2 m m o l ) を 9 2 % の収率で得る。

【 0 0 6 4 】

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO, 500 MHz) 2.10 (3H, s), 2.81-2.86 (2H, m), 3.60-3.63(1H, m), 3.78-3.94 (5H, m), 4.03-4.05 (1H, m), 5.13 (1H, d, J=4.88), 5.20 (1H, t, J=4.88), 5.78 (1H, d, J=1.71), 7.18(d, J=7.57), 8.47(1H, J=7.57), 10.92(1H, s)

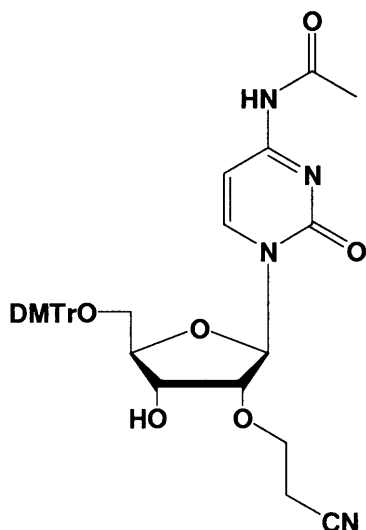
【 0 0 6 5 】

実施例 1 3 N 4 - アセチル - 5 ' - O - ジメトキシトリチル - 2 ' - O - ( 2 - シアノエチル ) シチジン ( 化合物 1 3 )

10

【 0 0 6 6 】

【 化 1 3 】



20

30

【 0 0 6 7 】

化合物 1 2 ( 1 0 5 5 m g , 3 . 1 2 m m o l ) を乾燥ピリジンにて 4 回共沸脱水させた後、乾燥ピリジン ( 3 0 m l ) に溶解させた。そこにジメトキシトリチルクロリド ( 1 1 6 2 m g , 3 . 4 3 m m o l ) を加え 3 時間 攪拌させ、水を加えて反応を停止する。反応液を減圧濃縮し、クロロホルムで希釈し飽和食塩水並びに飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄した。得られた有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。乾燥剤をろ別した後、減圧濃縮し得られた残渣を得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに吸着させクロロホルム：メタノール ( 9 8 : 2 0 . 5 % トリエチルアミン ) で精製し標題化合物 ( 1 8 4 8 m g , 2 . 8 8 m m o l , 9 2 % ) を白色泡状物質として得る。

40

【 0 0 6 8 】

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) 2.20 (3 H, s), 2.60-2.68 (2 H, m), 2.97-2.98 (1 H, br), 3.54-3.62 (2 H, m), 3.79 (6 H, m), 3.92-3.97 (1 H, m), 4.01(1H, d, J=5.13), 4.11-4.13(1H, m), 4.24-4.18(1H, m), 5.89 (1 H, s), 6.85-6.87 (4 H, m), 7.15-7.43 (10 H, m), 8.53 (1H, d, J=7.57), 10.00 (1H, br)

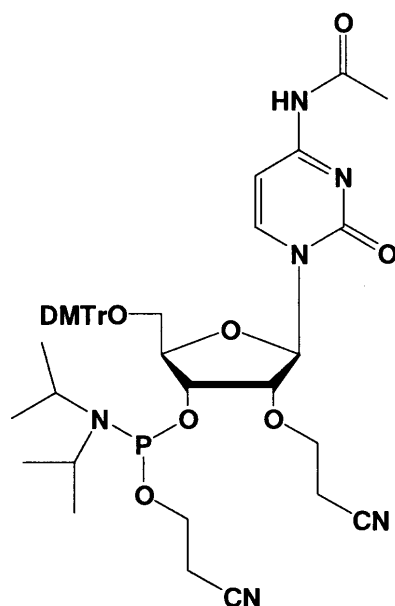
【 0 0 6 9 】

実施例 1 4 N 4 - アセチル - 5 ' - O - ジメトキシトリチル - 2 ' - O - ( 2 - シアノエチル ) シチジン 3 ' - ( 2 - シアノエチル N , N - ジイソプロピルホスホロアミダイト ) ( 化合物 1 4 )

【 0 0 7 0 】

50

## 【化 1 4】



10

20

## 【 0 0 7 1】

上記化合物 1 3 (668 mg, 1.04 mmol) を乾燥トルエンにて 5 回共沸脱水を行った後、アルゴン置換した。乾燥ジクロロメタン (8 ml) に溶解させジイソプロピルエチルアミン (271  $\mu$ l, 1.56 mmol) を加え、ジイソプロピルアミノ-(2-シアノエチル)-クロロホスフィン (271 mg, 1.15 mmol) を乾燥ジクロロメタン (2 ml) の溶液として加えた。3 時間攪拌した後、酢酸エチルで希釈し、飽和食塩水、飽和重曹水で有機層を洗浄した。得られた有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥して乾燥剤をろ別した。溶媒を減圧流去して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに吸着させクロロホルム：メタノール (9 8 : 2 ~ 9 7 : 3 0 . 5 % トリエチルアミン) で精製し標題化合物 (790 mg, 0.94 mmol, 90%) を白色泡状物質として得る。

30

## 【 0 0 7 2】

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) 1.01 1.18 (12 H, m), 2.23 2.24 (3 H, m), 2.40-2.75 (4 H, m), 3.45-3.74 (5 H, m), 3.81-3.82 (6 H, m), 3.84-4.59 (6 H, m), 5.91-5.93 (1 H, m), 6.83-6.87 (4 H, m), 6.96-7.05 (1 H, m), 7.26-7.44 (9H, m), 8.53-8.60 (1H, m), 10.10 (1H, s)

