

(19) 日本国特許庁(JP)

## 再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02019/088179

発行日 令和2年11月12日(2020.11.12)

(43) 国際公開日 令和1年5月9日(2019.5.9)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
<b>C07H 19/06 (2006.01)</b>	C07H 19/06	4C057
<b>C07H 23/00 (2006.01)</b>	C07H 23/00	4C086
<b>C07H 19/10 (2006.01)</b>	C07H 19/10	
<b>C07H 21/00 (2006.01)</b>	C07H 21/00	
<b>A61P 43/00 (2006.01)</b>	A61P 43/00 105	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 49 頁) 最終頁に続く

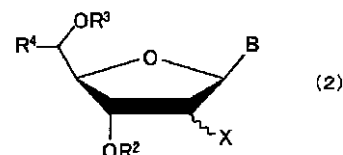
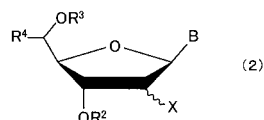
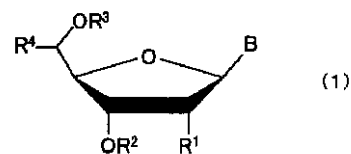
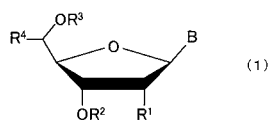
出願番号 特願2019-550462 (P2019-550462)	(71) 出願人 000006770 ヤマサ醤油株式会社 千葉県銚子市新生町2丁目10番地の1
(21) 国際出願番号 PCT/JP2018/040544	(71) 出願人 504139662 国立大学法人東海国立大学機構 愛知県名古屋市千種区不老町1番
(22) 国際出願日 平成30年10月31日(2018.10.31)	(74) 代理人 110000110 特許業務法人快友国際特許事務所
(31) 優先権主張番号 特願2017-211339 (P2017-211339)	(72) 発明者 上野 義仁 岐阜県岐阜市柳戸1番1 国立大学法人岐阜大学内
(32) 優先日 平成29年10月31日(2017.10.31)	(72) 発明者 前田 雄介 岐阜県岐阜市柳戸1番1 国立大学法人岐阜大学内
(33) 優先権主張国・地域又は機関 日本国(JP)	最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ヌクレオシド誘導体及びその利用

## (57) 【要約】

RNA医薬等に適用するのにより実用的なヌクレオシド及びその利用を提供する。このため、以下の式(1)又は(2)で表される、ヌクレオシド誘導体又はその塩を提供する。

【化16】



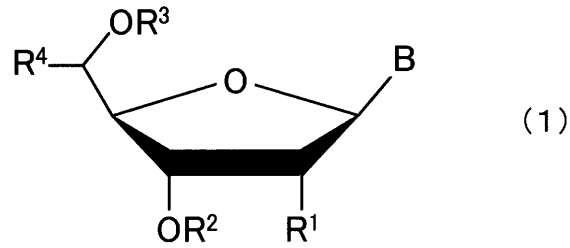
(式(1)中、R<sup>1</sup>は、水素原子、水酸基、水素原子がアルキル基又はアルケニル基で置換された水酸基又は保護された基を表し、式(2)中、Xは、ハロゲン原子を表す。式(1)及び式(2)中、R<sup>2</sup>及びR<sup>3</sup>は互いに同一又は異なっていてもよく、水素原子、水酸基の保護基

## 【特許請求の範囲】

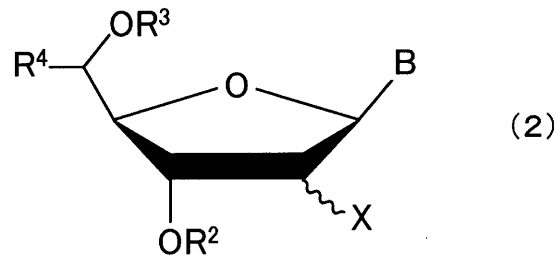
## 【請求項 1】

以下の式 (1) 又は (2) で表される、ヌクレオシド誘導体又はその塩。

## 【化 1 4】



10



20

(式 (1) 中、

R<sup>1</sup>は、水素原子、水酸基、水素原子がアルキル基又はアルケニル基で置換された水酸基又は保護された基を表し、

式 (2) 中、Xは、ハロゲン原子を表す。

式 (1) 及び式 (2) 中、

R<sup>2</sup>及びR<sup>3</sup>は互いに同一又は異なってもよく、水素原子、水酸基の保護基、リン酸基、保護されたリン酸基、又は - P(=O)<sub>n</sub>R<sup>5</sup>R<sup>6</sup> (nは0又は1を示し、R<sup>5</sup>及びR<sup>6</sup>は、互いに同一又は異なってもよく、水素原子、水酸基、保護された水酸基、メルカプト基、保護されたメルカプト基、低級アルコキシ基、シアノ低級アルコキシ基、アミノ基、又は置換されたアミノ基のいずれかを示す。ただし、nが1のときには、R<sup>5</sup>及びR<sup>6</sup>が共に水素原子となることはない。)を示し、

30

R<sup>4</sup>は、それぞれ連結基を有するNHR<sup>7</sup> (R<sup>7</sup>は、水素原子、アルキル基、アルケニル基又はアミノ基の保護基を表す。)、アジド基、アミジノ基又はグアニジノ基を表し、Bは、プリン-9-イル基、2-オキソ-ピリミジン-1-イル基、置換プリン-9-イル基、又は置換2-オキソ-ピリミジン-1-イル基のいずれかを表す。)

## 【請求項 2】

前記式 (1) 及び式 (2) 中、R<sup>7</sup>は水素原子を表すか又はR<sup>4</sup>は前記連結基を有するグアニジノ基を表す、請求項 1 に記載のヌクレオシド誘導体又はその塩。

## 【請求項 3】

前記式 (1) 及び式 (2) 中、R<sup>4</sup>の前記連結基は、炭素数 1 以上 6 以下のアルキレン基を表す、請求項 1 又は 2 に記載のヌクレオシド誘導体又はその塩。

40

## 【請求項 4】

前記式 (1) 及び式 (2) 中、R<sup>4</sup>の前記連結基は、炭素数 1 以上 6 以下のアルキレン基を表し、R<sup>7</sup>は水素原子を表す、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載のヌクレオシド誘導体又はその塩。

## 【請求項 5】

請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載のヌクレオシド誘導体を含む、オリゴヌクレオチドに対する細胞膜透過性付与剤。

## 【請求項 6】

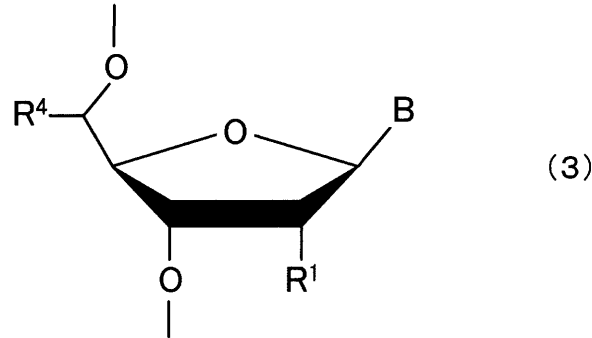
50

請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載のヌクレオシド誘導体を含む、オリゴヌクレオチドに対するリボヌクレアーゼ耐性付与剤。

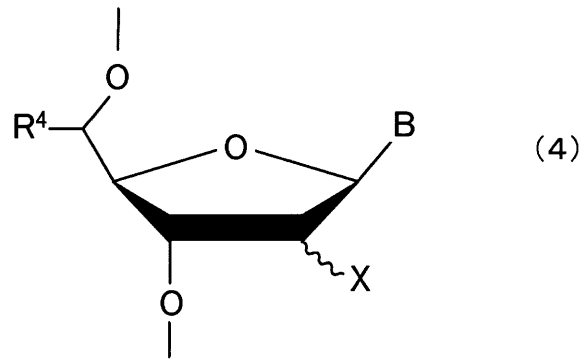
【請求項 7】

以下の式 (3) 及び式 (4) からなる群から選択される部分構造を少なくとも 1 個備える、オリゴヌクレオチド誘導体又はその塩。

【化 15】



10



20

(式 (3) 中、 $R^1$  は、水素原子、ハロゲン原子、水酸基、水素原子がアルキル基又はアルケニル基で置換された水酸基又は保護された水酸基を表し、式 (4) 中、 $X$  は、ハロゲン原子を表す。式 (3) 及び式 (4) 中、 $R^4$  は、それぞれ連結基を有する  $NHR^7$  ( $R^7$  は、水素原子、アルキル基、アルケニル基又はアミノ基の保護基を表す。)、アジド基、アミジノ基又はグアニジノ基を表し、 $B$  は、プリン - 9 - イル基、2 - オキソ - ピリミジン - 1 - イル基、置換プリン - 9 - イル基、又は置換 2 - オキソ - ピリミジン - 1 - イル基のいずれかを表す。)

30

【請求項 8】

前記部分構造を少なくとも 2 個備える、請求項 7 に記載のオリゴヌクレオチド誘導体又はその塩。

【請求項 9】

前記部分構造を少なくとも 3 個備えている、請求項 7 又は 8 に記載のオリゴヌクレオチド誘導体又はその塩。

40

【請求項 10】

前記部分構造を 3 個以上 8 個以下備える、請求項 7 ~ 9 のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド誘導体又はその塩。

【請求項 11】

前記オリゴヌクレオチドは、オリゴリボヌクレオチドである、請求項 7 ~ 10 のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド誘導体又はその塩。

【請求項 12】

請求項 7 ~ 11 のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド誘導体又はその塩を有効成分とする、*siRNA* 剤。

50

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本明細書は、ヌクレオシド誘導体及びその利用に関する。

(関連出願の相互参照)

本出願は、2017年10月31日に提出された日本国特許出願である特願2017-211339の関連出願であり、この日本出願に基づく優先権を主張するものであり、この日本出願に記載された全ての内容を援用によりここに組み込まれる。

## 【背景技術】

## 【0002】

がんをはじめ、遺伝子変異や遺伝子発現異常が原因又は関連している疾患は多数知られている。遺伝子の発現を抑制する*siRNA*などのRNA医薬は、こうした疾患に有用であり、優れた医薬品ポテンシャルを有しているといえる。

## 【0003】

一方、*siRNA*等は、細胞膜透過が困難であったり、ヌクレアーゼによる分解を受けやすいという問題がある。このため、これまで、*siRNA*の細胞内送達用のLNPなどのキャリアの使用が試みられたり、ヌクレオシドに対する種々の化学修飾が試みられている(非特許文献1~4)。

## 【先行技術文献】

## 【非特許文献】

## 【0004】

【非特許文献1】*HELVATICA CHIMICA ACTA* Vol. 83 (2000) 128-151

【非特許文献2】*The Journal of Organic Chemistry* 2012, 77, 3233-3245

【非特許文献3】*Bioorganic & Chemistry letters*(1999)2667-2672

【非特許文献4】*The Journal of Organic Chemistry* 2013, 78, 9956-9962

## 【発明の概要】

## 【0005】

しかしながら、細胞膜透過性、ヌクレアーゼ耐性こうした試みにもかかわらず、未だに、RNA医薬の有効性の一層の向上が求められている。こうしたRNAの改変によっても、十分な細胞膜透過性、リボヌクレアーゼ耐性及び遺伝子抑制能を充足することはできていない。

## 【0006】

本明細書は、RNA医薬等に適用するのにより実用的なヌクレオシド及びその利用を提供することを、目的とする。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0007】

本発明者らは、リボヌクレオチドの糖部であるリボースに対する化学修飾に着目する一方、リボースを構成する炭素原子ではあるが、リボースの五員環の構成炭素原子でない5'位炭素原子に対する修飾に着目した。かかる5'位炭素原子への塩基を有する置換基の導入によって、遺伝子発現抑制能を維持しつつ、リボヌクレアーゼ耐性及び細胞膜透過性を向上させようという知見を得た。本明細書によれば、かかる知見に基づき以下の手段が提供される。

## 【0008】

(1)以下の式(1)又は(2)で表される、ヌクレオシド誘導体又はその塩。

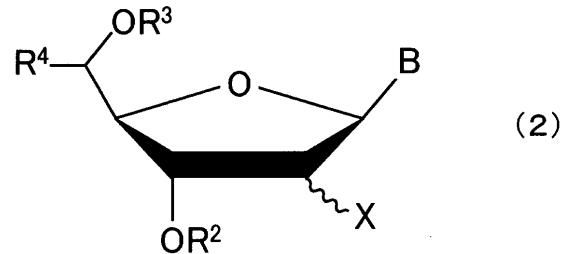
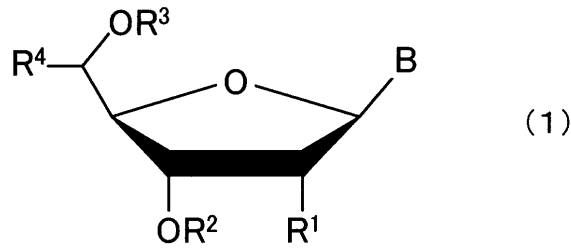
10

20

30

40

## 【化 1】



10

20

30

40

(式(1)中、

$R^1$ は、水素原子、水酸基、水素原子がアルキル基又はアルケニル基で置換された水酸基又は保護された基を表し、

式(2)中、 $X$ は、ハロゲン原子を表す。

式(1)及び式(2)中、

$R^2$ 及び $R^3$ は互いに同一又は異なってもよく、水素原子、水酸基の保護基、リン酸基、保護されたリン酸基、又は $-P(=O)_nR^5R^6$ ( $n$ は0又は1を示し、 $R^5$ 及び $R^6$ は、互いに同一又は異なってもよく、水素原子、水酸基、保護された水酸基、メルカプト基、保護されたメルカプト基、低級アルコキシ基、シアノ低級アルコキシ基、アミノ基、又は置換されたアミノ基のいずれかを示す。ただし、 $n$ が1のときには、 $R^5$ 及び $R^6$ が共に水素原子となることはない。)を示し、

