

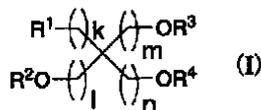


## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

下記式 ( I ) で表されるヌクレオシド類似体またはその塩。

## 【化 1】



前記式 ( I ) 中、 $\text{R}^1$  は、下記式 ( 1 ) の基、下記式 ( 1 ) の基において、その官能基が保護基で保護された基、下記式 ( 2 ) の基、下記式 ( 2 ) の基において、その官能基が保護基で保護された基、下記式 ( 3 ) の基、下記式 ( 3 ) の基において、その官能基が保護基で保護された基、下記式 ( 4 ) の基、下記式 ( 4 ) の基において、その官能基が保護基で保護された基、下記式 ( 5 ) の基、下記式 ( 5 ) の基において、その官能基が保護基で保護された基、下記式 ( 6 ) の基、下記式 ( 6 ) の基において、その官能基が保護基で保護された基、下記式 ( 7 ) の基、下記式 ( 7 ) の基において、その官能基が保護基で保護された基、下記式 ( 8 ) の基、および下記式 ( 8 ) の基において、その官能基が保護基で保護された基からなる群から選択されるいずれかの基であり、

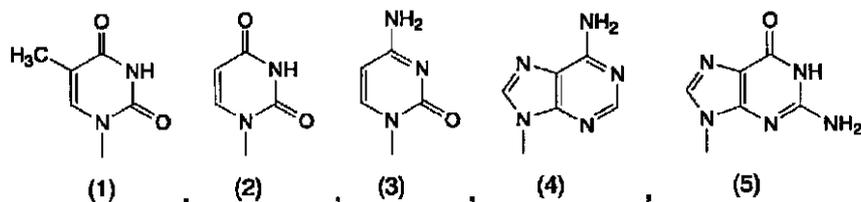
$\text{R}^2$  は、H または保護基であり、

$\text{R}^3$  は、H または保護基であり、

$\text{R}^4$  は、H または固相合成用活性化リン酸基であり、

$k$ 、 $l$ 、 $m$  および  $n$  は、互いに独立して、1 ~ 10 の整数である。

## 【化 2】



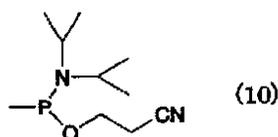
## 【請求項 2】

$\text{R}^2$  が、H、4,4'-ジメトキシトリチル (DMTr)、tert-ブチルジメチルシリル (TBDMS)、4-モノメトキシトリチル (MMTr)、tert-ブチルジフェニルシリル (TBDPS) または (9-フェニル)キサンテン-9-イルであり、

$\text{R}^3$  が、H、4,4'-ジメトキシトリチル (DMTr)、tert-ブチルジメチルシリル (TBDMS)、4-モノメトキシトリチル (MMTr)、tert-ブチルジフェニルシリル (TBDPS) または (9-フェニル)キサンテン-9-イルであり、

$\text{R}^4$  が、H または下記式 ( 10 ) で表される基である請求項 1 に記載のヌクレオシド類似体またはその塩。

## 【化 3】



10

20

30

40

50

## 【請求項 3】

前記式 ( I ) において、 $R^1$  が、前記式 ( 1 ) の基、前記式 ( 2 ) の基、前記式 ( 3 ) の基、前記式 ( 4 ) の基、前記式 ( 5 ) の基、前記式 ( 6 ) の基、前記式 ( 7 ) の基および前記式 ( 8 ) の基からなる群から選択されるいずれかの基であり、 $k$ 、 $l$ 、 $m$  および  $n$  が、1 である請求項 1 に記載のヌクレオシド類似体またはその塩。

## 【請求項 4】

$R^1$  が前記式 ( 1 ) の基であり、 $R^2$ 、 $R^3$  および  $R^4$  が H である前記式 ( I ) で表されるヌクレオシド類似体、

$R^1$  が前記式 ( 2 ) の基であり、 $R^2$ 、 $R^3$  および  $R^4$  が H である前記式 ( I ) で表されるヌクレオシド類似体、

$R^1$  が前記式 ( 3 ) の基であり、 $R^2$ 、 $R^3$  および  $R^4$  が H である前記式 ( I ) で表されるヌクレオシド類似体、

$R^1$  が前記式 ( 4 ) の基であり、 $R^2$ 、 $R^3$  および  $R^4$  が H である前記式 ( I ) で表されるヌクレオシド類似体、

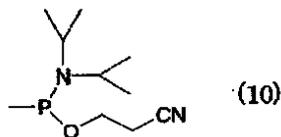
$R^1$  が前記式 ( 5 ) の基であり、 $R^2$ 、 $R^3$  および  $R^4$  が H である前記式 ( I ) で表されるヌクレオシド類似体、

$R^1$  が前記式 ( 6 ) の基であり、 $R^2$ 、 $R^3$  および  $R^4$  が H である前記式 ( I ) で表されるヌクレオシド類似体、

$R^1$  が前記式 ( 7 ) の基であり、 $R^2$ 、 $R^3$  および  $R^4$  が H である前記式 ( I ) で表されるヌクレオシド類似体、および

$R^1$  が前記式 ( 7 ) の基において、その官能基がベンゾイルで保護された基であり、 $R^2$  が 4, 4'-ジメトキシトリチル (DMTr) であり、 $R^3$  が、tert-ブチルジフェニルシリル (TBDPS) であり、 $R^4$  が、下記式 ( 10 ) で表される基である前記式 ( I ) で表されるヌクレオシド類似体からなる群から選択される請求項 1 に記載のヌクレオシド類似体。

## 【化 4】



## 【請求項 5】

オリゴヌクレオチドを構成する 1 以上のヌクレオシドが、ヌクレオシド類似体でそれぞれ置き換えられているオリゴヌクレオチド類似体であって、

前記ヌクレオシド類似体が、前記式 ( I ) 中、 $R^1$  が、前記式 ( 1 ) の基、前記式 ( 2 ) の基、前記式 ( 3 ) の基、前記式 ( 4 ) の基、前記式 ( 5 ) の基、前記式 ( 6 ) の基、前記式 ( 7 ) の基および前記式 ( 8 ) の基からなる群から選択されるいずれかの基であり、 $R^2$ 、 $R^3$  および  $R^4$  が H である請求項 1 に記載のヌクレオシド類似体であるオリゴヌクレオチド類似体。

## 【請求項 6】

前記オリゴヌクレオチド類似体が、一本鎖オリゴヌクレオチドである請求項 5 に記載のオリゴヌクレオチド類似体。

## 【請求項 7】

前記オリゴヌクレオチド類似体が、二本鎖形成能を有する請求項 5 に記載のオリゴヌクレオチド類似体。

## 【請求項 8】

前記オリゴヌクレオチド類似体が、ヌクレアーゼ耐性である請求項 5 に記載のオリゴヌクレオチド類似体。

## 【請求項 9】

オリゴヌクレオチドを含む遺伝子発現抑制剤であって、前記オリゴヌクレオチドが、請

10

20

30

40

50

求項 5 に記載のオリゴヌクレオチド類似体である遺伝子発現抑制剤。

【請求項 10】

遺伝子発現に伴う疾患を治療するための医薬組成物であって、前記医薬組成物が、請求項 9 に記載の遺伝子発現抑制剤を含む医薬組成物。

【請求項 11】

請求項 5 に記載のオリゴヌクレオチド類似体を含む検査キットであって、前記オリゴヌクレオチド類似体が、検体中の遺伝子とハイブリッド形成することにより、前記遺伝子が検査されるキット。

【請求項 12】

オリゴヌクレオチドを用いて遺伝子発現を抑制する方法であって、前記オリゴヌクレオチドが、請求項 5 に記載のオリゴヌクレオチド類似体である方法。

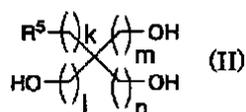
10

【請求項 13】

前記式 (I) 中、 $R^1$  が、前記式 (1) の基、前記式 (1) の基において、その官能基が保護基で保護された基、前記式 (2) の基、前記式 (2) の基において、その官能基が保護基で保護された基、前記式 (3) の基、前記式 (3) の基において、その官能基が保護基で保護された基、前記式 (4) の基、前記式 (4) の基において、その官能基が保護基で保護された基、前記式 (5) の基において、その官能基が保護基で保護された基、前記式 (6) の基、前記式 (6) の基において、その官能基が保護基で保護された基、前記式 (7) の基、前記式 (7) の基において、その官能基が保護基で保護された基、前記式 (8) の基、および前記式 (8) の基において、その官能基が保護基で保護された基からなる群から選択されるいずれかの基であり、 $R^2$ 、 $R^3$  および  $R^4$  が H であり、下記式 (II) で表される請求項 1 に記載のヌクレオシド類似体またはその塩の製造方法であって、

20

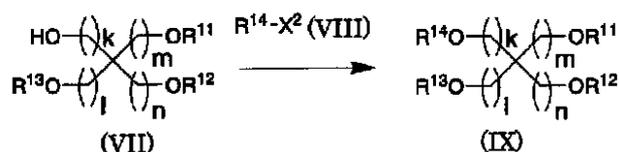
【化 5】



下記式 (VII) で表される化合物と、下記式 (VIII) で表される化合物とを反応させ、下記式 (IX) で表される化合物を得、

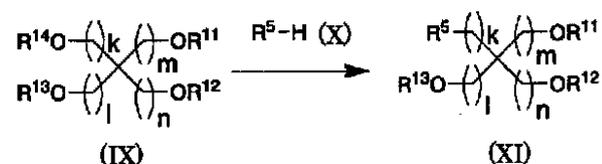
30

【化 6】



前記式 (IX) で表される化合物と、下記式 (X) で表される化合物とを、塩基存在下に縮合させ、下記式 (XI) で表される化合物を得、

【化 7】



40

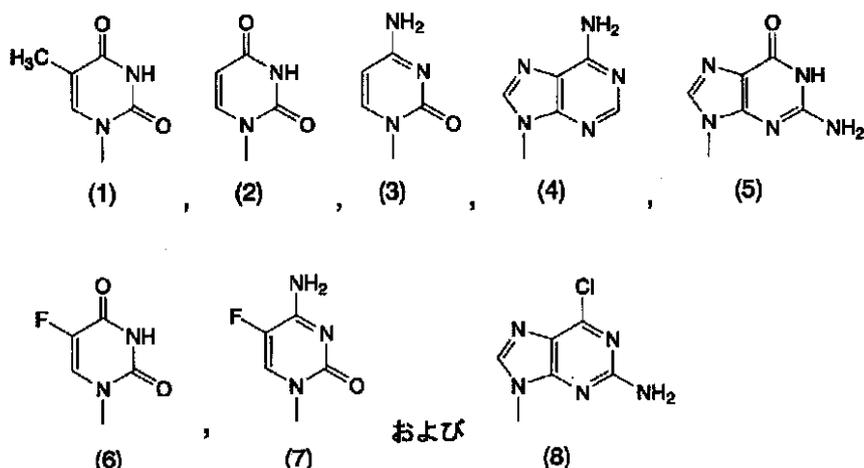
前記式 (XI) で表される化合物の、 $R^{11}$ 、 $R^{12}$  および  $R^{13}$  を除去することにより、式 (II) で表されるヌクレオシド類似体またはその塩を得る製造方法。

前記式中、 $R^5$  は、下記式 (1) の基、下記式 (1) の基において、その官能基が保護基で保護された基、下記式 (2) の基、下記式 (2) の基において、その官能基が保護基で保護された基、下記式 (3) の基、下記式 (3) の基において、その官能基が保護基で保護された基、下記式 (4) の基、下記式 (4) の基において、その官能基が保護基で保護

50

された基、前記式(5)の基において、その官能基が保護基で保護された基、下記式(6)の基、下記式(6)の基において、その官能基が保護基で保護された基、下記式(7)の基、下記式(7)の基、下記式(8)の基、および下記式(8)の基において、その官能基が保護基で保護された基からなる群から選択されるいずれかの基であり、

【化8】



10

$R^{11}$  は、保護基であり、

$R^{12}$  および  $R^{13}$  は、一緒になって、式  $-CR^{15}R^{16}-$  で表される基であり、

前記  $R^{15}$  および  $R^{16}$  は、互いに独立して、水素原子、低級アルキル基および低級アルコキシル基からなる群から選択されるいずれかであり、

$R^{14}$  は、式  $-SO_2-R^{17}$  で表される基であり、

前記  $R^{17}$  は、低級アルキルで置換されていてもよいアリール基であり、

$X^2$  は、互いに独立して、ハロゲン原子であり、

$k$ 、 $l$ 、 $m$  および  $n$  は、互いに独立して、1~10の整数である。

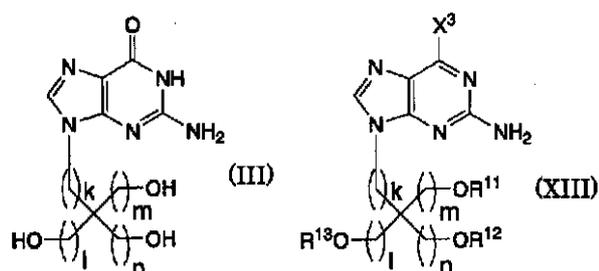
20

【請求項14】

前記式(I)中、 $R^1$  が、前記式(5)の基であり、 $R^2$ 、 $R^3$  および  $R^4$  が H であり、下記式(III)で表される請求項1に記載のヌクレオシド類似体またはその塩の製造方法であって、

30

【化9】



前記式(XIII)で表される化合物の、 $R^{11}$ 、 $R^{12}$  および  $R^{13}$  を除去すること、および加水分解により、式(III)で表されるヌクレオシド類似体またはその塩を得る製造方法。

40

前記式中、 $R^{11}$  は、保護基であり、

$R^{12}$  および  $R^{13}$  は、一緒になって、式  $-CR^{15}R^{16}-$  で表される基であり、

前記  $R^{15}$  および  $R^{16}$  は、互いに独立して、水素原子、低級アルキル基および低級アルコキシル基からなる群から選択されるいずれかであり、

$X^3$  は、ハロゲン原子であり、

$k$ 、 $l$ 、 $m$  および  $n$  は、互いに独立して、1~10の整数である。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

50

## 【0001】

本発明は、ヌクレオシド類似体またはその塩に関するものである。

## 【背景技術】

## 【0002】

近年、遺伝情報そのものを治療の対象としてとらえるという方法論が普及しつつある。この方法論の一つに、オリゴヌクレオチドを用いたアンチセンス法がある。アンチセンス法とは、化学合成したオリゴヌクレオチド類似体（例えば、15～20の塩基対から成る一本鎖DNA）を細胞に加え、標的メッセンジャーRNA（mRNA）とDNA等/mRNA二本鎖核酸を形成させることにより、標的遺伝子の発現を塩基配列特異的に抑制し、mRNAからタンパク質への翻訳過程を阻害する方法である。アンチセンス法では、病因となるウイルスまたは遺伝子の塩基配列が既知の場合、アンチセンス分子を理論的に設計し、それを合成するのが可能であることから、これまで治療が困難と考えられてきた様々なウイルスを原因とする疾患および遺伝子疾患に対する有効な治療方法の一つとして期待されている。

10

## 【0003】

また、ごく最近、オリゴヌクレオチドを用いた遺伝子発現抑制法として、RNAi（RNA interference、RNA干渉）を利用した方法に、注目が集まっている。このRNAiとは、二本鎖RNAを細胞に導入することにより、同じ塩基配列を有する細胞の染色体由来のRNAが分解され、切断される現象を指す。このRNAiの機構は、現在のところ、次のように考えられている。まず、長鎖二本鎖RNAが、酵素（Dicerと呼ばれる）により3'-UU型のダングリングエンド構造を持つ21塩基程度の長さの二本鎖RNA（siRNA（short interfering RNA）と呼ばれる）に加水分解される。そのsiRNAが、標的mRNAとRNA/mRNA二本鎖核酸を形成し、この二本鎖核酸を認識する細胞内タンパク質（RISC（RNA-induced Silencing Complex）と呼ばれる）と、この二本鎖核酸とが結合し、この結合体により、標的mRNAが切断されるというものである。このRNAiを利用する方法によると、多くの場合、アンチセンス法と比較して1/100程度の濃度のRNAを用いて同等の効果が得られている。従って、RNAiを利用する方法も、これまで治療が困難と考えられてきた様々なウイルスを原因とする疾患および遺伝子疾患に対する有効な治療方法の一つとして期待が高まっている。

20

30

## 【0004】

アンチセンス法、RNAiを利用する方法等に用いるのには、天然型オリゴヌクレオチドに含まれるリボース環を含むオリゴヌクレオチド類似体は、化学的、生物学的に非常に不安定であるという問題があった（例えば、非特許文献1参照）。一方、アンチセンス法、RNAiを利用する方法等で用いられるためには、天然型オリゴヌクレオチドとの二本鎖形成能力も要求されるが、化学的、生物学的に安定なオリゴヌクレオチド類似体は、通常、この二本鎖形成能力が低いという問題があった（例えば、非特許文献2参照）。このように、化学的、生物学的に安定という特性と、優れた二本鎖形成能力という特性は、両立するのが困難であるという問題があった。しかし、DNAチップ、遺伝子診断薬等にオリゴヌクレオチド類似体を用いる場合、安定した診断結果を得るためにも、これらの特性が優れたオリゴヌクレオチド類似体の提供が望まれていた。

40

【非特許文献1】Eugen Uhlmann and Anusch Peyman, Antisense oligonucleotides: a new therapeutic principle, Chemical Reviews, 1990年、第90巻、p. 543.

【非特許文献2】Jin yan Tang, Jamal Temsamani and Sudhir Agrawal, Self-stabilized antisense oligonucleotide phosphorothioates: properties and anti-HIV activity, Nucleic Acids Research, 1993年、第21巻、p. 2729.