## 【 0 0 7 3】

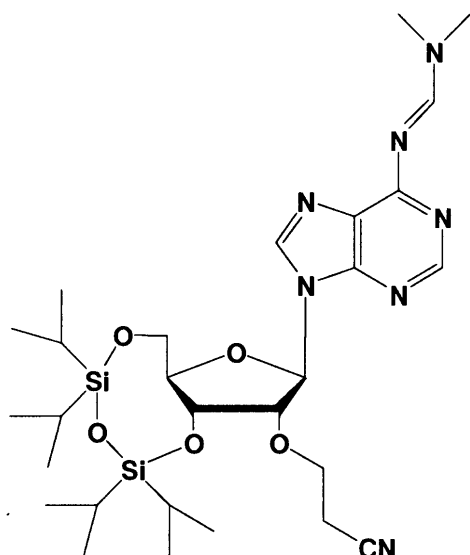
実施例 1 5 N 6 ジメチルアミノメチレン 3', 5' O テトライソプロピルジシロキサニリデン 2' O シアノエチルアデノシン (化合物 1 5)

40

## 【 0 0 7 4】



## 【化 1 5】



10

20

## 【0075】

N 6 ジメチルアミノメチレン 3', 5' O テトライソプロピルジシロキサニリデン アデノシン化合物 (565 mg, 1 mmol) を t-ブチルアルコール (5 ml) に溶解させた。そこにアクリロニトリル (1.3 ml, 20 mmol)、引き続き炭酸セシウム (353 mg, 1 mmol) を加え 3 時間激しく攪拌した。その後、セライトろ過により炭酸セシウムを取り除き、減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに吸着させクロロホルム：メタノール (50 : 1) で精製し標題化合物 (559 mg, 90%) を得た。

## 【0076】

$^1\text{H-NMR}$  (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) 0.96 1.12 (28H, m), 2.71 2.73 (2H, m), 3.19 (3H, s), 3.25 (3H, s), 3.94-4.27 (6H, m), 4.77 (1H, dd), 6.01 (1H, s), 8.14 (1H, s), 8.48 (1H, s), 8.93 (1H, s)

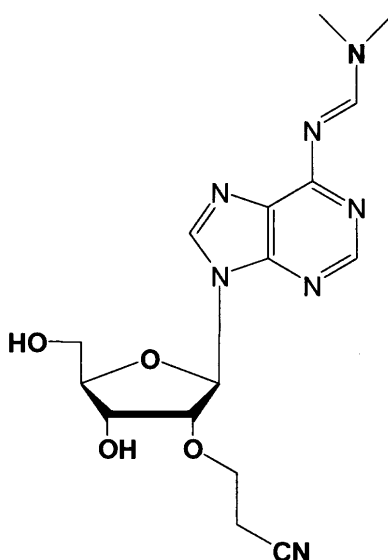
30

## 【0077】

実施例 16 N 6 ジメチルアミノメチレン 2' O シアノエチルアデノシン (化合物 16)

## 【0078】

## 【化 16】



10

20

## 【0079】

得られた化合物 15 (1.45 g, 2.35 mmol) をテトラヒドロフラン 24 ml に溶解させた。そこにトリエチルアミン 3 フッ化水素 (1.3 ml, 7.98 mmol)、引き続きトリエチルアミン (589  $\mu$ l, 4.23 mmol) を加え 1 時間攪拌する。反応液を減圧濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに吸着させクロロホルム：メタノール (50 : 1 から 25 : 1) で精製し標題化合物 (878 mg, quant) を得た。

## 【0080】

$^1\text{H-NMR}$  (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz) 2.62 2.65 (2H, m), 3.16 (3H, s), 3.18 (3H, s), 3.65 3.72 (4H, m), 3.80 3.86 (4H, m), 4.09 4.11 (1H, m), 4.43 (1H, t), 4.53 (1H, t), 6.08 (1H, d), 8.34 (1H, s), 8.40 (1H, s), 8.83 (1H, s)

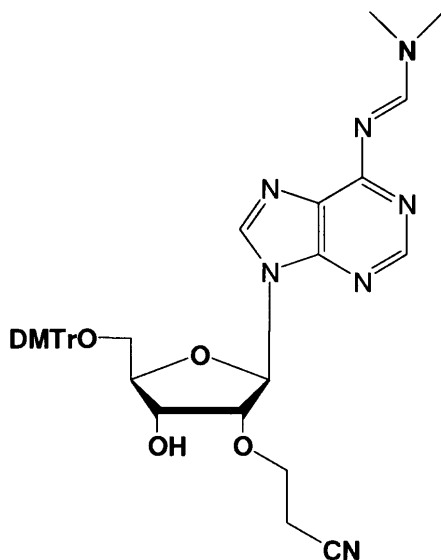
30

## 【0081】

実施例 17 N6 ジメチルアミノメチレン 5'-O ジメトキシトリチル 2'-O シアノエチルアデノシン (化合物 17)

## 【0082】

## 【化 17】



10

20

## 【0083】

化合物 16 (716 mg, 1.91 mmol) をピリジン (19 ml) に溶解させた。そこにジメトキシトリチルクロリド (712 mg, 2.10 mmol) を加え 3 時間攪拌する。反応液を減圧濃縮し、クロロホルムで希釈し飽和食塩水並びに飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄した。さらに水層をクロロホルムで 3 回逆抽出し有機層とあわせて無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。乾燥剤をろ別した後、減圧濃縮し得られた残渣を得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに吸着させクロロホルム：メタノール (100 : 0 から 50 : 1 含 0.5% トリエチルアミン) で精製し標題化合物 (1132 mg, 87%) を得た。