$R^4$ は、それぞれ連結基を有する $NHR^7$ ( $R^7$ は、水素原子、アルキル基、アルケニル基又はアミノ基の保護基を表す。)、アジド基、アミジノ基又はグアニジノ基を表し、 $B$ は、プリン-9-イル基、2-オキソ-ピリミジン-1-イル基、置換プリン-9-イル基、又は置換2-オキソ-ピリミジン-1-イル基のいずれかを表す。)

(2)前記式(1)及び式(2)中、 $R^7$ は水素原子を表すか又は $R^4$ は前記連結基を有するグアニジノ基を表す、(1)に記載のヌクレオシド誘導体又はその塩。

(3)前記式(1)及び式(2)中、 $R^4$ の前記連結基は、炭素数1以上6以下のアルキレン基を表す、(1)又は(2)に記載のヌクレオシド誘導体又はその塩。

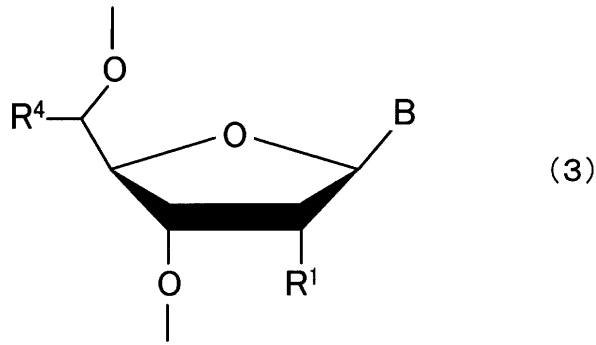
(4)前記式(1)及び式(2)中、 $R^4$ の前記連結基は、炭素数1以上6以下のアルキレン基を表し、 $R^7$ は水素原子を表す、(1)~(3)のいずれかに記載のヌクレオシド誘導体又はその塩。

(5)(1)~(4)のいずれかに記載のヌクレオシド誘導体を含む、オリゴヌクレオチドに対する細胞膜透過性付与剤。

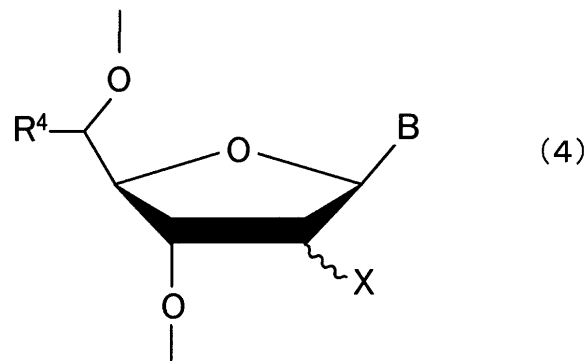
(6)(1)~(4)のいずれかに記載のヌクレオシド誘導体を含む、オリゴヌクレオチドに対するリボヌクレアーゼ耐性付与剤。

(7)以下の式(3)及び式(4)からなる群から選択される部分構造を少なくとも1個備える、オリゴヌクレオチド誘導体又はその塩。

## 【化 2】



10



20

(式(3)中、R<sup>1</sup>は、水素原子、ハロゲン原子、水酸基、水素原子がアルキル基又はアルケニル基で置換された水酸基又は保護された水酸基を表し、式(4)中、Xは、ハロゲン原子を表す。式(3)及び式(4)中、R<sup>4</sup>は、それぞれ連結基を有するNHR<sup>7</sup>(R<sup>7</sup>は、水素原子、アルキル基、アルケニル基又はアミノ基の保護基を表す。)、アジド基、アミノ基又はグアニジノ基を表し、Bは、プリン-9-イル基、2-オキソ-ピリミジン-1-イル基、置換プリン-9-イル基、又は置換2-オキソ-ピリミジン-1-イル基のいずれかを表す。)

(8) 前記部分構造を少なくとも2個備える、(7)に記載のオリゴヌクレオチド誘導体又はその塩。

30

(9) 前記部分構造を少なくとも3個備えている、(7)又は(8)に記載のオリゴヌクレオチド誘導体又はその塩。

(10) 前記部分構造を3個以上8個以下備える、(7)~(9)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド誘導体又はその塩。

(11) 前記オリゴヌクレオチドは、オリゴリボヌクレオチドである、(7)~(10)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド誘導体又はその塩。

(12) (7)~(11)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド誘導体又はその塩を有効成分とする、siRNA剤。

40

## 【図面の簡単な説明】

## 【0009】

【図1】リボヌクレアーゼ耐性の評価結果を示す図である。

【図2】アミノアルキル基修飾による細胞膜透過性の評価結果を示す図である。

【図3】アミノアルキル基修飾による細胞膜透過性の他の評価結果を示す図である。

## 【発明を実施するための形態】

## 【0010】

本明細書の開示は、siRNAなどRNA医薬に好適な実用性のあるヌクレオシド誘導体又はその塩及びその利用に関する。本明細書に開示されるヌクレオシド誘導体又はその塩(以下、単に、本ヌクレオシド誘導体ともいう。)によれば、遺伝子発現抑制能を十分に発揮し、しかも、リボヌクレアーゼ耐性を有するとともに、細胞膜透過性に優れている

50

。このため、従来のRNA医薬に用いられてきた送達用のLNPなどのキャリアを用いない投与に好適なオリゴヌクレオチドを提供できる。

【0011】

また、本ヌクレオシド誘導体は、RNAを用いた検出プローブなど試薬としても有用である。すなわち、種々のRNA試薬に好適なオリゴヌクレオチドを提供できる。

【0012】

本明細書に開示されるヌクレオシド誘導体は、従来困難であったリボースの5'位にアミノアルキル系置換基などの塩基性置換基を導入し、その性質について精査したところ、予想を超える有用な特徴を見出したことに基づいている。すなわち、従来、リボヌクレアーゼ耐性に関しては、リボースの2'位や3'位の置換体によることが一般的であった。これに対して、本明細書に開示されるヌクレオシド誘導体によれば、リボース環を構成する炭素原子を修飾するのではなく、5'炭素原子の水素原子を置換するものであるため、当該ヌクレオシド誘導体を用いたオリゴヌクレオチドによるsiRNA活性を維持しつつ、予想を超えるリボヌクレアーゼ耐性と細胞膜透過性という、RNA医薬等に有用な特性を兼ね備えることができる。

10

【0013】

以下、本開示の代表的かつ非限定的な具体例について、適宜図面を参照して詳細に説明する。この詳細な説明は、本開示の好ましい例を実施するための詳細を当業者に示すことを単純に意図しており、本開示の範囲を限定することを意図したものではない。また、以下に開示される追加的な特徴ならびに開示は、さらに改善されたヌクレオチド誘導体及びその利用を提供するために、他の特徴や開示とは別に、又は共に用いることができる。

20

【0014】

また、以下の詳細な説明で開示される特徴や工程の組み合わせは、最も広い意味において本開示を実施する際に必須のものではなく、特に本開示の代表的な具体例を説明するためにのみ記載されるものである。さらに、上記及び下記の代表的な具体例の様々な特徴、ならびに、独立及び従属クレームに記載されるものの様々な特徴は、本開示の追加的かつ有用な実施形態を提供するにあたって、ここに記載される具体例のとおり、あるいは列挙された順番のとおり組み合わせなければならないものではない。

【0015】

本明細書及び/又はクレームに記載された全ての特徴は、実施例及び/又はクレームに記載された特徴の構成とは別に、出願当初の開示ならびにクレームされた特定事項に対する限定として、個別に、かつ互いに独立して開示されることを意図するものである。さらに、全ての数値範囲及びグループ又は集団に関する記載は、出願当初の開示ならびにクレームされた特定事項に対する限定として、それらの中間の構成を開示する意図を持ってなされている。

30

【0016】

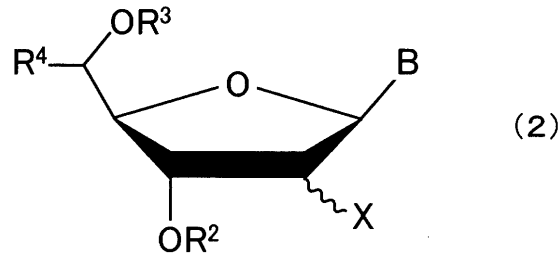
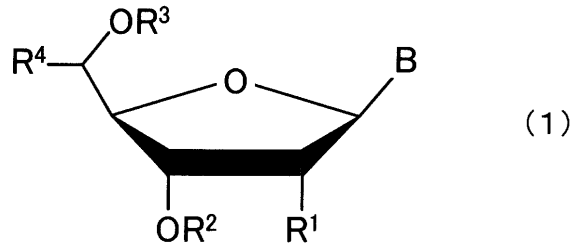
(本ヌクレオシド誘導体)

本ヌクレオシド誘導体は、以下の式(1)又は(2)で表されるヌクレオシド誘導体又はその塩とすることができる。本ヌクレオシド誘導体は、当業者の周知の方法で、オリゴヌクレオチドの部分構造に含めることができる。

40

【0017】

## 【化3】



10

## 【0018】

本ヌクレオシド誘導体は、リボース及びデオキシリボースの第5'位に塩基性を有する置換基を備えることで、本ヌクレオシド誘導体に由来する部分構造を備えるオリゴヌクレオチドにおいて、オリゴヌクレオチドが有するリン酸基などに起因する負電荷の少なくとも一部を中和することができるという電荷調節能を備えることができる。

20

## 【0019】

また、当該部分構造を備えるオリゴヌクレオチドの細胞膜透過性を向上させることができる。

## 【0020】

さらに、本ヌクレオシド誘導体に由来する部分構造を備えるオリゴヌクレオチドにおいて、リボヌクレアーゼ耐性を向上させることができる。

## 【0021】

本明細書中、式等で表される化合物における置換基における「低級」の意は、該置換基を構成する炭素数が、最大10個までであることを意味している。例えば、通常は炭素数1~6個、又は炭素数1~5個が例示され、さらには炭素数1~4個、又は炭素数1~3個であることが好ましい例として挙げられる。

30

## 【0022】

以下、本明細書に開示される本ヌクレオシド誘導体又はその塩及びこれらの利用について説明する。

## 【0023】

(ヌクレオシド誘導体及びその塩)

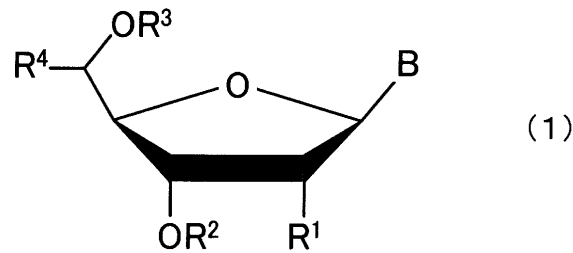
本ヌクレオシド誘導体又はその塩の一つの態様は、以下の式(1)で表されるヌクレオシド誘導体又はその塩である。

40

## 【0024】



## 【化4】



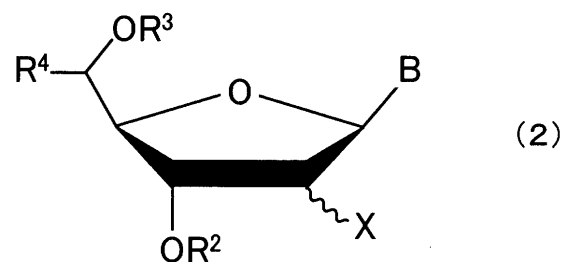
## 【0025】

10

また、本ヌクレオシド誘導体又はその塩の他の一つの態様は、以下の式(2)で表されるヌクレオシド誘導体又はその塩である。

## 【0026】

## 【化5】



20

## 【0027】

[R<sup>1</sup>について]

式(1)中、R<sup>1</sup>は、水素原子、水酸基、水素原子がアルキル基又はアルケニル基で置換された水酸基又は保護された水酸基を表す。R<sup>1</sup>が水素原子のとき、本ヌクレオシド誘導体は、デオキシリボヌクレオシド誘導体である。R<sup>1</sup>が、水酸基、水素原子がアルキル基又はアルケニル基で置換された水酸基又は保護された水酸基であるとき、本ヌクレオシド誘導体は、リボヌクレオシド誘導体である。

30

## 【0028】

## [Xについて]

式(2)中、Xは、ハロゲン原子を表す。ハロゲン原子としては、特に限定するものではないが、塩素原子、ヨウ素原子、フッ素原子及び臭素原子等が挙げられる。Xがハロゲン原子のとき、本ヌクレオシド誘導体は、デオキシリボヌクレオシド誘導体である。なお、ハロゲン原子は、式(2)からも明らかのように、リボースの2'位の炭素原子に対する結合方向は特に限定するものではないが、天然のリボースの水酸基に相当するようにハロゲン原子が結合することが好適である。

