

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6501753号
(P6501753)

(45) 発行日 平成31年4月17日(2019.4.17)

(24) 登録日 平成31年3月29日(2019.3.29)

(51) Int.Cl.		F I	
C 0 7 H 21/02	(2006.01)	C O 7 H	21/02
C 1 2 N 15/113	(2010.01)	C 1 2 N	15/113
C O 7 H 19/10	(2006.01)	C O 7 H	19/10
C O 7 H 19/20	(2006.01)	C O 7 H	19/20
C O 7 F 9/6558	(2006.01)	C O 7 F	9/6558

請求項の数 4 (全 56 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-507438 (P2016-507438)
(86) (22) 出願日	平成27年2月25日(2015.2.25)
(86) 国際出願番号	PCT/JP2015/055405
(87) 国際公開番号	W02015/137121
(87) 国際公開日	平成27年9月17日(2015.9.17)
審査請求日	平成30年2月5日(2018.2.5)
(31) 優先権主張番号	特願2014-46396 (P2014-46396)
(32) 優先日	平成26年3月10日(2014.3.10)
(33) 優先権主張国	日本国(JP)

(73) 特許権者	504157024 国立大学法人東北大学 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号
(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔
(74) 代理人	100118773 弁理士 藤田 節
(74) 代理人	100180862 弁理士 花井 秀俊
(72) 発明者	磯部 寛之 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 国立大学法人東北大学内
(72) 発明者	藤野 智子 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 国立大学法人東北大学内

最終頁に続く

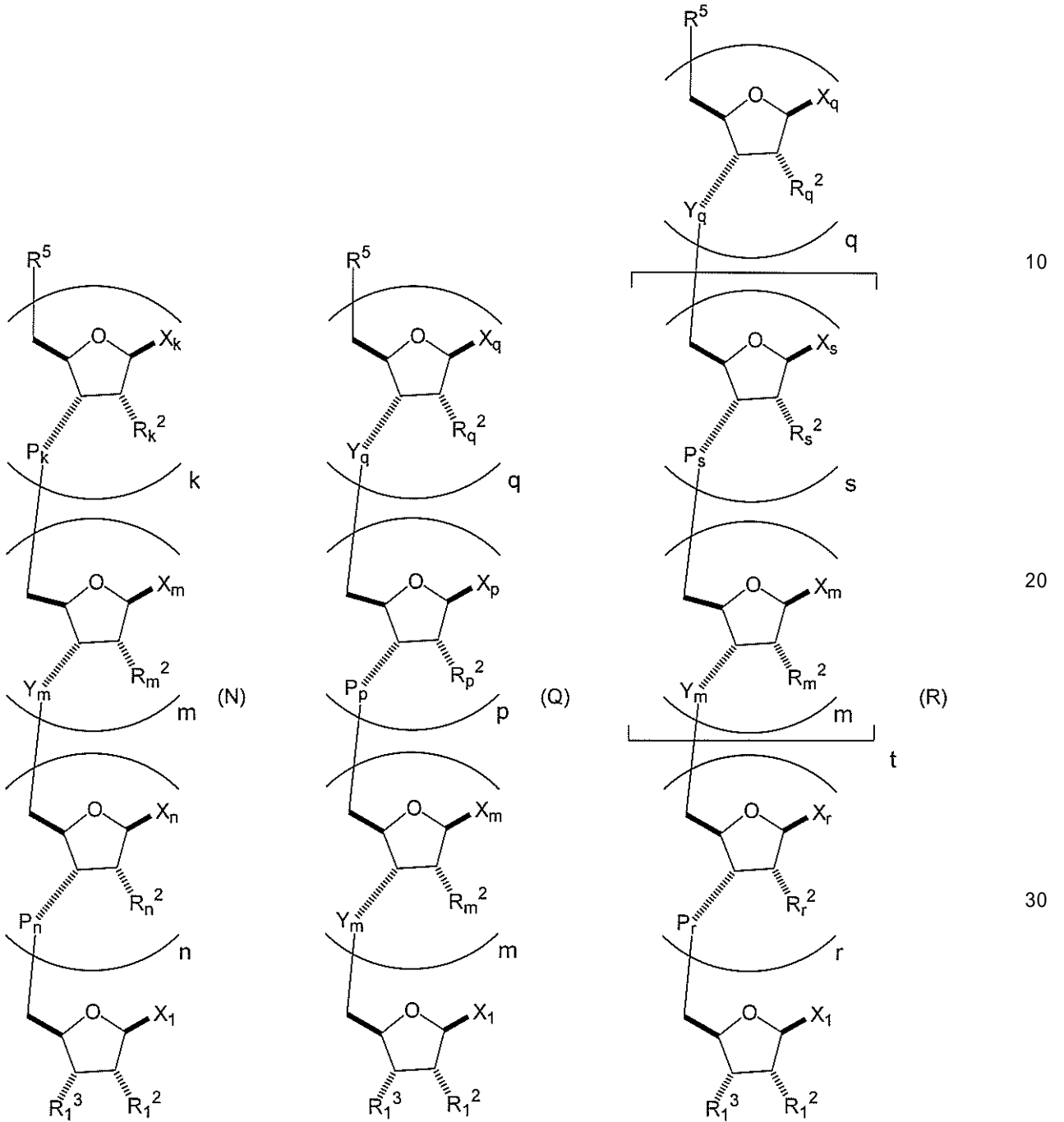
(54) 【発明の名称】 アジド基を有するリボヌクレオシド類縁体及びその製造方法、並びに該類縁体から形成されるトリアゾール連結型オリゴリボヌクレオチドを含むキメラ型オリゴリボヌクレオチド類縁体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

式(N)、(Q)及び(R)のいずれか：

【化1】



[式(N)中、

k 及び n は、それぞれ独立して、0以上の整数であり、
但し、 k 及び n は、同時に0になることはなく；

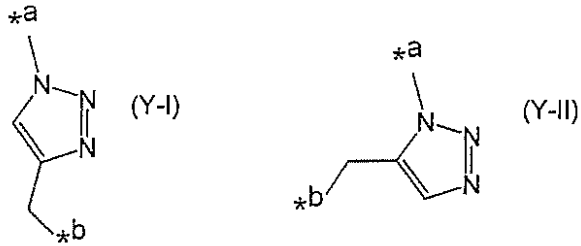
m は、1~20の範囲の整数であり；

X_1 、 X_k 、 X_m 及び X_n は、それぞれ独立して、プリン塩基及びピリミジン塩基から選択され；

R_1^2 、 R_k^2 、 R_m^2 及び R_n^2 は、それぞれ独立して、ヒドロキシル又はその保護形態であり；
 R_1^3 は、ヒドロキシル又はその保護形態若しくは活性化形態であり；

Y_m は、以下の式(Y-I)及び(Y-II)：

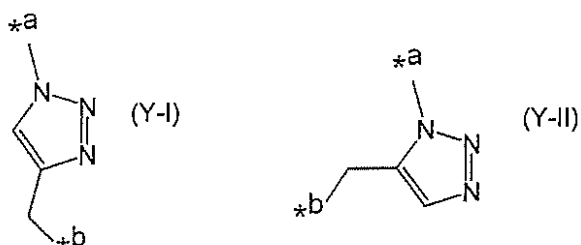
【化2】



[式中、

*aは、 X^m を含むヌクレオシド部分との結合位置を示し、*bは、 X^l 又は X^n を含むヌクレオシド部分との結合位置を示す]からなる群より選択される二価の基であり； P_k 及び P_p は、リン酸ジエステル結合、又はリン酸ジエステル結合の非架橋酸素原子が1個以上の硫黄原子若しくはボラノ基で置換された結合からなる群より選択される二価の基であり； R^5 は、ヒドロキシル又はその保護形態であり、但し、kが2以上の整数の場合、 X_k 、 R_k^2 及び P_k は、それぞれ互いに同一の基であってもよく、異なる基であってもよく；mが2以上の整数の場合、 X_m 、 R_m^2 及び Y_m は、それぞれ互いに同一の基であってもよく、異なる基であってもよく；nが2以上の整数の場合、 X_n 、 R_n^2 及び P_n は、それぞれ互いに同一の基であってもよく、異なる基であってもよく；式(Q)中、pは、1以上の整数であり；m及びqは、それぞれ独立して、0以上の整数であり；但し、m及びqは、同時に0になることはなく； X_1 、 X_m 、 X_p 及び X_q は、それぞれ独立して、プリン塩基及びピリミジン塩基から選択され； R_1^2 、 R_m^2 、 R_p^2 及び R_q^2 は、それぞれ独立して、ヒドロキシル又はその保護形態であり； R_1^3 は、ヒドロキシル又はその保護形態若しくは活性化形態であり； Y_m 及び Y_q は、以下の式(Y-I)及び(Y-II)；

【化3】



[式中、

*aは、 X^m 又は X^q を含むヌクレオシド部分との結合位置を示し、*bは、 X^l 又は X^p を含むヌクレオシド部分との結合位置を示す]からなる群より選択される二価の基であり； P_p は、リン酸ジエステル結合、又はリン酸ジエステル結合の非架橋酸素原子が1個以上の硫黄原子若しくはボラノ基で置換された結合からなる群より選択される二価の基であり； R^5 は、ヒドロキシル又はその保護形態であり、但し、mが2以上の整数の場合、 X_m 、 R_m^2 及び Y_m は、それぞれ互いに同一の基であってもよく、異なる基であってもよく；pが2以上の整数の場合、 X_p 、 R_p^2 及び P_p は、それぞれ互いに同一の基であってもよく、異

10

20

30

40

50

なる基であってもよく；

q が2以上の整数の場合、 X_q 、 R_q^2 及び Y_q は、それぞれ互いに同一の基であってもよく、異なる基であってもよく；

式 (R) 中、

r 及び s は、それぞれ独立して、0以上の整数であり、

但し、 r 及び s は、同時に0になることはなく；

m 及び q は、それぞれ独立して、0以上の整数であり；

但し、 m 及び q は、同時に0になることはなく；

t は、1~20の範囲の整数であり；

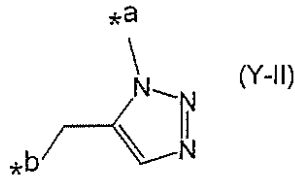
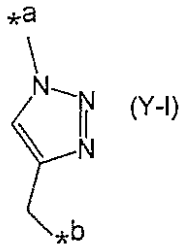
X_1 、 X_m 、 X_q 、 X_r 及び X_s は、それぞれ独立して、プリン塩基及びピリミジン塩基から選択され；

R_1^2 、 R_m^2 、 R_q^2 、 R_r^2 及び R_s^2 は、それぞれ独立して、ヒドロキシル又はその保護形態であり；

R_1^3 は、ヒドロキシル又はその保護形態若しくは活性化形態であり；

Y_m 及び Y_q は、以下の式 (Y-I) 及び (Y-II) ；

【化 4】



[式中、

* a は、 X^m 又は X^q を含むヌクレオシド部分との結合位置を示し、

* b は、 X^1 、 X^r 又は X^s を含むヌクレオシド部分との結合位置を示す]

からなる群より選択される二価の基であり；

P_r 及び P_s は、リン酸ジエステル結合、又はリン酸ジエステル結合の非架橋酸素原子が1個以上の硫黄原子若しくはボラノ基で置換された結合からなる群より選択される二価の基であり；

R^5 は、ヒドロキシル又はその保護形態であり、

但し、 m が2以上の整数の場合、 X_m 、 R_m^2 及び Y_m は、それぞれ互いに同一の基であってもよく、異なる基であってもよく；

q が2以上の整数の場合、 X_q 、 R_q^2 及び Y_q は、それぞれ互いに同一の基であってもよく、異なる基であってもよく；

r が2以上の整数の場合、 X_r 、 R_r^2 及び P_r は、それぞれ互いに同一の基であってもよく、異なる基であってもよく；

s が2以上の整数の場合、 X_s 、 R_s^2 及び P_s は、それぞれ互いに同一の基であってもよく、異なる基であってもよく；

t が2以上の整数の場合、 X_m 及び X_s 、 R_m^2 及び R_s^2 、 Y_m 、並びに P_s は、それぞれ互いに同一の基であってもよく、異なる基であってもよい]

で表される化合物若しくはその塩、又はそれらの溶媒和物。

【請求項 2】

請求項1に記載の式 (N) で表される化合物の製造方法であって、以下の工程：

n 個のリボヌクレオチドを連結して得られるオリゴリボヌクレオチドと、式 (M) ；

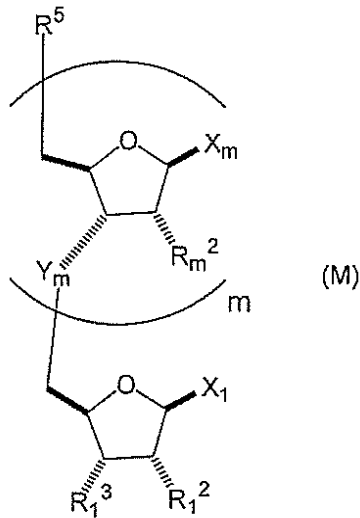
10

20

30

40

【化5】



10

[式中、

m は、1以上の整数であり；

X_1 及び X_m は、それぞれ独立して、プリン塩基及びピリミジン塩基から選択され；

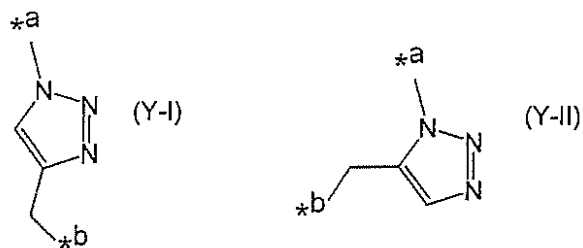
R_1^2 及び R_m^2 は、それぞれ独立して、ヒドロキシル又はその保護形態であり；

R_1^3 は、ヒドロキシル又はその保護形態若しくは活性化形態であり；

Y_m は、以下の式 (Y-I) 及び (Y-II) ；

20

【化6】



[式中、

$*a$ は、 X^m を含むヌクレオシド部分との結合位置を示し、

$*b$ は、 X^1 を含むヌクレオシド部分との結合位置を示す]

からなる群より選択される、二価の基であり；

R^5 は、ヒドロキシル又はその保護形態であり、

但し、 m が2以上の整数の場合、 X_m 、 R_m^2 及び Y_m は、それぞれ互いに同一の基であってもよく、異なる基であってもよい]

で表される化合物とを連結反応させる工程 (1) ；

前記工程 (1) で得られた工程 (1) の連結体と k 個のリボヌクレオチドとを順次連結反応させる工程 (2) ；

を含む、前記方法。

30

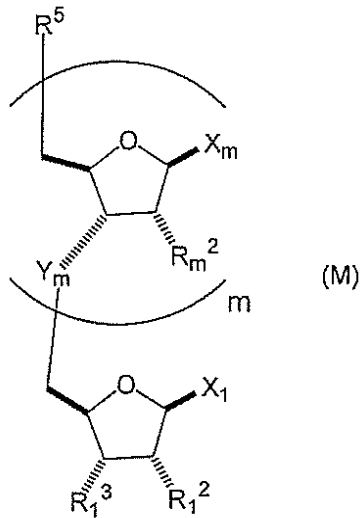
40

【請求項3】

請求項1に記載の式 (Q) で表される化合物の製造方法であって、以下の工程：

式 (M) ；

【化7】



10

[式中、

m は、1以上の整数であり；

X_1 及び X_m は、それぞれ独立して、プリン塩基及びピリミジン塩基から選択され；

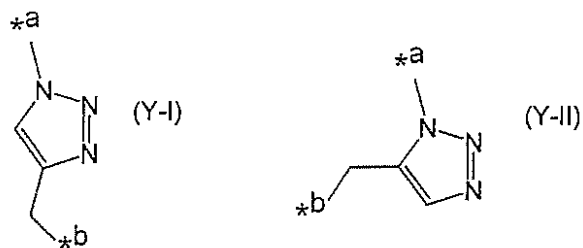
R_1^2 及び R_m^2 は、それぞれ独立して、ヒドロキシル又はその保護形態であり；

R_1^3 は、ヒドロキシル又はその保護形態若しくは活性化形態であり；

Y_m は、以下の式(Y-I)及び(Y-II)；

20

【化8】



30

[式中、

* a は、 X^m を含むヌクレオシド部分との結合位置を示し、

* b は、 X^1 を含むヌクレオシド部分との結合位置を示す]

からなる群より選択される、二価の基であり；

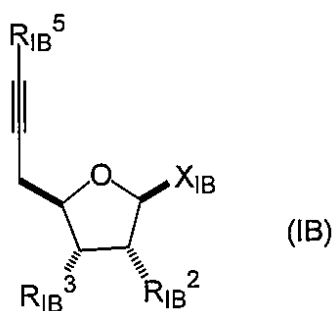
R^5 は、ヒドロキシル又はその保護形態であり、

但し、 m が2以上の整数の場合、 X_m 、 R_m^2 及び Y_m は、それぞれ互いに同一の基であってもよく、異なる基であってもよい]

で表される化合物と $p-1$ 個のリボヌクレオチドとを順次連結反応させる工程(1)；

前記工程(1)で得られた工程(1)の連結体と式(1B)；

【化9】



40

[式中、

X_{1B} は、それぞれ独立して、プリン塩基及びピリミジン塩基から選択され；

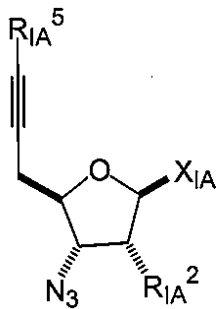
50

R_{1B}^2 は、水素、ヒドロキシル又はその保護形態であり；
 R_{1B}^3 は、ヒドロキシル又はその保護形態若しくは活性化形態であり；
 R_{1B}^5 は、水素又は保護基である]

で表される化合物とを連結反応させる工程(2)；

前記工程(2)で得られた工程(2)の連結体とq-1個の式(IA)：

【化10】



(IA)

10

[式中、

X_{1A} は、それぞれ独立して、プリン塩基及びピリミジン塩基から選択され；

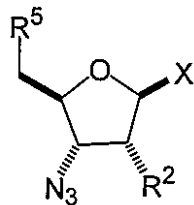
R_{1A}^2 は、水素、ヒドロキシル又はその保護形態であり；

R_{1A}^5 は、水素又は保護基である]

で表される化合物とを順次連結反応させる工程(3)；

前記工程(3)で得られた工程(3)の連結体と式(IC)：

【化11】



(IC)

20

[式中、

R^5 は、前記と同義であり；

R^2 は、 R_m^2 と同義であり；

X は、 X_m と同義である]

で表される化合物とを連結反応させる工程(4)；

を含む、前記方法。

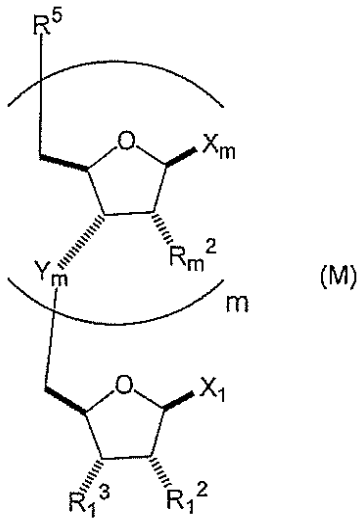
【請求項4】

請求項1に記載の式(R)で表される化合物の製造方法であって、以下の工程：

r個のリボヌクレオチドを連結して得られるオリゴリボヌクレオチドと、式(M)：

30

【化12】



10

[式中、

m は、1以上の整数であり；

X_1 及び X_m は、それぞれ独立して、プリン塩基及びピリミジン塩基から選択され；

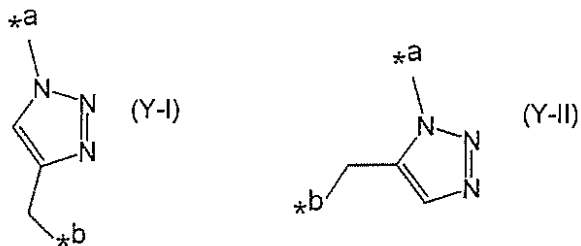
R_1^2 及び R_m^2 は、それぞれ独立して、ヒドロキシル又はその保護形態であり；

R_1^3 は、ヒドロキシル又はその保護形態若しくは活性化形態であり；

Y_m は、以下の式(Y-I)及び(Y-II)；

20

【化13】



30

[式中、

* a は、 X^m を含むヌクレオシド部分との結合位置を示し、

* b は、 X^1 を含むヌクレオシド部分との結合位置を示す]

からなる群より選択される、二価の基であり；

R^5 は、ヒドロキシル又はその保護形態であり、

但し、 m が2以上の整数の場合、 X_m 、 R_m^2 及び Y_m は、それぞれ互いに同一の基であってもよく、異なる基であってもよい]

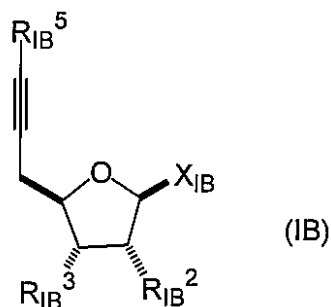
で表される化合物とを連結反応させる工程(1)；

前記工程(1)で得られた工程(1)の連結体と $s-1$ 個のリボヌクレオチドとを順次連結反応させる工程(2)；

前記工程(2)で得られた工程(2)の連結体と式(1B)；

40

【化14】



50

[式中、

X_{1B} は、それぞれ独立して、プリン塩基及びピリミジン塩基から選択され；

R_{1B}^2 は、水素、ヒドロキシル又はその保護形態であり；

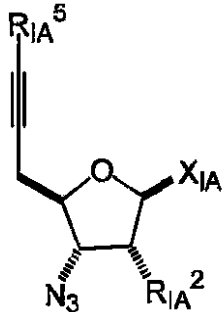
R_{1B}^3 は、ヒドロキシル又はその保護形態若しくは活性化形態であり；

R_{1B}^5 は、水素又は保護基である]

で表される化合物とを連結反応させる工程 (3) ；

前記工程 (3) で得られた工程 (3) の連結体とm-1個の式 (IA) ；

【化 1 5】



(IA)

10

[式中、

X_{1A} は、それぞれ独立して、プリン塩基及びピリミジン塩基から選択され；

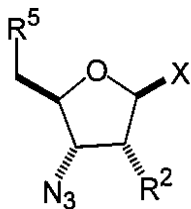
R_{1A}^2 は、水素、ヒドロキシル又はその保護形態であり；

R_{1A}^5 は、水素又は保護基である]

で表される化合物とを順次連結反応させる工程 (4-i) と、

前記工程 (4-i) で得られた工程 (4-i) の連結体と式 (IC) ；

【化 1 6】



(IC)

20

30

[式中、

R^5 は、前記と同義であり；

R^2 は、 R_m^2 と同義であり；

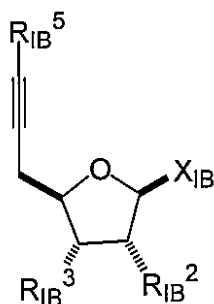
X は、 X_m と同義である]

で表される化合物とを連結反応させる工程 (4-ii) と、

前記工程 (4-ii) で得られた工程 (4-ii) の連結体とs-1個のリボヌクレオチドとを
順次連結反応させる工程 (4-iii) と、

前記工程 (4-iii) で得られた工程 (4-iii) の連結体と式 (IB) ；

【化 1 7】



(IB)

40

[式中、

X_{1B} は、それぞれ独立して、プリン塩基及びピリミジン塩基から選択され；

50

R_{1B}^2 は、水素、ヒドロキシル又はその保護形態であり；
 R_{1B}^3 は、ヒドロキシル又はその保護形態若しくは活性化形態であり；
 R_{1B}^5 は、水素又は保護基である]

で表される化合物とを連結反応させる工程(4-iv)と、

をt-1回繰り返す工程(4)；

前記工程(4)で得られた工程(4)の連結体とq-1個の式(IA)で表される化合物とを順次連結反応させる工程(5)；

前記工程(5)で得られた工程(5)の連結体と式(IC)で表される化合物とを連結反応させる工程(6)；

を含む、前記方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、アジド基を有するリボヌクレオシド類縁体及びその製造方法、並びに該類縁体から形成されるトリアゾール連結型オリゴリボヌクレオチドを含むキメラ型オリゴリボヌクレオチド類縁体に関する。