50

## 【発明の開示】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0005】

そこで、本発明は、化学的、生物的安定性および二本鎖形成能の2つの特性が優れたオリゴヌクレオチド類似体を製造可能にするヌクレオシド類似体およびそのヌクレオシド類似体を含むオリゴヌクレオチド類似体の提供を目的とする。

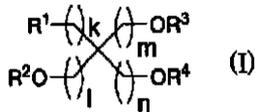
## 【課題を解決するための手段】

## 【0006】

本発明は、下記式(I)で表されるヌクレオシド類似体またはその塩である。

## 【0007】

## 【化10】



## 【0008】

前記式(I)中、R<sup>1</sup>は、下記式(1)の基、下記式(1)の基において、その官能基が保護基で保護された基、下記式(2)の基、下記式(2)の基において、その官能基が保護基で保護された基、下記式(3)の基、下記式(3)の基において、その官能基が保護基で保護された基、下記式(4)の基、下記式(4)の基において、その官能基が保護基で保護された基、下記式(5)の基、下記式(5)の基において、その官能基が保護基で保護された基、下記式(6)の基、下記式(6)の基において、その官能基が保護基で保護された基、下記式(7)の基、下記式(7)の基において、その官能基が保護基で保護された基、下記式(8)の基、および下記式(8)の基において、その官能基が保護基で保護された基からなる群から選択されるいずれかの基であり、

R<sup>2</sup>は、Hまたは保護基であり、

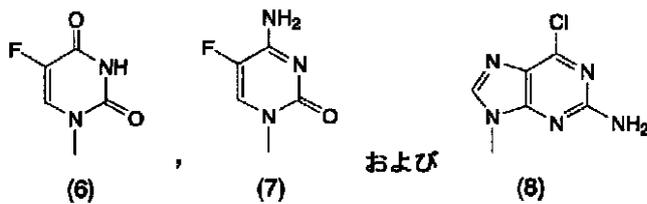
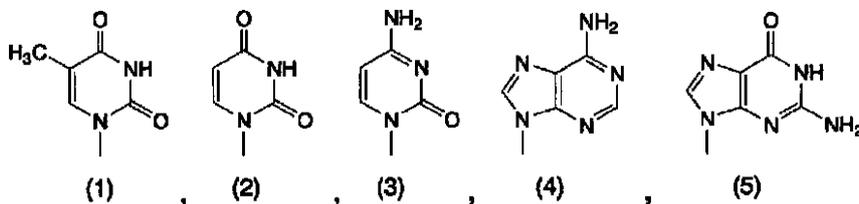
R<sup>3</sup>は、Hまたは保護基であり、

R<sup>4</sup>は、Hまたは固相合成用活性化リン酸基であり、

k、l、mおよびnは、互いに独立して、1~10の整数である。

## 【0009】

## 【化11】



## 【発明の効果】

## 【0010】

本発明は、従来にはない新規な化学構造を設計し、かつその化学構造を有するヌクレオシド類似体の製造に成功したことに基づき、完成したものである。本発明は、このヌクレ

10

20

30

40

50

オシド類似体により、ヌクレアーゼ耐性および二本鎖形成能の2つの特性が優れたオリゴヌクレオチド類似体を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】図1は、本発明のオリゴヌクレオチド類似体の一例と、比較例のオリゴヌクレオチドの一例のヌクレアーゼ耐性を示す図である。Lane 1：天然型0 min, Lane 2：天然型5 min, Lane 3：天然型10 min, Lane 4：天然型15 min, Lane 5：天然型30 min, Lane 6：修飾型0 min, Lane 7：修飾型5 min, Lane 8：修飾型10 min, Lane 9：修飾型15 min, Lane 10：修飾型30 min。

10

【発明を実施するための最良の形態】

【0012】

本発明において、「オリゴヌクレオチド」は、例えばヌクレオシドサブユニットのポリマーをいい、そのサブユニット数は特に限定されないが、例えば、3から100個である。中でも、本発明のヌクレオチド類似体がDNAである場合には、それらのサブユニット数は、3～100個が好ましく、3～30個がより好ましく、RNAである場合には、3～50個が好ましく、3～30個がより好ましい。なお、本発明における「オリゴヌクレオチド類似体」は、ヌクレオシドが、本発明のヌクレオシド類似体で置き換えられていること以外は、特に限定されない。例えば、本発明のヌクレオシド類似体以外のヌクレオシドについては、糖部および塩基部分は、当業者に公知な類似体であってもよい。

20

【0013】

本発明において、 $R^1$  について、官能基が保護されている保護基とは、核酸化学において公知な保護基から選択される。例えば、ベンゾイル(Bz)、イソブチリル(iBu)、フェノキシアセチル(Pac)、アリルオキシカルボニル(AOC)、N,N-ジメチルアミノメチレン、アセチル(Ac)等が、その保護基として用いられうる。

【0014】

本発明において、 $R^2$  および  $R^3$  について前記保護基とは、従来公知の1級アルコールの保護基を用いることができる。そのような保護基としては、例えば、4,4'-ジメトキシトリチル(DMTri)、tert-ブチルジメチルシリル(TBDMS)、4-モノメトキシトリチル(MMTri)、tert-ブチルジフェニルシリル(TBDPS)、(9-フェニル)キサンテン-9-イル[ピキシル(pixel)]等が、挙げられる。

30

【0015】

本発明において、前記  $R^1$ 、 $R^2$  および  $R^3$  について前記保護基とは、本発明のヌクレオシド類似体を用いて、最終的にオリゴヌクレオチド類似体を製造するための条件を考慮して、適宜選択することができる。例えば、前記オリゴヌクレオチド類似体を製造する際、最終的な保護基の除去の条件に応じて、 $R^1$ 、 $R^2$  および  $R^3$  を、適宜、選択したヌクレオシド類似体を用いてもよい。

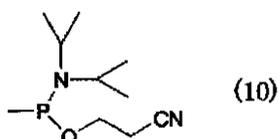
【0016】

本発明において、 $R^4$  について、前記固相合成用活性化リン酸基としては、固相合成において従来公知のリン酸基を用いることができ、例えば、ホスホロアミダイト、ホスホナート、チオホスファイト等を形成するリン酸基が挙げられる。ホスホロアミダイトを形成する、固相合成用活性化リン酸基としては、例えば、下記式(10)で表される基が挙げられる。

40

【0017】

【化12】



50

## 【0018】

本発明において、その塩とは、例えば無機塩基との塩、有機塩基との塩、無機酸との塩、有機酸との塩等などが挙げられる。無機塩基との塩の例としては、例えばナトリウム塩、カリウム塩などのアルカリ金属塩；カルシウム塩、マグネシウム塩などのアルカリ土類金属塩；ならびにアルミニウム塩、アンモニウム塩などが挙げられる。有機塩基との塩の例としては、例えばトリメチルアミン、トリエチルアミン、ピリジン、ピコリン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、ジシクロヘキシルアミン、N, N' - ジベンジルエチレンジアミンなどとの塩が挙げられる。無機酸との塩の例としては、例えば塩酸、臭化水素酸、硝酸、硫酸、リン酸などとの塩が挙げられる。有機酸との塩の例としては、例えばギ酸、酢酸、トリフルオロ酢酸、フマル酸、シュウ酸、酒石酸、マレイン酸、クエン酸、コハク酸、リンゴ酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、p - トルエンスルホン酸などとの塩が挙げられる。本発明において、その塩とは、薬理的に許容される塩が好ましい。

10

## 【0019】

本発明において、k、l、mおよびnは、互いに独立して1～10の整数であり、好ましくは1～6の整数である。k、l、mおよびnは、同一または異なってもよい。

## 【0020】

本発明の式(I)で表わされるヌクレオシド類似体またはその塩は、R<sup>2</sup>が、H、4, 4' - ジメトキシトリチル(DMTTr)、tert - ブチルジメチルシリル(TBDMS)、4 - モノメトキシトリチル(MMTTr)、tert - ブチルジフェニルシリル(TBDPS)または(9 - フェニル)キサンテン - 9 - イルであり、

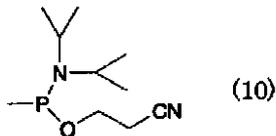
20

R<sup>3</sup>が、H、4, 4' - ジメトキシトリチル(DMTTr)、tert - ブチルジメチルシリル(TBDMS)、4 - モノメトキシトリチル(MMTTr)、tert - ブチルジフェニルシリル(TBDPS)または(9 - フェニル)キサンテン - 9 - イルであり、

R<sup>4</sup>が、Hまたは下記式(10)で表される基であるのが好ましい。

## 【0021】

## 【化13】



30

## 【0022】

また、本発明の式(I)で表されるヌクレオシド類似体またはその塩は、前記式(I)において、R<sup>1</sup>が、前記式(1)の基、前記式(2)の基、前記式(3)の基、前記式(4)の基、前記式(5)の基、前記式(6)の基、前記式(7)の基および前記式(8)の基からなる群から選択されるいずれかの基であり、k、l、mおよびnが、1であるのが好ましい。

## 【0023】

また、本発明の式(I)で表わされるヌクレオシド類似体またはその塩は、R<sup>1</sup>が前記式(1)の基であり、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>およびR<sup>4</sup>がHである前記式(I)で表されるヌクレオシド類似体、

40

R<sup>1</sup>が前記式(2)の基であり、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>およびR<sup>4</sup>がHである前記式(I)で表されるヌクレオシド類似体、

R<sup>1</sup>が前記式(3)の基であり、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>およびR<sup>4</sup>がHである前記式(I)で表されるヌクレオシド類似体、

R<sup>1</sup>が前記式(4)の基であり、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>およびR<sup>4</sup>がHである前記式(I)で表されるヌクレオシド類似体、

R<sup>1</sup>が前記式(5)の基であり、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>およびR<sup>4</sup>がHである前記式(I)で表されるヌクレオシド類似体、

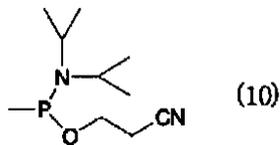
50

$R^1$  が前記式 (6) の基であり、 $R^2$ 、 $R^3$  および  $R^4$  が H である前記式 (I) で表されるヌクレオシド類似体、

$R^1$  が前記式 (7) の基であり、 $R^2$ 、 $R^3$  および  $R^4$  が H である前記式 (I) で表されるヌクレオシド類似体、または

$R^1$  が前記式 (7) の基において、その官能基がベンゾイルで保護された基であり、 $R^2$  が 4, 4'-ジメトキシトリチル (DMTr) であり、 $R^3$  が、tert-ブチルジフェニルシリル (TBDPS) であり、 $R^4$  が、下記式 (10) で表される基である前記式 (I) で表されるヌクレオシド類似体が、より好ましい。

【化 14】



10

【0024】

なお、本発明のヌクレオシド類似体またはその塩は、本発明のオリゴヌクレオチド類似体の製造用に限定されず、他の用途にも適用可能である。

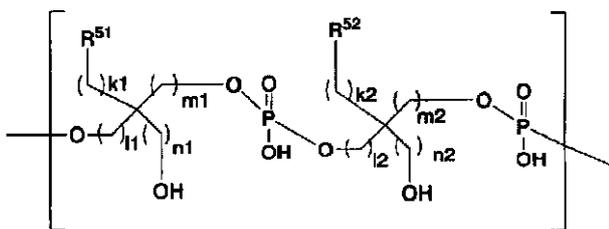
【0025】

本発明のオリゴヌクレオチド類似体は、オリゴヌクレオチドを構成する 1 以上のヌクレオシドが、ヌクレオシド類似体でそれぞれ置き換えられているオリゴヌクレオチド類似体であって、前記ヌクレオシド類似体が、前記式 (I) 中、 $R^1$  が、前記式 (1) の基、前記式 (2) の基、前記式 (3) の基、前記式 (4) の基、前記式 (5) の基、前記式 (6) の基、前記式 (7) の基および前記式 (8) の基からなる群から選択されるいずれかの基であり、 $R^2$ 、 $R^3$  および  $R^4$  が H である本発明のヌクレオシド類似体である。例えば、オリゴヌクレオチドを構成するヌクレオシドの全てが、前記ヌクレオシド類似体で置き換えられているオリゴヌクレオチド類似体は、以下の式で表される。

20

【0026】

【化 15】



30

【0027】

前記式中、 $R^{51}$  および  $R^{52}$  は、互いに独立して、前記式 (1) の基、前記式 (2) の基、前記式 (3) の基、前記式 (4) の基、前記式 (5) の基、前記式 (6) の基、前記式 (7) の基および前記式 (8) の基からなる群から選択されるいずれかの基であり、 $k_1$ 、 $k_2$ 、 $l_1$ 、 $l_2$ 、 $m_1$ 、 $m_2$ 、 $n_1$  および  $n_2$  は、互いに独立して、1 ~ 10 の整数である。

40

【0028】

本発明のオリゴヌクレオチド類似体は、一本鎖オリゴヌクレオチド、二本鎖オリゴヌクレオチド等であってもよい。オリゴヌクレオチド類似体が、二本鎖である場合、前記二本鎖オリゴヌクレオチドの一方または両方の一本鎖オリゴヌクレオチドを構成する 1 以上のヌクレオシドが、前記式 (I) 中、 $R^1$  が、前記式 (1) の基、前記式 (2) の基、前記式 (3) の基、前記式 (4) の基、前記式 (5) の基、前記式 (6) の基、前記式 (7) の基および前記式 (8) の基からなる群から選択されるいずれかの基であり、 $R^2$ 、 $R^3$  および  $R^4$  が H であるヌクレオシド類似体であってもよい。

50

## 【 0 0 2 9 】

オリゴヌクレオチド類似体が一本鎖である場合、本発明のオリゴヌクレオチド類似体は、二本鎖形成能を有するのが好ましい。本発明のオリゴヌクレオチド類似体が、天然型オリゴヌクレオチドと二本鎖形成能を有すれば、アンチセンス、遺伝子検出等のため用いることができるからである。

## 【 0 0 3 0 】

本発明のオリゴヌクレオチド類似体は、ヌクレアーゼ耐性であるのが好ましい。本発明のオリゴヌクレオチド類似体が、細胞内に取り込まれた際、ヌクレアーゼで分解されるのを防ぐことができ、その結果、オリゴヌクレオチド類似体の細胞内での活性を、持続させることが可能だからである。

10

## 【 0 0 3 1 】

本発明の遺伝子発現抑制剤は、本発明のオリゴヌクレオチド類似体を含む。このような遺伝子発現抑制剤は、オリゴヌクレオチド類似体が、例えば、*siRNA* やアンチセンスとして作用し、標的遺伝子の *mRNA* を切断したり、標的遺伝子の *mRNA* と二本鎖を形成等して、その結果、遺伝子発現を抑制することができる。

## 【 0 0 3 2 】

本発明の医薬組成物は、遺伝子発現に伴う疾患を治療するためであり、前記遺伝子発現抑制剤を含むものである。遺伝子発現に伴う疾患、例えば、あるタンパク質が発現されることにより疾患が引き起こされる場合、この医薬組成物により、その遺伝子発現を抑制し、その遺伝子発現に伴う疾患を治療するのに用いることが可能である。

20

## 【 0 0 3 3 】

本発明の検査キットは、本発明のオリゴヌクレオチド類似体を含み、前記オリゴヌクレオチド類似体が、検体中の遺伝子とハイブリッド形成することにより、前記遺伝子が検査されるキットである。このようなキットとしては、例えば、*DNA*チップ、*DNA*マイクロアレイ等が挙げられる。このキットには、本発明のオリゴヌクレオチド類似体の他に、ウェルとオリゴヌクレオチド類似体等とが固定されたプレート、ファイバー、バイオチップ等の固定化担体等が挙げられる。このようなキットには、前記オリゴヌクレオチド類似体等のほかに、例えば、薬物、反応して発色する発色試薬、検出を容易にする検出試薬等を含んでもよい。

## 【 0 0 3 4 】

*DNA*チップとしては、一般に、ガラス基板上に既知遺伝子配列を用いた本発明のオリゴヌクレオチド類似体を含む溶液をスポットして固定化したものや、ガラス基板上で本発明のオリゴヌクレオチド類似体を合成することによって固定化したもの等がある。前記 *DNA*チップは、例えば、検体中の遺伝子を、前記オリゴヌクレオチド類似体を固定化した分析部にアプライし、前記遺伝子と基板上的オリゴヌクレオチド類似体とのハイブリッド形成を、例えば、蛍光色素等により検出することによって、目的遺伝子の発現の有無を検出できる。このような *DNA*チップによれば、例えば、少量の試料でも有効に分析が可能であり、また、多種の *DNA*プローブを一つの基板に固定化できるため、一つの *DNA*チップにおいて同一検体につき、多項目の分析を行うことができる。

30

## 【 0 0 3 5 】

本発明の遺伝子発現抑制方法は、オリゴヌクレオチド類似体を用いて、遺伝子の発現を抑制する方法である。この方法では、オリゴヌクレオチド類似体が、例えば、*siRNA* やアンチセンスとして作用し、標的遺伝子の *mRNA* を切断したり、標的遺伝子の *mRNA* と二本鎖を形成等して、その結果、遺伝子発現を抑制することができる。

40

## 【 0 0 3 6 】

次に、本発明のヌクレオシド類似体を製造するための製造方法について、例を挙げて説明する。このような製造方法により、従来にはない化学構造を有する、本発明のヌクレオシド類似体の製造が可能になった。

## 【 0 0 3 7 】

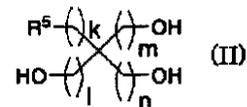
まず、前記式 ( I ) 中、 $R^1$  が、前記式 ( 1 ) の基、前記式 ( 1 ) の基において、その

50

官能基が保護基で保護された基、前記式(2)の基、前記式(2)の基において、その官能基が保護基で保護された基、前記式(3)の基、前記式(3)の基において、その官能基が保護基で保護された基、前記式(4)の基、前記式(4)の基において、その官能基が保護基で保護された基、前記式(5)の基において、その官能基が保護基で保護された基、前記式(6)の基、前記式(6)の基において、その官能基が保護基で保護された基、前記式(7)の基、前記式(7)の基において、その官能基が保護基で保護された基、前記式(8)の基、および前記式(8)の基において、その官能基が保護基で保護された基からなる群から選択されるいずれかの基であり、 $R^2$ 、 $R^3$ および $R^4$ がHであり、下記式(II)で表されるヌクレオシド類似体またはその塩の製造方法の一例を説明する。

【0038】

【化16】



10

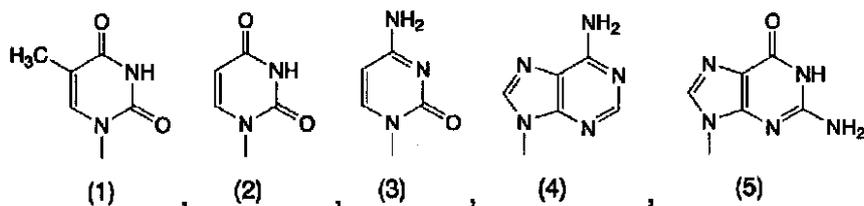
【0039】

前記式(II)中、 $R^5$ は、前記式(1)の基、前記式(1)の基において、その官能基が保護基で保護された基、前記式(2)の基、前記式(2)の基において、その官能基が保護基で保護された基、前記式(3)の基、前記式(3)の基において、その官能基が保護基で保護された基、前記式(4)の基、前記式(4)の基において、その官能基が保護基で保護された基、前記式(5)の基において、その官能基が保護基で保護された基、前記式(6)の基、前記式(6)の基において、その官能基が保護基で保護された基、前記式(7)の基、前記式(7)の基において、その官能基が保護基で保護された基、前記式(8)の基、および前記式(8)の基において、その官能基が保護基で保護された基からなる群から選択されるいずれかの基であり、 $k$ 、 $l$ 、 $m$ および $n$ は、互いに独立して、1~10の整数である。

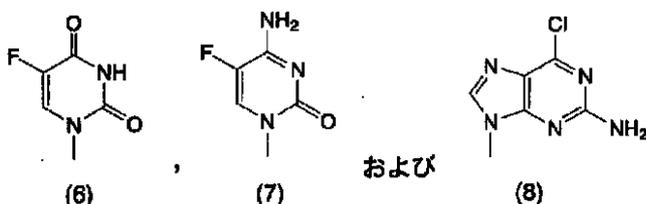
20

【0040】

【化17】



30



40

【0041】

その製造方法を、例えば、以下のスキーム1に示す。その製造方法によれば、例えば、下記式(VII)で表される化合物と、下記式(VIII)で表される化合物とを反応させ、下記式(IX)で表される化合物を得、

