

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02016/152980

発行日 平成30年1月25日 (2018.1.25)

(43) 国際公開日 平成28年9月29日 (2016.9.29)

(51) Int.Cl.		F I	テーマコード (参考)
<b>C07H 21/02</b>	<b>(2006.01)</b>	C O 7 H 21/02	4 C O 5 7
<b>C07H 21/04</b>	<b>(2006.01)</b>	C O 7 H 21/04	C S P Z 4 C O 7 6
<b>A61P 43/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P 43/00	1 1 1 4 C O 8 4
<b>A61K 48/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K 48/00	4 C O 8 5
<b>A61K 31/713</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K 31/713	4 C O 8 6

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 75 頁) 最終頁に続く

出願番号 特願2017-508427 (P2017-508427)  
 (21) 国際出願番号 PCT/JP2016/059398  
 (22) 国際出願日 平成28年3月24日 (2016.3.24)  
 (31) 優先権主張番号 特願2015-60689 (P2015-60689)  
 (32) 優先日 平成27年3月24日 (2015.3.24)  
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(71) 出願人 304019399  
 国立大学法人岐阜大学  
 岐阜県岐阜市柳戸1番1  
 (74) 代理人 100118706  
 弁理士 青山 陽  
 (72) 発明者 北出 幸夫  
 日本国岐阜県岐阜市柳戸1番1 国立大学  
 法人岐阜大学内  
 (72) 発明者 柴田 綾  
 日本国岐阜県岐阜市柳戸1番1 国立大学  
 法人岐阜大学内  
 Fターム(参考) 4C057 BB04 BB05 DD03 MM01 MM02  
 MM04 MM05 MM09

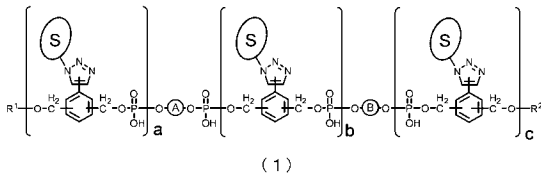
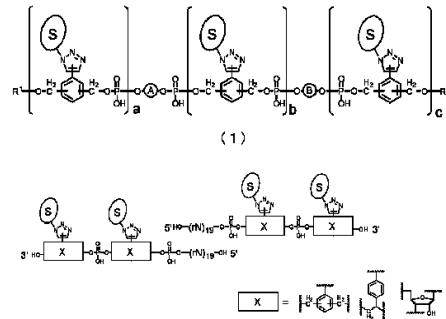
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 オリゴヌクレオチド誘導体及びそれを用いたオリゴヌクレオチド構築物並びにそれらの製造方法

(57) 【要約】

【課題】合成が容易であり、リポフェクション試薬を用いることなく細胞内に導入することができる、新たなオリゴヌクレオチド誘導体を提供する。

【解決手段】本発明のオリゴヌクレオチド誘導体は、例えば(1)で示される。この誘導体は細胞表面のリガンドにアミノ糖鎖部分が結合し、細胞内に導入されると考えられ、選択的なドラッグデリバリー機能が期待できる。



式中、R<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>は、それぞれ独立して水素又はリン酸基を表し、a、b及びcは独立して0以上の整数であって少なくとも1つが1以上であり、A及びBは独立して変更されてもよいオリゴヌクレオチドであってAとBとを合わせた鎖長が3以上のオリゴヌクレオチドを表す。ただし、A及びBにおいてオリゴヌクレオチドの3'末端と5'末端の水酸基を含まない。また、式中Sは糖鎖誘導基、ペプチド鎖又はトコフェロール結合基を示す。また、式中のベンゼン環に結合した水素の替りにアルキル基が結合していてもよい。

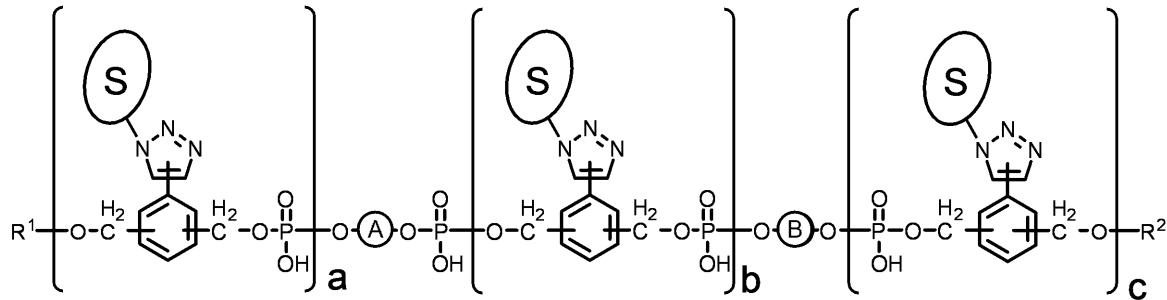
【選択図】 図1

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

次式(1)で表されるオリゴヌクレオチド誘導体。

## 【化 1】



10

(1)

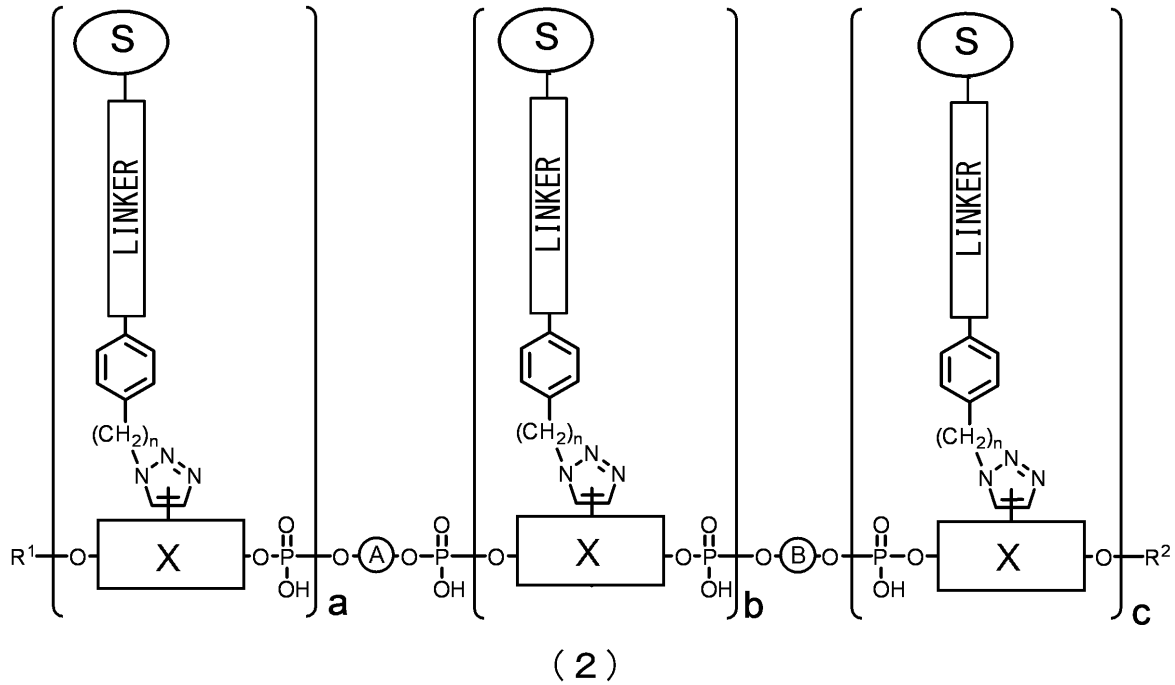
式中、 $R^1$ 及び $R^2$ は、それぞれ独立して水素又はリン酸基を表し、 $a$ 、 $b$ 及び $c$ は独立して0以上の整数であって少なくとも1つが1以上であり、 $A$ 及び $B$ は独立して改変されてもよいオリゴヌクレオチドであって $A$ と $B$ とを合わせた鎖長が3以上のオリゴヌクレオチドを表す。ただし、 $A$ 及び $B$ においてオリゴヌクレオチドの3'末端と5'末端の水酸基を含まない。また、式中 $S$ は糖置換基、ペプチド鎖又はトコフェロール結合基を示す。また、式中のベンゼン環に結合した水素の替りにアルキル基が結合していてもよい。

20

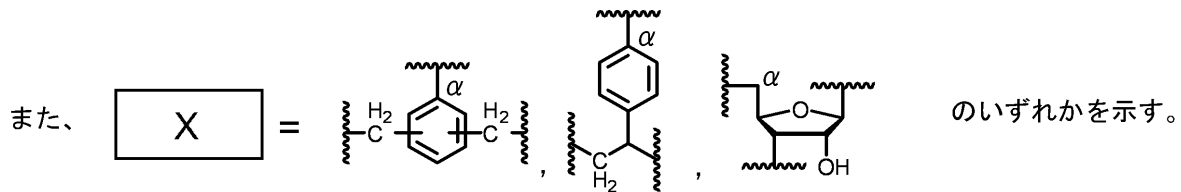
## 【請求項 2】

次式(2)で表されるオリゴヌクレオチド誘導体。

## 【化2】



式中、 $R^1$ 及び $R^2$ は、それぞれ独立して水素又はリン酸基を表し、 $a$ 、 $b$ 及び $c$ は独立して0以上の整数であって少なくとも1つが1以上であり、 $A$ 及び $B$ は独立して改変されてもよいオリゴヌクレオチドであって $A$ と $B$ とを合わせた鎖長が3以上のオリゴヌクレオチドを表す。ただし、 $A$ 及び $B$ においてオリゴヌクレオチドの3'末端と5'末端の水酸基を含まない。また、式中のベンゼン環に結合した水素の替りにアルキル基が結合していてもよい。また、式中 $S$ は糖置換基、ペプチド鎖又はトコフェロール結合基を示し、 $n$ は0~4の自然数を示し、LINKERはリンカーを示す。

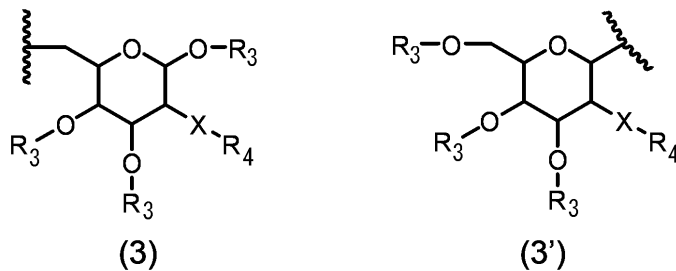


ただし $\alpha$ 印を付けた炭素はトリアゾール環に結合している。また、式中 $X$ に結合した水素の代わりにフッ素及び/又は又はアルキル基が結合していても良い。

## 【請求項3】

前記 $S$ は下記化学構造式(3)又は(3')で示される請求項1又は2に記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

## 【化3】



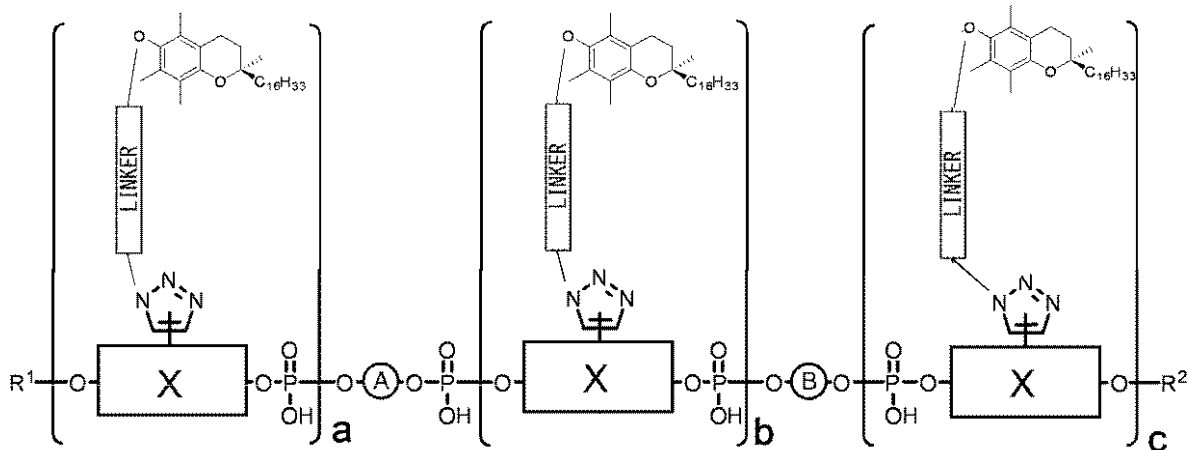
$X = O$ , 又は  $NH$

$R_3$  と  $R_4$  はそれぞれ独立して  $R_3 = H, Ac$ , 又は  $COCF_3$ ;  $R_4 = H, Ac$ , 又は  $COCF_3$

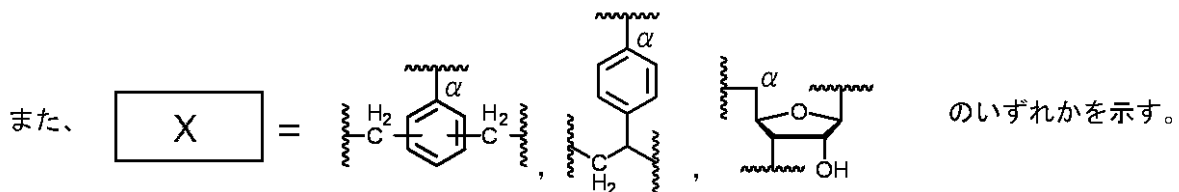
## 【請求項4】

次式で表されるオリゴヌクレオチド誘導体。

## 【化4】



式中、 $R^1$ 及び $R^2$ は、それぞれ独立して水素又はリン酸基を表し、 $a$ 、 $b$ 及び $c$ は独立して0以上の整数であって少なくとも1つが1以上であり、 $A$ 及び $B$ は独立して改変されてもよいオリゴヌクレオチドであって $A$ と $B$ とを合わせた鎖長が3以上のオリゴヌクレオチドを表す。ただし、 $A$ 及び $B$ においてオリゴヌクレオチドの3'末端と5'末端の水酸基を含まない。また、式中のベンゼン環に結合した水素の替りにアルキル基が結合していてもよい。**LINKER**はリンカーを示す。



ただし $\alpha$ 印を付けた炭素はトリアゾール環に結合している。また、式中 $X$ に結合した水素の代わりにフッ素及び/又は又はアルキル基が結合していても良い。

## 【請求項5】

$R^1$ 及び $R^2$ はHであることを特徴とする請求項1乃至4のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

30

## 【請求項6】

$b$ は0であることを特徴とする請求項1乃至5のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

## 【請求項7】

$a$ 及び $b$ はともに0であることを特徴とする請求項1乃至6のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

## 【請求項8】

$c$ は1以上5以下であることを特徴とする請求項7に記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

40

## 【請求項9】

$A$ 及び $B$ は、所定の遺伝子mRNAの部分配列又はその相補配列を有する請求項1乃至8のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

## 【請求項10】

$A$ 及び $B$ を合わせた鎖長は、10以上35以下である請求項1乃至9のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

## 【請求項11】

$A$ 及び $B$ はオリゴリボヌクレオチドであることを特徴とする請求項1乃至10のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

## 【請求項12】

遺伝子発現調節用オリゴヌクレオチド構築物であって、  
請求項1乃至11のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド誘導体を有する構築物。

【請求項13】

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

【請求項14】

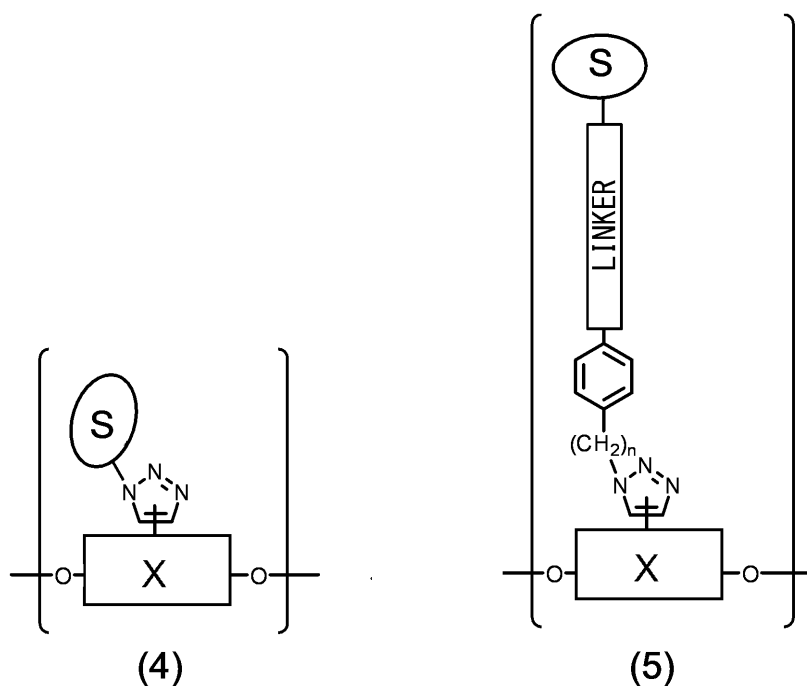
アンチジーン、アンチセンス、アプタマー、siRNA、miRNA、shRNA及びリボザイムから選択される請求項12又は13に記載の構築物。

【請求項15】

10

ダングリグエンド部分に以下の式(4)又は(5)で表されるユニットを有する請求項12乃至14のいずれか1項記載の構築物。

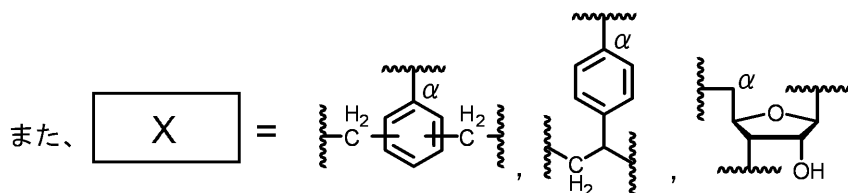
【化5】



20

30

式中Sは糖置換基、ペプチド鎖又はトコフェロール結合基を示し、nは0~4の自然数を示し、  
LINKER はリンカーを示す。



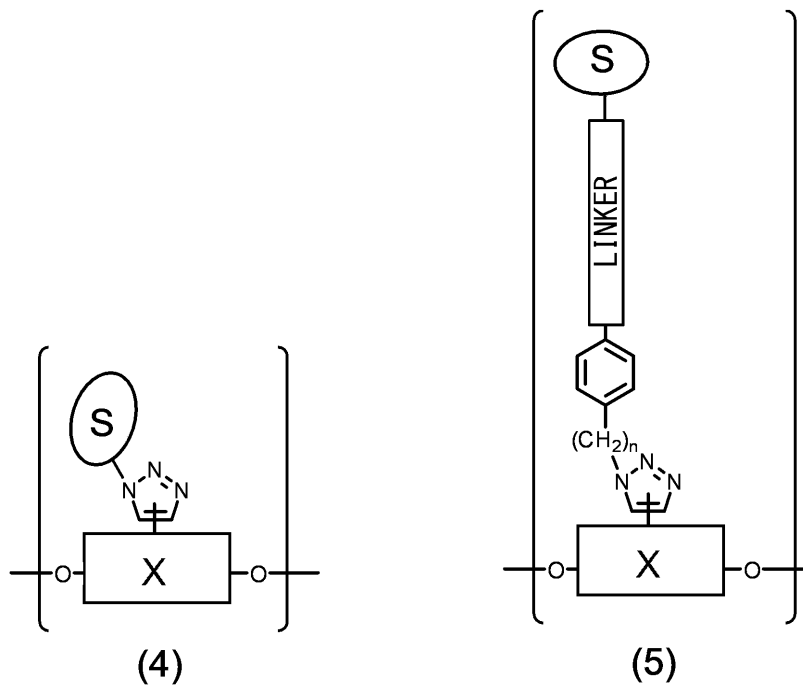
40

ただし $\alpha$ 印を付けた炭素はトリアゾール環に結合している。また、式中Xに結合した水素の代わりにフッ素及び/又は又はアルキル基が結合していても良い。

【請求項16】

siRNAであって、前記オリゴヌクレオチド誘導体において、a及びbは0であり、cは1又は2であり、3'末端ダングリグエンド部分に以下の式(4)又は(5)で表されるユニットを含む請求項15記載の構築物。

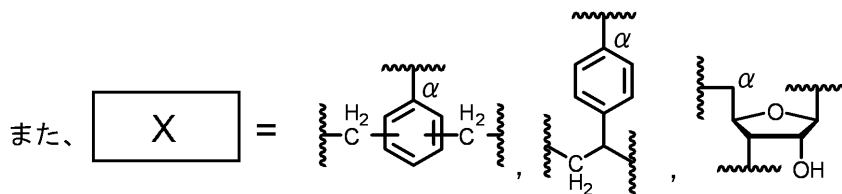
## 【化 6】



10

20

式中Sは糖置換基、ペプチド鎖 又はトコフェロール結合基 を示し、nは0 ~ 4の自然数を示し、  
LINKER はリンカーを示す。



ただし $\alpha$ 印を付けた炭素はトリアゾール環に結合している。また、式中Xに結合した水素の代わりに  
フッ素及び/又は又はアルキル基が結合していても良い。

30

## 【請求項 17】

遺伝子診断用オリゴヌクレオチド構築物であって、請求項 1 乃至 11 のいずれかに記載  
のオリゴヌクレオチド誘導体を有する構築物。

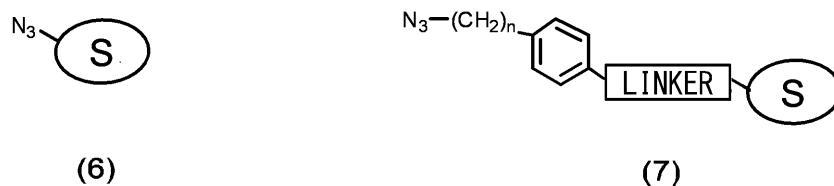
## 【請求項 18】

プローブであることを特徴とする請求項 17 に記載の構築物。

## 【請求項 19】

以下の式 (6) 又は (7) で表される化合物。

## 【化 7】



(6)

(7)

式中Sは糖置換基、ペプチド鎖 又はトコフェノール結合基 を示し、nは0 ~ 4の自然数を示し、  
LINKER はリンカーを示す。

50

## 【請求項 20】

siRNAのダンダリングエンドユニット用である請求項 19 に記載の化合物。

## 【請求項 21】

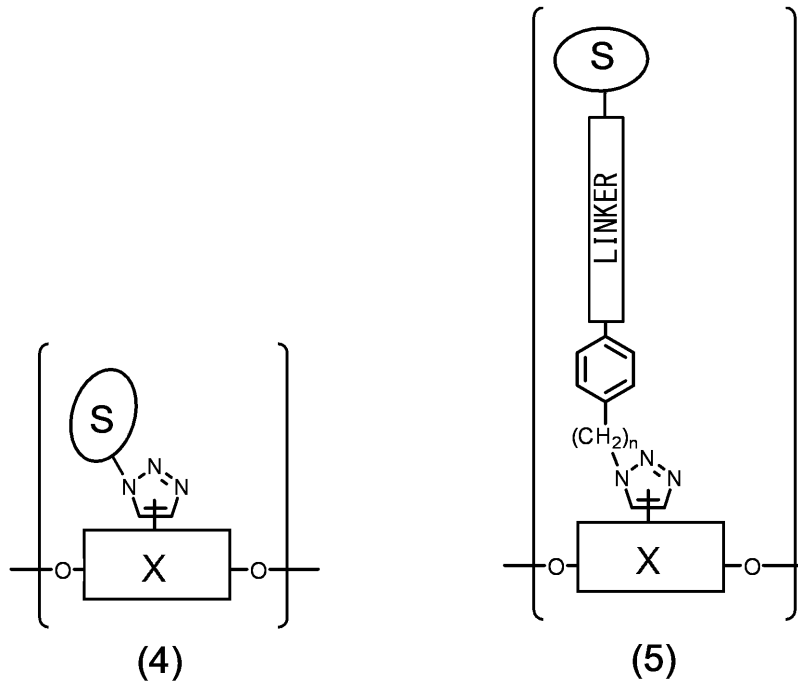
請求項 19 に記載の化合物から選択される1種又は2種以上を用いることを特徴とするオリゴヌクレオチドの修飾方法。

## 【請求項 22】

オリゴヌクレオチドに、少なくとも1個の以下の式(4)又は(5)で表されるユニットを付加、置換及び挿入のいずれか又はこれらを組み合わせて導入することを特徴とするオリゴヌクレオチドの修飾方法。

## 【化 8】

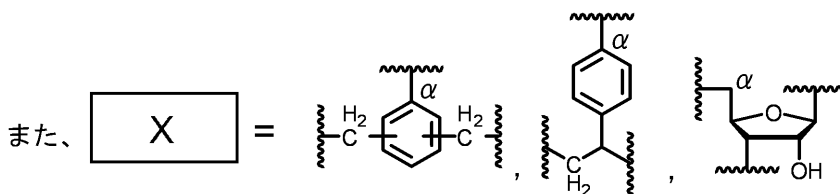
10



20

式中 S は糖置換基、ペプチド鎖 又は トコフェロール結合基 を示し、n は 0 ~ 4 の自然数を示し、  
LINKER は リンカーを示す。

30



ただし  $\alpha$  印を付けた炭素はトリアゾール環に結合している。また、式中 X に結合した水素の代わりにフッ素及び/又は又はアルキル基が結合していても良い。

40

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、オリゴヌクレオチド誘導体及びそれを用いたオリゴヌクレオチド構築物並びにそれらの製造方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

近年、DNA や RNA など各種のオリゴヌクレオチドが治療、診断等の用途に用いられるようになってきている。例えば、注目されている核酸技術として、RNA 干渉 (RNAi) を利用し

50

た、特定遺伝子のノックダウン法が挙げられる。RNAiとは、二本鎖RNA (dsRNA) の働きによって、それと配列の相同な遺伝子の働きが抑制される現象をいう。このRNAiを利用した核酸医薬は、次世代の治療薬として、大きな期待が寄せられている。

【0003】

一方、オリゴヌクレオチドを化学修飾して、天然型には無い、新たな機能を付与する研究も行われている。本発明者らも、オリゴヌクレオチドの末端にエチニル基を導入し、さらに、このエチニル基に対し、クリック反応を利用してベンゼン環等の新たな置換基を修飾する技術を開発している(特許文献1)。また、この技術で得られた人工のオリゴヌクレオチドが、天然型オリゴヌクレオチドと比べて高いヌクレアーゼ耐性を有しており、細胞内で分解され難いという結果を得ている。

10

【0004】

しかし核酸自体はマイナス電荷を帯びており、細胞膜を透過することができない。このため、核酸医薬においては、ヌクレオチドが細胞膜を通過できるようなdrug delivery system (DDS)が必要となる。現在、ヌクレオチドを細胞内に導入する方法として、リポソームを利用したリポフェクション法が開発されている。この方法は、負の電荷を持つDNAの周りに、正の電荷を持つ陽イオン性リポソームが結合した複合体を形成させて、エンドサイトーシス現象により細胞表面から細胞内にDNA等を取り込ませる方法である。

【0005】

しかし、上記リポフェクション法に用いられるリポフェクション試薬は、肝臓や腎臓に対する毒性があり、問題となっていた。また、リポフェクション法は、単なるエンドサイトーシスを利用したDDSであり、細胞に対する選択性に欠けていた。

20

【0006】

こうした問題を解決するため、オリゴヌクレオチドの3'末端にアシアロ糖-ペプチド鎖を導入し、アシアロ糖タンパク質受容体(ASGPR)を通して細胞内に導入するという、化学修飾オリゴヌクレオチドが開発されている(特許文献2、3)。しかし、この方法では、図4に示されているような、三本のアシアロ糖-ペプチド鎖を有する複雑な化学構造を有しており、合成するためには煩雑な操作が必要となる。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

30

【特許文献1】特開2010-195698号公報

【特許文献2】W02012-037254

【特許文献3】特表2013-541334号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明は、上記従来の実情に鑑みてなされたものであり、合成が容易であり、リポフェクション試薬を用いることなく細胞内に導入することができる、新たなオリゴヌクレオチド誘導体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】

40

【0009】

前述したように、本発明者らは、オリゴヌクレオチドにエチニル基を導入することに成功している(特許文献1)。そこで、さらにこのエチニル基にクリック反応で糖類やペプチド鎖や天然物化合物を結合させることを考えた。なぜならば、細胞膜表面には特定の糖類を認識するレセプターが多数存在することが知られており(例えば、肝細胞などの表面に存在するデスミン、ピメンチンはN-アセチルグルコサミンを選択的に認識することが知られている)、糖鎖を認識するレセプターを介したドラッグデリバリーが期待できるからである。また、同様のことがペプチド鎖や天然物化合物に対しても期待できる。そして、鋭意研究を行った結果、エチニル基で修飾されたオリゴヌクレオチドに対して、クリック反応で糖類やペプチド鎖や天然物化合物を結合させれば、高収率かつ合成が容易な糖修飾

50

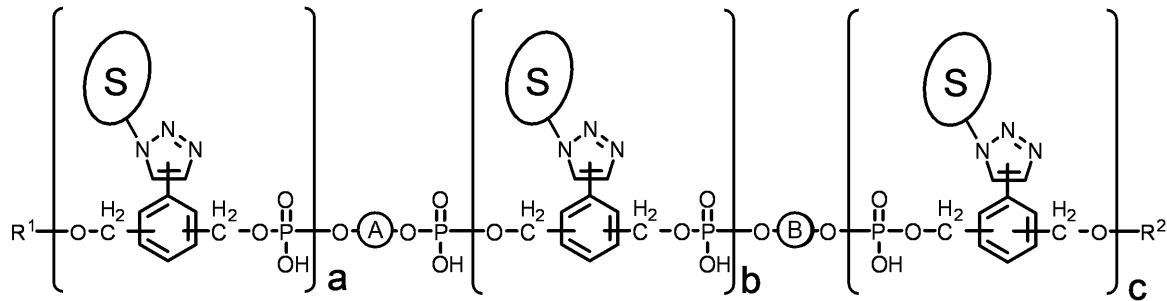


オリゴヌクレオチド誘導体とすることができることを見出した。さらには、このオリゴヌクレオチド誘導体によって修飾されたsiRNAが、リポフェクション試薬を用いることなく、細胞内に導入することができることを見出し、本発明を完成させるに至った。

【0010】

すなわち、本発明の第1の局面のオリゴヌクレオチド誘導体は、次式(1)で表される。ここで、式中Sで示される糖置換基には、単糖類糖置換基の他2糖類や多糖類の置換基も含まれる。また、糖置換基にはアミノ糖やアミノ基がアシル化されたアミノ糖誘導体も含まれる。

【化1】



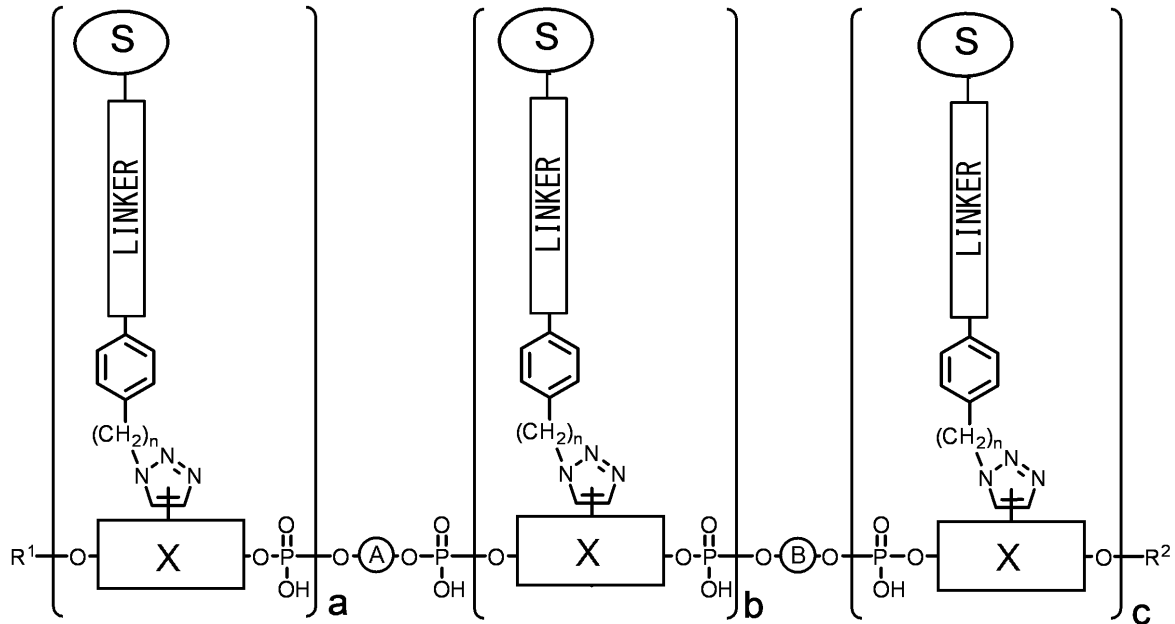
(1)

式中、 $R^1$ 及び $R^2$ は、それぞれ独立して水素又はリン酸基を表し、 $a$ 、 $b$ 及び $c$ は独立して0以上の整数であって少なくとも1つが1以上であり、 $A$ 及び $B$ は独立して改変されてもよいオリゴヌクレオチドであって $A$ と $B$ とを合わせた鎖長が3以上のオリゴヌクレオチドを表す。ただし、 $A$ 及び $B$ においてオリゴヌクレオチドの3'末端と5'末端の水酸基を含まない。また、式中Sは糖置換基、ペプチド鎖又はトコフェロール結合基を示す。また、式中のベンゼン環に結合した水素の替りにアルキル基が結合していてもよい。

【0011】

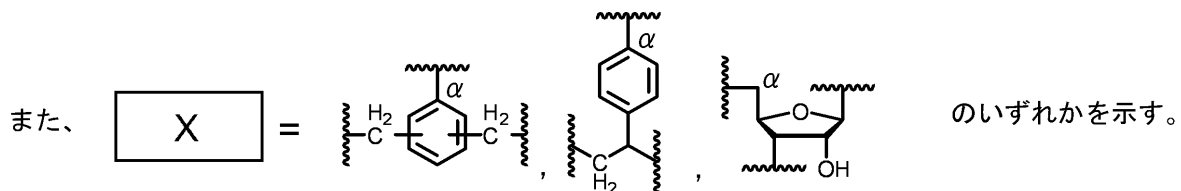
また、本発明の第2の局面のオリゴヌクレオチド誘導体は、次式(2)で表される。ここで、式中Sは糖置換基、ペプチド鎖又はトコフェロール結合基であり、糖置換基には、単糖類糖置換基の他2糖類や多糖類の置換基も含まれる。また、糖置換基にはアミノ糖やアミノ基がアシル化されたアミノ糖誘導体も含まれる。

## 【化2】



(2)

式中、 $R^1$ 及び $R^2$ は、それぞれ独立して水素又はリン酸基を表し、 $a$ 、 $b$ 及び $c$ は独立して0以上の整数であって少なくとも1つが1以上であり、 $A$ 及び $B$ は独立して改変されてもよいオリゴヌクレオチドであって $A$ と $B$ とを合わせた鎖長が3以上のオリゴヌクレオチドを表す。ただし、 $A$ 及び $B$ においてオリゴヌクレオチドの3'末端と5'末端の水酸基を含まない。また、式中のベンゼン環に結合した水素の替りにアルキル基が結合していてもよい。また、式中 $S$ は糖置換基、ペプチド鎖又はトコフェロール結合基を示し、 $n$ は0~4の自然数を示し、LINKERはリンカーを示す。