## 【0084】

$^1\text{H-NMR}$  (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) 2.52 2, 2.59 (2H, m), 3.13 (3H, s), 3.18 (3H, s), 3.25 3.57 (2H, m), 3.72 (6H, s), 3.82 3.92 (2H, m), 4.20 4.24 (3H, m), 4.50 (1H, t), 4.60 (1H, dd), 6.14 (1H, d), 6.75 (4H, d), 7.13 7.47 (9H, m), 8.09 (1H, s), 8.43 (1H, s), 8.94 (1H, s)

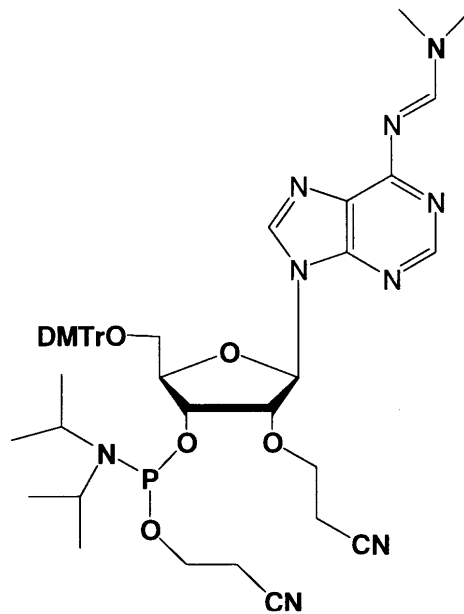
30

## 【0085】

実施例 18 N6 ジメチルアミノメチレン 5'-O ジメトキシトリチル 2'-O シアノエチルアデノシン 3'-(2-シアノエチル N,N-ジイソプロピルホスホロアミダイト) (化合物 18)

## 【0086】

## 【化 18】



10

20

## 【0087】

上記化合物 17 ( 1 . 0 6 g , 1 . 5 1 m m o l ) を脱水トルエンにて 5 回共沸脱水した後アルゴン置換した。乾燥ジクロロメタン ( 1 2 m l ) に溶解させ、ジイソプロピルエチルアミン ( 0 . 3 m l , 1 . 7 2 m m o l ) 、 2 - シアノエチル N , N - ジイソプロピルアミノクロロホスフィン ( 3 2 8 m g , 1 . 3 6 m m o l ) を乾燥ジクロロメタン ( 2 m l ) の溶液として反応系に滴下した。室温で 2 時間攪拌した後、反応液をクロロホルムで希釈し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で 3 回、飽和食塩水で 1 回洗浄した。得られた有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥させた。乾燥剤をろ過後、減圧濃縮した。得られた残渣を NH シリカゲルカラムクロマトグラフィーに吸着させクロロホルム : メタノール ( 1 0 0 : 0 1 0 0 : 1 ) で精製し標題化合物 ( 8 9 6 m g , 8 2 % ) を得た。

30

## 【0088】

$^1\text{H}$  NMR(CDC13, 500MHz) 1.06 1.18(12H, m), 2.58 2.66(4H, m), 3.21(3H, s), 3.26(3H, s), 3.32 3.35(1H, m), 3.51 4.01(14H, m), 4.34 4.39(1H, m), 4.55 4.67(1H, m), 4.80 4.85(1H, m), 6.10-6.14(1H, m), 6.76 6.83(4H, t), 7.18 7.36(9H, m), 8.09 8.12(1H, m), 8.45 8.46(1H, m), 8.95 8.96(1H, m)

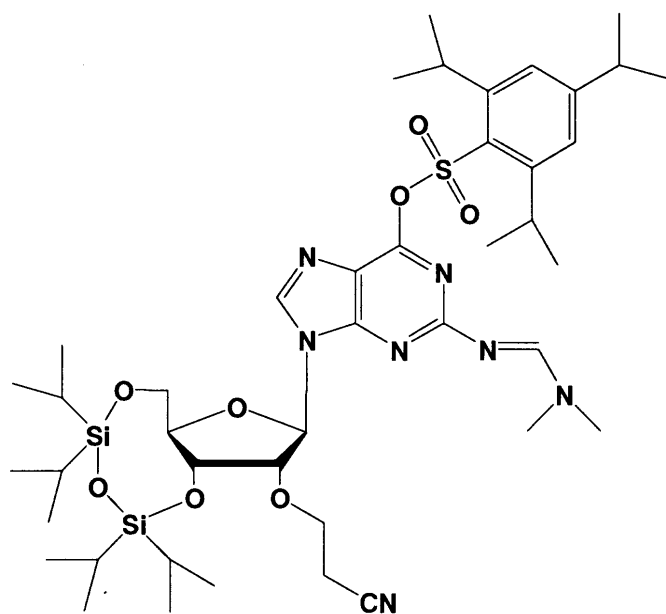
## 【0089】

実施例 19 N2 - ジメチルアミノメチレン - O - 6 - トリイソプロピルベンゼンスルホン 3', 5' - O - テトライソプロピルジシロキサニリデン 2' - O - シアノエチルグアノシン (化合物 19)

40

## 【0090】

## 【化 19】



10

20

## 【0091】

N2 - ジメチルアミノメチレン - 06 トリイソプロピルベンゼンスルホニル 3', 5' - O - テトライソプロピルジシロキサニリデン グアノシン (6.60 g, 7.80 mmol) を t - ブチルアルコール (39 ml) に溶解させた。そこにアクリロニトリル (20 ml, 156 mmol)、引き続き炭酸セシウム (2.75 g, 7.80 mmol) を加え 2 時間激しく攪拌した。その後、セライトろ過により炭酸セシウムを取り除き、減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに吸着させクロロホルム : メタノール (100 : 1) で精製し標題化合物 (5.82 mg, 83%) を得た。