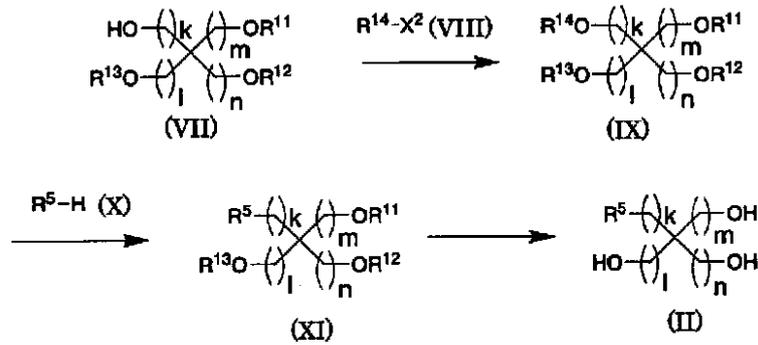
前記式(IX)で表される化合物と、下記式(X)で表される化合物とを、塩基存在下に縮合させ、下記式(XI)で表される化合物を得、

前記式(XI)で表される化合物の、 $R^{11}$ 、 $R^{12}$ および $R^{13}$ を除去することにより、式(II)で表されるヌクレオシド類似体またはその塩を得ることができる。

【0042】

50

## 【化 18】



スキーム 1

10

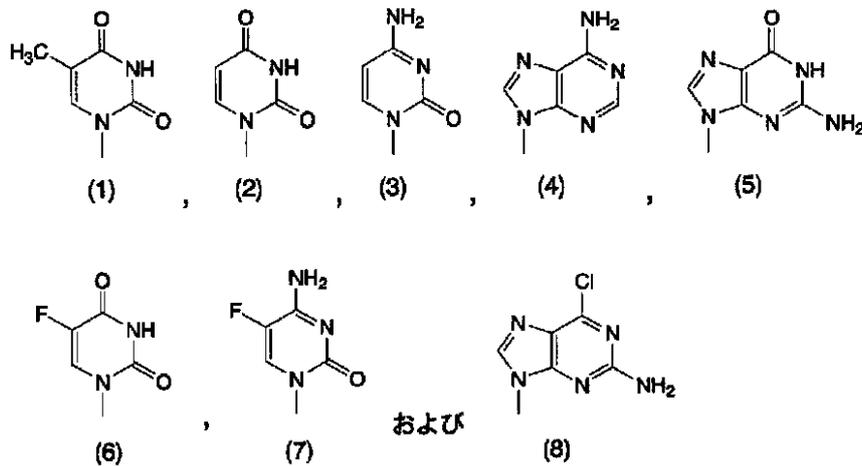
## 【0043】

前記式中、 $R^5$  は、下記式(1)の基、下記式(1)の基において、その官能基が保護基で保護された基、下記式(2)の基、下記式(2)の基において、その官能基が保護基で保護された基、下記式(3)の基、下記式(3)の基において、その官能基が保護基で保護された基、下記式(4)の基、下記式(4)の基において、その官能基が保護基で保護された基、前記式(5)の基において、その官能基が保護基で保護された基、下記式(6)の基、下記式(6)の基において、その官能基が保護基で保護された基、下記式(7)の基、下記式(7)の基、下記式(8)の基、および下記式(8)の基において、その官能基が保護基で保護された基からなる群から選択されるいずれかの基であり、

20

## 【0044】

## 【化 19】



30

## 【0045】

40

$R^{11}$  は、保護基であり、  
 $R^{12}$  および  $R^{13}$  は、一緒になって、式  $-CR^{15}R^{16}-$  で表される基であり、  
 前記  $R^{15}$  および  $R^{16}$  は、互いに独立して、水素原子、低級アルキル基および低級アルコキシル基からなる群から選択されるいずれかであり、  
 $R^{14}$  は、式  $-SO_2-R^{17}$  で表される基であり、  
 前記  $R^{17}$  は、低級アルキルで置換されていてもよいアール基であり、  
 $X^2$  は、ハロゲン原子であり、  
 $k$ 、 $l$ 、 $m$  および  $n$  は、互いに独立して、1~10の整数である。

## 【0046】

本発明において、 $R^{11}$  について前記保護基とは、従来公知の1級アルコールの保護基

50

を用いることができる。そのような保護基としては、例えば、tert-ブチルジフェニルシリル(TBDPS)、tert-ブチルジメチルシリル(TBDMS)、4,4'-ジメトキシトリチル(DMTr)、4-モノメトキシトリチル(MMTr)、(9-フェニル)キサテン-9-イル[ピキシル(pixel)]、アセチル(Ac)、ベンゾイル(Bz)等が、挙げられる。

【0047】

また、本発明において、R<sup>5</sup>について、官能基が保護されている保護基とは、核酸化学において公知な保護基から選択される。例えば、ベンゾイル(Bz)、イソブチリル(iBu)、フェノキシアセチル(Pac)、アリルオキシカルボニル(AOC)、N,N-ジメチルアミノメチレン、アセチル(Ac)等が、その保護基として用いられうる。

10

【0048】

本発明において、R<sup>15</sup>およびR<sup>16</sup>について前記低級アルキル基とは、直鎖状または分岐状のアルキル基であり、例えば1~6の炭素原子を含むものである。前記低級アルキル基の例としては、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル2-エチルブチル、イソブチル、tert-ブチル、ペンチル、n-ヘキシル等が挙げられる。

【0049】

本発明において、R<sup>15</sup>およびR<sup>16</sup>について前記低級アルコキシル基とは、直鎖状または分岐状のアルコキシル基であり、例えば1~6の炭素原子を含むものである。前記低級アルコキシル基の例としては、メトキシ、エトキシ、n-プロピルオキシ、イソプロピルオキシ、n-ブチル2-エチルブチルオキシ、イソブチルオキシ、tert-ブチルオキシ、ペンチルオキシ、n-ヘキシルオキシ等が挙げられる。

20

【0050】

本発明において、式-CR<sup>15</sup>R<sup>16</sup>-で表される基としては、例えば、-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-、-CH(OCH<sub>3</sub>)-等が挙げられる。

【0051】

本発明において、R<sup>17</sup>について前記アリール基とは、芳香族炭化水素残基であり、例えば、6~30の炭素原子を含むものである。前記アリール基の例としては、単環式アリール基、例えば、フェニル等および、縮合多環式アリール基、例えば、ナフチル、インデニル、フルオレニル等が挙げられる。

【0052】

本発明において、R<sup>17</sup>について、低級アルキルで置換されていてもよいアリール基としては、例えば、前記低級アルキルの1~5で置換されているアリール基が挙げられる。その具体例としては、例えば、p-メチルフェニル、p-メトキシフェニル等である。

30

【0053】

本発明において、X<sup>2</sup>について、前記ハロゲン原子とは、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子等である。

【0054】

前記スキーム1において、まず、前記式(VII)で表される化合物と、前記式(VIII)で表される化合物とを、任意に塩基(例えば、4-ジメチルアミノピリジン(DMAP)、DABCO等)存在下に反応させ、前記式(IX)で表される化合物を得ることができる。なお、前記式(VIII)で表される化合物は、公知文献を参考に自家製造してもよいし、市販で入手してもよい。

40

【0055】

次に、前記式(IX)で表される化合物と、前記式(X)で表される化合物とを、塩基(例えば、炭酸カリウム、炭酸ナトリウム、炭酸ルビジウム、炭酸リチウム、炭酸セシウム等)および任意にクラウンエーテル(18-クラウン-6-エーテル、21-クラウン-7-エーテル、15-クラウン-5-エーテル、12-クラウン-4-エーテル等)存在下に縮合させ、下記式(XI)で表される化合物を得ることができる。なお、前記式(X)で表される化合物は、公知文献を参考に自家製造してもよいし、市販で入手してもよい。

50

## 【0056】

最後に、前記式 (XI) で表される化合物の、 $R^{11}$ 、 $R^{12}$  および  $R^{13}$  を除去することにより、式 (II) で表されるヌクレオシド類似体またはその塩を得ることができる。前記式 (XI) で表される化合物の、 $R^{11}$ 、 $R^{12}$  および  $R^{13}$  を除去するには、 $R^{11}$ 、 $R^{12}$  および  $R^{13}$  それぞれの基に応じて、公知の除去方法を選択することができる。例えば、 $R^{11}$  が *tert*-ブチルジフェニルシリル (TB DPS)、*tert*-ブチルジメチルシリル (TB DMS) 等のシリル基である場合、トリブチルアンモニウムフルオライド (TBAF)、塩化アンモニウム等で処理することにより、 $R^{11}$  を除去することが可能である。また、例えば、 $R^{12}$  および  $R^{13}$  が、一緒になって、式 -C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>- で表される基である場合、酸 (例えば、トリフルオロ酢酸、塩酸、酢酸等) で処理することにより、 $R^{12}$  および  $R^{13}$  を同時に除去することが可能である。

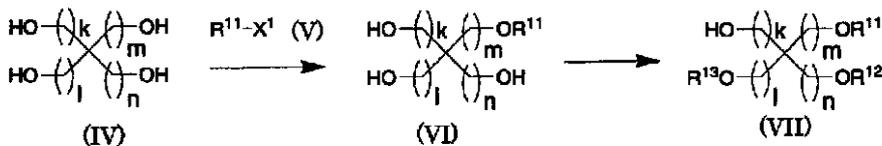
10

## 【0057】

前記式 (VII) で表される化合物は、例えば、以下のスキーム 2 に示すようにして製造してもよい。

## 【0058】

## 【化20】



20

スキーム 2

## 【0059】

前記式中、 $R^{11}$  は、保護基であり、 $R^{12}$  および  $R^{13}$  は、一緒になって、式 -C $R^{15}$ R $R^{16}$ - で表される基であり、前記  $R^{15}$  および  $R^{16}$  は、互いに独立して、水素原子、低級アルキル基および低級アルコキシル基からなる群から選択されるいずれかであり、 $X^1$  は、ハロゲン原子であり、 $k$ 、 $l$ 、 $m$  および  $n$  は、互いに独立して、1 ~ 10 の整数である。

30

## 【0060】

本発明において、 $X^1$  について、前記ハロゲン原子とは、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子等である。

## 【0061】

前記スキーム 2 において、例えば、前記式 (IV) で表される化合物と、前記式 (V) で表される化合物とを、任意に塩基 (例えば、イミダゾール、DABCO (1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octane)、トリエチルアミン等) 存在下に反応させ、前記式 (VI) で表される化合物を得ることができる。なお、前記式 (IV) で表される化合物および前記式 (V) で表される化合物は、公知文献を参考に自家製造してもよいし、市販で入手してもよい。

40

## 【0062】

次に、前記式 (VI) で表される化合物の 3 つの水酸基のうち 2 つを、 $R^{12}$  および  $R^{13}$  で保護して、前記式 (VII) で表される化合物を得ることができる。 $R^{12}$  および  $R^{13}$  で保護する方法としては、保護基である  $R^{12}$  および  $R^{13}$  の種類に応じて公知の保護方法を選択することができる。例えば、 $R^{12}$  および  $R^{13}$  が、一緒になって、式 -C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>- で表される基である場合、前記式 (VI) で表される化合物を、アセトン、酸触媒 (例えば、パラトルエン安息香酸等) 存在下に加熱することにより、前記式 (VII) 中、 $R^{12}$  および  $R^{13}$  が、一緒になって、式 -C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>- で表される基である化合物を得ることができる。

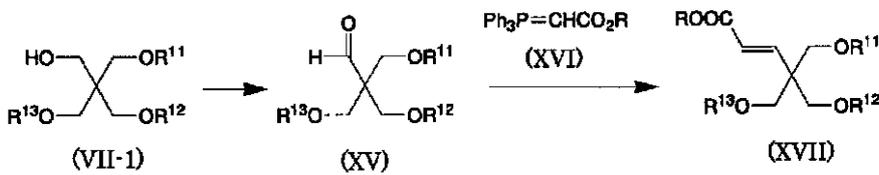
## 【0063】

50

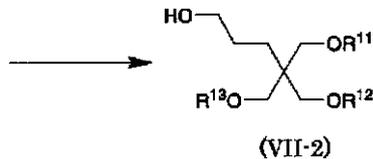
また、前記式(VII)中、kが2であり、l、mおよびnが1である式(VII-2)で表される化合物は、例えば、以下のスキーム3に示すようにして製造してもよい。

【0064】

【化21】



10



スキーム3

【0065】

前記式中、R<sup>11</sup>は、保護基であり、R<sup>12</sup>およびR<sup>13</sup>は、一緒になって、式-CR<sup>15</sup>R<sup>16</sup>-で表される基であり、前記R<sup>15</sup>およびR<sup>16</sup>は、互いに独立して、水素原子、低級アルキル基および低級アルコキシル基からなる群から選択されるいずれかであり、Rは、低級アルキル基である。

20

【0066】

本発明において、Rについて前記低級アルキル基とは、直鎖状または分岐状のアルキル基であり、例えば1~6の炭素原子を含むものである。前記低級アルキル基の例としては、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、2-エチルブチル、イソブチル、tert-ブチル、ペンチル、n-ヘキシル等が挙げられる。

【0067】

前記スキーム3において、まず、前記式(VII-1)で表される化合物を酸化して、前記式(XV)で表される化合物を得ることができる。酸化剤としては、例えば、BaMnO<sub>4</sub>、Collins試薬[CrO<sub>3</sub>(C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>N)<sub>2</sub>]、PCC(ピリジニウムクロクロマト)(C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>N<sup>+</sup>HCrO<sub>3</sub>Cl<sup>-</sup>)、DCC-DMSO(ジシクロヘキシルカルボジイミド-ジメチルスルホキシド)等が挙げられる。なお、前記式(VII-1)で表される化合物は、例えば、前記スキーム2中、前記式(VII)中、k、l、mおよびnが1である式(VII)の化合物であってもよい。その場合、前記式(IV)中k、l、mおよびnが1である式(IV)の化合物、例えばペンタエリスリトールを出発原料として、前記スキーム2に記載の製造方法に従い、前記式(VII)中、k、l、mおよびnが1である式(VII)の化合物を製造してもよい。

30

【0068】

次に、前記式(XV)で表される化合物に、イリド化合物(XVI)を反応させ、式(XVII)で表される化合物を得ることができる。このイリド化合物(XVI)は、当業者に公知のWittig反応、Horner-Emmons反応等において調製されるイリド化合物製造方法に従い、製造することができる。

40

【0069】

次に、前記式(XVII)で表される化合物を接触還元し、次いでエステル(-COOR)部分を還元することにより、前記式(VII-2)で表される化合物を得ることができる。接触還元は、例えば、遷移金属触媒の存在下、水素ガスにより行うことができる。前記遷移金属触媒としては、例えば、白金、パラジウム(例えば、Pd-C等)、ロジウム(例えば、Rh<sub>2</sub>O<sub>3</sub>等)、ルテニウム、ニッケル触媒等を用いることができる。前記

50

エステル部分の還元は、例えば、水素化リチウムアルミニウム ( $\text{LiAlH}_4$ ) 等を用いることができる。

【0070】

なお、前記式 (VII-2) で表される化合物の製造は、例えば、公知文献を参考にして行ってもよい。その公知文献としては、例えば、Satoshi Shuto, Satoshi Niizuma and Akira Matsuda, One-pot conversion of  $\alpha, \beta$ -unsaturated alcohols into the corresponding carbon-elongated dienes with a stable phosphorus ylide-BaMnO<sub>4</sub> system. Synthesis of 6'-methylene derivatives of Neplanocin A as potential antiviral nucleosides. New Neplanocin analogues 11. , The Journal of Organic Chemistry, 1998年, 第63巻, p. 4489等が挙げられる。

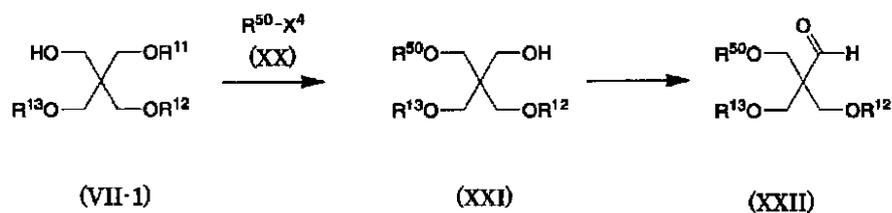
10

【0071】

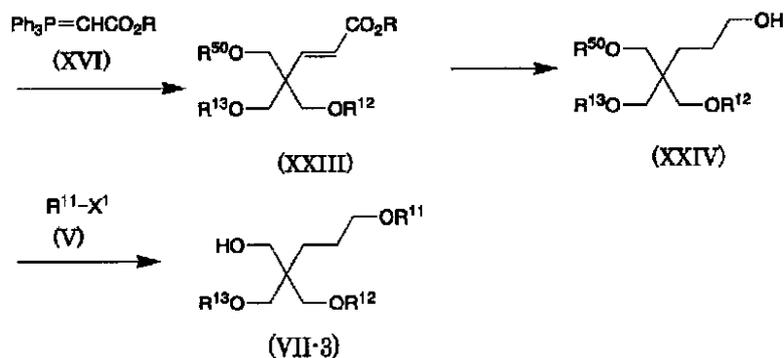
また、前記式 (VII) 中、 $m$  が 2 であり、 $k$ 、 $l$  および  $n$  が 1 である式 (VII-3) で表される化合物は、例えば、以下のスキーム 4 に示すようにして製造してもよい。

【0072】

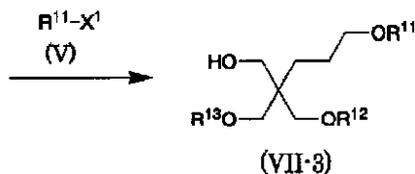
【化22】



20



30



スキーム 4

【0073】

前記式中、 $\text{R}^{11}$  は、保護基であり、  
 $\text{R}^{12}$  および  $\text{R}^{13}$  は、一緒になって、式  $-\text{CR}^{15}\text{R}^{16}-$  で表される基であり、  
 前記  $\text{R}^{15}$  および  $\text{R}^{16}$  は、互いに独立して、水素原子、低級アルキル基および低級アルコキシル基からなる群から選択されるいずれかであり、  
 $\text{X}^1$  および  $\text{X}^4$  は、互いに独立して、ハロゲン原子であり、  
 $\text{R}$  は、低級アルキル基であり、  
 $\text{R}^{50}$  は保護基である。

40

【0074】

前記  $\text{R}^{50}$  について前記保護基とは、従来公知の 1 級アルコールの保護基を用いることができる。そのような保護基としては、例えば、tert-ブチルジフェニルシリル (TBDPS)、tert-ブチルジメチルシリル (TBDMS)、4,4'-ジメトキシトリチル (DMTr)、4-モノメトキシトリチル (MMTr)、(9-フェニル)キサン

50

テン - 9 - イル [ ピキシル ( p i x y l ) ]、アセチル ( A c )、ベンゾイル ( B z ) 等  
が、挙げられる。

【 0 0 7 5 】

本発明において、前記 X<sup>4</sup> について、前記ハロゲン原子とは、フッ素原子、塩素原子、  
臭素原子、ヨウ素原子等である。

【 0 0 7 6 】

前記スキーム 4 において、まず、前記式 ( V I I - 1 ) で表される化合物に、式 ( X X )  
で表される化合物とを、任意に塩基 ( 例えば、イミダゾール、D A B C O、トリエチル  
アミン等 ) 存在下に反応させ、前記式 ( X X I ) で表される化合物を得ることができる。  
なお、前記式 ( X X ) で表される化合物は、公知文献を参考に自家製造してもよいし、市  
販で入手してもよい。