【背景技術】

【0002】

核酸は、遺伝情報の蓄積及び伝達を担う重要な生体高分子である。天然に存在する核酸は、リン酸ジエステル結合により連結されたフラノース骨格上に核酸塩基を配し、その配列により遺伝情報が記述される。核酸塩基の配列は、遺伝情報の記述のみならず、リボザイム等にみられるような核酸の機能発現に重要な役割を果たしている。

20

【0003】

最近、ヒトの全塩基配列が解読され、この情報をもとに遺伝子療法が発展するものと期待されている。遺伝子療法として発展が期待されるいくつかの手法のうち、アンチセンス法及びアンチジーン法は、遺伝子の複写及び転写経路を阻害する技術である。RNA干渉法(以下、「RNAi」とも記載する)は、数十塩基対程度の短鎖RNA(例えば、siRNA等)を用いて、標的遺伝子の発現を特異的に抑制する技術である。

【0004】

前記の技術では、特定の核酸塩基配列に対して、高選択的且つ高効率に結合する配列認識能を有する分子が必要となる。前記の技術開発においては、当初、天然型核酸の骨格を有する化合物を利用した試みが行われてきた。しかしながら、1)標的塩基配列に対する結合力の弱さ、2)標的塩基配列に結合した後の複合体の、酵素等の生体物質に対する安定性、並びに3)細胞内に移行してさらに標的塩基配列に到達するための生体膜透過性の観点から、問題が存在した。特に、天然型核酸の骨格を有する化合物においては、細胞内の核酸分解酵素による分解が大きな問題であった。

30

【0005】

現在では、非天然型骨格上に核酸塩基を配置した核酸類縁体である人工核酸の使用が検討されている。これまで知られている人工核酸としては、1)リン酸ジエステル結合部分を修飾した人工核酸、2)フラノース部位のグリコシル結合及び/又はヒドロキシル基を修飾した人工核酸、3)核酸塩基部位を修飾した人工核酸、並びに4)糖・リン酸骨格以外の構造を利用した人工核酸等がある。前記人工核酸として、例えば、1)リン酸部位の酸素原子を硫黄原子で置換したホスホロチオエート型、ホスホロジチオエート型、ホスホロジアミデート型、メチルホスホネート型又はメチルホスホノチオエート型の人工核酸、2)フラノース環上の置換基修飾型、糖環骨格が1炭素増炭したピラノース型、又は多環式糖骨格型の人工核酸、3)塩基間スタッキングの強化又は核酸鎖間静電反発の抑制を行う修飾塩基としてピリミジンC-5位修飾塩基型、プリンC-7位修飾塩基型、環拡張修飾塩基型の人工核酸、並びに4)ペプチド鎖を基礎骨格としたペプチド核酸(PNA)等が知られている(例えば、非特許文献1及び2、特許文献1~3)。

40

【0006】

50

前記の人工核酸のうち、PNAは、中性のペプチド鎖を骨格に利用するため、特異的塩基配列に対する結合力が強く、さらに加水分解酵素に対する安定性も高い等、多くの利点を有している。さらに、その合成に既存のオリゴペプチド合成手法が利用できるため、固相上で簡便に製造できる。このため、PNAは、もっとも注目されている人工核酸となっている。しかしながら、PNAは、疎水的な骨格を利用するため、溶解性が低い等の短所も報告されている。また合成的にも、ペプチド鎖の伸長及び核酸塩基をもつペプチド鎖の導入と多工程を要し、またこれらの工程に関わる置換基の保護・脱保護の工程が必要である。このため、PNAは、合成が簡便であるとはいえない。

【0007】

これに対し、本発明者らは、核酸のリン酸ジエステル結合に代えて、1,2,3-トリアゾール環を介する結合を有する新規非天然ヌクレオシド誘導体を開発した（特許文献4）。当該文献に記載の非天然ヌクレオシド誘導体は、1,2,3-トリアゾール環を介する結合を主骨格とする。このため、この非天然ヌクレオシド誘導体は、生体内で分解され難く、且つ相補鎖に対する結合力が高いという利点を有する。さらに、当該文献に記載の非天然ヌクレオシド誘導体の製造方法は、鎖長伸長段階に、3-位アジドと5-位エチニルとの付加環化反応を採用している。このため、この製造方法は、簡便な反応条件で鎖長伸長が可能であるという利点も有する（非特許文献3~6）。

10

【0008】

特許文献5は、前記1,2,3-トリアゾール環を介する結合を有する新規非天然ヌクレオシド誘導体の原料として使用し得る化合物の製造方法を記載する。

20

【0009】

特許文献6は、1,2,3-トリアゾール環を介する結合を有する非天然ヌクレオチドを記載する。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0010】

【特許文献1】国際公開第92/20702号パンフレット

【特許文献2】国際公開第01/96355号パンフレット

【特許文献3】国際公開第01/96356号パンフレット

【特許文献4】特許第5075340号公報

30

【特許文献5】特開2011-153111号公報

【特許文献6】特表2012-513953号公報

【非特許文献】

【0011】

【非特許文献1】ゲノムケミストリー、関根光雄・齋藤烈編、講談社サイエンティフィク、2003年

【非特許文献2】Peptide nucleic acids, 2nd ed. P. E. Nielsen著、Horizon Bioscience、2004年

【非特許文献3】Sharpless, K. B.ら, Angrew. Chem. Int. Ed., 2001年, 第40巻, p. 2004-2021

40

【非特許文献4】Zhang, L.ら, J. Am. Chem. Soc., 2005年, p. 15998-15999

【非特許文献5】Isobe, H.ら, Org. Lett., 2008年, 第10 (17)巻, p. 3729-3732

【非特許文献6】Fujino, T.ら, Tetrahedron Lett., 2009年, 第50 (28)巻, p. 4101-4103

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

前記のように、1,2,3-トリアゾール環を介した結合を形成するための非天然ヌクレオシド類縁体、及び該類縁体を用いて形成されるトリアゾール連結型非天然ヌクレオチドは知られている。しかしながら、5'-末端が天然型の形態、すなわち5'-ヒドロキシル基を有

50

する形態であるトリアゾール連結型非天然ヌクレオチドを合成するために必要とされる、5-位がヒドロキシル基である非天然ヌクレオシド類縁体は未だ提供されていない。

【0013】

それ故、本発明は、1,2,3-トリアゾール環を含む有機基を介して結合した構造を含むトリアゾール連結型非天然ヌクレオチドを合成するための、5-位がヒドロキシル基である非天然ヌクレオシド類縁体を製造する手段を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0014】

本発明者らは、前記課題を解決するための手段を種々検討した結果、安価なD-キシロースを出発原料とし、これにアジドを導入した後、プリン塩基又はピリミジン塩基に対するグリコシル化反応を用いて該塩基を導入することにより、1,2,3-トリアゾール環を含む有機基を介して結合した構造を含むトリアゾール連結型非天然ヌクレオチドを製造するための原料化合物を製造し得ることを見だし、本発明を完成した。

10

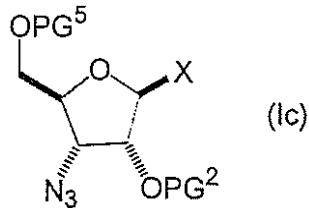
【0015】

すなわち、本発明の要旨は以下の通りである。

【0016】

(1) 式 (Ic) :

【化1】



20

[式中、

Xは、それぞれ独立して、プリン塩基及びピリミジン塩基から選択され；

PG²及びPG⁵は、それぞれ独立して、水素又は保護基である]

で表される化合物の製造方法であって、

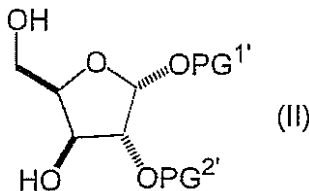
D-キシロースを出発原料として、D-キシロースの3 -ヒドロキシルを3 -アジド化し、且つ1-位にプリン塩基又はピリミジン塩基を結合させることを含む、前記方法。

30

【0017】

(2) D-キシロースから、式 (II) :

【化2】



40

[式中、

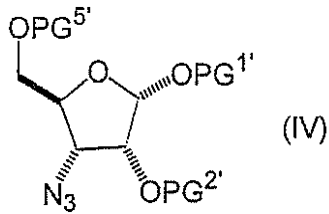
PG^{1'}及びPG^{2'}は、塩基性条件下において安定で、且つ酸処理によって脱保護される保護基であって、

但し、PG^{1'}及びPG^{2'}は、それぞれ同一若しくは異なる独立した基であるか、又はそれらが一緒になって形成される1個の基である]

で表される化合物を形成させる、フラノース環形成工程；

式 (II) で表される化合物を3 -アジド化して、式 (IV) :

【化3】



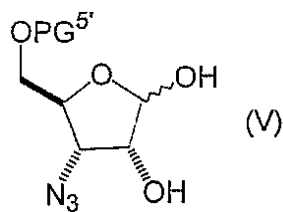
[式中、

PG^{1'} 及び PG^{2'} は前記と同義であり；PG^{5'} は、酸性条件下において安定である保護基である]

で表される化合物を形成させる、アジド基導入工程；

式 (IV) で表される化合物を酸処理することによって PG^{1'} 及び PG^{2'} を脱保護し、式 (V)：

【化4】

[式中、PG^{5'} は前記と同義である]

で表される化合物を形成させる、脱保護工程；並びに

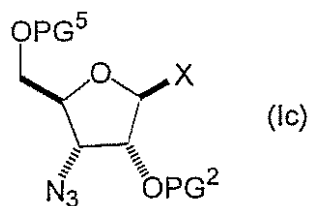
式 (V) で表される化合物に、プリン塩基又はピリミジン塩基に対するグリコシル化反応を用いてプリン塩基又はピリミジン塩基を導入して、式 (Ic) で表される化合物を形成させる、塩基導入工程；

を含む、前記 (1) に記載の方法。

【0018】

(3) 式 (Ic)：

【化5】



[式中、

Xは、それぞれ独立して、プリン塩基及びピリミジン塩基から選択され；

PG^{2'} 及び PG^{5'} は、それぞれ独立して、水素又は保護基である]

で表される化合物若しくはその塩、又はそれらの溶媒和物。

【0019】

(4) 式 (M)：

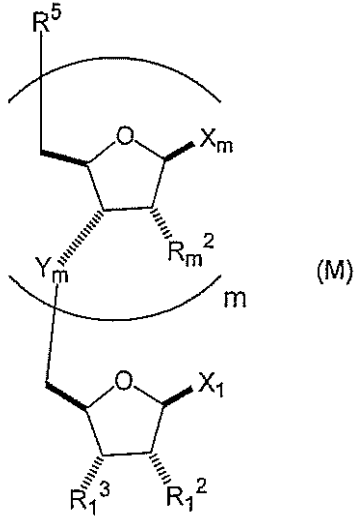
10

20

30

40

【化6】



10

[式中、

m は、1以上の整数であり；

X_1 及び X_m は、それぞれ独立して、プリン塩基及びピリミジン塩基から選択され；

R_1^2 及び R_m^2 は、それぞれ独立して、ヒドロキシル又はその保護形態であり；

R_1^3 は、ヒドロキシル又はその保護形態若しくは活性化形態であり；

20

Y_m は、1,2,3-トリアゾール環を含む二価の基であり；

R^5 は、ヒドロキシル又はその保護形態であり、

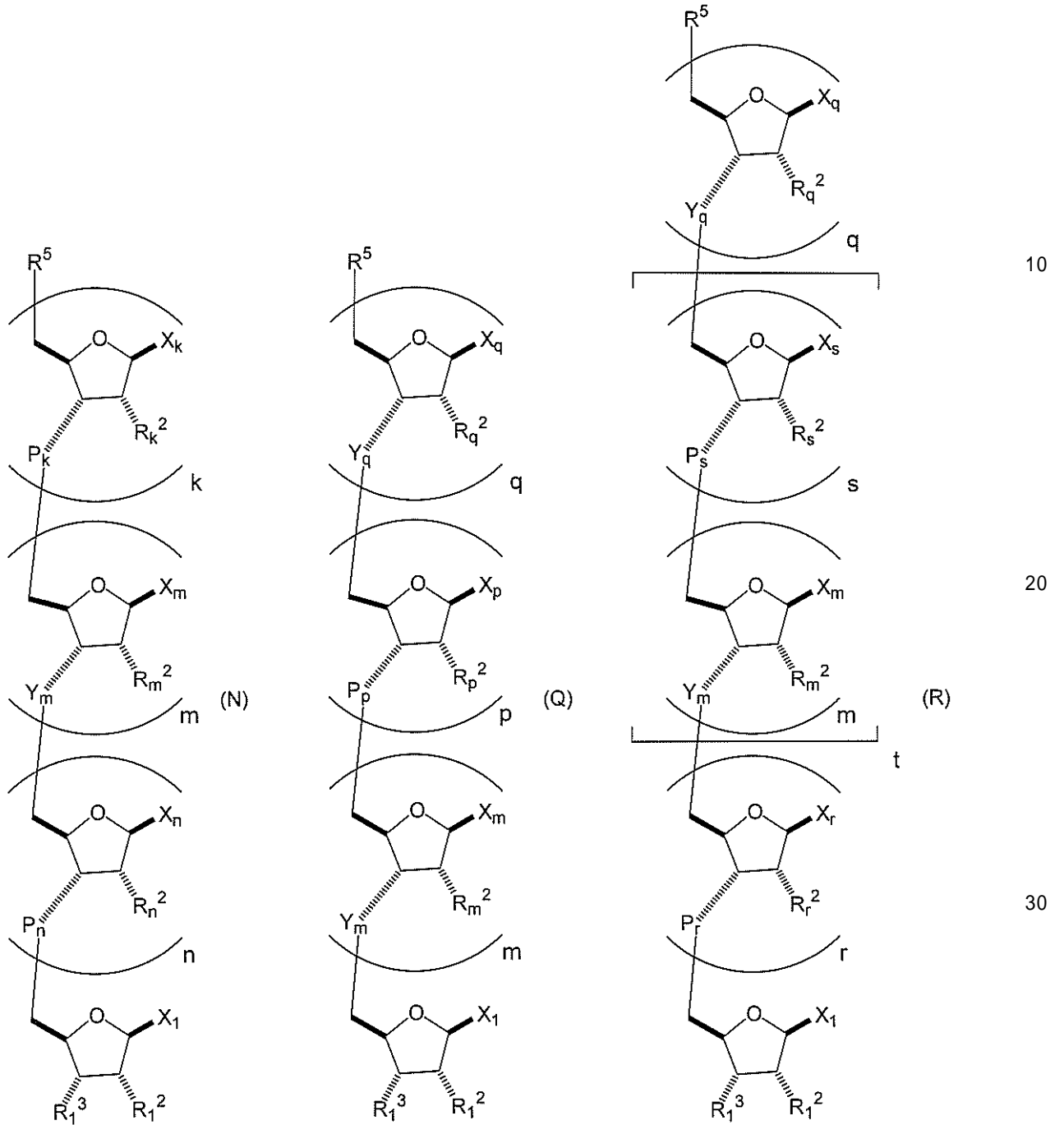
但し、 m が2以上の整数の場合、 X_m 、 R_m^2 及び Y_m は、それぞれ互いに同一の基であってもよく、異なる基であってもよい]

で表される化合物若しくはその塩、又はそれらの溶媒和物。

【0020】

(5) 式(N)、(Q)及び(R)のいずれか；

【化7】



[式中、

k 、 n 、 r 及び s は、それぞれ独立して、0以上の整数であり、
但し、 k 及び n は、同時に0になることはなく、

r 及び s は、同時に0になることはなく；

p は、1以上の整数であり；

m 及び q は、それぞれ独立して、0以上の整数であり；

但し、 m 及び q は、同時に0になることはなく；

t は、0以上の整数であり；

X_1 、 X_k 、 X_m 、 X_n 、 X_p 、 X_q 、 X_r 及び X_s は、それぞれ独立して、プリン塩基及びピリミジン塩基から選択され；

R_1^2 、 R_k^2 、 R_m^2 、 R_n^2 、 R_p^2 、 R_q^2 、 R_r^2 及び R_s^2 は、それぞれ独立して、ヒドロキシル又はその保護形態であり；

R_1^3 は、ヒドロキシル又はその保護形態若しくは活性化形態であり；

10

20

30

40

50

Y_m 及び Y_q は、1,2,3-トリアゾール環を含む二価の基であり；

P_k 、 P_n 、 P_p 、 P_r 及び P_s は、リン酸ジエステル結合、又はリン酸ジエステル結合の非架橋酸素原子が1個以上の硫黄原子若しくはボラノ基で置換された結合からなる群より選択される二価の基であり；

R^5 は、ヒドロキシル又はその保護形態であり、

但し、 k が2以上の整数の場合、 X_k 、 R_k^2 及び P_k は、それぞれ互いに同一の基であってもよく、異なる基であってもよく；

m が2以上の整数の場合、 X_m 、 R_m^2 及び Y_m は、それぞれ互いに同一の基であってもよく、異なる基であってもよく；

n が2以上の整数の場合、 X_n 、 R_n^2 及び P_n は、それぞれ互いに同一の基であってもよく、異なる基であってもよく；

p が2以上の整数の場合、 X_p 、 R_p^2 及び P_p は、それぞれ互いに同一の基であってもよく、異なる基であってもよく；

q が2以上の整数の場合、 X_q 、 R_q^2 及び Y_q は、それぞれ互いに同一の基であってもよく、異なる基であってもよく；

r が2以上の整数の場合、 X_r 、 R_r^2 及び P_r は、それぞれ互いに同一の基であってもよく、異なる基であってもよく；

s が2以上の整数の場合、 X_s 、 R_s^2 及び P_s は、それぞれ互いに同一の基であってもよく、異なる基であってもよく；

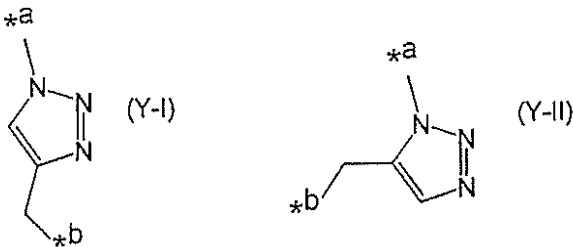
t が2以上の整数の場合、 X_m 及び X_s 、 R_m^2 及び R_s^2 、 Y_m 、並びに P_s は、それぞれ互いに同一の基であってもよく、異なる基であってもよい]

で表される化合物若しくはその塩、又はそれらの溶媒和物。

【0021】

(6) Y_m 及び Y_q が、それぞれ独立して、以下の式(Y-I)及び(Y-II)：

【化8】



[式中、

* a は、 X^m 又は X^q を含むヌクレオシド部分との結合位置を示し、

* b は、 X^l 、 X^n 、 X^p 、 X^r 又は X^s を含むヌクレオシド部分との結合位置を示す]

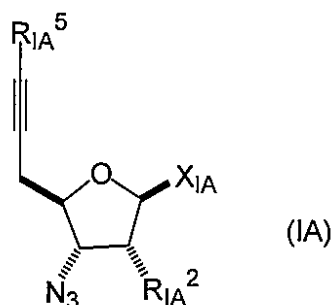
からなる群より選択される、前記(4)又は(5)に記載の化合物若しくはその塩、又はそれらの溶媒和物。

(7) 前記(4)に記載の式(M)で表される化合物の製造方法であって、以下の工程

:

式(IA)：

【化9】



10

20

30

40

50

[式中、

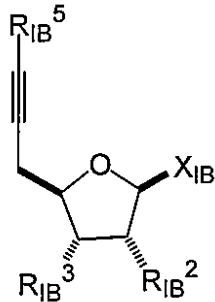
X_{1A} は、それぞれ独立して、プリン塩基及びピリミジン塩基から選択され；

R_{1A}^2 は、水素、ヒドロキシル又はその保護形態であり；

R_{1A}^5 は、水素又は保護基である]

で表される化合物と式 (IB) :

【化 1 0】



(IB)

10

[式中、

X_{1B} は、それぞれ独立して、プリン塩基及びピリミジン塩基から選択され；

R_{1B}^2 は、水素、ヒドロキシル又はその保護形態であり；

R_{1B}^3 は、ヒドロキシル又はその保護形態若しくは活性化形態であり；

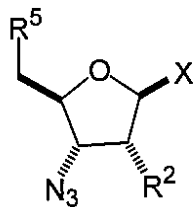
R_{1B}^5 は、水素又は保護基である]

で表される化合物とを連結反応させる、工程 (1) ;

前記工程 (1) で得られた工程 (1) の連結体と $m-2$ 個の式 (IA) で表される化合物とを順次連結反応させる、工程 (2) ;

前記工程 (2) で得られた工程 (2) の連結体と式 (IC) :

【化 1 1】



(IC)

20

30

[式中、

R^5 は、前記と同義であり；

R^2 は、 R_m^2 と同義であり；

X は、 X_m と同義である]

で表される化合物とを連結反応させる工程 (3) ;

を含む、前記方法。

(8) 前記 (5) 又は (6) に記載の式 (N) で表される化合物の製造方法であって、以下の工程 :

n 個のリボヌクレオチドを連結して得られるオリゴリボヌクレオチドと前記 (4) に記載の式 (M) で表される化合物とを連結反応させる工程 (1) ;

前記工程 (1) で得られた工程 (1) の連結体と k 個のリボヌクレオチドとを順次連結反応させる工程 (2) ;

を含む、前記方法。

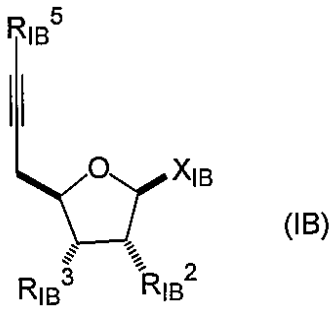
(9) 前記 (5) 又は (6) に記載の式 (Q) で表される化合物の製造方法であって、以下の工程 :

前記 (4) に記載の式 (M) で表される化合物と $p-1$ 個のリボヌクレオチドとを順次連結反応させる工程 (1) ;

前記工程 (1) で得られた工程 (1) の連結体と式 (IB) :

40

【化 1 2】



10

[式中、

X_{IB} は、それぞれ独立して、プリン塩基及びピリミジン塩基から選択され；

R_{IB}^2 は、水素、ヒドロキシル又はその保護形態であり；

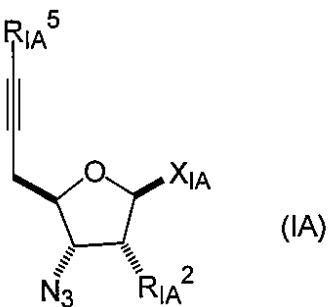
R_{IB}^3 は、ヒドロキシル又はその保護形態若しくは活性化形態であり；

R_{IB}^5 は、水素又は保護基である]

で表される化合物とを連結反応させる工程 (2) ；

前記工程 (2) で得られた工程 (2) の連結体と q-1 個の式 (IA) ；

【化 1 3】



20

[式中、

X_{IA} は、それぞれ独立して、プリン塩基及びピリミジン塩基から選択され；

R_{IA}^2 は、水素、ヒドロキシル又はその保護形態であり；

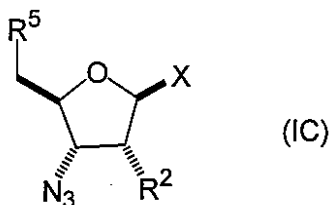
R_{IA}^5 は、水素又は保護基である]

30

で表される化合物とを順次連結反応させる工程 (3) ；

前記工程 (3) で得られた工程 (3) の連結体と式 (IC) ；

【化 1 4】



40

[式中、

R^5 は、前記と同義であり；

R^2 は、 R_m^2 と同義であり；

X は、 X_m と同義である]

で表される化合物とを連結反応させる工程 (4) ；

を含む、前記方法。

(10) 前記 (5) 又は (6) に記載の式 (R) で表される化合物の製造方法であって、以下の工程 ；

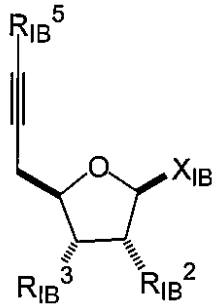
r 個のリボヌクレオチドを連結して得られるオリゴリボヌクレオチドと前記 (4) に記載の式 (M) で表される化合物とを連結反応させる工程 (1) ；