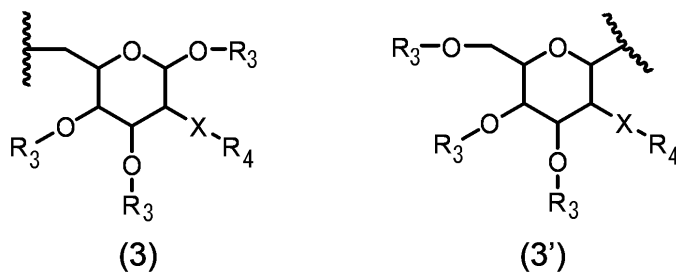


ただし $\alpha$ 印を付けた炭素はトリアゾール環に結合している。また、式中 $X$ に結合した水素の代わりにフッ素及び/又は又はアルキル基が結合していてもよい。

## 【0012】

本発明のオリゴヌクレオチド誘導体における $S$ が糖置換基である場合、糖置換基は下記化学構造式(3)又は(3')で示されるものであってもよい。

## 【化3】



$X = O$ , 又は  $NH$

$R_3$  と  $R_4$  はそれぞれ独立して  $R_3 = H, Ac$ , 又は  $COCF_3$ ;  $R_4 = H, Ac$ , 又は  $COCF_3$

## 【0013】

また、糖置換基 $S$ にアシル基がある場合、アシル基にフッ素原子で修飾されていてもよ

10

20

30

40

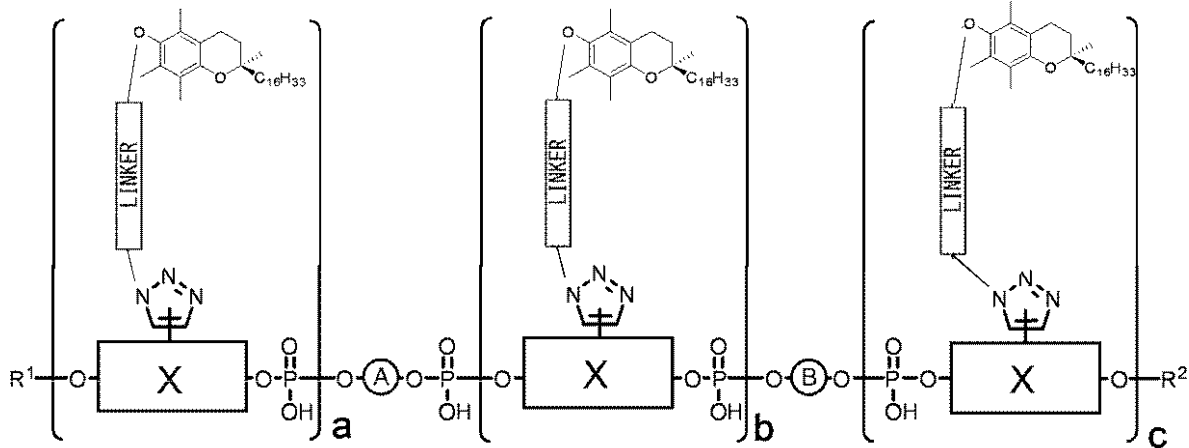
50

い（例えば、トリフルオロアセチル基等）。フッ素原子が糖置換基に導入されると、疎水性を上げることができる。このため、細胞膜表面の受容体が疎水性官能基を受け入れやすい場合には、透過性が増加すると考えられる。

【0014】

本発明の第3の局面のオリゴヌクレオチド誘導体は、次式で表される。

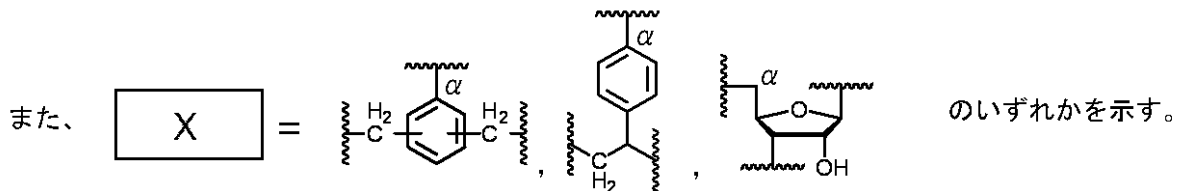
【化4】



10

式中、R<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>は、それぞれ独立して水素又はリン酸基を表し、a、b及びcは独立して0以上の整数であって少なくとも1つが1以上であり、A及びBは独立して改変されてもよいオリゴヌクレオチドであってAとBとを合わせた鎖長が3以上のオリゴヌクレオチドを表す。ただし、A及びBにおいてオリゴヌクレオチドの3'末端と5'末端の水酸基を含まない。また、式中のベンゼン環に結合した水素の替りにアルキル基が結合していてもよい。LINKERはリンカーを示す。

20



ただしα印を付けた炭素はトリアゾール環に結合している。また、式中Xに結合した水素の代わりにフッ素及び/又は又はアルキル基が結合していても良い。

30

【0015】

また、本発明のオリゴヌクレオチド誘導体におけるR<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>はHであってもよい。さらに、bは0であってもよい。また、a及びbはともに0であってもよい。さらに、cは1以上5以下であってもよい。

さらに、A及びBは、所定の遺伝子mRNAの部分配列又はその相補配列を有していてもよい。こうであれば、mRNAに対してRNA干渉を奏し得るため、標的となるmRNAによるタンパクの合成を阻害することができる。

また、A及びBを合わせた鎖長は、10以上35以下であることができる。通常、siRNAやmiRNAの長さはこの範囲内にあり、標的となるこれらのRNAによるタンパクの合成を阻害することができる。

40

さらに、A及びBはオリゴリボヌクレオチドとすることができる。

【0016】

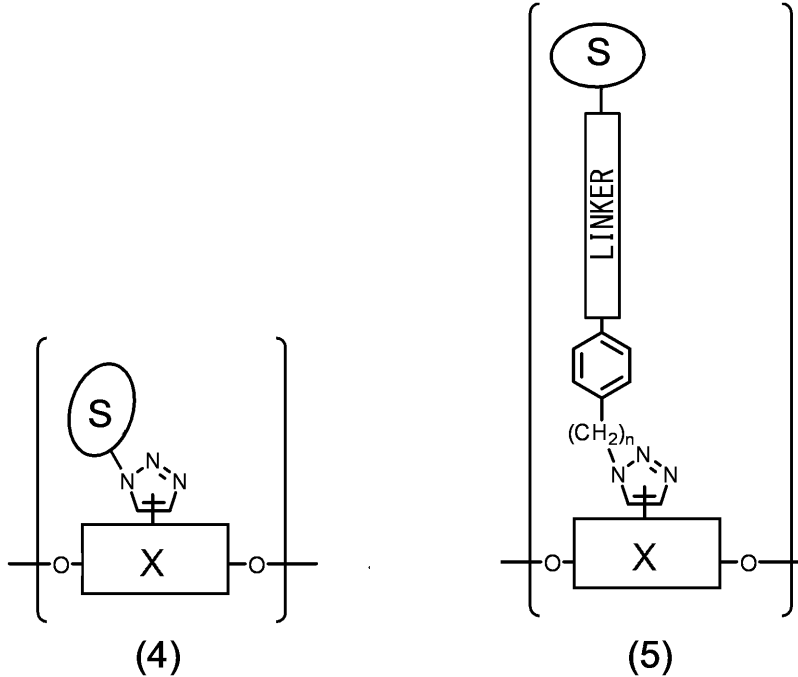
本発明のオリゴヌクレオチド誘導体は、遺伝子発現を調節するために利用することができる。すなわち、本発明のオリゴヌクレオチド構築物は、遺伝子発現調節用オリゴヌクレオチド構築物であって、本発明のオリゴヌクレオチド誘導体を有する。このような、遺伝子発現調節の具体的な用途として、1本鎖及び2本鎖DNA、1本鎖及び2本鎖RNA、DNA/RNAキメラ並びにDNA/RNAハイブリッドが挙げられる。さらには、アンチジーン、アンチセンス、アプタマー、siRNA、miRNA、shRNA及びリボザイムが挙げられる。

50

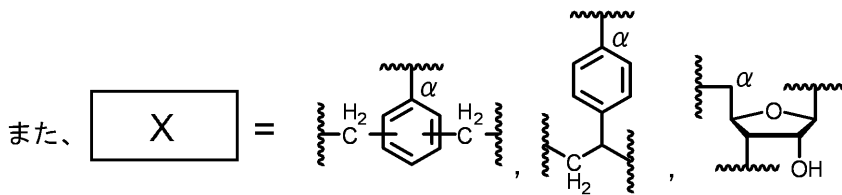
## 【0017】

また、本発明のオリゴヌクレオチド構築物は、ダンゲリングエンド部分に以下の式(4)又は(5)で表されるユニットを有するものであってもよい。

## 【化5】



式中Sは糖置換基、ペプチド鎖又はトコフェロール結合基を示し、nは0～4の自然数を示し、LINKERはリンカーを示す。



ただし $\alpha$ 印を付けた炭素はトリアゾール環に結合している。また、式中Xに結合した水素の代わりにフッ素及び/又は又はアルキル基が結合していても良い。

## 【0018】

本発明のオリゴヌクレオチド構築物は、siRNAであって、オリゴヌクレオチド誘導体において、a及びbは0であり、cは1又は2であり、3'末端ダンゲリングエンド部分に上記の式(4)又は(5)で表されるユニットを含むこととすることができる。

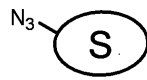
## 【0019】

本発明のオリゴヌクレオチド誘導体は、遺伝子診断用オリゴヌクレオチド構築物とすることができる。さらに、本構築物はプローブとすることができる。

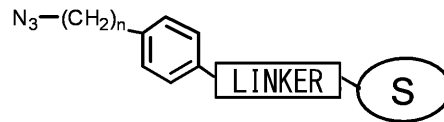
## 【0020】

本発明のオリゴヌクレオチド誘導体は、下記式(6)又は(7)で表される本発明の化合物とエチニル基を有するオリゴヌクレオチドを用い、いわゆるクリック反応を用いて合成することができる。

## 【化6】



(6)



(7)

式中Sは糖置換基、ペプチド鎖又はトコフェロール結合基を示し、nは0～4の自然数を示し、  
LINKERはリンカーを示す。

10

## 【0021】

この化合物は、siRNAのダングリグエンドの化学修飾用のユニットとして用いることができる。

## 【0022】

本発明の上記化合物から選択される1種又は2種以上を用いて、オリゴヌクレオチドを修飾することができる。また、オリゴヌクレオチドに、少なくとも1個の前述した式(4)又は式(5)で表されるユニットを付加、置換及び挿入のいずれか又はこれらを組み合わせて導入することもできる。

## 【図面の簡単な説明】

20

## 【0023】

【図1】部分構造(4)を3'末端に有するsiRNAの一例を示す図である。

【図2】Dual-Luciferase reporter assayによる遺伝子発現抑制能の評価結果を示すグラフである。

【図3】siRNAがリガンドに対して選択的に結合し、細胞内へ選択的にデリバリーされることを示す模式図である。

【図4】オリゴヌクレオチドの3'末端にアシアロ糖-ペプチド鎖を導入した、特許文献2に記載の化学修飾オリゴヌクレオチドの分子式である。

【図5】糖もしくはRGDペプチド修飾RNAと5'末端フルオレセイン修飾RNAからなる二本鎖及び未修飾フルオレセインラベルRNA二本鎖の、共焦点顕微鏡によるHeLa細胞内への修飾RNA二本鎖の取り込みの観察結果を示す写真である。

30

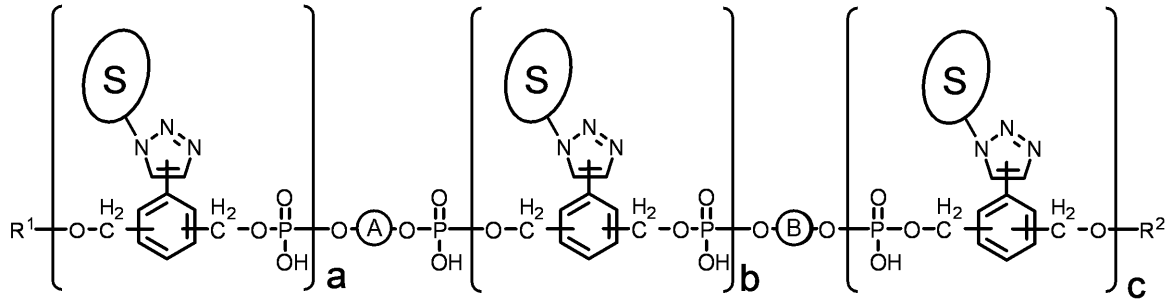
## 【発明を実施するための形態】

## 【0024】

(オリゴヌクレオチド誘導体)

本発明の第1の局面のオリゴヌクレオチド誘導体は、次式(1)で示され、本発明の第2の局面のオリゴヌクレオチド誘導体は、次式(2)で示される。

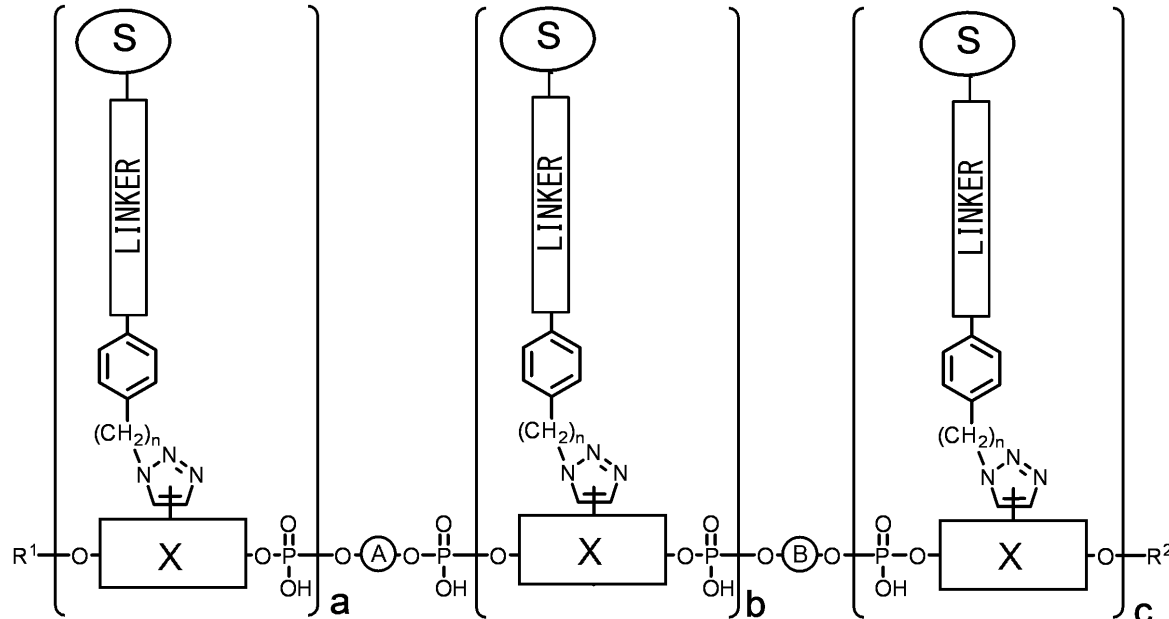
## 【化7】



(1)

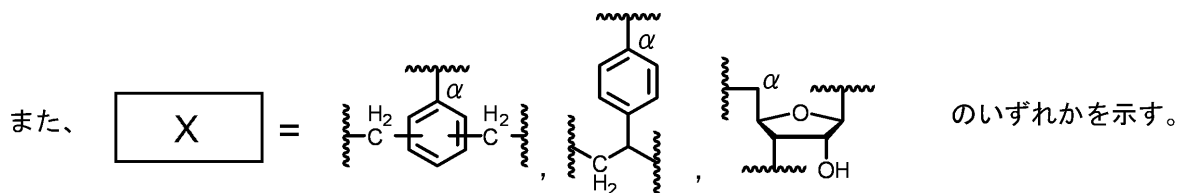
式中、 $R^1$ 及び $R^2$ は、それぞれ独立して水素又はリン酸基を表し、 $a$ 、 $b$ 及び $c$ は独立して0以上の整数であって少なくとも1つが1以上であり、 $A$ 及び $B$ は独立して改変されてもよいオリゴヌクレオチドであって $A$ と $B$ とを合わせた鎖長が3以上のオリゴヌクレオチドを表す。ただし、 $A$ 及び $B$ においてオリゴヌクレオチドの3'末端と5'末端の水酸基を含まない。また、式中 $S$ は糖置換基、ペプチド鎖又はトコフェロール結合基を示す。また、式中のベンゼン環に結合した水素の替りにアルキル基が結合していてもよい。

## 【化8】



(2)

式中、 $R^1$ 及び $R^2$ は、それぞれ独立して水素又はリン酸基を表し、 $a$ 、 $b$ 及び $c$ は独立して0以上の整数であって少なくとも1つが1以上であり、 $A$ 及び $B$ は独立して改変されてもよいオリゴヌクレオチドであって $A$ と $B$ とを合わせた鎖長が3以上のオリゴヌクレオチドを表す。ただし、 $A$ 及び $B$ においてオリゴヌクレオチドの3'末端と5'末端の水酸基を含まない。また、式中のベンゼン環に結合した水素の替りにアルキル基が結合していてもよい。また、式中 $S$ は糖置換基、ペプチド鎖又はトコフェロール結合基を示し、 $n$ は0~4の自然数を示し、LINKERはリンカーを示す。



ただし $\alpha$ 印を付けた炭素はトリアゾール環に結合している。また、式中 $X$ に結合した水素の代わりにフッ素及び/又は又はアルキル基が結合していてもよい。

10

20

30

40

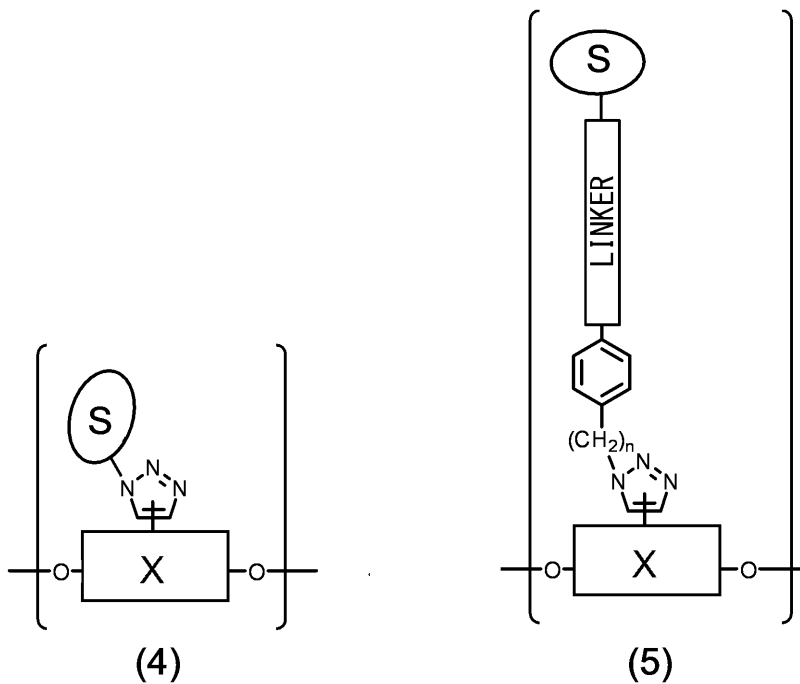
50

【0025】

本発明の第1の局面のオリゴヌクレオチド誘導体では、オリゴヌクレオチド誘導体の両末端又は途中の少なくとも1箇所に下記式(4)で示される部分構造を有している。また、本発明の第2の局面のオリゴヌクレオチド誘導体では、オリゴヌクレオチド誘導体の両末端又は途中の少なくとも1箇所に下記式(5)で示される部分構造を有している。これらの部分構造には、糖置換基を有する場合、ピメンチンやアシアロ糖タンパク質受容体(ASGPR)などの細胞膜表面のリガンドを通しての細胞内への導入が可能となる。また、Sがペプチド鎖やトコフェロール結合基の場合にも、同様の細胞膜透過性が期待できる。また、このような人工的な部分構造が存在しているため、耐ヌクレアーゼ性の向上が期待できる。このような部分構造は、配列既知又は配列未知のオリゴヌクレオチドに対して、付加、置換又は挿入のいずれか、あるいは、これらを組み合わせて導入することができる。なお、ここでいうオリゴヌクレオチドとは、改変されたオリゴヌクレオチドも含む概念である。

10

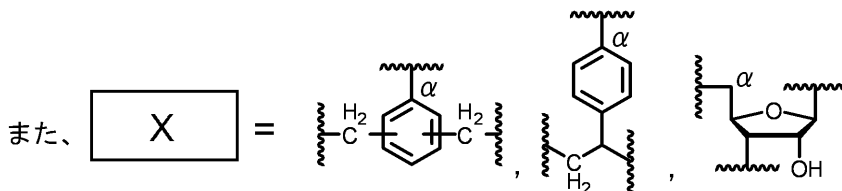
【化9】



20

30

式中Sは糖置換基、ペプチド鎖 又はトコフェロール結合基 を示し、nは0～4の自然数を示し、LINKER はリンカーを示す。



40

ただしα印を付けた炭素はトリアゾール環に結合している。また、式中Xに結合した水素の代わりにフッ素及び/又は又はアルキル基が結合していても良い。

【0026】

上記(4)及び(5)における糖置換基は特に限定はなく、グルコース、フルクトース、ガラクトース、マンノース、フコース、グルコサミン、フルクトサミン、ガラクトサミン、マンノサミン等の単糖類の他、スクロース、ラクトース、マルトース等の二量体以上

50

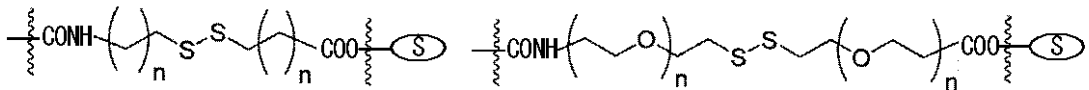
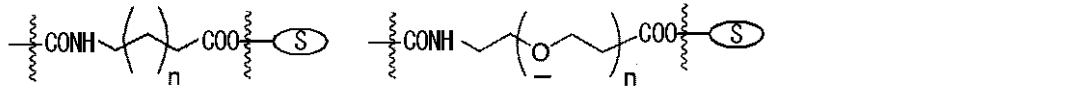
のオリゴ糖であってもよい。また、アミノ糖や、アミノ糖のアミノ基にアシル基が結合したものでよい。この場合においてアシル基にフッ素元素が結合していてもよい。

また、(5)におけるリンカーとしては、糖置換基やペプチド鎖やトコフェロールの水酸基に適応可能なリンカーであれば、特に限定はない。例えば、以下のようなものが挙げられる(式中nは自然数を示す)。リンカーは糖置換基やペプチド鎖の移動の自由度を増加させるため、リンカーを導入することにより、細胞膜のリガンド(受容体)に結合しやすくなると考えられる。

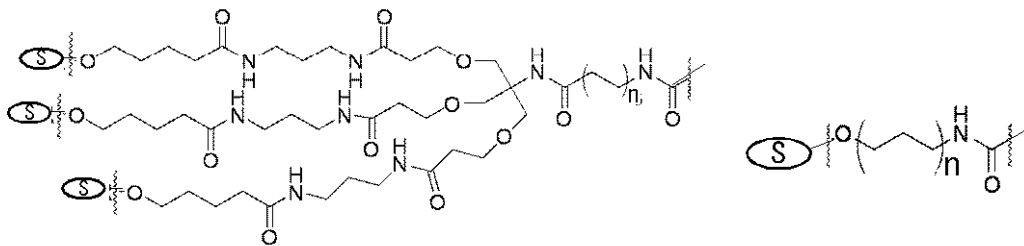
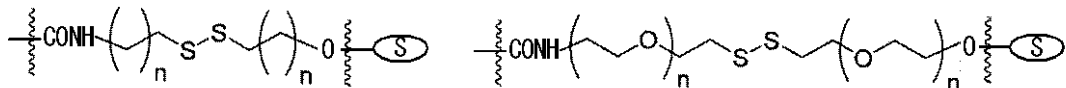
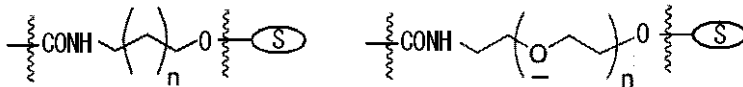
【化10】

Sが糖置換基の場合のリンカーの例

10

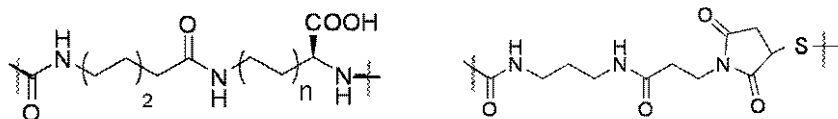


20



30

Sがペプチド鎖の場合のリンカーの例



40

(シスチンの硫黄元素に結合するリンカー)

【0027】

上記式(4)及び(5)で示される部分構造において、ベンゼン環に結合している2つの「-CH<sub>2</sub>O-」基及びトリアゾール環は、ベンゼン環のいずれの位置に結合していてもよい。また、ベンゼン環に直接結合する水素に替えて、アルキル基が結合していてもよい。例えば、炭素数1~4のアルキル基が挙げられる。すなわち、メチル基、エチル基、n-プロピル基、n-ブチル基、イソブチル基及びtert-ブチル基が挙げられる。

50



## 【0028】

またこの部分構造(4)又は(5)がオリゴヌクレオチドの5'末端に配置されれば、5'末端に作用するエキソヌクレアーゼ抵抗性を付与するのに有効である。一方、この部分構造(4)又は(5)がオリゴヌクレオチドの3'末端に配置されれば、3'末端に作用するエキソヌクレアーゼに有効であり、RNAiによるサイレンシング効果の向上に有効である。したがって、例えば3'末端作用性ヌクレアーゼ抵抗性を向上させたい場合には、a及びbは0であってもよい。逆に、5'末端作用性ヌクレアーゼ抵抗性を高める場合には、b及びcは0であってもよい。また、ヌクレアーゼ抵抗性を得る場合には、a、b及びcはいずれも少なくとも1つ有していればよいが、それぞれあるいは組み合わせて2個以上有することもできる。

10

## 【0029】

また、この部分構造(4)又は(5)がオリゴヌクレオチドの両端以外の部分に配置されれば、オリゴヌクレオチドの非3'末端非5'末端においてエンドヌクレアーゼ抵抗性を付与するのに有効である。

## 【0030】

また、本発明のオリゴヌクレオチド誘導体における部分構造(4)及び(5)の数や部位は、ヌクレアーゼ抵抗性と、部分構造(4)又は(5)を導入することによるオリゴヌクレオチド誘導体への影響を考慮して決定される。例えば、本発明のオリゴヌクレオチド誘導体を利用してsiRNA又はshRNAを構築する場合、a及びbは0とし、これらの構築物の3'末端のダングリグエンド部位に対応するヌクレオチド(例えば、dT(デオキシチミン))の3'末端に1個~3個(c=1~3)、好ましくは1個又は2個(c=1、2)の部分構造(U)を付加してもよいし、siRNAの例えば2つのdTのうち1個又は2個を部分構造(4)あるいは(5)で置換してもよい(c=1、2)。さらには、3'末端ダングリグエンドに部分構造(4)又は(5)を挿入してもよい。既存ヌクレオチドを部分構造(4)又は(5)で置換する形態は、siRNAの鎖長を延長することがないというメリットがある。

20

## 【0031】

また、本発明のオリゴヌクレオチド誘導体を利用してアンチジーン、アンチセンス、アプタマー、miRNA及びリボザイムを構築するときには必要に応じて適宜、部分構造(4)又は(5)を備えるようにすればよい。例えば、アンチセンスRNAには、3'末端側及び5'末端側に部分構造(4)又は(5)を形成することができる。また、アプタマーやリボザイムにあっては、非5'末端非3'末端における部分構造(4)又は(5)が有効な場合もありえる。また、プローブにおいては、3'末端側及び/又は5'末端側に部分構造(4)又は(5)を備えることもできる。

30

## 【0032】

本発明のオリゴヌクレオチド誘導体においては、A及びBは、それぞれ独立し、同一であっても異なってもよいが、改変されていてもよいオリゴヌクレオチドを表す。ここで、本明細書においてオリゴヌクレオチドとは、一般にオリゴヌクレオチドやポリヌクレオチドを構成するモノマーであるヌクレオチドをモノマー単位として該モノマー単位を複数有するポリマーを意味するものとする。また、オリゴヌクレオチドとは、モノマー単位として、デオキシリボヌクレオチド及び/又はリボヌクレオチドを意味するものである。一般に、ヌクレオチドとしてデオキシリボヌクレオチドをモノマー単位とするポリマーをDNAと称し、リボヌクレオチドをモノマー単位とするポリマーをRNAと称するが、本発明のオリゴヌクレオチド誘導体は、一般に挿されるDNA及びRNAのほか、これらのモノマー単位のオリゴマーを含むものとする。また、オリゴヌクレオチドは、RNA/DNAキメラも包含している。また、改変されていてもよいオリゴヌクレオチドとは、プリン及びピリミジンであるグアニン、シトシン、チミン、アデニン、ウラシルまたはメチルシトシンなどの天然塩基を含むヌクレオチドのみからなるオリゴヌクレオチドのほか、オリゴヌクレオチドの各種部分、すなわち、塩基、糖部分及びリン酸エステル部分において何らかの化学修飾が施された1又は2以上のヌクレオチドを有するオリゴヌクレオチドを包含している。

40

50

## 【0033】

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

10

## 【0034】

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

## 【0035】

(オリゴヌクレオチド構築物)

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

20

## 【0036】

こうした各種形態を採るオリゴヌクレオチド構築物は、ヌクレアーゼのターゲットとなる可能性のある部位に部分構造(4)又は(5)を備えることが好ましい。これらの部分構造は、ターミナルミスマッチやダングリングエンドに備えることができる。エキソヌクレオチド抵抗性を考慮すると、ダングリングエンドに部分構造(4)又は(5)を備えることが好ましい。また、部分構造(4)又は(5)は、バルジ、ミスマッチインターナルループ、ヘアピンループなどに備えることができる。

30

## 【0037】

本発明のオリゴヌクレオチド構築物は、ヌクレアーゼ抵抗性が向上されているため、遺伝子発現調節用、又は研究用、診断用の各種用途に用いることができる。遺伝子発現調節用途としては、アンチジーン、アンチセンス、アプタマー、siRNA、miRNA、shRNA及びリボザイム等が挙げられる。特に、siRNA及びshRNAにおいて3'末端オーバーハング部位のdTに対し部分構造(4)又は(5)を置換的又は付加的に導入することでヌクレアーゼ耐性とサイレンシング活性の双方を向上させることができる。

40

## 【0038】

図1に、部分構造(4)を3'末端に有するsiRNAの一例を示す。また、診断用途又は研究用途としては、プローブが挙げられる。プローブは、設計または選択により、ターゲット核酸に特異的に規定された配列を有しており、所定のストリンジェンシーの下で、それらがハイブリダイズするようにするに取得されたオリゴヌクレオチドである。プローブに本オリゴヌクレオチド誘導体を用いることでヌクレアーゼ耐性が向上されるため、ターゲット核酸を含有するサンプル中に混在するヌクレアーゼの影響を抑制又は回避して、ヌクレアーゼの除去程度が低くてもあるいはヌクレアーゼ除去処理を省略したサンプル調製が可能になる。これにより簡易に遺伝子診断や検査をすることができるようになる。

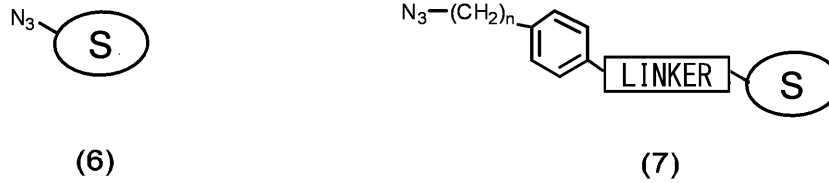
50

## 【0039】

(オリゴヌクレオチド誘導体の製造方法)

式(6)又は(7)で表される化合物は、本発明のオリゴヌクレオチド誘導体を製造のための使用に好ましい化合物である。

## 【化11】



10

式中Sは糖置換基、ペプチド鎖又はトコフェロール結合基を示し、nは0～4の自然数を示し、  
LINKERはリンカーを示す。

## 【0040】

(オリゴヌクレオチド誘導体の製造方法)

エチニル基を有するオリゴヌクレオチドは従来公知の核酸合成法によって得ることができる。その後、適宜本発明の化合物(6)又は(7)とクリック反応を行うことにより、本発明のオリゴヌクレオチド誘導体を製造することができる。

20

## 【0041】

例えば、5'末端に部分構造(4)又は(5)を有するオリゴヌクレオチド誘導体を得るには、従来の核酸合成法により取得した5'末端にエチニル基を有するオリゴヌクレオチドと上記化合物(6)又は(7)をクリック反応することにより、部分構造(4)又は(5)を導入することができる。さらに、5'末端に連続してエチニル基を有するオリゴヌクレオチドとクリック反応を行うことにより、複数個の部分構造(4)又は(5)を連続して導入することもできる。こうして5'末端側に1又は2個以上の部分構造(4)又は(5)を有するオリゴヌクレオチド誘導体を得ることができる。

## 【0042】

また、3'末端側に部分構造(4)又は(5)のユニットを有するオリゴヌクレオチド誘導体を得るには、従来の核酸合成法により取得した5'末端にエチニル基を有するオリゴヌクレオチドと上記化合物(6)又は(7)をクリック反応させればよい。また、非3'末端非5'末端に部分構造(4)又は(5)を有するオリゴヌクレオチド誘導体を得るには、非3'末端非5'末端にエチニル基を有するオリゴヌクレオチドと本発明の化合物(6)又は(7)をクリック反応させればよい。

30

## 【0043】

(オリゴヌクレオチドの修飾方法)

オリゴヌクレオチドの修飾方法は、配列既知又は配列未知のオリゴヌクレオチドに少なくとも1個の部分構造(4)又は(5)を付加、置換及び挿入のいずれかあるいはこれらを組み合わせて導入することができる。こうした修飾により、ヌクレアーゼ耐性の他、サイレンシング効果の高いRNA構築物を得ることができる。部分構造(4)又は(5)の導入は、オリゴヌクレオチド誘導体の製造方法に準じて実施すればよい。

40

## 【0044】

(オリゴヌクレオチド誘導体の利用)

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

50

## 【0045】

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

## 【0046】

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

10

## 【0047】

## &lt; 実施例 &gt;

以下、本発明を具体化した実施例について具体的に詳述する。

## 【0048】

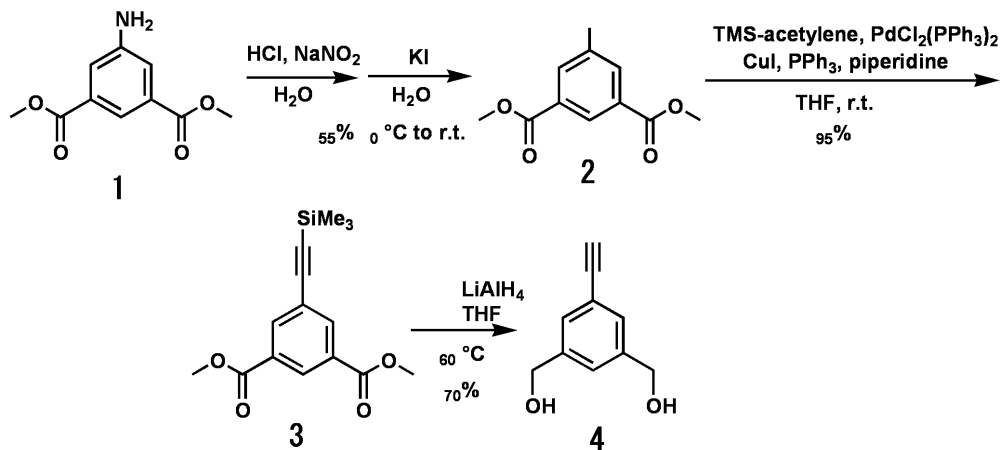
## (アミダイト化GPC樹脂の調製)