10

【 0 0 7 7 】

次に、前記式 ( X X I ) で表される化合物を、酸化して、前記式 ( X X I I ) で表され  
る化合物を得ることができる。酸化は、前記スキーム 3 において前記式 ( V I I - 1 ) で  
表される化合物を酸化すると同様の条件を用いて行うことができる。

【 0 0 7 8 】

次に、前記式 ( X X I I ) で表される化合物に、イリド化合物 ( X V I ) を反応させ、  
式 ( X X I I I ) で表される化合物を得ることができる。このイリド化合物 ( X V I ) は  
、前記スキーム 3 におけるイリド化合物 ( X V I ) と同様のものを用いることができる。

20

【 0 0 7 9 】

次に、前記式 ( X X I I I ) で表される化合物を接触還元し、次いでエステル ( - C O  
O R ) 部分を還元することにより、前記式 ( X X I V ) で表される化合物を得ることが  
できる。接触還元およびエステル部分の還元は、前記スキーム 3 における前記  
式 ( X V I I ) で表される化合物の接触還元およびエステル還元と同様の条件を用いて行  
うことができる。

【 0 0 8 0 】

次に、式 ( X X I V ) で表される化合物に、前記式 ( V ) で表される化合物とを反応さ  
せ、その後、基 R<sup>50</sup> を除去して前記式 ( V I I - 3 ) で表される化合物を得ることが  
できる。この式 ( V ) の化合物との反応条件は、前記スキーム 2 における前記式 ( I V ) で  
表される化合物と、前記式 ( V ) で表される化合物との反応条件と同様の条件を用いて行  
うことができる。また、前記基 R<sup>50</sup> の除去は、R<sup>50</sup> の基に応じて、公知の除去方法を  
選択することができる。

30

【 0 0 8 1 】

このように、k、m、l および n が 1 ~ 10 の整数である前記式 ( V I I ) で表される  
化合物は、従来公知な技術、すなわち、保護および脱保護と、イリド化合物を用いた増炭  
反応を組み合わせることにより、製造することができる。

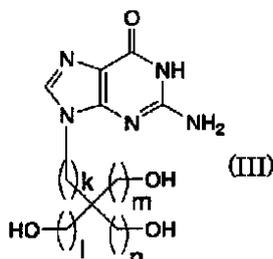
【 0 0 8 2 】

また、前記式 ( I ) 中、R<sup>1</sup> が、前記式 ( 5 ) の基であり、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup> および R<sup>4</sup> が H  
であり、下記式 ( I I I ) で表されるヌクレオシド類似体またはその塩の製造方法の一例  
を説明する。

40

【 0 0 8 3 】

【 化 2 3 】



50

【0084】

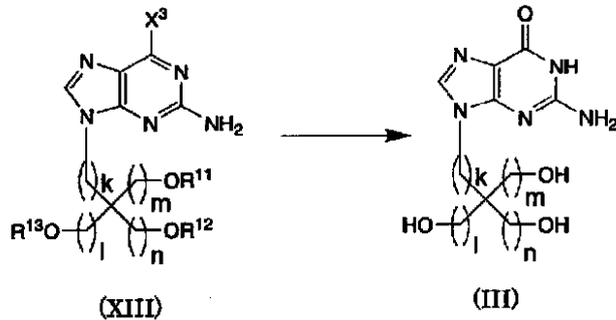
前記式中、 $k$ 、 $l$ 、 $m$ および $n$ は、互いに独立して、 $1 \sim 10$ の整数である。

【0085】

その製造方法を、例えば、以下のスキーム5に示す。この製造方法によれば、例えば、前記式(XIII)で表される化合物の、 $R^{11}$ 、 $R^{12}$ および $R^{13}$ を除去すること、および加水分解により、式(III)で表されるヌクレオシド類似体またはその塩を得ることができる。

【0086】

【化24】



スキーム5

【0087】

前記式中、 $R^{11}$ は、保護基であり、 $R^{12}$ および $R^{13}$ は、一緒になって、式 $-CR^{15}R^{16}-$ で表される基であり、前記 $R^{15}$ および $R^{16}$ は、互いに独立して、水素原子、低級アルキル基および低級アルコキシル基からなる群から選択されるいずれかであり、 $X^3$ は、ハロゲン原子であり、 $k$ 、 $l$ 、 $m$ および $n$ は、互いに独立して、 $1 \sim 10$ の整数である。

【0088】

本発明において、 $X^3$ について、前記ハロゲン原子とは、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子等である。

前記式(XIII)で表される化合物の、 $R^{11}$ 、 $R^{12}$ および $R^{13}$ を除去するには、 $R^{11}$ 、 $R^{12}$ および $R^{13}$ それぞれの基に応じて、公知の除去方法を選択することができる。例えば、 $R^{11}$ がtert-ブチルジフェニルシリル(TBDPS)、tert-ブチルジメチルシリル(TBDMS)等のシリル基である場合、トリブチルアンモニウムフルオライド(TBAF)、塩化アンモニウム等で処理することにより、 $R^{11}$ を除去することが可能である。また、例えば、 $R^{12}$ および $R^{13}$ が、一緒になって、式 $-C(CH_3)_2-$ で表される基である場合、酸(例えば、トリフルオロ酢酸、塩酸、酢酸等)で処理することにより、 $R^{12}$ および $R^{13}$ を同時に除去することが可能である。

【0089】

前記式(XIII)で表される化合物の加水分解は、公知の除去方法を選択することができる。例えば、酸(例えば、トリフルオロ酢酸、塩酸、酢酸等)で処理することにより、この加水分解を行うことが可能である。この酸処理により、例えば、前記式(XIII)中、 $R^{12}$ および $R^{13}$ が、一緒になって、式 $-C(CH_3)_2-$ で表される基である場合、加水分解と $R^{12}$ および $R^{13}$ の除去とを同時に行うことができる。

【0090】

なお、前記式(XIII)で表される化合物は、公知文献を参考に自家製造してもよいし、前記スキーム1において、式(XI)中、 $R^5$ が前記式(8)の基であるヌクレオシド類似体の製造方法を参考に自家製造してもよい。

【0091】

次に、前記式(I)中、 $R^1$ が、前記式(1)の基、前記式(1)の基において、その

10

20

30

40

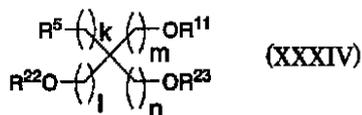
50

官能基が保護基で保護された基、前記式(2)の基、前記式(2)の基において、その官能基が保護基で保護された基、前記式(3)の基、前記式(3)の基において、その官能基が保護基で保護された基、前記式(4)の基、前記式(4)の基において、その官能基が保護基で保護された基、前記式(5)の基において、その官能基が保護基で保護された基、前記式(6)の基、前記式(6)の基において、その官能基が保護基で保護された基、前記式(7)の基、前記式(7)の基において、その官能基が保護基で保護された基、前記式(8)の基、および前記式(8)の基において、その官能基が保護基で保護された基からなる群から選択されるいずれかの基であり、 $R^2$ が保護基であり、 $R^3$ が保護基であり、 $R^4$ が固相合成用活性化リン酸基であり、下記式(XXXIV)で表されるヌクレオシド類似体またはその塩の製造方法の一例を説明する。

10

【0092】

【化25】



【0093】

前記式(XXXIV)において、 $R^5$ は、前記式(1)の基、前記式(1)の基において、その官能基が保護基で保護された基、前記式(2)の基、前記式(2)の基において、その官能基が保護基で保護された基、前記式(3)の基、前記式(3)の基において、その官能基が保護基で保護された基、前記式(4)の基、前記式(4)の基において、その官能基が保護基で保護された基、前記式(5)の基において、その官能基が保護基で保護された基、前記式(6)の基、前記式(6)の基において、その官能基が保護基で保護された基、前記式(7)の基、前記式(7)の基において、その官能基が保護基で保護された基、前記式(8)の基、および前記式(8)の基において、その官能基が保護基で保護された基からなる群から選択されるいずれかの基であり、 $R^{11}$ は、保護基であり、 $R^{22}$ は、保護基であり、 $R^{23}$ は、固相合成用活性化リン酸基である。

20

【0094】

本発明において、 $R^{22}$ について前記保護基とは、従来公知の1級アルコールの保護基を用いることができる。そのような保護基としては、例えば、4,4'-ジメトキシトリチル(DMTri)、tert-ブチルジメチルシリル(TBDMS)、4-モノメトキシトリチル(MMTri)、TBDPS、(9-フェニル)キサントゲン-9-イル[ピキシル(pixel)]等が、挙げられる。

30

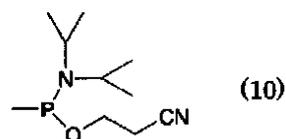
【0095】

本発明において、 $R^{23}$ について前記固相合成用活性化リン酸基としては、固相合成において従来公知のリン酸基を用いることができ、例えば、ホスホロアミダイト、ホスホナート、チオホスファイト等を形成するリン酸基が挙げられる。ホスホロアミダイトを形成する、固相合成用活性化リン酸基としては、例えば、下記式(10)で表される基が挙げられる。

40

【0096】

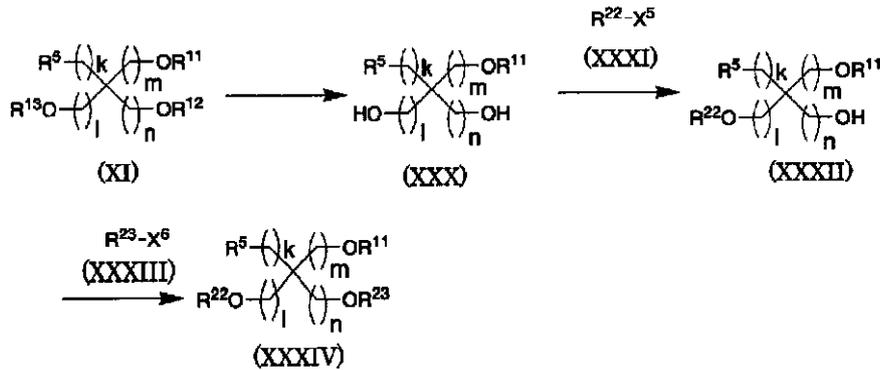
【化26】



【0097】

その製造方法を、例えば、以下のスキーム6に示す。

【化 2 7】



スキーム 6

【0098】

前記式において、 $R^5$  は、前記式(1)の基、前記式(1)の基において、その官能基が保護基で保護された基、前記式(2)の基、前記式(2)の基において、その官能基が保護基で保護された基、前記式(3)の基、前記式(3)の基において、その官能基が保護基で保護された基、前記式(4)の基、前記式(4)の基において、その官能基が保護基で保護された基、前記式(5)の基において、その官能基が保護基で保護された基、前記式(6)の基、前記式(6)の基において、その官能基が保護基で保護された基、前記式(7)の基、前記式(7)の基において、その官能基が保護基で保護された基、前記式(8)の基、および前記式(8)の基において、その官能基が保護基で保護された基からなる群から選択されるいずれかの基であり、 $R^{11}$  は、保護基であり、 $R^{22}$  は、保護基であり、 $R^{23}$  は、固相合成用活性化リン酸基であり、 $X^5$  および  $X^6$  はハロゲン原子である。

【0099】

本発明において、 $X^5$  および  $X^6$  について前記ハロゲン原子とは、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子等である。

【0100】

その製造方法によれば、例えば、前記式(XI)で表される化合物の、 $R^{12}$  および  $R^{13}$  を除去して、式(XXX)で表される化合物を得ることができる。前記式(XI)で表される化合物の、 $R^{12}$  および  $R^{13}$  を除去するには、 $R^{12}$  および  $R^{13}$  それぞれの基に応じて、公知の除去方法を選択することができる。例えば、 $R^{12}$  および  $R^{13}$  が、一緒になって、式  $-C(CH_3)_2-$  で表される基である場合、酸(例えば、トリフルオロ酢酸、塩酸、酢酸等)で処理することにより、 $R^{12}$  および  $R^{13}$  を同時に除去することが可能である。

【0101】

次いで、例えば、前記式(XXX)で表される化合物を、式(XXXI)で表される化合物と、任意に塩基(例えば、ピリジン等)、触媒(例えば、ジメチルアミノピリジン等)等の存在下に、反応させ、式(XXXII)で表される化合物を得ることができる。式(XXXI)で表される化合物は、市販で入手してもよいし、公知文献を利用して自家製造してもよい。

【0102】

そして、例えば、前記式(XXXII)で表される化合物に、式(XXXIII)で表される化合物を、任意に塩基(例えば、ジイソプロピルエチルアミン等)等の存在下に縮合させ、前記式(XXXIV)で表される化合物を得ることができる。

【0103】

また、前記式(I)中、 $R^1$  が、前記式(5)の基であり、 $R^2$  が保護基であり、 $R^3$  が保護基であり、 $R^4$  が固相合成用活性化リン酸基であり、下記式(XXXVII)で表されるヌクレオシド類似体またはその塩の製造方法の一例を説明する。

10

20

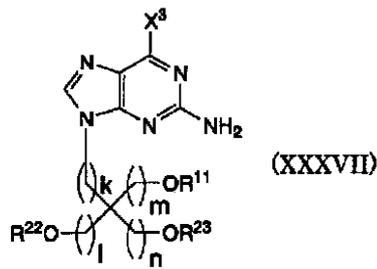
30

40

50

【 0 1 0 4 】

【 化 2 8 】



10

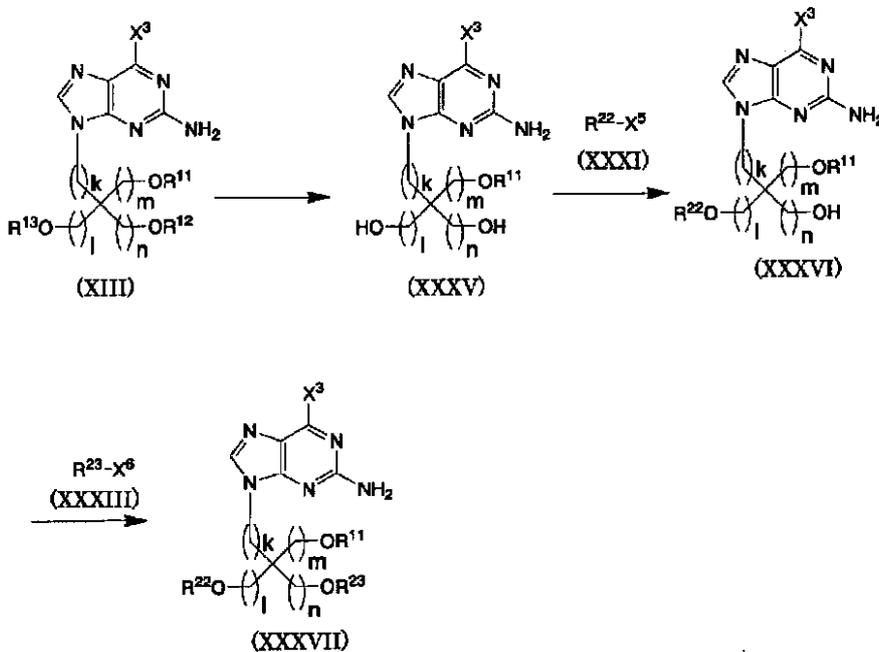
【 0 1 0 5 】

前記式 (XXXVII) 中、 $R^{11}$  は、保護基であり、 $R^{22}$  は、保護基であり、 $R^{23}$  は、固相合成用活性化リン酸基であり、 $X^3$  は、ハロゲン原子であり、 $k$ 、 $l$ 、 $m$  および  $n$  は、互いに独立して、1 ~ 10 の整数である。

【 0 1 0 6 】

その製造方法を、例えば、以下のスキーム 7 に示す。

【 化 2 9 】



20

30

スキーム 7

【 0 1 0 7 】

前記式中、 $R^{11}$  は、保護基であり、 $R^{22}$  は、保護基であり、 $R^{23}$  は、固相合成用活性化リン酸基であり、 $X^3$ 、 $X^5$  および  $X^6$  は、ハロゲン原子であり、 $k$ 、 $l$ 、 $m$  および  $n$  は、互いに独立して、1 ~ 10 の整数である。

40

【 0 1 0 8 】

その製造方法によれば、例えば、前記式 (XIII) で表される化合物の、 $R^{12}$  および  $R^{13}$  を除去して、式 (XXXV) で表される化合物を得ることができる。前記式 (XIII) で表される化合物の、 $R^{12}$  および  $R^{13}$  を除去するには、 $R^{12}$  および  $R^{13}$  それぞれの基に応じて、公知の除去方法を選択することができる。例えば、 $R^{12}$  および  $R^{13}$  が、一緒になって、式  $-C(CH_3)_2-$  で表される基である場合、酸 (例えば、トリフルオロ酢酸、塩酸、酢酸等) で処理することにより、 $R^{12}$  および  $R^{13}$  を同時に除去することが可能である。

【 0 1 0 9 】

次いで、例えば、前記式 (XXXV) で表される化合物を、式 (XXXI) で表される

50

化合物と、任意に塩基（例えば、ピリジン等）、触媒（例えば、ジメチルアミノピリジン等）等の存在下に、反応させ、式（XXXVI）で表される化合物を得ることができる。式（XXXI）で表される化合物は、市販で入手してもよいし、公知文献を利用して自家製造してもよい。

【0110】

そして、例えば、前記式（XXXVI）で表される化合物に、式（XXXIII）で表される化合物を、任意に塩基（例えば、ジイソプロピルエチルアミン等）等の存在下に縮合させ、前記式（XXXVII）で表される化合物を得ることができる。

【0111】

つぎに、本発明のオリゴヌクレオチド類似体の製造方法の一例について説明する。まず、例えば、本発明のヌクレオシド類似体の3つの水酸基の内1つを、固相合成用活性化リン酸基で活性化させ、残りの2つの水酸基を保護した化合物を用意する。その化合物としては、例えば、前記式（XXXIV）で表わされる化合物または前記式（XXXVII）で表わされる化合物を用いることができる。その固相合成用活性化リン酸基としては、固相合成において従来公知のリン酸基を用いることができ、例えば、ホスホロアミダイト、ホスホナート、チオホスファイト等を形成するリン酸基が挙げられる。そして、本発明のオリゴヌクレオチド類似体は、例えば、この活性化化合物を、オリゴヌクレオチド合成分野で従来公知の技術を用いて、オリゴヌクレオチド類似体の配列に従い、ヌクレオシドを順次固相上でカップリングさせて行うことができる。

10

【0112】

なお、ヌクレオシド、カップリング試薬、脱保護試薬、洗浄試薬等は、通常核酸固相合成に用いられるものを用いる。得られた固相担体上のオリゴヌクレオチド類似体は、必要であればオリゴヌクレオチド側鎖の脱保護を行った後、固相担体から切り出して、粗オリゴヌクレオチド類似体を得る。切り出しに用いる試薬は、固相担体およびリンカー（固相担体とオリゴヌクレオチド類似体を接続する部分）構造等に応じて、従来公知の試薬から、適宜選択することができる。この粗オリゴヌクレオチド類似体は、必要であれば、HPLC等で精製してもよい。