50

前記工程(1)で得られた工程(1)の連結体とs-1個のリボヌクレオチドとを順次連結反応させる工程(2)；

前記工程(2)で得られた工程(2)の連結体と式(1B)：

【化15】



(1B)

10

[式中、

X_{IB} は、それぞれ独立して、プリン塩基及びピリミジン塩基から選択され；

R_{IB}^2 は、水素、ヒドロキシル又はその保護形態であり；

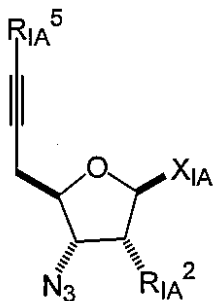
R_{IB}^3 は、ヒドロキシル又はその保護形態若しくは活性化形態であり；

R_{IB}^5 は、水素又は保護基である]

で表される化合物とを連結反応させる工程(3)；

前記工程(3)で得られた工程(3)の連結体とm-1個の式(1A)：

【化16】



(1A)

30

[式中、

X_{IA} は、それぞれ独立して、プリン塩基及びピリミジン塩基から選択され；

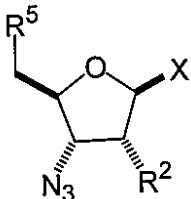
R_{IA}^2 は、水素、ヒドロキシル又はその保護形態であり；

R_{IA}^5 は、水素又は保護基である]

で表される化合物とを順次連結反応させる工程(4-i)と、

前記工程(4-i)で得られた工程(4-i)の連結体と式(1C)：

【化17】



(1C)

40

[式中、

R^5 は、前記と同義であり；

R^2 は、 R_m^2 と同義であり；

Xは、 X_m と同義である]

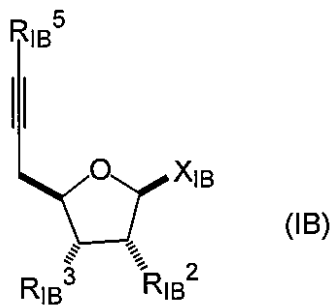
で表される化合物とを連結反応させる工程(4-ii)と、

前記工程(4-ii)で得られた工程(4-ii)の連結体とs-1個のリボヌクレオチドとを順次連結反応させる工程(4-iii)と、

50

前記工程(4-iii)で得られた工程(4-iii)の連結体と式(1B)：

【化18】



10

[式中、

X_{1B} は、それぞれ独立して、プリン塩基及びピリミジン塩基から選択され；

R_{1B}^2 は、水素、ヒドロキシル又はその保護形態であり；

R_{1B}^3 は、ヒドロキシル又はその保護形態若しくは活性化形態であり；

R_{1B}^5 は、水素又は保護基である]

で表される化合物とを連結反応させる工程(4-iv)と、

をt-1回繰り返す工程(4)；

前記工程(4)で得られた工程(4)の連結体とq-1個の式(1A)で表される化合物とを順次連結反応させる工程(5)；

20

前記工程(5)で得られた工程(5)の連結体と式(1C)で表される化合物とを連結反応させる工程(6)；

を含む、前記方法。

【発明の効果】

【0022】

本発明により、1,2,3-トリアゾール環を含む有機基を介して結合した構造を含むトリアゾール連結型非天然ヌクレオチドを合成するための、5-位がヒドロキシル基である非天然ヌクレオチド類縁体を製造する手段を提供することが可能となる。

【0023】

本明細書は、本願の優先権の基礎である日本国特許出願第2014-046396号の明細書及び/又は図面に記載される内容を包含する。

30

【図面の簡単な説明】

【0024】

【図1】図1は、トリアゾール連結型オリゴリボヌクレオチドを含むキメラ型オリゴリボヌクレオチド類縁体(L RNA-RNA)をパッセンジャー鎖(c1)又はガイド鎖(c2)として用いるインビトロ遺伝子サイレンシングアッセイ後のEYFP mRNAのTagRFP mRNAに対する相対的レベルを示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0025】

<1. 非天然ヌクレオチド類縁体>

40

本明細書において、「プリン塩基」は、プリン核を有する塩基性化合物又はその9-位窒素原子上の水素原子を除去した1個の基を意味する。プリン塩基としては、限定するものではないが、例えば、アデニン及びグアニン等のプリン核酸塩基、並びにこれらの誘導体を挙げることができる。本明細書において、「ピリミジン塩基」は、ピリミジン核を有する塩基性化合物又はその1-位窒素原子上の水素原子を除去した1個の基を意味する。ピリミジン塩基としては、限定するものではないが、例えば、ウラシル、シトシン及びチミン等のピリミジン核酸塩基、並びにこれらの誘導体を挙げることができる。ピリミジン核酸塩基及びプリン核酸塩基の誘導体としては、限定するものではないが、例えば、ウラシル、シトシン、チミン、アデニン又はグアニンのハロゲン化誘導体及び脱アミノ誘導体、前記化合物の酸素原子が硫黄原子に置換された誘導体、ピリミジンのC-5位修飾塩基、プリ

50

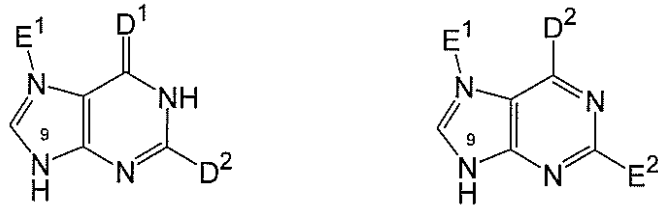
ンのC-7位修飾塩基、並びに環拡張型修飾塩基等を挙げることができる。

【0026】

例えば、プリン核酸塩基及びその誘導体としては、以下の式で表される化合物を挙げることができる。

【0027】

【化19】



10

【0028】

式中、D¹は、酸素原子又は硫黄原子であり、D²は、ヒドロキシル又はアミノであり、E¹及びE²は、それぞれ独立して、水素原子、ハロゲン、シアノ、アルキル、アルケニル又はアルキニルである。この場合、プリン核酸塩基及びその誘導体は、9-位の窒素原子を介してヌクレオシド部分の糖の1-位の炭素原子と結合する。

【0029】

前記化合物に含まれるプリン核酸塩基及びその誘導体としては、例えば、ヒポキサンチンのような脱アミノグアニン誘導体、8-フルオログアニン、8-ブロモグアニン及び8-ヨードグアニンのようなハロゲン化グアニン誘導体等の、グアニンの誘導体；8-フルオロアデニン、8-ブロモアデニン及び8-ヨードアデニンのようなハロゲン化アデニン誘導体、並びに1,N⁶-エテノアデニン等の、アデニンの誘導体を挙げることができる。

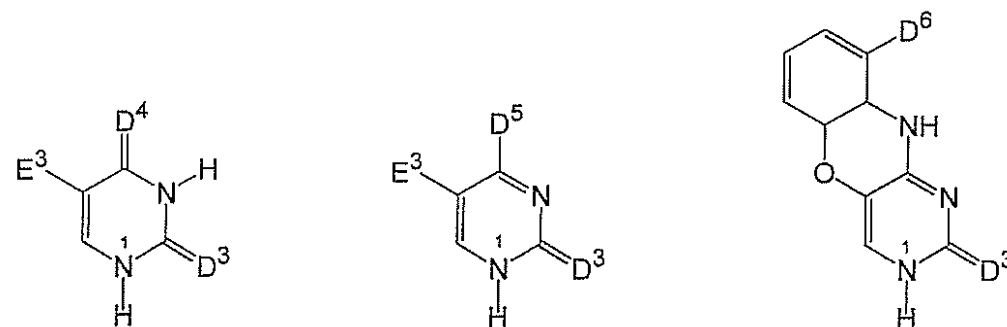
20

【0030】

例えば、ピリミジン核酸塩基及びその誘導体としては、以下の式で表される化合物を挙げることができる。

【0031】

【化20】



30

【0032】

式中、D³及びD⁴は、それぞれ独立して、酸素原子又は硫黄原子であり、D⁵は、ヒドロキシル又はアミノであり、D⁶は、水素原子、ハロゲン、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ又はアミノアルコキシであり、E³は、水素原子、ハロゲン、アルキル、アルケニル、アルキニル又はアルコキシである。この場合、ピリミジン核酸塩基及びその誘導体は、1-位の窒素原子を介してヌクレオシド部分の糖の1-位の炭素原子と結合する。

40

【0033】

以下において説明する本発明の化合物に含まれるピリミジン核酸塩基及びその誘導体としては、例えば、5-フルオロウラシル、5-ブロモウラシル及び5-ヨードウラシルのようなハロゲン化ウラシル誘導体、2-チオウラシル、4-チオウラシル及び2,4-ジチオウラシルのような酸素原子に代えて硫黄原子を有するウラシル誘導体、5-メチルウラシル、5-ビニルウラシル、並びに5-エチニルウラシル等の、ウラシルの誘導体；5-フルオロシトシン、5-ブロモシトシン及び5-ヨードシトシンのようなハロゲン化シトシン誘導体、5-エチニル

50

シトシンのようなアルキニルを有するシトシン誘導体等の、シトシンの誘導体を挙げる
ことができる。

【0034】

本明細書において、「アルキル」は、特定の数の炭素原子を含む、直鎖又は分枝鎖の脂肪族炭化水素基を意味する。例えば、「C₁~C₆アルキル」は、少なくとも1個且つ多くても6個の炭素原子を含む、直鎖又は分枝鎖の炭化水素鎖を意味する。好適なアルキルとしては、例えば、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、t-ブチル、ペンチル及びヘキシル等の直鎖又は分枝鎖のC₁~C₆アルキルを挙げる
ことができる。

【0035】

本明細書において、「アルケニル」は、前記アルキルの1個以上のC-C単結合が二重結合に置換された基を意味する。好適なアルケニルとしては、例えば、ビニル、アリル、プロペニル、イソプロペニル、2-メチル-1-プロペニル、2-メチルアリル、3-ブテニル、4-ペンテニル、5-ヘキセニル及び1,3-ブタンジエニル等の直鎖又は分枝鎖のC₂~C₆アルケニルを挙げる
ことができる。

10

【0036】

本明細書において、「アルキニル」は、前記アルキルの1個以上のC-C単結合が三重結合に置換された基を意味する。好適なアルキニルとしては、例えば、エチニル、2-プロピニル、2-ブチニル、2-ペンチニル、2-ヘキシニル及び2-ペンテン-4-イニル等の直鎖又は分枝鎖のC₂~C₆アルキニルを挙げる
ことができる。

【0037】

20

本明細書において、「シクロアルキル」は、特定の数の炭素原子を含む、脂環式アルキルを意味する。例えば、「C₃~C₆シクロアルキル」は、少なくとも3個且つ多くても6個の炭素原子を含む、環式の炭化水素基を意味する。好適なシクロアルキルは、限定するものではないが、例えばシクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル及びシクロヘキシル等を挙げる
ことができる。

【0038】

本明細書において、「シクロアルケニル」は、前記シクロアルキルの1個以上のC-C単結合が二重結合に置換された基を意味する。好適なシクロアルケニルは、限定するものではないが、例えばシクロブテニル、シクロペンテニル及びシクロヘキセニル等を挙げる
ことができる。

30

【0039】

本明細書において、「ヘテロシクリル」は、前記シクロアルキル又はシクロアルケニルの1個以上の炭素原子が、それぞれ独立して窒素原子(N)、硫黄原子(S)及び酸素原子(O)から選択されるヘテロ原子に置換された基を意味する。この場合において、N又はSによる置換は、それぞれN-オキド又はSのオキド若しくはジオキドによる置換を包含する。好適なヘテロシクリルは、限定するものではないが、例えばピロリジニル、テトラヒドロフラニル、ジヒドロフラニル、テトラヒドロチエニル、テトラヒドロピラニル、ジヒドロピラニル、テトラヒドロチオピラニル、ピペリジニル、モルホリニル、チオモルホリニル及びピペラジニル等を挙げる
ことができる。

【0040】

40

本明細書において、「アリール」は、6~15の炭素原子数を有する芳香環基を意味する。好適なアリールは、限定するものではないが、例えばフェニル、ピフェニル、ナフチル及びアントリル(アントラセニル)等を挙げる
ことができる。

【0041】

本明細書において、「アリールアルキル」は、前記アルキルの水素原子の1個が前記アリールに置換された基を意味する。好適なアリールアルキルは、限定するものではないが、例えばベンジル、1-フェネチル及び2-フェネチル等を挙げる
ことができる。

【0042】

本明細書において、「アリールアルケニル」は、前記アルケニルの水素原子の1個が前記アリールに置換された基を意味する。好適なアリールアルケニルは、限定するものでは
50

ないが、例えばスチリル等を挙げるができる。

【0043】

本明細書において、「ヘテロアリアル」は、前記アリアル¹の1個以上の炭素原子が、それぞれ独立して窒素原子(N)、硫黄原子(S)及び酸素原子(O)から選択されるヘテロ原子に置換された基を意味する。この場合において、N又はSによる置換は、それぞれN-オキシド又はSのオキシド若しくはジオキシドによる置換を包含する。好適なヘテロアリアルは、限定するものではないが、例えばフラニル、チエニル(チオフェニル)、ピロリル、イミダゾリル、ピラゾリル、トリアゾリル、テトラゾリル、チアゾリル、オキサゾリル、イソオキサゾリル、オキサジアゾリル、チアジアゾリル、イソチアゾリル、ピリジリル、ピリダジニル、ピラジニル、ピリミジニル、キノリニル、イソキノリニル及びインドリル等を挙げるができる。

10

【0044】

本明細書において、「ヘテロアリアルアルキル」は、前記アルキルの水素原子の1個が前記ヘテロアリアルに置換された基を意味する。

【0045】

本明細書において、「アシル」は、前記で説明した基から選択される1価基とカルボニルとが連結した基を意味する。好適なアシルは、限定するものではないが、例えばアセチル、プロピオニル及びベンゾイル等を挙げるができる。

【0046】

本明細書において、「アルコキシ」及び「アルコキシル」は、前記アルキル、アルケニル又はアルキニルの1個以上の水素原子が酸素原子に置換された基を意味する。好適な直鎖又は分枝鎖のC₁~C₆アルコキシとしては、例えば、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、イソプロポキシ、ブトキシ及びイソブトキシ等を挙げるができる。

20

【0047】

本明細書において、「アミノアルコキシ」及び「アミノアルコキシル」は、前記アルコキシの1個以上の水素原子がアミノ基に置換された基を意味する。好適な直鎖又は分枝鎖のアミノC₁~C₆アルコキシとしては、アミノメトキシ、2-アミノエトキシ及び3-アミノプロポキシ等を挙げるができる。

【0048】

本明細書において、「ハロゲン」は、フッ素、臭素、ヨウ素又は塩素を意味する。好適なハロゲンとしては、例えば、フッ素、臭素又はヨウ素を挙げるができる。

30

【0049】

本明細書において、「ヘテロ原子」は、酸素原子(O)、窒素原子(N)、硫黄原子(S)、ケイ素原子(Si)又はリン原子(P)を意味する。

【0050】

前記で説明した基は、それぞれ独立して、非置換であるか、或いは1個若しくは複数のハロゲン、OH、NQ¹Q²(Q¹及びQ²は、それぞれ独立して、水素、ヒドロキシル、アルキル、アルケニル若しくはアルキニルである)、NO₂、C(O)Q³(Q³は水素、ヒドロキシル、NH₂若しくは前記で説明した基から選択される1価基である)、又は前記で説明した基から選択される1価基によってさらに置換することもできる。

40

【0051】

本明細書において、「保護基」は、望ましくない反応の進行を防止するために、特定の官能基に導入される基であって、特定の反応条件において定量的に除去され、且つそれ以外の反応条件においては実質的に安定、即ち反応不活性である基を意味する。本明細書において、「保護(化)」及び「脱保護(化)」は、それぞれ官能基に保護基を導入すること、及び保護基を定量的に除去することを意味する。また、本明細書において、「保護形態」は、1個又は複数の官能基に保護基が導入された形態を意味し、「保護誘導体」は、特定の化合物において、1個又は複数の官能基に保護基が導入された誘導体、すなわち保護形態の基を有する該化合物の誘導体を意味する。保護誘導体は、以下で説明する保護化を実施することによって調製してもよく、予め所望の保護基が導入されている市販の保護

50

誘導体を用いてもよい。

【0052】

例えば、酸性条件下において安定で、且つアルカリ処理で脱保護されるヒドロキシル基又はアミノ基の保護基としては、限定するものではないが、例えば、アセチル (Ac)、ベンゾイル (Bz)、並びに tert-ブチルジメチルシリル (TBDMS)、トリイソプロピルシリル (TIPS) 及び tert-ブチルジフェニルシリル (TBDPS) のようなシリルを挙げることができる。前記保護基による保護化は、例えば、トリエチルアミン又はピリジンのような有機塩基存在下、無水酢酸、塩化ベンゾイル又は塩化シランのような保護化試薬と反応させることにより実施することができる。また、前記保護基の脱保護化は、メタノール又は水のような溶媒中、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム又はアンモニアのようなアルカリで処理することにより実施することができる。

10

【0053】

塩基性条件下において安定で、且つ酸処理によって脱保護されるヒドロキシル基の保護基としては、限定するものではないが、例えば、アセトニド、tert-ブチル、非置換、モノ置換又はジ置換トリチル (例えばトリチル又はジメトキシトリチル (DMTr)) を挙げることができる。前記の保護基による保護化は、例えば、硫酸又は塩酸のような酸存在下、アセトン又はイソブテンと反応させることにより、或いはトリエチルアミン又はピリジンのような有機塩基存在下、塩化トリチルと反応させることにより実施することができる。また、かかる保護基の脱保護化は、水性溶媒中、トリフルオロ酢酸 (TFA) 又はトリクロロ酢酸 (TCA) のような酸と反応させることにより実施することができる。

20

【0054】

酸性及び塩基性条件下において安定で、且つ還元処理で脱保護されるヒドロキシル基又はアミノ基の保護基としては、限定するものではないが、例えば、ベンジル (Bn) 及び p-メトキシベンジルを挙げることができる。前記保護基による保護化は、例えば、ジイソプロピルエチルアミンのような有機塩基存在下、ハロゲン化ベンジル又はハロゲン化 p-メトキシベンジルのような保護化試薬と反応させることにより実施することができる。また、前記保護基の脱保護化は、ジクロロメタンのような溶媒中、ポロントリクロリドで処理するか、又は接触還元することにより実施することができる。

【0055】

酸性条件下において安定で、且つ脱シリル化条件で脱保護される末端アルキンの保護基としては、限定するものではないが、例えば、トリメチルシリル (TMS) 及びトリイソプロピルシリル (TIPS) のようなシリルを挙げることができる。前記保護基の脱保護化は、テトラヒドロフラン (THF) のような非プロトン性極性溶媒中、テトラブチルアンモニウムフルオリド又は強塩基のような試薬と反応させることにより実施することができる。なお、本明細書において、「脱シリル化条件」は、前記で説明したような、シリルの脱保護化を実施するための反応条件を意味する。

30

【0056】

なお、互いに隣接する2個のヒドロキシル基を同時に保護化する場合、該2個のヒドロキシル基に導入される保護基は、それぞれ同一の独立した基であってもよく、それらが一緒になって形成される1個の基であってもよい。後者の保護基としては、アセトニドが好ましい。

40

【0057】

本明細書において、「脱離基」は、特定の官能基 (例えば、ヒドロキシル基) を除去するために導入される基であって、置換反応によって脱離し除去される基を意味する。脱離基としては、p-トルエンスルホン酸 (TsO)、トリフルオロメタンスルホン酸 (TfO)、並びにフッ素、塩素、臭素及びヨウ素のようなハロゲンを挙げることができる。前記で挙げた脱離基の導入は、例えば、トリエチルアミン又はピリジンのような有機塩基存在下、p-トルエンスルホン酸クロリド (TsCl)、トリフルオロメタンスルホン酸無水物 (Tf₂O) 又はトリフェニルホスフィン及び N-クロロコハク酸イミド等のハロゲン化剤のような脱離基の導入試薬と反応させることにより実施することができる。

50

【0058】

本明細書において、「活性化基」は、特定の官能基（例えば、ヒドロキシル基）と別の基との間に架橋基を形成するために導入される基を意味する。また、本明細書において、「活性化形態」は、1個又は複数の官能基に活性化基が導入された形態を意味し、「活性化誘導体」は、特定の化合物において、1個又は複数の官能基に活性化基が導入された誘導体、すなわち活性化形態の基を有する該化合物の誘導体を意味する。活性化基としては、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を挙げることができる。前記で挙げた活性化基の導入は、例えば、ジクロロメタンのような無極性溶媒中、ジイソプロピルエチルアミンのような有機塩基存在下、2-シアノエチル N,N-ジイソプロピルクロロホスホロアミダイトのような活性化基の導入試薬と反応させることにより実施することができる。

10

【0059】

本明細書において、「固相」は、1個又は複数の反応性官能基を有する実質的に不溶性の材料を意味する。また、本明細書において、「固定化形態」は、1個又は複数の官能基に固相が結合した形態を意味する。本発明において使用される固相としては、特に制限されず、公知の核酸合成法、例えばホスホロアミダイト法において通常使用される固相、例えば、ポリスチレン樹脂等の合成樹脂又は多孔性の球状ガラスビーズ(CPG)等のガラス材料等を挙げることができる。前記固相は、リンカー部にヒドロキシルを有するポリスチレン合成樹脂であることが好ましい。前記固相は、例えば、ポリスチレン合成樹脂表面のリンカー鎖に、コハク酸エステル等のスペーサーを介して、以下において説明する本発明の化合物の3-ヒドロキシル基と結合することができる。

20

【0060】

特許第5075340号公報は、非天然ヌクレオチドとして、糖とピリミジン塩基又はプリン塩基とがグリコシド結合してなる糖 - 塩基部が複数結合したヌクレオシド誘導体であって、該糖 - 塩基部が1,2,3-トリアゾール環を含む有機基を介して結合した構造を含む、前記ヌクレオシド誘導体を記載する。特開2011 - 153111号公報は、特許第5075340号公報に記載の1,2,3-トリアゾール環を含む有機基を含むヌクレオシド誘導体を製造するための原料化合物の製造方法を記載する。しかしながら、従来技術において、5'-末端にヒドロキシル基を有するヌクレオチド類縁体を製造するための原料は提供されていなかった。

30

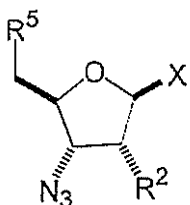
【0061】

本発明者らは、安価なD-キシロースを出発原料とし、これにアジドを導入した後、プリン塩基又はピリミジン塩基に対するグリコシル化反応を用いて該塩基を導入することにより、1,2,3-トリアゾール環を含む有機基を介して結合した構造を含むトリアゾール連結型非天然ヌクレオチドを製造するための原料化合物を製造し得ることを見いだした。

【0062】

それ故、本発明は、式(1C)：

【化21】



(1C)

40

で表される化合物に関する。本発明において、式(1C)で表される化合物を、「5'-末端側非天然ヌクレオチド類縁体」又は単に「非天然ヌクレオチド類縁体」と記載する場合がある。式(1C)で表される化合物は、これまでにその合成結果が報告されていなかった新規化合物である。それ故、本発明の式(1C)で表される化合物を提供することにより、5'-末端にヒドロキシル基を有するヌクレオチド類縁体を製造することが可能となる。

【0063】

50

式(1C)において、Xは、それぞれ独立して、プリン塩基及びピリミジン塩基から選択されることが必要である。Xは、アデニン及びグアニン等のプリン核酸塩基、及びこれらの誘導体、並びに、ウラシル、シトシン及びチミン等のピリミジン核酸塩基、及びこれらの誘導体からなる群より選択されることが好ましい。

【0064】

式(1C)において、R²及びR⁵は、それぞれ独立して、水素、ヒドロキシル又はその保護形態であることが必要である。本発明において、R²が水素である式(1C)で表される化合物を、「5'-末端側非天然デオキシリボヌクレオシド類縁体」又は「非天然デオキシリボヌクレオシド類縁体」と、R²がヒドロキシル又はその保護形態である式(1C)で表される化合物を、「5'-末端側非天然リボヌクレオシド類縁体」又は「非天然リボヌクレオシド類縁体」と記載する場合がある。