以下のスキームI及びスキームIIに示す合成経路により、アミダイト化されたヌクレオチド誘導体である化合物6及びCPG樹脂である化合物8を合成した。すなわち、5-アミノイソフタル酸ジメチル1のアミノ基をヨウ素化して、化合物2を収率55%で得、続いてヨウ素基をトリメチルシリルアセチレンへと変換して、化合物3を収率95%で得た。さらに、還元及び脱トリメチルシリル化をおこなって化合物4を収率70%で得た。

20

## 【0049】

## 【化12】



30

## スキーム I

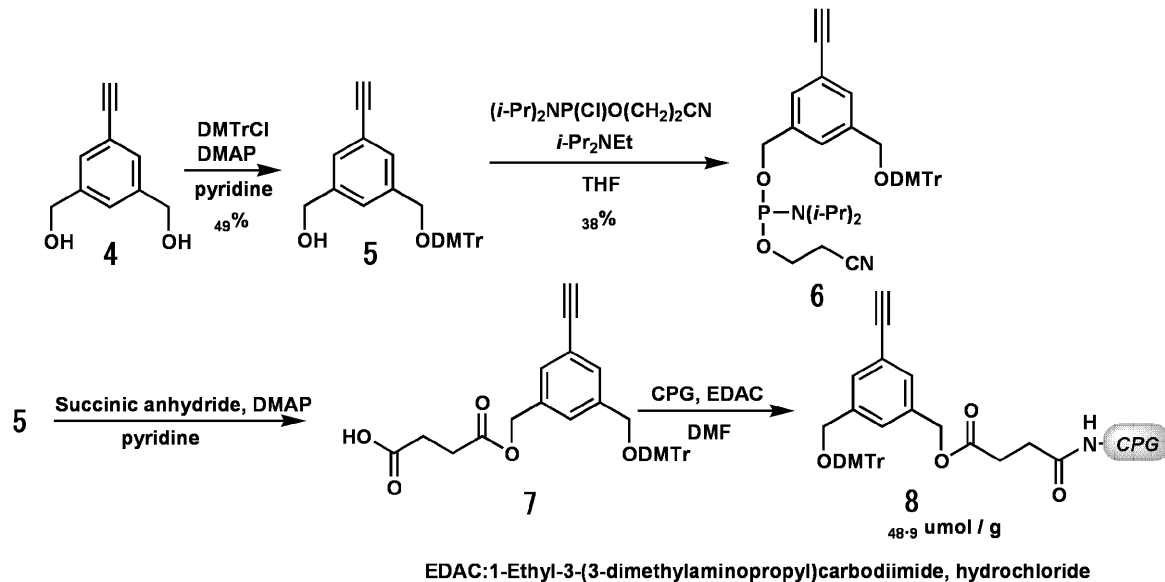
40

## 【0050】

こうして得られた化合物4を、スキームIIに示すように、4,4'-ジメトキシトリチルクロリド (DMTrCl) で修飾して化合物5を収率49%で得、さらに化合物5をアミダイト化して化合物6を収率38%で得た。また、化合物5をスクシニル化した後、CPG樹脂に修飾して化合物8を48.9 μmol/gの活性で得た。

## 【0051】

## 【化 1 3】



10

## スキーム II

20

## 【 0 0 5 2】

以下、スキームI及びスキームIIにおける各工程について、詳細に説明する。

## Dimethyl 5-iodoisophthalate (2)の合成

Ar 雰囲気下、Dimethyl 5-aminoisophthalate (1) (6.27 g, 30.0 mmol)を氷で冷却したhydrochloric acid (2M)39mLに加えた。0 以下で数分攪拌した後、氷で冷却した 21.6 mL のNaNO<sub>2</sub> (2.52 g, 36.5 mmol, 1.2 eq.) 水溶液を滴下した。さらに 30 mL の dichloromethane を加え室温に達した後5時間攪拌した。氷冷下 KI (7.47 g, 45.0 mmol, 1.5 eq.) の水溶液70 mLを滴下させ室温で 12 時間攪拌した。攪拌終了後、水層を EtOAc にて抽出し、飽和食塩水にて洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させた後、シリカゲルクロマトグラフィー (SiO<sub>2</sub>, hexane) にて化合物 2 (5.285 g 16.5 mmol 55%) を単離した。

30

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) ; 8.62 (t, 1H, J = 1.4 Hz), 8.53 (s, 2H, J = 1.4 Hz), 3.94 (s, 6H). <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) d 165.2(2C), 142.9 (2C), 132.6 (2C), 130.2, 93.8, 53.1 (2C), MS (EI) m/z 320 (M<sup>+</sup>), HRMS Calcd for C<sub>10</sub>H<sub>9</sub>IO<sub>4</sub>: 319.9546. Found : 319.9553. Anal. Calcd for C<sub>10</sub>H<sub>9</sub>IO<sub>4</sub>: C, 37.52; H, 2.83. Found: C, 37.44; H, 2.86.

## 【 0 0 5 3】

## Dimethyl 5-trimethylsilylisophthalate (3)の合成

アルゴン雰囲気下において、化合物2(96.0mg、0.3mmol), bis(triphenylphosphine)palladium dichloride (16.8 mg, 4 mol %), cuprous iodide(4.6 mg, 8 mol %)及びtriphenyl phosphine (11.8 mg, 15 mol %), を三回凍結脱気した。また、trimethylsilyl acetylene (83.9 μL, 2.0 eq), piperidine (0.5 mL 16.8 eq) を THF (5 mL) に溶解し、三回凍結脱気したあと、凍結脱気した化合物2(96.0mg、0.3mmol), bis(triphenylphosphine)palladium dichloride (16.8 mg, 4 mol %), cuprous iodide(4.6 mg, 8 mol %)及びtriphenyl phosphineと混合し、室温で12時間攪拌した。その後、溶媒を減圧留去した後、クロロホルムで抽出し、飽和塩化アンモニウム溶液にて洗浄、硫酸ナトリウムで乾燥後シリカゲルクロマトグラフィー (SiO<sub>2</sub>, hexane / EtOAc = 100:1 ) にて化合物3 (82.7 mg, 95%) を単離した。

40

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) ; 8.60 (t, 1H, J = 1.7 Hz), 8.29 (d, 2H, J = 1.7 Hz), 3.95 (s, 6H). 0.26 (s, 9H) <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) d 165.8(2C), 137.1 (2C), 131.0 (2C), 130.5, 124.4, 102.9, 96.9, 52.7 (2C), 0.0 (2C), MS (EI) m/z 290 (M<sup>+</sup>), HRMS

50

Calcd for  $C_{15}H_{18}O_4Si$ : 290.0974 Found: 290.0979. Anal. Calcd for  $C_{15}H_{18}O_4Si$ : C, 62.04; H, 6.25. Found: C, 62.86; H, 6.23.

【 0 0 5 4 】

5-Ethynyl-1,3-benzendimethanol (4) の合成

Ar雰囲気下 3 (6.64 g, 22.9 mmol) を THF (100 mL) に溶解し lithium aluminium hydride (2.60 g, 68.5 mmol 3.0 eq) を室温にて加え、60 に昇温し12時間攪拌した。NaHCO<sub>3</sub>溶液にて反応を停止させ EtOAc にて抽出し飽和食塩水にて洗浄後、硫酸ナトリウムにて乾燥後、シリカゲルクロマトグラフィー (中性SiO<sub>2</sub>, hexane / EtOAc = 2:1) にて化合物4 (2.26 g, 69%, 13.9 mmol) を単離した。

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) ; 7.43 (s, 2H), 7.38 (s, 1H), 4.70 (d, 4H, J = 6.0 Hz), 3.08 (s, 1H), 1.68 (t, 2H, J = 6.0 Hz) <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) d 160.1(2C), 129.6 (2C), 125.7 (2C), 122.5, 83.3, 77.2, 64.6(2C), MS (EI) m/z 162 (M<sup>+</sup>), HRMS Calcd for C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>: 162.0681 Found: 162.0685. Anal. Calcd for C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>: C, 74.06; H, 6.21;. Found: C, 73.83; H, 6.19.

10

【 0 0 5 5 】

1-(4,4'-Dimethoxytrityloxymethyl)-5-ethynyl-3-benzenemethanol (5) の合成

Ar雰囲気下 4 (649.0 mg, 2.45 mmol) と DMTrCl (1.6 g, 4.72 mmol 1.92 mmol) を pyridine (20 mL) 中で室温12 時間攪拌した。NaHCO<sub>3</sub>溶液を加え反応を停止させた。EtOAc にて抽出し飽和食塩水にて洗浄後、硫酸ナトリウムにて乾燥後、シリカゲルクロマトグラフィー (中性SiO<sub>2</sub>, hexane / EtOAc = 2:1) にて化合物5 (941.4 mg, 50%, 1.25 mmol) を単離した。

20

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) ; 7.54-7.22 (m, 12H), 6.84 (d, 4H, J = 9.0 Hz), 4.65 (s, 2H), 4.18 (s, 2H), 3.79 (s, 6H) 3.09 (s, 1H), 1.82 (s, 1H) <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) d 160.1(2C), 146.5, 143.3, 141.1, 137.3 (2C), 131.2 (4C), 130.3, 130.1, 129.2 (2C), 128.8 (2C), 127.8, 127.0, 123.7, 114.1 (4C), 87.9, 84.5, 78.5, 66.3, 64.6, 55.7 (2C), MS (FAB<sup>+</sup>) m/z 646 (M<sup>+</sup>), HRMS Calcd for C<sub>31</sub>H<sub>28</sub>O<sub>4</sub>: 464.5516 Found: no date. Anal. Calcd for C<sub>31</sub>H<sub>28</sub>O<sub>4</sub>: C, 80.15; H, 6.08. Found: C, 79.16; H, 6.35.

【 0 0 5 6 】

1-[[ (2-Cyanoethoxy)(N,N-diisopropylamino)phosphinyloxymethyl]-3-(4,4'-dimethoxytrityloxymethyl)-5-ethynylbenzene (6) の合成

30

Ar雰囲気下のグローブバッグ中にて 5 (646 mg, 1.0 mmol) を THF (5.0 mL) 煮溶解し N,N-diisopropylethylamine (0.86 mL, 5.0 mmol, 5.0 eq.) を加え、さらに chloro(2-cyanoethoxy)(N,N-diisopropylamino)phosphine (0.44 mL, 2.0 mmol, 2.0 eq.) を滴下させた。室温にて1時間攪拌後、NaHCO<sub>3</sub> 溶液にて反応を停止させクロロホルムで抽出しNaHCO<sub>3</sub> 溶液にて洗浄、硫酸ナトリウムにて乾燥後シリカゲルクロマトグラフィー (中性 SiO<sub>2</sub>, hexane / EtOAc = 1:1) にて化合物6 (252.7 mg, 37%) を与えた。

<sup>31</sup>P NMR (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 149.3.

【 0 0 5 7 】

5-Ethynyl-1,3-benzendimethanol誘導体のCPG樹脂樹脂 (8) の製造例

40

化合物5 (674.9 mg, 1.45 mmol) と、無水コハク酸 (580.8 mg, 5.80 mmol) と、DMAP (1.91 mg, 0.017 mmol) とを pyridine (3.9 mL) に溶解し、Ar 雰囲気下 72 時間室温で攪拌、CHCl<sub>3</sub> と H<sub>2</sub>O を加え 有機層を H<sub>2</sub>O 飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧留去し真空乾燥した。こうして得られた化合物7 と、Aminopropyl controlled pore glass (837.5 mg, 77 μmol) と、1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (720 mg, 3.76 mmol) とを DMF (15 mL), 中に加え 72 時間室温で攪拌した。pyridine で CPG樹脂を洗浄後、capping solution (8 mL, 0.1 M DMAP in pyridine:Ac<sub>2</sub>O) 9:1, v/v) を加え 16 時間室温攪拌後に pyridine, EtOH, MeCN, にて CPG樹脂を洗浄後真空乾燥させ、化学修飾された CPG樹脂である化合物8 を 48.9 μmol/g の活性で得た。活性は、この CPG樹脂 6 mg をガラスフィルターにのせて、HClO<sub>4</sub>:EtOH (3:2, v/v) の溶液

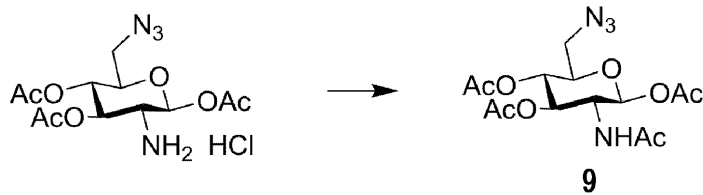
50

を流し込み、そのろ液の UV 498 nm の波長を (DMTr基の波長) の吸光度を求め計算した。

【 0 0 5 8 】

1,3,4-tri-O-acetyl-2-acetamido-6-azido- -D-glucopyranose (9) の合成

【 化 1 4 】



10

【 0 0 5 9 】

本発明のオリゴヌクレオチド誘導体における、アミノ基がアシル化されたアミノ糖部分を構築するための化合物として、上記式で示される化合物9を合成した。以下に、その詳細を述べる。

2-amino-1,3,4-O-acetyl-6-azido- -D-glucopyranose hydrochloride (134 mg, 0.4 mmol) をジクロロメタン (脱水) (4 mL) に溶かし氷浴中でトリエチルアミン (224  $\mu$ L, 1.6 mmol), 無水酢酸 (454  $\mu$ L) を加え氷浴を外し攪拌した。なお、原料のアジド化合物は、J. Morel, Helv. Chim. Acta, 1958, 41, 1501-1504; S. Ogawa, H. Fujimori, T. Suami, Bull. Soc. Chim. Jpn., 1976, 49, 2585-2586.の方法によって調製した。18時間後TLCにて原料の消失を確認した。メタノールを加えクエンチし溶媒を減圧留去した後、酢酸エチルに溶かし1 N塩酸, 飽和炭酸水素ナトリウム水溶液, 飽和食塩水で洗い、無水硫酸ナトリウムを加え乾燥させた。その後ろ過し減圧蒸留し、白色結晶 (134 mg, 0.4 mmol, 97%) として化合物9を得た。

20

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 5.68 (d, 1H,  $J = 8.4$  Hz), 5.56 (d, 1H,  $J = 8.4$  Hz), 5.43 (t, 1H,  $J = 9.8$  Hz), 5.04 (t, 1H,  $J = 9.8$  Hz), 4.26 (q, 1H,  $J = 9.6$  Hz), 3.75 (m, 1H), 3.39-3.34 (m, 2H), 2.10 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 1.91 (s, 3H).

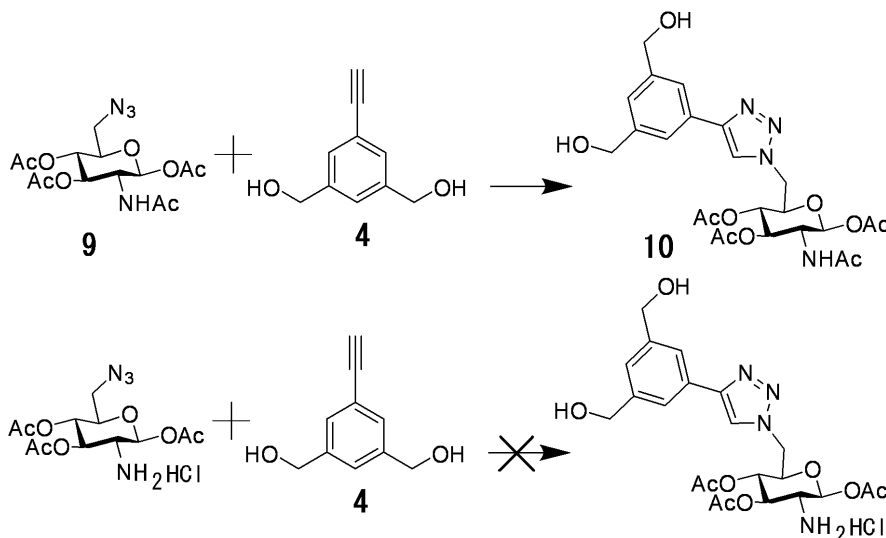
【 0 0 6 0 】

<Huisgen反応(クリック反応)>

本発明のオリゴヌクレオチド誘導体を合成する前に、モデル反応として、上述の化合物9と化合物4とのHuisgen反応(クリック反応)を行った。その結果、1,2,3-triazole環を有する化合物10が得られることを確認した。一方、化合物9の原料となったアシル化されていないアミノ糖誘導体塩酸塩についても同様の反応を行ったが、Huisgen反応(クリック反応)は起こらなかった。

30

【 化 1 5 】



40

50

## 【 0 0 6 1 】

1-[1,3,4-tri-O-acetyl-2-N-acetyl-β-D-glucopyranose]-4-[3,5-bis(hydroxymethyl)phenyl]-1H-1,2,3-triazole (10) の合成

エッペンドルフチューブに5-エチル-1,3-ベンゼンジメタノール(4) (100 mM solution in DMSO, 2 μL, 0.2 μmol), 1 (100 mM solution in DMSO, 2 μL, 0.2 μmol), 硫酸銅5水和物 (1 M solution in Milli-Q水, 2 μL, 2 μmol), アスコルビン酸ナトリウム (1 M solution in Milli-Q水, 2 μL, 2 μmol), アセトニトリル (4 μL), 1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) (4 μL), Milli-Q水 (24 μL) を加え、1秒ほどボルテックスミキサーにより攪拌し、そのまま室温で15分静置した。凍結乾燥しMALDI-TOF/Msにて10の構造を確認した。

10

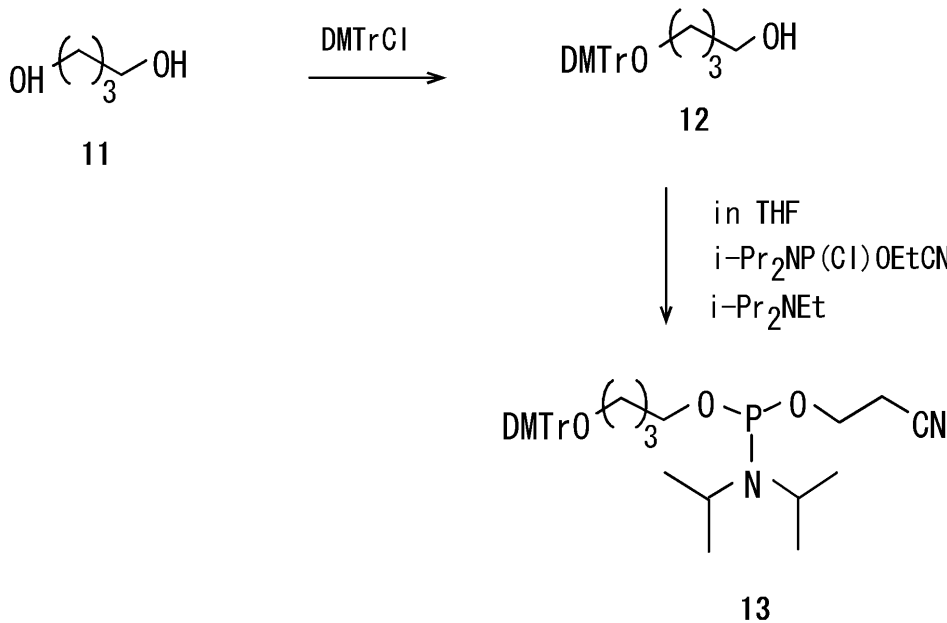
MALDI-TOF/Ms ( $[M+H]^+$ ) ; Calculated For  $C_{24}H_{30}N_4NaO_{10}$  : 557.2, Found : 557.0.

## 【 0 0 6 2 】

< アミダイト体の調製 >

以下の合成経路に従い、化合物11からトリチル体12を経由してアミダイト体13を調製した。

## 【 化 1 6 】



20

30

## 【 0 0 6 3 】

(トリチル体12の合成)

上記合成経路に示す化合物11を出発原料とし、DMTrClにて片方の水酸基のトリチル保護を行い、トリチル体12を得た。以下に、その詳細を説明する。

## 【 0 0 6 4 】

良く乾燥したDMTrCl 1.00gにdry pyridine 30mLを加えて溶かし、そこに各々3当量分のブタンジオール(化合物11、0.79mL)を加え、室温で3時間攪拌した。その後、酢酸エチルと蒸留水で分液し、有機層を飽和NaHCO<sub>3</sub> aq.、飽和NaCl aq.で洗浄し、無水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を加え乾燥した。溶媒を減圧留去後、中性シリカゲルクロマトグラフィー (Hex:EtOAc=3:1) にて単離精製し、目的化合物12 (0.90g、77%) を得た。

40

<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) [ppm] ;

7.44~7.20 ( 9H, m ), 6.82 ( 4H, d, J = 7.6 Hz ), 3.79 ( 6H, s ), 3.64 ( 2H, s ), 3.11 ( 2H, s ), 1.68 ( 4H, s )

## 【 0 0 6 5 】

(化合物13の合成)

トリチル体12の水酸基を亜リン酸化しアミダイト体13を得た。操作はグローブバック中

50



、完全無水条件下で操作を行った。

一晚真空乾燥した化合物12 (0.172g) をdry THFに溶解させ、各々DIPEA (3当量分) と亜リン酸化試薬 (1.5当量分) を加えた。その後、グローブバックから取り出し、室温で0.5~1時間攪拌した。TLC (Hex:EtOAc=2:1) により原料の消失を確認した。その後CHCl<sub>3</sub>と飽和NaHCO<sub>3</sub> aqで抽出し、有機層を飽和NaCl aqで洗浄し、無水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を加え乾燥した。溶媒を減圧留去後、中性シリカゲルクロマトグラフィー (Hex:EtOAc=3:1) にて単離精製し、アミダイト体13 (1.09g、88%) を得た。

<sup>31</sup>P NMR (160MHz、CDCl<sub>3</sub>) [ppm] : 147.92

【 0 0 6 6 】

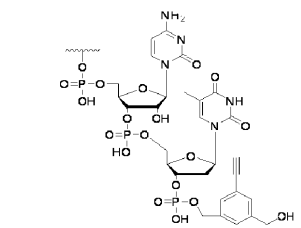
< siRNAの合成 >

以下の手順により、表1に示した各種のsiRNAを合成した。(この配列はRenilla Luciferaseをターゲットにするものである)。表中ASは共通するアンチセンス鎖であり、S1,S2,S3、及びS3-GlcNAcはセンス鎖である。また、表中のシーケンスにおいてアルファベット大文字はDNAであり、アルファベット小文字はRNAである。シーケンス中の3'末端部分の構造を以下に示す。

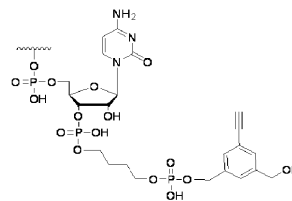
【表1】

オリゴヌクレオチド	シーケンス (5'-3')	[M-H] <sup>-</sup>	
		Calculated	Found
AS	guaggaguagugaaaggccTT	6809.0	6808.5
S1	ggccuuucacuacuccuacTB <sup>E</sup>	6748.9	6749.5
S2	ggccuuucacuacuccuacC <sub>4</sub> B <sup>E</sup>	6596.9	6597.2
S3	ggccuuucacuacuccuacC <sub>4</sub> C <sub>4</sub> B <sup>E</sup>	6748.9	6749.1
S3-GlcNAc	ggccuuucacuacuccuacC <sub>4</sub> C <sub>4</sub> B <sup>GlcNAc</sup>	6791.0	6791.6

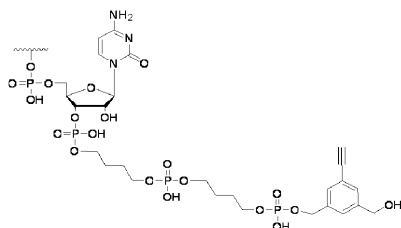
【化17】



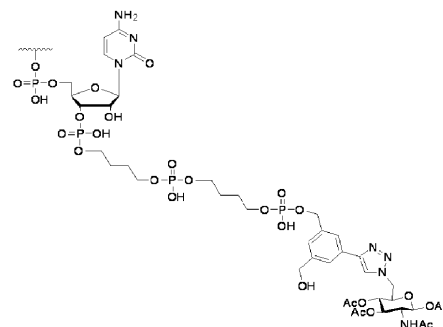
S1 : ggccuuucacuacuccuacTB<sup>E</sup>



S2 : ggccuuucacuacuccuacC<sub>4</sub>B<sup>E</sup>



S3 : ggccuuucacuacuccuacC<sub>4</sub>C<sub>4</sub>B<sup>E</sup>



S3-GlcNAc : ggccuuucacuacuccuacC<sub>4</sub>C<sub>4</sub>B<sup>GlcNAc</sup>

【 0 0 6 7 】

10

20

30

40

50

## (ASの合成)

核酸自動合成機(ABI 3400 DNA Synthesizer; Applied Biosystems)を用いて、dT修飾固相担体(Glen Research) 1  $\mu\text{mol}$  スケールで合成を行った。dT-CE Phosphoramidite (Glen Research)および RNA Phosphoramidite (Sigma-Aldrich)は0.1 Mアセトニトリル溶液に調製した。ホスホロアミダイト体のカップリング時間は20分にした。DMTr基を除去した状態で合成を終了した。固相担体からのASの切り出しおよび脱保護は定法に基づいて行った。減圧乾固後の残渣を20%変性 PAGEにより精製した。ASのバンドを切り出し、ゲル溶出液(0.1 N TEAA (pH 7.0), 1 mM EDTA)中で一晚振盪した。Sep-Pak(登録商標)  $\text{tC}_{18}$ 逆相カラムを用いゲル溶出液からASを回収した。精製したASは、MALDI-TOF/Ms (AXIMA-CFR plus; 島津製作所)で構造確認を行った。

10

## 【0068】

## (S1の合成)

1  $\mu\text{mol}$  の固相担体化合物8を用いてスケールでS1の合成を行った。その他の条件及び構造確認方法については、ASの場合と同様である。

## 【0069】

## (S2の合成)

1  $\mu\text{mol}$  の固相担体化合物8を用いてS2の合成を行った。化合物13は0.15 M アセトニトリル溶液に調製して用いた。その他の条件及び構造確認方法については、ASの場合と同様である。

20

## 【0070】

## (S3の合成)

1  $\mu\text{mol}$  の固相担体化合物8を用いてS3の合成を行った。化合物13は0.15 M アセトニトリル溶液に調製して用いた。その他の条件及び構造確認方法については、ASの場合と同様である。

## 【0071】

## (S3-GlcNAcの合成)

エッペンドルフチューブに、S3 (2 mM solution in  $\text{H}_2\text{O}$ , 1  $\mu\text{L}$ , 2 nmol), 1,3,4-tri-O-acetyl-2-acetamido-6-azido- $\beta$ -D-glucopyranose (9) (10 mM solution in DMSO, 3  $\mu\text{L}$ , 30 nmol), アセトニトリル (2.2  $\mu\text{L}$ ) を滅菌した1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) (2.2  $\mu\text{L}$ )、滅菌水 (9.6  $\mu\text{L}$ ) 加え、1分ほどボルテックスミキサーにより攪拌した。その後、アスコルビン酸ナトリウム (100 mM solution in  $\text{H}_2\text{O}$ , 2  $\mu\text{L}$ , 200 nmol)、硫酸銅5水和物 (100 mM solution in  $\text{H}_2\text{O}$ , 2  $\mu\text{L}$ , 200 nmol) を順次加え、1分ほどボルテックスミキサーにより攪拌し、室温下15分間静置した。HPLCにて精製を行い、目的物(S3-GlcNAc)を得た。

30

## 【0072】

<Dual-Luciferase reporter assayによる遺伝子発現抑制能の評価>

上記のようにして合成したアンチセンス鎖ASとセンス鎖S3-GlcNAcを、それぞれ210 pmol分エッペンドルフチューブに移し乾固させ、siRNA buffer (GE Dharmacon) (100  $\mu\text{L}$ ) に溶解し、100  $^{\circ}\text{C}$ で5分間加熱後、1時間以上静置し2本鎖の形成を行い、この2.1  $\mu\text{M}$ の各サンプルから10倍希釈、100倍希釈したものを作製しassay用のサンプルを調整した。

40

また、同様の方法により、アンチセンス鎖ASと、アンチセンス鎖ASに対応するセンス鎖とからsiRNA(ダンダリングエンドは共にTT)を合成し、コントロールとした。

siRNA導入前日にHeLa細胞(NIHより供与)を4000 cell/45  $\mu\text{L}$  になるようにOPTI-MEMに懸濁させた後、0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  psi-CHECK (登録商標) -2 vector (Promega) (18  $\mu\text{L}$ )、TransFast (登録商標) Transfection Reagent (Promega) (27  $\mu\text{L}$ )、Opti-MEM (登録商標) (Life Technologies) (315  $\mu\text{L}$ ) を加えた。96 well plateの各well に50  $\mu\text{L}$ ずつ入れ、37  $^{\circ}\text{C}$ で1時間インキュベートした。15% BS in DMEM (100  $\mu\text{L}$ ) を加え24時間培養した。

siRNAの導入に際しては、トランスフェクション試薬を用いる場合と、用いない場合の2方法により、行った。すなわち、トランスフェクション試薬ありの場合は、OPTI-MEMとTransFastを用いて各量のsiRNAを細胞内にトランスフェクションした。また、トランスフェ

50

クシオン試薬なしの場合は、各量のsiRNAをDMEMと混合し細胞に添加した。4時間後に10% BS in DMEM (100  $\mu$ L) を加え48時間培養した。

48時間培養後、培地を吸引し-80 で細胞を凍結させた。翌日、Dual-Glo (登録商標) Luciferase Assay System (Promega)を用いて遺伝子発現抑制能の評価を行った。評価はプロメガ社のプロットコールに従って行った。

【0073】

結果を図2に示す。

リポフェクション試薬を用いなかった場合において、S3-GlcNAcをセンス鎖としたsiRNAでは、添加量が10nMから50nM、100nMと増加するにしたがって、Luciferaseの活性度が低下しており、ルシフェラーゼに関する遺伝子抑制の機能が発揮されたことが分かった。これに対して、コントロールであるS1をセンス鎖としたsiRNAは、添加量を10nMから50nM、100nMと増加しても、Luciferaseの活性度が低下せず、ルシフェラーゼに関する遺伝子抑制の機能が発揮されなかった。

一方、リポフェクション試薬を用いた場合には、どちらのsiRNAにおいても、ルシフェラーゼに関する遺伝子抑制の機能が発揮された。

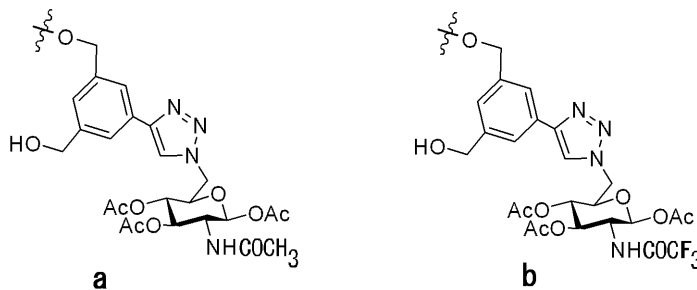
以上の結果は、次のように解釈される。すなわち、S3-GlcNAcをセンス鎖としたsiRNAでは、図3に示すように、HeLa細胞の細胞膜表面に存在する、アミノ糖鎖を認識する特定のリガンドに結合し、このリガンドを介したエンドサイトーシスによって、細胞内へsiRNAが導入されたのである。このことは、本発明のオリゴヌクレオチド誘導体を用いたsiRNAが、リガンドに対して選択的に結合し、細胞内への選択的なデリバリーの可能性を示している。また、このようなデリバリーシステムは、siRNAのみならず、アンチジーン、アンチセンス、アプタマー、miRNA、shRNA等にも適用できると考えられる。

【0074】

<トリフルオロアセチル基を導入したオリゴヌクレオチド誘導体>

本発明のオリゴヌクレオチド誘導体における、アミノ基がアセチル化されたアミノ糖置換基S (下記部分構造a参照) に替えて、トリフルオロアセチル化したオリゴヌクレオチド誘導体 (下記部分構造b参照) を用いることもできる。

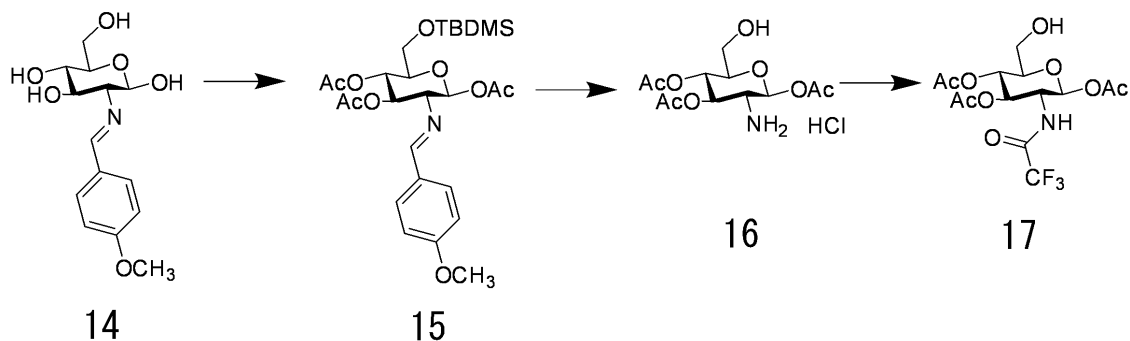
【化18】



【0075】

以下の合成経路に従って、トリフルオロアセチルグルコサミン誘導体17を合成した。

【化19】



10

20

30

40

50

## 【 0 0 7 6 】

1,3,4-tri-O-acetyl-2-[p-methoxybenzylidene(amino)]-6-tert-butylidimethylsilyl-  
-D-glucopyranose (15) の合成

2-[p-methoxybenzylidene(amino)]-  
-D-glucopyranose (14) (5.03 g, 16.9 mmol) を  
ピリジン (53 mL) に溶かし氷浴にした。TBDMSCl (1.61 g, 10.6 mmol) を加え攪拌した。  
。なお、(14) は、J. Morel, Helv. Chim. Acta, 1958, 41, 1501-1504; b) S. Ogawa,  
H. Fujimori, T. Suami, Bull. Soc. Chim. Jpn., 1976, 49, 2585-2586.の方法により合  
成した。8時間後TLCにて原料の消失を確認した。無水酢酸 (7.6 mL) 加え室温まで昇温し  
攪拌した。20時間後TLCにて中間生成物の消失を確認した。酢酸エチルと蒸留水で抽出後  
、有機層を飽和食塩水で洗い、無水硫酸ナトリウムにて乾燥し減圧留去した。その後シリ  
カゲルカラムクマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル = 5/1, 1%トリエチルアミン) に  
て精製し、黄色結晶 (4.73 g, 7.7 mmol, 48%)として化合物15を得た。

10

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 8.13 (s, 1H), 7.63 (d, 2H,  $J = 8.8$  Hz), 6.89 (d, 2H,  
 $J = 8.8$  Hz), 5.90 (d, 1H,  $J = 8.8$  Hz), 5.38 (t, 1H,  $J = 9.6$  Hz), 3.76 (d, 2H,  $J$   
 $= 8.8$  Hz), 3.71 (q, 1H,  $J = 7.2$  Hz), 3.38 (t, 1H,  $J = 9.6$  Hz), 2.02 (s, 3H), 2.  
00 (s, 3H), 1.98 (s, 3H), 1.85 (s, 3H), 0.87 (s, 9H), 0.01 (d, 6H,  $J = 8.0$  Hz).  
HRMS (ESI,  $m/z$ ,  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ) ; Calculated For  $\text{C}_{26}\text{H}_{39}\text{NNaO}_9\text{Si}$  : 560.22918, Found : 560  
.22084.