20

【0113】

次に、オリゴヌクレオチド類似体が二本鎖である場合の製造について例を挙げて説明する。例えば前記のような方法に従い、一本鎖のオリゴヌクレオチド類似体をまず製造する。そのオリゴヌクレオチド類似体と相補的な配列を有する、一本鎖の天然オリゴヌクレオチドも別途、従来公知の方法に従い、製造する。次いで、得られた一本鎖のオリゴヌクレオチド類似体をアニーリング用緩衝液中に溶解させたものと、一本鎖の天然オリゴヌクレオチドをアニーリング用緩衝液中に溶解させたものとを、例えば混合し、加熱処理し、その後、徐々に室温まで冷却させて、二本鎖のオリゴヌクレオチド類似体を得ることができる。この二本鎖のオリゴヌクレオチド類似体は、必要に応じて、フェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿等をさらに行って、単離精製することができる。

30

【0114】

なお、スキーム1～7の各工程において、必要であれば、各官能基に保護基を導入したり、保護基を脱保護したり、保護基を変更してもよい。なお、官能基の種類に応じた保護基の選択、保護基の導入および保護基の除去は、当該分野で公知の方法に従い、行うことができ、例えば、「有機合成における保護基（Protective Groups in Organic Synthesis）, T. Greeneら著、John Wiley & Sons, Inc. 出版」等を参照することができる。

40

【実施例】

【0115】

本明細書の記載において、以下の略語を使用する。

DMAP：4 - ジメチルアミノピリジン（4 - dimethylaminopyridine）

TBAF：トリブチルアンモニウムフルオリド（tributylammonium f

50

luoride)

TBDPS-Cl: tert-ブチルジフェニルシリルクロライド (tert-butyl diphenylsilylchloride)

TFA: トリフルオロ酢酸 (Trifluoroacetic acid)

Ar: アルゴン (Argon)

THF: テトラヒドロフラン (tetrahydrofuran)

TEAA: 酢酸トリエチルアンモニウム塩 (Triethylammonium Acetate)

【0116】

(実施例1)

10

9-(2,2-ジヒドロキシメチル-3-ヒドロキシプロピル)アデニンの製造

【0117】

(1) 1-t-ブチル-ジフェニルシリルオキシ-2,2-ジヒドロキシメチル-3-プロパノール (1-t-butyl-diphenylsilyloxy-2,2-dihydroxymethyl-3-propanol) の製造

ペンタエリスリトール (3.00 g、22.02 mmol) とイミダゾール (3.30 g、44.04 mmol) を乾燥させ、アルゴン雰囲気下において DMF (28.5 ml) に溶解させた。その溶液に、TBDPS-Cl (2.22 g、24.2 mmol) をゆっくり滴下して加え、その混合物を室温にて5時間攪拌した。混合物から溶媒を留去後、得られた残渣を、酢酸エチルと水から抽出した。抽出した酢酸エチル溶液を、飽和 NaCl aq で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。その酢酸エチル溶液から溶媒を留去し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl<sub>3</sub>: MeOH = 1:0 ~ 20:1) で精製して、無色透明オイル状の表題化合物を得た。(収量 5.17 g、13.82 mmol、収率 62%)

20

【0118】

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) ; 7.56 (4H, s, フェニル), 7.32 (6H, s, フェニル), 3.57 (8H, d, J = 30.8, CH<sub>2</sub>-1, 2, 2, 3), 2.90 (3H, m, OH), 0.98 (9H, s, ter-ブチル)。

【0119】

(2) 2,2-ジメチル-5-t-ブチル-ジフェニルシリルオキシシメチル-5-ヒドロキシメチル-1,3-ジオキサン (2,2-dimethyl-5-t-butyl-diphenylsilyloxydimethyl-5-hydroxymethyl-1,3-dioxan) の製造

30

1-t-ブチル-ジフェニルシリルオキシ-2,2-ジヒドロキシメチル-3-プロパノール (3.50 g、9.35 mmol) および p-トルエン安息香酸・一水和物 (2.18 g、11.22 mmol) とを、アセトン (100 ml) 中で溶解した。その溶液に、o-ギ酸エチル (20 ml) を加え、その混合物を室温で2時間攪拌した。その混合物を希アンモニア水で中和して反応を停止した後、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (n-Hex: EtOAc = 20:1 ~ 5:1) で精製して、黄色オイル状の表題化合物を得た。(収量 3.76 g、8.98 mmol、収率 96%)

40

【0120】

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) ; 7.67 (5H, d, J = 6.4 Hz, フェニル), 7.40 (5H, q, J = 8.0 Hz, フェニル), 3.74 (8H, m, CH<sub>2</sub>-4, 5, 5, 6), 1.40 (6H, d, J = 9.8 Hz, CH<sub>3</sub>-2, 2), 1.062 (9H, s, ter-ブチル)。

【0121】

(3) 2,2-ジメチル-5-t-ブチル-ジフェニルシリルオキシシメチル-5-トルエンシルホニルメチル-1,3-ジオキサン (2,2-dimethyl-5-t-butyl-diphenylsilyloxydimethyl-5-toluenesl

50

ufonylmethyl-1,3-dioxan)の製造

2,2-ジメチル-5-t-ブチル-ジフェニルシリルオキシルメチル-5-ヒドロキシメチル-1,3-ジオキサン(1.66g、4.01mmol)のCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(50ml)中溶液に、DMAP(1.47g、12.03mmol)を加え、さらに氷冷下にて5-トルエンスルホニルメチルクロライド(2.29g、12.03mmol)を加えて、その混合物を約5時間攪拌した。その混合物を、CH<sub>3</sub>Clおよび飽和NaHCO<sub>3</sub>水溶液で抽出および洗浄した。得られた有機層を、硫酸ナトリウムで乾燥し、有機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(CHCl<sub>3</sub>:MeOH=100:1~20:1)で精製して、白色結晶の表題化合物を得た。(収量1.7787g、3.12mmol、収率78%)

10

【0122】

<sup>1</sup>H NMR(400MHz, CDCl<sub>3</sub>) ; 7.66(5H, m, フェニル), 7.35(9H, m, フェニル), 3.82(4H, s, CH<sub>2</sub>-4, 6), 3.74(4H, s, CH<sub>2</sub>-5, 5), 1.38(6H, s, CH<sub>3</sub>-2, 2), 1.05(9H, s, ter-ブチル), 1.05(3H, s, Ts-Me) .

【0123】

(4) 2,2-ジメチル-5-t-ブチル-ジフェニルシリルオキシルメチル-5-(アデニン-9-イル-メチル)-1,3-ジオキサン(2,2-dimethyl-5-t-butyl-diphenylsilyloxymethyl-5-(adenine-9-yl-methyl)-1,3-dioxan)の製造

20

2,2-ジメチル-5-t-ブチル-ジフェニルシリルオキシルメチル-5-トルエンスルホニルメチル-1,3-ジオキサン(3.48g、6.12mmol)に、アデニン(1.65g、12.2mmol)、炭酸カリウム(1.27g、9.17mmol)、18-クラウン-6-エーテル(1.94g、7.34mmol)を加え、一晚乾燥させた。その混合物にDMF(150ml)を加え、得られた混合物を55 オイルバスで48時間加熱した。その混合物に、n-ヘキサンおよび酢酸エチルの混合物(n-Hex:EtOAc=1:1)および水を加えて、抽出した。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(CHCl<sub>3</sub>:MeOH=100:1~30:1)で精製して、白色結晶の表題化合物を得た。(収量2.49g、4.69mmol、収率76.6%)

30

【0124】

<sup>1</sup>H NMR(400MHz, CDCl<sub>3</sub>) ; 8.26(1H, d, J=2.0Hz, CH-アデニン-2), 7.76(1H, d, J=2.4Hz, CH-アデニン-8), 7.61(4H, m, フェニル), 7.40(6H, m, フェニル), 5.85(2H, s, NH<sub>2</sub>-アデニン-6), 2.58(8H, s, CH<sub>2</sub>-4, 5, 5, 6), 1.44(3H, s, CH<sub>3</sub>-2), 1.35(3H, s, CH<sub>3</sub>-2), 1.10(9H, s, ter-ブチル);

Mass(EI)m/z: 532.2666(M<sup>+</sup>) 516, 474, 416, 386, 366 .

【0125】

40

(5) 9-(2,2-ジヒドロキシメチル-3-t-ブチル-ジフェニルシリルオキシルメチルプロピル)アデニン(9-(2,2-dihydroxymethyl-3-t-butyl-diphenylsilyloxymethylpropyl)adenine)の製造

2,2-ジメチル-5-t-ブチル-ジフェニルシリルオキシルメチル-5-(アデニン-9-イル-メチル)-1,3-ジオキサン(1.23g、2.32mmol)のTHF(20ml)中溶液に、TBAF(5ml)を加えて、その混合物を室温で3時間攪拌した。その混合物から溶媒を減圧留去し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(CHCl<sub>3</sub>:MeOH=100:1~10:1)で精製して、白色結晶の表題化合物を得た。(収量0.78g、1.59mmol、収率95%)

50

## 【0126】

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) ; 8.04 (1H, s, CH - アデニン - 2), 7.87 (1H, s, CH - アデニン - 8), 7.57 (4H, m, フェニル), 7.57 (6H, m, フェニル), 7.18 (2H, s,  $\text{NH}_2$  - アデニン - 6), 5.07 (1H, t,  $J = 5.6\text{ Hz}$ , 5 - OH), 3.20 (8H, s,  $\text{CH}_2$  - 4, 5, 5, 6), 1.21 (3H, s,  $\text{CH}_3$  - 2), 1.17 (3H, s,  $\text{CH}_3$  - 2), 0.84 (9H, s, *ter* - ブチル);

Mass (EI)  $m/z$ : 293.1488 ( $\text{M}^+$ ) 278, 235, 206, 188, 148;

Anal. calcd for  $\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{N}_5\text{O}_3 \cdot 1/4 \text{ EtOH}$ : C, 53.19; H, 6.78; N, 22.97. found: C, 53.03; H, 6.59; N, 22.94.

10

## 【0127】

(6) 9 - (2, 2 - ジヒドロキシメチル - 3 - ヒドロキシプロピル) アデニン (9 - (2, 2 - dihydroxymethyl - 3 - hydroxypropyl) adenine) の製造

9 - (2, 2 - ジヒドロキシメチル - 3 - *t* - ブチル - ジフェニルシリルオキシルメチルプロピル) アデニン (30.2 mg, 0.103 mmol) の THF 溶液に、TFA (1 ml) を加えて、その混合物を 2 時間攪拌した。その混合物に、水およびメタノールを加え、その後、混合物から溶媒を除去して減圧乾固した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー ( $\text{CHCl}_3$ : MeOH = 30:1 ~ 10:1) で精製して、表題化合物を得た。(収量 18 mg, 0.071 mmol, 収率 69%)

20

## 【0128】

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) ; 8.30 (1H, s, CH - アデニン - 2), 8.20 (1H, s, CH - アデニン - 8), 7.56 (2H, s,  $\text{NH}_2$  - アデニン - 6), 4.08 (3H, s, OH - 2, 2, 3), 3.24 (8H, m,  $\text{CH}_2$  - 1, 2, 2, 3);

Mass (EI)  $m/z$ : 253.1175 ( $\text{M}^+$ ) 253, 242, 222, 204, 188;

HRMS (EI) Calcd for  $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{O}_3\text{N}_5$  253.1175 Found 253.1172.

30

## 【0129】

(実施例 2)

9 - (2, 2 - ジヒドロキシメチル - 3 - ヒドロキシプロピル) グアニンの製造

## 【0130】

(1) 2, 2 - ジメチル - 5 - *t* - ブチル - ジフェニルオキシルメチル - 5 - (2 - アミノ - 6 - クロロプリン - 9 - イル - メチル) - 1, 3 - ジオキサン (2, 2 - dimethyl - 5 - *t* - Butyl - diphenyloxymethyl - 5 - (2 - amino - 6 - chloropurine - 9 - yl - methyl) - 1, 3 - dioxan) の製造

40

2, 2 - ジメチル - 5 - *t* - ブチル - ジフェニルシリルオキシルメチル - 5 - トルエンシルホニルメチル - 1, 3 - ジオキサン (5.88 g, 10.34 mmol)、2 - アミノ - 6 - クロロ - プリン (3.51 g, 12.41 mmol)、炭酸カリウム (2.14 g, 15.51 mmol) および 18 - クラウン - 6 - エーテル (3.28 g, 12.41 mmol) をそれぞれ一晩真空乾燥させた。それらを、DMF (170 ml) に溶解させ、その溶液を 55 で 36 時間加熱した。反応混合物から溶媒を留去し、得られた残渣に *n* - ヘキサンおよび酢酸エチルの混合物 (*n* - Hex: EtOAc = 1:1) および水を加え、抽出した。得られた有機層を、飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した。有機層から溶媒を留去し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー ( $\text{CHCl}_3$ : MeOH = 100:1 ~ 20:1) で精製して、白色結晶の表題化合物を得た。

50

(収量 2.24 g、5.27 mmol、収率 51%)

【0131】

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) ; 8.02 (1H, s, CH-プリン-2), 7.78 (1H, s, CH-プリン-8), 7.61 (4H, m, フェニル), 7.40 (6H, m, フェニル), 6.61 (2H, s,  $\text{NH}_2$ -プリン-2), 2.12 (3H, s, OH-3', 4', 5'), 3.87 (2H, s,  $\text{CH}_2$ ) 3.22 (6H, s,  $\text{CH}_2$ );

Mass (EI) m/z : 565.2276 ( $\text{M}^+$ ) 550, 508, 450, 430, 420;

Anal. calcd for  $\text{C}_{29}\text{H}_{36}\text{ClN}_5\text{O}_3\text{Si}$ : C, 61.52; H, 6.41; N, 12.37. found: C, 61.58; H, 6.44; N, 12.24.

10

【0132】

(2) 2, 2-ジメチル-5-(2-アミノ-6-クロロプリン-9-イル-メチル)5-ヒドロキシメチル-1, 3-ジオキサン(2, 2-dimethyl-5-(2-amino-6-chloropurine-9-yl-methyl)5-hydroxymethyl-1, 3-dioxan)の製造

2, 2-ジメチル-5-t-ブチル-ジフェニルオキシルメチル-5-(2-アミノ-6-クロロプリン-9-イル-メチル)-1, 3-ジオキサン(426 mg、0.783 mmol)に、Ar置換下、THF(約1 ml)を加えて溶解させた。その溶液にTBAF(1 ml)を加え、その混合物を約2時間攪拌した。その混合物から溶媒を留去し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー( $\text{CHCl}_3$ : MeOH = 100:1 ~ 20:1)で精製して、白色結晶の表題化合物を得た。(収量 216 mg、0.704 mmol、収率 90%)

20

【0133】

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) ; 7.80 (1H, s, CH-2-アミノ-6-クロロプリン-8), 5.16 (2H, s,  $\text{NH}_2$ -2-アミノ-6-クロロプリン-2), 4.43 (2H, s,  $\text{CH}_2$ ), 3.77 (2H, d,  $J = 12.0\text{ Hz}$ ,  $\text{CH}_2$ ), 3.58 (2H, d,  $J = 13.0\text{ Hz}$ ,  $\text{CH}_2$ ), 1.591 (1H, s, OH), 1.59 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ), 1.51 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ).

30

【0134】

(3) 9-(2, 2-ジヒドロキシメチル-3-ヒドロキシプロピル)グアニン(9-(2, 2-dihydroxymethyl-3-hydroxypropyl)guanine)の製造

2, 2-ジメチル-5-(2-アミノ-6-クロロプリン-9-イル-メチル)5-ヒドロキシメチル-1, 3-ジオキサン(58 mg、0.187 mmol)に50% TFA(7.84 ml)を加え、その混合物を約2時間攪拌した。その混合物に水およびメタノールを加え、その後、混合物から溶媒を除去して減圧乾固した。得られた残渣を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー( $\text{CHCl}_3$ : MeOH = 30:1 ~ 10:1)で精製して、表題化合物を得た。(収量 31 mg、0.118 mmol、収率 63%)

40

【0135】

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) ; 10.66 (1H, s, NH-1), 7.62 (1H, s, CH-8), 6.61 (2H, s,  $\text{NH}_2$ -2), 2.12 (3H, s, OH-3', 4', 5'), 3.87 (2H, s,  $\text{CH}_2$ ) 3.22 (6H, s,  $\text{CH}_2$ );

Mass (EI) m/z : 269.1124 ( $\text{M}^+$ ) 269, 238, 220, 191, 165;

HRMS (EI) Calcd for 269.1124 Found 269.1118.

【0136】

50

## (実施例3)

1 - (2, 2 - ジヒドロキシメチル - 3 - ヒドロキシプロピル) ウラシルの製造

## 【0137】

(1) 2, 2 - ジメチル - 5 - t - ブチル - ジフェニルオキシシルメチル - 5 - (ウラシル - 9 - イル - メチル) - 1, 3 - ジオキサシラン(2, 2 - dimethyl - 5 - t - Butyl - diphenyloxymethyl - 5 - (uracil - 9 - ylmethyl) - 1, 3 - dioxane) の製造

2, 2 - ジメチル - 5 - t - ブチル - ジフェニルシリルオキシシルメチル - 5 - トルエン  
スルホニルメチル - 1, 3 - ジオキサシラン(3.65 g、6.41 mmol)、ウラシル(1.43 g、12.83 mmol)、炭酸カリウム(1.06 g、7.70 mmol) および 18 - クラウン - 6 - エーテル(2.04 g、7.70 mmol) をそれぞれ一晩真空乾燥させた。それらを DMF (70 ml) および DMSO (30 ml) に溶解させ、その溶液を 55 °C で 36 時間加熱した。反応混合物から溶媒を留去し、得られた残渣に n - ヘキサンおよび酢酸エチルの混合物 (n - Hex : EtOAc = 1 : 1) および水を加え、抽出した。得られた有機層を、飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した。有機層から溶媒を留去し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl<sub>3</sub> : MeOH = 100 : 1 ~ 50 : 1) で精製した。得られた無色透明のオイル状化合物を、ジエチルエーテルにて結晶化し、白色結晶の表題化合物を得た。(収量 1.62 g、3.19 mmol、収率 50%)

10

## 【0138】

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 11.2 (1H, s, NH), 7.63 (4H, m, Phe), 7.44 (7H, m, Phe, CH - ウラシル - 6), 5.45 (1H, d, J = 10.4 Hz, CH - ウラシル - 5), 3.09 (8H, m, CH<sub>2</sub> - 4, 5, 5, 6), 1.31 (3H, s, CH<sub>3</sub> - 2), 1.20 (3H, s, CH<sub>3</sub> - 2), 1.00 (9H, s, t - ブチル);

Mass (FAB<sup>+</sup>) m/z : 508.2394 (M<sup>+</sup> + H), 451, 307, 289, 154, 107;

Anal. calcd for C<sub>28</sub>H<sub>36</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>Si : C, 66.11; H, 7.13; N, 5.51. found : C, 66.08; H, 7.03; N, 5.37.