10

【0065】

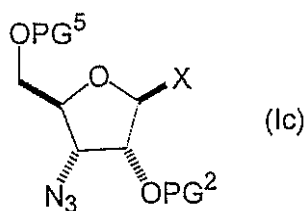
式(1C)において、R²がヒドロキシルの保護形態の場合、該保護形態を形成する保護基は、酸性条件下において安定である保護基であることが好ましく、酸性条件下において安定で、且つアルカリ処理で脱保護される保護基であることがより好ましく、アセチル(Ac)若しくはベンゾイル(Bz)のようなアシル、又はtert-ブチルジメチルシリル(TBDMS)、トリイソプロピルシリル(TIPS)若しくはtert-ブチルジフェニルシリル(TBDPS)のようなシリルであることがさらに好ましい。R⁵がヒドロキシルの保護形態の場合、該保護形態を形成する保護基は、酸性及び/又は塩基性条件下において安定である保護基であることが好ましく、トリチル若しくはジメトキシトリチル(DMTri)のような非置換、モノ置換若しくはジ置換トリチル、又はベンジル(Bn)であることがより好ましく、トリチル若しくはジメトキシトリチル(DMTri)のような非置換、モノ置換若しくはジ置換トリチルであることがさらに好ましい。

20

【0066】

本発明はまた、式(1c)：

【化22】



30

で表される化合物に関する。本発明の式(1c)で表される化合物は、非天然リボヌクレオシド類縁体の形態である本発明の式(1C)で表される化合物に相当する。本発明において、式(1c)で表される化合物を、「5'-末端側非天然リボヌクレオシド類縁体」又は単に「非天然リボヌクレオシド類縁体」と記載する場合がある。

【0067】

式(1c)において、Xは、それぞれ独立して、プリン塩基及びピリミジン塩基から選択されることが必要である。Xは、アデニン及びグアニン等のプリン核酸塩基、及びこれらの誘導体、並びに、ウラシル、シトシン及びチミン等のピリミジン核酸塩基、及びこれらの誘導体からなる群より選択されることが好ましい。

40

【0068】

式(1c)において、PG²及びPG⁵は、それぞれ独立して、水素又は保護基であることが必要である。PG²は、酸性条件下において安定である保護基であることが好ましく、酸性条件下において安定で、且つアルカリ処理で脱保護される保護基であることがより好ましく、アセチル(Ac)若しくはベンゾイル(Bz)のようなアシル、又はtert-ブチルジメチルシリル(TBDMS)、トリイソプロピルシリル(TIPS)若しくはtert-ブチルジフェニルシリル(TBDPS)のようなシリルであることがさらに好ましい。PG⁵は、酸性及び/又は塩基性条件下において安定である保護基であることが好ましく、トリチル若しくはジメトキシト

50

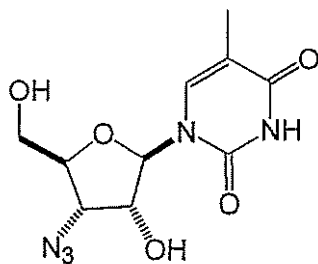
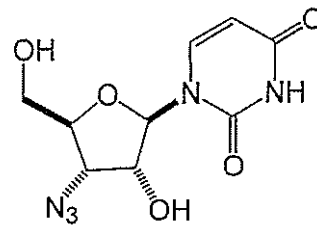
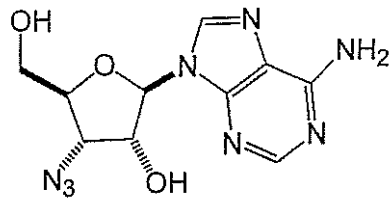
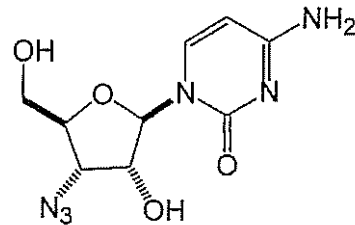
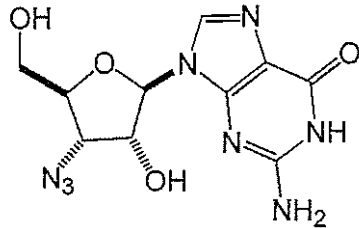
リチル (DMTr) のような非置換、モノ置換若しくはジ置換トリチル、又はベンジル (Bn) のようなエーテルであることがより好ましく、トリチル若しくはジメトキシトリチル (DMTr) のような非置換、モノ置換若しくはジ置換トリチルであることがさらに好ましい。

【0069】

本発明の式 (1c) 又は式 (1c) で表される化合物は、以下の式で表される5'-末端側非天然リボヌクレオシド類縁体から選択されることが特に好ましい。この場合、本発明の5'-末端側非天然リボヌクレオシド類縁体を用いることにより、5'-末端にヒドロキシル基を有するトリアゾール連結型オリゴリボヌクレオチド類縁体を製造することができる。

【0070】

【化23】



【0071】

本発明の式 (1c) 及び式 (1c) で表される化合物、以下において説明する式 (M)、(N)、(Q) 及び (R) で表される化合物、並びにそれらの化合物の原料又は中間体として使用される化合物は、前記化合物自体だけでなく、それらの保護形態、活性化形態又は固定化形態も包含する。前記化合物の保護形態、活性化形態又は固定化形態は、前記で説明した保護基、活性化基又は固相を含む形態であることが好ましい。前記化合物の保護形態、活性化形態又は固定化形態を用いることにより、5'-末端にヒドロキシル基を有するトリアゾール連結型オリゴリボヌクレオチド類縁体を効率的に製造することができる。

【0072】

本発明の式 (1c) 及び式 (1c) で表される化合物、以下において説明する式 (M)、(N)、(Q) 及び (R) で表される化合物、並びにそれらの化合物の原料又は中間体として使用される化合物は、該化合物並びにそれらの保護形態、活性化形態及び固定化形態自体だけでなく、それらの塩も包含する。前記化合物の塩の対イオンとしては、限定するものではないが、例えば、ナトリウムイオン、カリウムイオン、カルシウムイオン若しくはマグネシウムイオンのようなカチオン、又は塩化物イオン、臭化物イオン、ギ酸イオン、酢酸イオン、マレイン酸イオン、フマル酸イオン、安息香酸イオン、アスコルビン酸イオン、

10

20

30

40

50

パモ酸イオン、コハク酸イオン、ビスメチレンサリチル酸イオン、メタンスルホン酸イオン、エタンジスルホン酸イオン、プロピオン酸イオン、酒石酸イオン、サリチル酸イオン、クエン酸イオン、グルコン酸イオン、アスパラギン酸イオン、ステアリン酸イオン、パルミチン酸イオン、イタコン酸イオン、グリコール酸イオン、p-アミノ安息香酸イオン、グルタミン酸イオン、ベンゼンスルホン酸イオン、シクロヘキシルスルファミン酸イオン、メタンスルホン酸イオン、エタンスルホン酸イオン、イセチオン酸イオン、ベンゼンスルホン酸イオン、p-トルエンスルホン酸イオン、ナフタレンスルホン酸イオン、リン酸イオン、硝酸イオン、硫酸イオン、炭酸イオン、炭酸水素イオン又は過塩素酸イオンのようなアニオンが好ましい。

【0073】

本発明の式(1C)及び式(1c)で表される化合物が前記の対イオンとの塩の形態である場合、親化合物である天然ヌクレオシド分子と比較して、核酸合成反応における安定性、及び/又は相補鎖に対する結合力を実質的に低下させることなく該化合物を使用することができる。また、本発明の式(M)、(N)、(Q)及び(R)で表される化合物が前記の対イオンとの塩の形態である場合、親化合物である天然オリゴリボヌクレオチド分子と比較して、生体内における安定性、標的細胞内に移行するための細胞膜透過性、及び/又は相補鎖に対する結合力を実質的に低下させることなく該化合物を使用することができる。

【0074】

本発明の式(1C)及び式(1c)で表される化合物、以下において説明する式(M)、(N)、(Q)及び(R)で表される化合物、並びにそれらの化合物の原料又は中間体として使用される化合物、さらにはそれらの塩は、前記化合物並びにそれらの保護形態、活性化形態及び固定化形態、さらにはそれらの塩自体だけでなく、それらの溶媒和物も包含する。前記化合物又はその塩と溶媒和物を形成し得る溶媒としては、限定するものではないが、例えば、メタノール、エタノール、2-プロパノール(イソプロピルアルコール)、ジメチルスルホキシド(DMSO)、酢酸、エタノールアミン若しくは酢酸エチルのような有機溶媒、又は水が好ましい。

【0075】

本発明の式(1C)及び式(1c)で表される化合物又はその塩が前記の溶媒との溶媒和物の形態である場合、親化合物である天然ヌクレオシド分子と比較して、核酸合成反応における安定性、及び/又は相補鎖に対する結合力を実質的に低下させることなく該化合物を使用することができる。

【0076】

また、本発明の式(M)、(N)、(Q)及び(R)で表される化合物又はその塩が前記の溶媒との溶媒和物の形態である場合、親化合物である天然オリゴリボヌクレオチド分子と比較して、生体内における安定性、標的細胞内に移行するための細胞膜透過性、及び/又は相補鎖に対する結合力を実質的に低下させることなく該化合物を使用することができる。

【0077】

<2. 非天然リボヌクレオシド類縁体の製造方法>

本発明はまた、本発明の式(1c)で表される化合物の製造方法に関する。

【0078】

本発明の製造方法は、D-キシロースを出発原料として、D-キシロースの3'-ヒドロキシルを3'-アジド化し、且つ1-位にプリン塩基又はピリミジン塩基を結合させることを含むことが必要である。D-キシロースは、従来技術の方法で使用されるヌクレオシドと比較して、極めて安価である。それ故、本発明の製造方法により、5'-末端側非天然リボヌクレオシド類縁体、及び最終的な目的物であるトリアゾール連結型オリゴリボヌクレオチド類縁体を低コストで製造することができる。

【0079】

本発明の製造方法において、1-位ヒドロキシル基へのプリン塩基又はピリミジン塩基の導入は、プリン塩基又はピリミジン塩基に対するグリコシル化反応を用いて実施されるこ

10

20

30

40

50

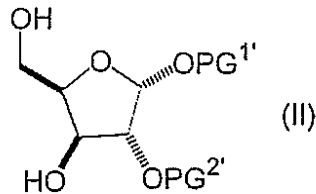
とが好ましい。本発明において、「グリコシル化反応」は、プリン塩基又はピリミジン塩基を、リボースの1-位炭素原子に結合させる反応を意味する。一般に、グリコシル化反応は、グリコシド基の立体化学を制御することは困難である。しかしながら、本発明の製造方法では、1-ヒドロキシル基がラセミ化したフラノース化合物を基質として用いても、所望の β -配置でプリン塩基又はピリミジン塩基が導入されたフラノース化合物を主生成物として得ることができる。それ故、本発明の製造方法により、所望の絶対立体配置を有する式 (Ic) で表される化合物を高収率で製造することができる。

【0080】

[2-1. フラノース環形成工程]

本発明の方法は、D-キシロースから、式 (II) :

【化24】



で表される化合物を形成させる工程を含む。本発明において、本工程を「フラノース環形成工程」と記載する場合がある。また、本発明において、式 (II) で表される化合物を「 β -D-キシロフラノースの保護誘導体」と記載する場合がある。

【0081】

式 (II) において、 $PG^{1'}$ 及び $PG^{2'}$ は、塩基性条件下において安定で、且つ酸処理によって脱保護される保護基であることが必要である。但し、 $PG^{1'}$ 及び $PG^{2'}$ は、それぞれ同一若しくは異なる独立した基であるか、又はそれらが一緒になって形成される1個の基である。 $PG^{1'}$ 及び $PG^{2'}$ は、それらが一緒になって1個の基を形成することが好ましく、アセトニドを形成することがより好ましい。 $PG^{1'}$ 及び $PG^{2'}$ が一緒になって1個の基を形成する場合、 $PG^{1'}$ 及び $PG^{2'}$ を同一の反応条件下で保護及び脱保護することができる。

【0082】

本工程は、D-キシロースの1-位及び2-位のヒドロキシル基を保護化してそれぞれ $OPG^{1'}$ 及び $OPG^{2'}$ を形成させる段階、並びに該段階の生成物においてフラノース環を形成させることにより、 β -D-キシロフラノースの保護誘導体を形成する段階を含むことが好ましい。前記保護化は、例えば、D-キシロースを、酸性（好ましくは硫酸酸性）条件下でケトン（好ましくはアセトン）と反応させることにより実施することが好ましい。この場合、 $PG^{1'}$ 及び $PG^{2'}$ が一緒になって1個の保護基（好ましくはアセトニド）を形成する。

【0083】

本工程において、フラノース環の形成は、前記保護化で形成されたD-キシロースの保護誘導体を、塩基性条件下（好ましくは炭酸ナトリウム）で処理することにより実施することが好ましい。フラノース環の形成反応の反応温度は、20~80 の範囲であることが好ましく、20~60 の範囲であることがより好ましい。また、反応時間は、2~48時間の範囲であることが好ましく、2~24時間の範囲であることがより好ましい。前記の条件で反応させることにより、所望の立体化学を有する β -D-キシロフラノースの保護誘導体を得ることができる。

【0084】

[2-2. アジド基導入工程]

本発明の方法は、式 (II) で表される化合物を3-アジド化して、式 (IV) :

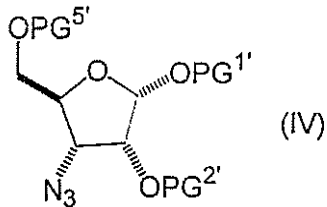
10

20

30

40

【化25】



で表される化合物を形成させる工程を含む。本発明において、本工程を「アジド基導入工程」と記載する場合がある。式(IV)において、PG^{1'}及びPG^{2'}は前記と同義である。

10

【0085】

式(IV)において、PG^{5'}は、酸性条件下において安定である保護基であることが必要である。PG^{5'}は、式(Ic)の基PG⁵と同一であってもよく、異なってもよい。PG^{5'}は、酸性及び塩基性条件下において安定である保護基であることが好ましく、ベンジル(Bn)、又はトリチル若しくはジメトキシトリチル(DMTr)のような非置換、モノ置換若しくはジ置換トリチルであることがより好ましく、ベンジル(Bn)であることがさらに好ましい。

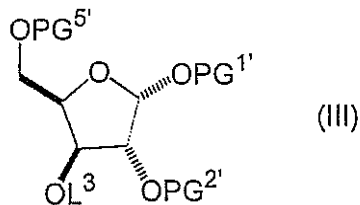
【0086】

本工程は、式(II)で表される化合物の5-位のヒドロキシル基を保護化してOPG^{5'}を形成させる段階、式(II)で表される化合物の3-位のヒドロキシル基に脱離基を導入して、

20

式(III)：

【化26】



[式中、

30

PG^{1'}、PG^{2'}及びPG^{5'}は前記と同義であり；L³は、脱離基である]

で表される化合物を形成させる段階、及び式(III)で表される3-位に脱離基を導入した保護誘導体を3-アジド化して、式(IV)で表される化合物を形成させる段階を含むことが好ましい。前記三段階を含む行程を実施することにより、アジド基の導入を選択的に行うことができる。

【0087】

本工程において、式(II)で表される化合物の3-位のヒドロキシル基に脱離基L³を導入する段階は、トリフルオロメタンスルホン酸(TfO)のような脱離基を導入することにより実施することが好ましい。また、3-アジド化する段階は、N,N-ジメチルホルムアミド(DMF)のような非プロトン性極性溶媒中、3-位に脱離基を導入した保護誘導体にアジ化ナトリウムを加えてアジド化することにより実施することが好ましい。アジド基の導入反応の反応温度は、20~80の範囲であることが好ましく、20~60の範囲であることがより好ましい。また、反応時間は、2~48時間の範囲であることが好ましく、5~48時間の範囲であることがより好ましい。前記の条件で本工程を実施することにより、3-アジド基を有する式(IV)で表される化合物を得ることができる。

40

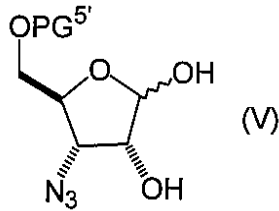
【0088】

[2-3. 1,2-位脱保護工程]

本発明の方法は、式(IV)で表される化合物を酸処理することによってPG^{1'}及びPG^{2'}を脱保護し、式(V)：

50

【化27】



で表される化合物を形成させる工程を含む。本発明において、本工程を「1,2-位脱保護工程」又は単に「脱保護工程」と記載する場合がある。式(V)において、PG^{5'}は前記と同義である。

10

【0089】

本工程において、PG^{1'}及びPG^{2'}の脱保護は、前記で説明した塩基性条件下において安定で、且つ酸処理によって脱保護される保護基の脱保護条件下で実施することが好ましい。前記の条件で本工程を実施することにより、1,2-位の保護基を選択的に脱保護して、式(V)で表される化合物を得ることができる。

【0090】

[2-4. 塩基導入工程]

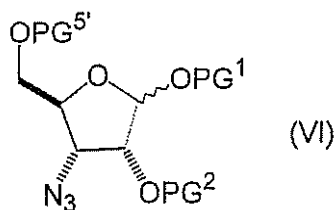
本発明の方法は、式(V)で表される化合物に、プリン塩基又はピリミジン塩基に対するグリコシル化反応を用いてプリン塩基又はピリミジン塩基を導入して、式(Ic)で表される化合物を形成させる工程を含む。本発明において、本工程を「塩基導入工程」と記載する場合がある。

20

【0091】

式(V)において、PG^{5'}が、式(Ic)の基PG⁵と異なる基である場合、本工程は、式(V)で表される化合物の1,2-位のヒドロキシル基を保護化して、式(VI)：

【化28】



30

[式中、

PG¹及びPG²は、酸性条件下において安定で、且つアルカリ処理によって脱保護される保護基であって、

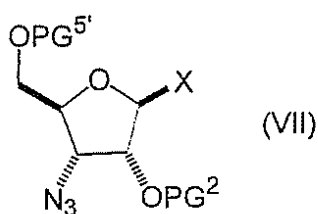
但し、PG¹及びPG²は、それぞれ同一若しくは異なる独立した基であるか、又はそれらが一緒になって形成される1個の基であり；

PG^{5'}は前記と同義である]

で表される化合物を形成させる段階、プリン塩基又はピリミジン塩基に対するグリコシル化反応を用いて、式(VI)で表される化合物にプリン塩基又はピリミジン塩基を導入して、式(VII)：

40

【化29】



50

[式中、PG²及びPG^{5'} は前記と同義である]

で表される化合物を形成させる段階、並びに、該式 (VII) で表される化合物の5-位のヒドロキシル基の保護基をPG^{5'} からPG⁵に交換して式 (Ic) で表される化合物を形成させる段階を含む。式 (V) において、PG^{5'} が、式 (Ic) の基PG⁵と同一の基である場合、本工程は、式 (V) で表される化合物の1,2-位のヒドロキシル基を保護化して、式 (VI) で表される化合物を形成させる段階、プリン塩基又はピリミジン塩基に対するグリコシル化反応を用いて、式 (VI) で表される化合物にプリン塩基又はピリミジン塩基を導入して、式 (Ic) で表される化合物を形成させる段階を含む。この場合、本工程は、前記保護基の交換段階を含まない。

【 0 0 9 2 】

式 (VI) において、PG¹は、酸性条件下において安定である保護基であることが好ましく、酸性条件下において安定で、且つアルカリ処理で脱保護される保護基であることがより好ましく、アセチルであることがさらに好ましい。

【 0 0 9 3 】

式 (VI) 及び式 (VII) において、PG²は、式 (Ic) における基PG²と同義である。

【 0 0 9 4 】

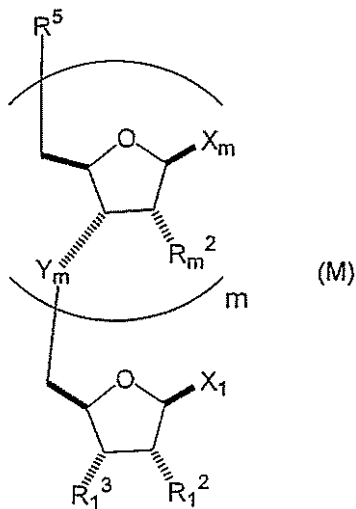
本工程において、グリコシル化反応は、例えば、アセトニトリル又は塩化メチレンのような有機溶媒中、トリメチルシリルトリフラート又は塩化スズ存在下、プリン塩基又はピリミジン塩基を、式 (V) 又は (VI) で表される化合物と反応させることにより実施することができる。或いは、プリン塩基又はピリミジン塩基を、予め1,1,3,3,3-ヘキサメチルジシラザン及びクロロトリメチルシランと反応させることによってシリル化し、該シリル化されたプリン塩基又はピリミジン塩基を、1,2-ジクロロエタンのような無極性溶媒中、トリメチルシリルトリフルオロメタンスルホネートのような試薬存在下、式 (V) 又は (VI) で表される化合物と反応させることにより実施することができる。グリコシル化反応の反応温度は、20 ~ 還流温度の範囲であることが好ましく、30 ~ 還流温度であることがより好ましい。また、反応時間は、2~48時間の範囲であることが好ましく、2~36時間の範囲であることがより好ましい。ここで、式 (V) 又は (VI) で表される化合物の1-ヒドロキシル基の立体化学は特に限定されず、 β -配置であっても α -配置であってもよく、或いはラセミ化していてもよい。前記の条件で本工程を実施することにより、式 (Ic) で表される化合物を高収率で製造することができる。

【 0 0 9 5 】

< 3. トリアゾール連結型オリゴリボヌクレオチド類縁体 >

本発明はまた、式 (M) :

【 化 3 0 】



で表される化合物に関する。本発明において、式 (M) で表される化合物を、「1,2,3-トリアゾール環を含む有機基で連結されたオリゴリボヌクレオチド (RNA) 類縁体」又は単

10

20

30

40

50

に「トリアゾール連結型オリゴリボヌクレオチド (RNA) 類縁体 (T^L RNA)」と記載する場合がある。本発明の式 (M) で表されるトリアゾール連結型オリゴリボヌクレオチド類縁体は、親化合物である天然オリゴリボヌクレオチド分子と比較して、生体内における安定性、標的細胞内に移行するための細胞膜透過性、及びノ又は相補鎖に対する結合力を実質的に維持した非天然オリゴリボヌクレオチド分子として使用することができる。また、本発明の式 (M) で表されるトリアゾール連結型オリゴリボヌクレオチド類縁体は、以下において説明するトリアゾール連結型オリゴリボヌクレオチドを含むキメラ型オリゴリボヌクレオチド類縁体の原料としても使用することができる。

【0096】

式 (M) において、 m は、1以上の整数であることが必要である。 m は、1~30の範囲の整数であることが好ましく、1~20の範囲の整数であることがより好ましい。

10

【0097】

式 (M) において、 X_1 及び X_m は、それぞれ独立して、プリン塩基及びピリミジン塩基から選択されることが必要である。但し、 m が2以上の整数の場合、 X_m は、互いに同一の基であってもよく、異なる基であってもよい。 X_1 及び X_m は、それぞれ独立して、アデニン及びグアニン等のプリン核酸塩基、及びこれらの誘導体、並びに、ウラシル、シトシン及びチミン等のピリミジン核酸塩基、及びこれらの誘導体からなる群より選択されることが好ましい。

【0098】

式 (M) において、 R_1^2 及び R_m^2 は、それぞれ独立して、ヒドロキシル又はその保護形態であることが必要である。但し、 m が2以上の整数の場合、 R_m^2 は、互いに同一の基であってもよく、異なる基であってもよい。 R_1^2 及び R_m^2 は、それぞれ独立して、ヒドロキシル、或いは酸性条件下において安定である保護基によって形成されるヒドロキシルの保護形態であることが好ましく、ヒドロキシル、或いは酸性条件下において安定で、且つアルカリ処理で脱保護される保護基によって形成されるヒドロキシルの保護形態であることがより好ましく、ヒドロキシル、或いはアセチル (Ac) 若しくはベンゾイル (Bz) のようなアシル、又は tert-ブチルジメチルシリル (TBDMS)、トリイソプロピルシリル (TIPS) 若しくは tert-ブチルジフェニルシリル (TBDPS) のようなシリルによって形成されるヒドロキシルの保護形態であることがより好ましい。