## 【0092】

$^1\text{H-NMR}$  (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) 0.99 1.34 (46H, m), 2.77 2.632.79 (2H, t), 2.95 2.97 (1H, m), 3.11 (3H, s), 3.16 (3H, s), 3.99 4.33 (9H, m), 4.57 (1H, dd), 6.18 (1H, s), 7.23 (2H, s), 8.04 (1H, s), 8.23 (1H, s)

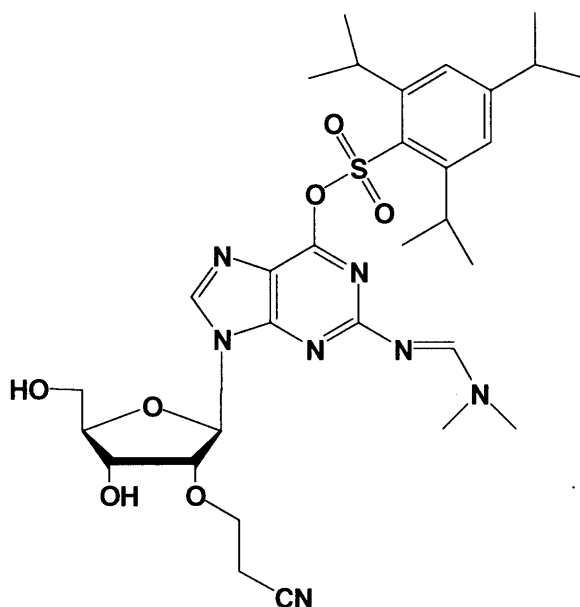
30

## 【0093】

実施例 20 N2 ジメチルアミノメチレン 6 O トリイソプロピルベンゼンスルホニル 2' O シアノエチルグアノシン (化合物 20)

## 【0094】

【化 2 0】



10

20

【 0 0 9 5】

化合物 19 (1.13 mg, 0.126 mmol) をテトラヒドロフラン (1 ml) に溶解させた。そこにトリエチルアミン3フッ化水素 (72  $\mu$ l, 0.442 mmol)、引き続きトリエチルアミン (31  $\mu$ l, 0.226 mmol) を加え1時間攪拌する。反応液を減圧濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに吸着させクロロホルム：メタノール (100：0 から 50：1 から 10：1) で精製し標題化合物 (67 mg, 81%) を得た。

【 0 0 9 6】

$^1\text{H-NMR}$  (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) 1.22 1.31 (18H, m), 2.57-2.60 (2H, t), 2.81-2.96 (1H, m), 3.05 (3H, s), 3.12 (3H, s), 3.62-3.79 (3H, m), 3.93 (1H, d), 4.24 (2H, dt), 4.31 (1H, br), 4.62 (1H, m), 4.84 (1H, dd), 5.98 6.15 (2H, m), 7.23 (2H, s), 8.12 (1H, s), 8.20 (1H, s)

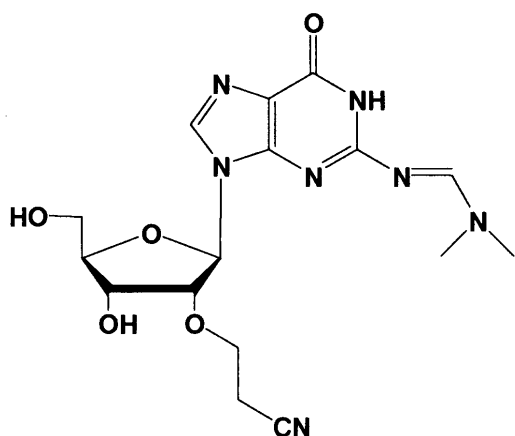
30

【 0 0 9 7】

実施例 21 N2 ジメチルアミノメチレン 2'-O シアノエチルグアノシン (化合物 21)

【 0 0 9 8】

## 【化 2 1】



10

## 【0099】

化合物 13 (630 mg, 0.7 mmol) を無水アセトニトリル (7 ml) に溶解させオルトニトロベンズアルドキシム (349 mg, 2.10 mmol), テトラメチルグアニジン (263  $\mu$ l, 2.10 mmol) を加える。1 時間攪拌後、反応液を酢酸エチルで希釈し、飽和食塩水、飽和塩化アンモニウム水溶液で洗浄する。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、ろ過して有機溶媒を減圧留去する。得られた残渣を無水 THF (7 ml) に溶解させ、トリエチルアミン (172  $\mu$ l, 1.26 mmol), トリエチルアミン 3 フッ化水素 (399 ml, 2.45 mmol) を加えて、1 時間攪拌する。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに吸着させクロロホルム：メタノール (90 : 10 85 : 15, v/v) で精製し標題化合物 (218 mg, 0.557 mmol, 80%) を白色固体として得る。

20

## 【0100】

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO, 500 MHz) 2.73-2.76 (2H, m), 3.03 (3H, s), 3.15 (3H, s), 3.54-3.58 (1H, m), 3.63-3.69 (1H, m), 3.78-3.82 (1H, m), 3.91 (1H, q,  $J=3.91$ ), 4.29 (1H, q,  $J=4.39, 5.13$ ), 4.40 (1H, t,  $J=5.13$ ), 5.01 (1H, t,  $J=5.61$ ), 5.30 (1H, d,  $J=5.37$ ), 5.91 (1H, d,  $J=5.13$ ), 8.08 (1H, s), 8.55 (1H, s), 11.4 (1H, br)