## 【0029】

## (アルキル基)

本明細書中、アルキル基としては、直鎖状、分枝状、環状、又はそれらの組み合わせである飽和炭化水素基が挙げられる。通常は、低級アルキル基が好ましく、例えば炭素数1~6個の低級アルキル基、又は炭素数1~5個の低級アルキル基がより好ましい例として挙げられ、さらに炭素数1~4個又は炭素数1~3個の低級アルキル基が特に好ましい例として挙げられる。直鎖状の炭素数1から4までのアルキル基としては、メチル基、エチル基、n-プロピル基、又n-ブチル基等が好適な例として挙げられ、このうち、メチル基、エチル基、n-プロピル基が好ましく、また例えばメチル基、エチル基が好ましく、また例えばメチル基が好ましい。また分枝状の炭素数1から4までのアルキル基としては、イソプロピル基、イソブチル基、s-ブチル基、t-ブチル基等が挙げられ、このうち、イソプロピル基が特に好ましい例として挙げられる。又、環状の炭素数1から4までのアルキル基としては、シクロプロピル基、シクロブチル基、又はシクロプロピルメチル基

40

50

等が挙げられる。

【0030】

(アルケニル基)

本明細書中、アルケニル基としては、直鎖状、分枝状、環状、又はそれらの組み合わせである飽和炭化水素基が挙げられる。通常は、低級アルケニル基が好ましく、低級アルケニル基としては、例えばエテニル基、1-プロペニル基、2-プロペニル基、1-メチル-2-プロペニル基、1-メチル-1-プロペニル基、2-メチル-1-プロペニル基、1-ブテニル基、2-ブテニル基などが挙げられる。

【0031】

(水酸基の保護基又は保護された水酸基)

本明細書において、水酸基の保護基としては、当業者に周知であって、例えば、Protective Groups in Organic Synthesis (John Wiley and Sons、2007年版)を参考にすることができる。水酸基の保護基としては、代表的な例を挙げると、例えば、脂肪族アシル基、芳香族アシル基、低級アルコキシメチル基、適宜の置換基があってもよいオキシカルボニル基、適宜の置換基があってもよいテトラヒドロピラニル基、適宜の置換基があってもよいテトラチオピラニル基、合わせて1から3個の置換又は無置換のアリール基にて置換されたメチル基(但し前述の置換アリールにおける置換基としては、低級アルキル、低級アルコキシ、ハロゲン原子、又はシアノ基を意味する。)、又はシリル基、等が例示される。

10

【0032】

なお、本明細書中、アルコキシ基としては、直鎖状、分枝状、環状、又はそれらの組み合わせである飽和アルキルエーテル基が挙げられる。低級アルコキシ基が好ましく、低級アルコキシ基としては、例えば炭素数1~6個の低級アルコキシ基、又は炭素数1~5個の低級アルコキシ基が挙げられ、さらには炭素数1~4個、又は炭素数1~3個のアルコキシ基が好ましく、炭素数1~4個のアルコキシ基が特に好ましい。炭素数1~4個のアルコキシ基としては、メトキシ基、エトキシ基、n-プロポキシ基、又はn-ブトキシ基等が好ましい例として挙げられる。また、イソプロポキシ基、イソブトキシ基、s-ブトキシ基、又はt-ブトキシ基等も好ましい例として挙げられる。また、シクロプロポキシ基、シクロブトキシ基も好ましく、シクロプロピルメトキシ基も好ましい例として挙げられる。

20

30

【0033】

本明細書中、アルキルチオ基としては、直鎖状、分枝状、環状、又はそれらの組み合わせである飽和アルキルチオ基が挙げられる。低級アルキルチオ基が好ましく、低級アルキルチオ基としては、例えば炭素数1~6個の低級アルキルチオ基、又は炭素数1~5個の低級アルキルチオ基が好ましく、さらには炭素数1~4個の低級アルキルチオ基、又は炭素数1~3個までのアルキルチオ基が特に好ましい例として挙げられる。炭素数1~4個の飽和アルキルチオ基としては、例えば、メチルチオ基、エチルチオ基、n-プロピルチオ基、n-ブチルチオ基等が好ましい例として例示される。またイソプロピルチオ基、イソブチルチオ基、s-ブチルチオ基、又はt-ブチルチオ基等も好ましい例として例示される。またシクロプロピルチオ基、又はシクロブチルチオ基が好ましい例として挙げられ、さらにシクロプロピルメチルチオ基がさらに好ましい例として例示される。

40

【0034】

これらのうち、脂肪族アシル基、芳香族アシル基、シリル基が特に好ましい例として挙げられる。また、合わせて1から3個の置換又は無置換のアリール基にて置換されたメチル基(但しその置換アリールにおける置換基は、前述の通り)も好ましい例として挙げられる。

【0035】

上記の脂肪族アシル基としては、例えば、アルキルカルボニル基、カルボキシアルキルカルボニル基、ハロゲン低級アルキルカルボニル基、又は低級アルコキシ低級アルキルカルボニルが挙げられる。

50

## 【0036】

なお、前記アルキルカルボニル基におけるアルキルは前述の説明の通りである。すなわち、アルキルカルボニル基としては、例えばホルミル基、アセチル基、プロピオニル基、ブチリル基、イソブチリル基、ペンタノイル基、ピバロイル基、バレリル基、イソバレリル基、オクタノイル基、ノナノイル基、デカノイル基、3-メチルノナノイル基、8-メチルノナノイル基、3-エチルオクタノイル基、3,7-ジメチルオクタノイル基、ウンデカノイル基、ドデカノイル基、トリデカノイル基、テトラデカノイル基、ペンタデカノイル基、ヘキサデカノイル基、1-メチルペンタデカノイル基、14-メチルペンタデカノイル基、13,13-ジメチルテトラデカノイル基、ヘプタデカノイル基、15-メチルヘキサデカノイル基、オクタデカノイル基、1-メチルヘプタデカノイル基、ノナデカノイル基、アイコサノイル基、又はヘナイコサイル基が挙げられる。このうち、アセチル基、プロピオニル基、ブチリル基、イソブチリル基、ペンタノイル基、ピバロイル基が好ましい例として挙げられ、さらにはアセチル基が特に好ましい例として挙げられる。また前記カルボキシ化アルキルカルボニル基におけるアルキルは前述の説明の通りである。カルボキシ化の置換位置などについても適宜選択できる。すなわち、カルボキシ化アルキルカルボニル基としては、例えばスクシノイル基、グルタロイル基、アジポイル基が挙げられる。

10

## 【0037】

前記ハロゲン低級アルキルカルボニル基における、ハロゲン、低級、及びアルキルについては前述の説明の通りである。ハロゲンの置換位置などについても適宜選択できる。すなわち、ハロゲン低級アルキルカルボニル基としては、例えばクロロアセチル基、ジクロロアセチル基、トリクロロアセチル基、トリフルオロアセチル基が挙げられる。

20

## 【0038】

前記低級アルコキシ低級アルキルカルボニル基における、アルコキシ及びアルキル、さらに低級については前述の説明の通りである。低級アルコキシが置換する位置などについても適宜選択できる。すなわち、低級アルコキシ低級アルキルカルボニル基として、例えばメトキシアセチル基が挙げられる。

## 【0039】

上記の芳香族アシル基としては、例えば、アリールカルボニル基、ハロゲンアリールカルボニル基、低級アルキル化アリールカルボニル基、低級アルコキシ化アリールカルボニル基、カルボキシ化アリールカルボニル基、ニトロ化アリールカルボニル基、又はアリール化アリールカルボニル基が挙げられる。

30

## 【0040】

前記アリールカルボニル基としては、例えばベンゾイル基、 $\alpha$ -ナフトイル基、 $\beta$ -ナフトイル基が挙げられ、さらに好ましくはベンゾイル基が挙げられる。前記ハロゲンアリールカルボニル基としては、例えば、2-ブロモベンゾイル基、4-クロロベンゾイル基が挙げられる。前記低級アルキル化アリールカルボニル基としては、2,4,6-トリメチルベンゾイル基、4-トルオイル基、3-トルオイル基、2-トルオイル基が挙げられる。前記低級アルコキシ化アリールカルボニル基としては、例えば4-アニソイル基、3-アニソイル基、2-アニソイル基が挙げられる。

40

## 【0041】

前記カルボキシ化アリールカルボニル基としては、例えば2-カルボキシベンゾイル基、3-カルボキシベンゾイル基、4-カルボキシベンゾイル基が挙げられる。前記ニトロ化アリールカルボニル基としては、例えば、4-ニトロベンゾイル基、3-ニトロベンゾイル基、2-ニトロベンゾイル基が挙げられる。前記アリール化アリールカルボニル基としては、例えば、4-フェニルベンゾイル基が挙げられる。

## 【0042】

低級アルコキシメチル基としては、例えばメトキシメチル基、1,1-ジメチル-1-メトキシメチル基、エトキシメチル基、プロポキシメチル基、イソプロポキシメチル基、ブトキシメチル基、*t*-ブトキシメチル基が挙げられる。特に好ましくはメトキシメチル

50

基が挙げられる。

【0043】

適宜の置換基があってもよいオキシカルボニル基としては、低級アルコキシカルボニル基、ハロゲン又はシリル基で置換された低級アルコキシカルボニル基、又はアルケニルオキシカルボニル基が挙げられる。

【0044】

前記低級アルコキシカルボニル基としては、例えばメトキシカルボニル基、エトキシカルボニル基、*t*-ブトキシカルボニルイソブトキシカルボニル基が挙げられる。前記ハロゲン又はシリル基で置換された低級アルコキシカルボニル基としては、2,2-トリクロロエトキシカルボニル基、2-(トリメチルシリル)エトキシカルボニル基が挙げられる。

10

【0045】

前記アルケニルオキシカルボニル基としては、ビニルオキシカルボニル基が挙げられる。上記の、適宜の置換基があってもよいテトラヒドロピラニル基としては、例えばテトラヒドロピラン-2-イル基、又は、3-プロモテトラヒドロピラン-2-イル基が好ましい例として挙げられ、特に好ましくはテトラヒドロピラン-2-イル基が挙げられる。

【0046】

適宜の置換基があってもよいテトラチオピラニル基としては、例えばテトラヒドロチオピラン-2-イル基、4-メトキシテトラヒドロチオピラン-4-イル基が挙げられ、さらに好ましくはテトラヒドロチオピラン-2-イル基が挙げられる。合わせて1から3個の置換又は無置換のアリール基にて置換されたメチル基、においては、前述の置換アリールにおける置換基としては、低級アルキル、低級アルコキシ、ハロゲン、又はシアノ基を意味する。

20

【0047】

合わせて1から3個の置換又は無置換のアリール基にて置換されたメチル基としては、例えばベンジル基、*n*-ナフチルメチル基、*m*-ナフチルメチル基、ジフェニルメチル基、トリフェニルメチル基、*n*-ナフチルジフェニルメチル基が挙げられ、好ましくはベンジル基、トリフェニルメチル基が挙げられる。その他に、例えば9-アンスリルメチル4-メチルベンジル基、2,4,6-トリメチルベンジル基、3,4,5-トリメチルベンジル基が挙げられ、好ましくは、2,4,6-トリメチルベンジル基、3,4,5-トリメチルベンジル基が挙げられる。その他の種類として、例えば4-メトキシベンジル基、4-メトキシフェニルジフェニルメチル基、4,4'-ジメトキシトリフェニルメチル基が挙げられ、好ましくは4-メトキシベンジル基、4-メトキシフェニルジフェニルメチル基、4,4'-ジメトキシトリフェニルメチル基が挙げられる。さらには、例えば4-クロロベンジル基、4-プロモベンジル基が挙げられる。またその他に、例えば4-シアノベンジル基も好ましい例として挙げられる。

30

【0048】

本明細書中、シリル基としては、トリメチルシリル基、トリエチルシリル基、イソプロピルジメチルシリル基、*t*-ブチルジメチルシリル基、メチルジイソプロピルシリル基、メチルジ-*t*-ブチルシリル基、トリイソプロピルシリル基、ジフェニルメチルシリル基、ジフェニルブチルシリル基、ジフェニルイソプロピルシリルフェニルジイソプロピルシリル基が挙げられる。このなかでさらに好ましくは、トリメチルシリル基、*t*-ブチルジメチルシリル基、トリイソプロピルシリル基、ジフェニルメチルシリル基が挙げられ、特に好ましくは、トリメチルシリル基、*t*-ブチルジメチルシリル基、ジフェニルメチルシリル基が挙げられる。

40

【0049】

本明細書における水酸基の保護基としては、化学的方法(例えば、加水素分解、加水分解、電気分解、又は光分解など)、又は生物学的方法(例えば、人体内で加水分解等。想像するに微生物等での誘導など)、のいずれかの方法により開裂し、脱離する置換基を意味する場合もある。水酸基の保護基としては、特に、加水素分解、又は加水分解により脱

50

離する置換基が好ましい例として挙げられる。なお、保護された水酸基は、かかる保護基で水素原子が置換された水酸基ということができる。

【 0 0 5 0 】

[ R<sup>2</sup>及びR<sup>3</sup>について]

式(1)及び式(2)中、R<sup>2</sup>及びR<sup>3</sup>は、互いに同一又は異なってもよく、水素原子、水酸基の保護基、リン酸基、保護されたリン酸基、又は - P ( = O )<sub>n</sub> ( R<sup>5</sup> ) R<sup>6</sup>を表す。水酸基の保護基は既に説明したとおりである。

【 0 0 5 1 】

( 保護されたリン酸基 )

保護されたリン酸基における保護基は当業者公知であり、上述の参考文献や説明を参考にすることができる。

10

【 0 0 5 2 】

リン酸基の保護基としては、例えば、低級アルキル基、シアノ基で置換された低級アルキル基、シリル基で置換されたエチル基、ハロゲンで置換された低級アルキル基、低級アルケニル基、シアノ基で置換された低級アルケニル基、シクロアルキル基、シアノ基で置換された低級アルケニル基、アラルキル基、ニトロ基でアリアル環が置換されたアラルキル基、ハロゲンでアリアル環が置換されたアラルキル基、低級アルキル基で置換されたアリアル基、ハロゲンで置換されたアリアル基、又はニトロ基で置換されたアリアル基が挙げられる。