20

【0099】

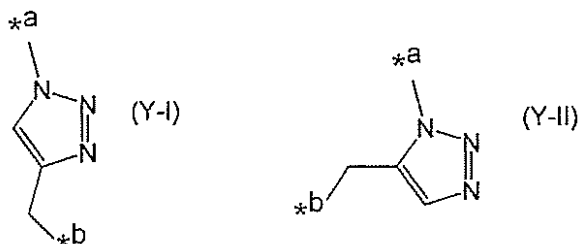
式 (M) において、 R_1^3 は、ヒドロキシル又はその保護形態若しくは活性化形態であることが必要である。 R_1^3 は、ヒドロキシル又はヒドロキシルの活性化形態であることが好ましく、ヒドロキシル又は2-シアノエチル N,N-ジイソプロピルホスホロアミダイトであることがより好ましい。 R_1^3 が、前記のヒドロキシルの活性化形態である場合、式 (M) で表される化合物を、当該技術分野で通常使用される核酸の固相合成法において原料として使用することができる。

30

【0100】

式 (M) において、 Y_m は、1,2,3-トリアゾール環を含む二価の基であることが必要である。 Y_m は、それぞれ独立して、以下の式 (Y-I) 及び (Y-II) :

【化31】



40

[式中、

*a は、 X^m を含むヌクレオチド部分との結合位置を示し、

*b は、 X^1 を含むヌクレオチド部分との結合位置を示す]

50

からなる群より選択されることが好ましい。分子中に、1,2,3-トリアゾール環を含む二価の基をヌクレオシドの架橋基として含むことにより、本発明の式(M)で表される化合物は、生体内における高い安定性、標的細胞内に移行するための高い細胞膜透過性、及び/又は相補鎖に対する高い結合力を有することができる。

【0101】

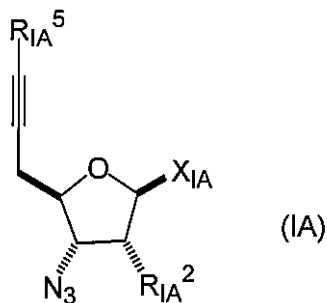
式(M)において、 R^5 は、ヒドロキシル又はその保護形態であることが必要である。 R^5 は、ヒドロキシル、或いは酸性及び/又は塩基性条件下において安定である保護基によって形成されるヒドロキシルの保護形態であることが好ましく、ヒドロキシル、或いはトリチル若しくはジメトキシトリチル(DMTTr)のような非置換、モノ置換若しくはジ置換トリチル、又はベンジル(Bn)によって形成されるヒドロキシルの保護形態であることがより好ましく、トリチル若しくはジメトキシトリチル(DMTTr)のような非置換、モノ置換若しくはジ置換トリチル保護基によって形成されるヒドロキシルの保護形態であることがさらに好ましい。

10

【0102】

本発明の式(M)で表されるトリアゾール連結型オリゴリボヌクレオチド類縁体は、式(IA)：

【化32】



20

[式中、

X_{1A} は、それぞれ独立して、プリン塩基及びピリミジン塩基から選択され；

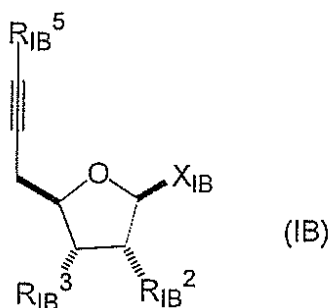
R_{1A}^2 は、水素、ヒドロキシル又はその保護形態であり；

R_{1A}^5 は、水素又は保護基である]

で表される化合物と式(IB)：

30

【化33】



40

[式中、

X_{1B} は、それぞれ独立して、プリン塩基及びピリミジン塩基から選択され；

R_{1B}^2 は、水素、ヒドロキシル又はその保護形態であり；

R_{1B}^3 は、ヒドロキシル又はその保護形態若しくは活性化形態であり；

R_{1B}^5 は、水素又は保護基である]

で表される化合物とを連結反応させる工程(1)、前記工程(1)で得られた工程(1)の連結体とm-2個の式(IA)で表される化合物とを順次連結反応させる工程(2)、前記工程(2)で得られた工程(2)の連結体と式(IC)で表される化合物とを連結反応させる工程(3)を含む方法によって製造することができる。

【0103】

50

式(IA)及び式(IB)において、 X_{IA} 及び X_{IB} 、 R_{IA}^2 及び R_{IB}^2 、並びに R_{IB}^3 は、前記で説明した X 、 R^2 、及び R^3 とそれぞれ同義であることが好ましい。

【0104】

式(IA)及び式(IB)において、 R_{IA}^5 及び R_{IB}^5 は、水素、或いは酸性条件下において安定で、且つ脱シリル化条件で脱保護される保護基であることが好ましい。

【0105】

式(IA)で表される化合物及び式(IB)で表される化合物は、予め合成されたものを購入等して準備してもよく、例えば特許第5075340号公報又は特開2011-153111号公報に記載の方法に基づき合成することによって準備してもよい。いずれの場合も、本発明の式(M)で表される化合物の製造方法の実施形態に包含される。

10

【0106】

前記連結反応は、各原料化合物を、触媒存在下の反応系中で反応させることによって実施することが好ましい。前記触媒としては、例えば、一価銅錯体、二価銅及び還元剤の組み合わせ、0価銅及び二価銅の組み合わせ、並びにルテニウム錯体を挙げることができる。一価銅錯体としては、例えば、臭化銅ジメチルスルフィド錯体等のハロゲン化銅ジメチルスルフィド錯体、並びに臭化銅(I)及びヨウ化銅(I)等のハロゲン化銅(I)を挙げることができる。二価銅及び還元剤の組み合わせとしては、例えば、硫酸銅(II)の無水物又は水和物とアスコルビン酸ナトリウムとの組み合わせ、酢酸銅(II)とアスコルビン酸ナトリウムとの組み合わせ、塩化銅(II)とアスコルビン酸ナトリウムとの組み合わせ、並びに硫酸銅の無水物又は水和物とトリ(カルボキシエチル)ホスフィンとの組み合わせを挙げることができる。この場合、還元剤によって二価銅が還元されて、反応液中で一価銅を生成する。ルテニウム錯体としては、 $Ru(OAc)_2(PPh_3)_2$ 、 $Cp^*RuCl(PPh_3)_2$ 及び $Cp^*RuCl(NBD)$ のような二価ルテニウム錯体を挙げることができる。前記の触媒を用いることにより、結果として得られる式(M)で表されるトリアゾール連結型オリゴリボヌクレオチド類縁体の収量を向上させることができる。

20

【0107】

前記連結反応は、各原料化合物を、溶媒存在下の反応系中で反応させることによって実施することが好ましい。前記溶媒は、tert-ブタノール、メタノール若しくは2-プロパノールのようなプロトン性極性有機溶媒、ジメチルホルムアミド(DMF)、ジメチルスルホキシド(DMSO)、アセトニトリル若しくはピリジンのような非プロトン性極性有機溶媒、又はそれらの組合せであることが好ましい。前記の溶媒を用いることにより、結果として得られる式(M)で表されるトリアゾール連結型オリゴリボヌクレオチド類縁体の収量を向上させることができる。

30

【0108】

前記連結反応の反応温度は、20~80の範囲であることが好ましく、50~60の範囲であることがより好ましい。また、反応時間は、2~48時間の範囲であることが好ましく、6~24時間の範囲であることがより好ましい。前記の条件で連結反応を実施することにより、結果として得られる式(M)で表されるトリアゾール連結型オリゴリボヌクレオチド類縁体の収量を向上させることができる。

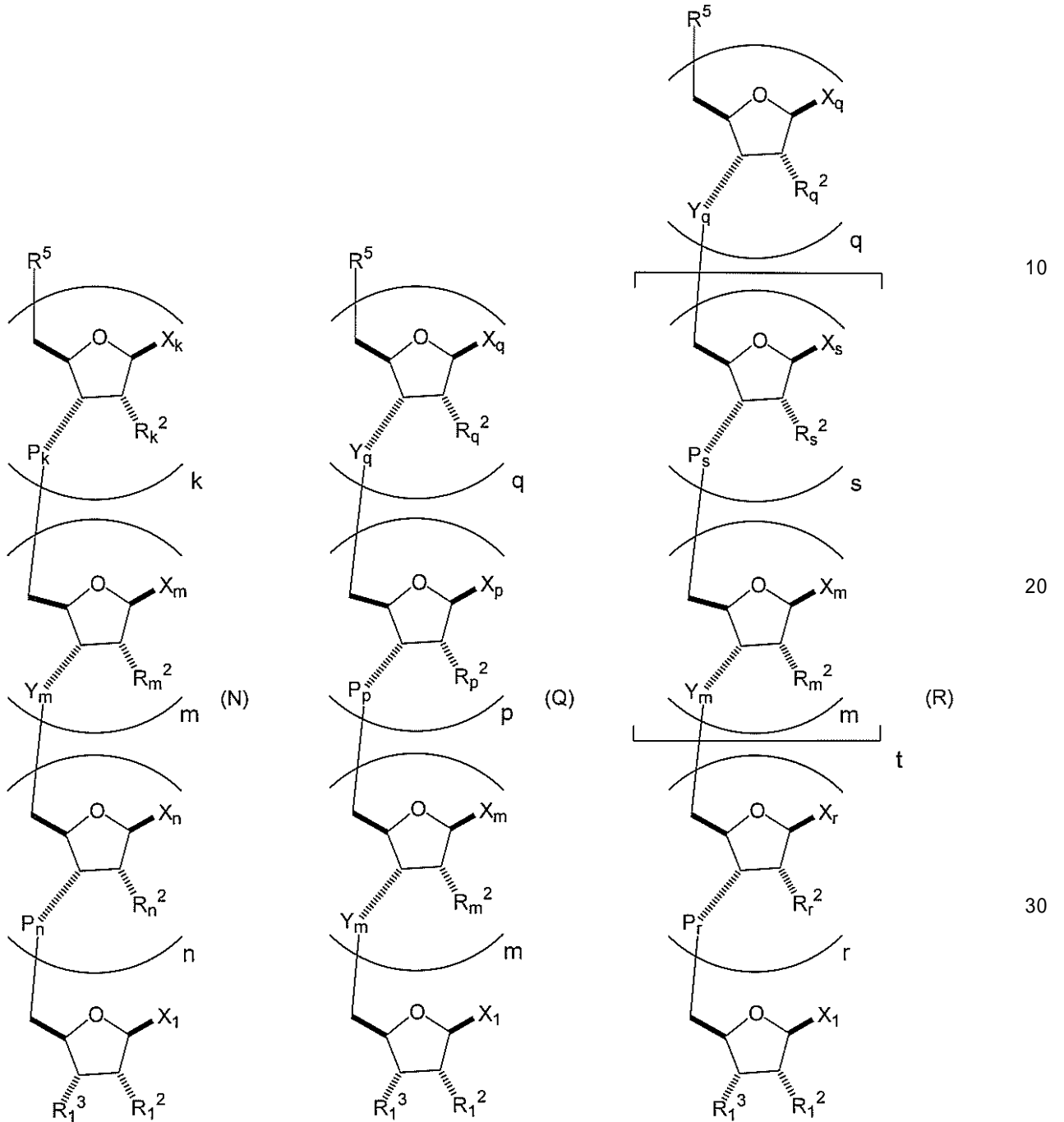
【0109】

<4. トリアゾール連結型オリゴリボヌクレオチドを含むキメラ型オリゴリボヌクレオチド類縁体>

40

本発明はまた、式(N)、(Q)及び(R)のいずれか：

【化 3 4】



で表される化合物に関する。本発明において、式 (N)、(Q) 及び (R) で表される化合物を、「1,2,3-トリアゾール環を含む有機基で連結されたオリゴリボヌクレオチドを含むキメラ型オリゴリボヌクレオチド (RNA) 類縁体」、「トリアゾール連結型オリゴリボヌクレオチドを含むキメラ型オリゴリボヌクレオチド (RNA) 類縁体」又は単に「キメラ型オリゴリボヌクレオチド (RNA) 類縁体 (T^L -RNA-RNA)」と記載する場合がある。本発明の式 (N)、(Q) 及び (R) で表されるキメラ型オリゴリボヌクレオチド類縁体は、分子内にリン酸ジエステル結合、又はリン酸ジエステル結合の非架橋酸素原子が1個以上の硫黄原子若しくはボラノ基で置換された結合を有するため、一定の水溶性を有する。それ故、本発明の式 (N)、(Q) 及び (R) で表されるキメラ型オリゴリボヌクレオチド類縁体は、親化合物である天然オリゴリボヌクレオチド分子と比較して、生体内における安定性、標的細胞内に移行するための細胞膜透過性、及び/又は相補鎖に対する結合力だけでなく、水溶性を実質的に維持した非天然オリゴリボヌクレオチド分子として使用することができる。

【0110】

式(N)、(Q)及び(R)において、k、n、r及びsは、それぞれ独立して、0以上の整数であることが必要である。但し、k及びnは、同時に0になることはない。また、r及びsは、同時に0になることはない。pは、1以上の整数であることが必要である。m及びqは、それぞれ独立して、0以上の整数であることが必要である。但し、m及びqは、同時に0になることはない。tは、0以上の整数であることが必要である。kは、0~30の範囲の整数であることが好ましく、1~20の範囲の整数であることがより好ましい。mは、0~30の範囲の整数であることが好ましく、1~20の範囲の整数であることがより好ましい。nは、0~30の範囲の整数であることが好ましく、1~20の範囲の整数であることがより好ましい。pは、1~30の範囲の整数であることが好ましく、1~20の範囲の整数であることがより好ましい。qは、0~30の範囲の整数であることが好ましく、1~20の範囲の整数であることがより好ましい。rは、0~30の範囲の整数であることが好ましく、1~20の範囲の整数であることがより好ましい。sは、0~30の範囲の整数であることが好ましく、1~20の範囲の整数であることがより好ましい。tは、0~30の範囲の整数であることが好ましく、1~20の範囲の整数であることがより好ましい。

10

【0111】

式(N)において、k、m及びnは、 $k+n$ とmとの比が1:30~60:1の範囲であることが好ましく、2:30~30:1の範囲であることがより好ましく、2:1~20:1の範囲であることがさらに好ましい。式(Q)において、m、p及びqは、pと $q+m$ との比が1:30~60:1の範囲であることが好ましく、2:30~30:1の範囲であることがより好ましく、2:1~20:1の範囲であることがさらに好ましい。式(R)において、m、q、r、s及びtは、 $r+s \times t$ と $q+m \times t$ との比が1:30~60:1の範囲であることが好ましく、2:30~30:1の範囲であることがより好ましく、2:1~20:1の範囲であることがさらに好ましい。前記の条件を満たす場合、式(N)、(Q)及び(R)で表される化合物は、ヌクレオシドの架橋基中に、リン酸ジエステル結合、又はリン酸ジエステル結合の非架橋酸素原子が1個以上の硫黄原子若しくはボラノ基で置換された結合を一定の割合で含む。それ故、前記の条件を満たす場合、式(N)、(Q)及び(R)で表される化合物は高い水溶性を有することができる。

20

【0112】

式(N)、(Q)及び(R)において、 X_1 、 X_k 、 X_m 、 X_n 、 X_p 、 X_q 、 X_r 及び X_s は、それぞれ独立して、プリン塩基及びピリミジン塩基から選択されることが必要である。但し、kが2以上の整数の場合、 X_k は、互いに同一の基であってもよく、異なる基であってもよい。mが2以上の整数の場合、 X_m は、互いに同一の基であってもよく、異なる基であってもよい。nが2以上の整数の場合、 X_n は、互いに同一の基であってもよく、異なる基であってもよい。pが2以上の整数の場合、 X_p は、互いに同一の基であってもよく、異なる基であってもよい。qが2以上の整数の場合、 X_q は、互いに同一の基であってもよく、異なる基であってもよい。rが2以上の整数の場合、 X_r は、互いに同一の基であってもよく、異なる基であってもよい。sが2以上の整数の場合、 X_s は、互いに同一の基であってもよく、異なる基であってもよい。tが2以上の整数の場合、 X_m 及び X_s は、互いに同一の基であってもよく、異なる基であってもよい。 X_1 、 X_k 、 X_m 、 X_n 、 X_n 、 X_p 、 X_q 、 X_r 及び X_s は、それぞれ独立して、アデニン及びグアニン等のプリン核酸塩基、及びこれらの誘導体、並びに、ウラシル、シトシン及びチミン等のピリミジン核酸塩基、及びこれらの誘導体からなる群より選択されることが好ましい。

30

40

【0113】

式(N)、(Q)及び(R)において、 R_1^2 、 R_k^2 、 R_m^2 、 R_n^2 、 R_p^2 、 R_q^2 、 R_r^2 及び R_s^2 は、それぞれ独立して、ヒドロキシル又はその保護形態であることが必要である。但し、kが2以上の整数の場合、 R_k^2 は、互いに同一の基であってもよく、異なる基であってもよい。mが2以上の整数の場合、 R_m^2 は、互いに同一の基であってもよく、異なる基であってもよい。nが2以上の整数の場合、 R_n^2 は、互いに同一の基であってもよく、異なる基であってもよい。pが2以上の整数の場合、 R_p^2 は、互いに同一の基であってもよく、異なる基であってもよい。qが2以上の整数の場合、 R_q^2 は、互いに同一の基であってもよく、異なる基で

50

あってもよい。rが2以上の整数の場合、 R_r^2 は、互いに同一の基であってもよく、異なる基であってもよい。sが2以上の整数の場合、 R_s^2 は、互いに同一の基であってもよく、異なる基であってもよい。tが2以上の整数の場合、 R_m^2 及び R_s^2 は、互いに同一の基であってもよく、異なる基であってもよい。 R_1^2 、 R_k^2 、 R_m^2 、 R_n^2 、 R_p^2 、 R_q^2 、 R_r^2 及び R_s^2 は、それぞれ独立して、ヒドロキシル、或いは酸性条件下において安定である保護基によって形成されるヒドロキシルの保護形態であることが好ましく、ヒドロキシル、或いは酸性条件下において安定で、且つアルカリ処理で脱保護される保護基によって形成されるヒドロキシルの保護形態であることがより好ましく、ヒドロキシル、或いはアセチル (Ac) 若しくはベンゾイル (Bz) のようなアシル、又はtert-ブチルジメチルシリル (TBDMS)、トリイソプロピルシリル (TIPS) 若しくはtert-ブチルジフェニルシリル (TBDPS) のようなシリルによって形成されるヒドロキシルの保護形態であることがより好ましい。

10

【0114】

式(N)、(Q)及び(R)において、 R_1^3 は、ヒドロキシル又はその保護形態若しくは活性化形態であることが必要である。 R_1^3 は、ヒドロキシル又はヒドロキシルの活性化形態であることが好ましく、ヒドロキシル、又は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によって形成されるヒドロキシルの活性化形態であることがより好ましい。 R_1^3 が、前記のヒドロキシルの活性化形態である場合、式(N)、(Q)及び(R)で表される化合物を、当該技術分野で通常使用される核酸の固相合成法において原料として使用することができる。

【0115】

20

式(N)、(Q)及び(R)において、 P_k 、 P_n 、 P_p 、 P_r 及び P_s は、リン酸ジエステル結合、又はリン酸ジエステル結合の非架橋酸素原子が1個以上の硫黄原子若しくはボラノ基で置換された結合からなる群より選択される二価の基であることが必要である。但し、kが2以上の整数の場合、 P_k は、互いに同一の基であってもよく、異なる基であってもよい。nが2以上の整数の場合、 P_n は、互いに同一の基であってもよく、異なる基であってもよい。pが2以上の整数の場合、 P_p は、互いに同一の基であってもよく、異なる基であってもよい。rが2以上の整数の場合、 P_r は、互いに同一の基であってもよく、異なる基であってもよい。sが2以上の整数の場合、 P_s は、互いに同一の基であってもよく、異なる基であってもよい。リン酸ジエステル結合の非架橋酸素原子が1個以上の硫黄原子若しくはボラノ基で置換された結合としては、ホスホロチオエート結合、ホスホロジチオエート結合及びボラノホスフェート結合等を挙げることができる。分子中に、リン酸ジエステル結合をヌクレオシドの架橋基として一定の割合で含むことにより、本発明の式(N)、(Q)及び(R)で表される化合物は、高い水溶性を有することができる。

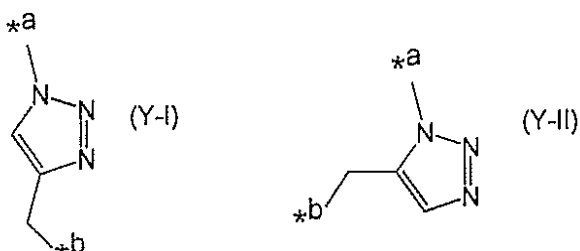
30

【0116】

式(N)、(Q)及び(R)において、 Y_m 及び Y_q は、1,2,3-トリアゾール環を含む二価の基であることが必要である。但し、mが2以上の整数の場合、 Y_m は、互いに同一の基であってもよく、異なる基であってもよい。qが2以上の整数の場合、 Y_q は、互いに同一の基であってもよく、異なる基であってもよい。tが2以上の整数の場合、 Y_m は、互いに同一の基であってもよく、異なる基であってもよい。 Y_m 及び Y_q は、それぞれ独立して、以下の式(Y-I)及び(Y-II)：

40

【化35】



【式中、

50

*^aは、X^m又はX^qを含むヌクレオシド部分との結合位置を示し、

*^bは、X¹、Xⁿ、X^p、X^r又はX^sを含むヌクレオシド部分との結合位置を示す]

からなる群より選択されることが好ましい。分子中に、1,2,3-トリアゾール環を含む二価の基をヌクレオシドの架橋基として一定の割合で含むことにより、本発明の式(N)、(Q)及び(R)で表される化合物は、生体内における高い安定性、標的細胞内に移行するための高い細胞膜透過性、及び/又は相補鎖に対する高い結合力を有することができる。

【0117】

式(N)、(Q)及び(R)において、R⁵は、ヒドロキシル又はその保護形態であることが必要である。R⁵は、ヒドロキシル、或いは酸性及び/又は塩基性条件下において安定である保護基によって形成されるヒドロキシルの保護形態であることが好ましく、ヒドロキシル、或いはトリチル若しくはジメトキシトリチル(DMTri)のような非置換、モノ置換若しくはジ置換トリチル、又はベンジル(Bn)のようなエーテルによって形成されるヒドロキシルの保護形態であることがより好ましく、ヒドロキシル、或いはトリチル若しくはジメトキシトリチル(DMTri)のような非置換、モノ置換若しくはジ置換トリチルによって形成されるヒドロキシルの保護形態であることがさらに好ましい。R⁵が前記の特徴を有することにより、本発明の式(N)、(Q)及び(R)で表される化合物は、標的細胞内に移行するための細胞膜透過性、及び/又は相補鎖に対する結合力をさらに向上させることができる。

10

【0118】

本発明の式(N)で表されるトリアゾール連結型オリゴリボヌクレオチドを含むキメラ型オリゴリボヌクレオチド類縁体は、本発明の式(M)で表されるトリアゾール連結型オリゴリボヌクレオチド類縁体とn個のリボヌクレオチドとを順次連結反応させる工程(1)、前記工程(1)で得られた工程(1)の連結体とk個のリボヌクレオチドとを順次連結反応させる工程(2)を含む方法によって製造することができる。前記製造方法において、n個のリボヌクレオチドは、互いに同一の化合物であってもよく、異なる化合物であってもよい。また、k個のリボヌクレオチドは、互いに同一の化合物であってもよく、異なる化合物であってもよい。前記製造方法において、リボヌクレオチドを連結反応させる工程は、当該技術分野で通常使用される核酸の固相合成法を適用することにより、実施することができる。また、式(N)において、P_k又はP_nが、リン酸ジエステル結合の非架橋酸素原子が1個以上の硫黄原子若しくはボラノ基で置換された結合の場合、リボヌクレオチドを連結反応させる工程は、該結合を形成する段階を含むことが好ましい。リン酸ジエステル結合の非架橋酸素原子が1個以上の硫黄原子若しくはボラノ基で置換された結合を形成する段階は、当該技術分野で通常使用される該結合の形成反応を適用することにより、実施することができる。