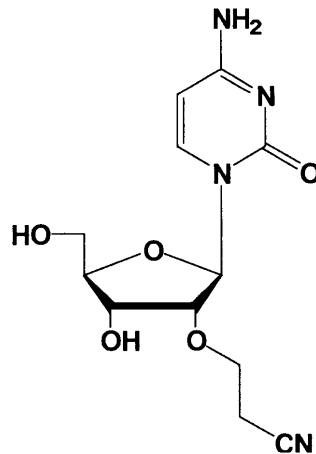
30

## 【0101】

実施例 22 2'-O シアノエチルシチジン (化合物 22)

## 【0102】

## 【化 2 2】



10

## 【0103】

化合物 12 (141 mg, 0.401 mmol) をアンモニア水 : エタノール (4 ml, v/v = 3/1) に溶解させ 1 時間攪拌する。反応液を減圧濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに吸着させクロロホルム : メタノール (7 : 1) で精製し標題化合物 (109 mg, 92%) を得た。

20

## 【0104】

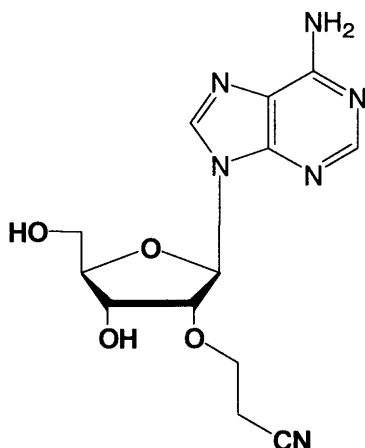
<sup>1</sup>H-NMR(D<sub>2</sub>O, 500 MHz) 2.83 2.86(2H, m), 3.83(1H, dd), 3.95 4.03(3H, m), 4.14 4.18(2H, m), 4.28(1H, dd), 5.97(1H, d), 6.05(1H, dd), 7.88(1H, d)

## 【0105】

実施例 23 2' - シアノエチルアデノシン (化合物 23)

## 【0106】

## 【化 2 3】



30

40

## 【0107】

化合物 16 (475 mg, 1.27 mmol) をアセトニトリルに溶解させヒドラジン (218 μl, 7 mmol) を加えて 3 時間攪拌する。反応系に析出してきた粉体をイソプロピルアルコールで洗浄した。さらに炉液を減圧濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに吸着させクロロホルム : メタノール (100 : 0 50 : 1 10 : 1) で精製し先ほどの粉体とあわせて標題化合物 (332 mg, 82%) を得た。

50



## 【 0 1 0 8 】

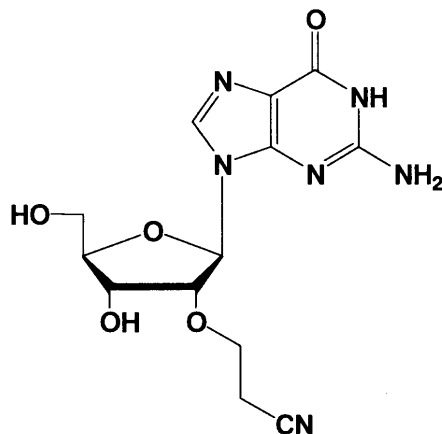
<sup>1</sup>H-NMR(D<sub>2</sub>O, 500 MHz) 2.83 2.86(2H, m), 3.83(1H, dd), 3.95 4.03(3H, m), 4.14 4.18(2H, m), 4.28(1H, dd), 5.97(1H, d), 6.05(1H, dd), 7.88(1H, d)

## 【 0 1 0 9 】

実施例 2 4 2'-O シアノエチルグアノシン (化合物 2 4)

## 【 0 1 1 0 】

## 【 化 2 4 】



10

20

## 【 0 1 1 1 】

化合物 2 1 (4 4 7 m g , 0 . 6 8 0 m m o l ) をアセトニトリル 7 m l に溶解させオルトニトロベンズアルドオキシム (3 3 9 m g , 7 m m o l )、テトラメチルグアニジン (8 5 μ l , 0 . 6 7 7 m m o l ) を加えて 1 時間攪拌する。反応液を減圧濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに吸着させクロロホルム：メタノール (1 0 0 : 0 5 0 : 1 2 0 : 1 1 0 : 1 ) で精製する。得られた化合物をアンモニア水：エタノール (5 m l , v / v = 3 : 1 ) を加えて 6 時間攪拌する。反応液を減圧濃縮し 5 0 % エタノール溶液から結晶化し標題化合物 (1 2 1 m g , 5 3 % ) を得る。

30

## 【 0 1 1 2 】

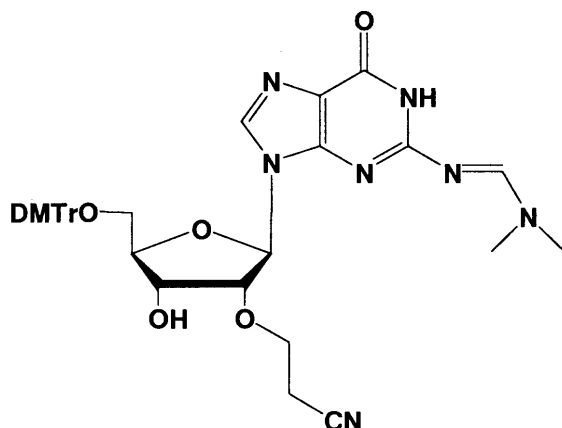
<sup>1</sup>H-NMR(D<sub>2</sub>O, 500 MHz) 2.73(2H, t), 3.76 3.95(4H, m), 4.23(1H, q), 4.50(1H, dd), 4.52(1H, t), 5.98(1H, d), 8.04(1H, s)

## 【 0 1 1 3 】

実施例 2 5 2 N -ジメチルアミノメチレン 5'-O ジメトキシトリチル 2'-O (2 シアノエチル) グアノシン (化合物 2 5)