## 【 0 0 7 7 】

1,3,4-tri-O-acetyl-  
-D-glucopyranose hydrochloride (16) の合成

20

化合物15 (260 mg, 0.56 mmol) をアセトン (0.95 mL) に溶かし40 のウォーターバスで  
加温し、5 N塩酸 (149.00  $\mu\text{L}$ ) を入れ攪拌した。45分後TLCにて15の消失を確認した。吸引  
ろ過し、析出物を1,4-ジオキサソランで洗浄し、白色結晶 (123 mg, 0.36 mmol, 65%)として  
化合物16を得た。

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) : 8.68 (s, 2H), 5.88 (d, 1H,  $J = 8$  Hz), 5.30 (t, 1H,  
 $J = 10$  Hz), 4.85 (t, 1H,  $J = 10$  Hz), 3.97-3.93 (m, 1H), 3.55-3.44 (m, 2H), 3.40  
(d, 1H,  $J = 8$ Hz), 2.13 (s, 3H), 1.99 (s, 3H), 1.95 (s, 3H). HRMS (ESI,  $m/z$ ,  $[\text{M}+$   
 $\text{Na}]^+$ ) ; Calculated For  $\text{C}_{12}\text{H}_{19}\text{NNaO}_8$  : 328.10084, Found : 328.09630.

## 【 0 0 7 8 】

1,3,4-tri-O-acetyl-2-N-trifluoroacetyl-  
-D-glucopyranose (17) の合成

30

化合物16 (686 mg, 2.24 mmol) をピリジン (6.8 mL) に溶かし氷浴にして攪拌した。その  
後トリフルオロ酢酸無水物を加え氷浴を外し攪拌した。6時間後TLCにて16の消失を確認し  
た。クロロホルムと蒸留水にて抽出後、有機層を飽和食塩水で洗い、無水硫酸ナトリウム  
にて乾燥後減圧留去した。その後シリカゲルカラムクマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エ  
チル = 5/1-1/1) にて精製し、白色結晶の化合物17 (739 mg, 1.84 mmol, 82%)を得た。

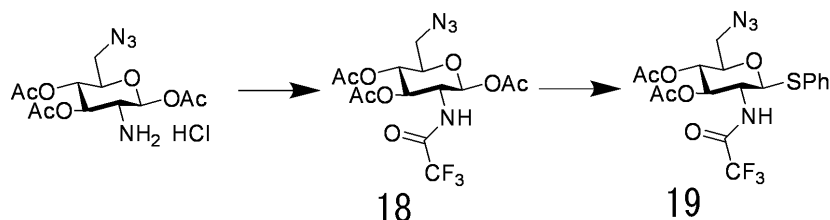
$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) : 8.12 (d, 1H,  $J = 5.2$  Hz), 7.66 (d, 1H,  $J = 5.2$  Hz)  
, 5.87 (t, 1H,  $J = 4.0$  Hz), 5.32 (t, 1H,  $J = 5.4$  Hz), 4.93 (t, 1H), 4.08 (q, 1H,  
 $J = 5.4$ Hz), 3.92 (s, 1H), 3.55-3.47 (m, 1H), 2.12 (s, 3H), 1.98 (s, 3H), 1.93 (s,  
3H). HRMS (ESI,  $m/z$ ,  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ) ; Calculated For  $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{F}_3\text{NNaO}_9$  : 424.08313, Fou  
nd : 424.08165.

40

## 【 0 0 7 9 】

また、下記合成経路に従って、アジ基及びチオフェノール基を有するトリフルオロアセ  
チルグルコサミン誘導体19を合成した。

## 【化20】



## 【0080】

1,3,4-tri-O-acetyl-2-N-trifluoroacetyl-6-azido- $\beta$ -D-glucopyranose (18) の合成  
 2-amino-1,3,4-O-acetyl-6-azido- $\beta$ -D-glucopyranose hydrochloride (250 mg, 0.8 mmol), ジクロロメタン(脱水)(7.5 mL), ピリジン(1.2 mL, 7.6 mmol), トリフルオロ酢酸無水物 (175.0  $\mu$ L, 0.9 mmol) を加え撹拌した。4時間後TLCにて原料の消失を確認した。蒸留水を加え反応を止め、クロロホルムと蒸留水で抽出後、有機層を飽和食塩水で洗い、無水硫酸ナトリウムにて乾燥後減圧留去した。その後シリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン/酢酸エチル = 2/1)にて精製し、白色結晶 (294 mg, 0.7 mmol, 87%)として化合物18を得た。

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 7.12 (d, 1H,  $J = 9.2$  Hz), 5.77 (d, 1H,  $J = 9.2$  Hz), 5.35 (t, 1H,  $J = 10$  Hz), 5.07 (t, 1H,  $J = 10$  Hz), 4.36 (q, 1H,  $J = 9.6$  Hz), 3.88 (m, 1H), 3.45-3.36 (m, 2H), 2.13 (s, 3H), 2.10 (s, 3H), 2.07 (s, 3H). HRMS (ESI,  $m/z$ ,  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ) ; Calculated For  $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{F}_3\text{N}_4\text{NaO}_8$  : 499.08962, Found : 449.08529.

## 【0081】

1-thiophenyl-2-N-trifluoroacetyl-3,4-di-O-acetyl-6-azido- $\beta$ -D-glucopyranose (19) の合成

化合物18 (500 mg, 1.3 mmol) をジクロロメタン(脱水) (4.50 mL) に溶かした。その後チオフェノール (0.18 mL, 1.8 mmol), 三フッ化ホウ素ジエチルエーテル錯体 (0.47 mL, 3.8 mmol) を加え撹拌した。18時間後TLCにて原料の消失を確認した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 : 飽和炭酸ナトリウム水溶液 : 飽和食塩水 = 1 : 1 : 0.5の水溶液10 mLを加え撹拌した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 : 飽和炭酸ナトリウム水溶液 = 1 : 1の水溶液で抽出し、有機層に無水硫酸ナトリウムを加え乾燥させたあと減圧留去した。その後シリカゲルカラムクロマトグラフィー(クロロホルム/メタノール = 70/1)にて精製し、白色結晶 (580 mg, 1.24 mmol, 95%)の化合物19を得た。

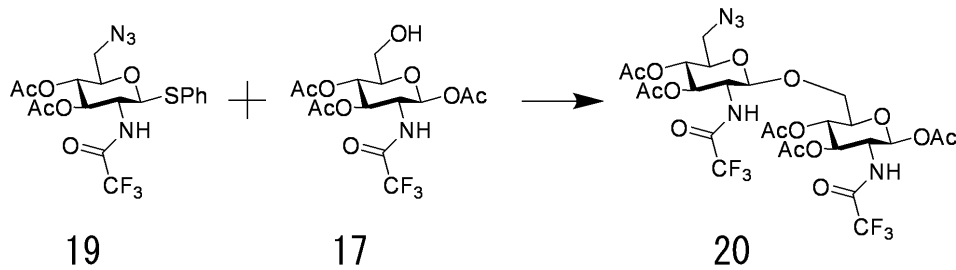
$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 7.54-7.51 (m, 2H), 7.38-7.32 (m, 3H), 6.54 (d, 1H,  $J = 8.8$  Hz), 5.25 (t, 1H,  $J = 9.8$  Hz), 4.99 (t, 1H,  $J = 9.8$  Hz), 4.84 (d, 1H,  $J = 8.8$  Hz), 3.99 (q, 1H,  $J = 8.5$  Hz), 3.70-3.66 (m, 1H), 3.41-3.33 (m, 2H), 2.01 (s, 6H). HRMS (ESI,  $m/z$ ,  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ) ; Calculated For  $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{F}_3\text{N}_4\text{NaO}_6\text{S}_1$  : 500.07548, Found : 500.08002.

## 【0082】

2-N-trifluoroacetyl-3,4-O-trifluoroacetyl-6-azido- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\beta$ )-1,3,4,-O-acetyl-2-N-trifluoroacetyl- $\beta$ -D-glucopyranose (20) の合成

以上のようにして合成した化合物19及び化合物17を結合させてトリフルオロアセチルグルコサミン誘導体20を合成した。

## 【化21】



## 【0083】

化合物19 (200.2 mg, 0.50 mmol)、化合物17 (170.0 mg, 0.36 mmol)をジクロロメタン(脱水) (16.8 mL)に溶解し、モレキュラーシーブス4A (1.6 g)を加え攪拌した。その後、25℃まで冷やしN-ヨードスクシンイミド (87.6 mg, 0.40 mmol)を加え30分後にトリフルオロメタンスルホン酸 (28.0 μL)を加え0℃で攪拌した。30分後TLCにて化合物17の消失を確認した。吸引ろ過でモレキュラーシーブス4Aを取り除いた後、酢酸エチル (50 mL)を加え希釈した。飽和チオ硫酸ナトリウム水溶液 (40 mL)、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で有機層を洗った。無水硫酸ナトリウムを加え乾燥させる過し減圧蒸留した。シリカゲルカラムクマトグラフィ(クロロホルム/メタノール = 30/1-10/1)にて精製し、白色結晶 (251 mg, 0.46 mmol, 91%)として化合物20を得た。

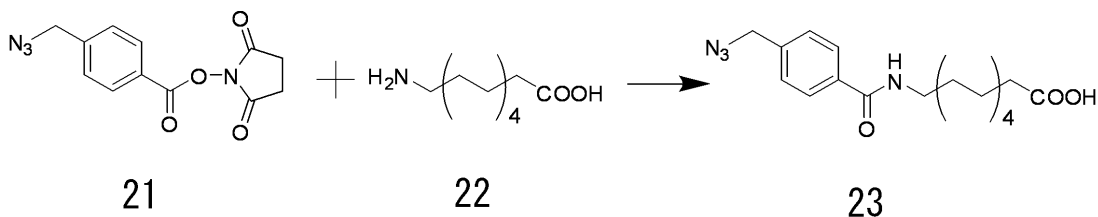
<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) : 9.64 (d, 1H, J = 9.2 Hz), 9.40 (d, 1H, J = 9.2 Hz), 5.74 (d, 1H, J = 9.2 Hz), 5.20 (t, 1H, J = 9.8 Hz), 5.11 (t, 1H, J = 9.8 Hz), 4.93 (t, 1H, J = 9.8 Hz), 4.85 (t, 1H, J = 9.8 Hz), 4.77 (t, 1H, J = 8.8 Hz), 3.86-3.77 (m, 3H), 3.53-3.43 (m, 2H), 3.29-3.25 (m, 2H), 1.97 (s, 3H), 1.95 (s, 3H), 1.91 (s, 3H), 1.87 (s, 3H), 1.84 (s, 3H). MALDI-TOF/Ms (m/z, [M+Na]<sup>+</sup>); Calculated For C<sub>26</sub>H<sub>31</sub>F<sub>6</sub>N<sub>5</sub>NaO<sub>15</sub> : 790.5, Found : 792.4.

## 【0084】

さらに、リンカー部分を導入するための様々な化合物を合成した。以下にそれらの詳細を示す。

Undecanoic acid, 11-[(4-(azidomethyl)benzoyl) amino]- (23) の合成

## 【化22】



## 【0085】

11-アミノウンデカン酸22(2.64 g, 13.1 mmol, 1.2 eq.)、トリエチルアミン (3.80 mL, 27.3 mmol, 2.5 eq.)をDMF (54.5 mL)で溶解し、Succinimidyl 4-(azidomethyl)benzoate 21 (2.99 g, 10.9 mmol)を加え、攪拌した。なお、化合物21はA. Gopin, S. Ebner, B. Attali and D. Shabat, Bioconjugate Chem., 2006, 17, 1432-1440.の方法によって合成した。48時間後、TLCにて原料の消失を確認した。反応溶液に5%クエン酸を加えpH < 2に調整し、酢酸エチルで抽出後、蒸留水で3回分液した。有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥・ろ過し減圧留去した。その後、シリカゲルカラムクマトグラフィ(クロロホルム:メタノール = 50:1-25:1)で精製し、白色結晶(3.65 g, 10.1 mmol, 93%)として化合物23を得た。

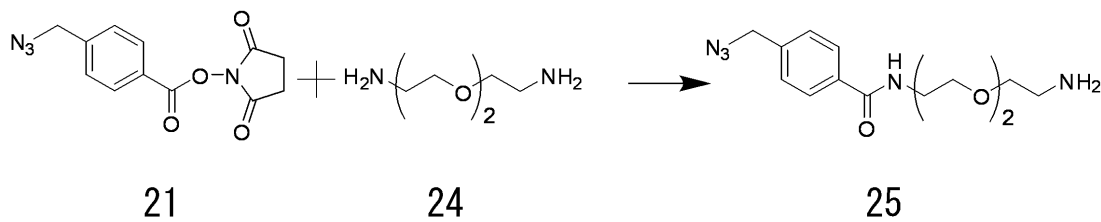
<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 7.79-7.76 (d, 2H, J = 8.4 Hz), 7.39-7.26 (d, 2H, J = 7.6 Hz), 6.14 (s, 1H), 4.39 (s, 2H), 3.46-3.43 (m, 2H, J = 6.4 Hz), 2.34-2.32 (q, 2H, J = 7.2 Hz), 1.65-1.58 (m, 4H, J = 8.6 Hz), 1.33-1.25 (q, 12H, J = 15.4 Hz)

z).

【 0 0 8 6 】

4-(Azidomethyl)-N-[2-[2-(2-aminoethoxy)ethoxy]ethyl]benzamide (25) の合成

【 化 2 3 】



10

【 0 0 8 7 】

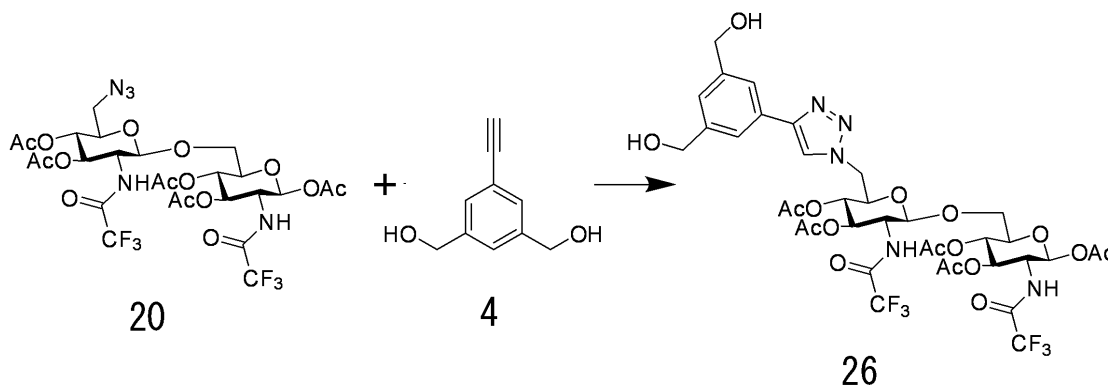
Succinimidyl 4-(azidomethyl)benzoate 21 (1.25 g, 4.56 mmol) をジクロロメタン (30 mL) で溶解し、滴下ロートでジクロロメタン (16 mL) で溶解した1,2-ビス(2-アミノエトキシ)エタン24 (3.35 g, 22.8 mmol, 5.0 eq.) 溶液を滴下・攪拌した。18時間後、TLCにて原料の消失を確認し、減圧留去した。その後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルム : メタノール = 10 : 1 + 0.05 % NH<sub>3</sub> aq. 5 : 1 + 0.05 % NH<sub>3</sub> aq. 3 : 1 + 0.05 % NH<sub>3</sub> aq.) で精製し、化合物25 (0.97 g, 2.39 mmol, 52 %) をオイル状で得た。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 7.88-7.86 (d, 2H, J = 8.8 Hz), 7.39-7.37 (d, 2H, J = 8.8 Hz), 7.17 (s, 1H), 4.39 (s, 2H), 3.69-3.65 (m, 8H), 3.51 (t, 2H, J = 5.2 Hz), 2.86 (s, 2H), 2.28 (s, 2H).

20

【 0 0 8 8 】

1-[3,4-O-acetyl-6-azido-2-N-trifluoroacetyl-β-D-glucopyranosyl-(1→6)-1,3,4-O-acetyl-2-N-trifluoroacetyl-β-D-glucopyranose]-4-[3,5-bis(hydroxymethyl)phenyl]-1H-1,2,3-triazole (26) の合成

【 化 2 4 】



30

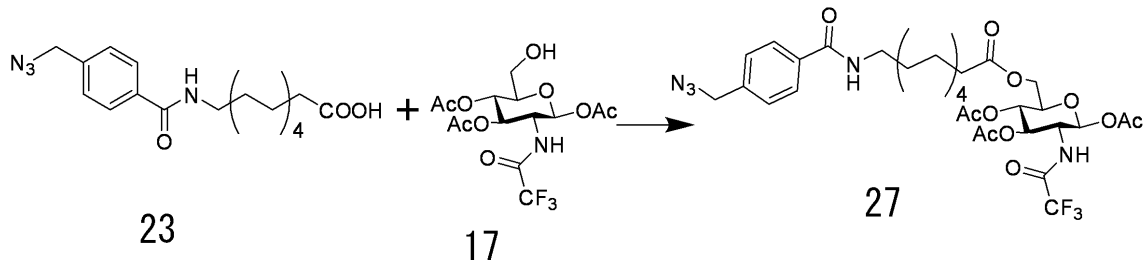
【 0 0 8 9 】

エペンドルフチューブに5-エチニル-1,3-ベンゼンジメタノール(BE) 4 (100 mM solution in DMSO, 2 μL, 0.2 μmol), 化合物20 (100 mM solution in DMSO, 2 μL, 0.2 μmol), 硫酸銅5水和物(1 M solution in Milli-Q水, 2 μL, 2 μmol), アスコルビン酸ナトリウム (1 M solution in Milli-Q水, 2 μL, 2 μmol), アセトニトリル (4 μL), 1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) (4 μL), Milli-Q水 (24 μL) を加え、1秒ほどボルテックスミキサーで混合し、そのまま室温で15分静置した。凍結乾燥しMALDI-TOF/Msにて化合物26の構造を確認した。

40

MALDI-TOF/Ms ([M+Na]<sup>+</sup>) ; Calculated For C<sub>36</sub>H<sub>41</sub>N<sub>5</sub>NaO<sub>15</sub> : 953.2, Found : 952.5.

## 【化25】



## 【0090】

10

化合物(27)の合成

化合物17 (100 mg, 249  $\mu$ mol), 化合物23 (135 mg, 375  $\mu$ mol, 1.51 eq.), DMAP (3 mg, 25  $\mu$ mol, 0.1 eq.) をピリジン (1 mL) に溶解し、氷冷下でEDC HCl (72 mg, 376  $\mu$ mol, 1.51 eq.) を加えた。1日後、TLCにて原料が消失していたため、酢酸エチル (10 mL) で希釈し、蒸留水で2回、炭酸水素ナトリウム水溶液で分液した。飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムを加え乾燥させた後、減圧留去した。フラッシュカラムクロマトグラフィー (ヘキサン / 酢酸エチル = 4 / 1 3 / 1 1 / 1 酢酸エチル) を行い、白色色結晶 (196 mg, 264  $\mu$ mol, 106 %) として化合物27を得た。

$^1\text{H NMR}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) ; 7.79-7.77 (d, 2H), 7.40-7.38 (d, 2H), 7.31-7.29 (d, 1H), 6.19 (s, 1H), 5.81-5.79 (d, 1H), 5.32-5.28 (t, 1H), 5.14-5.10 (t, 1H), 4.40 (s, 1H), 4.36-4.14 (m, 2H), 3.85-3.81 (m, 1H), 3.48-3.43 (dd, 2H), 2.36-2.33 (t, 1H), 2.11 (s, 3H), 2.054 (s, 3H), 2.046 (s, 3H), 1.35-1.30 (m, 13H).

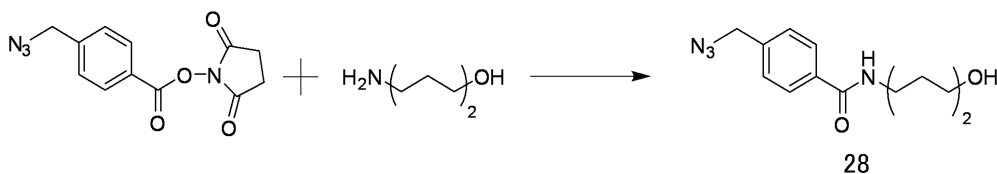
20

## 【0091】

以上のようにして得られた、トリフルオロアセチルグルコサミン誘導体20及び27は、これらの分子に存在するアジ基を足掛かりにクリック反応によって容易にオリゴヌクレオチドを修飾することができる。こうして修飾されたオリゴヌクレオチド誘導体は、細胞膜表面にはアミノ糖を認識するレセプターによって認識され、エンドサイトーシスによって細胞の核内に取り込みやすくなる。このため、リポフェクション試薬を用いることなく、細胞内に導入することが期待できる。また、フッ素原子の導入によって疎水性が増すことで、細胞膜表面の受容体が疎水性官能基を受け入れやすい場合には、透過性が増加すると考えられる。

30

## 【化26】



## 【0092】

化合物28の合成

Succinimidyl 4-(azidomethyl)benzoate <sup>[1]</sup> (793 mg, 2.89 mmol) と6-アミノヘキサノール (538 mg, 4.59 mmol, 1.6 eq.) をMeOH (30 ml) に溶解し、室温で攪拌した。1時間後、TLC (EtOAc, UV, アニスアルデヒド) で原料の消失を確認した。酢酸エチルで希釈し、1 N HCl、蒸留水と分液した。有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、減圧留去を行った。その後、フラッシュカラムクロマトグラフィー (クロロホルム : メタノール = 100 : 0 100 : 1) を行った。化合物28 (422 mg, 1.53 mmol, 53%) を白色粉末で得た。

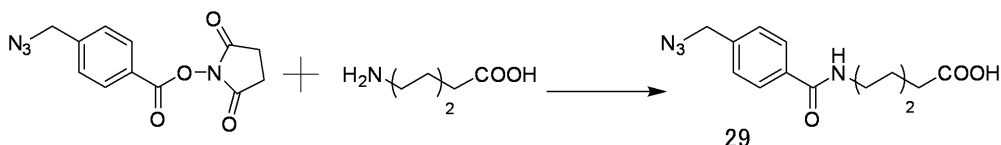
40

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) 8.46 - 8.43 (t,  $J = 5.0$  Hz, 1H), 7.86 - 7.84 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 7.45 - 7.43 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 4.51 (s, 2H), 4.34 - 4.31 (t,  $J = 6.0$  Hz, 1H), 3.40 - 3.35 (q,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 3.26 - 3.21 (q,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 1.53 - 1.29 (m, 8H).

50



## 【化27】



## 【0093】

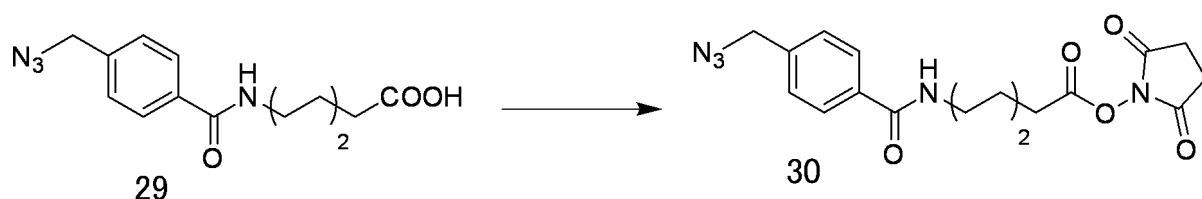
## 化合物29の合成

アルゴン置換下でsuccinimidyl 4-(azidomethyl)benzoate<sup>[1]</sup> (823 mg, 3.00 mmol) と 2-アミノカプロン酸 (472 mg, 3.60 mmol, 1.2 eq) に DMF (15 mL) と TEA (1.00 mL) を加えた。3 日後、TLC で反応を確認 (クロロホルム : メタノール = 5 : 1, UV で検出) し原料の消失を確認した。反応溶液を酢酸エチルで希釈し、1 N HCl 水溶液で抽出した。有機層を飽和食塩水で1回洗浄し、無水硫酸ナトリウムで脱水後、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 (クロロホルム : メタノール = 100 : 1 100 : 2 100 : 4) で精製した。溶媒を減圧留去し、化合物29 (888 mg, 2.99 mmol, 99%) の白色の結晶を得た。

10

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 7.79-7.77 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.39-7.37 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 6.21 (s, 1H), 4.40 (s, 2H), 3.50-3.49 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 2.41-2.37 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 1.74-1.62 (m, 4H), 1.50-1.42 (m, 2H)

## 【化28】



20

## 【0094】

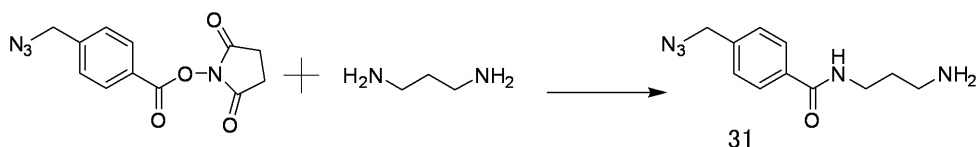
## 化合物30の合成

アルゴン置換下で化合物 29 (581 mg, 2.00 mmol) と NHS (279 mg, 2.40 mmol, 1.2 eq) を DMF (10 mL) で溶解させた。WSC (581 mg, 3.00 mmol, 1.5 eq) を加え、攪拌した。18時間後、TLC (酢酸エチル, UV で検出) で原料の消失を確認した。反応溶液を酢酸エチルで希釈後、蒸留水で3回分液し、飽和食塩水で1回洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで脱水後、溶媒を減圧留去した。カラムクロマトグラフィー (ヘキサン : 酢酸エチル = 1 : 1 酢酸エチル) で単離精製した。化合物 30 (650 mg, 1.68 mmol, 84%) の白色の結晶を得た。

30

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 7.81-7.79 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.39-7.37 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 6.33 (s, 1H), 4.40 (s, 2H), 3.50-3.46 (q, J = 7.0 Hz, 2H), 2.83 (s, 4H), 2.66-2.62 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 1.87-1.79 (m, 2H), 1.72-1.65 (m, 2H), 1.58-1.26 (m, 2H).

## 【化29】



40

## 【0095】

## 化合物31の合成

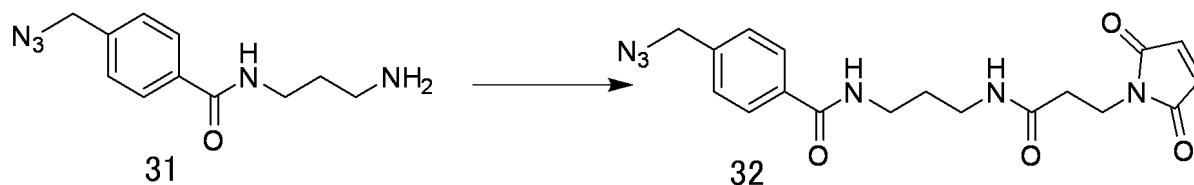
CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL) に1,3-ジアミノプロパン (73.7 mg, 1.0 mmol) を溶解させ、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL) にsuccinimidyl 4-(azidomethyl)benzoate<sup>[1]</sup> (274.2 mg, 1.0 mmol) を溶解させたものをゆっくりと滴下した (滴下時間25分)。18時間後TLC (クロロホルム : メタノール = 3 : 1 + 1% NH<sub>3</sub> aq., UVとニンヒドリン試薬) で反応液に原料が残っていないことを確認した。クロロホルム : メタノール = 10 : 1 + 1% NH<sub>3</sub> aq.の溶出溶媒でカラムク

50

ロマトグラフィーを行った。化合物31 (197.1 mg, 0.8 mmol, 84%) の黄色液体が得られた。

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 7.85-7.82 (2H, t,  $J = 4.0$  Hz), 7.39-7.37 (2H, d,  $J = 8.0$  Hz), 4.40 (2H, s), 3.63-3.59 (2H, m), 2.97-2.94 (2H, t,  $J = 6.0$  Hz), 1.79-1.75 (2H, t,  $J = 8.0$  Hz).

【化30】



10

【0096】

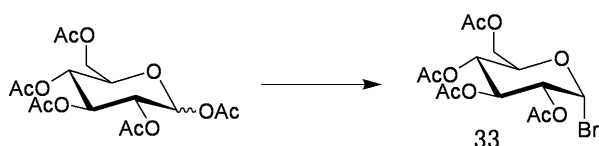
化合物32の合成

アルゴン置換下で化合物15 (108.1 mg, 0.5 mmol) にDMF (6 mL) を加え溶解させ、Succinimido 4-maleimido hexanoate <sup>[2]</sup> (183.7 mg, 0.7 mmol, 1.5 eq) を加え撹拌した。6時間後、TLC (ジクロロメタン : アセトン = 1 : 1, UVとニンヒドリン試薬) で原料が残っていないことを確認し、減圧留去した。ジクロロメタン : アセトン = 1 : 1の溶出溶媒でカラムクロマトグラフィーを行い、化合物32 (23.8 mg, 0.1 mmol, 13%) の薄黄色固体を得た。

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) : 8.46 (1H, s), 7.98 (1H, s), 7.87-7.85 (2H, d,  $J = 8.0$  Hz), 7.47-7.45 (2H, d,  $J = 8.0$  Hz), 7.02 (2H, s), 4.53 (2H, s), 3.63-3.61 (2H, d,  $J = 8.0$  Hz), 3.25-3.23 (2H, d,  $J = 8.0$  Hz), 3.07-3.05 (2H, d,  $J = 8.0$  Hz), 2.36-2.32 (2H, t,  $J = 8.0$  Hz), 1.63-1.62 (2H, d,  $J = 4.0$  Hz).

20

【化31】



30

【0097】

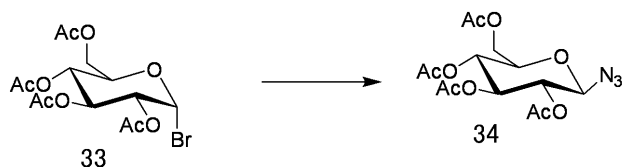
化合物33の合成

$\text{D-glucose penta acetate}$  (1.5 g, 3.84 mmol) をDCM 19mLに溶解し、氷浴下でhydrogen bromide (2.26 mL, 5.0 eq.) を加えた。滴下後、氷浴を取り除き室温で4時間撹拌した。反応終了後、 $\text{H}_2\text{O}$ を加え $\text{CHCl}_3$ で抽出後、有機層を飽和食塩水で洗い、無水硫酸ナトリウムを加え乾燥させた後に減圧留去した。そして、カラムクロマトグラフィー (Hexane:EtOAc = 1:1) で単離精製し化合物33の白色結晶を得た (収量 0.70g、収率 44%)。

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) = 6.60 (d,  $J = 4.12$  Hz, 1H), 5.55 (dd,  $J = 10.08, 9.60$  Hz, 1H), 5.15 (dd,  $J = 10.52, 9.64$  Hz, 1H), 4.83 (dd,  $J = 10.52, 4.12$  Hz, 1H), 4.33-4.27 (m, 2H), 4.13-4.10 (m, 1H), 2.10 (s, 3H), 2.09 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 2.02 (s, 3H).

40

【化32】



【0098】

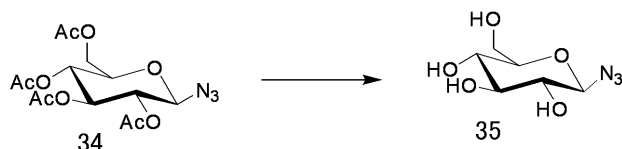
化合物34の合成

50

化合物33 (0.58 g, 1.4 mmol) をDMF 14 mLに溶解し、NaN<sub>3</sub> (0.46 g, 5.0 eq.) を加えて50 の油浴で24時間攪拌した。反応終了後、H<sub>2</sub>Oを加えEtOAcで抽出後、有機層を飽和食塩水で洗い、無水硫酸ナトリウムを加え乾燥させた後に減圧留去した。そして、カラムクロマトグラフィー (Hexan:EtOAc=1:1) で単離精製し化合物34の白色結晶を得た(収量 0.48g、収率 91%)。

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) = 5.21 (t, J = 10.08, 9.60 Hz, 1H), 5.09 (t, J = 10.08 Hz, 1H), 4.94 (dd, J = 9.60, 9.16 Hz, 1H), 4.63 (d, J = 8.72 Hz, 1H), 4.26 (dd, J = 12.84, 4.60 Hz, 1H), 4.16 (dd, J = 12.84, 2.28 Hz, 1H) 3.78 (dddd, J = 2.28, 4.60, 10.08 Hz, 1H), 2.09 (s, 3H), 2.07 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 2.02 (s, 3H).

【化 3 3】



10

【 0 0 9 9 】

化合物35の合成

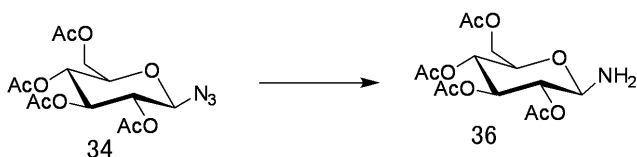
化合物2 (0.36 g, 0.96 mmol) に16% NH<sub>3</sub>/MEOHを10 mL加えて室温で8時間攪拌した。TLCで反応終了を確認後、減圧留去し透明なオイルとして化合物35を定量的に得た。

20

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) = 5.46 (d, J = 5.60 Hz, 1H), 5.07 (d, J = 5.60 Hz, 1H), 5.00 (d, J = 5.60 Hz, 1H), 4.59 (d, J = 6.00 Hz, 1H), 4.42 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 3.66-3.61 (m, 1H) 3.43-3.37 (m, 1H), 3.22-3.16 (m, 1H), 3.14-3.11 (m, 1H), 3.02 (ddd, J = 9.20, 5.60 Hz, 1H), 2.94 (ddd, J = 5.60, 9.00 Hz, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (100.5 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) = 90.6, 79.7, 77.1, 73.8, 70.1, 61.3.