20

【 0 0 5 3 】

前記の低級アルキル基としては、前述したとおりである。前記のシアノ基で置換された低級アルキル基としては、例えば2 - シアノエチル基、2 - シアノ - 1、1 - ジメチルエチル基が挙げられ、特に好ましくは、2 - シアノエチル基が挙げられる。前記のシリル基で置換されたエチル基としては、例えば2 - メチルジフェニルシリルエチル基、2 - トリメチルシリルエチル基、2 - トリフェニルシリルエチル基が挙げられる。

【 0 0 5 4 】

前記のハロゲンで置換された低級アルキル基としては、例えば2, 2, 2 - トリクロロエチル基、2, 2, 2 - トリプロモエチル基、2, 2, 2 - トリフルオロエチル基、2, 2, 2 - トリクロロエチル基が挙げられ、特に好ましくは、2, 2, 2 - トリクロロエチル基が挙げられる。前記の低級アルケニル基としては、例えばエテニル基、1 - プロペニル基、2 - プロペニル基、1 - メチル - 2 - プロペニル基、1 - メチル - 1 - プロペニル基、2 - メチル - 1 - プロペニル基、1 - ブテニル基、2 - ブテニル基などが挙げられる。

30

【 0 0 5 5 】

前記のシアノ基で置換された低級アルケニル基としては、例えば2 - シアノエチル基、2 - シアノプロピル基、2 - シアノブテニル基が挙げられる。前記のアラルキル基としては、例えばベンジル基、 $\alpha$ -ナフチルメチル基、 $\beta$ -ナフチルメチル基、インデニルメチル基、フェナンスレニルメチル基、アントラセニルメチル基、ジフェニルメチル基、トリフェニルメチル基、1 - フェネチル基、2 - フェネチル基、1 - ナフチルエチル基、2 - ナフチルエチル基、1 - フェニルプロピル基、2 - フェニルプロピル基、3 - フェニルプロピル基、1 - ナフチルプロピル、2 - ナフチルプロピル、3 - ナフチルプロピル、1 - フェニルブチル基、2 - フェニルブチル基、3 - フェニルブチル基、4 - フェニルブチル基が挙げられ、さらに好ましくは、ベンジル基、ジフェニルメチル基、トリフェニルメチル基、1 - フェネチル基、2 - フェネチル基が挙げられ、特に好ましくは、ベンジル基が挙げられる。

40

【 0 0 5 6 】

前記のニトロ基でアリアル環が置換されたアラルキル基としては、2 - ( 4 - ニトロフェニル ) エチル基、0 - ニトロベンジル基、4 - ニトロベンジル基、2, 4 - ジニトロベンジル基、4 - クロロ - 2 - ニトロベンジル基などが挙げられる。

【 0 0 5 7 】

50

本明細書においてリン酸の保護基としては、化学的方法（例えば、加水素分解、加水分解、電気分解、又は光分解など）、又は生物学的方法（例えば、人体内で加水分解等。想像するに微生物等での誘導など）、のいずれかの方法により開裂し、脱離する置換基を意味する場合もある。リン酸の保護基としては、特に、加水素分解、又は加水分解により脱離する置換基が好ましい例として挙げられる。

【0058】

( - P ( = O )<sub>n</sub> ( R<sup>5</sup> ) R<sup>6</sup> )

本発明のヌクレオシド類縁体の R<sup>2</sup> 及び R<sup>4</sup> は、 - P ( = O )<sub>n</sub> ( R<sup>5</sup> ) R<sup>6</sup> となる場合がある。 n は 0 又は 1 を示し、 R<sup>5</sup> 及び R<sup>6</sup> は、互いに同一又は異なってもよく、水素原子、水酸基、保護された水酸基、メルカプト基、保護されたメルカプト基、低級アルコキシ基、シアノ低級アルコキシ基、アミノ基、又は置換されたアミノ基のいずれかを示す。ただし、 n が 1 のときには、 R<sup>5</sup> 及び R<sup>6</sup> が共に水素原子となることはない。保護された水酸基及び低級アルコキシ基については、既に説明したとおりである。

10

【0059】

( 保護されたメルカプト基 )

保護されたメルカプト基は、当業者において周知である。保護されたメルカプト基としては、例えば上記水酸基の保護基として挙げたものの他、例えばアルキルチオ基、アリールチオ基、脂肪族アシル基、芳香族アシル基が挙げられる。好ましくは、脂肪族アシル基、芳香族アシル基が挙げられ、特に好ましくは、芳香族アシル基が挙げられる。アルキルチオ基としては、低級アルキルチオ基が好ましく、例えば、メチルチオ、エチルチオ、*tert*-ブチルチオ基が好ましい例として挙げられる。アリールチオ基としては、例えばベンジルチオが挙げられる。また芳香族アシル基としてはベンゾイル基が挙げられる。

20

【0060】

前記のシアノ低級アルコキシ基としては、例えば、シアノ基が置換した直鎖状、分枝状、環状、又はそれらの組み合わせである炭素数 1 ~ 5 個のアルコキシ基（なお、シアノ基中の炭素の数を含めずに数えた場合）が好ましい例として挙げられ、具体的には例えば、シアノメトキシ、2 - シアノエトキシ、3 - シアノプロポキシ、4 - シアノブトキシ、3 - シアノ 2 - メチルプロポキシ、又は 1 - シアノメチル - 1 , 1 - ジメチルメトキシ等が挙げられ、特に好ましくは、2 - シアノエトキシ基が挙げられる。

【0061】

R<sup>5</sup> 及び R<sup>6</sup> として、置換されたアミノ基が選択できる。そのアミノ基の置換基は、低級アルコキシ基、低級アルキルチオ基、シアノ低級アルコキシ基、又は低級アルキル基のいずれかを示す。なお前記 R<sup>5</sup> 及び R<sup>6</sup> が共に、置換されたアミノ基である場合では、該置換されたアミノ基として互いに異なった置換されたアミノ基であってもよい。前記の低級アルコキシ基、低級アルキルチオ基、シアノ低級アルコキシ基、及び低級アルキル基は、前述に説明された通りである。

30

【0062】

- P ( = O )<sub>n</sub> ( R<sup>5</sup> ) R<sup>6</sup> としては、より具体的には、ホスホロアミダイト基、H - ホスホネート基、又はホスホニル基が好ましい例として挙げられ、ホスホロアミダイト基が特に好ましい例として挙げられる。

40

【0063】

- P ( = O )<sub>n</sub> ( R<sup>5</sup> ) R<sup>6</sup> において、 n が 0 であり、 R<sup>5</sup> 及び R<sup>6</sup> の少なくとも一方が置換されたアミノ基であり、他方は何であってもよい場合には、ホスホロアミダイト基となる。ホスホロアミダイト基としては、 R<sup>5</sup> 及び R<sup>6</sup> の一方が置換されたアミノ基であり、他方が低級アルコキシ基、又はシアノ低級アルコキシ基であるホスホロアミダイト基が、縮合反応の反応効率が良好であり、特に好ましい。その置換されたアミノ基としては、例えば、ジエチルアミノ基、ジイソプロピルアミノ基、ジメチルアミノ基等が好ましい例として挙げられ、特に好ましくはジイソプロピルアミノ基が例示される。また、 R<sup>5</sup> 及び R<sup>6</sup> の他方の置換基における低級アルコキシ基としては、メトキシ基が好ましい例として挙げられる。また、シアノ低級アルコキシ基としては、2 - シアノエチル基が好ましい例として

50

挙げられる。ホスホロアミダイト基としては、具体的には、 $-P(OC_2H_4CN)(N(CH(CH_3)_2)_2)$ 、又は $-P(OCH_3)(N(CH(CH_3)_2)_2)$ が好ましい例として挙げられる。

【0064】

$-P(=O)_n(R^5)R^6$ において、 $n$ が1であり、 $R^5$ 及び $R^6$ の少なくとも一方が水素原子であり、他方は水素原子以外であれば何であってもよい場合には、 $H$ -ホスホネート基となる。その、水素以外の置換基としては、例えば、ヒドロキシル基、メチル基、メトキシ基、チオール基等が挙げられ、特に好ましくはヒドロキシル基が例示される。

【0065】

また、 $-P(=O)_n(R^5)R^6$ において、 $n$ が1であり、 $R^5$ 及び $R^6$ が共に低級アルコキシ基である場合には、ホスホニル基となる。なお、 $R^5$ 及び $R^6$ における低級アルコキシ基は互いに同一でも相違していてもよい。その低級アルコキシ基としては、例えば、メトキシ基、エトキシ基等が好ましい例として挙げられる。ホスホニル基としては、具体的には、 $-P(=O)(OCH_3)_2$ が挙げられる。

10

【0066】

本ヌクレオシド誘導体における $R^2$ としては、例えば、 $-P(=O)_n(R^5)R^6$ であることが特に好ましい。 $-P(=O)_n(R^5)R^6$ としては、ホスホロアミダイト基、 $H$ -ホスホネート基、又はホスホニル基が好ましい例として挙げられる。 $R^2$ としては、その他にリン酸基、又は保護されたリン酸基であることも好ましい。さらに $R^2$ としては、水素原子、又は水酸基の保護基であることも好ましい。

20

【0067】

$R^2$ の具体的な他の例示としては、水素原子、アセチル基、ベンゾイル基、ベンジル基、 $p$ -メトキシベンジル基、トリメチルシリル基、 $tert$ -ブチルジフェニルシリル基、 $-P(OC_2H_4CN)(N(CH(CH_3)_2)_2)$ 、 $-P(OCH_3)(N(CH(CH_3)_2)_2)$ 、又はホスホニル基が好ましい例として挙げられる。

【0068】

本ヌクレオシド誘導体における $R^3$ としては、例えば、水素原子又は水酸基の保護基が好ましい。また例えば、リン酸基、保護されたリン酸基、又は $-P(=O)_n(R^5)R^6$ であることも好ましい。 $R^3$ としての具体的な例示を挙げると、水素原子、アセチル基、ベンゾイル基、ベンジル基、 $p$ -メトキシベンジル基、ジメトキシトリチル基、モノメトキシトリチル基、 $tert$ -ブチルジフェニルシリル基、又はトリメチルシリル基が好ましい例として挙げられる。

30

【0069】

[ $R^4$ について]

式(1)及び式(2)中、 $R^4$ は、それぞれ連結基を有する $NHR^7$ 、アジド基、アミノ基又はグアニジノ基を表すことができる。すなわち、 $NHR^7$ 、アジド基、アミノ基又はグアニジノ基は、それぞれが連結基を介して5'位の炭素原子に結合している。

【0070】

連結基としては、例えば、炭素数1個以上の2価炭化水素基を表すことができる。すなわち、2価の炭化水素基としては、炭素数1~8個以下のアルキレン基、炭素数2~8個以下のアルケニレン基などが挙げられる。

40

【0071】

連結基としてのアルキレン基としては、直鎖状、分枝状であってもよいが、好ましくは直鎖状である。例えば、低級アルキル基が好ましく、例えば炭素数1~6個の低級アルキル基、また例えば、炭素数1~6個の低級アルキル基が好ましく、また例えば、炭素数2~4個又は炭素数2~3個の低級アルキル基が好ましい。直鎖状の炭素数1から6までのアルキル基としては、メチレン基、エチレン基、プロパン-1、3-ジイル基、 $n$ -ブタン-1, 1-ジイル基、 $n$ -ペンチル-1-5, -ジイル基、 $n$ -ヘキシル-1, 6-ジイル基等が挙げられる。また、例えば、ブタン-1, 2-ジイル基等が挙げられる。また例えば、エチレン基、プロパン-1, 3-ジイル基、 $n$ -ブタン-1, 1-ジイル基が特

50

に好ましい例として挙げられる。

【0072】

連結基としてのアルケニレン基としては、直鎖状、分枝状であり、好ましくは直鎖状である。例えば、低級アルケニレン基が好ましく、低級アルケニレン基としては、例えば、エテン-1,2-ジイル基、プロペン-1,3-ジイル基、ブテン-1,4-ジイル基等が挙げられる。

【0073】

式(1)で表されるヌクレオシド誘導体においては、例えばエチレン基などの炭素数2以上のアルキレン基などの2価炭化水素基であることがオリゴヌクレオチド誘導体のヌクレアーゼ耐性及び細胞膜透過性の観点から好適である。また、式(2)で表されるヌクレオシド誘導体においては、例えばエチレン基などの炭素数1以上のアルキレン基などの2価炭化水素基であってもヌクレアーゼ耐性及び細胞膜透過性の観点から好適である。

【0074】

$R^7$ としては、水素原子、アルキル基又はアルケニル基又はアミノ基の保護基が挙げられる。アルキル基は、既に説明したアルキル基のほか、低級アルキル基が好ましく挙げられる。アルケニル基としては、既に説明したアルケニル基のほか、低級アルケニル基が好ましく挙げられる。 $R^7$ が水素原子などこれらの基であるとき、連結基は、炭素数2以上、また例えば3以上、また例えば4以上で、例えば6以下、また例えば5以下、また例えば4以下のアルキレン基であることが好適である。