## 【 0 1 1 4 】

## 【化 2 5】



10

## 【0115】

化合物 21 (392 mg, 1.00 mmol) 無水ピリジンにて 4 回共沸脱水を行い、無水ピリジン 10 ml に溶解させた。ジメトキシトリチルクロリド (373 mg, 1.10 mmol) を加えて室温で 3 時間攪拌する。水を加えて反応を停止し溶媒を減圧留去した。得られた残渣をクロロホルムで希釈し飽和食塩水ならびに飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させ溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに吸着させクロロホルム：メタノール (98 : 2, 0.5% トリエチルアミン) にて精製し、標題化合物 (635 mg, 0.92 mmol, 92%) を白色泡状物として得る。

20

## 【0116】

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) 2.57-2.59 (2 H, m), 2.98 (3 H, s), 3.04 (3 H, s), 3.38 (1 H, dd,  $J=4.64, 10.50$ ), 3.45-3.47 (1 H, dd,  $J=2.44, 10.50$ ), 3.74 (6 H, s), 3.78-3.96 (3 H, m), 4.21-4.23 (1 H, m), 4.29 (1 H, dd,  $J=3.42, 8.55$ ), 4.59-4.60 (1 H, m), 6.09 (1 H, dd,  $J=3.42$ ), 6.10-6.78 (4 H, m), 7.13-7.41 (9 H, m), 7.74 (1 H, s), 8.54 (1 H, s), 10.01 (1 H, br)

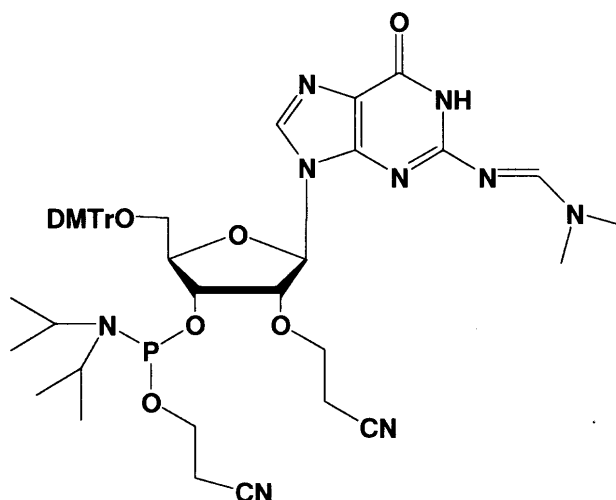
30

## 【0117】

実施例 26 2 N - ジメチルアミノメチレン 5' - O ジメトキシトリチル 2' - O (2 - シアノエチル) グアノシン 3' - (2 - シアノエチル N, N - ジイソプロピルホスホロアミダイト) (化合物 26)

## 【0118】

## 【化 2 6】



10

## 【 0 1 1 9】

20

化合物 25 (1.95 g, 2.81 mmol) を無水トルエンにて3回共沸脱水を行い系内をアルゴン置換した。無水ジクロロメタン (26 ml) に溶解させた後、ジイソプロピルエチルアミン (736  $\mu$ l, 1.56 mmol) を加え、ジイソプロピルアミノ-(2-シアノエチル)-クロロホスフィン (732 mg, 3.09 mmol) を無水ジクロロメタン (2 ml) の溶液として加えた。3時間攪拌した後、クロロホルムで希釈し、飽和食塩水並びに飽和炭酸水素ナトリウム水溶液にて洗浄する。得られた有機層を無水硫酸ナトリウムにて乾燥し、ろ別する。有機溶媒を減圧留去して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに吸着させクロロホルム：メタノール (98：2, 0.5% トリエチルアミン) にて精製し標題化合物 (2.11 g, 2.36 mmol, 84%) を白色泡状物質として得る。

## 【 0 1 2 0】

30

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) 1.01 -1.24 (12 H, m), 2.33-2.66 (5 H, m), 3.07-3.10 (6 H, m), 3.30-4.02 (14 H, m), 4.29-4.35 (2 H, m), 4.48-4.55 (1 H, m), 6.09-6.12 (1 H, m), 6.79-6.82 (4H, m), 7.17-7.44 (10 H, m), 7.78-7.82 (1H, m), 8.57-8.60 (1H, m), 9.73-9.77 (1H, m)

## 【 0 1 2 1】

実施例 27 2'-シアノエチルウリジル酸 12 量体の合成

常法により調整された、2'-O-シアノエチルウリジンがサクシニルリンカーを介して導入されているロングアミノアルキルチェーン CPG (16  $\mu\text{mol/g}$ ) を 1  $\mu\text{mol}$  固相合成用ソケットに充填されたものを用い、2'-O-シアノエチルウリジンホスホロアミダイトユニット (化合物 7) を 0.1 M の無水アセトニトリルの溶液として DNA/RNA 自動合成機 (Applied Bio System) に縮合時間 10 分間の縮合時間である RNA 合成用プログラムを適用する。

40

合成終了後、アンモニア水 1 ml にて 20 分間処理して固相担体からオリゴヌクレオチドを切り出しを行う。その後、酢酸アンモニウムバッファーで適量希釈し、逆相カラムカートリッジ並びに陰イオン交換 HPLC を用いて精製する。逆相カラムカートリッジにて脱塩操作を行い得られたオリゴヌクレオチドを凍結乾燥して標題化合物を得る。(収率 21%)。陰イオン交換高速液体クロマトグラフィーによる分析プロファイルを図 1 A に示す。