20

## 【0139】

(2) 2, 2 - ジメチル - 5 - (ウラシル - 9 - イル - メチル) 5 - ヒドロキシメチル - 1, 3 - ジオキサシラン(2, 2 - dimethyl - 5 - (uracil - 9 - ylmethyl) 5 - hydroxymethyl - 1, 3 - dioxane) の製造

2, 2 - ジメチル - 5 - t - ブチル - ジフェニルオキシシルメチル - 5 - (ウラシル - 9 - イル - メチル) - 1, 3 - ジオキサシラン(200 mg、0.39 mmol) に、Ar 置換下、THF (10 ml) 加えて溶解させた。その溶液に TBAF (3 ml) を加え、その混合物を一晩攪拌した。その混合物から溶媒を留去し、得られた残渣を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl<sub>3</sub> : MeOH = 100 : 1 ~ 20 : 1) で精製して、白色結晶の表題化合物を得た。(収量 94 mg、0.35 mmol、収率 89%)

30

## 【0140】

Mass (EI) m/z : 270.1216 (M<sup>+</sup>) 255, 213, 194, 181, 166;

Anal. calcd for C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> · 1/6 H<sub>2</sub>O : C, 52.74; H, 6.76; N, 10.25. found : C, 52.55; H, 6.43; N, 10.18.

40

## 【0141】

(3) 1 - (2, 2 - ジヒドロキシメチル - 3 - ヒドロキシプロピル) ウラシル(1 - (2, 2 - dihydroxymethyl - 3 - hydroxypropyl) uracil) の製造

2, 2 - ジメチル - 5 - (ウラシル - 9 - イル - メチル) 5 - ヒドロキシメチル - 1,

50

3 - ジオキサン (34 mg、0.124 mmol) に 30% TFA (10 ml) を加え、その混合物を約 2 時間攪拌した。その混合物に水およびメタノールを加え、その後、混合物から溶媒を除去して減圧乾固した。得られた残渣を、n - ヘキサンおよびエーテルの混合物 (n - ヘキサン : Et<sub>2</sub>O = 1 : 1) から結晶化させ、白色結晶の表題化合物を得た (収量 20 mg、0.087 mmol、収率 70%)。

## 【0142】

Mass (EI) m/z : 230.0903 (M<sup>+</sup>) 212, 200, 182, 166, 152 ;

Anal. calcd for C<sub>13</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> : C, 46.95 ; H, 6.13 ; N, 12.17. found : C, 46.82 ; H, 5.97 ; N, 11.97.

10

## 【0143】

(実施例 4)

1 - (2, 2 - ジヒドロキシメチル - 3 - ヒドロキシプロピル) シトシンの製造

## 【0144】

(1) 2, 2 - ジメチル - 5 - t - ブチル - ジフェニルオキシシルメチル - 5 - (シトシン - 9 - イル - メチル) - 1, 3 - ジオキサン (2, 2 - dimethyl - 5 - t - Butyl - diphenyloxymethyl - 5 - (cytosine - 9 - yl - methyl) - 1, 3 - dioxan) の製造

2, 2 - ジメチル - 5 - t - ブチル - ジフェニルシリルオキシシルメチル - 5 - トルエン スルホニルメチル - 1, 3 - ジオキサン (2.80 g、4.92 mmol)、シトシン (1.09 g、9.84 mmol)、炭酸カリウム (0.82 g、5.91 mmol) および 18 - クラウン - 6 - エーテル (1.56 g、5.91 mmol) をそれぞれ一晩真空乾燥させた。それらを、DMF (30 ml) および DMSO (10 ml) に溶解させ、その溶液を 60 で 4 日間加熱した。反応混合物から溶媒を留去し、得られた残渣に n - ヘキサンおよび酢酸エチルの混合物 (n - Hex : EtOAc = 1 : 1) および水を加え、抽出した。得られた有機層を、飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した。有機層から溶媒を留去し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl<sub>3</sub> : MeOH = 100 : 1 ~ 20 : 1) で精製して、白色結晶の表題化合物を得た。(収量 1.20 g、2.37 mmol、収率 48%)

20

## 【0145】

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) ; 7.65 (4H, m, フェニル), 7.40 (6H, m, フェニル), 7.26 (1H, s, 2 - CH), 5.32 (1H, d, J = 6.8 Hz 3 - CH), 3.78 (8H, m, CH<sub>2</sub>), 1.65 (2H, s, 4 - NH<sub>2</sub>), 1.43 (3H, s, CH<sub>3</sub> - 2), 1.34 (3H, s, CH<sub>3</sub> - 2), 1.11 (9H, s, ter - ブチル) ;

Mass (EI) m/z : 507.2553 (M<sup>+</sup>) 492, 450, 392, 362, 292 ;

Anal. calcd for C<sub>28</sub>H<sub>37</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>Si · 1/6 Hex : C, 66.72 ; H, 7.59 ; N, 8.05. found : C, 66.68 ; H, 7.53 ; N, 7.85.

30

40

## 【0146】

(2) 2, 2 - ジメチル - 5 - (シトシン - 9 - イル - メチル) 5 - ヒドロキシメチル - 1, 3 - ジオキサン (2, 2 - dimethyl - 5 - (cytosine - 9 - yl - methyl) 5 - hydroxymethyl - 1, 3 - dioxan) の製造

2, 2 - ジメチル - 5 - t - ブチル - ジフェニルオキシシルメチル - 5 - (シトシン - 9 - イル - メチル) - 1, 3 - ジオキサン (200 mg、0.39 mmol) に、Ar 置換下、THF (10 ml) を加えて溶解させた。その溶液に TBAF (1 ml) を加え、その混合物を約 2 時間攪拌した。その混合物から溶媒を留去し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl<sub>3</sub> : MeOH = 100 : 1 ~ 20 : 1) で精製して、白色結晶の表題化合物を得た。(収量 95 mg、0.35 mmol、収率 91%)

50

Mass (EI) m/z : 269 . 1376 (M<sup>+</sup>) 254 , 211 , 201 , 182 , 164 .

【0147】

(3) 1 - (2, 2 - ジヒドロキシメチル - 3 - ヒドロキシプロピル) シトシン (1 - (2, 2 - dihydroxymethyl - 3 - hydroxypropyl) cytosine) の製造

2, 2 - ジメチル - 5 - (シトシン - 9 - イル - メチル) 5 - ヒドロキシメチル - 1, 3 - ジオキサ (34 mg、0.122 mmol) に 30% TFA (10 ml) を加え、その混合物を約 2 時間攪拌した。その混合物に水およびメタノールを加え、その後、混合物から溶媒を除去して減圧乾固した。得られた残渣を、n - ヘキサンおよびエーテルの混合物 (n - ヘキサン : Et<sub>2</sub>O = 1 : 1) から結晶化させ、白色結晶の表題化合物を得た (収量 20 mg、0.087 mmol、収率 69%)。

10

【0148】

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO - d<sub>6</sub>) ; 7.66 (1H, s, 6 - CH), 5.85 (1H, s, CH - 5), 4.63 (3H, s, OH - 2, 2, 3), 3.69 (2H, s, NH<sub>2</sub> - 2), 3.24 (8H, s, CH<sub>2</sub> - 1, 2, 2, 3) .

【0149】

(実施例 5)

1 - (2, 2 - ジヒドロキシメチル - 3 - ヒドロキシプロピル) チミンの製造

【0150】

(1) 2, 2 - ジメチル - 5 - t - ブチル - ジフェニルオキシシルメチル - 5 - (チミン - 9 - イル - メチル) - 1, 3 - ジオキサ (2, 2 - dimethyl - 5 - t - Buthyl - diphenyloxydimethyl - 5 - (thymine - 9 - ylmethyl) - 1, 3 - dioxan) の製造

2, 2 - ジメチル - 5 - t - ブチル - ジフェニルシリルオキシシルメチル - 5 - トルエンシルホニルメチル - 1, 3 - ジオキサ (2.80 g、4.92 mmol)、チミン (1.24 g、9.84 mmol)、炭酸カリウム (0.82 g、5.91 mmol) および 18 - クラウン - 6 - エーテル (1.56 g、5.91 mmol) をそれぞれ一晩真空乾燥させた。それらを、DMF (30 ml) および DMSO (10 ml) に溶解させ、その溶液を 60 で 4 日間加熱した。反応混合物から溶媒を除去し、得られた残渣に n - ヘキサンおよび酢酸エチルの混合物 (n - Hex : EtOAc = 1 : 1) および水を加え、抽出した。得られた有機層を、飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した。有機層から溶媒を除去し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl<sub>3</sub> : MeOH = 100 : 1 ~ 20 : 1) で精製して、白色結晶の表題化合物を得た。(収量 1.25 g、2.41 mmol、収率 49%)

20

30

【0151】

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) ; 8.16 (1H, s, NH - 3), 7.62 (4H, m, フェニル), 7.42 (6H, m, フェニル), 7.13 (1H, s, 6 - CH), 3.69 (8H, m, CH<sub>2</sub>), 1.72 (3H, s, 5 - Me), 1.43 (3H, s, CH<sub>3</sub> - 2), 1.32 (3H, s, CH<sub>3</sub> - 2), 1.12 (9H, s, ter - ブチル) ;

40

Mass (FAB<sup>+</sup>) m/z : 522 . 2550 (M<sup>+</sup> + H), 465 , 307 , 154 ;

Anal. calcd for C<sub>29</sub>H<sub>38</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>Si : C, 66.64 ; H, 7.33 ; N, 5.36 . found : C, 66.50 ; H, 7.20 ; N, 5.29 .

【0152】

(2) 2, 2 - ジメチル - 5 - (チミン - 9 - イル - メチル) 5 - ヒドロキシメチル - 1, 3 - ジオキサ (2, 2 - dimethyl - 5 - (thymine - 9 - ylmethyl) 5 - hydroxymethyl - 1, 3 - dioxan) の製造

2, 2 - ジメチル - 5 - t - ブチル - ジフェニルオキシシルメチル - 5 - (チミン - 9 -

50

イル - メチル) - 1, 3 - ジオキサン (200 mg、0.38 mmol) に、Ar 置換下、THF (10 ml) を加えて溶解させた。その溶液に TBAF (3 ml) を加え、その混合物を一晩攪拌した。その混合物から溶媒を留去し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl<sub>3</sub> : MeOH = 100 : 1 ~ 20 : 1) で精製して、白色結晶の表題化合物を得た。(収量 101 mg、0.35 mmol、収率 94%)

## 【0153】

Mass (EI) m/z : 284.1372 (M<sup>+</sup>) 269, 233, 208, 195, 180;

Anal. calcd for C<sub>13</sub>H<sub>2</sub>ON<sub>2</sub>O<sub>5</sub> · 1/5 H<sub>2</sub>O : C, 54.23; H, 7.14; N, 9.73. found : C, 54.30; H, 6.90; N, 9.65.

10

## 【0154】

(3) 1 - (2, 2 - ジヒドロキシメチル - 3 - ヒドロキシプロピル) チミン (1 - (2, 2 - dihydroxymethyl - 3 - hydroxypropyl) thymine) の製造

2, 2 - ジメチル - 5 - (チミン - 9 - イル - メチル) 5 - ヒドロキシメチル - 1, 3 - ジオキサン (48 mg、0.166 mmol) に 30% TFA (10 ml) を加え、その混合物を約 2 時間攪拌した。その混合物に水およびメタノールを加え、その後、混合物から溶媒を除去して減圧乾固した。得られた残渣を、n - ヘキサンおよびエーテルの混合物 (n - ヘキサン : Et<sub>2</sub>O = 1 : 1) から結晶化させ、白色結晶の表題化合物を得た (収量 28 mg、0.114 mmol、収率 67%)。

20

## 【0155】

Mass (EI) m/z : 244.1059 (M<sup>+</sup>), 195, 180, 152, 126, 96;

Anal. calcd for C<sub>13</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> · 1/5 H<sub>2</sub>O : C, 48.46; H, 6.67; N, 11.30. found : C, 48.04; H, 6.27; N, 11.36.

## 【0156】

(実施例 6)

1 - (2, 2 - ジヒドロキシメチル - 3 - ヒドロキシプロピル) 5 - フルオロウラシルの製造

30

## 【0157】

(1) 2, 2 - ジメチル - 5 - t - ブチル - ジフェニルシリルメチル - 5 - (5 - フルオロウラシル - 1 - イル - メチル) - 1, 3 - ジオキサン (2, 2 - dimethyl - 5 - t - Butyl - diphenylsilylmethyl - 5 - (5 - fluorouracil - 1 - yl - methyl) - 1, 3 - dioxan) の製造

2, 2 - ジメチル - 5 - t - ブチル - ジフェニルシリルオキシメチル - 5 - トルエンシルホニルメチル - 1, 3 - ジオキサン (2.23 g、3.92 mmol) の DMF (50 ml) 溶液を、予め真空乾燥させておいた 5 - フルオロウラシル (0.765 g、5.88 mmol)、60% NaH (0.235 g、5.88 mmol) および 18 - クラウン - 6 - エーテル (1.06 g、3.99 mmol) の混合物にゆっくり滴下した。得られた混合物を、Ar 雰囲気下、約 85 ° で 24 時間攪拌した。その混合物に n - ヘキサンおよび酢酸エチルの混合物 (酢酸エチル : ヘキサン = 1 : 1) ならびに水を加えて、抽出した。得られた有機層を、飽和 NaCl 水溶液、飽和 NaHCO<sub>3</sub> 水溶液で順次洗浄し、乾燥させた。その有機層から溶媒を減圧留去した後、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (n - Hex : EtOAc = 20 : 1 ~ 0 : 1) で精製して、白色結晶の表題化合物を得た。(156 mg, 0.296 mmol, 8%)

40

## 【0158】

<sup>1</sup>H NMR (DMSO - d<sub>6</sub>, 400 MHz) : 11.8 (1H, s, NH), 7.81 (1H, d, J = 6.4 Hz, CH - ウラシル - 6), 7.66 (4H, m, Phe

50

), 7.44 (6H, m, Phe), 3.67 (8H, m, CH<sub>2</sub>-4, 5, 5, 6), 1.31 (4H, m, CH<sub>3</sub>-2), 1.18 (2H, m, CH<sub>3</sub>-2), 1.00 (9H, s, t-ブチル).

【0159】

(2) 1-(2-t-ブチル-ジフェニルシリルメチル-2-ヒドロキシメチル-3-ヒドロキシプロピル)5-フルオロウラシル(1-(2-t-Buthyl-diphenylsilylmethyl-2-hydroxymethyl-3-hydroxypropyl)5-fluorouracil)の製造

2,2-ジメチル-5-t-ブチル-ジフェニルシリルメチル-5-(5-フルオロウラシル-1-イル-メチル)-1,3-ジオキサソ(151mg、0.287mmol)に30%酢酸を40ml加え、その混合物を約70℃で3時間加熱した。その混合物から溶媒を減圧留去し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(CHCl<sub>3</sub>:MeOH=50:1~30:1)で精製して、無色透明オイル状の表題化合物を得た。(41.6mg、0.0855mmol、30%)

10

【0160】

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz) : 9.29 (1H, s, NH), 7.64 (5H, m, Phe, CH-ウラシル-6), 7.44 (6H, m, Phe), 3.92 (2H, s, OH-2, 3), 3.56 (2H, s, CH<sub>2</sub>-2), 3.47 (2H, d, J=10.8Hz, CH<sub>2</sub>-1), 3.32 (4H, d, J=13.2Hz, CH<sub>2</sub>-2, 3), 1.12 (9H, s, t-ブチル).

20

【0161】

(3) 1-(2,2-ジヒドロキシメチル-3-ヒドロキシプロピル)5-フルオロウラシル(1-(2,2-dihydroxymethyl-3-hydroxypropyl)5-fluorouracil)の合成

1-(2-t-ブチル-ジフェニルシリルメチル-2-ヒドロキシメチル-3-ヒドロキシプロピル)5-フルオロウラシル(41.6mg、0.0855mmol)のTHF溶液へ、TBAF(0.15ml)を加え、その溶液を2時間攪拌した。その溶液から溶媒を減圧留去し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(CHCl<sub>3</sub>:MeOH=50:1~10:1)で精製して、白色結晶の表題化合物を得た。(14.2mg、0.057mmol、67%)

30

【0162】

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz) : 9.29 (1H, s, NH), 7.64 (5H, m, Phe, CH-ウラシル-6), 7.44 (6H, m, Phe), 3.92 (2H, s, OH-2, 3), 3.56 (2H, s, CH<sub>2</sub>-2), 3.47 (2H, d, J=10.8Hz, CH<sub>2</sub>-1), 3.32 (4H, d, J=13.2Hz, CH<sub>2</sub>-2, 3).

【0163】

(実施例7)

1-(2,2-ジヒドロキシメチル-3-ヒドロキシプロピル)5-フルオロシトシンの製造

40

【0164】

(1) 2,2-ジメチル-5-t-ブチル-ジフェニルシリルメチル-5-(5-フルオロシトシン-1-イル-メチル)-1,3-ジオキサソ(2,2-dimethyl-5-t-Buthyl-diphenylsilylmethyl-5-(5-Fluorocytosine-1-yl-methyl)-1,3-dioxan)の製造

2,2-ジメチル-5-t-ブチル-ジフェニルシリルオキシメチル-5-トルエンシルホニルメチル-1,3-ジオキサソ(1.67g、2.93mmol)のDMF(35ml)溶液を、予め真空乾燥させておいた5-フルオロシトシン(0.568g、4.40mmol)、60% NaH(0.176g、4.40mmol)および18-クラウン-6-エーテル(0.790g、2.99mmol)の混合物にゆっくり滴下した。

50

得られた混合物を、Ar雰囲気下、約75℃で48時間攪拌した。その混合物に、n-ヘキサンおよび酢酸エチルの混合物（酢酸エチル：ヘキサン=1：1）ならびに水を加えて、抽出した。得られた有機層を、飽和NaCl水溶液、飽和NaHCO<sub>3</sub>水溶液で順次洗浄し、乾燥させた。その有機層から溶媒を減圧留去した後、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（n-Hex：EtOAc=10：1～0：1）で精製して、白色結晶の表題化合物を得た。（352mg、0.669mmol、23%）

## 【0165】

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) : 9.29 (1H, s, NH), 7.64 (5H, m, Phe, CH-ウラシル-6), 7.44 (6H, m, Phe), 3.92 (2H, s, OH-2, 3), 3.56 (2H, s, CH<sub>2</sub>-2), 3.47 (2H, d, J=10.8 Hz, CH<sub>2</sub>-1), 3.32 (4H, d, J=13.2 Hz, CH<sub>2</sub>-2, 3), 1.12 (9H, s, t-ブチル).