【0075】

また、 $R^7$ が水素原子のとき、 $R^4$ は、連結基を有する $NH_2$ (アミノ基)、すなわち、連結基がアルキレン基やアルケニレン基のときには、アミノアルキル基やアミノアルケニル基などとなる。式(1)及び式(2)中、 $R^4$ がアミノアルキル基などであることにより、本ヌクレオシド誘導体及び本ヌクレオシド誘導体に由来するモノマーユニットを備えるオリゴヌクレオチド誘導体は、周囲のpH環境において電荷が変化するという特徴を伴う電荷付与性を発揮することができる。例えば、酸性下ではカチオン性であり、生理的条件下の中性ではプラス電荷が減少して電荷ゼロとなりうる。すなわち、かかる電荷調節能によれば、pH環境を変化させることで、必要時にヌクレオシド誘導体の電荷をダイナミックに変化させたり、所望の電荷を付与したりすることができる。したがって、このような本ヌクレオシド誘導体によれば、オリゴヌクレオチドの電荷を従来とは異なる態様であるいは従来よりも一層高い自由度で調整できるようになる。以上のことから、 $R^3$ がかかるアミノアルキル基などである本ヌクレオシド誘導体は、オリゴヌクレオチド等に対する電荷(正電荷)付与剤又は電荷調節剤として有用である。

【0076】

$R^3$ としては、それぞれ連結基を有する、アジド基、アミジノ基、すなわち、 $CH_3(NH)C(NH)-$ (アミジンのアミノ基から水素原子1個を除いたもの)、グアニジノ基、すなわち、 $NH_2(NH)C(NH)-$ (グアニジンのアミノ基から水素原子1個を除いたもの)が挙げられる。なかでも、グアニジノ基が挙げられる。 $R^3$ が、これらの基を有するとき、連結基は、炭素数1以上、また例えば2以上などのアルキレン基又はアルケニレン基などとすることができる。なお、 $R^4$ が、連結基を有するアミジノ基、グアニジノ基のときには、既述のアミノアルキル基などのときとは異なり、常にカチオン性となる。かかる本ヌクレオシド誘導体は、 $R^4$ がアミノアルキル基などである本ヌクレオシド誘導体と組み合わせて用いるのに有用である。

【0077】

アミノ基に対する保護基は、当業者に周知されており、前述の参考文献を参照することができる。具体的には、上記にて水酸基の保護基として挙げたものの他、例えばベンジル基、メチルベンジル基、クロロベンジル基、ジクロロベンジル基、フルオロベンジル基、トリフルオロメチルベンジル基、ニトロベンジル基、メトキシフェニル基、メトキシメチル(MOM)基、N-メチルアミノベンジル基、N,N-ジメチルアミノベンジル基、フェナシル基、アセチル基、トリフルオロアセチル基、ピバロイル基、ベンゾイル基、フタ

10

20

30

40

50



ルイミド基、アリルオキシカルボニル基、2, 2, 2 - トリクロロエトキシカルボニル基、ベンジルオキシカルボニル基、t - ブトキシカルボニル (B o c) 基、1 - メチル - 1 - (4 - ビフェニル) エトキシカルボニル (B p o c) 基、9 - フルオレニルメトキシカルボニル基、ベンジルオキシメチル (B O M) 基、又は2 - (トリメチルシリル) エトキシメチル (S E M) 基などが挙げられる。さらに好ましくは、ベンジル基、メトキシフェニル基、アセチル基、トリフルオロアセチル (T F A) 基、ピバロイル基、ベンゾイル基、t - ブトキシカルボニル (B o c) 基、1 - メチル - 1 - (4 - ビフェニル) エトキシカルボニル (B p o c) 基、9 - フルオレニルメトキシカルボニル基、ベンジルオキシメチル (B O M) 基、又は2 - (トリメチルシリル) エトキシメチル (S E M) 基が挙げられ、特に好ましくは、ベンジル基、メトキシフェニル基、アセチル基、ベンゾイル基、ベンジルオキシメチル基が挙げられる。

10

## 【0078】

本発明においてアミノ基の保護基としては、化学的方法 (例えば、加水素分解、加水分解、電気分解、又は光分解など)、又は生物学的方法 (例えば、人体内で加水分解等。想像するに微生物等での誘導など)、のいずれかの方法により開裂し、脱離する置換基を意味する場合もある。特に、加水素分解、又は加水分解により脱離する置換基がアミノ基の保護基として好ましい。

## 【0079】

[B : 塩基について]

本ヌクレオシド誘導体におけるB : 塩基としては、公知の天然塩基ほか、人工塩基が挙げられる。例えば、Bとしては、プリン - 9 - イル基、2 - オキソ - ピリミジン - 1 - イル基、置換プリン - 9 - イル基、又は置換2 - オキソ - ピリミジン - 1 - イル基が選択できる。

20

## 【0080】

すなわち、Bとしては、プリン - 9 - イル基、又は2 - オキソ - ピリミジン - 1 - イル基が挙げられるほか、2, 6 - ジクロロプリン - 9 - イル、又は2 - オキソ - ピリミジン - 1 - イルが挙げられる。さらに、2 - オキソ - 4 - メトキシ - ピリミジン - 1 - イル、4 - (1H - 1, 2, 4 - トリアゾール - 1 - イル) - ピリミジン - 1 - イル、又は2, 6 - ジメトキシプリン - 9 - イルが挙げられる。

## 【0081】

さらに、アミノ基が保護された2 - オキソ - 4 - アミノ - ピリミジン - 1 - イル、アミノ基が保護された2 - アミノ - 6 - プロモプリン - 9 - イル、アミノ基が保護された2 - アミノ - 6 - ヒドロキシプリン - 9 - イル、アミノ基及び/又は水酸基が保護された2 - アミノ - 6 - ヒドロキシプリン - 9 - イル、アミノ基が保護された2 - アミノ - 6 - クロロプリン - 9 - イル、アミノ基が保護された6 - アミノプリン - 9 - イル、又はアミノ基が保護された4 - アミノ - 5 - メチル - 2 - オキソ - ピリミジン - 1 - イル基が挙げられる。なお、水酸基及びアミノ基の各保護基については、既に説明したとおりである。

30

## 【0082】

さらに、6 - アミノプリン - 9 - イル (アデニン)、2 - アミノ - 6 - ヒドロキシプリン - 9 - イル (グアニジン)、2 - オキソ - 4 - アミノ - ピリミジン - 1 - イル (シトシン)、2 - オキソ - 4 - ヒドロキシ - ピリミジン - 1 - イル (ウラシル)、又は2 - オキソ - 4 - ヒドロキシ - 5 - メチルピリミジン - 1 - イル (チミン) が挙げられる。

40

## 【0083】

さらにまた、4 - アミノ - 5 - メチル - 2 - オキソ - ピリミジン - 1 - イル (メチルシトシン)、2, 6 - ジアミノプリン - 9 - イル、6 - アミノ - 2 - フルオロプリン - 9 - イル、6 - メルカプトプリン - 9 - イル、4 - アミノ - 2 - オキソ - 5 - クロロ - ピリミジン - 1 - イル、又は2 - オキソ - 4 - メルカプト - ピリミジン - 1 - イルが挙げられる。

## 【0084】

また、6 - アミノ - 2 - メトキシプリン - 9 - イル、6 - アミノ - 2 - クロロプリン -

50

9 - イル、2 - アミノ - 6 - クロロプリン - 9 - イル、又は2 - アミノ - 6 - プロモプリン - 9 - イルが挙げられる。

【0085】

置換プリン - 9 - イル基、又は置換2 - オキソ - ピリミジン - 1 - イル基それぞれにおける置換基は、水酸基、保護された水酸基、低級アルコキシ基、メルカプト基、保護されたメルカプト基、低級アルキルチオ基、アミノ基、保護されたアミノ基、低級アルキル基で置換されたアミノ基、低級アルキル基、低級アルコキシメチル基、又はハロゲン原子のいずれか一つ、又はそれらの複数の組み合わせのいずれかである。これらの置換基は、既に説明したとおりである。

【0086】

本ヌクレオシド誘導体におけるBとしては、置換プリン - 9 - イル基、又は置換2 - オキソ - ピリミジン - 1 - イル基における置換基が既述の各置換基が好ましいが、これに加えてさらに、トリアゾール基、低級アルコキシメチル基が加わることも好ましい。

【0087】

置換プリン - 9 - イル基の好ましい例としては、例えば、6 - アミノプリン - 9 - イル、2, 6 - ジアミノプリン - 9 - イル、2 - アミノ - 6 - クロロプリン - 9 - イル、2 - アミノ - 6 - プロモプリン - 9 - イル、2 - アミノ - 6 - ヒドロキシプリン - 9 - イル、6 - アミノ - 2 - メトキシプリン - 9 - イル、6 - アミノ - 2 - クロロプリン - 9 - イル、6 - アミノ - 2 - フルオロプリン - 9 - イル、2, 6 - ジメトキシプリン - 9 - イル、2, 6 - ジクロロプリン - 9 - イル、又は6 - メルカプトプリン - 9 - イル等が挙げられる。上述の置換基中にアミノ基や水酸基があれば、それらのアミノ基及び/又は水酸基が保護化された置換基が好ましい例として挙げられる。

【0088】

置換2 - オキソ - ピリミジン - 1 - イルとしては、例えば2 - オキソ - 4 - アミノ - ピリミジン - 1 - イル、1H - (1, 2, 4 - トリアゾール - 1 - イル) - ピリミジン - 1 - イル、4 - 1H - 1, 4 - アミノ - 2 - オキソ - 5 - クロロ - ピリミジン - 1 - イル、2 - オキソ - 4 - メトキシ - ピリミジン - 1 - イル、2 - オキソ - 4 - メルカプト - ピリミジン - 1 - イル、2 - オキソ - 4 - ヒドロキシ - ピリミジン - 1 - イル、2 - オキソ - 4 - ヒドロキシ - 5 - メチルピリミジン - 1 - イル、又は4 - アミノ - 5 - メチル - 2 - オキソ - ピリミジン - 1 - イル等が挙げられる。

また、2 - オキソ - 4 - メトキシ - ピリミジン - 1 - イル、又は4 - (1H - 1, 2, 4 - トリアゾール - 1 - イル) - ピリミジン - 1 - イルが好ましい例として挙げられる。

【0089】

こうしたBのうち、置換基中にアミノ基や水酸基があれば、それらのアミノ基又は水酸基が保護化された置換基が好ましい例として挙げられる。

【0090】

本ヌクレオシド誘導体は、塩であってもよい。塩の形態は特に限定されないが、一般的には酸付加塩が例示され、分子内対イオンの形態をとっていてもよい。又は置換基の種類によっては塩基付加塩が形成される場合もある。塩としては、薬学的に許容される塩が好ましい。薬学的に許容しうる塩を形成する酸及び塩基の種類は当業者には周知であり、例えばJ. Pharm. Sci., 1 - 19 (1977)に記載しているものなどを参考にすることができる。例えば、酸付加塩としては、鉱酸塩、有機酸塩が挙げられる。また、一個以上の置換基が酸性部分を含有する場合、塩基付加塩も好ましい例として挙げられる。

【0091】

鉱酸塩としては、例えば、塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩、硝酸塩、硫酸塩、硫酸水素酸塩、リン酸塩、リン酸水素酸塩などが挙げられる。通常は、塩酸塩、リン酸塩、が好ましい例として挙げられる。有機酸塩としては、例えば、酢酸塩、トリフルオロ酢酸塩、グルコン酸塩、乳酸塩、サリチル酸塩、クエン酸塩、酒石酸塩、アスコルビン酸塩、コハク酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、ギ酸塩、安息香酸塩、メタンスルホン酸塩、

10

20

30

40

50

エタンスルホン酸塩、又は p - トルエンスルホン酸塩などが挙げられる。通常は、酢酸塩等が好ましい例として挙げられる。塩基付加塩としては、アルカリ金属の塩、アルカリ土類金属の塩、有機アミン塩、アミノ酸の付加塩が挙げられる。

【 0 0 9 2 】

前記のアルカリ金属の塩としては、例えばナトリウム塩、カリウム塩などが挙げられる。また、アルカリ土類金属の塩としては、例えば、マグネシウム塩、カルシウム塩などが挙げられる。有機アミン塩としては、例えば、トリエチルアミン塩、ピリジン塩、プロカイン塩、ピコリン塩、ジシクロヘキシルアミン塩、ジエタノールアミン塩、トリエタノールアミン塩、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン塩等が例示される。また、アミノ酸の付加塩としては、例えば、アルギニン塩、リジン塩、オルニチン塩、セリン塩、グリシン塩、アスパラギン酸塩、グルタミン酸塩などが挙げられる。

10

【 0 0 9 3 】

本ヌクレオシド誘導体又はその塩は、水和物又は溶媒和物として存在する場合もあり、これらの物質も本明細書の開示の範囲に含まれる。本ヌクレオシド誘導体又はその塩は、後述の合成例や公知の方法に準じて、当業者は容易に製造することができる。

【 0 0 9 4 】

本ヌクレオシド誘導体は、オリゴヌクレオチドの少なくとも一部としてオリゴヌクレオチドに導入することで、一本鎖としてのオリゴヌクレオチド、二本鎖オリゴヌクレオチドのヌクレアーゼ耐性を向上させることができるほか、哺乳動物細胞等の細胞膜透過性を向上させることができる。すなわち、本ヌクレオシド誘導体は、それ自体は、ヌクレアーゼ耐性向上剤及び/又は細胞膜透過性付与剤として有用である。また、本ヌクレオシド誘導体は、4' に塩基性の置換基を備えることができる。これにより、オリゴヌクレオチド等におけるリン酸基などに由来する負電荷を調整することができるという電荷調節剤又は正電荷付与剤として機能することができる。