【化 3 4】



30

【 0 1 0 0 】

化合物36の合成

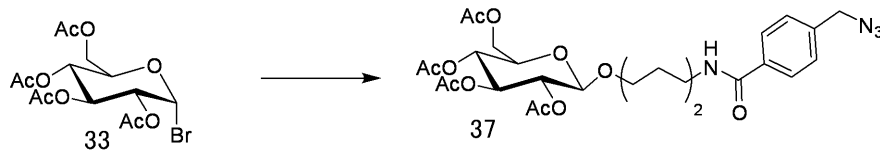
化合物35 (0.44 g, 1.4 mmol) をMeOH 11.8 mLに溶解し、Pd/C (44 mg, 10wt%) を加えて水素雰囲気下で3時間攪拌した。反応終了後、EtOAcでセライトろ過し有機層を減圧留去した。そして、カラムクロマトグラフィー (Hexane:EtOAc=1:1) で単離精製し、白色結晶からなる化合物36を得た(収量 0.30 g、収率 73%)。

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) = 5.23 (dd, J = 10.08, 9.64 Hz, 1H), 5.03 (dd, J = 10.08, 9.64 Hz, 1H), 4.82 (dd, J = 9.60, 9.16 Hz, 1H), 4.24-4.17 (m, 2H), 4.11-4.07 (m, 1H), 3.68 (dddd, J = 2.28, 4.60, 10.08 Hz, 1H), 2.06 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 2.00 (s, 3H), 1.99 (s, 3H).

40

<sup>13</sup>C NMR (98.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>) = 170.8, 170.3, 169.7, 85.1, 73.2, 72.8, 72.1, 68.8, 62.4, 20.9, 20.7.

## 【化 3 5】



## 【 0 1 0 1】

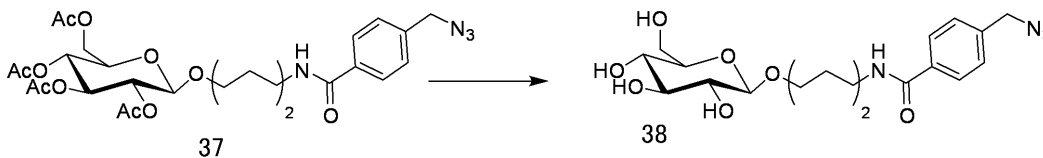
## 化合物37の合成

化合物34 (1.13 g, 2.0 eq.) と化合物28 (0.40 g, 1.38 mmol) をPyridine 5 mLに溶解し、Ag<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1.52 g, 4.0 eq.) 加え19h攪拌した。反応終了後、5% HClを加え、EtOAcで抽出し有機層をH<sub>2</sub>O、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗い、無水硫酸ナトリウムを加え乾燥させた後に減圧留去した。その後、カラムクロマトグラフィー (Hexane: EtOAc = 1:1) で単離精製し、化合物37を白色結晶として得た(収量 0.49 g、収率 64%)。

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) = 7.77 (d, J = 8.40 Hz, 2H), 7.37 (d, J = 8.40 Hz, 2H), 6.19-6.16 (m, 1H), 5.67 (d, J = 7.60 Hz, 1H), 5.23 (t, J = 9.20 Hz, 1H), 5.16-5.10 (m, 2H) 4.39 (s, 2H), 4.27 (dd, J = 12.40, 4.40 Hz, 1H), 4.21-4.09 (m, 3H), 3.82 (dddd, J = 2.40, 4.40, 10.00 Hz, 1H), 3.44 (dd, J = 6.60, 11.80 Hz, 2H), 2.07 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 2.00 (s, 3H), 1.70-1.60 (m, 4H), 1.42-1.39 (m, 4H).

<sup>13</sup>C NMR (100.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>) = 170.7, 170.2, 169.2, 153.5, 138.8, 134.8, 128.3, 127.5, 95.0, 72.8, 70.2, 69.1, 67.7, 61.4, 54.3, 40.0, 29.6, 28.4, 26.6, 25.4, 20.8, 20.7, 20.7.

## 【化 3 6】



## 【 0 1 0 2】

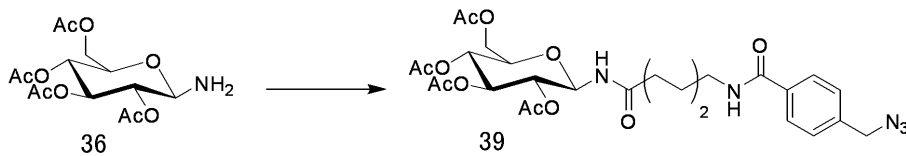
## 化合物38の合成

化合物37 (0.72 g) をdry MeOHに溶解し、28% Sodium Methoxide Methanol Solutionを適量加えて振とうした。5分後、TLCにて反応終了を確認し、DOWEX 50WX8-100 ion-exchange resinを加え振とう、綿栓ろ過し減圧留去した。そして、カラムクロマトグラフィー (CHCl<sub>3</sub> : CH<sub>3</sub>OH = 5 : 1) で単離精製し、化合物38を白色結晶として得た(収量 0.19 g)。

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) = 8.43 (t, J = 5.60 Hz, 1H), 7.81 (d, J = 8.40 Hz, 1H), 7.41 (d, J = 8.40 Hz, 1H), 4.91 (d, J = 4.80 Hz, 1H), 4.87 (d, J = 4.80 Hz, 1H), 4.84 (d, J = 4.4 Hz, 1H) 4.48 (s, 2H), 4.43 (t, J = 6.00 Hz, 1H), 4.05 (d, J = 7.60 Hz, 1H), 3.75-3.69 (m, 1H), 3.64-3.59 (m, 1H), 3.42-3.34 (m, 2H), 3.23-3.18 (m, 2H), 3.10-2.98 (m, 3H), 2.89 (ddd, J = 5.20, 8.20 Hz, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (100.5 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) = 166.2, 139.0, 135.0, 128.7, 128.1, 103.4, 77.3, 74.0, 70.6, 69.0, 61.6, 53.6, 29.8, 29.6, 26.9, 25.8.

## 【化37】



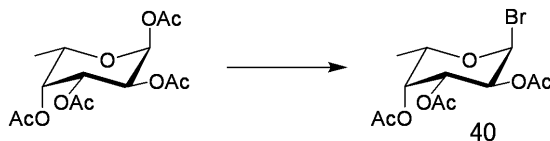
## 【0103】

## 化合物39の合成

化合物36 (0.1 g, 0.29 mmol) に化合物30 (0.25 g, 2.2 eq.) を加えて、THF 1mL 中に一晩撹拌した。その後、減圧留去し、カラムクロマトグラフィー (CHCl<sub>3</sub> : CH<sub>3</sub>OH = 50 : 1) で単離精製し、化合物39を白色結晶として得た (収量 17.9 mg、収率 11%)。

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) = 8.59 (d, J = 9.64, 1H), 8.43 (t, J = 5.50 Hz, 1H), 7.81 (d, J = 8.24 Hz, 1H), 7.40 (d, J = 8.72 Hz, 1H), 5.37-5.27 (m, 2H), 4.86-4.77 (m, 2H), 4.48 (s, 2H), 4.13-4.03 (m, 2H), 3.93-3.90 (m, 2H), 3.21-3.16 (m, 2H), 2.08-2.03 (m, 2H), 2.05 (s, 3H), 1.96 (s, 3H), 1.95 (s, 3H), 1.94 (s, 3H), 1.47-1.44 (m, 4H), 1.24-1.19 (m, 2H).

## 【化38】

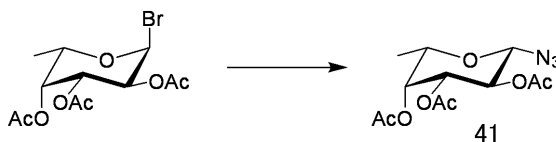


## 【0104】

## 化合物40の合成

1,2,3,4-tetra-O-acetyl-α-L-fucopyranose (1.5 g, 4.50 mmol) をDCM 22.5 mL に溶解し、氷浴下でHydrogen bromide (2.26 mL, 5.0 eq.) を加えた。滴下後、氷浴を取り除き室温で3.5時間撹拌した。反応終了後、H<sub>2</sub>Oを加えCHCl<sub>3</sub>で抽出後、有機層を飽和食塩水で洗い、無水硫酸ナトリウムを加え乾燥させた後に減圧留去した。そして、カラムクロマトグラフィー (Hexane:EtOAc= 4:1) で単離精製し、化合物40を白色結晶として得た (収量 1.33 g、収率 84%)。

## 【化39】



## 【0105】

## 化合物41の合成

化合物40 (1.23 g, 3.48 mmol) をDMF 17 mL に溶解し、NaN<sub>3</sub> (1.13 g, 5.0 eq.) を加えて50 °C の油浴で24時間撹拌する。反応終了後、H<sub>2</sub>Oを加えEtOAcで抽出後、有機層を飽和食塩水で洗い、無水硫酸ナトリウムを加え乾燥させた後に減圧留去した。そして、カラムクロマトグラフィー (Hexane:EtOAc=1:1) で単離精製し化合物41を白色結晶として得た (収量 0.74g、収率 52%)。

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) = 5.26-5.25 (m, 1H), 5.13 (dd, J = 10.0, 8.80 Hz, 1H), 5.02 (dd, J = 10.0, 3.60 Hz, 1H), 4.57 (d, J = 8.80 Hz, 1H), 3.89 (ddd, J = 6.40, 0.80 Hz, 1H), 2.18 (s, 3H), 2.07 (s, 3H), 1.98 (s, 3H), 1.24 (d, J = 6.40 Hz, 3H).

10

20

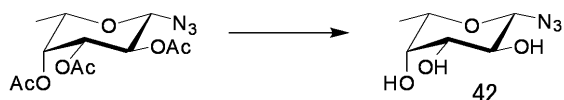
30

40

50

$^{13}\text{C}$  NMR (100.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) = 170.6, 170.2, 169.6, 88.3, 71.6, 71.2, 70.0, 68.3, 20.8, 20.7, 20.7, 16.1.

【化40】



【0106】

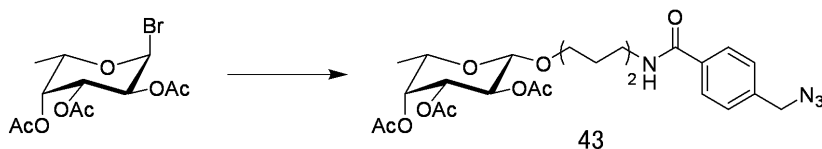
化合物42の合成

化合物41 (0.51 g, 1.62 mmol) に16%  $\text{NH}_3/\text{MEOH}$ を15 mL加えて室温で4時間攪拌した。TLCで反応終了を確認後、減圧濃留去し透明なオイルとして化合物42を定量的に得た(収量 0.39 g)。

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) = 5.23 (d,  $J = 5.20$  Hz, 1H), 4.81 (d,  $J = 5.60$  Hz, 1H), 4.56 (d,  $J = 4.40$  Hz, 1H), 4.31-4.29 (m, 1H), 3.61 (dd,  $J = 12.80, 6.40$  Hz, 1H), 3.40-3.39 (m, 1H), 3.30-3.26 (m, 2H), 3.13 (d,  $J = 5.20$  Hz, 1H), 1.10 (d,  $J = 6.40$  Hz, 3H).

$^{13}\text{C}$  NMR (100.5 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) = 91.0, 73.9, 73.0, 71.4, 70.4, 17.1.

【化41】

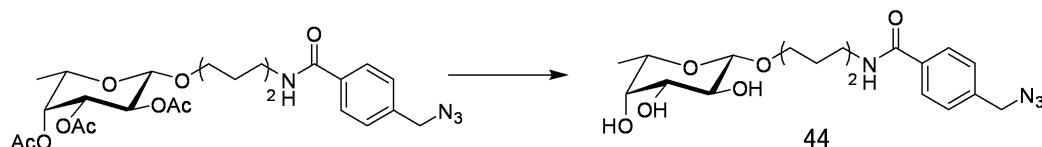


【0107】

化合物43の合成

化合物40 (0.60 g, 1.5 eq.) と化合物28 (0.33 g, 1.14 mmol) をPyridine 5 mLに溶解し、 $\text{Ag}_2\text{CO}_3$  (1.25 g, 4.0 eq.) 加え24h攪拌した。反応終了後、5% HClを加え、EtOAcで抽出し有機層を $\text{H}_2\text{O}$ 、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗い、無水硫酸ナトリウムを加え乾燥させた後に減圧留去した。その後、カラムクロマトグラフィー (Hexane: EtOAc = 1:1) で精製した。

【化42】



【0108】

化合物44の合成

化合物42 (0.20 g, mixture)をdry MeOH 3 mLに溶解し、28% Sodium Methoxide Methanol Solutionを適量加えて振とうした。5分後、TLCにて反応終了を確認し、DOWEX 50WX8-100 ion-exchange resinを加え振とう、綿栓ろ過し減圧留去した。そして、カラムクロマトグラフィー ( $\text{CHCl}_3 : \text{CH}_3\text{OH} = 5 : 1$ )で単離精製し化合物44を白色結晶として得た(収量 10 mg, 収率7% (2 steps))。

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) = 8.43 (t,  $J = 6.00$  Hz, 1H), 7.81 (d,  $J = 8.40$  Hz, 2H), 7.41 (d,  $J = 8.40$  Hz, 2H), 4.73 (d,  $J = 4.00$  Hz, 1H), 4.58 (d,  $J = 5.20$  Hz, 1H), 4.48 (s, 2H), 4.32 (d,  $J = 5.20$  Hz, 1H), 3.99 (d,  $J = 6.80$  Hz, 1H), 3.68-3.

10

20

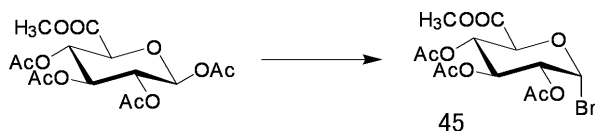
30

40

50

62 (m, 1H), 3.46-3.41 (m, 1H), 3.38-3.33 (m, 2H), 3.26-3.15 (m, 4H), 1.51-1.46 (m, 4H), 1.28 (m, 4H), 1.06 (d, J = 6.40 Hz, 3H).

【化43】



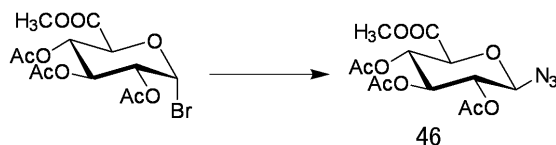
【0109】

10

化合物45の合成

Methyl-1,2,3,4-tetra-O-acetyl-β-D-glucuronate (1.5 g, 4.50 mmol) をDCM 20 mLに溶解し、氷浴下でHydrogen bromide (2.34 mL, 3.0 eq.)を加えた。滴下後、氷浴を取り除き室温で4時間攪拌した。反応終了後、H<sub>2</sub>Oを加えCHCl<sub>3</sub>で抽出後、有機層を飽和食塩水で洗い、無水硫酸ナトリウムを加え乾燥させた後に減圧留去した。そして、カラムクロマトグラフィー (Hexane:EtOAc= 4:1) で単離精製し、化合物45を白色結晶として得た(収量 0.22 g、収率 14%)。

【化44】



20

【0110】

化合物46の合成

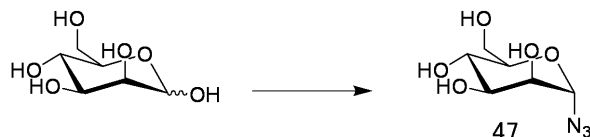
化合物45 (0.22 g, 0.55 mmol) をDMF 5.5 mLに溶解し、NaN<sub>3</sub> (0.18 g, 5.0 eq.)を加えて50 °Cの油浴で24時間攪拌した。反応終了後、H<sub>2</sub>Oを加えEtOAcで抽出後、有機層を飽和食塩水で洗い、無水硫酸ナトリウムを加え乾燥させた後に減圧留去した。そして、カラムクロマトグラフィー (Hexane:EtOAc=1:1) で単離精製し、化合物46を白色結晶として得た(収量 0.12g、収率 61%)。

30

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) = 5.26-5.22 (m, 2H), 4.95 (dd, J = 9.60, 9.16 Hz, 1H), 4.70 (d, J = 9.16 Hz, 1H), 4.10 (d, J = 9.64 Hz, 1H), 3.77 (s, 3H), 2.07-2.00 (m, 9H).

<sup>13</sup>C NMR (98.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>) = 170.1, 169.2, 88.2, 74.3, 71.9, 70.5, 69.1, 53.2, 20.7, 20.7, 20.6.

【化45】



40

【0111】

化合物47の合成

α-D-Mannose (0.18 g, 1.80 mmol) をH<sub>2</sub>O/1,4-dioxane (=1:1, 4 mL) に溶解し、-10 °Cに冷却した。2-chloro-1,3-dimethylimidazolium chloride (0.50 g, 2.96 mmol, 1.6 eq.), NaN<sub>3</sub> (0.59 g, 9.08 mmol, 5.0 eq.), TEA (1.3 ml, 9.33 mmol, 5.2 eq.)を加え攪拌した。23時間後、TLC (CHCl<sub>3</sub>:MeOH=3:1, 5%硫酸 in MeOH) で原料の消失を確認した。溶媒を減圧留去した。フッラシユカラムクロマトグラフィー (CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH=10:1) を

50

行った。化合物47<sup>[3]</sup> (0.16 g, 0.76 mmol, 75%) を白色固体で得た。

【化46】



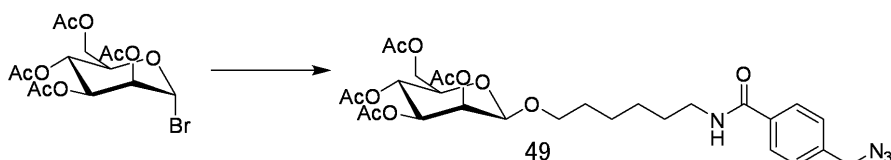
【0112】

化合物48の合成

$\alpha$ -Mannose penta acetate (0.70 g, 1.80 mmol) を $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (40 mL) に溶解し、Ar雰囲気下、氷冷下で0.69 M HBr in AcOH (7 mL) をゆっくり滴下した。滴下終了後、反応液を室温に戻し攪拌した。23時間後、TLC (Hexane : EtOAc = 2:1, 5%硫酸 in MeOH) で原料の消失を確認した。反応液を氷冷し飽和食塩水を加え、攪拌した。30分後、水層を除去し飽和重曹水を加え、攪拌した。反応液を $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ で希釈後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、水と分液した。飽和食塩水で洗浄後、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、減圧留去した。化合物48 (0.63 g, 1.53 mmol, 85%) をオイル状で得た。

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 6.29 (s, 1H), 5.74-5.70 (dd,  $J = 13.7, 7.6$  Hz, 1H), 5.45 (s, 1H), 5.40 - 5.35 (t,  $J = 10.2$  Hz, 1H), 4.36-4.31 (dd,  $J = 17.6, 4.9$  Hz, 1H), 4.24 - 4.20 (m, 1H), 4.16 - 4.12 (m, 1H), 2.18 (s, 3H), 2.11 (s, 3H), 2.08 (s, 3H), 2.01 (s, 3H).

【化47】



【0113】

化合物49の合成

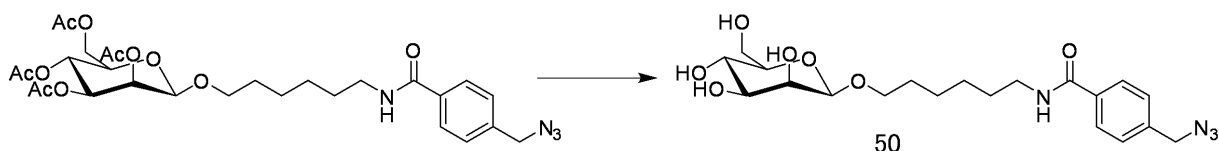
Ar置換下で化合物48 (0.21 g, 0.50 mmol) を $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 mL) で溶解し、化合物28 (0.22 g, 0.81 mmol, 1.6 eq.) と $\text{Na}_2\text{SO}_3$  (30 mg) を加え攪拌した。30分後、 $\text{Ag}_2\text{CO}_3$  (0.15 g, 0.53 mmol, 1.1 eq.) とDIPEA (0.1 mL, 0.57 mmol, 1.1 eq.) を加え攪拌した。9時間後、TLC (Hexane : EtOAc = 1:1, UV, 5%硫酸 in MeOH) で原料の消失を確認した。反応液を濾過し、溶媒を減圧留去した。カラムクロマトグラフィー (Hexane : EtOAc = 2:1 1:1) で精製した。化合物49 (0.10 g, 0.17 mmol, 33%) を白色粉末で得た。

$^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 6.69-6.68 (d,  $J = 6.4$  Hz, 1H), 6.29-6.27 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H), 5.50-5.47 (t,  $J = 5.2$  Hz, 1H), 4.37-4.36 (d,  $J = 2.8$  Hz, 1H), 4.14-4.04 (m, 2H), 3.48-3.46 (t,  $J = 3.0$  Hz, 1H), 3.31 (s, 2H), 3.11-3.01 (m, 2H), 2.61-2.57 (m, 1H), 2.42-2.27 (m, 4H), 0.97 (s, 3H), 0.94 (s, 3H), 0.93 (s, 3H), 0.58 (s, 3H), 0.51 (m, 4H), 0.31-0.21 (m, 4H).

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 165.93, 165.62, 165.04, 162.13, 134.27, 130.37, 123.64, 122.87, 119.70, 92.85, 90.43, 72.17, 66.61, 66.07, 61.01, 57.71, 57.55, 49.70, 49.54, 49.28, 49.00, 48.73, 48.47, 35.42, 25.02, 24.84, 22.15, 21.26, 20.33, 16.03, 16.00.



## 【化48】



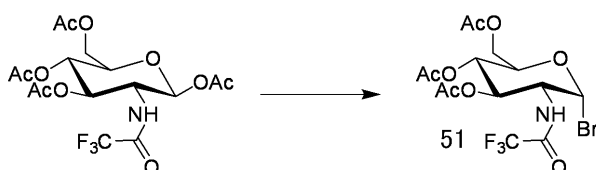
## 【0114】

## 化合物50の合成

化合物49 (92.5 mg, 0.15 mmol) をdry MeOH 3 mLに溶解し、Sodium Methoxide (9.9 mg, 0.18 mmol, 1.2eq.) を加え攪拌した。翌日、TLC(CHCl<sub>3</sub>:MeOH = 5 : 1, UV, 5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in EtOH) で反応終了を確認後、DOWEX 50WX8-100 ion-exchange resinを加えて反応液を中和した。綿栓ろ過し減圧濃縮した。白色固体の化合物50を定量的に得た。

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) 172.48, 169.67, 140.72, 135.60, 129.31, 128.68, 93.02, 74.92, 73.97, 72.94, 72.25, 70.38, 68.96, 68.69, 62.83, 62.76, 54.94, 40.96, 33.52, 30.45, 27.87, 26.62, 20.92.

## 【化49】



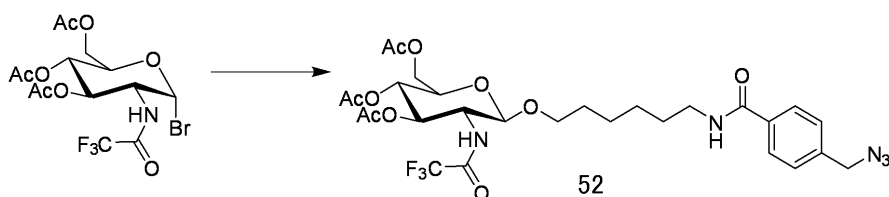
## 【0115】

## 化合物51の合成

-D-Glucopyranose, 2-deoxy-2-[(2,2,2-trifluoroacetyl)amino]-, 1,3,4,6-tetraacetate (0.57 g, 1.28 mmol) をCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30 mL) に溶解し、Ar雰囲気下、氷冷下で0.69 M HBr in AcOH (6 mL) をゆっくり滴下した。滴下終了後、反応液を室温に戻し攪拌した。16時間後、TLC (Hexane : EtOAc = 1 : 2, 5%硫酸 in MeOH) で原料の消失を確認した。反応液を氷冷し飽和食塩水を加え、攪拌した。30分後、水層を除去し飽和重曹水を加え、攪拌した。反応液をCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>で希釈後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、水と分液した。飽和食塩水で洗浄後、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、減圧留去した。化合物51 (0.51 g, 1.09 mmol, 85%) をオイル状で得た。

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 6.7-6.68 (d, J = 9.8 Hz, 1H), 6.55-6.54 (d, J = 5.4 Hz, 1H), 5.42-5.36 (t, J = 10.2 Hz, 1H), 5.31 - 5.26 (t, J = 9.8 Hz, 1H), 4.36-4.32 (m, 2H), 4.28 - 4.25 (m, 1H), 4.16 - 4.13 (d, J = 12.7 Hz, 1H), 2.12 (s, 3H), 2.08 (s, 3H), 2.07 (s, 3H).

## 【化50】



## 【0116】

## 化合物52の合成

Ar置換下で化合物51 (0.23 g, 0.50 mmol) をCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 mL) で溶解し、化合物28 (0.21 g, 0.75 mmol, 1.5 eq.) とNa<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (30 mg) を加え攪拌した。30分後、Ag<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.15 g, 0.54 mmol, 1.1 eq.) とDIPEA (0.1 ml, 0.57 mmol, 1.1 eq.) を加え攪拌した。9時間後、TLC (Hexane : EtOAc = 1:1, UV, 5%硫酸 in MeOH) で原料の消失を確認した。反応液

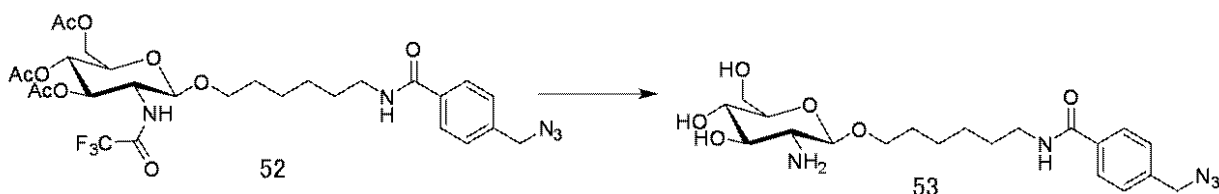
を濾過し、溶媒を減圧留去した。カラムクロマトグラフィー (Hexane : EtOAc = 2:1 1:1) で精製した。化合物52 (0.17 g, 0.26 mmol, 53 %) を白色粉末で得た。

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) : 7.50-7.47 (d,  $J = 9.2$  Hz, 1H), 7.06-7.04 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H), 6.63-6.61 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H), 6.04-6.01 (t,  $J = 5.7$  Hz, 1H), 4.67-4.53 (m, 1H), 4.27-4.23 (t,  $J = 9.9$  Hz, 1H), 3.90-3.88 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H), 3.64 (s, 2H), 3.48-3.42 (m, 1H), 3.36-3.18 (m, 2H), 3.08-3.02 (m, 1H), 2.84-2.48 (m, 3H), 1.26 (s, 3H), 1.23 (s, 3H), 1.21 (s, 3H), 0.83-0.76 (m, 4H), 0.66-0.52 (m, 4H).

$^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) 166.11, 166.04, 165.03, 162.79, 134.68, 129.97, 123.75, 123.04, 95.40, 67.56, 67.23, 64.95, 64.22, 57.55, 50.26, 49.54, 34.81, 24.72, 24.36, 21.41, 20.33, 16.01, 15.96, 15.78.

10

## 【化51】



## 【0117】

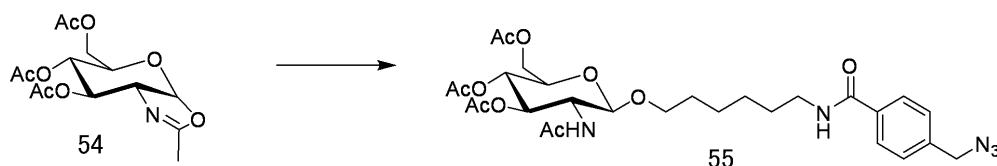
## 化合物53の合成

化合物52 (108 mg, 0.16 mmol) を16%  $\text{NH}_3/\text{MeOH}$  (6 mL) に溶解し攪拌した。16時間後、TLC ( $\text{CHCl}_3 : \text{CH}_3\text{OH} = 5 : 1$ , UV, アニスアルデヒド) で原料の消失を確認した。その後、溶媒を減圧留去した。化合物53 (70.1 mg, 0.16 mmol, 98%) を黄色油状で得た。

20

$^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) 169.66, 140.73, 135.62, 129.33, 128.70, 103.68, 78.19, 76.88, 71.79, 70.65, 62.62, 58.17, 54.96, 40.91, 30.59, 30.38, 27.80, 26.81, 22.07.

## 【化52】



30

## 【0118】

## 化合物55の合成

Ar置換下でoxazoline 54 (0.38 g, 1.14 mmol) を $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 mL) で溶解し、化合物28 (0.42 g, 1.53 mmol, 1.3 eq.) と(+)-10-camphorsulfonic acid (0.07 g, 0.31 mmol, 0.3 eq.) を加え、攪拌した。19時間後、TLC (EtOAc, UV, 5% 硫酸 in MeOH) で原料の消失を確認した。TEACHを加え、30分攪拌した。反応液を $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  で希釈後、飽和炭酸水素ナトリウム、水と分液した。有機層を蒸留水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧留去した。カラムクロマトグラフィー (Hexane : EtOAc = 1:2 1:3 1:5 0:10) で精製した。

40

化合物55 (0.45 g, 0.73 mmol, 64 %) を白色固体で得た。

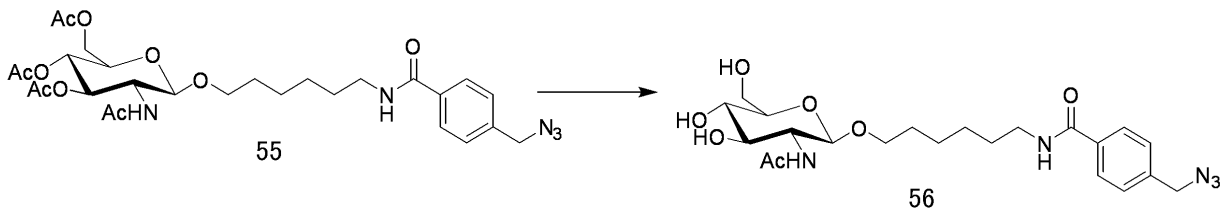
$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 7.84-7.82 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H), 7.36-7.34 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H), 6.99-6.96 (t,  $J = 5.7$  Hz, 1H), 6.70-6.68 (d,  $J = 9.2$  Hz, 1H), 5.28-5.23 (t,  $J = 9.9$  Hz, 1H), 5.00-4.96 (t,  $J = 8.2$  Hz, 1H), 4.36 (s, 2H), 4.21-4.17 (dd,  $J = 17.0, 9.6$  Hz, 1H), 4.07-4.04 (dd,  $J = 15.6, 6.9$  Hz, 1H), 3.86-3.78 (m, 1H), 3.60-3.56 (m, 1H), 3.49-3.30 (m, 3H), 2.01 (s, 3H), 1.98 (s, 3H), 1.97 (s, 3H), 1.88 (s, 3H), 1.58-1.49 (m, 4H), 1.37-1.31 (m, 4H).

$^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 170.79, 170.68, 169.51, 167.20, 138.84, 134.48, 128.23, 127.67, 100.67, 72.55, 71.62, 69.42, 68.89, 62.24, 60.43, 54.60, 54.21, 39.60

50

, 29.27, 28.92, 26.13, 25.21, 23.23, 20.78, 20.72, 20.67, 14.19.

【化53】



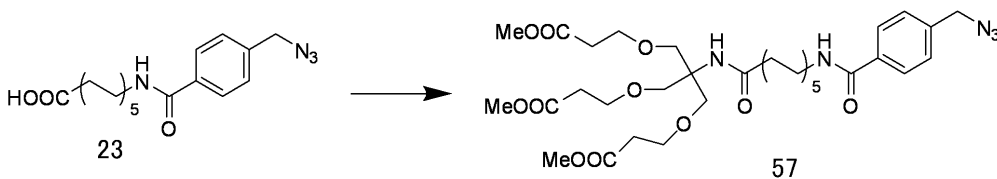
【0119】

10

化合物56の合成

化合物55 (345 mg, 0.57 mmol) を16%  $\text{NH}_3/\text{MeOH}$  (8 mL) に溶解し攪拌した。19時間後、TLC ( $\text{CHCl}_3 : \text{CH}_3\text{OH} = 5 : 1$ , UV, アニスアルデヒド) で原料の消失を確認した。その後、溶媒を減圧留去した。化合物56を定量的に白色固体で得た。

【化54】



20

【0120】

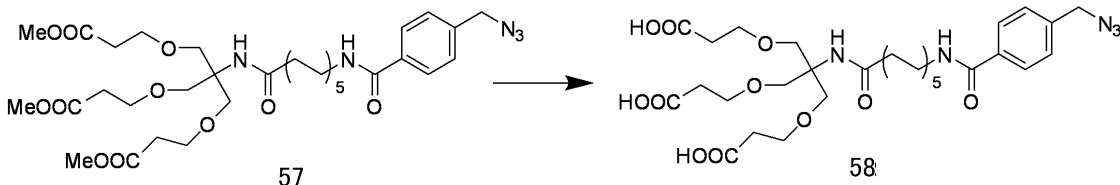
化合物57の合成

化合物23 (1.21 g, 3.61 mmol)、HOBt (0.59 g, 4.40 mmol, 1.2 eq.), DCC (1.21 g, 5.88 mmol, 1.6 eq.) を  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (18 ml) に溶解し、室温で攪拌した。10時間後、TLC (EtOAc, UV, アニスアルデヒド) で原料の消失を確認し、tris[(carboxyethoxy)ethyl]amino methane trimethyl ester<sup>3</sup> (1.35 g, 3.55 mmol, 1.0 eq.) と TEA (1 ml) を加えた。3日後、TLC ( $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} = 10 : 1$ , UV, ニンヒドリン) で原料の消失を確認した。反応液に水を加え反応を停止後、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  で希釈し、飽和重曹水で3回分液した。有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、減圧留去を行った。その後、フッラシユカラムクロマトグラフィー (ヘキサン : 酢酸エチル = 1 : 2) を行った。化合物57 (2.36 g, 3.26 mmol, 90%) を白色油状で得た。

30

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 7.79-7.77 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H), 7.40 - 7.37 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H), 6.16 (br, 1H), 5.90 (s, 1H), 4.40 (s, 2H), 3.70-3.67 (m, 20H), 3.47 - 3.42 (q,  $J = 6.7$  Hz, 2H), 2.56-2.53 (t,  $J = 6.2$  Hz, 6H), 2.15-2.11 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 1.63 - 1.57 (m, 7H), 1.37-1.24 (m, 20H).

【化55】



40

【0121】

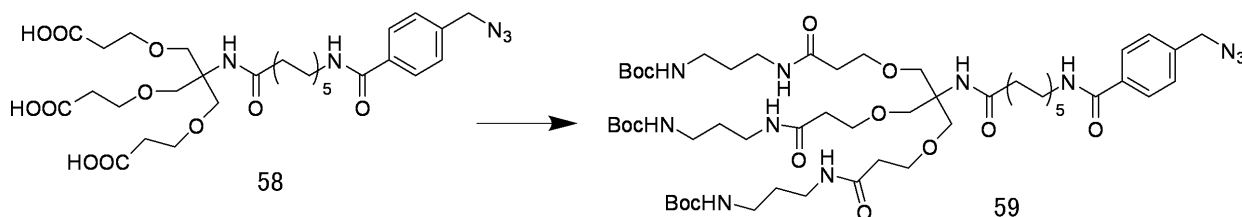
化合物58の合成

化合物57 (2.25 g, 3.12 mmol) を acetone (78 ml) に溶解し、氷冷下、0.4 M NaOH aq. (78ml) を加えた。反応液を室温に戻し、攪拌した。1日後、TLC ( $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} = 10 : 1$ , UV, アニスアルデヒド) で原料の消失を確認し、acetone を減圧留去した。水層を  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  で洗浄した後に、氷冷下 pH < 2 になるまで HCl を加えた。 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  で抽出し、目的化合物58 (1.85 g, 2.72 mmol, 87%) を白色油状で得た。

50

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) 12.21 (br, 1H), 8.53 - 8.50 (t,  $J = 5.9$  Hz, 1H), 7.92 - 7.90 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 7.51 - 7.49 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 6.98 (s, 1H), 4.58 (s, 2H), 3.39 - 3.23 (m, 16H), 2.60-2.56 (m, 24H), 2.11 - 2.07 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H), 1.57 - 1.47 (m, 4H), 1.33- 1.29 (m, 14H).