## 【 0 1 2 2】

MALDI TOF MASS (negative) Calcd. 4245.66 F

50

o u n d 4 2 4 4 . 3 3

【 0 1 2 3 】

実施例 28 G A C U の混合配列を有する 2' - O - シアノエチル RNA 4 量体の合成  
常法により調整された 2' - O - シアノエチルウリジンがサクシニルリンカーを介して  
導入されているロングアミノアルキルチェーン C P G ( 1 6 μ m o l / g ) を 1 μ m o l 固相  
合成用ソケットに充填されたものを用い、各 4 種類の 2' - O - シアノエチルヌクレオシド  
ホスホロアミダイトユニット ( 化合物 7、14、18、26 ) を 0 . 1 M の無水アセト  
ニトリルの溶液として DNA / RNA 自動合成機 ( A p p l i e d B i o S y s t e m ) に縮合時間 1 0 分間の縮合時間である RNA 合成用プログラムを適用する。

合成終了後、アンモニア水-酢酸アンモニウム ( 1 0 % w t / w t ) 1 m l にて 9 0 分間  
処理して固相担体からのオリゴヌクレオチドの切り出し並びに核酸塩基部の保護基の脱保  
護を行う。その後、酢酸アンモニウムバッファーで適当量希釈し、逆相カラムカートリッ  
ジ並びに陰イオン交換 H P L C を用いて精製する。逆相カラムカートリッジを用いて脱塩  
操作を行い得られたオリゴヌクレオチドを凍結乾燥して標題化合物を得る ( 収率 5 8 %  
 ) 。陰イオン交換高速液体クロマトグラフィーによる分析プロファイルを図 1 B に示す。

10

【 0 1 2 4 】

M A L D I T O F M A S S ( n e g a t i v e ) C a l c d . 1 4 3 4 . 3 1 F  
o u n d 1 4 3 4 . 1 2

【 0 1 2 5 】

実施例 29 G A C U G A C U G A C U の混合配列を有する 2' - O - シアノエチル RNA  
A 1 2 量体の合成

20

常法により調整された 2' - O - シアノエチルウリジンがサクシニルリンカーを介して  
導入されているロングアミノアルキルチェーン C P G ( 1 6 μ m o l / g ) を 1 μ m o l 固相  
合成用ソケットに充填されたものを用い、各 4 種類の 2' - O - シアノエチルヌクレオシド  
ホスホロアミダイトユニット ( 化合物 7、14、18、26 ) を 0 . 1 M の無水アセトニ  
トリルの溶液として DNA / RNA 自動合成機 ( A p p l i e d B i o S y s t e m ) に縮合時間 1 0 分間の縮合時間である RNA 合成用プログラムを適用する。

合成終了後、アンモニア水-酢酸アンモニウム ( 1 0 % w t / w t ) 1 m l にて 9 0 分  
間処理して固相担体からのオリゴヌクレオチドの切り出し並びに核酸塩基部の保護基の脱  
保護を行う。その後、酢酸アンモニウムバッファーで適当量希釈し、逆相カラムカートリ  
ッジ並びに陰イオン交換 H P L C を用いて精製する。逆相カラムカートリッジを用いて脱  
塩操作を行い得られたオリゴヌクレオチドを凍結乾燥して標題化合物を得る ( 収率 6 %  
 ) 。陰イオン交換高速液体クロマトグラフィーによる分析プロファイルを図 1 C に示す。

30

【 0 1 2 6 】

M A L D I - T O F M A S S ( n e g a t i v e ) C a l c d . 4 4 2 8 . 8 6 F o  
u n d 4 4 2 8 . 5 5

【 産業上の利用可能性 】

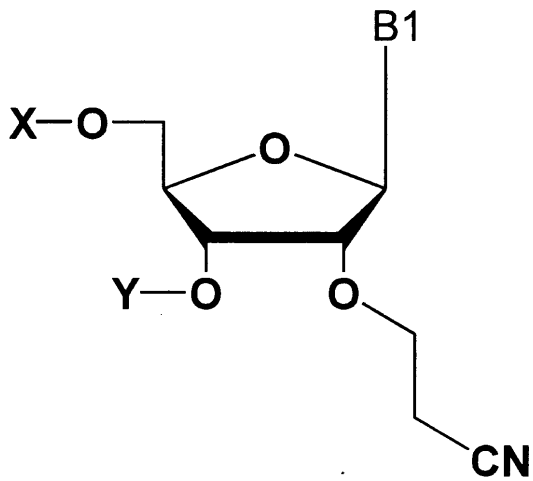
【 0 1 2 7 】

本発明の合成方法で得られる、一般式 ( I ) で表されるヌクレオシドもしくはそのヌク  
レオチド :

40

【 0 1 2 8 】

【化 2 7】



(I)

10

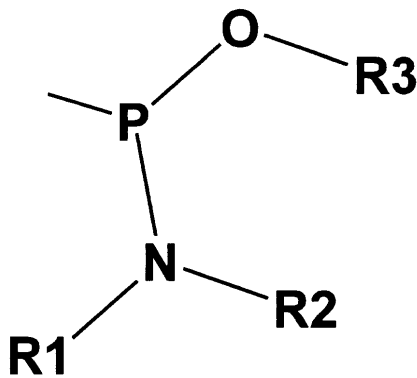
【0129】

20

(式 I 中、X 及び Y は同一または異なって、水素、置換基を有していてもよいシリル基、4 - メトキシトリチル基、4 , 4 ' - ジメトキシトリチル基、又は一般式 ( I I ) :

【0130】

【化 2 8】



(II)