20

30

【0119】

本発明の式(Q)で表されるトリアゾール連結型オリゴリボヌクレオチドを含むキメラ型オリゴリボヌクレオチド類縁体は、本発明の式(M)で表されるトリアゾール連結型オリゴリボヌクレオチド類縁体とp-1個のリボヌクレオチドとを順次連結反応させる工程(1)、前記工程(1)で得られた工程(1)の連結体と式(IB)で表される化合物とを連結反応させる工程(2)、前記工程(2)で得られた工程(2)の連結体とq-1個の式(IA)で表される化合物とを順次連結反応させる工程(3)、前記工程(3)で得られた工程(3)の連結体と式(IC)で表される化合物とを連結反応させる工程(4)を含む方法によって製造することができる。また、式(Q)において、X_qを含むトリアゾール連結型オリゴリボヌクレオチド部分とX_mを含むトリアゾール連結型オリゴリボヌクレオチド部分とが同一である、すなわち、qがmと同義であり、X_qがX_mと同義であり、R_q²がR_m²と同義であり、且つY_qがY_mと同義である実施形態の場合、本発明の式(Q)で表される化合物は、本発明の式(M)で表されるトリアゾール連結型オリゴリボヌクレオチド類縁体とp-1個のリボヌクレオチドとを順次連結反応させる工程(1)、前記工程(1)で得られた工程(1)の連結体と式(M)で表される化合物とを連結反応させる工程(2)を含む方法によって製造することができる。前記製造方法において、p-1個のリボヌクレオチドは、互いに同一の化合物

40

50

であってもよく、異なる化合物であってもよい。また、 $q-1$ 個の式(IA)で表される化合物は、互いに同一の化合物であってもよく、異なる化合物であってもよい。前記製造方法において、2個以上の式(M)で表されるトリアゾール連結型オリゴリボヌクレオチド類縁体を使用される場合、式(M)で表されるトリアゾール連結型オリゴリボヌクレオチド類縁体は、互いに同一の化合物であってもよく、異なる化合物であってもよい。前記製造方法において、リボヌクレオチドを連結反応させる工程は、当該技術分野で通常使用される核酸の固相合成法を適用することにより、実施することができる。また、式(Q)において、 P_p が、リン酸ジエステル結合の非架橋酸素原子が1個以上の硫黄原子若しくはボラノ基で置換された結合の場合、リボヌクレオチドを連結反応させる工程は、該結合を形成する段階を含むことが好ましい。リン酸ジエステル結合の非架橋酸素原子が1個以上の硫黄原子若しくはボラノ基で置換された結合を形成する段階は、当該技術分野で通常使用される該結合の形成反応を適用することにより、実施することができる。

【0120】

本発明の式(R)で表されるトリアゾール連結型オリゴリボヌクレオチドを含むオリゴリボヌクレオチド縁体は、 r 個のリボヌクレオチドを連結して得られるオリゴリボヌクレオチドと本発明の式(M)で表されるトリアゾール連結型オリゴリボヌクレオチド類縁体とを連結反応させる工程(1)、前記工程(1)で得られた工程(1)の連結体と $s-1$ 個のリボヌクレオチドとを順次連結反応させる工程(2)、前記工程(2)で得られた工程(2)の連結体と式(IA)で表される化合物とを連結反応させる工程(3)、次いで、前記工程(3)で得られた工程(3)の連結体と $m-1$ 個の式(IA)で表される化合物とを順次連結反応させる工程(4-i)と、前記工程(4-i)で得られた工程(4-i)の連結体と式(IC)で表される化合物とを連結反応させる工程(4-ii)と、前記工程(4-ii)で得られた工程(4-ii)の連結体と $s-1$ 個のリボヌクレオチドとを順次連結反応させる工程(4-iii)と、前記工程(4-iii)で得られた工程(4-iii)連結体と式(IA)で表される化合物とを連結反応させる工程(4-iv)とを $t-1$ 回繰り返す工程(4)、そして、前記工程(4)で得られた工程(4)の連結体と $q-1$ 個の式(IA)で表される化合物とを順次連結反応させる工程(5)、前記工程(5)で得られた工程(5)の連結体と式(IC)で表される化合物とを連結反応させる工程(6)を含む方法によって製造することができる。また、式(R)において、 X_q を含むトリアゾール連結型オリゴリボヌクレオチド部分と X_m を含むトリアゾール連結型オリゴリボヌクレオチド部分とが同一である、すなわち、 q が m と同義であり、 X_q が X_m と同義であり、 R_q^2 が R_m^2 と同義であり、且つ Y_q が Y_m と同義である実施形態の場合、本発明の式(R)で表される化合物は、 r 個のリボヌクレオチドを連結して得られるオリゴリボヌクレオチドと本発明の式(M)で表されるトリアゾール連結型オリゴリボヌクレオチド類縁体とを連結反応させる工程(1)、前記工程(1)で得られた工程(1)の連結体と $s-1$ 個のリボヌクレオチドとを順次連結反応させる工程(2)、次いで、前記工程(2)で得られた工程(2)の連結体と本発明の式(M)で表される化合物とを連結反応させる工程(3-i)と、前記工程(3-i)で得られた工程(3-i)の連結体と $s-1$ 個のリボヌクレオチドとを順次連結反応させる工程(3-ii)とを $t-1$ 回繰り返す工程(3)、そして、前記工程(3)で得られた工程(3)の連結体と本発明の式(M)で表されるトリアゾール連結型オリゴリボヌクレオチド類縁体とを連結反応させる工程(4)を含む方法によって製造することができる。前記製造方法において、 r 個のリボヌクレオチドは、互いに同一の化合物であってもよく、異なる化合物であってもよい。 $s-1$ 個のリボヌクレオチドは、互いに同一の化合物であってもよく、異なる化合物であってもよい。 $m-1$ 個の式(IA)で表される化合物は、互いに同一の化合物であってもよく、異なる化合物であってもよい。また、 $q-1$ 個の式(IA)で表される化合物は、互いに同一の化合物であってもよく、異なる化合物であってもよい。前記製造方法において、2個以上の式(M)で表されるトリアゾール連結型オリゴリボヌクレオチド類縁体を使用される場合、式(M)で表されるトリアゾール連結型オリゴリボヌクレオチド類縁体は、互いに同一の化合物であってもよく、異なる化合物であってもよい。前記製造方法において、リボヌクレオチドを連結反応させる工程は、当該技術分野で通常使用される核酸の固相合成法を適用することにより、実施することができる。ま

10

20

30

40

50

た、式 (R) において、 P_r 又は P_s が、リン酸ジエステル結合の非架橋酸素原子が1個以上の硫黄原子若しくはボラノ基で置換された結合の場合、リボヌクレオチドを連結反応させる工程は、該結合を形成する段階を含むことが好ましい。リン酸ジエステル結合の非架橋酸素原子が1個以上の硫黄原子若しくはボラノ基で置換された結合を形成する段階は、当該技術分野で通常使用される該結合の形成反応を適用することにより、実施することができる。

【0121】

本発明の式 (N)、(Q) 及び (R) で表されるキメラ型オリゴリボヌクレオチド類縁体は、親化合物である天然オリゴリボヌクレオチド分子と比較して、生体内における安定性、標的細胞内に移行するための細胞膜透過性、及びノ又は相補鎖に対する結合力だけでなく、水溶性を実質的に維持した非天然オリゴリボヌクレオチド分子として使用することができる。それ故、本発明はまた、式 (N)、(Q) 及び (R) のいずれかで表されるキメラ型オリゴリボヌクレオチド類縁体を使用する、遺伝子の発現を抑制する方法に関する。本発明の遺伝子の発現を抑制する方法は、前記遺伝子の塩基配列に対応する塩基配列を有する、式 (N)、(Q) 及び (R) のいずれかで表されるキメラ型オリゴリボヌクレオチド類縁体を準備する、キメラ型オリゴリボヌクレオチド類縁体準備工程；前記キメラ型オリゴリボヌクレオチド類縁体準備工程で準備されたキメラ型オリゴリボヌクレオチド類縁体を対象生物に遺伝子導入して、対象生物における遺伝子発現を抑制する、遺伝子発現抑制工程を含むことが必要である。

【0122】

本発明の方法において、キメラ型オリゴリボヌクレオチド類縁体準備工程は、前記で説明した式 (N)、(Q) 及び (R) で表されるキメラ型オリゴリボヌクレオチド類縁体の製造方法を適用することにより、実施することができる。

【0123】

本発明の方法において、遺伝子発現抑制工程で使用される対象生物は、特に限定されないが、ヒト又は非ヒト哺乳動物（例えば、イヌ、ネコ、ブタ、ウマ、ヤギ、ラット、マウス、ウシ、ウサギ又はヒツジ等）のような動物、或いは植物を挙げることができる。また、遺伝子導入は、低分子干渉RNA (siRNA) を用いる遺伝子発現の抑制のために当該技術分野において通常使用される各種の手段を適用することにより、実施することができる。

【0124】

本発明はまた、本発明の遺伝子の発現を抑制する方法に使用するためのキットに関する。本発明のキットは、遺伝子の塩基配列に対応する塩基配列を有する、式 (N)、(Q) 及び (R) のいずれかで表されるキメラ型オリゴリボヌクレオチド類縁体と、1個以上のさらなる要素とを含むことが必要である。前記キットを用いることにより、キメラ型オリゴリボヌクレオチド類縁体を用いて、遺伝子の発現を抑制することができる。

【0125】

本発明のキットに含まれる、遺伝子の塩基配列に対応する塩基配列を有するキメラ型オリゴリボヌクレオチド類縁体は、前記で説明した式 (N)、(Q) 及び (R) で表されるキメラ型オリゴリボヌクレオチド類縁体の製造方法を適用することにより、準備することができる。

【0126】

本発明のキットは、所望により1個以上のさらなる要素を含んでもよい。前記さらなる要素は、式 (N)、(Q) 及び (R) のいずれかで表されるキメラ型オリゴリボヌクレオチド類縁体と相補的な塩基配列を有するオリゴリボヌクレオチド又はその類縁体、リポフェクトアミン2000 (Invitrogen) のような遺伝子導入剤、並びに使用説明書からなる群より選択される1個以上の要素であることが好ましい。前記1個以上のさらなる要素は、当該技術分野で通常使用されるものの中から適宜選択することができる。前記1個以上のさらなる要素を含む本発明のキットを用いて、本発明の遺伝子の発現を抑制する方法を実施することができる。

【0127】

本発明のキットにおいて、式(N)、(Q)及び(R)で表されるキメラ型オリゴリボヌクレオチド類縁体と1個以上のさらなる要素とは、一体化された形態で提供される必要はなく、前記キメラ型オリゴリボヌクレオチド類縁体及び1個以上のさらなる要素が別々に包装された形態で提供されてもよい。いずれの形態も前記キットに包含される。

【0128】

以上説明したように、本発明の本発明の式(1C)及び式(1c)で表される非天然ヌクレオシド類縁体は、本発明の式(M)で表されるトリアゾール連結型オリゴリボヌクレオチド類縁体、或いは本発明の式(N)、(Q)及び(R)で表されるトリアゾール連結型オリゴリボヌクレオチドを含むキメラ型RNA類縁体のような、1,2,3-トリアゾール環を含む有機基を介して結合した構造を含むトリアゾール連結型非天然ヌクレオチドを製造するための原料化合物として使用することができる。それ故、本発明により、生体内における高い安定性、標的細胞内に移行するための高い細胞膜透過性、及び/又は相補鎖に対する高い結合力を有する非天然ヌクレオチドを提供することが可能となる。

【実施例】

【0129】

以下、実施例を用いて本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明の技術的範囲はこれら実施例に限定されるものではない。

【0130】

< I : 一般的実験方法 >

全ての反応は、窒素の不活性雰囲気下で実施した。高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による反応混合物の分析及び生成物の精製は、ODSカラム(COSMOSIL C18-MS-II, 4.6 × 250 mm, ナカライテスク; カラム温度: 40)を装着し、0~25% H₂O (100 mM CH₃CO₂NEt₄にて緩衝化, pH 7)/CH₃CNで60分間、流速: 1.0 mL/minのグラジエント溶出を用いるHPLCシステム上で実施した。分析用薄層クロマトグラフィー(TLC)は、蛍光検出試薬を含有するシリカゲル(230-400メッシュ、0.25 mm厚)を塗布したガラスプレート(Silica gel 60F₂₅₄, Merck社)を用いて実施した。フラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィーは、シリカゲル60N(球状且つ中性ゲル, 40~50 μm, 関東化学)を用いて実施した(Still, W. C.; Kahn, M.; Mitra, A. J. Org. Chem. 1978年, 43巻, p. 2923-2925)。中圧液体クロマトグラフィー(MPLC)は、シリカゲルカラム(SNAP Ultra, 100 g; Biotage社)を装着したMPLCシステムを用いて実施した。赤外吸収(IR)スペクトルは、全反射測定法(ATR)を備えたNicolet iS10 FT-IRを用いて記録し、波数()をcm⁻¹単位で出力した。プロトン(¹H)及びカーボン(¹³C)核磁気共鳴(NMR)スペクトルは、JEOL JNM-ECS 400 (¹H: 400 MHz; ¹³C: 100 MHz)及びBruker AVANCE 400 (¹H: 400 MHz, ¹³C: 100 MHz)分光計を用いて測定した。¹³C NMRスペクトル中のメチル(CH₃)、メチレン(CH₂)及びメチン(CH)シグナルを、DEPTスペクトルによって帰属した。CDCl₃中で測定した¹H NMRスペクトル¹³C NMRスペクトルを、溶媒の吸収に対して補正した。質量分析は、JEOL JMS-T100LC (ESI-TOF MS)質量分析計を用いて、レセルピン(1 ng/μL)を内部標準として測定した。MALDI-TOFマスマスペクトルは、Bruker Daltonicsマイクロフレックス装置(リニアモード, 負イオン, マトリクス: シナピン酸)を用いて測定した。

【0131】

< II : 材料 >

全ての標準的な -シアノエチルRNAホスホロアミダイト、試薬及び固相担体は、グレンリサーチ社から購入した。全ての改変オリゴヌクレオチドは、日本テクノサービス M-2-MX DNA/RNA合成機を用いて合成した。全ての市販ホスホロアミダイトは、無水アセトニトリルに溶解して70 mMの濃度とした。化学合成されたトリアゾール連結型ホスホロアミダイトは、70 mMの濃度に溶解した。

【0132】

< III : オリゴヌクレオチドの合成 >

[III-1 : 5-O-ベンジル-1,2-O-イソプロピリデン- -D-キシロフラノース(1-3)の合成]

10

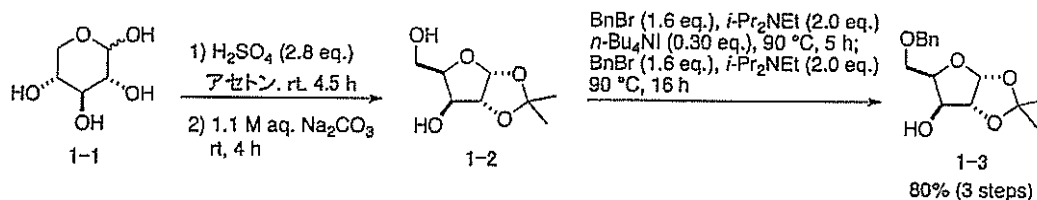
20

30

40

50

【化36】

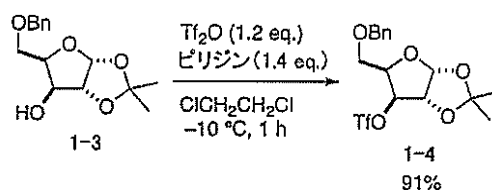


D-キシロース (1-1) (20.0 g, 133 mmol), 硫酸 (20.0 mL, 375 mmol) 及びアセトン (533 mL) の混合物を、室温で4.5時間撹拌した。炭酸ナトリウム水溶液 (1.1 M, 218 mL) の添加後、得られた混合物を、室温で4時間さらに撹拌した。得られた沈殿を濾過して集め、さらなるベンジル化に用いる粗アルコール (1-2) (26.6 g) を得た。粗アルコール、ヨウ化テトラ-n-ブチルアンモニウム (14.7 g, 39.9 mmol)、ベンジルブロミド (25.0 mL, 210 mmol) 及びジ-i-プロピルエチルアミン (46.0 mL, 264 mmol) の混合物を、90 °C で6時間加熱した。次いで、ベンジルブロミド (25.0 mL, 210 mmol) 及びジ-i-プロピルエチルアミン (46.0 mL, 264 mmol) を添加した。得られた混合物を、90 °C で16時間さらに加熱した。ジクロロメタン (60 mL) を添加した後、混合物をジクロロメタン (30 mL × 6) で抽出した。合わせた有機層を、硫酸ナトリウム上で乾燥させ、減圧下で濃縮した。粗物質を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出液: ジクロロメタン)、及び続けて MPLC (溶出液: クロロホルム、4分間の単一組成; 0~10% 酢酸エチル/クロロホルム、11分間のグラジエント) で精製して、標題化合物 (1-3) を白色固体として得た (24.6 g, 106 mmol, 80% (化合物 (1-1) からの3段階の収率))。化合物 (1-3) の物性値: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) 1.32 (s, 3H), 1.48 (s, 3H), 3.59 (d, J = 3.2 Hz, 1H), 3.93 (dd, J = 3.6, 11 Hz, 1H), 3.96 (dd, J = 4.0, 11 Hz, 1H), 4.25 (dd, J = 3.6, 6.8 Hz, 1H), 4.29 (dd, J = 2.8, 3.2 Hz, 1H), 4.51 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 4.57 (d, J = 12 Hz, 1H), 4.65 (d, J = 12 Hz, 1H), 5.98 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 7.28-7.38 (m, 5H)。

【0133】

[III-2: 5-O-ベンジル-1,2-O-イソプロピリデン-3-O-トリフルオロメタンスルホンイル-D-キシロフラノース (1-4) の合成]

【化37】



【0134】

アルコール (1-3) (1.01 g, 3.60 mmol) の1,2-ジクロロエタン溶液 (18 mL) に、トリフルオロメタンスルホン酸無水物 (709 mL, 4.32 mmol) 及びピリジン (406 μL, 5.04 mmol) を -10 °C で添加した。得られた混合物を、-10 °C で1時間撹拌した。得られた混合物を室温まで温めた後、該混合物に、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (15 mL) を添加した。得られた混合物を、ジクロロメタン (15 mL × 4) で抽出した。有機層を、硫酸ナトリウム上で乾燥させ、減圧下で濃縮した。粗物質を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出液: ジクロロメタン) で精製して、標題化合物 (1-4) を黄色油状物として得た (1.40 g, 3.40 mmol, 95%)。化合物 (1-4) の物性値: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) 1.33 (s, 3H), 1.50 (s, 3H), 3.68 (dd, J = 7.6, 9.6 Hz, 1H), 3.79 (dd, J = 5.6 Hz, 1H), 4.49-4.54 (m, 2H), 4.61 (d, J = 12 Hz, 1H), 4.73 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 5.28 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 6.00 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 7.28-7.38 (m, 5H)。

【0135】

[III-3: 3-アジド-5-O-ベンジル-3-デオキシ-1,2-O-イソプロピリデン-D-リボフラノース (1-5) の合成]

10

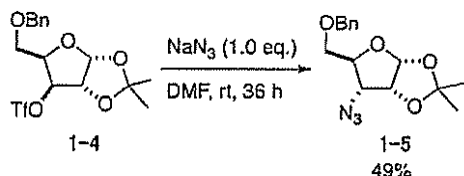
20

30

40

50

【化38】



【0136】

トリフラート(1-4)(5.83 g, 14.1 mmol)及びアジ化ナトリウム(923 mg, 14.1 mmol)のDMF(35 mL)中の混合物を、室温で43時間攪拌した。水を0で添加後、前記混合物をジエチルエーテル(30 mL×5)で抽出した。有機層を、硫酸ナトリウム上で乾燥させ、減圧下で濃縮した。粗物質を、0.5% トリエチルアミンで処理されたシリカゲルを用いるシリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶出液: 15% ジエチルエーテル/ヘキサン)で精製して、標題化合物(1-5)を黄色油状物として得た(2.12 g, 6.96 mmol, 49%)。化合物(1-5)の物性値: $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) 1.37 (s, 3H), 1.57 (s, 3H), 3.60-3.67 (m, 2H), 3.81 (dd, $J = 2.8, 12$ Hz, 1H), 4.20 (ddd, $J = 2.4, 3.6, 9.6$ Hz, 1H), 4.58 (d, $J = 12$ Hz, 1H), 4.64 (d, $J = 12$ Hz, 1H), 4.71 (dd, $J = 3.6$ Hz, 1H), 5.82 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H), 7.27-7.37 (m, 5H).

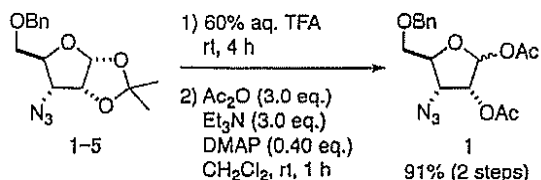
10

【0137】

[III-4: 1,2-ジ-0-アセチル-3-アジド-5-0-ベンジル-5-デオキシ-D-リボフラノース(1)の合成]

20

【化39】



【0138】

アセタール(1-5)(353 mg, 1.16 mmol)及び60%トリフルオロメタンスルホン酸水溶液の混合物を、室温で4時間攪拌した。減圧下で揮発性物質を除去した後、得られた混合物に、無水酢酸(335 μL , 3.55 mmol)、トリエチルアミン(500 μL , 3.58 mmol)、N,N-ジメチルアミノピリジン(DMAP; 58.2 mg, 0.477 mmol)及びジクロロメタン(2.7 mL)を添加した。得られた混合物を、室温で1時間攪拌した。飽和塩化アンモニウム水溶液(3 mL)の添加後、混合物をジクロロメタン(2 mL×6)で抽出した。合わせた有機層を、硫酸ナトリウム上で乾燥させ、減圧下で濃縮した。粗物質を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶出液: ジクロロメタン)で精製して、標題化合物(1)を黄色油状物として得た(370 mg, 1.06 mmol, 92%, ラセミ混合物)。化合物(1)の物性値: $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) 1.95 (s, 3H), 2.13 (s, 3H), 2.17 (s, 3H), 2.17 (s, 3H), 3.61 (d, $J = 3.6$ Hz, 2H), 3.66 (dd, $J = 3.2, 11$ Hz, 1H), 3.70 (dd, $J = 3.6, 11$ Hz, 1H), 4.16 (dd, $J = 3.6, 7.2$ Hz, 1H), 4.19-4.29 (m, 3H), 4.53 (d, $J = 12$ Hz, 1H), 4.58 (d, $J = 12$ Hz, 1H), 4.61 (d, $J = 12$ Hz, 1H), 4.62 (d, $J = 12$ Hz, 1H), 5.26 (dd, $J = 4.8, 7.6$ Hz, 1H), 5.32 (dd, $J = 0.8, 4.4$ Hz, 1H), 6.10 (d, $J = 0.8$ Hz, 1H), 6.42 (d, $J = 4.4$ Hz, 1H), 7.29-7.36 (m, 10H).