【化56】



10

【0122】

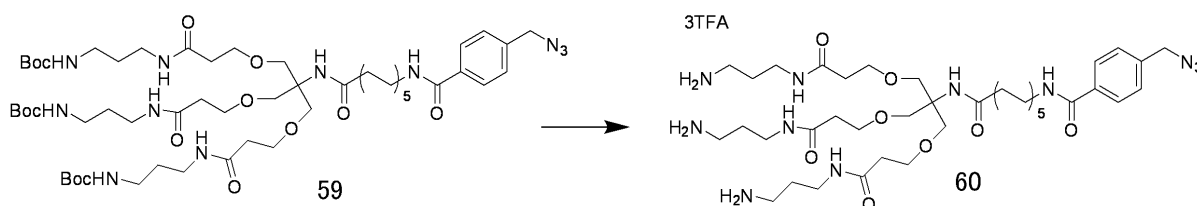
化合物59の合成

化合物58 (1.76 g, 2.59 mmol)、HOBt (1.41 g, 10.45 mmol, 4.0 eq.)、DCC (2.79 g, 3.53 mmol, 5.2 eq.)をDMF (13 ml) に溶解し、室温で撹拌した。10時間後、TLC ( $\text{CHCl}_3$ :MeOH = 5:1, UV, アニスアルデヒド) で原料の消失を確認し、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 ml) に溶解した(3-aminopropyl) carbamic acid tert-butyl ester<sup>3</sup> (1.80 g, 10.31 mmol, 4.0 eq.)を加えた。2日後、TLC ( $\text{CHCl}_3$ :MeOH = 10:1, UV, ニンヒドリン)で反応の進行を確認した。反応液に水を加え反応を停止後、析出物を除去した。EtOAcで希釈し、飽和重曹水で3回分液した。有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、減圧留去を行った。その後、フッラシカラムクロマトグラフィー( $\text{CHCl}_3$  :  $\text{CH}_3\text{OH} = 10:1$ )を行った。化合物59 (2.07 g, 1.80 mmol, 69%)を白色油状で得た。

20

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 7.83 - 7.81 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 7.39 - 7.37 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 6.98 (br, 3H), 6.68 (br, 1H), 6.37 (s, 1H), 5.38-5.35 (t,  $J = 6.1$  Hz, 3H), 4.40 (s, 2H), 3.46 - 3.41 (q,  $J = 6.7$  Hz, 2H), 3.32-3.27 (q,  $J = 6.2$  Hz, 6H), 3.17-3.12 (q,  $J = 5.9$  Hz, 6H), 2.44 - 2.41 (t,  $J = 5.7$  Hz, 6H), 2.19 - 2.16 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H), 1.64 - 1.57 (m, 12H), 1.43-1.35 (m, 35H), 1.27- 1.07 (m, 16H).

【化57】



30

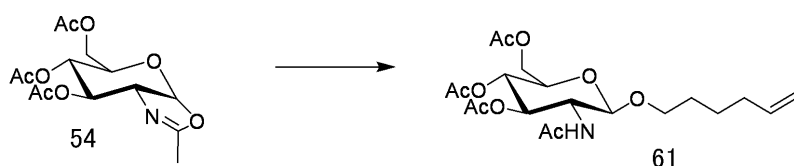
【0123】

化合物60の合成

化合物59 (1.99 g, 1.73 mmol)を $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 ml) に溶解し、TFA (2 ml)を加え室温で撹拌した。4時間後、TLC ( $\text{CHCl}_3$ :MeOH = 5:1, UV, アニスアルデヒド) で原料の消失を確認した。溶媒を減圧留去し、目的化合物60を白色油状で定量的に得た。

【化58】

40



【0124】

化合物61の合成

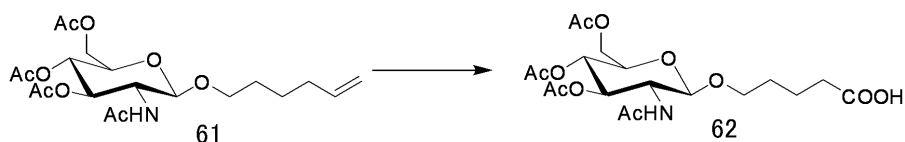
Ar置換下でoxazoline 54 (0.96 g, 2.91 mmol) を $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (7 mL)で溶解し、5-ヘキセン-1-オール (0.4 mL, 3.39 mmol, 1.2 eq.)とモレキュラーシーブ4 (1.04 g)を加え撹

50

拌した。30分後、トリフルオロメタンスルホン酸トリメチルシリル (0.3 mL, 1.64 mmol, 0.6 eq.) を滴下し、攪拌した。15時間後、TLC (EtOAc, 5 %硫酸 in MeOH) で原料の消失を確認した。CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>で吸引濾過をし、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>で希釈後、飽和炭酸水素ナトリウムで分液した。有機層を蒸留水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧留去した。カラムクロマトグラフィー (Hexane : EtOAc = 1:1 1:2) で精製し、化合物61 (0.98 g, 79 %) を白色粉末で得た。

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 5.81-5.74 (m, 1H), 5.45-5.43 (d, 1H, J = 8.0 Hz), 5.33-5.28 (t, 1H, J = 10.0 Hz), 5.09-4.93 (m, 3H), 4.69-4.67 (d, 1H, J = 8.0 Hz), 4.28-4.21 (m, 1H), 4.14-4.11 (m, 1H), 3.99-3.77 (m, 2H), 3.71-3.67 (m, 1H), 3.48-3.46 (m, 1H), 2.08-1.90 (m, 14H), 1.64-1.52 (m, 2H), 1.47-1.35 (m, 2H).

【化59】



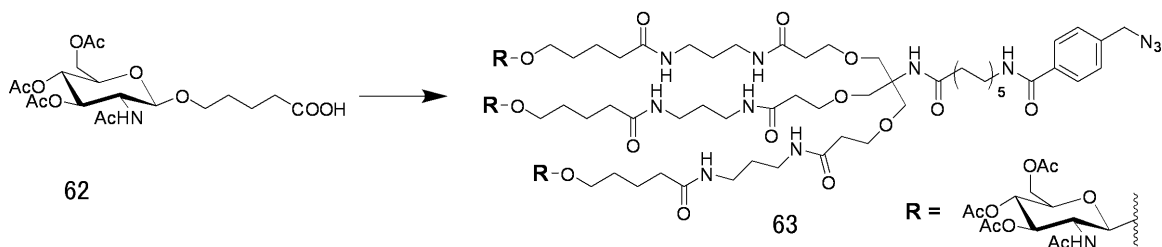
【0125】

化合物62の合成

化合物61 (2.58 g, 6.00 mmol) をMeCN : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> = 1:1 (15 mL) で溶解し、10 でNaIO<sub>4</sub>/H<sub>2</sub>O (5.13 g, 24.0 mmol, 4.0 eq.)/(12 mL) を加え、攪拌した。15分後、RuCl<sub>3</sub> (55.5 mg, 0.12 mmol, 0.02 eq.) を加えた。1時間後、NaIO<sub>4</sub> (1.30 g, 6.00 mmol, 1.0 eq.) を加えた。1時間半後、TLC (CHCl<sub>3</sub> : CH<sub>3</sub>OH = 5 : 1, 5%硫酸 in MeOH) で原料の消失を確認した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、pH > 7.0にした。その後、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>で希釈し、抽出した。水層を5%クエン酸でpH < 7.0にした。その後、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>で希釈し、抽出した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去し、化合物62 (1.73 g, 65%) を白色結晶で得た。

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 5.80-5.78 (d, 1H, J = 8.8 Hz), 5.29-5.25 (t, 1H, J = 7.6 Hz), 5.08-5.04 (t, 1H, J = 9.6 Hz), 4.239-4.228 (m, 1H), 4.14-4.10 (m, 1H), 3.91-3.83 (m, 2H), 3.70-3.66 (m, 1H), 3.52-3.47 (m, 1H), 2.42-2.32 (m, 2H), 2.08-1.71 (t, 12H, J = 14.0 Hz), 1.71-1.62 (m, 4H).

【化60】



【0126】

化合物63の合成

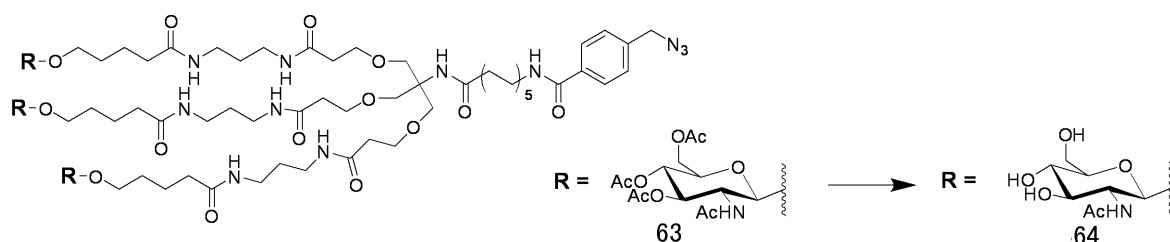
化合物62 (0.86 g, 1.93 mmol)、HOBt (0.34 g, 2.51 mmol, 1.3 eq.)、DCC (0.64 g, 3.11 mmol, 1.6 eq.) をCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 ml) に溶解し、室温で攪拌した。17時間後、TLC (CHCl<sub>3</sub> : CH<sub>3</sub>OH = 10: 1, UV, アニスアルデヒド) で原料の消失を確認し、pyridine (10 ml) に溶解した化合物60 (0.93 g, 0.78 mmol, 0.4 eq.) とTEA (1 ml) を加えた。3日後、TLC (CHCl<sub>3</sub>:MeOH = 5 : 1, UV, ニンヒドリン) で中間体の消失を確認した。反応液に水を加え反応を停止後、析出物を除去した。CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>で希釈し、飽和重曹水で3回分液した。有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、減圧留去を行った。その後、フッラシユカラムクロマトグラフィー (CHCl<sub>3</sub> : CH<sub>3</sub>OH = 5 : 1) を行った。化合物63 (1.14 g

, 0.53 mmol, 83%)を白色泡状で得た。

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\text{H} = 7.86 - 7.84$  (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H),  $7.41 - 7.38$  (d,  $J = 11.5$  Hz, 2H),  $7.32-7.29$  (t,  $J = 6.6$  Hz, 3H),  $7.10-7.06$  (t,  $J = 8.0$  Hz, 3H),  $6.98-6.91$  (m, 4H),  $6.61$  (s, 1H),  $5.31$  (s, 1H)  $5.29-5.24$  (t,  $J = 9.9$  Hz, 3H),  $5.08-5.03$  (t,  $J = 9.6$  Hz, 3H),  $4.66-4.64$  (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H),  $4.41$  (s, 2H),  $4.30 - 4.25$  (dd,  $J = 17.0, 5.0$  Hz, 3H),  $4.14-4.10$  (d,  $J = 14.7$  Hz, 3H),  $3.95-3.88$  (m, 5H),  $3.72-3.68$  (m, 15H),  $3.53 - 3.42$  (m, 4H),  $3.27 - 3.21$  (m, 12H),  $2.48-2.43$  (t,  $J = 8.8$  Hz, 6H),  $2.26-2.15$  (m, 8H),  $2.09$  (s, 9H),  $2.02$  (s, 18H),  $1.94$  (s, 9H),  $1.76-1.58$  (m, 22H),  $1.35 - 1.27$  (m, 12H).

$^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $173.98, 173.61, 171.94, 170.88, 170.67, 170.49, 169.43, 167.16, 138.66, 134.60, 128.11, 127.58, 100.59, 72.59, 71.54, 69.59, 69.41, 68.83, 67.40, 62.16, 59.50, 54.33, 54.11, 53.48, 40.14, 37.04, 36.66, 36.02, 35.89, 29.52, 29.45, 29.26, 29.15, 29.03, 28.27, 26.88, 25.70, 23.10, 22.53, 20.72, 20.64, 20.59.$

### 【化 6 1】



### 【 0 1 2 7 】

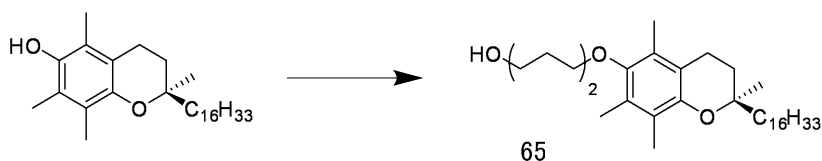
#### 化合物64の合成

化合物63 (0.21 g, 0.10 mmol)をdry MeOH 2 mLに溶解し、Sodium Methoxide (6.4 mg, 0.12 mmol)を加え撹拌した。翌日、TLC( $\text{CHCl}_3:\text{MeOH} = 5:1$ , UV, 5%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  in EtOH)にて反応終了を確認後、DOWEX 50WX8-100 ion-exchange resinを加えて反応液を中和した。綿栓ろ過し減圧濃縮した。化合物64 (0.17 g, 0.10 mmol, 96%)を白色泡状で得た。

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\text{H} = 8.47 - 8.44$  (t,  $J = 5.7$  Hz, 1H),  $7.85 - 7.83$  (m, 5H),  $7.75-7.72$  (t,  $J = 5.5$  Hz, 3H),  $7.68-7.66$  (d,  $J = 9.2$  Hz, 3H)  $7.44- 7.43$  (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H),  $7.26$  (br, 1H),  $6.99$  (s, 1H),  $4.96-4.95$  (d,  $J = 4.1$  Hz, 3H),  $4.89-4.88$  (d,  $J = 5.0$  Hz, 3H),  $4.54-4.50$  (m, 5H),  $4.24-4.22$  (d,  $J = 8.4$  Hz, 3H),  $4.10-4.08$  (m, 1H),  $3.72 - 3.64$  (m, 6H),  $3.54-3.51$  (m, 12H),  $3.45 - 3.15$  (m, 30H),  $3.07 - 3.00$  (m, 19H),  $2.28-2.25$  (t,  $J = 6.8$  Hz, 6H),  $2.05-2.01$  (t,  $J = 7.1$  Hz, 8H),  $1.78$  (s, 9H),  $1.51-1.40$  (m, 24H),  $1.26 - 1.22$  (m, 12H).

$^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $176.41, 176.09, 173.98, 173.71, 129.37, 128.74, 102.65, 77.98, 76.11, 72.11, 70.10, 68.66, 62.80, 57.35, 54.97, 41.08, 37.90, 37.82, 37.65, 36.73, 30.66, 30.47, 30.37, 30.27, 29.97, 28.11, 27.08, 23.76, 23.11, 22.06.$

### 【化 6 2】



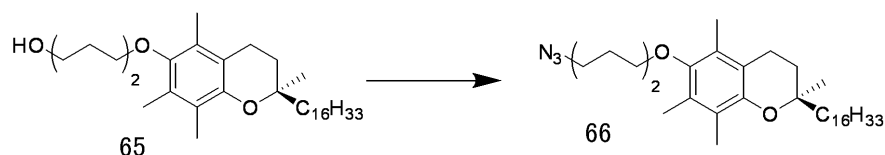
### 【 0 1 2 8 】

#### 化合物65の合成

トコフェロール(864 mL, 2.01 mmol)をアセトン(20 mL)で溶解させた。そこに6-ブromo-1-ヘキサノール(816  $\mu\text{L}$  6.03 mmol)と炭酸カリウム(829 mg, 6.03 mmol)を加え、76

°Cでrefluxした。48時間後、TLCにて反応の終結を確認した後、アセトンを減圧留去した。得られた残渣を、蒸留水と酢酸エチルで抽出を行い、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで有機層を乾燥させた。その後、エバポレーターにて減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Hexane : EtOAc = 8:1)にて精製した。化合物65 (855 mg, 1.61 mmol, 80%)を黄色オイルで得た。

【化63】



10

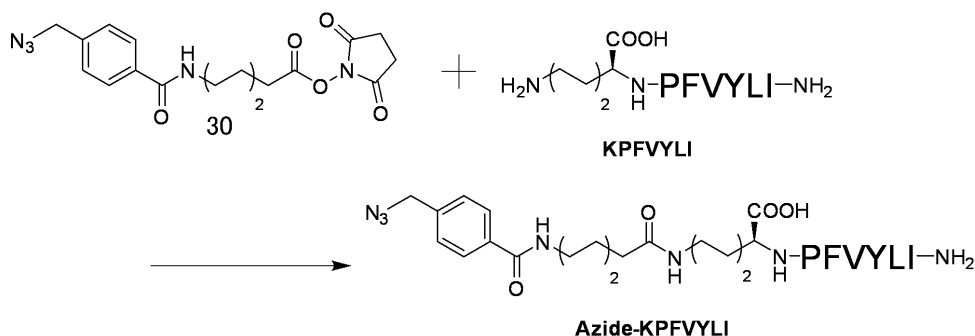
【0129】

化合物66の合成

化合物65 (367 mg, 0.69 mmol)をアルゴン雰囲気下、DMF(7 mL)で溶解させた。そこにトリフェニルホスフィン(239 mg, 0.91 mmol)、アジ化ナトリウム(228 mg, 3.51 mmol)、四臭化炭素 (348 mg, 1.05 mmol)を加え、よく撹拌した。48時間後、TLCにて反応の終結を確認した後、蒸留水と酢酸エチルで抽出を行い、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで有機層を乾燥させた。その後、エバポレーターにて減圧留去し、得られた残渣を中性シリカゲルカラムクロマトグラフィー(Hexane : EtOAc = 200:1 100:1 50:1 20:1)にて精製した。化合物66<sup>[4]</sup> (257mg, 0.46 mmol, 67%)を白色粉末で得た。

20

【化64】



30

【0130】

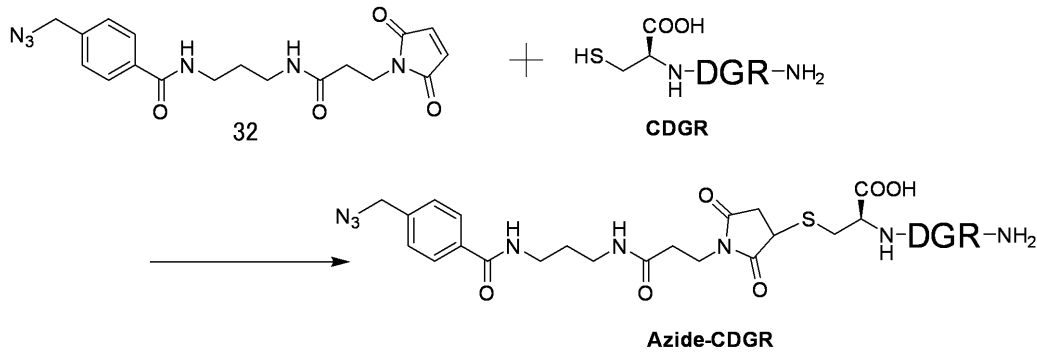
Azide-KPFVYLIの合成

バイアル瓶にペプチドKPFVYLI (2.1 mg, 3 μmol)を入れ、HEPES buffer (250 μL, pH 8.5)に溶解させた。DMSO (25 μL)に溶解させた化合物30 (1.3 mg, 3 μmol)を加え、室温下撹拌を行った。析出した化合物30が溶解するまでMeCN (約100 μL)を加え、引き続き室温下で4時間撹拌を行った。TLC (展開溶媒CHCl<sub>3</sub>:MeOH = 1 : 1, 1% NH<sub>4</sub>OH, 検出UV及びニンヒドリン)にて反応の完結を確認後、溶媒を減圧溜去した。得られた残渣をMeCN/H<sub>2</sub>O = 1:1混液(10 mL)にて洗浄した。遠心分離 (4300 rpm × 15 min, 4 )によって得られた沈殿より、azide-KPFVYLIを白色粉末として定量的に得た。

40

MALDI-TOF/MS calcd for C<sub>60</sub>H<sub>86</sub>N<sub>12</sub>O<sub>11</sub> [M+H]<sup>+</sup> 1151.7, found 1151.9.

## 【化65】



10

## 【0131】

## Azide-CDGRの合成

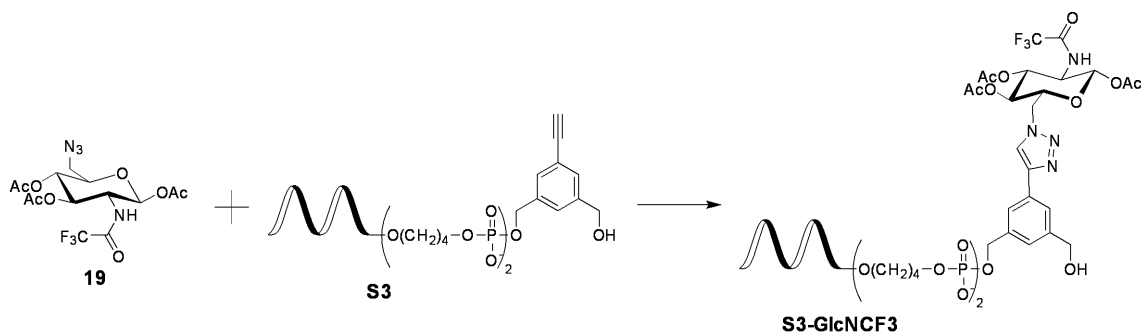
ペプチドCDGR (13 mg, 30  $\mu\text{mol}$ )、化合物32 (17 mg, 45  $\mu\text{mol}$ ) を5 mLナスフラスコに入れ、MeCN (1 mL) 及び $\text{H}_2\text{O}$  (0.5 mL) にて溶解させた。TEA (6  $\mu\text{L}$ ) 及びTCEP $\cdot\text{HCl}$  (0.4 mg) を加えて8時間撹拌を行った。次に、HPLCにて精製を行った。

分取した溶液の溶媒を減圧溜去した。得られた残渣にMeCNを加えた後、超音波処理を行い、結晶を析出させた。遠心分離(4300 rpm  $\times$  15 min, 4 ) によって得られた沈殿物より、azide-CDGR (3 mg, 4  $\mu\text{mol}$ , 12%) を白色粉末として得た。

MALDI-TOF/MS calcd for  $\text{C}_{33}\text{H}_{47}\text{N}_{13}\text{O}_{11}\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  834.3, found 834.2

20

## 【化66】



30

## 【0132】

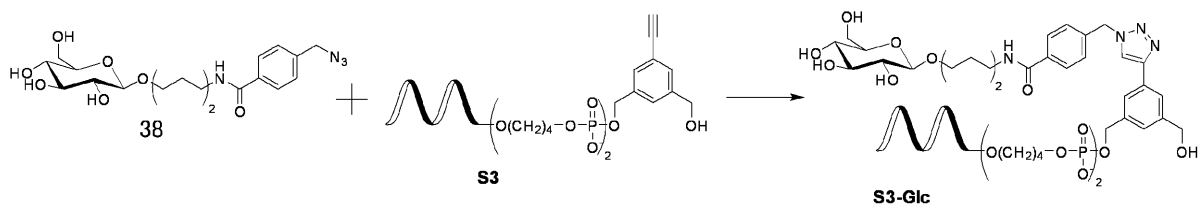
## 化合物19とRNAとのクリック反応

エッペンドルフチューブに、S3 (0.5 mM solution in  $\text{H}_2\text{O}$ , 1  $\mu\text{L}$ , 0.5 nmol), 化合物19 (5 mM solution in DMSO, 3  $\mu\text{L}$ , 15 nmol) を滅菌した1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) (1  $\mu\text{L}$ )、滅菌水 (3  $\mu\text{L}$ ) 加え、1分ほどボルテックスした。その後、アスコルビン酸ナトリウム (25 mM solution in  $\text{H}_2\text{O}$ , 1  $\mu\text{L}$ , 25 nmol)、硫酸銅5水和物 (25 mM solution in  $\text{H}_2\text{O}$ , 1  $\mu\text{L}$ , 25 nmol) を順次加え、1分ほどボルテックスし、37、15分間静置した。HPLCにて精製を行い、目的物(S3-GlcNCF3)を得た。

MALDI-TOF/MS calcd for 6846.0, found 6843.5.

40

## 【化67】



## 【0133】

## 化合物38とRNAとのクリック反応

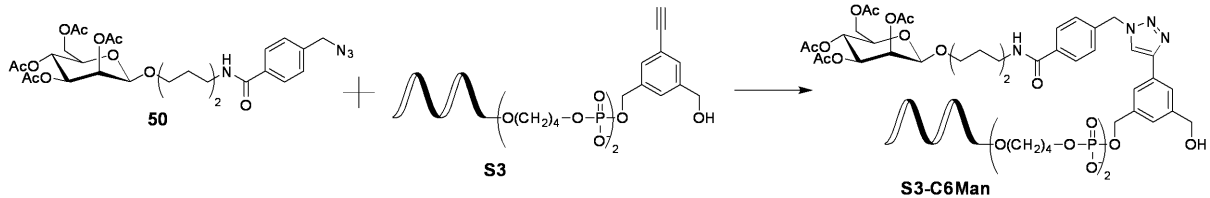
50



エッペンドルフチューブに、S3 (0.5 mM solution in H<sub>2</sub>O, 1 μL, 0.5 nmol), 化合物 38 (5 mM solution in DMSO, 3 μL, 15 nmol)を滅菌した1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) (1 μL)、滅菌水 (3 μL) 加え、1分ほどボルテックスした。その後、アスコルビン酸ナトリウム (25 mM solution in H<sub>2</sub>O, 1 μL, 25 nmol)、硫酸銅5水和物 (25 mM solution in H<sub>2</sub>O, 1 μL, 25 nmol) を順次加え、1分ほどボルテックスし、37 °C、15分間静置した。HPLCにて精製を行い、目的物(S3-Glc)を得た。

MALDI-TOF/MS calcd for 6858.1, found 6857.9.

【化68】



10

【0134】

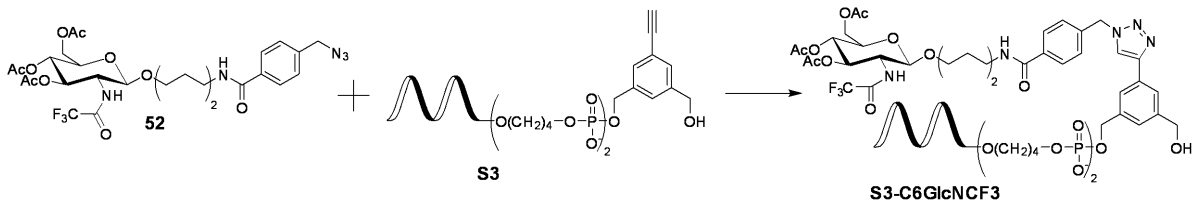
化合物50とRNAとのクリック反応

エッペンドルフチューブに、S3 (0.5 mM solution in H<sub>2</sub>O, 1 μL, 0.5 nmol), 化合物 50 (5 mM solution in DMSO, 3 μL, 15 nmol)を滅菌した1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) (1 μL)、滅菌水 (3 μL) 加え、1分ほどボルテックスした。その後、アスコルビン酸ナトリウム (25 mM solution in H<sub>2</sub>O, 1 μL, 25 nmol)、硫酸銅5水和物 (25 mM solution in H<sub>2</sub>O, 1 μL, 25 nmol) を順次加え、1分ほどボルテックスし、37 °C、15分間静置した。HPLCにて精製を行い、目的物(S3-G6Man)を得た。

20

MALDI-TOF/MS calcd for 7026.1, found 7027.5.

【化69】



30

【0135】

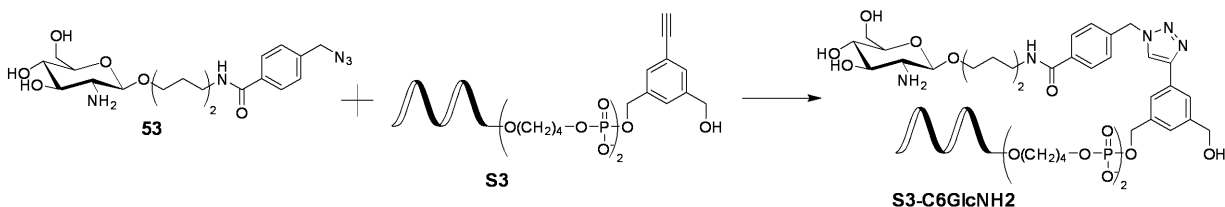
化合物52とRNAとのクリック反応

エッペンドルフチューブに、S3 (0.5 mM solution in H<sub>2</sub>O, 1 μL, 0.5 nmol), 化合物 52 (5 mM solution in DMSO, 3 μL, 15 nmol)を滅菌した1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) (1 μL)、滅菌水 (3 μL) 加え、1分ほどボルテックスした。その後、アスコルビン酸ナトリウム (25 mM solution in H<sub>2</sub>O, 1 μL, 25 nmol)、硫酸銅5水和物 (25 mM solution in H<sub>2</sub>O, 1 μL, 25 nmol) を順次加え、1分ほどボルテックスし、37 °C、15分間静置した。HPLCにて精製を行い、目的物(S3-G6GlcCF3)を得た。

40

MALDI-TOF/MS calcd for 7079.1, found 7075.2.

【化70】



【0136】

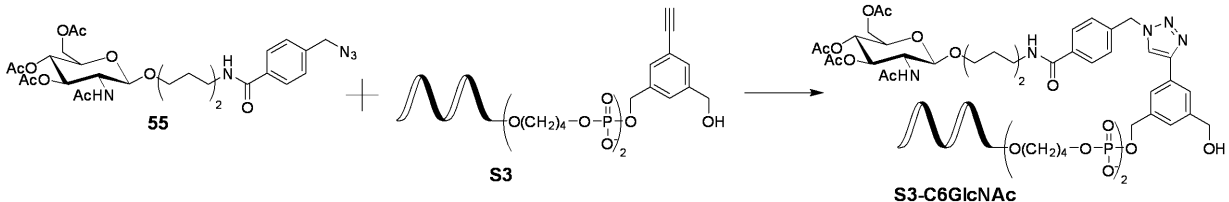
50

## 化合物53とRNAとのクリック反応

エッペンドルフチューブに、S3 (0.5 mM solution in H<sub>2</sub>O, 1 μL, 0.5 nmol), 化合物53 (5 mM solution in DMSO, 3 μL, 15 nmol)を滅菌した1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) (1 μL)、滅菌水 (3 μL) 加え、1分ほどボルテックスした。その後、アスコルビン酸ナトリウム (25 mM solution in H<sub>2</sub>O, 1 μL, 25 nmol)、硫酸銅5水和物 (25 mM solution in H<sub>2</sub>O, 1 μL, 25 nmol) を順次加え、1分ほどボルテックスし、37 °C、15分間静置した。HPLCにて精製を行い、目的物(S3-G6GlcNH<sub>2</sub>)を得た。

MALDI-TOF/MS calcd for 6857.1, found 6861.5.

## 【化71】



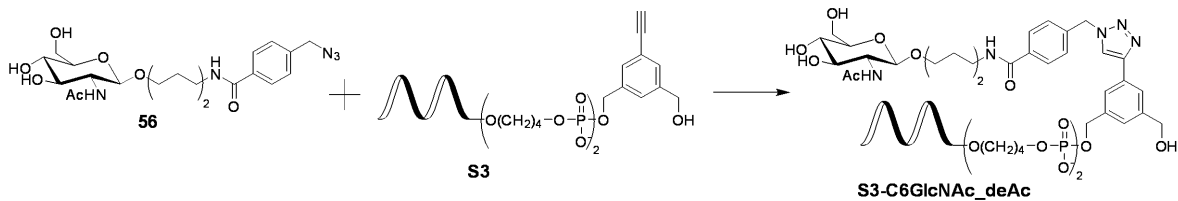
## 【0137】

## 化合物55とRNAとのクリック反応

エッペンドルフチューブに、S3 (0.5 mM solution in H<sub>2</sub>O, 1 μL, 0.5 nmol), 化合物55 (5 mM solution in DMSO, 3 μL, 15 nmol)を滅菌した1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) (1 μL)、滅菌水 (3 μL) 加え、1分ほどボルテックスした。その後、アスコルビン酸ナトリウム (25 mM solution in H<sub>2</sub>O, 1 μL, 25 nmol)、硫酸銅5水和物 (25 mM solution in H<sub>2</sub>O, 1 μL, 25 nmol) を順次加え、1分ほどボルテックスし、37 °C、15分間静置した。HPLCにて精製を行い、目的物(S3-G6GlcNAc)を得た。

MALDI-TOF/MS calcd for 7025.1, found 7031.0.

## 【化72】



## 【0138】

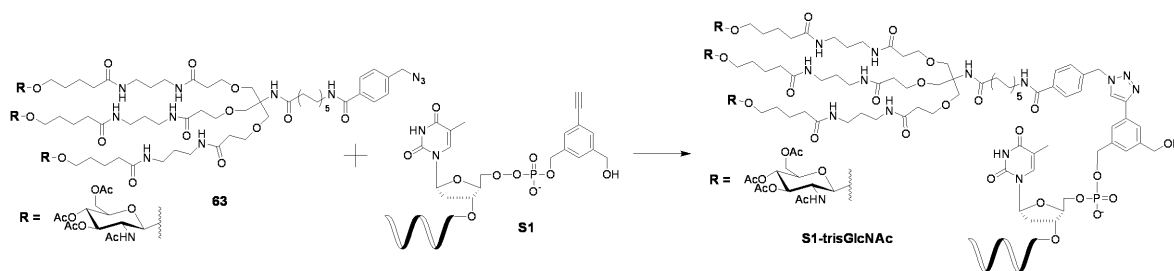
## 化合物56とRNAとのクリック反応

エッペンドルフチューブに、S3 (0.5 mM solution in H<sub>2</sub>O, 1 μL, 0.5 nmol), 化合物56 (5 mM solution in DMSO, 3 μL, 15 nmol)を滅菌した1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) (1 μL)、滅菌水 (3 μL) 加え、1分ほどボルテックスした。その後、アスコルビン酸ナトリウム (25 mM solution in H<sub>2</sub>O, 1 μL, 25 nmol)、硫酸銅5水和物 (25 mM solution in H<sub>2</sub>O, 1 μL, 25 nmol) を順次加え、1分ほどボルテックスし、37 °C、15分間静置した。HPLCにて精製を行い、目的物(S3-G6GlcNAc\_deAc)を得た。

MALDI-TOF/MS calcd for 6899.1, found 6901.1.