10

## 【0166】

(2) 1-(2-t-ブチル-ジフェニルシリルメチル-2-ヒドロキシメチル-3-ヒドロキシプロピル)5-フルオロシトシン(1-(2-t-Buthyl-diphenylsilylmethyl-2-hydroxymethyl-3-hydroxypropyl)5-fluorocytosine)の製造

2,2-ジメチル-5-t-ブチル-ジフェニルシリルメチル-5-(5-フルオロシトシン-1-イル-メチル)-1,3-ジオキサン(352mg、0.669mmol)に30%酢酸(50ml)を加え、その混合物を約70℃で4時間加熱した。この混合物から溶媒を減圧留去し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（CHCl<sub>3</sub>：MeOH=50：1～30：1）で精製して、無色透明オイル状の化合物を得た。その化合物に、n-ヘキサンとジエチルエーテルを加えて結晶を析出させ、白色結晶の表題化合物を得た。（171mg、0.351mmol、52%）

20

## 【0167】

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) : 9.29 (1H, s, NH), 7.64 (5H, m, Phe, CH-ウラシル-6), 7.44 (6H, m, Phe), 3.92 (2H, s, OH-2, 3), 3.56 (2H, s, CH<sub>2</sub>-2), 3.47 (2H, d, J=10.8 Hz, CH<sub>2</sub>-1), 3.32 (4H, d, J=13.2 Hz, CH<sub>2</sub>-2, 3), 1.12 (9H, s, t-ブチル).

30

## 【0168】

(3) 1-(2,2-ジヒドロキシメチル-3-ヒドロキシプロピル)5-フルオロシトシン(1-(2,2-dihydroxymethyl-3-hydroxypropyl)5-fluorocytosine)の製造

1-(2-t-ブチル-ジフェニルシリルメチル-2-ヒドロキシメチル-3-ヒドロキシプロピル)5-フルオロシトシン(171mg、0.351mmol)のTHF溶液へ、TBAF(0.70ml)を加えて、その混合物を2時間攪拌した。その混合物から溶媒を減圧留去し、得られた残渣へエタノールを加えて結晶を析出させて、白色結晶の表題化合物を得た。（32.0mg、0.129mmol、37%）

40

## 【0169】

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz) : 11.3 (1H, s, NH), 7.40 (1H, s, CH-ウラシル-6), 3.62 (3H, br, OH-2, 2, 3), 3.27 (8H, m, CH<sub>2</sub>-4, 5, 5, 6), 1.72 (3H, s, CH<sub>3</sub>-チミン).

## 【0170】

(実施例8)

9-[2-(2-ジアミノエトキシ-N,N-ジイソプロピルアミノホスフェイニルオキシメチル-2-(4,4'-ジメトキシトリチルオキシ)-3-tert-ブチルジフェニルシリルオキシ)プロピル]-N<sup>6</sup>-ベンゾイル-アデニン(9-[2-(2-cyanoethoxy-N,N-diisopropylaminophosphimyl

50

oxymethyl - 2 - ( 4 , 4 ' - dimethoxytrityloxy ) - 3 - tert - butyldiphenylsilyloxy ) propyl ] - N<sup>6</sup> - benzoyladenine ) の製造

【 0 1 7 1 】

( 1 ) 2 , 2 - ジメチル - 5 - t - ブチル - ジフェニルシリルオキシメチル - 5 - ( N<sup>6</sup> - ベンゾイルアデニン - 9 - イル - メチル ) - 1 , 3 - ジオキサ ( 2 , 2 - Dimethyl - 5 - t - butyl - diphenylsilyloxy methyl - 5 - ( N<sup>6</sup> - benzoyladenine - 9 - yl - methyl ) - 1 , 3 - dioxan ) の製造

実施例 1 ( 4 ) で得られた 2 , 2 - ジメチル - 5 - t - ブチル - ジフェニルシリルオキシメチル - 5 - ( アデニン - 9 - イル - メチル ) - 1 , 3 - ジオキサ ( 2 1 3 0 m g 、 4 . 0 1 m m o l ) をピリジン ( 4 0 m l ) に溶解させ、その溶液へ、氷冷下にてベンゾイルクロリド ( 5 6 0 μ l 、 4 . 8 1 m m o l ) を滴下した。室温で 1 6 時間攪拌した後、その混合物にメタノールを加えて過剰の試薬を分解した。得られた残渣にトルエンを共存させ、減圧濃縮してピリジンを除去した。得られたシロップにクロロホルムを加え、クロロホルム層を 2 N 塩酸、飽和炭酸水素ナトリウム溶液、飽和食塩水にて順次洗浄した。硫酸ナトリウムにより乾燥した後、そのクロロホルム層を減圧下で濃縮した。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 : ヘキサン = 2 : 1 ) で精製して、白色粉末の標題化合物を得た ( 収量 1 5 3 0 m g 、 2 . 4 1 m m o l 、 収率 6 0 % )

10

20

【 0 1 7 2 】

<sup>1</sup>H - NMR ( 4 0 0 M H z , C D C l <sub>3</sub> ) : 1 1 . 1 ( s , 1 H , N H ) , 8 . 6 6 ( s , 1 H , H - 8 ) , 8 . 3 0 ( s , 1 H , H - 2 ) , 8 . 0 5 - 7 . 4 1 ( m , 1 5 H , P h - C O , 2 P h - S i ) , 4 . 3 7 ( s , 2 H , C H <sub>2</sub> - N ) 3 . 7 6 ( 2 d , 4 H , 2 C H <sub>2</sub> - O - C ) , 1 . 2 5 , 1 . 2 1 ( 2 s , 6 H , 2 C H <sub>3</sub> - C ) 0 . 9 7 ( s , 9 H , tert - ブチル ) .

【 0 1 7 3 】

( 2 ) 9 - ( 2 , 2 - ヒドロキシメチル - 3 - tert - ブチルジフェニルシリルオキシプロピル ) - N<sup>6</sup> - ベンゾイル - アデニン ( 9 - ( 2 , 2 - Hydroxymethyl - 3 - tert - butyldiphenylsilyloxypropyl ) - N<sup>6</sup> - benzoyl - adenine ) の製造

2 , 2 - ジメチル - 5 - t - ブチル - ジフェニルシリルオキシメチル - 5 - ( N<sup>6</sup> - ベンゾイルアデニン - 9 - イル - メチル ) - 1 , 3 - ジオキサ ( 1 6 0 0 m g 、 2 . 5 2 m m o l ) のメタノール ( 2 0 m l ) 溶解に、p - トルエンスルホン酸一水和物 ( 5 0 0 m g 、 2 . 6 3 m m o l ) を加えて、その混合物を室温にて 4 8 時間攪拌した。TLC ( クロロホルム : メタノール = 1 0 : 1 ) により、前記混合物中の原料の消失を確認後、前記混合物にトリエチルアミンを加えて中和した。前記混合物を減圧下にて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 ( クロロホルム : メタノール = 6 0 : 1 ) で精製して、白色粉末の標題化合物を得た ( 8 9 0 m g 、 1 . 4 9 m m o l 、 収率 5 9 % ) .

30

40

【 0 1 7 4 】

<sup>1</sup>H - NMR ( 4 0 0 M H z , C D C l <sub>3</sub> ) : 9 . 1 2 ( b r s , 1 H , N H ) , 8 . 7 5 ( s , 1 H , H - 8 ) , 8 . 0 9 ( s , 1 H , H - 2 ) , 8 . 0 5 - 7 . 4 1 ( m , 1 5 H , P h - C O , 2 P h - S i ) , 4 . 4 8 ( s , 2 H , C H <sub>2</sub> - N ) 3 . 6 1 ( s , 2 H , C H <sub>2</sub> - O - S i ) , 3 . 4 5 , 3 . 2 6 ( 2 b r d , 4 H , 2 C H <sub>2</sub> - O H ) , 1 . 1 4 ( s , 9 H , tert - ブチル ) .

【 0 1 7 5 】

( 3 ) 9 - [ 2 - ヒドロキシメチル - 2 - ( 4 , 4 ' - ジメトキシトリチルオキシル ) - 3 - tert - ブチルジフェニルシリルオキシプロピル ] - N<sup>6</sup> - ベンゾイル - アデニン ( 9 - [ 2 - Hydroxymethyl - 2 - ( 4 , 4 ' - dimethoxytr

50

ityloxy) - 3 - tert - butyldiphenylsilyloxypropyl] - N<sup>6</sup> - benzoyl - adenine) の製造

9 - (2, 2 - ヒドロキシメチル - 3 - tert - ブチルジフェニルシリルオキシプロピル) - N<sup>6</sup> - ベンゾイル - アデニン (800 mg, 1.34 mmol) のピリジン (20 ml) 溶液に、ジメトキシトリチルクロリド (1360 mg, 4.02 mmol) およびジメチルアミノピリジン (491 mg, 4.02 mmol) を加え、その混合物を室温にて18時間攪拌した。TLCにて前記混合物中の原料の消失を確認後、前記混合物にメタノールを加えて過剰の試薬を分解した。得られた残渣にトルエンを共存させ、減圧濃縮した。得られた残渣を酢酸エチルに溶解させ、前記酢酸エチル溶液を蒸留水で洗浄した。硫酸ナトリウムにより乾燥した後、前記酢酸エチル層を減圧下で濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルム：メタノール = 200 : 1 100 : 1) で精製して、白色粉末の標題化合物を得た (680 mg, 0.76 mmol, 収率57%)。

10

【0176】

<sup>1</sup>H - NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 8.61 (s, 1H, H - 8), 8.04 - 6.76 (m, 30H, 2 Ph - OMe, Ph - C, Ph - CO 2 Ph - Si, H - 2, NH), 4.39 (s, 2H, CH<sub>2</sub>N), 3.71 - 3.69 (m, 8H, CH<sub>2</sub> - O - Si, 2 MeO), 3.45 - 3.37 (m, 4H, CH<sub>2</sub> - O - DMTr, CH<sub>2</sub>OH), 0.90 (s, 9H, tert - ブチル)。

20

【0177】

(4) 9 - [2 - (2 - ジアミノエトキシ - N, N - ジイソプロピルアミノホスフェニルオキシメチル - 2 - (4, 4' - ジメトキシトリチルオキシ) - 3 - tert - ブチルジフェニルシリルオキシ) プロピル] - N<sup>6</sup> - ベンゾイル - アデニン (9 - [2 - (2 - cyanoethoxy - N, N - diisopropylaminophosphoryloxymethyl - 2 - (4, 4' - dimethoxytrityloxy) - 3 - tert - butyldiphenylsilyloxy) propyl] - N<sup>6</sup> - benzoyladenine) の製造

9 - [2 - ヒドロキシメチル - 2 - (4, 4' - ジメトキシトリチルオキシ) - 3 - tert - ブチルジフェニルシリルオキシプロピル] - N<sup>6</sup> - ベンゾイル - アデニン (66.1 mg, 73.6 μmol) のジクロロメタン (0.37 ml) 溶液に、Hunig's base (76 μl, 0.44 mmol) および亜リン酸化試薬 (33 μl, 0.148 mmol) を加えた。TLCにより反応の完結を確認した後、飽和 NaHCO<sub>3</sub> 水溶液を前記混合物に添加して反応を停止させた。前記混合物を、クロロホルムと飽和 NaHCO<sub>3</sub> 水溶液により分液した。得られた有機層を減圧濃縮し、その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：ヘキサン = 2 : 1) で精製し、標題化合物を得た (44.4 mg, 44 μmol, 収率60%)。

30

【0178】

<sup>31</sup>P NMR (400 MHz, DMSO - d<sub>6</sub>) [ppm] : 147.47 ppm.

【0179】

(実施例9)

塩基配列の中央部に、ヌクレオシド類似体を1つ導入した配列番号1 (下記に示す塩基配列参照) (ただし、ヌクレオシド類似体は、tert - ブチルジフェニルシリル基を有する) からなる一本鎖のオリゴヌクレオチド類似体の製造

40

【化30】

5' - d (AAG GAA AA\*G AGG AAA GA) - 3'

【0180】

配列番号1の塩基配列に従い、核酸自動合成機およびCPG樹脂を用いるホスホロアミダイト法によりオリゴヌクレオチド類似体 (DNAタイプ) を製造した。塩基配列中、A\*で示す配列には、実施例8で製造した9 - [2 - (2 - ジアミノエトキシ - N, N - ジ

50

イソプロピルアミノホスフェイニルオキシメチル - 2 - ( 4 , 4 ' - ジメトキシトリチルオキシ ) - 3 - tert - ブチルジフェニルシリルオキシ ) プロピル ] - N<sup>6</sup> - ベンゾイル - アデニンをヌクレオシドモノマーとして用いて導入した。他の配列には、デオキシリボースタイプのヌクレオシドを用いて導入した。1 μmol の固相合成用 C P G 樹脂を使用し、各縮合時間は、1分とした。

【 0 1 8 1 】

前記 C P G 樹脂に結合した配列番号 1 のオリゴヌクレオチド類似体は、ベンゾイル基および 1 - tert - ブチルジフェニルシリルオキシ基で保護された状態で核酸自動合成機による合成を終了した。

【 0 1 8 2 】

前記 C P G 樹脂に結合したオリゴヌクレオチドは、28%アンモニア水溶液 ( 1 . 5 mL ) 中で 55 で 12 時間反応させた。反応混合物を減圧下で濃縮した。得られた濃縮物に、T B A F 溶液 ( 1 mL ) を加え、その混合物を 12 時間室温で攪拌して、前記シリル基を脱保護した。その後、得られた混合物を、0 . 1 M T E A A 緩衝液 ( 30 mL ) で希釈した。この混合物を C - 18 逆相カラムクロマトグラフィー ( S e p - P a k ) ( 溶出液 : 水中、50% C H<sub>3</sub> C N ( 2 mL ) ) により精製して、目的とする一本鎖のオリゴヌクレオチド類似体を得た。

M A L D I - T O F / M S 計算値 : 5 5 9 8 . 9 6、実測値 : 5 5 9 4 . 0 3。

【 0 1 8 3 】

前記実施例 9 において用いた、0 . 1 M の T E A A 緩衝液は、以下のようにして調製した。まず、2 N の酢酸 ( 1 1 4 . 3 8 mL ) およびトリエチルアミン ( 2 7 7 . 6 mL ) の混合物に、水を加えて 1 L にした。その溶液に酢酸を加えて、p H を 7 . 0 に調整し、次いでその溶液を 20 倍に希釈することにより調製した。

【 0 1 8 4 】

( 参考例 1 )

配列番号 1 の代わりに配列番号 2 ( 下記に示す塩基配列参照 ) の塩基配列に従い、実施例 9 と同様にして一本鎖オリゴヌクレオチドを得た。

【 化 3 1 】

5' -d (TC TTT CCT CTT TTC CTT) -3'

【 0 1 8 5 】

( 実施例 10 )

実施例 9 で製造した配列番号 1 からなるオリゴヌクレオチド類似体 ( 0 . 8 n m m o l ) を、アニーリングバッファー ( 10 m M のリン酸ナトリウム塩 ( p H 7 . 0 ) および 1 M の N a C l ) 中に溶解させた。その溶液を 90 で 1 分間、次いで 37 で 1 時間の間、インキュベートして、下記に示す塩基配列のような、配列番号 1 からなるオリゴヌクレオチド類似体と配列番号 2 からなるオリゴヌクレオチドとからなる、二本鎖オリゴヌクレオチド類似体を得た。

【 化 3 2 】

5' -d (AAG GAA AA\*G AGG AAA GA) -3'  
3' -d (TTC CTT TTC TCC TTT CT) -5'

【 0 1 8 6 】

( 比較例 1 )

配列番号 1 の代わりに配列番号 3 ( 下記に示す塩基配列参照 ) の塩基配列に従い、実施例 9 と同様にして、一本鎖のオリゴヌクレオチドを製造した。

【 0 1 8 7 】

【 化 3 3 】

5' -d (AAG GAA AAG AGG AAA GA) -3'

10

20

30

40

50

## 【0188】

(比較例2)

実施例9で製造した配列番号1からなるオリゴヌクレオチド類似体の代わりに、比較例1で製造した配列番号3からなるオリゴヌクレオチドを用いて、実施例10と同様にして、下記に示すような、配列番号3からなるオリゴヌクレオチドと、配列番号2からなるオリゴヌクレオチドをからなる、二本鎖オリゴヌクレオチド類似体を得た。

## 【0189】

【化34】



10

## 【0190】

(二本鎖の安定性)

実施例10で製造した二本鎖オリゴヌクレオチド類似体および比較例2で製造した二本鎖オリゴヌクレオチドについて、測定したそれぞれのT<sub>m</sub>値を、以下の表1に示す。

## 【0191】

【表1】

	T <sub>m</sub> 値 (°C)
実施例10	49.1
比較例2	57.7

20

## 【0192】

前記表1に示すように、本発明のヌクレオシド類似体で1箇所の塩基が置き換えられたオリゴヌクレオチド類似体(ただし、ヌクレオシド類似体は、tert-ブチルジフェニルシリル基を有する)が二本鎖の形成能を有することを、確認できた。

## 【0193】

(実施例11)

実施例9で製造した配列番号1からなるオリゴヌクレオチド類似体(100 pmol)を、10×PNK緩衝液(2 μL)、6 unit/μLのT4ポリヌクレオチドキナーゼ(E. coli A19)(1 μL)、<sup>32</sup>P ATP(1 μL)および滅菌水(16 μL)の混合液中で、氷冷下に、混合し、その後、37°Cで30分間攪拌した。その後、スピンカラムを用いて前記混合物から夾雑物を除去して、5'末端が<sup>32</sup>P同位体で標識された、配列番号1からなるオリゴヌクレオチド類似体を得た。

30

## 【0194】

(比較例3)

実施例9で製造した配列番号1からなるオリゴヌクレオチド類似体の代わりに、比較例1で製造した配列番号3からなるオリゴヌクレオチドを用いた以外は、実施例11と同様にして、5'末端が<sup>32</sup>P同位体で標識された、配列番号3からなるオリゴヌクレオチドを得た。

40

## 【0195】

(ヌクレアーゼ耐性)

一本鎖オリゴヌクレオチド類似体のエキソヌクレアーゼ耐性の評価

実施例11で得られた配列番号1からなる一本鎖オリゴヌクレオチド類似体、比較例3で得られた配列番号3からなる天然型的一本鎖オリゴヌクレオチドの、エキソヌクレアーゼ耐性を評価した。エキソヌクレアーゼとしては、ヘビ毒ホスホロジエステラーゼ(SVP)を使用した。SVPは、リン酸ジエステル結合を選択的に切断しオリゴヌクレオチドを5'-モノリン酸ヌクレオチドに分解する。なお、10 μMの一本鎖オリゴヌクレオチド類似体溶液は、実施例11で製造した配列番号1からなる一本鎖オリゴヌクレオチド類似体(100 pmol)に、未標識の実施例9で製造した配列番号1からなる一本鎖オリ

50

ゴヌクレオチド類似体 (400 pmol) を加え、滅菌水を用いて、10 μM に調整して製造した。10 μM の一本鎖オリゴヌクレオチド溶液も、前記と同様にして製造した。

【0196】

以下に示す組成の反応溶液から、1、5、10、15、30分後に、ローディング溶液 (7M urea XC BPB; 5 μL) を含む各エッペンドルフチューブに、反応液 (5 μL) をサンプリングして反応を停止させた。なお、0分後のサンプルは、SVP水溶液を加えていないものである。得られた各時間におけるサンプルを、20%ウレア入りPAGEにより電気泳動させて、ゲル中で分離した。前記ゲルを、イメージングプレートと接触させて、前記ゲル中の分離されたイメージを転写した。このイメージをバイオイメージングアナライザー (商品名: BAS2000、富士写真フィルム株式会社製) を用いて取り込み、RIイメージ解析ソフトにより画像処理した。その結果を図1に示す。