20

【 0 0 9 5 】

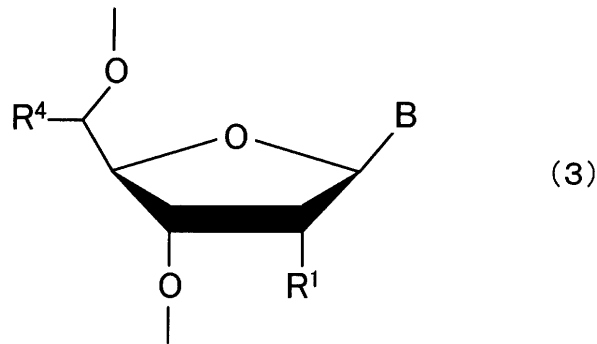
(オリゴヌクレオチド誘導体及びその塩)

本明細書に開示されるオリゴヌクレオチド誘導体(以下、本オリゴヌクレオチド誘導体ともいう。)は、式(3)及び式(4)で表される部分構造を少なくとも1個含有することができる。式(3)及び式(4)で表される部分構造は、それぞれ、式(1)及び式(2)で表されるヌクレオシド誘導体又はその塩に基づいて取得されうる。

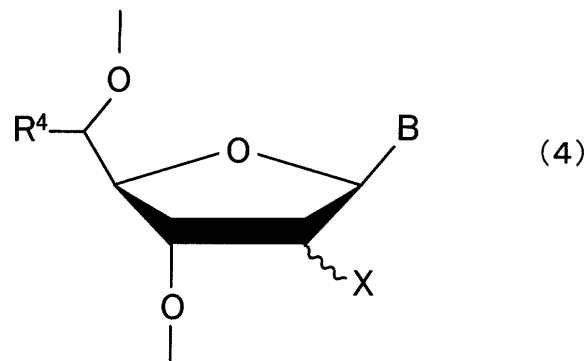
30

【 0 0 9 6 】

## 【化 6】



10



20

## 【0097】

式(3)及び式(4)で表される部分構造における $R^1$ 、 $X$ 、 $R^4$ 及び $B$ については、式(1)及び式(2)におけるのとそれぞれ同義である。

## 【0098】

式(3)及び式(4)で表される部分構造は、本オリゴヌクレオチド誘導体中において2個以上含んでいてもよい。その場合、これらの部分構造は、互いに同一であっても異なってもよい。また、本オリゴヌクレオチド誘導体に含まれる部分構造の全体は、式(3)で表される部分構造のみから構成されていてもよいし、式(4)で表される部分構造のみから構成されていてもよい。また、式(3)で表される部分構造1又は2以上有し、かつ式(4)で表される部分構造を1又は2以上有していてもよい。

30

## 【0099】

また、式(3)及び式(4)で表される部分構造の配置としては、互いに隣り合ってもよいし、離れて存在してもよい。例えば、本オリゴヌクレオチド誘導体は、前記部分構造を少なくとも、例えば、3個備えることができる。この場合、各部分構造を、本オリゴヌクレオチド誘導体の5'末端側、中央部及び3'末端側に略均等に備えることもできるし、そうでなくてもよい。ここで、当該部分構造を本オリゴヌクレオチド誘導体のこれら各部に略均等に備える、とは、これらの各部において、同数個を必ずしも部分構造を備えることを限定するものではなく、これら各部に少なくとも1個をそれぞれ備えることを少なくとも充足すれば足りる。例えば、各部に1~3個程度の部分構造を備える場合には、略均等ということができる。本オリゴヌクレオチド誘導体は、例えば、siRNAを意図する場合には、その鎖長は、概ね、18mer~25mer以下であり、典型的には、21mer~23merである。オリゴヌクレオチド誘導体は、例えば、少なくとも4個、また例えば、5個、また例えば6個の部分構造を備えることができる。また、本オリゴヌクレオチド誘導体は、当該部分構造を、特に限定するものではないが、例えば、8個以下、また例えば、7個以下、また例えば、6個以下備えることができる。

40

## 【0100】

式(3)で表される部分構造は、糖鎖部分がリボース又はデオキシリボースに由来していることから、本オリゴヌクレオチド誘導体は、オリゴリボヌクレオチドであってもよい

50

し、オリゴデオキシリボヌクレオチドであってもよい。また、本オリゴヌクレオチド誘導体は、リボヌクレオチドとデオキシリボヌクレオチドとのキメラであってもよい。

【0101】

本オリゴヌクレオチド誘導体は、それ自体一本鎖であるが、オリゴリボヌクレオチド、オリゴデオキシリボヌクレオチド、及びオリゴデオキシリボ/リボヌクレオチド（キメラ鎖）とのハイブリッド、すなわち、二本鎖の形態を採ることもできる。

【0102】

本オリゴヌクレオチド誘導体は、式(3)及び式(4)で表される部分構造以外の部分構造としては、その他の天然のヌクレオチド、又は公知のヌクレオシド誘導体及び/又はヌクレオチド誘導体などに該当する部分構造を備えることができる。本明細書において規定する部分構造及びその他の部分構造は、互いに、例えば、リン酸ジエステル結合、リン酸モノエステル結合、チオリン酸エステル結合等によって結合されうる。

10

【0103】

本オリゴヌクレオチド誘導体は、部分構造及びその他のヌクレオシド誘導体の個数を単位として、少なくとも2個以上、さらには8個以上であることが好ましく、特に好ましくは15個以上であることが挙げられる。上限としては特に限定されないが、例えば100個以下であり、また例えば、80個以下であり、また例えば、60個以下であり、また例えば、50個以下であり、また例えば、40個以下であり、また例えば、30個以下であり、また例えば、20個以下であってもよい。

【0104】

本オリゴヌクレオチド誘導体は、式(3)及び式(4)で表される部分構造ほか、その他の部分構造において、一個以上の不斉中心を有する場合があります、立体異性体が存在する場合も同様であって、立体異性体の任意の混合物、又はラセミ体などはいずれも本発明の範囲に包含される。また互変異性体として存在しうる場合もある。

20

【0105】

本オリゴヌクレオチド誘導体は、塩であってもよい。塩の形態は特に限定されないが、薬学的に許容される塩が好ましい例として挙げられる。塩については、既述の本ヌクレオシド誘導体における塩の態様を適用することができる。本オリゴヌクレオチド誘導体又はその塩としては、水和物や溶媒和物であってもよく、これらも本発明の範囲に含まれる。

【0106】

(本ヌクレオシド誘導体及び本オリゴヌクレオチド誘導体の製造)

本ヌクレオシド誘導体及び本オリゴヌクレオチド誘導体は、当業者であれば、後段の具体的な合成例のほか、本願出願時において公知のヌクレオシド及びオリゴヌクレオチドについての合成技術に基づいて、容易に合成されうる。

30

【0107】

本ヌクレオシド誘導体及び本オリゴヌクレオチド誘導体は、例えば下記の方法により製造できるが、本発明のヌクレオシド類縁体又はオリゴヌクレオチド類縁体の製造方法は下記の方法に限定されるものではない。

【0108】

それぞれの反応において、反応時間は特に限定されないが、後述の分析手段により反応の進行状態を容易に追跡できるため、目的物の収量が最大となる時点で終了すればよい。また、それぞれの反応は必要により、例えば、窒素気流下又はアルゴン気流下などの不活性ガス雰囲気で行うことができる。それぞれの反応において、保護基による保護及びその後の脱保護が必要な場合は、後述の方法を利用することにより適宜反応を行うことができる。

40

【0109】

なお、本明細書においては、Bnはベンジル基を示し、Acはアセチル基を示し、Bzはベンゾイル基を示し、PMBはp-メトキシベンジル基を示し、Trはトリフェニルメチル基を示し、TBAFは、テトラブチルアンモニウムフロライドを示し、TEMPOは、2,2,6,6-テトラメチルピペリジン 1-オキシドを示し、DDQは、2,3-ジクロロ-5,6-ジ

50

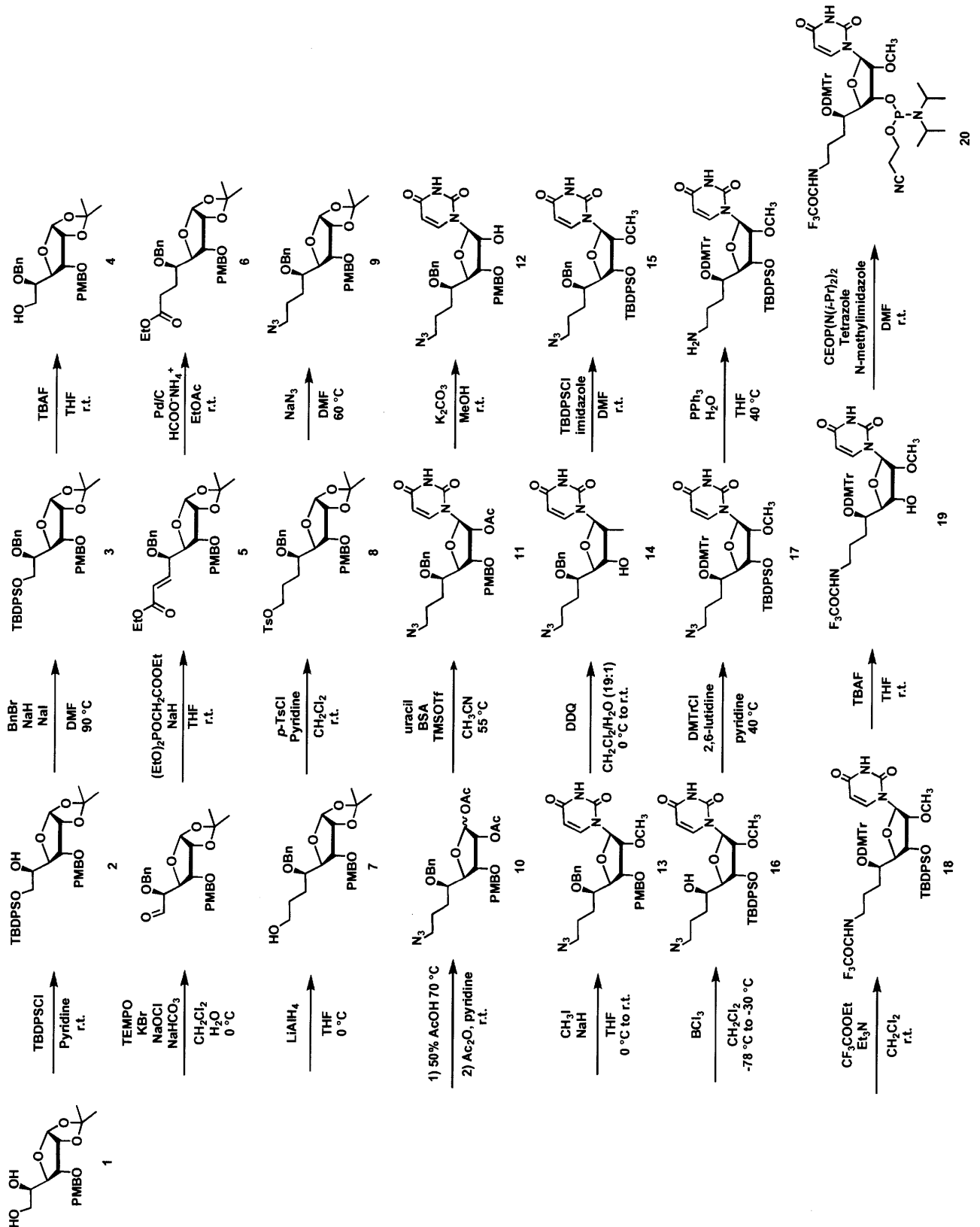
シアノ-p-ベンゾキノンを示し、 $\text{PPH}_3$ は、トリフェニルホスフィンを示し、 $\text{BCl}_3$ は、三塩化ホウ素を示し、THAは、トリフルオロアセチル基を示し、TsOは、トシルオキシ基を示し、MMTrは4-メトキシトリフェニルメチル基を示し、DMTrは4,4'-ジメトキシトリフェニルメチル基を示し、TMSはトリメチルシリル基を示し、TBDMsはtert-ブチルジメチルシリル基を示し、TBDPSはtert-ブチルジフェニルシリル基を示し、MOMはメトキシメチル基を示し、BOMはベンジルオキシメチル基を示し、SEMは2-(トリメチルシリル)エトキシメチル基を示す。

【0110】

例えば、本ヌクレオシド誘導体の一例は、以下のスキームに従い合成することができる。なお、以下のスキームは、グルコースを出発物質として、チミンリボヌクレオシド誘導体を合成し、本オリゴヌクレオチド誘導体の合成のためのホスホロアミダイト剤を合成するまでのスキームの一例である。

【0111】

## 【化7】



10

20

30

40

## 【0112】

常法に従い、グルコースから、上記化合物 1 を取得した。化合物 1 から、  
 Bioorganic & Medical Chemistry 11(2003)211-2226, Bioorganic & Chemistry letters(1999)2667-2672, The Journal of Organic Chemistry 2013, 78, 9956-9962, HELVETICA CHIMICA ACTA Vol. 83 (2000) 128-151等のほか、Bioorganic & Medical Chemistry 11(2003)211-2226, Bioorganic & Chemistry letters(1999)2667-2672及びNucleic Acids Res

50

earch, 43, (2015), 2993-3011の記載に基づいて化合物3ないし化合物20を得ることができる。

【0113】

式(3)及び(4)で表される部分構造を備える本オリゴヌクレオチド誘導体は、式(1)又は(2)で表される各種の本ヌクレオシド誘導体を、アミダイト剤等として利用することで容易に製造できる。すなわち、こうしたヌクレオシド誘導体を用いることで、公知のDNAシンセサイザーを用いて合成することができ、得られるオリゴヌクレオチド誘導体は、カラムを用いて精製し、生成物の純度を逆相HPLCやMALDI-TOF-MSで分析することにより、精製された本オリゴヌクレオチド誘導体を得ることができる。なお、本オリゴヌクレオチド誘導体を酸付加塩とする方法は、当業者に周知である。