40

## 【化73】



## 【0139】

10

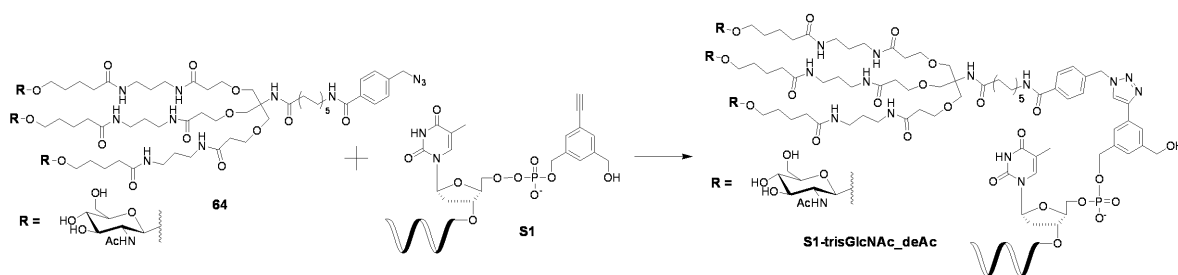
## 化合物63とRNAとのクリック反応

エペンドルフチューブに、S1 (0.5 mM solution in H<sub>2</sub>O, 1 μL, 0.5 nmol), 化合物63 (5 mM solution in DMSO, 3 μL, 15 nmol)を滅菌した1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) (1 μL)、滅菌水 (3 μL) 加え、1分ほどボルテックスした。その後、アスコルビン酸ナトリウム (25 mM solution in H<sub>2</sub>O, 1 μL, 25 nmol)、硫酸銅5水和物 (25 mM solution in H<sub>2</sub>O, 1 μL, 25 nmol) を順次加え、1分ほどボルテックスし、37 °C、15分間静置した。HPLCにて精製を行い、目的物(S1-trisGlcNAc)を得た。

MALDI-TOF/MS calcd for 8554.9, found 8551.4.

## 【化74】

20



## 【0140】

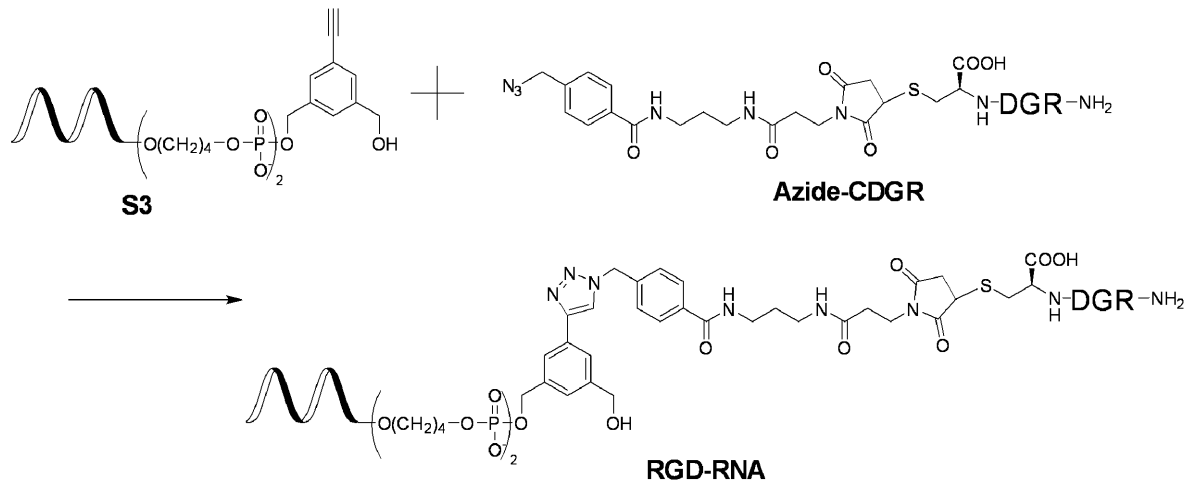
30

## 化合物64とRNAとのクリック反応

エペンドルフチューブに、S1 (0.5 mM solution in H<sub>2</sub>O, 1 μL, 0.5 nmol), 化合物64 (5 mM solution in DMSO, 3 μL, 15 nmol)を滅菌した1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) (1 μL)、滅菌水 (3 μL) 加え、1分ほどボルテックスした。その後、アスコルビン酸ナトリウム (25 mM solution in H<sub>2</sub>O, 1 μL, 25 nmol)、硫酸銅5水和物 (25 mM solution in H<sub>2</sub>O, 1 μL, 25 nmol) を順次加え、1分ほどボルテックスし、37 °C、15分間静置した。HPLCにて精製を行い、目的物(S1-trisGlcNAc\_deAc)を得た。

MALDI-TOF/MS calcd for 8176.8, found 8173.4.

## 【化 7 5】



10

## 【 0 1 4 1】

Azide-RGDとRNAとのクリック反応

エッペンドルフチューブに、S3 (0.5 mM solution in  $\text{H}_2\text{O}$ , 2  $\mu\text{L}$ , 1 nmol), Azide-CR GD (15 mM solution in DMSO, 1  $\mu\text{L}$ , 15 nmol), アセトニトリル (1.0  $\mu\text{L}$ ) を滅菌した 1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) (1.0  $\mu\text{L}$ )、滅菌水 (3  $\mu\text{L}$ ) 加え、1分ほどボルテックスした。その後、アスコルビン酸ナトリウム (50 mM solution in  $\text{H}_2\text{O}$ , 1  $\mu\text{L}$ , 50 nmol)、硫酸銅5水和物 (50 mM solution in  $\text{H}_2\text{O}$ , 1  $\mu\text{L}$ , 50 nmol) を順次加え、1分ほどボルテックスし、室温下15分間静置した。反応液をAmicon Ultra (3K) を用いて遠心濾過 (15000  $\times$  g, 15 min, 4 ) し、目的のRGD-RNAを得た。

20

MALDI-TOF/MS calcd for 7277.2, found 7277.5.

## 【 0 1 4 2】

修飾RNA二本鎖の細胞への取り込み

糖もしくはRGDペプチド修飾RNAと5'末端フルオレセイン修飾RNAをPBSバッファ中でアニーリングを行い、二本鎖を形成させた。

修飾RNA二本鎖を終濃度400 nMになるようにOPTI-MEMに溶解し、HeLa細胞に添加した。ポジティブコントロールとして未修飾フルオレセインラベルRNA二本鎖(終濃度100 nM)をTransFast (Promega)を用いて導入したものを合わせて準備した。ネガティブコントロールとして未修飾フルオレセインラベルRNA二本鎖を終濃度400 nMになるようにOPTI-MEMに溶解し、HeLa細胞に添加したものを合わせて準備した。4時間後、共焦点顕微鏡 (LSM 710, Carl Zeiss) を用いてHeLa細胞内への修飾RNA二本鎖の取り込みを観察した。

30

## 【 0 1 4 3】

結果を図5に示す。

ポジティブコントロールであるリポフェクション試薬を用いたフルオレセインラベルRNA二本鎖 (X=dTdT) では細胞内にフルオレセインの緑色の蛍光が観察された。それに対し、ネガティブコントロールであるリポフェクション試薬を用いないフルオレセインラベルRNA二本鎖 (X=dTdT) では細胞外にのみ緑色の蛍光が観察された。一方、糖もしくはペプチド修飾したRNA二本鎖を用いた場合には、ポジティブコントロールと同様に細胞内にも緑色の蛍光が観察された。このことから、糖もしくはペプチド修飾したRNA二本鎖はリポフェクション試薬なしでも細胞内に取り込まれることが分かった。

40

## 【 0 1 4 4】

参考文献

- [1] a) J. Morel, *Helv. Chim. Acta*, 1958, 41, 1501-1504; b) S. Ogawa, H. Fujimori, T. Suami, *Bull. Soc. Chim. Jpn.*, 1976, 49, 2585-2586.  
 [2] H. Y. Song, M. H. Ngai, Z. Y. Song, P. A. MacAry, J. Hobley and M. J. Lear, *Org. Biomol. Chem.*, 2009, 7, 3400-3406.

50

[3] T. Machida, K. Lang, L. Xue, J. W. Chin and N. Winssinger, Bioconjugate Chem. 2015, 26, 802-806.

[4] L.-A. Jouanno, A. Chevalier, N. Sekkat, N. Perzo, H. Castel, A. Romieu, N. Lange, C. Sabot and P.-Y. Renard, J. Org. Chem., 2014, 79, 10353-10366.

【 0 1 4 5 】

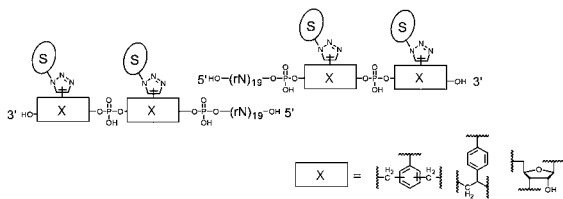
この発明は上記発明の実施の態様及び実施例の説明に何ら限定されるものではない。特許請求の範囲を逸脱せず、当業者が容易に想到できる範囲で種々の変形態様もこの発明に含まれる。

【 産業上の利用可能性 】

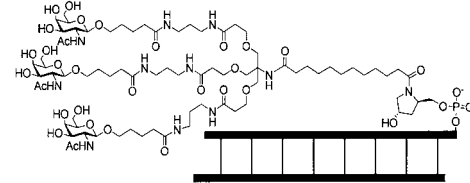
【 0 1 4 6 】

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

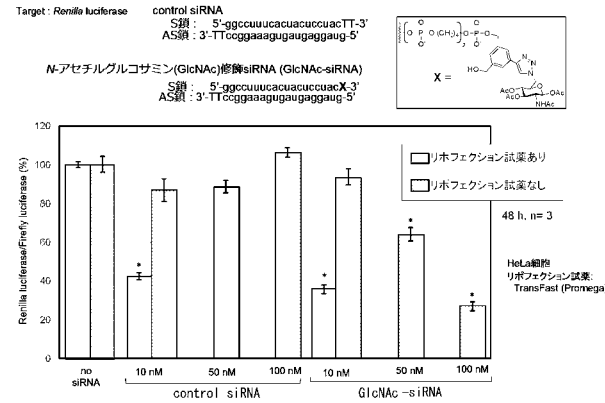
【 図 1 】



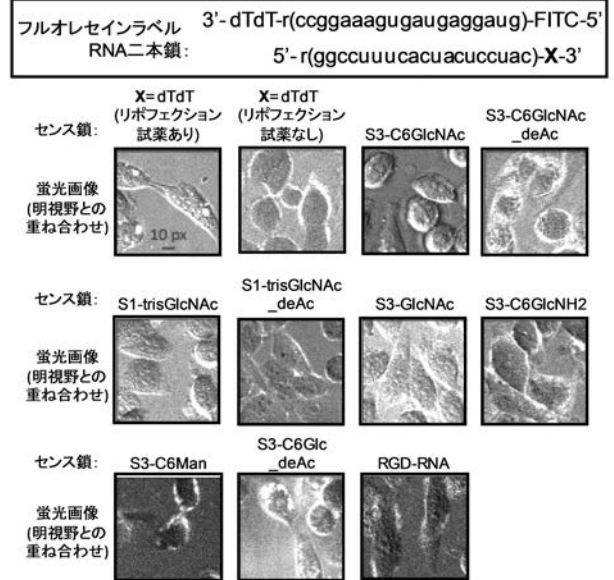
【 図 4 】



【 図 2 】



【 図 5 】



【 図 3 】



## 【配列表】

201615298000001.app

## 【手続補正書】

【提出日】平成28年7月14日(2016.7.14)

## 【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】全文

【補正方法】変更

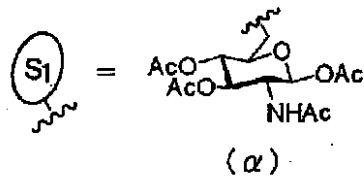
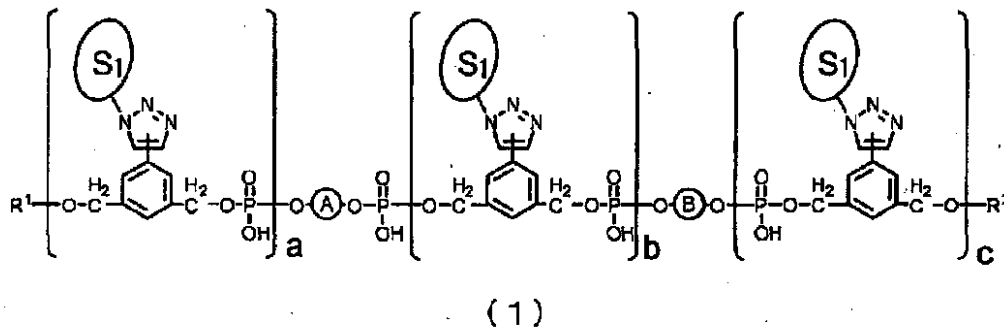
【補正の内容】

【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

次式(1)で表されるオリゴヌクレオチド誘導体(式中、 $R^1$ 及び $R^2$ は、それぞれ独立して水素又はリン酸基を表し、 $a$ 、 $b$ 及び $c$ は独立して0以上の整数であって少なくとも1つが1以上であり、 $A$ 及び $B$ は独立して変更されてもよいオリゴヌクレオチドであって $A$ と $B$ とを合わせた鎖長が3以上のオリゴヌクレオチドを表す。ただし、 $A$ 及び $B$ においてオリゴヌクレオチドの3'末端と5'末端の水酸基を含まない。また、式中 $S_1$ は下記( )で示される置換基である)。

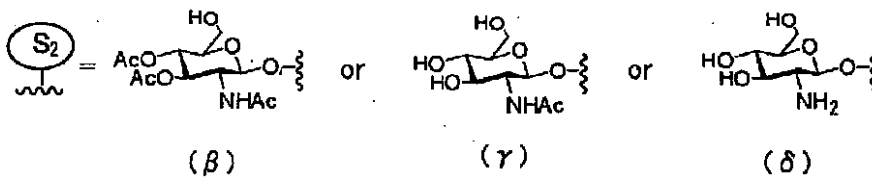
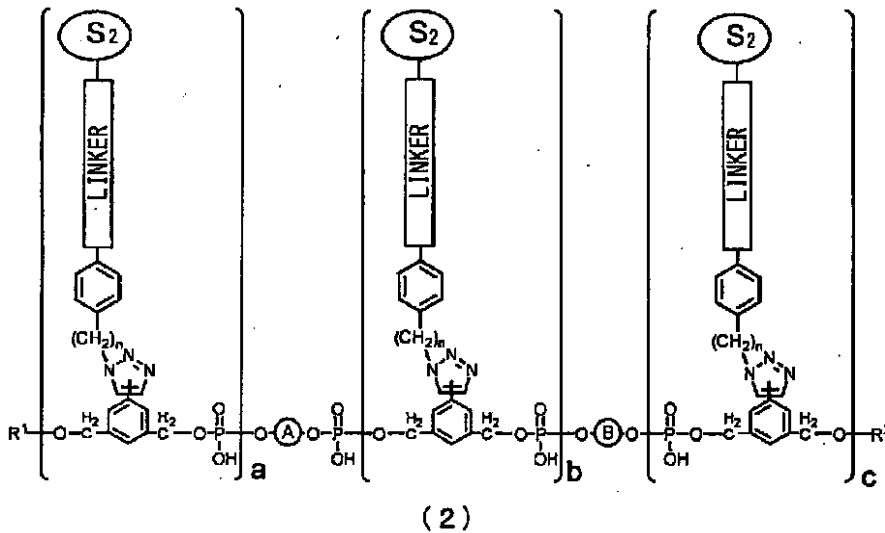
## 【化1】



## 【請求項2】

次式(2)で表されるオリゴヌクレオチド誘導体(式中、 $R^1$ 及び $R^2$ は、それぞれ独立して水素又はリン酸基を表し、 $a$ 、 $b$ 及び $c$ は独立して0以上の整数であって少なくとも1つが1以上であり、 $A$ 及び $B$ は独立して変更されてもよいオリゴヌクレオチドであって $A$ と $B$ とを合わせた鎖長が3以上のオリゴヌクレオチドを表す。ただし、 $A$ 及び $B$ においてオリゴヌクレオチドの3'末端と5'末端の水酸基を含まない。また、四角で囲ったLINKERの文字はリンカーを示し、 $S_2$ は該リンカーの末端に結合する下記( )、( )、( )、又は( )で示される置換基(複数個の $S_2$ が該リンカーに結合していてもよい)であり、 $n$ は0-4の自然数を示す)。

## 【化 2】



or 末端にRGDのアミノ酸配列を有するペプチド鎖

(ε)

【請求項 3】

(削除)

【請求項 4】

(削除)

【請求項 5】

R<sup>1</sup> 及び R<sup>2</sup> は Hであることを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

【請求項 6】

b は 0 であることを特徴とする請求項 1、2 及び 5 のいずれか 1 項に記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

【請求項 7】

a 及び b はともに 0 であることを特徴とする請求項 1、2、5 及び 6 のいずれか 1 項に記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

【請求項 8】

c は 1 以上 5 以下であることを特徴とする請求項 1、2、5、6 及び 7 のいずれか 1 項に記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

【請求項 9】

A 及び B は、所定の遺伝子 mRNA の部分配列又はその相補配列を有する請求項 1、2、5、6、7 及び 8 のいずれか 1 項に記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

【請求項 10】

A 及び B を合わせた鎖長は、10 以上 35 以下である請求項 1、2、5、6、7、8 及び 9 のいずれか 1 項に記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

【請求項 11】

A 及び B はオリゴリボヌクレオチドであることを特徴とする請求項 1、2、5、6、7

、 8、 9 及び 10 のいずれか 1 項に記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

【請求項 1 2】

遺伝子発現調節用オリゴヌクレオチド構築物であって、請求項 1、 2、 5、 6、 7、 8、 9、 10 及び 11 のいずれか 1 項に記載のオリゴヌクレオチド誘導体を有する構築物。

【請求項 1 3】

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

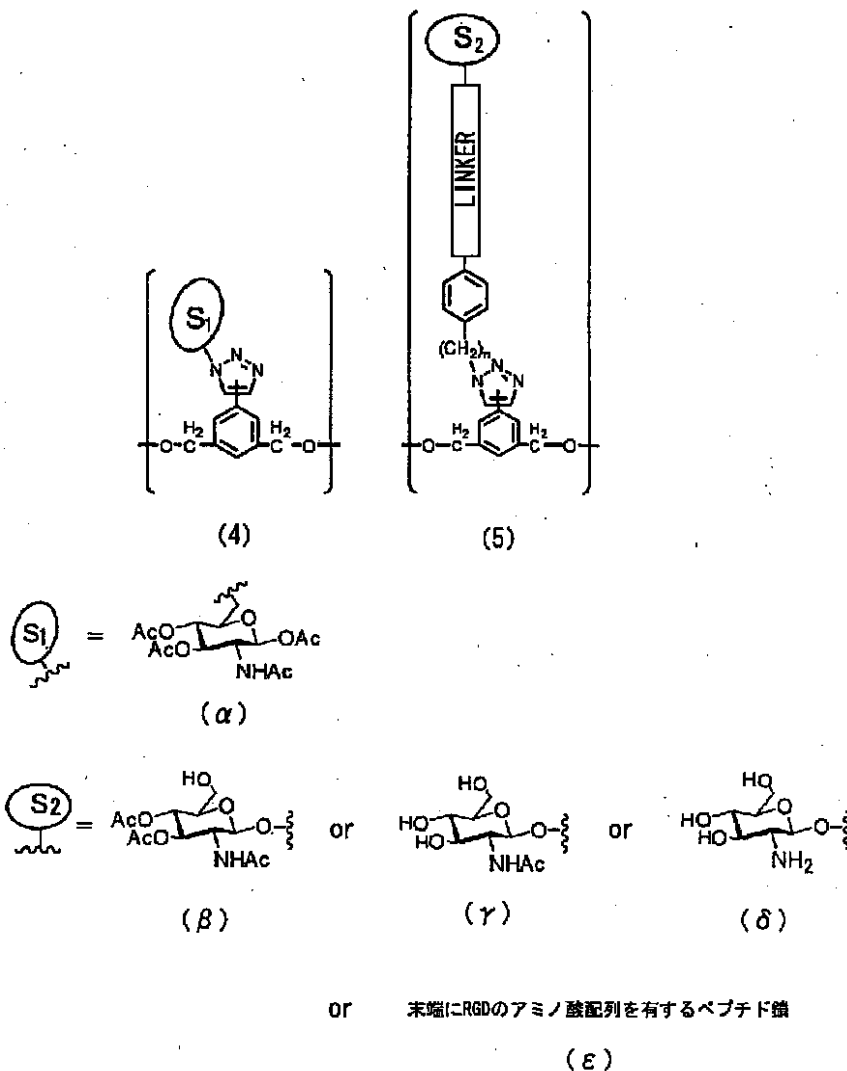
【請求項 1 4】

アンチジーン、 アンチセンス、 アプタマー、 siRNA、 miRNA、 shRNA 及びリポザイムから選択される請求項 1 2 又は 1 3 に記載の構築物。

【請求項 1 5】

ダングリグエンド部分に以下の式 (4) 又は (5) で表されるユニットを有する請求項 1 2 乃至 1 4 のいずれか 1 項記載の構築物 (式中、  $S_1$  は下記 ( ) で示される置換基である。また、四角で囲った LINKER の文字はリンカーを示し、  $S_2$  は該リンカーの末端に結合する下記 ( )、 ( )、 ( )、 又は ( ) で示される置換基 (複数個の  $S_2$  が該リンカーに結合していてもよい) であり、  $n$  は 0 - 4 の自然数を示す)。

【化 3】



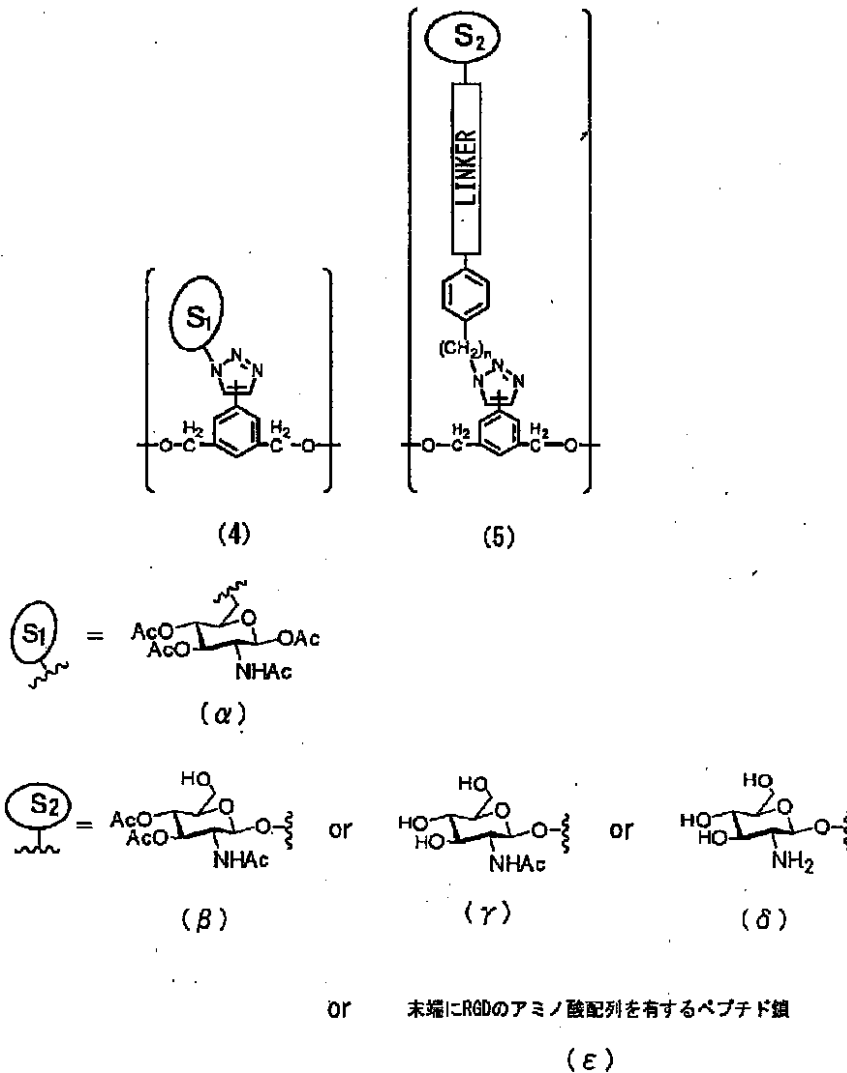
【請求項 1 6】

siRNA であって、前記オリゴヌクレオチド誘導体において、 $a$  及び  $b$  は 0 であり、 $c$  は 1 又は 2 であり、3' 末端ダングリグエンド部分に以下の式 (4) 又は (5) で表



されるユニットを含む請求項 15 記載の構築物（式中、 $S_1$  は下記（ ）で示される置換基である。また、四角で囲った L I N K E R の文字はリンカーを示し、 $S_2$  は該リンカーの末端に結合する下記（ ）、（ ）、（ ）、又は（ ）で示される置換基（複数の  $S_2$  が該リンカーに結合していてもよい）であり、 $n$  は 0 - 4 の自然数を示す）。

【化 4】



## 【請求項 17】

遺伝子診断用オリゴヌクレオチド構築物であって、請求項 1、2、5、6、7、8、9、10 及び 11 のいずれか 1 項に記載のオリゴヌクレオチド誘導体を有する構築物。

## 【請求項 18】

プローブであることを特徴とする請求項 17 に記載の構築物。

## 【請求項 19】

(削除)

## 【請求項 20】

(削除)

## 【請求項 21】

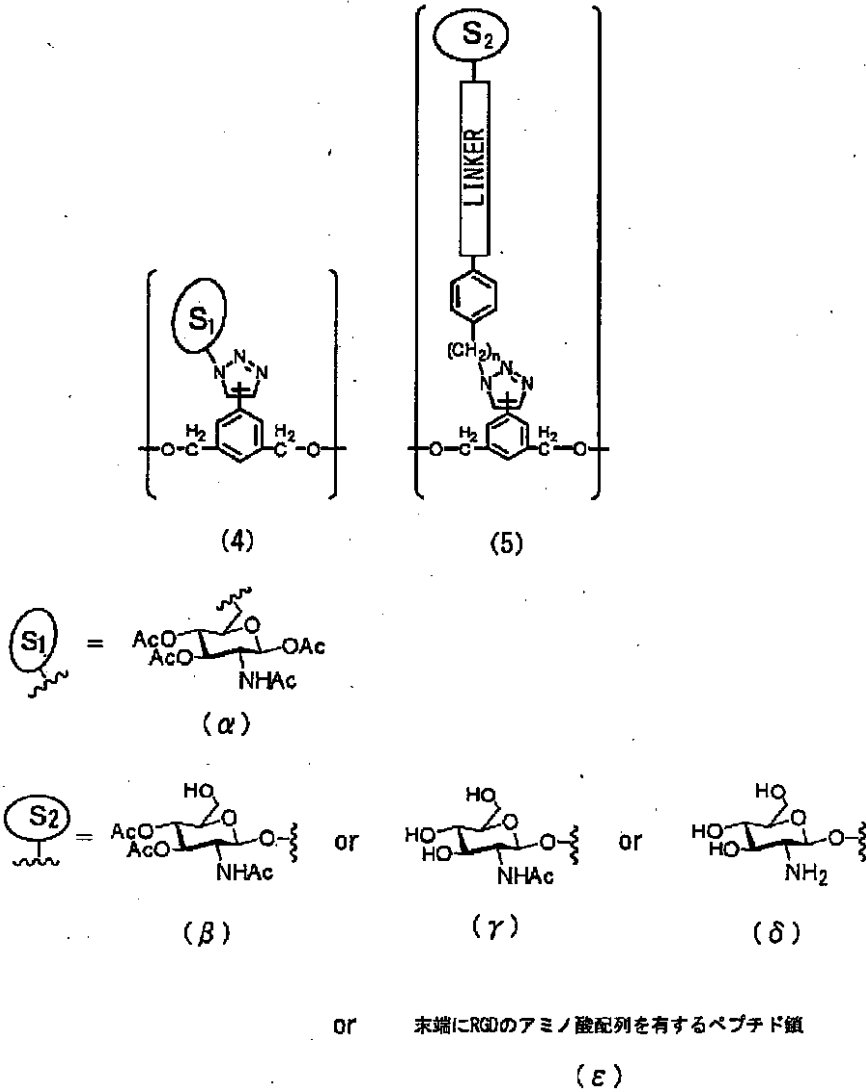
(削除)

## 【請求項 22】

オリゴヌクレオチドに、少なくとも 1 個の以下の式（4）又は（5）で表されるユニットを付加、置換及び挿入のいずれか又はこれらを組み合わせて導入することを特徴とするオリゴヌクレオチドの修飾方法（式中、 $S_1$  は下記（ ）で示される置換基である。また、四角で囲った L I N K E R の文字はリンカーを示し、 $S_2$  は該リンカーの末端に結合す

る下記 ( ) , ( ) , ( ) , 又は ( ) で示される置換基 ( 複数個の S<sub>2</sub> が該リンカーに結合していてもよい ) であり、 n は 0 - 4 の自然数を示す ) 。

【化 5】



【手続補正書】

【提出日】平成29年8月30日(2017.8.30)

【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】全文

【補正方法】変更

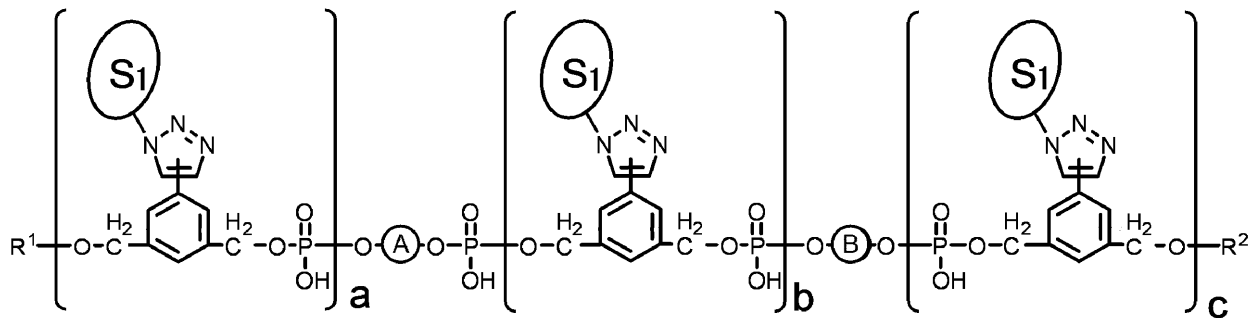
【補正の内容】

【特許請求の範囲】

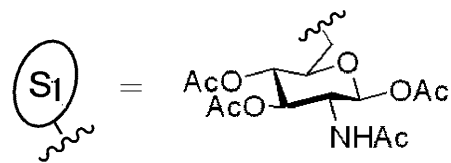
【請求項 1】

次式 ( 1 ) で表されるオリゴヌクレオチド誘導体 ( 式中、R<sup>1</sup> 及び R<sup>2</sup> は、それぞれ独立して水素又はリン酸基を表し、a、b 及び c は独立して 0 以上の整数であって少なくとも 1 つが 1 以上であり、A 及び B は独立して変更されてもよいオリゴヌクレオチドであって A と B とを合わせた鎖長が 3 以上のオリゴヌクレオチドを表す。ただし、A 及び B においてオリゴヌクレオチドの 3' 末端と 5' 末端の水酸基を含まない。また、式中 S<sub>1</sub> は下記 ( ) で示される置換基である ) 。

## 【化1】



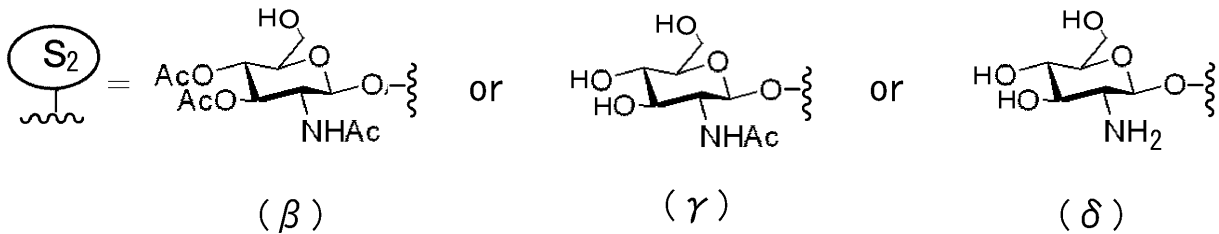
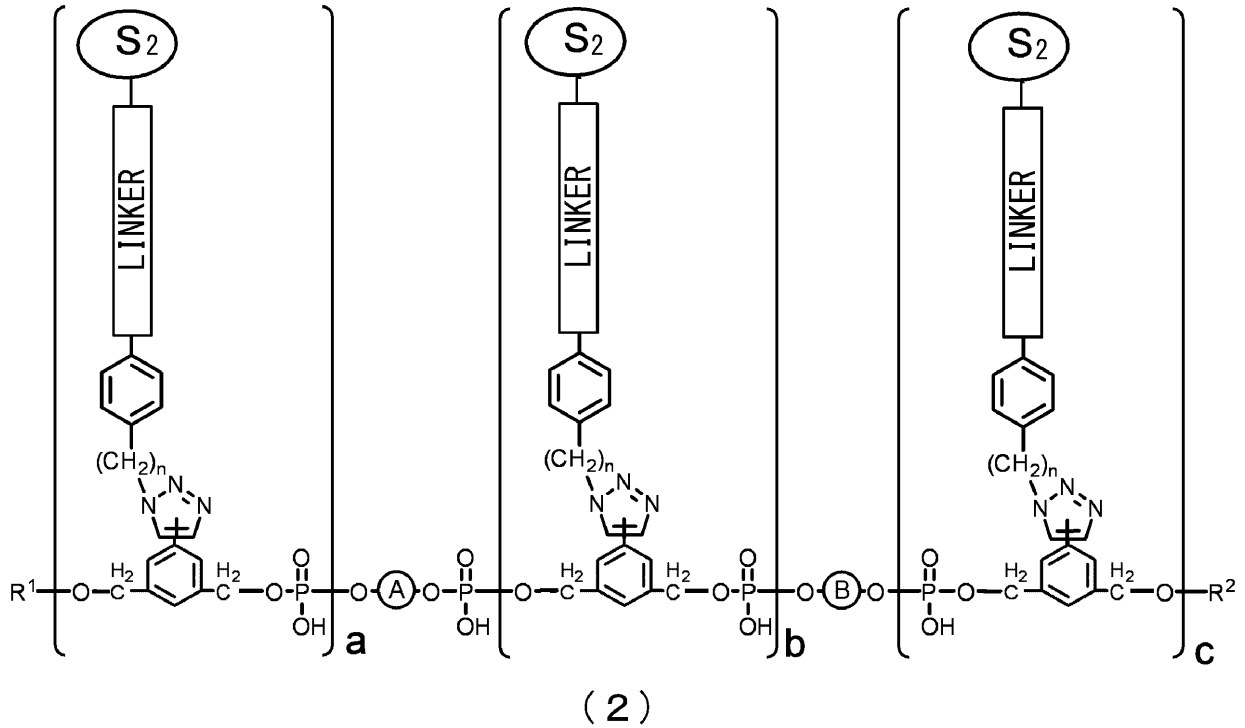
(1)

 $(\alpha)$ 

## 【請求項2】

次式(2)で表されるオリゴヌクレオチド誘導体(式中、 $R^1$ 及び $R^2$ は、それぞれ独立して水素又はリン酸基を表し、 $a$ 、 $b$ 及び $c$ は独立して0以上の整数であって少なくとも1つが1以上であり、 $A$ 及び $B$ は独立して変更されてもよいオリゴヌクレオチドであって $A$ と $B$ とを合わせた鎖長が3以上のオリゴヌクレオチドを表す。ただし、 $A$ 及び $B$ においてオリゴヌクレオチドの3'末端と5'末端の水酸基を含まない。また、四角で囲ったLINKERの文字はリンカーを示し、 $S_2$ は該リンカーの末端に結合する下記( )、( )、( )、又は( )で示される置換基(複数個の $S_2$ が該リンカーに結合していてもよい)であり、 $n$ は0-4の自然数を示す)。