10

【0197】

一本鎖オリゴヌクレオチド類似体 (実施例11) の反応溶液の組成

一本鎖オリゴヌクレオチド類似体 (最終濃度10 μM)	4 μL
緩衝液 (250mM Tris-HCl, 50mM MgCl <sub>2</sub> (pH7.0))	6 μL
1units/mL SVP水溶液	4 μL
<u>滅菌水</u>	<u>26 μL</u>
計	40 μL

20

【0198】

一本鎖オリゴヌクレオチド (比較例3) の反応溶液の組成

一本鎖オリゴヌクレオチド (最終濃度10 μM)	4 μL
緩衝液 (250mM Tris-HCl, 50mM MgCl <sub>2</sub> (pH7.0))	6 μL
1units/mL SVP水溶液	4 μL
<u>滅菌水</u>	<u>26 μL</u>
計	40 μL

30

【0199】

前記図1に示すように、一本鎖オリゴヌクレオチド類似体 (ただし、ヌクレオシド類似体は、tert-ブチルジフェニルシリル基を有する) は、天然型一本鎖オリゴヌクレオチドと比較して、エキソヌクレアーゼ耐性が向上していることが確認された。また、前記図1に示すように、前記一本鎖オリゴヌクレオチド類似体は、サイト1のみならず、サイト2においても、ヌクレアーゼ耐性を示すことが確認された。このサイト1は、前記ヌクレオシド類似体と、天然のヌクレオシドとの間の結合部位である。サイト2は、天然のヌクレオシド間の結合部位であるが、一方の天然のヌクレオシド結合部位は、前記ヌクレオシド類似体と結合している。そのため、本発明のヌクレオシド類似体は、その隣接するヌクレオシドとの結合部位のみならず、離れた位置にあるヌクレオシド間の結合部位のヌクレアーゼ耐性も向上させることが、確認された。

40

【産業上の利用可能性】

【0200】

本発明のヌクレオシド類似体は、例えば、検査キット用オリゴヌクレオチドを製造する

50

ためのヌクレオシドとして有用である。

【配列表フリーテキスト】

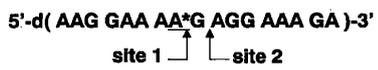
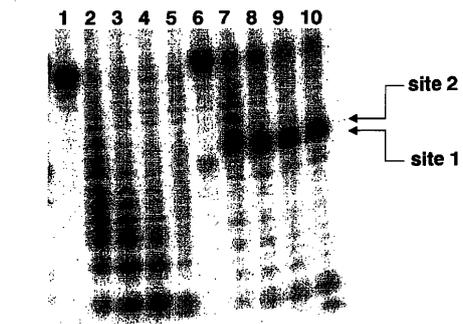
【0201】

配列番号1 オリゴヌクレオチド類似体

配列番号2 オリゴヌクレオチド

配列番号3 オリゴヌクレオチド

【図1】



## 【手続補正書】

【提出日】平成18年2月13日(2006.2.13)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

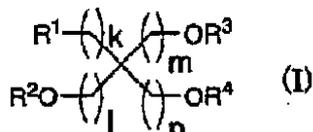
【補正対象項目名】請求項1

【補正方法】変更

## 【補正の内容】

【請求項1】下記式(I)で表されるヌクレオシド類似体またはその塩。

## 【化1】



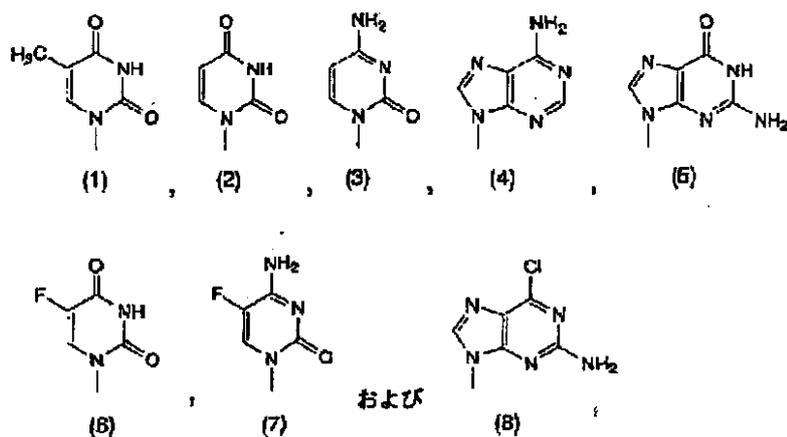
前記式(I)中、 $\text{R}^1$ は、下記式(1)の基、下記式(1)の基において、その官能基が保護基で保護された基、下記式(2)の基、下記式(2)の基において、その官能基が保護基で保護された基、下記式(3)の基、下記式(3)の基において、その官能基が保護基で保護された基、下記式(4)の基、下記式(4)の基において、その官能基が保護基で保護された基、下記式(5)の基、下記式(5)の基において、その官能基が保護基で保護された基、下記式(6)の基、下記式(6)の基において、その官能基が保護基で保護された基、下記式(7)の基、下記式(7)の基において、その官能基が保護基で保護された基、下記式(8)の基、および下記式(8)の基において、その官能基が保護基で保護された基からなる群から選択されるいずれかの基であり、

 $\text{R}^2$ は、Hまたは保護基であり、 $\text{R}^3$ は、Hまたは保護基であり、 $\text{R}^4$ は、Hまたは固相合成用活性化リン酸基であり、

kは、1であり、

l、mおよびnは、互いに独立して、1~10の整数である。

## 【化2】



## 【手続補正2】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】請求項13

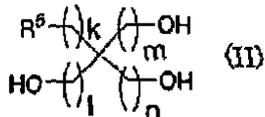
【補正方法】変更

## 【補正の内容】

【請求項13】前記式(I)中、 $\text{R}^1$ が、前記式(1)の基、前記式(1)の基において、その官能基が保護基で保護された基、前記式(2)の基、前記式(2)の基において、その官能基が保護基で保護された基、前記式(3)の基、前記式(3)の基において、その官能基が保護基で保護された基、前記式(4)の基、前記式(4)の基において、その

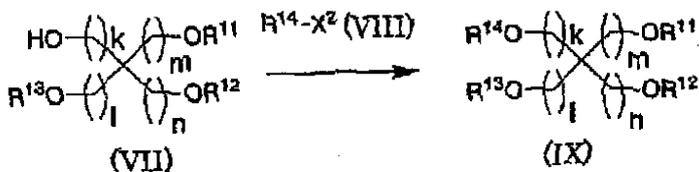
官能基が保護基で保護された基、前記式(5)の基において、その官能基が保護基で保護された基、前記式(6)の基、前記式(6)の基において、その官能基が保護基で保護された基、前記式(7)の基、前記式(7)の基において、その官能基が保護基で保護された基、前記式(8)の基、および前記式(8)の基において、その官能基が保護基で保護された基からなる群から選択されるいずれかの基であり、 $R^2$ 、 $R^3$  および  $R^4$  がHであり、下記式(II)で表される請求項1に記載のヌクレオシド類似体またはその塩の製造方法であって、

【化5】



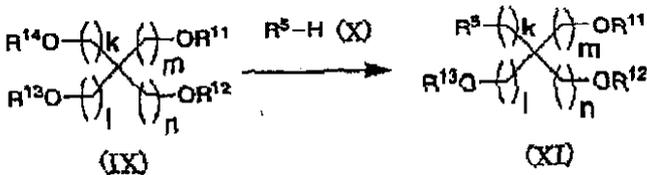
下記式(VII)で表される化合物と、下記式(VIII)で表される化合物とを反応させ、下記式(IX)で表される化合物を得、

【化6】



前記式(IX)で表される化合物と、下記式(X)で表される化合物とを、塩基存在下に縮合させ、下記式(XI)で表される化合物を得、

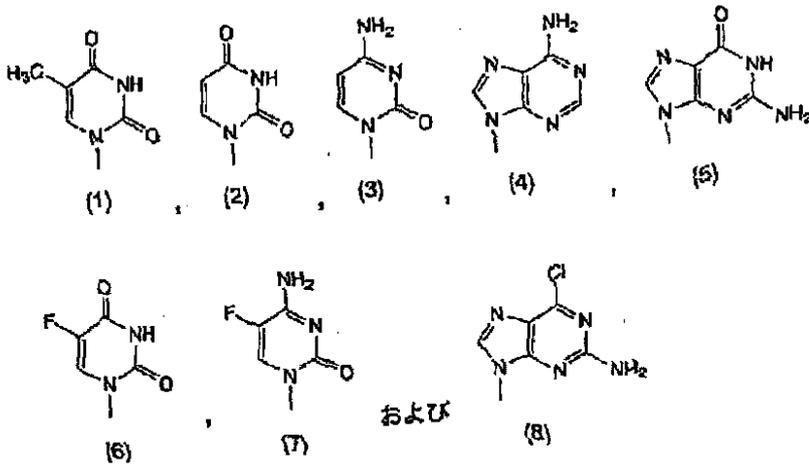
【化7】



前記式(XI)で表される化合物の、 $R^{11}$ 、 $R^{12}$  および  $R^{13}$  を除去することにより、式(II)で表されるヌクレオシド類似体またはその塩を得る製造方法。

前記式中、 $R^5$  は、下記式(1)の基、下記式(1)の基において、その官能基が保護基で保護された基、下記式(2)の基、下記式(2)の基において、その官能基が保護基で保護された基、下記式(3)の基、下記式(3)の基において、その官能基が保護基で保護された基、下記式(4)の基、下記式(4)の基において、その官能基が保護基で保護された基、前記式(5)の基において、その官能基が保護基で保護された基、下記式(6)の基、下記式(6)の基において、その官能基が保護基で保護された基、下記式(7)の基、下記式(7)の基、下記式(8)の基、および下記式(8)の基において、その官能基が保護基で保護された基からなる群から選択されるいずれかの基であり、

【化8】



$R^{11}$  は、保護基であり、

$R^{12}$  および  $R^{13}$  は、一緒になって、式  $-CR^{15}R^{16}-$  で表される基であり、

前記  $R^{15}$  および  $R^{16}$  は、互いに独立して、水素原子、低級アルキル基および低級アルコキシル基からなる群から選択されるいずれかであり、

$R^{14}$  は、式  $-SO_2-R^{17}$  で表される基であり、

前記  $R^{17}$  は、低級アルキルで置換されていてもよいアリール基であり、

$X^2$  は、互いに独立して、ハロゲン原子であり、

$k$  は、1 であり、

$l$ 、 $m$  および  $n$  は、互いに独立して、1 ~ 10 の整数である。

【手続補正3】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

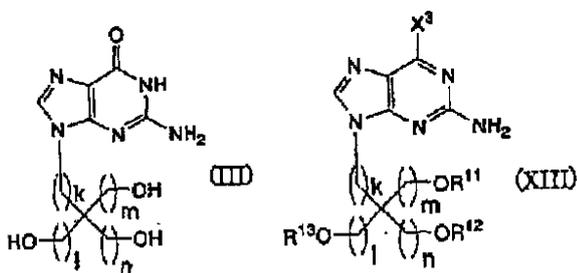
【補正対象項目名】請求項14

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項14】前記式(I)中、 $R^1$  が、前記式(5)の基であり、 $R^2$ 、 $R^3$  および  $R^4$  がHであり、下記式(III)で表される請求項1に記載のヌクレオシド類似体またはその塩の製造方法であって、

【化9】



前記式(XIII)で表される化合物の、 $R^{11}$ 、 $R^{12}$  および  $R^{13}$  を除去すること、および加水分解により、式(III)で表されるヌクレオシド類似体またはその塩を得る製造方法。

前記式中、 $R^{11}$  は、保護基であり、

$R^{12}$  および  $R^{13}$  は、一緒になって、式  $-CR^{15}R^{16}-$  で表される基であり、

前記  $R^{15}$  および  $R^{16}$  は、互いに独立して、水素原子、低級アルキル基および低級アルコキシル基からなる群から選択されるいずれかであり、

$X^3$  は、ハロゲン原子であり、

$k$  は、1 であり、

$l$ 、 $m$  および  $n$  は、互いに独立して、1 ~ 10 の整数である。

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/017168

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07D239/54 (2006.01), A61K31/513 (2006.01), A61P43/00 (2006.01), C07D239/47 (2006.01), C07D473/18 (2006.01), C07D473/34 (2006.01), C07H21/04 (2006.01), C07D473/40 (2006.01), A61K31/7125 (2006.01) 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) C07D239/54 (2006.01), A61K31/513 (2006.01), A61P43/00 (2006.01), C07D239/47 (2006.01), C07D473/18 (2006.01), C07D473/34 (2006.01), C07H21/04 (2006.01), C07D473/40 (2006.01), A61K31/7125 (2006.01)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAPLUS (STN), REGISTRY (STN), JSTPlus (JOIS)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 95/22330 A1 (COMMONWEALTH SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH ORGANIZATION), 24 August, 1995 (24.08.95), Full text & AU 9518010 A & ZA 9501336 A	1, 2, 4, 13, 14
X	BAILEY, S. and HARNDEN, M.R., Analogues of the Antiviral Acyclonucleoside 9-(4-Hydroxy-3- hydroxymethylbutyl) guanine., Part 2. Substitutions on C-1' and C-3' of the Acyclic N-9 Substituent, J.Chem.Soc. Perkin Trans., I, 1988, pages 2767 to 2775	1, 2, 4, 13, 14
<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	"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	
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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	
"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)	"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	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 08 November, 2005 (08.11.05)	Date of mailing of the international search report 22 November, 2005 (22.11.05)	
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer	
Facsimile No.	Telephone No.	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/017168

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2-121992 A (Beecham Group plc), 09 May, 1990 (09.05.90), Full text; particularly, pages 1 to 2; Claims & EP 369583 B1 & PT 91749 A & US 5138057 A & JP 3089354 B2	1, 2, 4, 13, 14
A	Yoshihito UENO et al., "Tobu Kaikangata Adenosine o Fukumu DNA no Gosei to Sono Nihonsa, Sanbonsa Kakusan Keiseino", CSJ: The Chemical Society of Japan Dai 83 Kai Shunki Nenkaï-Koen Yokoshu, No.2, 03 March, 2002 (03.03.02), 2 G8-50, page 1113	1-11

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/017168

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: 12

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 12 pertains to methods for treatment of the human body by therapy and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2.  Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3.  Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2005/017168	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. <sup>7</sup> <b>C07D239/54</b> (2006.01), <b>A61K31/513</b> (2006.01), <b>A61P43/00</b> (2006.01), <b>C07D239/47</b> (2006.01), <b>C07D473/18</b> (2006.01), <b>C07D473/34</b> (2006.01), <b>C07B21/04</b> (2006.01), <b>C07D473/40</b> (2006.01), <b>A61K31/7125</b> (2006.01)			
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> <b>C07D239/54</b> (2006.01), <b>A61K31/513</b> (2006.01), <b>A61P43/00</b> (2006.01), <b>C07D239/47</b> (2006.01), <b>C07D473/18</b> (2006.01), <b>C07D473/34</b> (2006.01), <b>C07B21/04</b> (2006.01), <b>C07D473/40</b> (2006.01), <b>A61K31/7125</b> (2006.01)			
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			
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), REGISTRY (STN), JSTPlus (JOIS)			
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	WO 95/22330 A1 (COMMONWEALTH SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH ORGANIZATION) 1995.08.24, 全文 & AU 9518010 A & ZA 9501336 A	1, 2, 4, 13, 14	
X	BAILEY, S. and HARDEN, M. R., Analogues of the Antiviral Acyclonucleoside 9-(4-Hydroxy-3-hydroxymethylbutyl)guanine. Part 2. Substitutions on C-1' and C-3' of the Acyclic N-9 Substituent, J. Chem. Soc. Perkin Trans. I, 1988, p.2767-2775	1, 2, 4, 13, 14	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		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 08.11.2005		国際調査報告の発送日 22.11.2005	
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) 大久保 元浩	4C 3543
		電話番号 03-3581-1101 内線 3452	

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2005/017168

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
A	JP 2-121992 A (ビーチャム・グループ・ピーエルシー) 1990.05.09, 全文、特に、第 1-2 頁特許請求の範囲参照のこと & EP 369583 B1 & PT 91749 A & US 5138057 A & JP 3089354 B2	1, 2, 4, 13, 14
A	上野義仁 他, 糖部開環型アデノシンを含むDNAの合成とその二 本鎖、三本鎖核酸形成能, 日本化学会第 83 春季年会—講演予稿集 No. 2, 2003 年 3 月 3 日, 2 G8-50, p. 1113	1-11

様式 PCT/ISA/210 (第 2 ページの続き) (2005 年 4 月)

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2005/017168

## 第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1.  請求の範囲 12 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、請求の範囲12は、治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
2.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1.  出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2.  追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3.  出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4.  出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付を伴う異議申立てがなかった。

様式PCT/ISA/210 (第1ページの続業(2)) (2005年4月)

## フロントページの続き

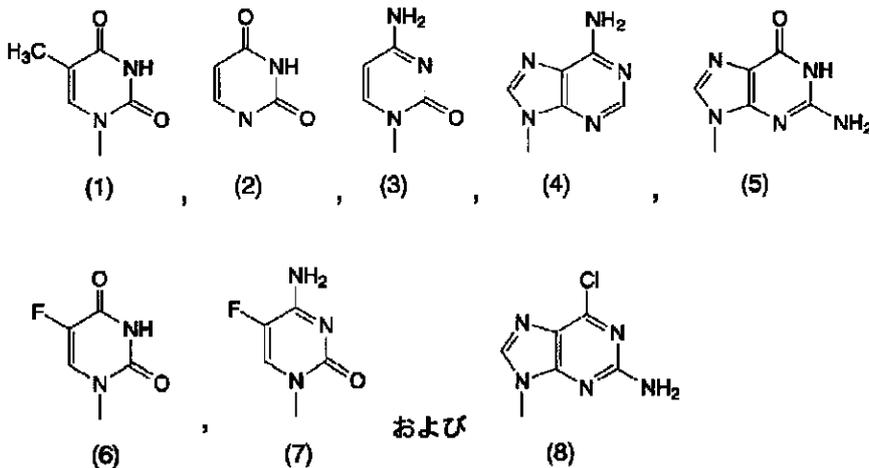
(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 D 239/47 (2006.01)	C 0 7 D 239/47	Z
A 6 1 K 31/505 (2006.01)	A 6 1 K 31/505	
A 6 1 K 31/52 (2006.01)	A 6 1 K 31/52	
A 6 1 K 31/522 (2006.01)	A 6 1 K 31/522	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
C 0 7 F 9/6524 (2006.01)	C 0 7 F 9/6524	
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A
C 0 7 D 473/40 (2006.01)	C 0 7 D 473/40	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A

(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, LV, 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, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, 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) 4B063 QA01 QA08 QA13 QA19 QQ41 QR42 QS34  
 4C057 BB02 DD03 MM01  
 4C086 AA01 AA02 AA03 AA04 BC42 CB07 MA01 MA04 NA14 ZB21  
 4H050 AA01 AB20

## 【要約の続き】

## 【化2】



(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。