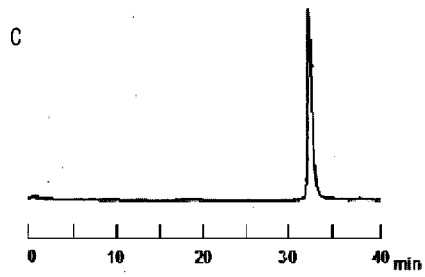
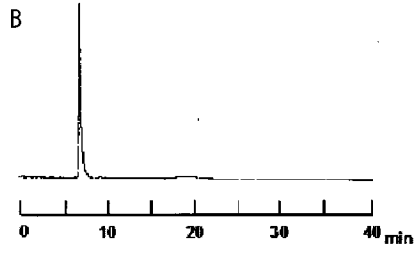
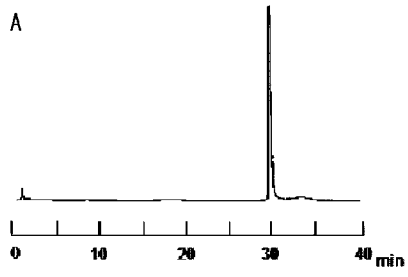
30

【0131】

40

(式 ( I I ) 中、R 1 および R 2 は同一または異なって、炭素数 1 から 7 のアルキル基を表すか、又は、R 1 および R 2 が互いに結合して環構造を形成し、R 3 はリン酸の保護基を表す) を表し、B 1 は置換基を有していてもよいピリミジン塩基又はプリン塩基を表す。) である修飾 RNA は遺伝子制御のための人工 RNA 分子等として有用である。

【 図 1 】



## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2005/003459
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl <sup>7</sup> C07H19/067, 19/167		
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) Int.Cl <sup>7</sup> C07H19/067, 19/167		
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 1996-2005 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2005 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2005		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), EMBASE (STN), REGISTRY (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MONIA, Brett. P. et al., 'Antisense modulation of phosphorylase kinase alpha 1 expression', WO 2002/020546 A1 (abstract, RN403861-16-5), CAPLUS[online] [retrieved on 19 April, 2005 (19.04.05)], Retrieved from CAPLUS Accession no. 2002:185142, CA Accession no.136:257259.	1
A	MARTIN, von Pierre, Ein neuer Zugang zu 2', -O- Alkylribonucleosiden und Eigenschaften deren Oligonucleotide. Helvetica. Chimica. Acta., 1995, Vol.78, pages 486, 504	1-16
A	GROTLI, Morten et al., 2'-O-(Carbamoylmethyl) oligoribonucleotides., Tetrahedron, 1999, Vol.55, pages 4299, 4314	1-16
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 22 April, 2005 (22.04.05)		Date of mailing of the international search report 17 May, 2005 (17.05.05)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/003459

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BEETS, M.G.J. et al., Macrocyclic oxalactones. Rev.trav.chim., 1953, Vol.72, pages 411 to 418	1-16



国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2005/003459	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. <sup>7</sup> C07H19/067, 19/167			
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. <sup>7</sup> C07H19/067, 19/167			
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 1971-2005年 日本国実用新案登録公報 1996-2005年 日本国登録実用新案公報 1994-2005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 (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), EMBASE (STN), 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 請求の範囲の番号	
X	MONIA, Brett. P. et al., ' Antisense modulation of phosphorylase kinase alpha 1 expression', WO 2002/020546 A1 (abstract, RN 403861-16-5) CAPLUS [online] [retrieved on 19 April 2005] Retrieved from CAPLUS Accession no. 2002:185142, CA Accession no. 136:257259.	1	
A	MARTIN, von Pierre, Ein neuer Zugang zu 2'-O-Alkylribonucleosiden und Eigenschaften deren Oligonucleotide. Helvetica Chimica Acta, 1995, Vol. 78, pages 486	1-16	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー		の日の後に公表された文献	
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの		「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの	
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの		「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの	
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)		「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの	
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」同一パテントファミリー文献	
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願			
国際調査を完了した日 22.04.2005		国際調査報告の発送日 17.5.2005	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JJP) 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) 渡辺 仁	4C 3544
		電話番号 03-358.1-1101 内線	3452

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2005/003459

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 請求の範囲の番号
	and 504	
A	GROTLI, Morten et al., 2'-O-(Carbamoylmethyl)oligoribonucleotides. Tetrahedron, 1999, Vol. 55, pages 4299 and 4314	1-16
A	BEETS, M. G. J. et al., Macrocyclic oxalactones. Rev. trav. chim., 1953, Vol. 72, pages 411 and 418	1-16

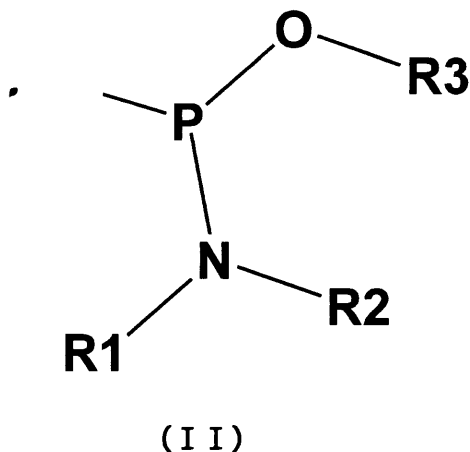
フロントページの続き

(51) Int. Cl. F I テーマコード(参考)  
**C 0 7 F 7/18 (2006.01)** C 0 7 F 7/18 X

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

Fターム(参考) 4H049 VN01 VP02 VQ88 VR22 VR42 VS88  
 4H050 AA01 AA02 AA03 AB84 BB12 BB21 BB31 BB61 WA17 WA23

【要約の続き】



(式(I I)中、R1およびR2は同一または異なって、炭素数1から7のアルキル基を表すか、又は、R1およびR2が互いに結合して環構造を形成し、R3はリン酸の保護基を表す)を表し、B1は置換基を有していてもよいピリミジン塩基又はプリン塩基を表す。)に関する。

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