## 【化 2】



or    末端にRGDのアミノ酸配列を有するペプチド鎖

(ε)

## 【請求項 3】

前記独立して変更されてもよいオリゴヌクレオチドには  $-(CH_2)_n-$  (ただし  $n$  は 1 以上の自然数) という部分構造が含まれていることを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

## 【請求項 4】

$R^1$  及び  $R^2$  は H であることを特徴とする請求項 1 乃至 3 のいずれか 1 項に記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

## 【請求項 5】

$b$  は 0 であることを特徴とする請求項 1 乃至 4 のいずれか 1 項に記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

## 【請求項 6】

$a$  及び  $b$  はともに 0 であることを特徴とする請求項 1 乃至 5 のいずれか 1 項に記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

## 【請求項 7】

$c$  は 1 以上 5 以下であることを特徴とする請求項 1 乃至 6 のいずれか 1 項に記載のオリ

ゴヌクレオチド誘導体。

【請求項 8】

A 及び B は、所定の遺伝子 mRNA の部分配列又はその相補配列を有する請求項 1 乃至 7 のいずれか 1 項に記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

【請求項 9】

A 及び B を合わせた鎖長は、10 以上 35 以下である請求項 1 乃至 8 のいずれか 1 項に記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

【請求項 10】

A 及び B はオリゴリボヌクレオチドであることを特徴とする請求項 1 乃至 9 のいずれか 1 項に記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

【請求項 11】

遺伝子発現調節用オリゴヌクレオチド構築物であって、請求項 1 乃至 10 のいずれか 1 項に記載のオリゴヌクレオチド誘導体を有する構築物。

【請求項 12】

1 本鎖及び 2 本鎖 DNA、1 本鎖及び 2 本鎖 RNA、DNA / RNA キメラ並びに DNA / RNA ハイブリッドから選択される遺伝子発現調節用オリゴヌクレオチド構築物であって請求項 11 に記載の構築物。

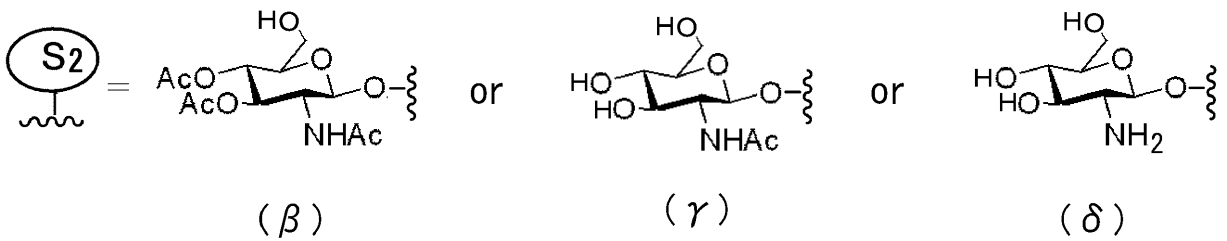
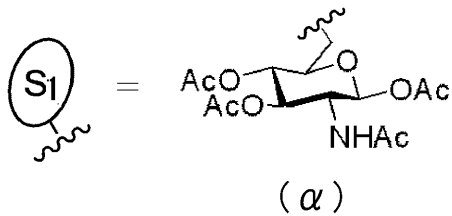
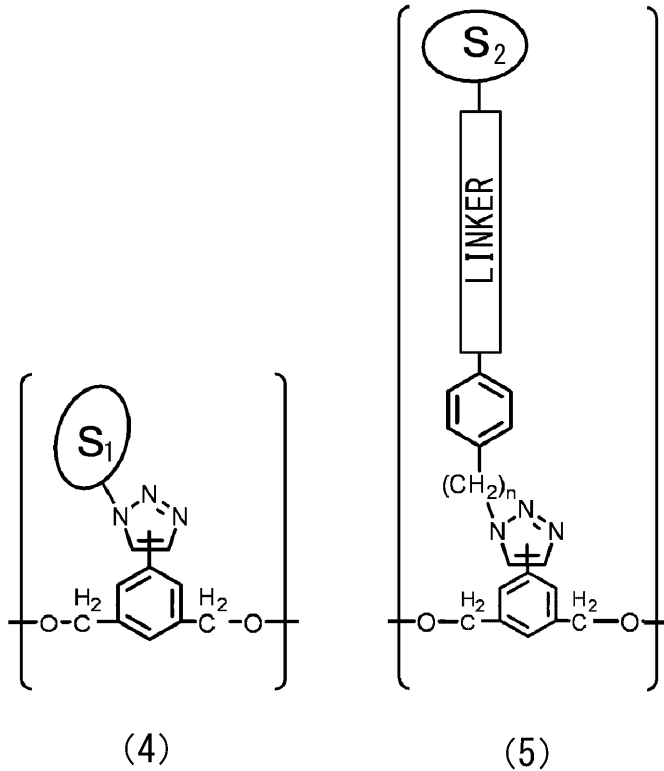
【請求項 13】

アンチジーン、アンチセンス、アプタマー、siRNA、miRNA、shRNA 及びリボザイムから選択される請求項 11 又は 12 に記載の構築物。

【請求項 14】

ダンダリングエンド部分に以下の式 (4) 又は (5) で表されるユニットを有する請求項 11 乃至 13 のいずれか 1 項記載の構築物 (式中、 $S_1$  は下記 ( ) で示される置換基である。また、四角で囲った LINKER の文字はリンカーを示し、 $S_2$  は該リンカーの末端に結合する下記 ( ) , ( ) , ( ) , 又は ( ) で示される置換基 (複数個の  $S_2$  が該リンカーに結合していてもよい) であり、 $n$  は 0 ~ 4 の自然数を示す)。

## 【化3】



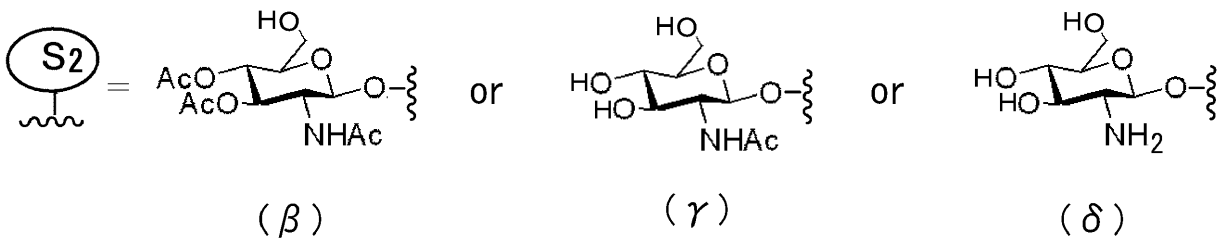
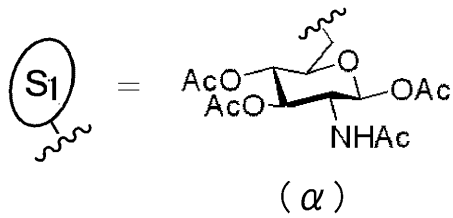
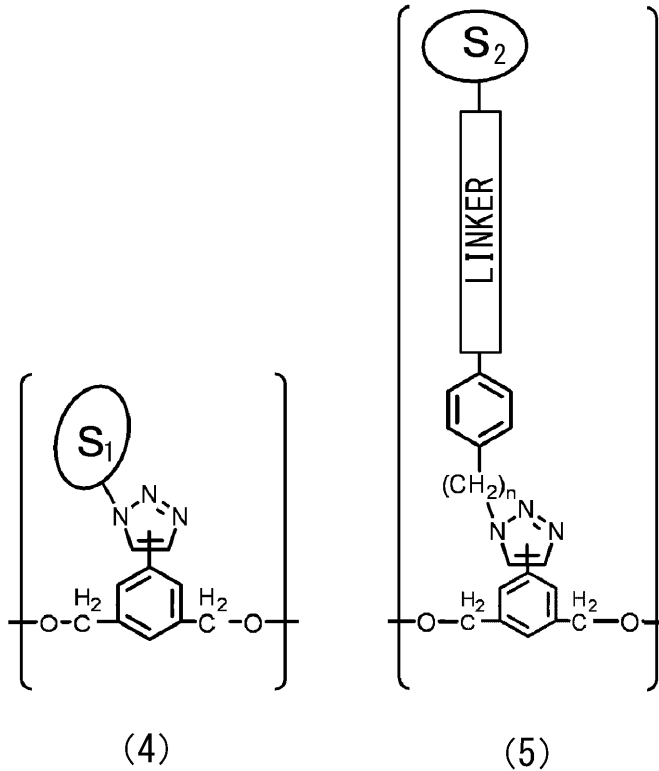
or 末端にRGDのアミノ酸配列を有するペプチド鎖

(ε)

## 【請求項15】

siRNAであって、前記オリゴヌクレオチド誘導体において、a及びbは0であり、cは1又は2であり、3'末端ダンゲリングエンド部分に以下の式(4)又は(5)で表されるユニットを含む請求項14記載の構築物(式中、 $S_1$ は下記( )で示される置換基である。また、四角で囲ったLINKERの文字はリンカーを示し、 $S_2$ は該リンカーの末端に結合する下記( )、( )、( )、又は( )で示される置換基(複数個の $S_2$ が該リンカーに結合していてもよい)であり、nは0~4の自然数を示す)。

## 【化4】



or 末端にRGDのアミノ酸配列を有するペプチド鎖

( $\epsilon$ )

## 【請求項16】

遺伝子診断用オリゴヌクレオチド構築物であって、請求項1乃至10のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド誘導体を有する構築物。

## 【請求項17】

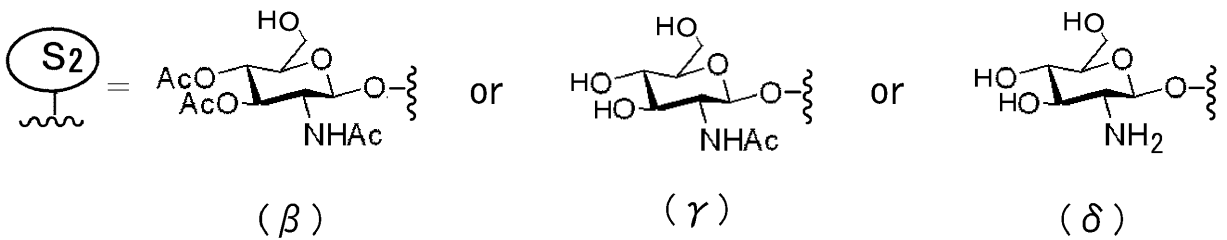
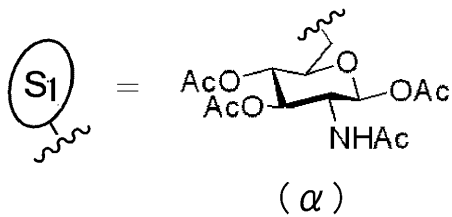
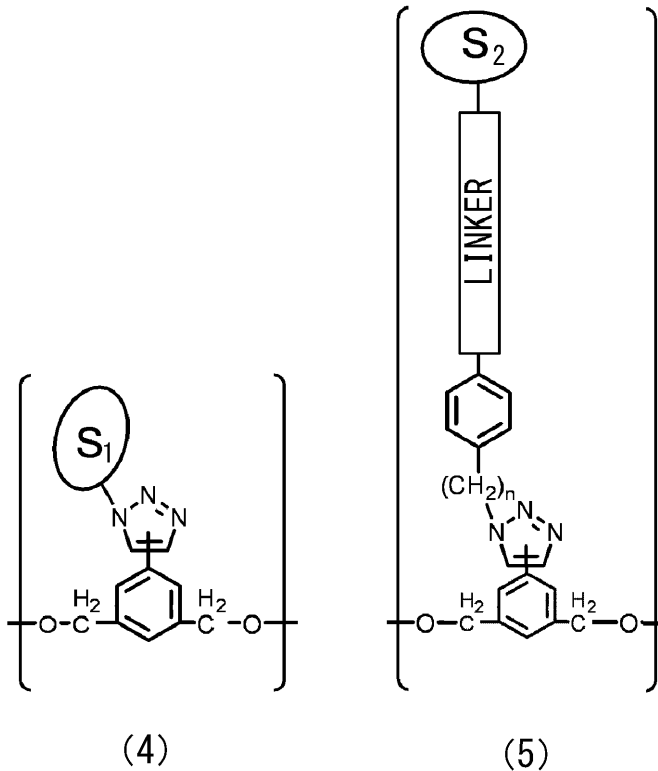
プローブであることを特徴とする請求項16に記載の構築物。

## 【請求項18】

オリゴヌクレオチドに、少なくとも1個の以下の式(4)又は(5)で表されるユニットを付加、置換及び挿入のいずれか又はこれらを組み合わせて導入することを特徴とするオリゴヌクレオチドの修飾方法(式中、 $S_1$ は下記( )で示される置換基である。また、

四角で囲ったLINKERの文字はリンカーを示し、 $S_2$ は該リンカーの末端に結合する下記( )、( )、( )、又は( )で示される置換基(複数個の $S_2$ が該リンカーに結合していてもよい)であり、 $n$ は0~4の自然数を示す)。

【化5】



or 末端にRGDのアミノ酸配列を有するペプチド鎖

( $\epsilon$ )

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0132

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0132】

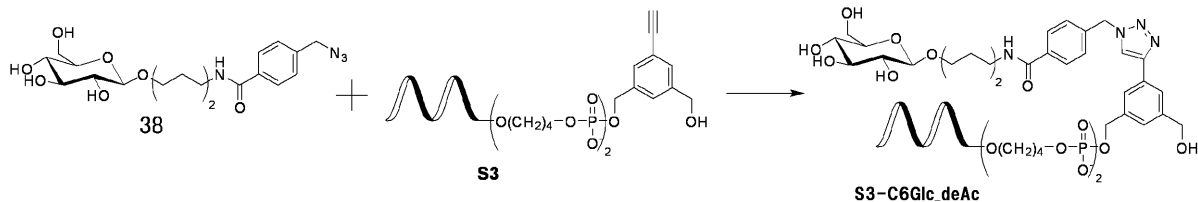


## 化合物19とRNAとのクリック反応

エッペンドルフチューブに、S3 (0.5 mM solution in H<sub>2</sub>O, 1 μL, 0.5 nmol), 化合物19 (5 mM solution in DMSO, 3 μL, 15 nmol)を滅菌した1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) (1 μL)、滅菌水 (3 μL) 加え、1分ほどボルテックスした。その後、アスコルビン酸ナトリウム (25 mM solution in H<sub>2</sub>O, 1 μL, 25 nmol)、硫酸銅5水和物 (25 mM solution in H<sub>2</sub>O, 1 μL, 25 nmol) を順次加え、1分ほどボルテックスし、37 °C、15分間静置した。HPLCにて精製を行い、目的物(S3-GlcNCF<sub>3</sub>)を得た。

MALDI-TOF/MS calcd for 6846.0, found 6843.5.

## 【化 6 7】



## 【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 3 3

【補正方法】変更

【補正の内容】

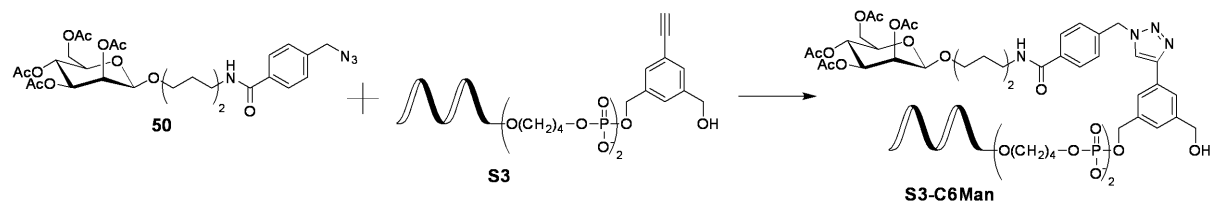
【0 1 3 3】

## 化合物38とRNAとのクリック反応

エッペンドルフチューブに、S3 (0.5 mM solution in H<sub>2</sub>O, 1 μL, 0.5 nmol), 化合物38 (5 mM solution in DMSO, 3 μL, 15 nmol)を滅菌した1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) (1 μL)、滅菌水 (3 μL) 加え、1分ほどボルテックスした。その後、アスコルビン酸ナトリウム (25 mM solution in H<sub>2</sub>O, 1 μL, 25 nmol)、硫酸銅5水和物 (25 mM solution in H<sub>2</sub>O, 1 μL, 25 nmol) を順次加え、1分ほどボルテックスし、37 °C、15分間静置した。HPLCにて精製を行い、目的物(S3-C6Glc.deAc)を得た。

MALDI-TOF/MS calcd for 6858.1, found 6857.9.

## 【化 6 8】



## 【手続補正 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 3 4

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 3 4】

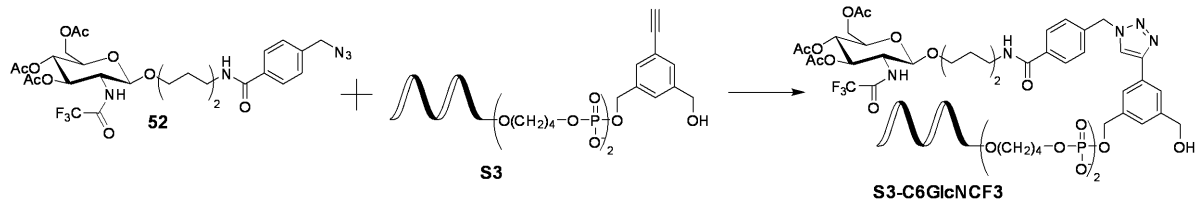
## 化合物50とRNAとのクリック反応

エッペンドルフチューブに、S3 (0.5 mM solution in H<sub>2</sub>O, 1 μL, 0.5 nmol), 化合物50 (5 mM solution in DMSO, 3 μL, 15 nmol)を滅菌した1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) (1 μL)、滅菌水 (3 μL) 加え、1分ほどボルテックスした。その後、アスコルビン酸ナトリウム (25 mM solution in H<sub>2</sub>O, 1 μL, 25 nmol)、硫酸銅5水和物 (25 mM solution in H<sub>2</sub>O, 1 μL, 25 nmol) を順次加え、1分ほどボルテックスし、37 °C、15分間静置した。HPLCにて

て精製を行い、目的物(S3-C6Man)を得た。

MALDI-TOF/MS calcd for 7026.1, found 7027.5.

【化 6 9】



【手続補正 5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 3 5

【補正方法】変更

【補正の内容】

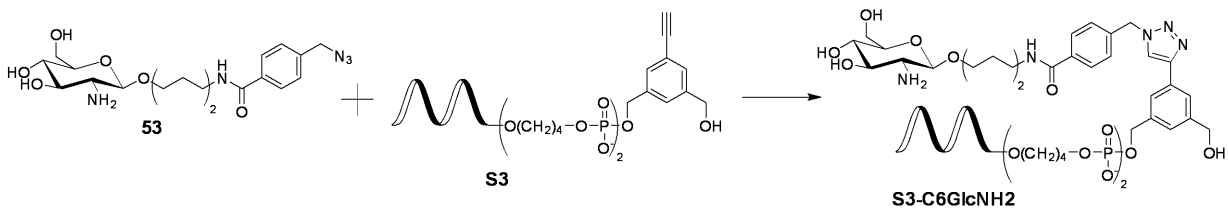
【0 1 3 5】

化合物52とRNAとのクリック反応

エッペンドルフチューブに、S3 (0.5 mM solution in H<sub>2</sub>O, 1 μL, 0.5 nmol), 化合物52 (5 mM solution in DMSO, 3 μL, 15 nmol)を滅菌した1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) (1 μL)、滅菌水 (3 μL) 加え、1分ほどボルテックスした。その後、アスコルビン酸ナトリウム (25 mM solution in H<sub>2</sub>O, 1 μL, 25 nmol)、硫酸銅5水和物 (25 mM solution in H<sub>2</sub>O, 1 μL, 25 nmol) を順次加え、1分ほどボルテックスし、37 °C、15分間静置した。HPLCにて精製を行い、目的物(S3-C6GlcCF<sub>3</sub>)を得た。

MALDI-TOF/MS calcd for 7079.1, found 7075.2.

【化 7 0】



【手続補正 6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 3 6

【補正方法】変更

【補正の内容】

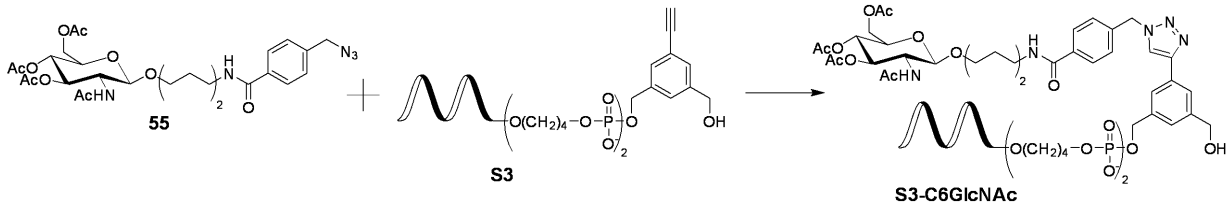
【0 1 3 6】

化合物53とRNAとのクリック反応

エッペンドルフチューブに、S3 (0.5 mM solution in H<sub>2</sub>O, 1 μL, 0.5 nmol), 化合物53 (5 mM solution in DMSO, 3 μL, 15 nmol)を滅菌した1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) (1 μL)、滅菌水 (3 μL) 加え、1分ほどボルテックスした。その後、アスコルビン酸ナトリウム (25 mM solution in H<sub>2</sub>O, 1 μL, 25 nmol)、硫酸銅5水和物 (25 mM solution in H<sub>2</sub>O, 1 μL, 25 nmol) を順次加え、1分ほどボルテックスし、37 °C、15分間静置した。HPLCにて精製を行い、目的物(S3-C6GlcNH<sub>2</sub>)を得た。

MALDI-TOF/MS calcd for 6857.1, found 6861.5.

## 【化 7 1】



## 【手続補正 7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 3 7

【補正方法】変更

【補正の内容】

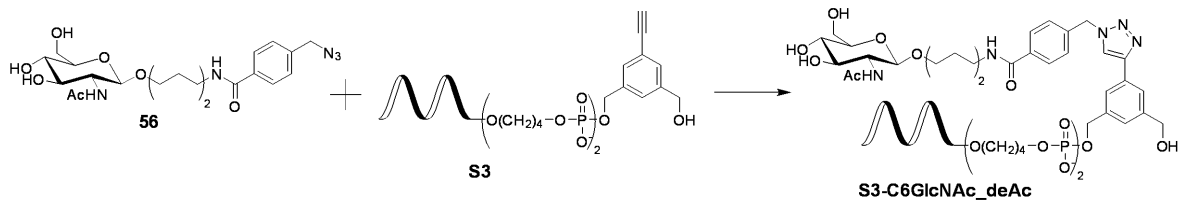
【0 1 3 7】

化合物55とRNAとのクリック反応

エッペンドルフチューブに、S3 (0.5 mM solution in H<sub>2</sub>O, 1 μL, 0.5 nmol), 化合物55 (5 mM solution in DMSO, 3 μL, 15 nmol)を滅菌した1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) (1 μL)、滅菌水 (3 μL) 加え、1分ほどボルテックスした。その後、アスコルビン酸ナトリウム (25 mM solution in H<sub>2</sub>O, 1 μL, 25 nmol)、硫酸銅5水和物 (25 mM solution in H<sub>2</sub>O, 1 μL, 25 nmol) を順次加え、1分ほどボルテックスし、37、15分間静置した。HPLCにて精製を行い、目的物(S3-C6GlcNAc)を得た。

MALDI-TOF/MS calcd for 7025.1, found 7031.0.

## 【化 7 2】



## 【手続補正 8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 3 8

【補正方法】変更

【補正の内容】

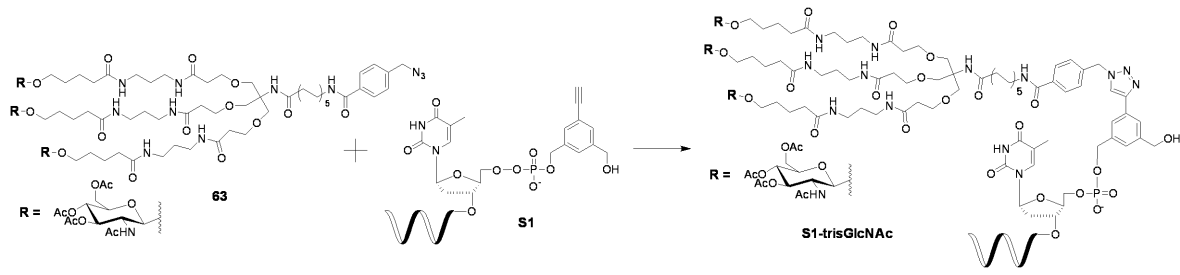
【0 1 3 8】

化合物56とRNAとのクリック反応

エッペンドルフチューブに、S3 (0.5 mM solution in H<sub>2</sub>O, 1 μL, 0.5 nmol), 化合物56 (5 mM solution in DMSO, 3 μL, 15 nmol)を滅菌した1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) (1 μL)、滅菌水 (3 μL) 加え、1分ほどボルテックスした。その後、アスコルビン酸ナトリウム (25 mM solution in H<sub>2</sub>O, 1 μL, 25 nmol)、硫酸銅5水和物 (25 mM solution in H<sub>2</sub>O, 1 μL, 25 nmol) を順次加え、1分ほどボルテックスし、37、15分間静置した。HPLCにて精製を行い、目的物(S3-C6GlcNAc<sub>deAc</sub>)を得た。

MALDI-TOF/MS calcd for 6899.1, found 6901.1.

## 【化73】



## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2016/059398
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> C07H21/02(2006.01)i, C07H21/04(2006.01)i, C12N15/113(2010.01)i  According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07H21/02, C07H21/04, C12N15/113  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2016 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2016 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2016  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAplus/REGISTRY(STN)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	JP 2012-513953 A (Alynlam Pharmaceuticals, Inc.), 21 June 2012 (21.06.2012), claims; examples & US 2012/0035115 A1 claims; examples & WO 2010/039548 A2 & EP 2342616 A2	19-21/1-22
X/Y	JP 2010-132578 A (Kyushu University), 17 June 2010 (17.06.2010), claims; paragraph [0072]; examples (Family: none)	19-21/1-22
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 02 June 2016 (02.06.16)		Date of mailing of the international search report 14 June 2016 (14.06.16)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer  Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/059398

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	JP 2009-535323 A (Centre National de la Recherche Scientifique), 01 October 2009 (01.10.2009), claims; experimental part; fig. 8, 23 & US 2009/0124571 A1 claims; EXPERIMENTAL PART; fig. 8, 23 & WO 2007/125429 A2 & EP 2021351 A2	19-21/1-22
X/Y	JP 2010-508015 A (Baseclick GmbH), 18 March 2010 (18.03.2010), claims; examples; fig. 14 & US 2010/0081137 A1 claims; examples; fig. 14 & WO 2008/052775 A2 & EP 2089343 A2 & CN 101605743 A	19-21/1-22
X/Y	WO 2013/139803 A1 (MAX-PLANCK-GESSELLSCHAFT ZUR FORDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V.), 26 September 2013 (26.09.2013), comp.17b, 18b, 19b, 25d, 26d & JP 2015-514067 A & US 2015/0238597 A1 & EP 2827899 A1 & CN 104321079 A & KR 10-2014-0138996 A	19,20/1-22
X/Y	PESCHKE,B. et al, Controlled coupling of peptides at their C-termini, Peptides(Amsterdam, Netherlands), 2009, Vol.30, No.4, pp.689-698	19,20/1-22
X/Y	JOUANNO,L. et al, Kondrat'eva Ligation: Diels- Alder-Based Irreversible Reaction for Bioconjugation, Journal of Organic Chemistry, 2014, Vol.79, No.21, pp.10353-10366	19,20/1-22
Y	JP 2010-195698 A (Gifu University), 09 September 2010 (09.09.2010), claims; examples (Family: none)	1-22
Y	FUJIMOTO,K. et al, Synthesis of versatile fluorescent sensors based on click chemistry: detection of unsaturated fatty acids by their pyrene-emission switching, Chemical Communications(Cambridge, United Kingdom), 2009, No.46, pp.7164-7166	1-22
Y	JP 2011-504874 A (Tokyo Medical and Dental University), 17 February 2011 (17.02.2011), claims; paragraph [0015]; fig. 1 & US 2010/0234282 A1 & WO 2009/069313 A1 claims; paragraph [0015]; fig. 1 & EP 2215229 A1 & CN 101874111 A	1-22

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2016/059398

In the inventions described in claims 2-18 and 22, in regard to the definition for X in claims 2, 4, 15 and 22, a group is described which has such a structure that position-1' and position-3' in the ribose are bonded to an oxygen atom and a carbon atom at position-5' in the ribose is bonded to triazole (wherein the group is referred to as "group (1)", hereinbelow).

However, in light of a fact that a common phosphodiester bond between nucleotides in an oligonucleotide is a bond between position-3' and position-5' in a ribose, it is assumed that the above-mentioned group (1) is correctly a group having such a structure that a carbon atom at position-3' and a carbon atom at position-5' in the ribose are bonded to an oxygen atom and position-1' in the ribose is bonded to triazole (wherein the group is referred to as "group (2)", hereinbelow).

Such being the case, the international search was carried out under the assumption that the definition for X in claims 2, 4, 15 and 22 can be either one of the above-mentioned groups (1) and (2).

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 6 / 0 5 9 3 9 8													
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07H21/02(2006,01)i, C07H21/04(2006,01)i, C12N15/113(2010,01)i															
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07H21/02, C07H21/04, C12N15/113															
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 <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2016年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2016年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2016年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2016年	日本国実用新案登録公報	1996-2016年	日本国登録実用新案公報	1994-2016年				
日本国実用新案公報	1922-1996年														
日本国公開実用新案公報	1971-2016年														
日本国実用新案登録公報	1996-2016年														
日本国登録実用新案公報	1994-2016年														
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Caplus/REGISTRY (STN)															
C. 関連すると認められる文献															
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号													
X/ Y	JP 2012-513953 A (アルニラム ファーマスーティカルズ インコーポレイテッド) 2012.06.21, 特許請求の範囲、実施例 & US 2012/0035115 A1; claims, Example & WO 2010/039548 A2 & EP 2342616 A2	19-21/ 1-22													
X/ Y	JP 2010-132578 A (国立大学法人九州大学) 2010.06.17, 特許請求の範囲、[0072]、実施例 (ファミリーなし)	19-21/ 1-22													
<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。															
<table border="0"> <tr> <td>* 引用文献のカテゴリー</td> <td>の日の後に公表された文献</td> </tr> <tr> <td>「A」特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの</td> <td>「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</td> </tr> <tr> <td>「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</td> <td>「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</td> </tr> <tr> <td>「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)</td> <td>「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</td> </tr> <tr> <td>「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td>「&amp;」同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</td> <td></td> </tr> </table>				* 引用文献のカテゴリー	の日の後に公表された文献	「A」特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの	「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの	「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの	「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)	「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの	「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」同一パテントファミリー文献	「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	
* 引用文献のカテゴリー	の日の後に公表された文献														
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの	「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの														
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの														
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)	「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの														
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」同一パテントファミリー文献														
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願															
国際調査を完了した日 02.06.2016		国際調査報告の発送日 14.06.2016													
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) 三上 晶子	4 P 4042												
		電話番号 03-3581-1101 内線 3492													



国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2016/059398
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X/ Y	JP 2009-535323 A (サントル ナショナル ドゥ ラ ルシエルシ ユ シアンティフィック) 2009.10.01, 特許請求の範囲、実験の部、 図 8, 23 & US 2009/0124571 A1; claims、EXPERIMENTAL PART, Figure 8, 23 & WO 2007/125429 A2 & EP 2021351 A2	19-21/ 1-22
X/ Y	JP 2010-508015 A (ベースクリック ゲーエムベーハー) 2010.03.18, 特許請求の範囲、実施例、図 14 & US 2010/0081137 A1; claims、EXAMPLES、Figure 14 & WO 2008/052775 A2 & EP 2089343 A2 & CN 101605743 A	19-21/ 1-22
X/ Y	WO 2013/139803 A1 (MAX-PLANCK-GESSELLSCHAFT ZUR FORDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E. V.) 2013.09.26, comp.17b, 18b, 19b, 25d, 26d & JP 2015-514067 A & US 2015/0238597 A1 & EP 2827899 A1 & CN 104321079 A & KR 10-2014-0138996 A	19, 20/ 1-22
X/ Y	PESCHKE, B. et al, Controlled coupling of peptides at their C-termini, Peptides(Amsterdam, Netherlands), 2009, Vol. 30, No. 4, pp. 689-698	19, 20/ 1-22
X/ Y	JOUANNO, L. et al, Kondrat'eva Ligation: Diels-Alder-Based Irreversible Reaction for Bioconjugation, Journal of Organic Chemistry, 2014, Vol. 79, No. 21, pp. 10353-10366	19, 20/ 1-22
Y	JP 2010-195698 A (国立大学法人岐阜大学) 2010.09.09, 特許請求の範囲、実施例 (ファミリーなし)	1-22
Y	FUJIMOTO, K. et al, Synthesis of versatile fluorescent sensors based on click chemistry: detection of unsaturated fatty acids by their pyrene-emission switching, Chemical Communications(Cambridge, United Kingdom), 2009, No. 46, pp. 7164-7166	1-22
Y	JP 2011-504874 A (国立大学法人 東京医科歯科大学) 2011.02.17, 特許請求の範囲、[0015]、図 1 & US 2010/0234282 A1 & WO 2009/069313 A1; claims、[0015]、fig.1 & EP 2215229 A1 & CN 101874111 A	1-22

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2016/059398

請求項 2-18, 22 に係る発明に関し、請求項 2, 4, 15, 22 の X の定義には、リボースの 1' 位と 3' 位が酸素原子に結合し、5' 位の炭素原子がトリアゾールに結合した構造の基（以下、「基(1)」という。）が記載されている。しかしながら、オリゴヌクレオチドにおける、一般的なヌクレオチド間のホスホジエステル結合が、リボースの 3' 位と 5' 位間の結合であることに鑑みれば、上記の基(1)は、正しくは、リボースの 3' 位と 5' 位の炭素原子が酸素原子に結合し、1' 位がトリアゾールに結合した構造の基（以下、「基(2)」という。）ではないかと推定される。

なお、国際調査は、請求項 2, 4, 15, 22 の X の定義が、上記の基(1)、基(2)のいずれもとり得ると解して行った。

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 31/7105 (2006.01)	A 6 1 K 31/7105	
A 6 1 K 31/711 (2006.01)	A 6 1 K 31/711	
A 6 1 K 31/7125 (2006.01)	A 6 1 K 31/7125	
A 6 1 K 47/54 (2017.01)	A 6 1 K 47/54	
A 6 1 K 47/59 (2017.01)	A 6 1 K 47/59	
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 0 7 H 21/04	B
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A G
C 1 2 N 15/115 (2010.01)	C 1 2 N 15/00	A
A 6 1 K 49/00 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	H
	A 6 1 K 49/00	

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

Fターム(参考) 4C076 AA95 CC29 CC41 DD66 DD66N DD69 DD69N EE25 EE25A EE59  
 EE59A EE59N FF34  
 4C084 AA13 NA05 NA11 NA13 NA14 ZC411 ZC781  
 4C085 HH20 KB92  
 4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04 NA05 NA11 NA13 NA14  
 ZC41 ZC78

(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。