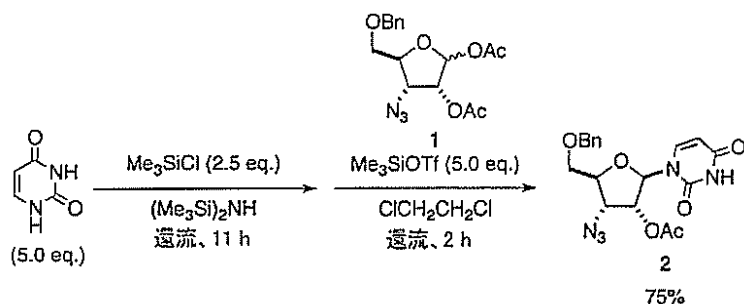
30

40

【0139】

[III-5: 1-(2-0-アセチル-3-アジド-5-0-ベンジル-3-デオキシ-D-リボフラノシル)ウラシル(2)の合成]

【化40】



10

【0140】

ウラシル (130 mg, 1.16 mmol)、クロロトリメチルシラン (50.0 μ L, 0.579 mmol) 及びヘキサメチルジシラザン (3.0 mL)の混合物を、還流温度で11時間加熱した。減圧下で揮発性物質を除去した後、残留したガム状物を、ジアセテート (1) (203 mg, 0.581 mmol)、トリメチルシリルトリフラート (104 μ L, 0.575 mmol)及び1,2-ジクロロエタン (5 mL)と混合した。得られた混合物を、還流温度で2時間攪拌した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (5 mL)を添加した後、混合物をジクロロメタン (6 \times 5 mL)で抽出した。合わせた有機層を、炭酸水素ナトリウム上で乾燥させ、減圧下で濃縮した。粗物質を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶出液: 0~10% メタノール/ジクロロメタン)で精製して、標題化合物 (2) を無色油状物として得た (174 mg, 0.434 mmol, 75%)。化合物 (2) の物

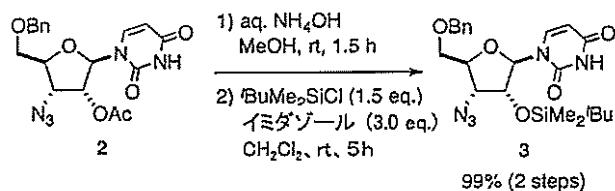
性値: IR (neat) 3189, 3063, 2867, 2361, 2113, 1751, 1690, 1223, 1088, 670 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) 2.90 (s, 3H), 3.60 (dd, $J = 2.0, 11.2$ Hz, 1H), 3.80 (dd, $J = 2.4, 11.2$ Hz, 1H), 4.05 (ddd, $J = 2.0, 2.4, 5.2$ Hz, 1H), 4.28 (dd, $J = 5.0, 5.2$ Hz, 1H), 4.51 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H), 4.54 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H), 5.33 (dd, $J = 4.8, 5.0$ Hz, 1H), 5.38 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.03 (d, $J = 4.8$ Hz, 1H), 7.20-7.35 (m, 5H), 7.61 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) 21.0 (CH_3), 61.1 (CH), 69.6 (CH_2), 74.5 (CH_2), 76.0 (CH), 82.4 (CH), 87.6 (CH), 103.5 (CH), 128.7 (CH), 129.1 (CH), 129.4 (CH), 137.5, 140.4 (CH), 151.0, 163.8, 170.5; HRMS (ESI-TOF), $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{N}_5\text{O}_6\text{Na}$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ に対する計算値: 424.1233, 実測値: 424.1239。

20

【0141】

[III-6: 1-(3-アジド-5-0-ベンジル-3-デオキシ-2-0-t-ブチルジメチルシリル-D-リボフラノシル)ウラシル (3) の合成]

【化41】



30

【0142】

アセテート (2) (574 mg, 1.43 mmol)のメタノール溶液(0.16 mL)に、28% 水性アンモニア (0.16 mL)を滴下した。得られた混合物を、室温で攪拌した。1.5時間後、減圧下で溶媒を除去し、粗アルコールを得た。粗アルコールを、続けてシリル化に用いた。アルコールのジクロロメタン溶液(3.6 mL)に、イミダゾール (292 mg, 4.29 mmol)を0 で加えた。得られた混合物を、室温で攪拌した。30分後、前記混合物に、t-ブチルジメチルシリルクロリド (2.0 M (ジクロロメタン中), 323 mg, 2.15 mmol)を加えた。得られた混合物を、室温で5時間攪拌した。水(3.6 mL)を添加後、前記混合物をジクロロメタン (6 \times 4 mL)で抽出した。合わせた有機層を、硫酸マグネシウム上で乾燥させ、減圧下で濃縮した。粗物質を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶出液: 75% ジクロロメタン/ヘキササン; 2% メタノール/ジクロロメタン)で精製して、標題化合物 (3) を白色固体として

40

50

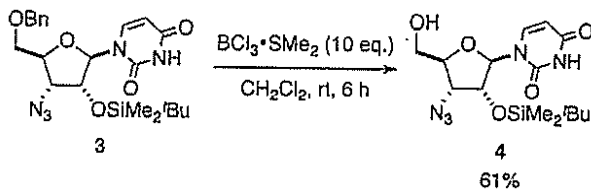
得た (174 mg, 0.434 mmol, 75%)。化合物 (3) の物性値 : IR (粉末) 2930, 2106, 1688, 1265, 1129 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) 0.093 (s, 3H), 0.11 (s, 3H), 0.90 (s, 9H), 3.71 (dd, $J = 2.0, 11.2$ Hz, 1H), 3.92 (dd, $J = 4.6, 6.4$ Hz, 1H), 3.95 (d, $J = 2.0, 11.2$ Hz, 1H), 4.22 (ddd, $J = 2.0, 2.0, 6.4$ Hz, 1H), 4.38 (dd, $J = 3.4, 4.6$ Hz, 1H), 4.56 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H), 4.59 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H), 5.32 (dd, $J = 2.0, 8.0$ Hz, 1H), 5.86 (d, $J = 3.4$ Hz, 1H), 7.30-7.41 (m, 5H), 7.83 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 9.30-9.32 (br s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) -5.0 (CH_3), -4.80 (CH_3), 18.1, 25.7 (CH_3), 60.8 (CH), 68.9 (CH_2), 74.1 (CH_2), 76.7 (CH), 80.8 (CH), 89.7 (CH), 102.1 (CH), 128.2 (CH), 128.6 (CH), 128.9 (CH), 137.1, 140.2 (CH), 150.4, 163.5.

10

【 0 1 4 3 】

[III-7 : 1-(3-アジド-5-0-ベンジル-3-デオキシ--D-リボフラノシル)ウラシル (4) の合成]

【 化 4 2 】



20

【 0 1 4 4 】

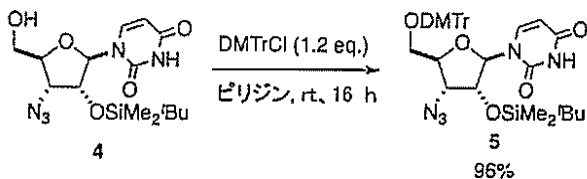
ベンジル化合物 (3) (686 mg, 1.45 mmol) のジクロロメタン溶液 (14.5 mL) に、ポロントリクロリド ジメチルスルフィド錯体 (2.0 M (ジクロロメタン中), 7.25 mL, 14.5 mmol) を滴下した。得られた混合物を、室温で6時間攪拌した。メタノール (4 mL) 及び飽和塩化アンモニウム水溶液 (10 mL) を -78 °C で添加後、混合物をジクロロメタン (6 × 10 mL) で抽出した。合わせた有機層を、硫酸マグネシウム上で乾燥させ、減圧下で濃縮した。粗物質を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出液 : 20-50% 酢酸エチル/ジクロロメタン) で精製して、標題化合物 (4) を白色固体として得た (340 mg, 0.887 mmol, 61%)。化合物 (4) の物性値 : IR (粉末) 2930, 2107, 1691, 1265, 1115 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, 15% $\text{CD}_3\text{OD}/\text{CDCl}_3$) -0.015 (s, 3H), -0.019 (s, 3H), 0.80 (s, 9H), 3.62 (dd, $J = 2.0, 12.4$ Hz, 1H), 3.82 (dd, $J = 2.4, 12.4$ Hz, 1H), 3.87 (dd, $J = 4.8, 5.0$ Hz, 1H), 3.99 (ddd, $J = 2.0, 2.4, 5.0$ Hz, 1H), 4.46 (dd, $J = 4.4, 4.8$ Hz, 1H), 5.62 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 5.66 (d, $J = 4.4$ Hz, 1H), 7.81 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, 15% $\text{CD}_3\text{OD}/\text{CDCl}_3$) -5.3 (CH_3), -5.3 (CH_3), 17.8, 25.4 (CH_3), 60.8 (CH), 60.8 (CH_2), 75.9 (CH), 82.4 (CH), 90.5 (CH), 102.1 (CH), 141.3 (CH), 150.6, 164.2.

30

【 0 1 4 5 】

[III-8 : 1-(3-アジド-5-0-ジメトキシトリチル-3-デオキシ-2-0-t-ブチルジメチルシリル--D-リボフラノシル)ウラシル (5) の合成]

【 化 4 3 】



40

【 0 1 4 6 】

アルコール化合物 (4) (336 mg, 0.875 mmol) 及び 4,4'-ジメトキシトリチルクロリド (356 mg, 1.05 mmol) のピリジン溶液 (4.4 mL) を、室温で16時間攪拌した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (4 mL) を 0 °C で添加後、混合物をジクロロメタン (6 × 4 mL) で抽出した。合わせた有機層を、硫酸マグネシウム上で乾燥させ、減圧下で濃縮した。粗物質を、

50

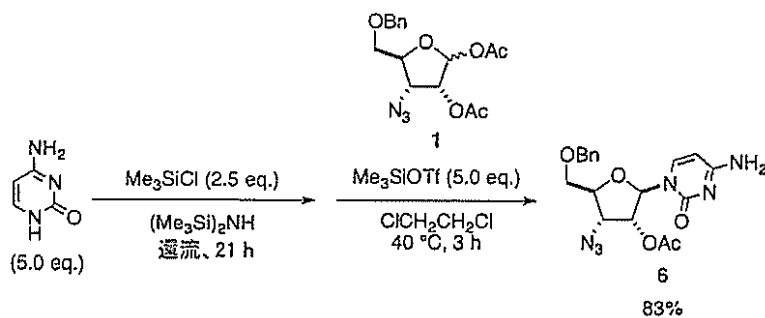
シリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶出液:0-20% 酢酸エチル/ヘキサン)で精製して、標題化合物(5)を白色固体として得た(578 mg, 0.843 mmol, 96%)。化合物(5)の物性値: IR (粉末) 2972, 2108, 1688, 1254, 1049 cm^{-1} ; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) 0.00 (s, 3H), 0.01 (s, 3H), 0.74 (s, 9H), 3.26 (dd, $J = 2.0, 9.5$ Hz, 1H), 3.46 (dd, $J = 1.5, 9.5$ Hz, 1H), 3.59 (s, 6H), 3.82 (dd, $J = 4.0, 6.0$ Hz, 1H), 4.02 (ddd, $J = 1.5, 2.0, 6.0$ Hz, 1H), 4.30 (dd, $J = 2.0, 4.0$ Hz, 1H), 5.16 (dd, $J = 1.5, 7.0$ Hz, 1H), 5.67 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 6.67 (d, $J = 7.5$ Hz, 4H), 7.04-7.22 (m, 9H), 7.84 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) -5.0 (CH_3), -4.7 (CH_3), 18.1, 25.7 (CH_3), 55.3 (CH_3), 60.2 (CH), 61.5 (CH_2), 76.9 (CH), 80.6 (CH), 87.4, 90.1 (CH), 102.2 (CH), 113.4 (CH), 127.3 (CH), 128.1 (CH), 128.2 (CH), 130.1 (CH), 130.2 (CH), 134.9, 135.0, 140.1 (CH), 144.2, 150.4, 158.8, 163.8.

10

【0147】

[III-9: 1-(2-O-アセチル-3-アジド-5-O-ベンジル-3-デオキシ- β -D-リボフラノシル)シトシン(6)の合成]

【化44】



20

【0148】

シトシン(477 mg, 4.29 mmol)、トリメチルシリルクロリド(0.273 mL, 2.15 mmol)及びヘキサメチルジシラザン(11 mL)の混合物を、還流温度で21時間加熱した。減圧下で揮発性物質を除去した後、残留したガム状物を、ジアセテート(1)(308 mg, 0.881 mmol)、トリメチルシリルトリフラート(0.797 mL, 4.41 mmol)及び1,2-ジクロロエタン(8.8 mL)と混合した。得られた混合物を、40 で3時間撹拌した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液(3 mL)を添加した後、混合物をジクロロメタン(3 mL \times 7)で抽出した。合わせた有機層を、硫酸ナトリウム上で乾燥させ、減圧下で濃縮した。粗物質を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶出液:0-5% メタノール/ジクロロメタン)で精製して、標題化合物(6)を白色固体として得た(294 mg, 0.734 mmol, 83%)。化合物(6)の物性値: IR (粉末) 2930, 2113, 1648, 1491, 1224 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) 2.17 (s, 3H), 3.67 (dd, $J = 2.0, 11$ Hz, 1H), 3.91 (dd, $J = 2.0, 11$ Hz, 1H), 4.12 (ddd, $J = 2.0, 2.0, 6.8$ Hz, 1H), 4.28 (dd, $J = 5.6, 6.0$ Hz, 1H), 4.60 (d, $J = 12$ Hz, 1H), 4.63 (d, $J = 12$ Hz, 1H), 5.43 (dd, $J = 3.6, 5.2$ Hz, 1H), 5.68 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 6.08 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H), 7.31-7.43 (m, 5H), 7.85 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H); HRMS (ESI-TOF), $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{N}_6\text{O}_5\text{Na}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ に対する計算値: 423.1393, 実測値: 423.1395.

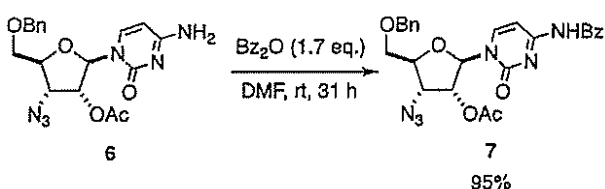
30

40

【0149】

[III-10: 1-(2-O-アセチル-3-アジド-5-O-ベンジル-3-デオキシ- β -D-リボフラノシル)- N^4 -ベンゾイルシトシン(7)の合成]

【化45】



50

【 0 1 5 0 】

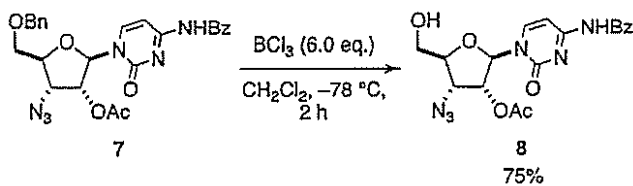
シトシン誘導体 (6) (225 mg, 0.561 mmol) 及び安息香酸無水物 (216 mg, 0.954 mmol) のDMF溶液 (4.0 mL) を、室温で31時間攪拌した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (5 mL) を0 で添加した後、混合物をジクロロメタン (5 mL x 3) で抽出した。合わせた有機層を、硫酸ナトリウム上で乾燥させ、減圧下で濃縮した。粗物質を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出液: 0-5% メタノール/ジクロロメタン) で精製して、標題化合物 (7) を白色固体として得た (381 mg, 0.756 mmol, 95%)。化合物 (7) の物性値: IR (粉末) 2988, 2115, 1485, 1256, 1066 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) 2.19 (s, 3H), 3.70 (dd, $J = 2.0, 11$ Hz, 1H), 3.97 (dd, $J = 2.0, 11$ Hz, 1H), 4.15 (ddd, $J = 2.0, 2.0, 7.2$ Hz, 1H), 4.29 (dd, $J = 5.6, 7.2$ Hz, 1H), 4.63 (d, $J = 12$ Hz, 1H), 4.66 (d, $J = 12$ Hz, 1H), 5.53 (dd, $J = 3.2, 4.8$ Hz, 1H), 6.14 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H), 7.36-7.41 (m, 6H), 7.52 (dd, $J = 8.0, 8.0$ Hz, 2H), 7.62 (dd, $J = 7.2, 8.0$ Hz, 1H), 7.89 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 8.31 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H); HRMS (ESI-TOF), $\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O}_6\text{Na}$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ に対する計算値: 527.1655, 実測値: 527.1631.

10

【 0 1 5 1 】

[III-11: 1-(2-O-アセチル-3-アジド-3-デオキシ- β -D-リボフラノシル)- N^4 -ベンゾイルシトシン (8) の合成]

【 化 4 6 】



20

【 0 1 5 2 】

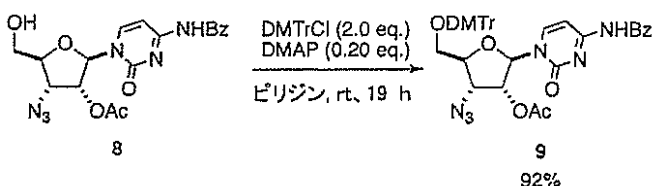
ベンジル化合物 (7) (427 mg, 0.847 mmol) のジクロロメタン溶液 (42 mL) に、ボロントリクロリド (1.0 M (ジクロロメタン中), 5.00 mL, 5.00 mmol) を -78 で滴下した。得られた混合物を、-78 で2時間攪拌した。ジクロロメタン (40 mL)、メタノール (20 mL) 及び飽和塩化アンモニウム水溶液 (10 mL) を添加後、混合物を室温まで温め、ジクロロメタン (15 mL x 4) で抽出した。合わせた有機層を、硫酸ナトリウム上で乾燥させ、減圧下で濃縮した。粗物質を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出液: 0-100% 酢酸エチル/ジクロロメタン) で精製して、標題化合物 (8) を白色固体として得た (265 mg, 0.639 mmol, 75%)。化合物 (8) の物性値: IR (粉末) 2988, 2115, 1485, 1256, 1066 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) 2.18 (s, 3H), 3.84 (dd, $J = 2.0, 13$ Hz, 1H), 4.08 (dd, $J = 2.0, 13$ Hz, 1H), 4.12 (ddd, $J = 2.0, 2.0, 6.4$ Hz, 1H), 4.57 (dd, $J = 6.0, 6.4$ Hz, 1H), 5.74 (dd, $J = 3.6, 5.6$ Hz, 1H), 5.81 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H), 7.48-7.63 (m, 4H), 7.91 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 8.13 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H); HRMS (ESI-TOF), $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_6\text{O}_6\text{Na}$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ に対する計算値: 437.1186, 実測値: 437.1204.

30

【 0 1 5 3 】

[III-12: 1-(2-O-アセチル-3-アジド-5-O-ジメトキシトリチル-3-デオキシ- β -D-リボフラノシル)- N^4 -ベンゾイルシトシン (9) の合成]

【 化 4 7 】



40

【 0 1 5 4 】

アルコール化合物 (8) (230 mg, 0.554 mmol)、4,4'-ジメトキシトリチルクロリド (382

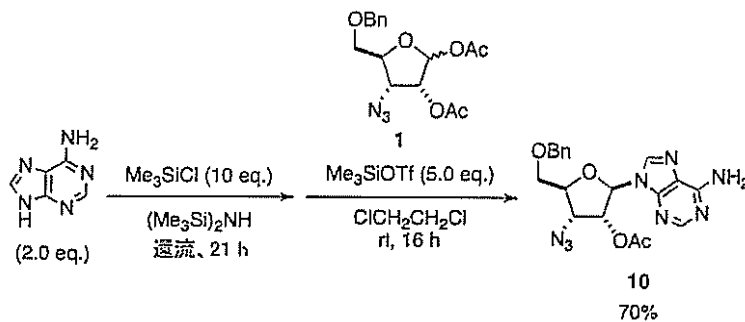
50

mg, 1.13 mmol)及びN,N-ジメチルアミノピリジン (13.9 mg, 0.114 mmol)のピリジン溶液(3.7 mL)を、室温で19時間攪拌した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (4 mL)を0 で添加後、混合物をジクロロメタン (5 mL×10)で抽出した。合わせた有機層を、硫酸ナトリウム上で乾燥させ、減圧下で濃縮した。粗物質を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶出液:2-3% メタノール/ジクロロメタン)で精製して、標題化合物(9)を白色固体として得た(365 mg, 0.509 mmol, 92%)。化合物(9)の物性値:IR (粉末) 2988, 2115, 1485, 1256, 1066 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) 2.19 (s, 3H), 3.44 (dd, J = 2.4, 11 Hz, 1H), 3.70 (dd, J = 2.4, 11 Hz, 1H), 3.83 (s, 6H), 4.09 (ddd, J = 2.4, 2.4, 8.0 Hz, 1H), 4.34 (dd, J = 5.6, 8.0 Hz, 1H), 5.62 (dd, J = 2.4, 5.2 Hz, 1H), 6.12 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 6.88 (dd, J = 2.0, 3.2 Hz, 2H), 6.91 (dd, J = 2.0, 3.2 Hz, 2H), 7.28-7.43 (m, 10H), 7.52 (dd, J = 7.2, 8.0 Hz, 2H), 7.62 (dd, J = 7.2, 7.6 Hz, 1H), 7.89 (d, J = 7.89 Hz, 2H), 8.39 (d, J = 6.8 Hz, 1H); HRMS (ESI-TOF), $\text{C}_{39}\text{H}_{36}\text{N}_6\text{O}_8\text{Na}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ に対する計算値:739.2492, 実測値:739.2479.

【0155】

[III-13: 1-(2-O-アセチル-3-アジド-5-O-ベンジル-3-デオキシ-β-D-リボフラノシル)アデニン(10)の合成]

【化48】



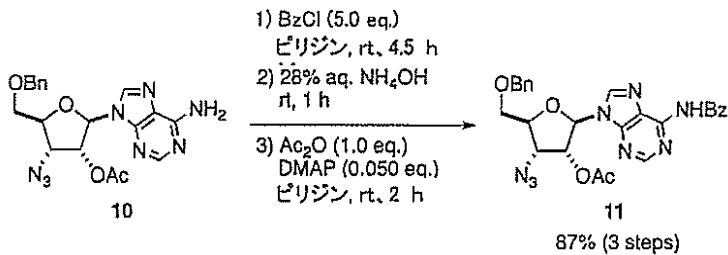
【0156】

アデニン (194 mg, 1.44 mmol)、トリメチルシリルクロリド(0.911 mL, 7.18 mmol)及びヘキサメチルジシラザン(3.6 mL)の混合物を、還流温度で21時間加熱した。減圧下で揮発性物質を除去した後、残留したガム状物を、ジアセテート(1)(252 mg, 0.721 mmol)、トリメチルシリルトリフラート(0.650 mL, 3.60 mmol)及び1,2-ジクロロエタン(7 mL)と混合した。得られた混合物を、室温で16時間攪拌した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液(5 mL)を添加した後、混合物をジクロロメタン(5 mL×10)で抽出した。合わせた有機層を、硫酸ナトリウム上で乾燥させ、減圧下で濃縮した。粗物質を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶出液:0-3% メタノール/酢酸エチル)で精製して、標題化合物(10)を白色固体として得た(215 mg, 0.507 mmol, 70%)。化合物(10)の物性値:IR (粉末) 2973, 2111, 1632, 1382, 1049 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) 2.13 (s, 3H), 3.77 (dd, J = 1.6, 11 Hz, 1H), 3.98 (dd, J = 1.6, 11 Hz, 1H), 4.11 (ddd, J = 1.6, 1.6, 5.6 Hz, 1H), 4.62 (s, 2H), 4.46 (dd, J = 5.6, 7.6 Hz, 1H), 5.24 (dd, J = 7.6, 7.6 Hz, 1H), 5.56 (s, 2H), 5.82 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.33-7.45 (m, 5H), 8.07 (s, 1H), 8.48 (s, 1H); HRMS (ESI-TOF), $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{N}_8\text{O}_4\text{Na}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ に対する計算値:447.1505, 実測値:447.1522.