10

【0114】

本オリゴヌクレオチド誘導体によれば、リボース5'位に連結基を介して所定のN含有基を備えることで、RNA干渉能等の生体におけるRNA機能を十分に維持しつつ、RNAの実質電荷量を調節でき、脂溶性(ファンデルワールス分子間力)を増強し、dsRNA溶解温度をさげることを実現できる。これにより、リボヌクレアーゼ耐性を向上させることができるほか、細胞膜透過性を向上させることができる。さらに、リン酸基等によるマイナス電荷を中和し、全体としての電荷を調節することもできる。

【0115】

本オリゴヌクレオチド誘導体においては、本部分構造を少なくとも1個備えることができる。また例えば、同2個備えることができる。本部分構造を複数個備えることで、細胞膜透過性、リボヌクレアーゼ耐性等を確実に向上させ、また調整することができる。また、本オリゴヌクレオチド誘導体は、本部分構造を少なくとも3個備えることもできる。

20

【0116】

本オリゴヌクレオチド誘導体においては、1個又は2個以上の本部分構造の備える部位は特に限定するものではないが、例えば、5'末端側及び3'末端側のいずれか及び双方に備えることができる。5'末端側及び3'末端側とは、それぞれ、本オリゴヌクレオチドのポリマー鎖の各末端から適数個の範囲の領域をいい、それぞれ、ポリマー鎖の全構成単位の、例えば30%を超えない構成単位からなる領域をいう。上記末端からの範囲の割合は、ポリマー鎖の全長によっても異なるが、例えば25%以下、また例えば20%以下、また例えば10%以下、また例えば5%以下などとすることができる。より具体的には、5'末端側及び3'末端側とは、例えば各末端から1個~30個、また例えば例えば1個~25個、また例えば1個~20個、また例えば1個~15個、また例えば1個~10個、また例えば1個~8個、また例えば1個~6個、また例えば1個~5個、また例えば1個~4個、また例えば1~3個、また例えば例えば1~2個のヌクレオシド誘導体由来の構成単位の領域とすることができる。本オリゴヌクレオチド誘導体は、こうした末端領域のいずれかに1個又は2個以上の本部分構造を備えることができる。好ましくは、2個以上備えることができる。また、本オリゴヌクレオチド誘導体は、5'末端及び3'末端(すなわち、各末端から1個目の構成単位)のいずれか又は双方に本部分構造を備えることもできる。

30

【0117】

本オリゴヌクレオチド誘導体においては、1個又は2個以上の本部分構造を、5'末端側及び3'末端側以外の部分である中央部に備えることもできる。本オリゴヌクレオチド誘導体が、中央部に本部分構造を備えることで、リボヌクレアーゼ耐性及び細胞膜透過性の向上や調整が一層容易になる。また、オリゴヌクレオチド全体の電荷の調整もより容易になる。

40

【0118】

本オリゴヌクレオチド誘導体は、5'末端側及び3'末端側のいずれか又は双方と中央部に本部分構造を備えることもできる。好ましくは5'末端側、3'末端側及び中央部の各部に1個又は2個以上の本部分構造を備えることができる。このように、全体として、おおよそ均等にあるいは分散して本部分構造を備えることで、リボヌクレアーゼ耐性及び

50



細胞膜透過性さらには電荷調節性を向上させることができる。本オリゴヌクレオチド誘導体の中央部には、本部分構造を2個以上備えることが、特性向上の観点から有用である。

【0119】

本オリゴヌクレオチド誘導体における本部分構造としては、式(3)で表されるリボヌクレオシド誘導体由来する部分構造、式(4)で表されるデオキシリボヌクレオチド誘導体由来する部分構造を用いることができる。なお、式(3)で表されるリボヌクレオシド誘導体及び式(4)の部分構造は、Bの塩基として、RNAにおける塩基であるウラシル(U)他を備えることで、リボヌクレオシド誘導体の代替物として用いることができる。

【0120】

また、本部分構造は、式(3)及び(4)における $R^4$ が、炭素数1又は2以上のアルキレン基を連結基として、 $NHR^7$ を有することが、リボヌクレアーゼ耐性及び細胞膜透過性さらには電荷調節性の観点から好適である。この場合、 $R^7$ は、水素原子であってもよいし、炭素数1~6程度のアルキル基を有するアシル基であってもよい。当該アルキレン基は、エチレン基、プロピレン基、ブチレン基、ペンチレン基、ヘキシレン基などとするることができる。また、例えばエチレン基、プロピレン基、ブチレン基などとするることができる。また例えば例えばエチレン基、プロピレン基などとするることができる。エチレン基、プロピレン基を連結基とすることで、メチレン基を用いた場合に比較して高いリボヌクレアーゼ耐性と細胞膜透過性さらには電荷調節性とを得ることができる。

【0121】

また、本部分構造は、連結基を備えるアミジノ基、アジド基及びグアニジノ基であってもよい。かかる官能基を備えることでも、高いリボヌクレアーゼ耐性及び細胞膜透過性を得ることができる。この場合、連結基は、炭素数1以上のアルキレン基であってもよい。

【0122】

また、本部分構造は、式(3)及び式(4)の $R^4$ の連結基が炭素数1~6程度のアルキル基、さらに、例えば、炭素数の下限が2以上、また例えば3以上であることが好適である。かかる構造は、リボヌクレアーゼ耐性及び細胞膜透過性に有効である。

【0123】

本オリゴヌクレオチド誘導体は、少なくとも本部分構造を少なくとも6個備えることが好適である。6個以上備えることで、リボヌクレアーゼ耐性や細胞膜透過性、さらには電荷調節性に有利である。

【0124】

本オリゴヌクレオチド誘導体は、例えば、siRNAとして利用できる。すなわち、二重鎖を形成したオリゴヌクレオチド誘導体は、生体内成分(RISCタンパク質)と複合体を形成して、配列特異的にmRNAを切断することにより、mRNA上の情報がリボソームにより特定のタンパク質へ翻訳されることをできなくする。また、miRNAを構成する構成物として、あるいはまたアプタマーRNAの構成物としても取り込まれて、リボヌクレアーゼ耐性や細胞膜透過性向上の特徴を生かしつつ、利用できると考えられる。さらに、他の化合物と連結してコンジュゲートを構成することもできる。さらにまた、本オリゴヌクレオチド誘導体は、リボザイムの構成物としても利用できる。また、本オリゴヌクレオチド誘導体は、RNAチップやその他の試薬としても有用である。

【0125】

このことから本オリゴヌクレオチド誘導体は、天然ヌクレオチドにはない特徴を生かして、抗腫瘍剤、抗ウイルス剤をはじめとする遺伝子の働きを阻害して疾病を治療する種々のRNA医薬品の構成物として、天然ヌクレオチドに優る有用性が期待される。すなわち、本オリゴヌクレオチド誘導体は、こうしたRNA医薬のほか、その原料又は中間体試薬として有用である。また、本ヌクレオシド誘導体は、こうしたRNA医薬の原料又は中間体として有用である。

【0126】

本オリゴヌクレオチド誘導体の電荷調節性、リボヌクレアーゼ耐性、細胞膜透過性、電

10

20

30

40

50

荷調節能ならびに本オリゴヌクレオチド誘導体を含む種々のRNAの生物活性については、当業者であれば、適宜、後述する実施例や本願出願時における当業者の周知の手法を参照することで容易に評価することができる。

【実施例】

【0127】

以下、本明細書の開示をより具体的に説明するために具体例としての実施例を記載する。以下の実施例は、本明細書の開示を説明するためのものであって、その範囲を限定するものではない。

【実施例1】

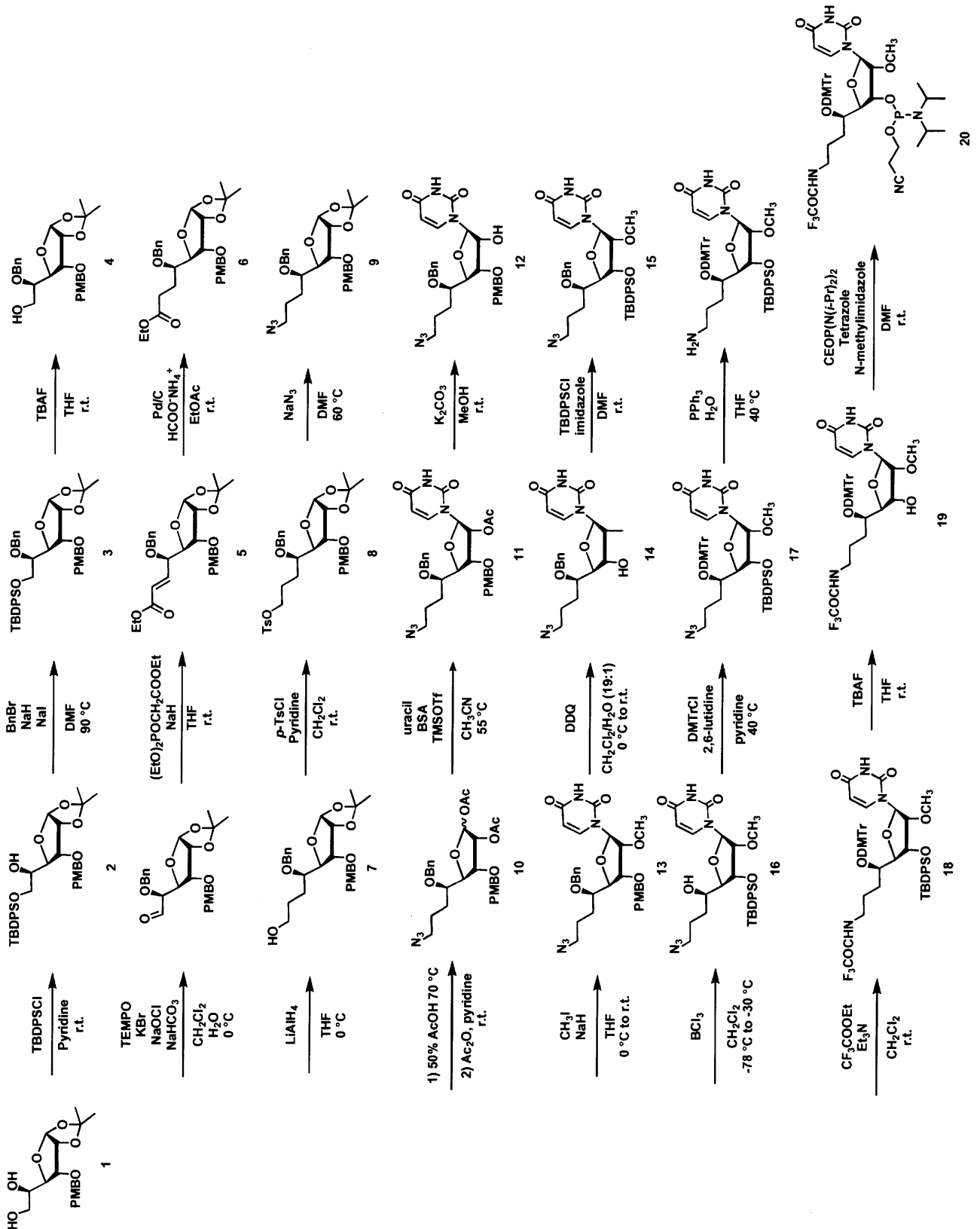
【0128】

(1)2 OCH<sub>3</sub>-5 アミノプロピルアミダイトユニット及び樹脂体の合成

以下のスキームに従い、2 OCH<sub>3</sub>-5 アミノプロピルアミダイトユニット及び樹脂体を合成した。

【0129】

## 【化 8】



10

20

30

40

## 【 0 1 3 0 】

1, 2-O-isopropylidene-3-O-(4-methoxybenzyl)-D-allofuranose (1)

グルコースを出発原料とし、既存の手法(Bioorganic & Medical Chemistry 11(2003)211-2226, Bioorganic & Chemistry letters(1999)2667-2672)を用いて目的物 1を合成した。

## 【 0 1 3 1 】

50

6-O-[(1, 1-dimethylethyl)diphenylsilyl]-1, 2-O-isopropylidene-3-O-(4-methoxybenzyl)- $\beta$ -D-allofuranose (2)

Ar雰囲気下で化合物 (1) 7.25 g (21.3 mmol) をpyridine 72 mLに溶かし、TBDPSCI 6.09 mL (23.4 mmol) を加えて室温で16時間30分攪拌。反応液をEtOAcとsat. NaHCO<sub>3</sub> aq. で生成物を抽出し、有機層を蒸留水、sat. NaCl aq.で洗い、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で乾燥した。溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Hexane : EtOAc = 3 : 1) で精製し、無色のオイル状化合物 (2) (11.34 g, 19.6 mmol, 92%) を得た。