【0157】

[III-14: 1-(2-O-アセチル-3-アジド-5-O-ベンジル-3-デオキシ-β-D-リボフラノシル)-N¹-ベンゾイルアデニン(11)の合成]

【化49】



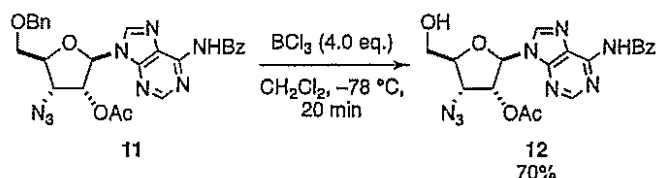
【0158】

アデニン誘導体 (10) (672 mg, 1.58 mmol) のピリジン溶液 (16 mL) に、ベンゾイルクロリド (0.920 mL, 7.93 mmol) を 0 で添加した。得られた混合物を、室温で4.5時間撹拌した。水性水酸化アンモニウム (4 mL) を 0 で添加した。得られた混合物を、1時間撹拌した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (4 mL) を添加した後、混合物をジクロロメタン (5 mL × 4) で抽出した。有機層を、硫酸ナトリウム上で乾燥させ、減圧下で濃縮して粗アルコールを得た (1.36 g)。粗アルコールを、更に精製することなく、続けてアセチル化に用いた。粗物質 (1.36 g) 及び N,N-ジメチルアミノピリジン (9.77 mg, 80.0 μmol) のピリジン溶液 (16 mL) に、無水酢酸 (0.150 mL, 1.58 mmol) を添加した。得られた混合物を、室温で2時間撹拌した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (5 mL) を 0 で添加した後、減圧下で揮発性物質を除去した。得られた混合物に水を添加し、ジクロロメタン (5 mL × 5) で抽出した。有機層を、硫酸ナトリウム上で乾燥させ、減圧下で濃縮した。粗物質を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出液: 0-2% メタノール/ジクロロメタン) で精製して、標題化合物 (11) を白色固体として得た (728 mg, 1.38 mmol, 87%)。化合物 (11) の物性値: IR (粉末) 2926, 2114, 1640, 1317, 1076 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) 1.89 (s, 3H), 3.67 (dd, J = 2.0, 11 Hz, 1H), 3.97 (dd, J = 2.4, 11 Hz, 1H), 4.24 (ddd, J = 2.0, 2.4, 6.8 Hz, 1H), 4.46 (dd, J = 5.2, 6.4 Hz, 1H), 4.64 (d, J = 12 Hz, 1H), 4.78 (d, J = 12 Hz, 1H), 5.68 (dd, J = 3.2, 5.2 Hz, 1H), 7.27 (d, J = 3.2 Hz, 1H), 7.33-7.56 (m, 8H), 8.26 (d, J = 6.4 Hz, 2H), 8.34 (s, 1H), 8.84 (s, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) 20.4 (CH₃), 59.7 (CH), 67.6 (CH₂), 73.9 (CH₂), 77.4 (CH), 82.1 (CH), 89.2 (CH), 114.6, 128.2 (CH), 128.3 (CH), 128.5 (CH), 128.9 (CH), 129.4 (CH), 132.3 (CH), 136.8, 137.2, 142.1 (CH), 144.2 (CH), 150.3, 158.8, 169.4, 179.4; HRMS (ESI-TOF), C₂₆H₂₄N₈O₅Na [M + Na]⁺ に対する計算値: 551.1767, 実測値: 551.1764.

【0159】

[III-15: 1-(2-O-アセチル-3-アジド-3-デオキシ-β-D-リボフラノシル)-N¹-ベンゾイルアデニン (12) の合成]

【化50】



【0160】

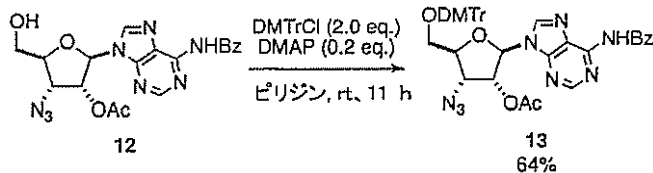
ベンジル化合物 (11) (101 mg, 0.190 mmol) のジクロロメタン溶液 (9.5 mL) に、ボロントリクロリド (1.0 M (ジクロロメタン中), 0.760 mL, 0.760 mmol) を滴下し、-78 で20分間撹拌した。メタノール (5 mL) 及び飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (10 mL) を添加後、混合物を室温まで温め、ジクロロメタン (3 mL × 3) で抽出した。有機層を、硫酸ナトリウム上で乾燥させ、減圧下で濃縮した。粗物質を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出液: 0-3% メタノール/ジクロロメタン) で精製して、標題化合物 (12) を白色固

体として得た(68.2 mg, 0.156 mmol, 82%)。化合物(12)の物性値: IR (粉末) 3346, 2115, 1642, 1317, 1071 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) 1.90 (s, 3H), 3.99 (dd, $J = 1.2, 12$ Hz, 1H), 4.23 (ddd, $J = 1.2, 2.0, 6.8$ Hz, 1H), 4.28 (dd, $J = 2.0, 12$ Hz, 1H), 4.59 (dd, $J = 5.2, 6.8$ Hz, 1H), 5.76 (dd, $J = 3.2, 5.2$ Hz, 1H), 7.24 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H), 7.48 (ddd, $J = 1.2, 7.2, 7.2$ Hz, 2H), 7.56 (ddd, $J = 1.2, 7.2, 7.2$ Hz, 1H), 8.25 (dd, $J = 1.2, 7.2$ Hz, 1H), 8.35 (s, 1H), 9.16 (s, 1H); HRMS (ESI-TOF), $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{N}_8\text{O}_5\text{Na}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ に対する計算値: 461.1298, 実測値: 461.1291.

【0161】

[III-16: 1-(2-O-アセチル-3-アジド-5-O-ジメトキシトリチル-3-デオキシ-β-D-リボフラノシル)- N^1 -ベンゾイルアデニン(13)の合成]

【化51】



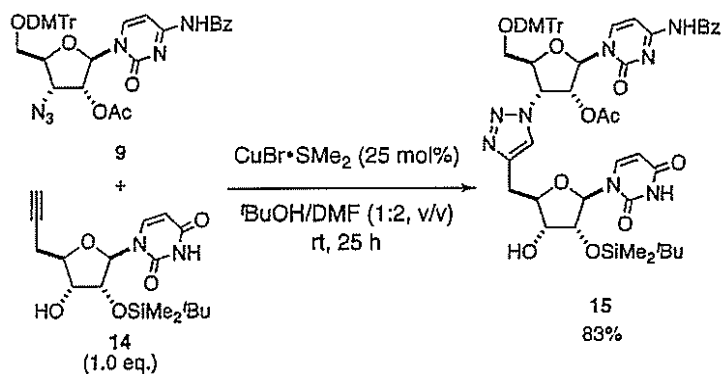
【0162】

アルコール化合物(12)(296 mg, 0.675 mmol)、4,4'-ジメトキシトリチルクロリド(458 mg, 1.35 mmol)及び N,N -ジメチルアミノピリジン(16.5 mg, 0.135 mmol)のピリジン溶液(4.5 mL)を、室温で11時間攪拌した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液(4 mL)を0 で添加後、混合物をジクロロメタン(3 mL \times 8)で抽出した。合わせた有機層を、硫酸ナトリウム上で乾燥させ、減圧下で濃縮した。粗物質を、0.5% トリエチルアミンで処理されたシリカゲルを用いるシリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶出液: 0-1% メタノール/ジクロロメタン)で精製して、標題化合物(13)を白色固体として得た(322 mg, 0.434 mmol, 64%)。化合物(13)の物性値: IR (粉末) 2990, 2115, 1641, 1317, 1072 cm^{-1} ; HRMS (ESI-TOF), $\text{C}_{40}\text{H}_{36}\text{N}_8\text{O}_7\text{Na}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ に対する計算値: 763.2605, 実測値: 763.2578.

【0163】

[III-17: 2量体アルコール(15)の合成]

【化52】



【0164】

アルキン(9)(60.7 mg, 84.7 μmol)、アジド(14)(31.0 mg, 84.7 μmol)及び臭化銅ジメチルスルフィド錯体(4.44 mg, 21.6 μmol)のtert-ブタノール/DMF溶液(1:2, v/v, 0.85 mL)を、室温で25時間攪拌した。溶媒を減圧下で除去した後、粗物質を、0.5% トリエチルアミンで処理されたシリカゲルを用いるシリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶出液: 0-3% メタノール/ジクロロメタン)で精製して、標題化合物(15)を白色固体として得た(75.9 mg, 70.1 μmol , 83%)。化合物(15)の物性値: ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) 0.13 (s, 3H), 0.14 (s, 3H), 0.94 (s, 9H), 1.72 (s, 3H), 2.88 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H), 3.18 (dd, $J = 8.0, 16$ Hz, 1H), 3.28 (dd, $J = 4.8, 16$ Hz, 1H), 3.44 (d, $J = 10$ Hz, 1H), 3.63 (d, $J = 10$ Hz, 1H), 3.87 (s, 3H), 3.88 (s, 3H), 4.07 (dd, $J = 5.6, 11$ Hz, 1H), 4.22 (ddd, $J = 3.2, 4.8, 8.0$ Hz, 1H), 4.51 (dd, $J = 4.4, 5.2$

10

20

30

40

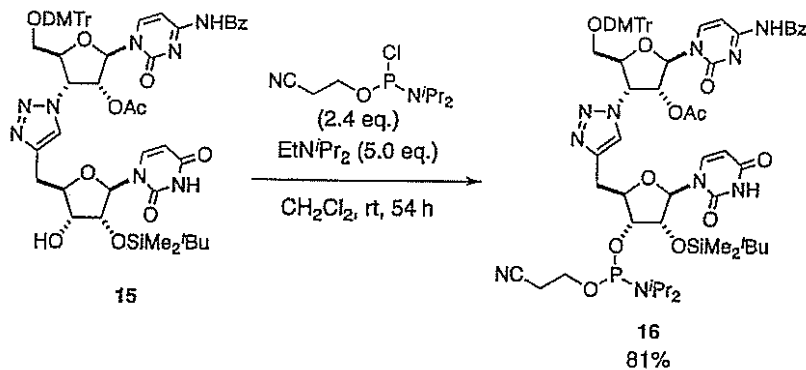
50

Hz, 1H), 5.22 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 5.64 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 5.70 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 5.75 (dd, J = 5.2, 9.2 Hz, 1H), 6.02 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 6.17 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 6.86 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 6.89 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 7.25-7.38 (m, 10H), 7.53 (dd, J = 7.6, 8.0 Hz, 3H), 7.64 (dd, J = 7.6, 7.6 Hz, 1H), 7.74 (s, 1H), 7.99 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 8.59 (d, J = 7.6 Hz, 1H); HRMS (ESI-TOF), $C_{56}H_{62}N_8O_{13}SiNa$ $[M+Na]^+$ に対する計算値 : 1105.4103, 実測値 : 1105.4066.

【 0 1 6 5 】

[III-18 : 2量体ホスホロアミダイト (16) の合成]

【 化 5 3 】



【 0 1 6 6 】

二量体アルコール (15) (122 mg, 112 μ mol) のジクロロメタン溶液 (2.25 mL) に、ジイソプロピルエチルアミン (97.5 μ L, 560 μ mol) 及び2-シアノエチル N,N-ジイソプロピルクロロホスホロアミダイト (60.0 mL, 269 μ mol) を添加した。得られた混合物を、室温で54時間攪拌した。ジクロロメタン (2 mL) 及び飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (2 mL) を0 で添加した後、得られた混合物をジクロロメタン (2 mL \times 5) で抽出した。有機層を、硫酸ナトリウム上で乾燥させ、減圧下で濃縮した。粗物質を、0.5% トリエチルアミンで処理されたシリカゲルを用いるシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出液 : 0-1% メタノール/ジクロロメタン (0.5% トリエチルアミン含有)) で精製して、標題化合物 (16 , ラセミ体) を黄白色固体として得た (117 mg, 90.8 μ mol, 81%)。化合物 (16) の物性値 : 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) 0.04 (s, 3H), 0.05 (s, 3H), 0.06 (s, 3H), 0.09 (s, 3H), 0.85 (s, 9H), 0.86 (s, 9H), 1.16-1.19 (m, 24H), 1.58 (s, 3H), 1.62 (s, 3H), 2.59 (dd, J = 6.0, 6.4 Hz, 2H), 2.63 (dd, J = 6.4, 6.4 Hz, 2H), 3.05-3.91 (m, 29H), 4.07-4.16 (m, 3H), 4.29 (ddd, J = 3.6, 4.0, 10 Hz, 1H), 4.42 (ddd, J = 3.6, 4.0, 9.6 Hz, 1H), 4.47 (dd, J = 4.4, 4.8 Hz, 1H), 4.65 (dd, J = 4.8, 4.8 Hz, 1H), 5.12-5.15 (m, 2H), 5.49 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 5.60-5.64 (m, 3H), 5.71-5.78 (m, 2H), 5.91 (dd, J = 1.6, 5.6 Hz, 1H), 5.94 (dd, J = 1.6, 5.6 Hz, 1H), 6.09 (d, J = 1.2 Hz, 1H), 6.13 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 6.81 (d, J = 4.8 Hz, 4H), 6.83 (d, J = 4.8 Hz, 4H), 7.20-7.33 (m, 20H), 7.41-7.47 (m, 6H), 7.54-7.59 (m, 2H), 7.73 (d, J = 6.4 Hz, 2H), 7.91 (d, J = 7.6 Hz, 4H), 8.48-8.53 (m, 2H); HRMS (ESI-TOF), $C_{65}H_{79}N_{10}O_{14}PSiNa$ $[M+Na]^+$ に対する計算値 : 1305.5182, 実測値 : 1305.5142.

【 0 1 6 7 】

[III-19 : 8量体キメラ型オリゴリボヌクレオチド類縁体 (17) の合成]

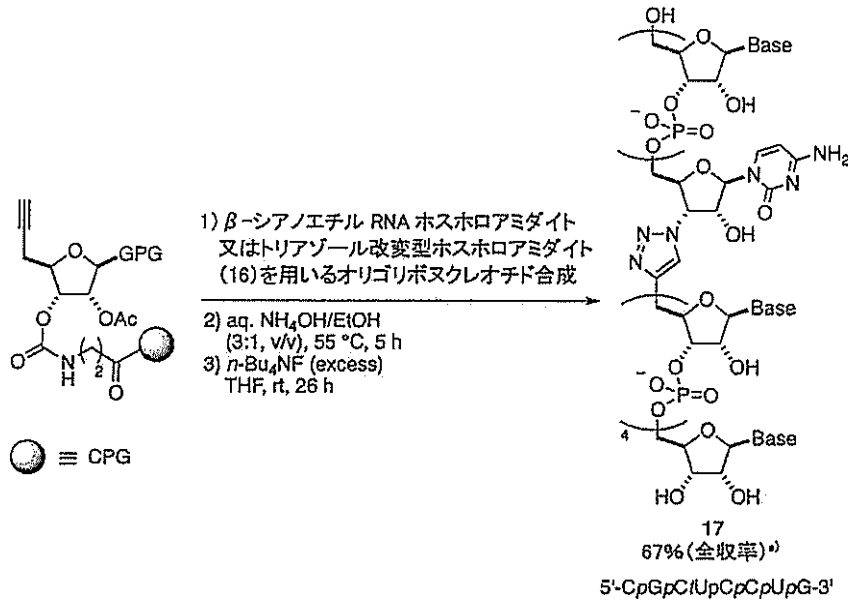
10

20

30

40

【化54】



10

a) 全収率は、固相支持モノマー(rG)からオリゴヌクレオチド合成までの収率。
収率は、遊離したDMTrカチオンのUV分析によって決定した。

【0168】

20

8量体オリゴヌクレオチド類縁体 (17) (5'-CpGpCtUpCpCpUpG-3' ; p : ホスホジエ
テル結合 ; t : トリアゾール結合) の合成は、0.2 μmol の rG 固相支持体 (グレンリサーチ
社) を出発単量体として使用する、 β -シアノエチル RNA ホスホアミダイト 又は 2量体ホ
スホアミダイト (16) を用いる標準的なホスホアミダイト法を用いて実施した。固相
合成の全収率は、遊離したトリチルカチオンの吸収から、67% と決定された。固相支持体
からのオリゴヌクレオチド類縁体の切断は、28% 水酸化アンモニウム/エタノール水
溶液 (3:1, v/v) を 55 °C で 5 時間用いることによって実施し、揮発性物質を減圧下で除去し
た。粗オリゴマーを、さらなる脱シリル化反応に用いた。粗オリゴマーを、 n -テトラブチ
ルアンモニウムフルオリド (1.0 M (THF 中), 1.0 mL) と混合した。得られた混合物を、
室温で 26 時間攪拌した。揮発性物質を減圧下で除去した後、残渣を水に溶解させた。得ら
れた溶液を、Sep-pak (登録商標) (SPE) カラムに通液することによって脱塩した。濾液
を減圧下で濃縮し、HPLC によって部分的に精製した。精製されたオリゴヌクレオチド
類縁体を、MALDI-TOF 質量分析に供して、その質量を確認した。MS (MALDI-TOF), $\text{C}_{76}\text{H}_{94}\text{N}_{29}\text{O}_{52}\text{P}_6$ [M + 5H]⁺ に対する計算値 : 2430, 実測値 : 2431.

30

【0169】

< IV : トリアゾール連結型オリゴヌクレオチドを含むキメラ型 RNA 類縁体の用途 >

[IV-1 : 遺伝子サイレンシングアッセイ]

ヒト HeLa 細胞を、10% (v/v) ウシ胎児血清 (FBS, BioWest) 及び 1% (v/v) ペニシリ
ン - ストレプトマイシン (和光純薬工業) を添加した E-MEM (和光純薬工業) 中で、37
、5% CO_2 雰囲気下で培養した。10% (v/v) FBS を添加した E-MEM と混合した細胞 (1.5×10
 5 /mL) を、12 ウェルプレート (FALCON) の各ウェルに播種 (1 mL / ウェル) し、遺伝子導
入前に 24 時間接着させた。lipofectamine (登録商標) 2000 (2.0 μL , Invitrogen) を
用いて、製造者の指示に従い、細胞を、0.15 μg pEYFP-N1 及び 0.15 μg TagRFP-C プラス
ミド 及び 10 pmol トリアゾール連結型オリゴヌクレオチドを含むキメラ型 RNA 類縁体か
らなる siRNA (表 1) で同時導入した。ネガティブコントロールとして、等量の非標的化対
照 RNA 二本鎖 (duplex) (p0 及び g0) を用いるアッセイを実施した。遺伝子導入から 4 時間
後に、10% (v/v) FBS を添加した新鮮生育培地で培地を交換した。細胞を、合計 48 時間生
育させた後、全 RNA の一定分量を用いる定量的 RT-PCR によって分析した。ISOGEN (ニッポ
ンジーン) を用いて得た siRNA を遺伝子導入した HeLa 細胞からの RNA を、DNase 処理 (TURBO
DNase, Ambion) し、逆転写した (Prime Script RT reagent Kit, Perfect Real Time,

40

50

タカラバイオ)。その結果得られたcDNA、プライマー及びFAM-標識されたTaqman (登録商標)プローブ(配列を表2に示す)、並びにPremix Ex Taq (Probe qPCR, タカラバイオ)の混合物を、PCR反応前に95 で3分間インキュベートした。増幅プロトコールは、95 で15秒間、60 で1分間の40サイクルであった。PCR産物のレベルは、ABI 7300リアルタイムPCRシステムでモニターし、7300システムSDSソフトウェア (Applied Biosystems) を用いて分析した。各試料のEYFP mRNAのレベルは、TagRFP mRNAのレベルに対して規格化した。

【0170】

【表1】

表1 インビトロ遺伝子サイレンシングアッセイに用いる天然型 RNA 及びキメラ型 ^{TL}RNA-RNA の配列

p0	5' -r (CpGpApApUpCpCpUpApCpApApApGpCpGpCpGpCp) d (TpT) -3' (配列番号 1)
g0	5' -r (GpCpGpCpGpCpUpUpUpGpUpApGpGpApUpUpCpGp) d (TpT) -3' (配列番号 2)
p1	5' -r (GpGpCpUpApCpGpUpCpCpApGpGpApGpCpGpCpAp) d (TpT) -3' (配列番号 3)
g1	5' -r (UpGpCpGpCpUpCpCpUpGpGpApCpGpUpApGpCpCp) d (TpT) -3' (配列番号 4)
c1	5' -r (GpGpC tUpApCpGpUpCpCpApGpGpApGpCpGpCpAp) d (TpT) -3' (配列番号 5)
c2	5' -r (UpGpCpGpCpUpCpC tUpGpGpApCpGpUpApGpCpCp) d (TpT) -3' (配列番号 6)

※表中、「p」は、天然型のリン酸ジエステル結合を、「t」は、トリアゾール連結基からなる結合を示す。また、「r」はリボヌクレオチド配列を、「d」はデオキシリボヌクレオチド配列を示す。

【0171】

【表2】

表2 定量的RT-PCR に用いるプライマー及びプローブの配列

EYFP プライマー-F	5' -d (CpCpApCpT pApCpCpApGpCpApGpApApCpApCpCp) -3' (配列番号 7)
EYFP プライマー-R	5' -d (CpT pCpGpT pT pGpGpGpGpT pCpT pT pT pGpCpT pCpApG) -3' (配列番号 8)
EYFP プローブ	5' -FAM-d (TpGpCpT pGpCpT pGpCpCpGpApCpApApCpCpApCpT pApCpCpCpT) -TAMRA-3' (配列番号 9)
TagRFP プライマー-F	5' -d (CpT pGpCpCpT pApCpCpApGpCpT pT pCpApT pGpT pApCpG) -3' (配列番号 10)
TagRFP プライマー-R	5' -d (CpCpCpT pCpApGpGpApApGpGpApCpT pGpCpT pT pA) -3' (配列番号 11)
TagRFP プローブ	5' -FAM-d (ApGpCpApGpApApCpCpT pT pCpApT pCpApApCpCpApCpApCpCpApCpG) -TAMRA-3' (配列番号 12)

※表中、「p」は、天然型のリン酸ジエステル結合を、「t」は、トリアゾール連結基からなる結合を示す。

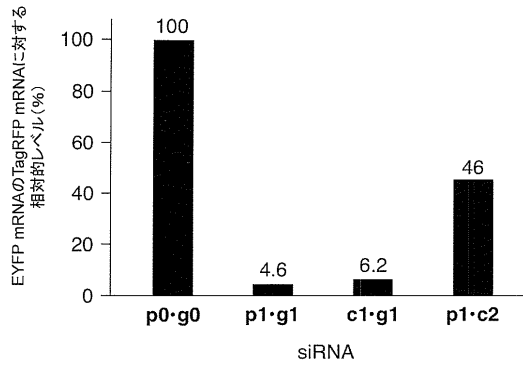
【0172】

キメラ型^{TL}RNA-RNAをパッセンジャー鎖(c1)又はガイド鎖(c2)として用いるインビトロ遺伝子サイレンシングアッセイ後のEYFP mRNAのTagRFP mRNAに対する相対的レベルを図1に示す。ネガティブコントロールとして、非標的化対照RNA二本鎖(p0及びg0)を用いた。

【0173】

本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

【 図 1 】



【 配列表 】

0006501753000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
 C 0 7 H 19/056 (2006.01) C 0 7 H 19/056
 C 0 7 B 61/00 (2006.01) C 0 7 B 61/00 3 0 0

(72)発明者 古樫 加奈子
 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 国立大学法人東北大学内

審査官 三上 晶子

(56)参考文献 特開2007-204367(JP,A)
 MUTISYA,D. et al, Synthesis and properties of triazole-linked RNA, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2011年, Vol.21, No.11, pp.3420-3422
 磯部寛之 他, トリアゾール連結人工核酸の化学, 有機合成化学協会誌, 2012年, Vol.70, No.8, pp.821-830
 CHANDRASEKHAR,S. et al, Synthesis of readily accessible triazole-linked dimer deoxynucleoside phosphoramidite for solid-phase, Synthesis, 2010年, No.21, pp.3710-3714
 ARYA,A. et al, Chemoenzymatic synthesis of 3'-deoxy-3'-(4-substituted-triazol-1-yl)-5-methyluridine, Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids, 2013年, Vol.32, No.12, pp.646-659
 GADTHULA,S. et al, Synthesis and Anti-HIV Activity of -D-3'-Azido-2',3'-unsaturated Nucleosides and -D-3'-Azido-3'-, Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids, 2005年, Vol.24, No.10-12, pp.1707-1727

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 C 0 7 H 1 / 0 0 - 9 9 / 0 0
 C 1 2 N 1 5 / 1 1 3
 C 0 7 B 6 1 / 0 0
 C 0 7 F 9 / 6 5 5 8
 C A p l u s / R E G I S T R Y (S T N)