【 0 1 3 2 】

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 7.69- 7.65 (m, 4 H), 7.44- 7.35 (m, 6 H), 7.19- 7.17 (m, 2 H), 6.81-6.80 (m, 2 H), 5.71 (d, J= 4.2 Hz, 1 H), 4.58 (d, J = 11 Hz, 1 H), 4.48 (t, J = 4.1 Hz, 1 H), 4.43 (d, J = 11.7 Hz, 1 H), 4.06 (dd, J = 8.6 Hz, 3.4 Hz, 1 H), 4.02- 4.04 (m, 1 H), 3.89 (dd, J = 8.6 Hz, 4.8 Hz, 1 H), 3.79 (s, 3 H), 3.75-3.73 (m, 2H), 2.55 (d, J = 3.5 Hz, 1 H), 1.55 (s, 3 H), 1.34 (s, 3 H), 1.06 (s, 9 H) ; <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 159.5, 135.8, 135.7, 129.9, 129.9, 129.8, 127.9, 113.9, 113.0, 104.2, 78.0, 77.9, 77.3, 72.1, 71.9, 64.7, 55.4, 27.0, 27.0, 26.7, 19.4 ; HRMS (ESI) m/zCalcd for C<sub>33</sub>H<sub>42</sub>NaO<sub>7</sub>Si (M+Na)<sup>+</sup>; 601.25975 found 601.25809

10

【 0 1 3 3 】

5-O-Benzyl-6-O-[(1,1-dimethylethyl)diphenylsilyl]-1, 2-O-isopropylidene-3-O-(4-methoxybenzyl)- $\beta$ -D-allofuranose (3)

Ar雰囲気下で化合物 (2) 11.34 g (19.6 mmol) をDMF 113 mLに溶かし、NaH 1.57 g (39.2 mmol) を加えて室温で30分攪拌。氷浴で冷却してBnBr 4.66 mL (39.2 mmol) 、 NaI 0.59 g (3.92 mmol) を加えて室温に戻し、90 °Cで5時間攪拌。5時間後、氷浴で冷却してMeOH 10 mLを加えて20分攪拌。反応液をEtOAcとsat. NaHCO<sub>3</sub> aq. で生成物を抽出し、有機層をsat. NaCl aq. で洗い、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で乾燥した。溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Hexane : EtOAc = 7 : 1) で精製し、黄色のオイル状化合物(3) (8.69 g, 13.0 mmol, 66%) を得た。

20

【 0 1 3 4 】

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 7.68- 7.64 (m, 4 H), 7.44- 7.39 (m, 2H), 7.35- 7.31 (m, 5H), 7.30- 7.26 (m, 5H), 7.12-7.10 (m, 2H), 6.76-6.74 (m, 2 H), 5.67 (d, J = 4.1 Hz, 1 H), 4.47 (d, J = 11.6 Hz, 1 H), 4.68 (d, J = 11.6 Hz, 1 H), 4.54 (d, J = 11.6 Hz, 1 H), 4.47 (t, J = 4.1 Hz, 1 H), 4.38 (d, J = 11.0 Hz, 1 H), 4.26 (dd, J = 8.2 Hz, 2.1 Hz, 1 H), 4.00-3.96 (m, 2H), 3.80-3.79 (m, 2H), 3.78 (s, 3 H), 1.57 (s, 3 H), 1.34 (s, 3 H), 1.04 (s, 9 H) ; <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 159.4, 139.3, 135.8, 135.8, 133.7, 133.6, 129.9, 129.7, 128.3, 127.8, 127.8, 127.6, 127.4, 113.8, 113.0, 104.2, 79.6, 78.0, 74.1, 71.7, 64.1, 55.4, 27.1, 27.0, 26.8, 19.3, 14.3 ; HRMS (ESI) m/zCalcd for C<sub>40</sub>H<sub>48</sub>NaO<sub>7</sub>Si (M+Na)<sup>+</sup>; 691.30670 found 691.30739

30

【 0 1 3 5 】

5-O-Benzyl-1, 2-O-isopropylidene-3-O-(4-methoxybenzyl)- $\beta$ -D-allofuranose (4)

Ar雰囲気下で化合物 (3) 3.67 g (5.49 mmol) をTHF 37 mLに溶かし、1 M TBAF (8.24 mmol) を加えて室温で19時間攪拌。反応液をEtOAcと蒸留水で生成物を抽出し、有機層をsat. NaCl aq. で洗い、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で乾燥した。溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Hexane : EtOAc = 3 : 1) で精製し、透明なオイル状化合物(4) (2.11 g, 4.91 mmol, 89%) を得た。

40

【 0 1 3 6 】

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 7.34- 7.32 (m, 2H), 7.30- 7.28 (m, 5H), 6.88- 6.86 (m, 2H), 5.72 (d, J = 4.1 Hz, 1H), 4.72 (d, J = 12.4 Hz, 1H), 4.70 (d, J = 11.0 Hz, 1H), 4.64 (d, J = 11.7 Hz, 1H), 4.56 (t, J = 3.42, 1H), 4.50 (d, J = 11.7 Hz, 1H), 4.21 (dd, J = 8.94 Hz, 2.04 Hz, 1H), 4.03 (dd, J = 8.9 Hz, 4.1 Hz, 1H), 3.

50

89- 3.87 (m, 1H), 3.80 (s, 3H), 3.67- 3.65 (m, 2H), 2.42 (t, J = 5.5 Hz, 1H), 1.59 (s, 1H), 1.36 (s, 1H) ;  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 159.6, 138.5, 129.9, 128.9, 128.3, 127.6, 127.5, 113.8, 112.9, 104.0, 80.0, 77.9, 77.2, 76.3, 73.3, 71.7, 61.9, 55.2, 26.8, 26.5 ; HRMS (ESI) m/z Calcd for  $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{NaO}_7$  (M+Na) $^+$ ; 453.18892 found 453.18636.

## 【 0 1 3 7 】

(R) -5-O-Benzyl-5-C-[2-ethoxycarbonyl-(E)-vinyl]-1, 2-O-isopropylidene-3-O-(4-methoxybenzyl)-D-ribose (5)

化合物 (4) 4.47 g (10.4 mmol) を  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  17.3 mL に溶かし、氷浴で冷却した。TEMPO 16 mg (0.10 mmol)、2 M KBr aq. 0.5 mL を加えて氷浴中で攪拌。NaHCO<sub>3</sub> 0.15 g を NaClO aq. 8.5 mL に溶かし、反応液に加えて氷浴中で40分攪拌。反応液を  $\text{CHCl}_3$  と蒸留水で分液し、有機層を 10% HCl aq.、10% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> aq.、蒸留水、sat. NaCl aq. で洗い、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で乾燥した。溶媒を減圧留去した。得られた残渣を Ar 雰囲気下で (EtO)<sub>2</sub>P(O)CH<sub>2</sub>COOEt 2.43 mL を THF 25 mL に溶かし、NaH 0.49 g を加えて氷浴中で10分攪拌。THF 25 mL に溶かした残渣をドロップワイズに加え、室温で30分攪拌。蒸留水を30 mL 加えて、室温で攪拌。反応液を EtOAc と蒸留水で生成物を抽出し、有機層を sat. NaCl aq. で洗い、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で乾燥した。溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Hexane : EtOAc = 3 : 1) で精製し、黄色のオイル状化合物 (5) (4.15 g, 8.33 mmol, 80%) を得た。

10

## 【 0 1 3 8 】

$^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 7.34- 7.32 (m, 2H), 7.29- 7.27 (m, 3H), 7.23- 7.22 (m, 2H), 6.86- 6.83 (m, 3H), 5.88 (d, J = 13.7 Hz, 1H), 5.71 (d, J = 4.1 Hz, 1H), 4.63 (d, J = 11.7 Hz, 1H), 4.62 (d, J = 11.6 Hz), 4.50 (m, 2H), 4.21 (d, J = 11.6 Hz, 1H), 4.26-4.22 (m, 2H), 4.19 (q, J = 6.9 Hz, 2H), 3.82-3.80 (m, 1H), 3.80 (s, 3H), 1.58 (s, 3H), 1.35 (s, 3H), 1.29 (t, J = 7.6 Hz, 3H) ;  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 165.9, 159.6, 143.6, 138.0, 130.0, 129.6, 128.5, 127.8, 127.8, 123.8, 114.0, 113.3, 104.4, 80.8, 77.6, 77.2, 76.6, 72.2, 71.8, 60.6, 55.4, 27.1, 26.8, 14.4 ; HRMS (ESI) m/z Calcd for  $\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{NaO}_8$  (M+Na) $^+$ ; 521.21514 found 521.21582.

20

## 【 0 1 3 9 】

(R) -5-O-Benzyl-5-C-[2-ethoxycarbonylethyl]-1, 2-O-isopropylidene-3-O-(4-methoxybenzyl)-D-ribose (6)

化合物 (5) 5.07 g (10.1 mmol) を EtOAc 25 mL に溶かし、5% Pd/C 1.45 g (13.6 mmol)、ギ酸アンモニウム 3.18 g (50.5 mmol) を加えて室温で5時間30分攪拌。反応液をセライトろ過し、ろ液を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Hexane : EtOAc = 3 : 1) で精製し、透明なオイル状化合物 (6) (4.57 g, 9.13 mmol, 90%) を得た。

30

## 【 0 1 4 0 】

$^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 7.34- 7.27 (m, 5H), 7.23- 7.22 (m, 2H), 6.85- 6.83 (m, 2H), 5.65 (d, J = 3.4 Hz, 1H), 4.67 (d, J = 11.7 Hz, 1H), 4.65 (d, J = 11.7 Hz, 1H), 4.52 (d, J = 11.7 Hz, 1H), 4.50 (d, J = 11.0 Hz, 1H), 4.48 (t, J = 4.1 Hz, 1H), 4.17 (dd, J = 8.94 Hz, 2.1 Hz, 1H), 3.94 (dd, J = 8.6 Hz, 4.1 Hz, 1H), 3.78 (s, 3H), 3.73- 3.70 (m, 1H), 2.42- 2.37 (m, 1H), 2.33- 2.28 (m, 1H), 1.96- 1.90 (m, 1H), 1.80- 1.74 (m, 1H), 1.57 (s, 3H), 1.33 (s, 3H), 1.20 (t, J = 6.9 Hz, 3H) ;  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 173.5, 159.5, 138.9, 129.9, 129.8, 128.4, 127.8, 127.5, 113.9, 113.0, 104.0, 81.1, 77.9, 77.3, 77.1, 73.5, 71.9, 60.5, 60.4, 55.4, 31.0, 27.1, 26.8, 26.2, 14.3 ; HRMS (ESI) m/z Calcd for  $\text{C}_{28}\text{H}_{36}\text{KO}_8$  (M+K) $^+$ ; 539.20472 found 539.20262.

40

## 【 0 1 4 1 】

(R) -5-O-Benzyl-5-C-hydroxypropyl-1, 2-O-isopropylidene-3-O-(4-methoxybenzyl)-D-ribose (7)

50

Ar雰囲気下、氷浴中でLiAlH<sub>4</sub> 0.55 g (14.4 mmol) にTHF 35 mLを加えて攪拌。化合物 (6) 3.61 gをTHF 10 mLに溶かした溶液をドロップワイズに加え、氷浴中で30分攪拌。(+) - 酒石酸ナトリウムカリウム四水和物の飽和水溶液を加えて、室温で30分攪拌。反応液をEtOAcと蒸留水で生成物を抽出し、有機層をsat. NaCl aq. で洗い、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で乾燥した。溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Hexane : EtOAc = 3 : 1) で精製し、透明なオイル状化合物 (7) (3.28 g, 7.14 mmol, 99%) を得た。

## 【 0 1 4 2 】

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 7.35- 7.27 (m, 7H), 6.87- 6.85 (m, 2H), 5.67 (d, J = 3.7 Hz, 1H), 4.71 (d, J = 11.9 Hz, 1H), 4.68 (d, J = 12.8 Hz, 1H), 4.56 (d, J = 11.5 Hz, 1H), 4.51 (t, J = 4.1 Hz, 1H), 4.49 (d, J = 11.0 Hz, 1H), 4.20 (dd, J = 8.7 Hz, 1.8Hz, 1H), 3.96 (dd, J = 8.7 Hz, 4.6 Hz, 1H), 3.80 (s, 3H), 3.72- 3.69 (m, 1H), 3.57- 3.53 (m, 1H), 1.70- 1.63 (m, 2H), 1.59 (s, 3H), 1.56- 1.52 (m, 1H), 1.45- 1.42 (m, 1H), 1.36 (s, 3H) ; <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 159.5, 138.9, 129.9, 129.8, 128.4, 127.9, 127.6, 113.9, 113.0, 104.0, 88.2, 78.2, 77.9, 77.0, 73.5, 71.8, 62.8, 55.4, 29.6, 27.4, 27.1, 26.8 ; HRMS (ESI) m/z Calcd for C<sub>26</sub>H<sub>34</sub>NaO<sub>7</sub> (M+Na)<sup>+</sup>; 481.22022 found 481.22082.

10

## 【 0 1 4 3 】

(R)-5-O-Benzyl-1, 2-O-isopropylidene-3-O-(4-methoxybenzyl)-5-C-p-toluenesulfonyl oxypropyl- -D-ribose (8)

Ar雰囲気下で化合物 (7) 0.10 g (0.23 mmol) をCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 1.0 mLに溶かし、氷浴で攪拌。p-TsCl 0.15 g、pyridine 0.13 mLを加えて室温で3時間攪拌。反応液をCHCl<sub>3</sub>とsat. NaHCO<sub>3</sub> aq. で生成物を抽出し、有機層をsat. NaCl aq.で洗い、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で乾燥した。溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Hexane : EtOAc = 1 : 1) で精製し、透明なオイル状化合物 (8) (0.13 g, 0.217 mmol, 96%) を得た。

20

## 【 0 1 4 4 】

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 7.74 (d, J= 8.3 Hz, 2H), 7.32-7.27 (m, 5H), 7.25-7.21 (m, 4H), 6.88-6.85 (m, 2H), 5.65 (d, J = 4.1 Hz, 1H), 4.64 (d, J = 11.7 Hz, 2H), 4.50 (t, J = 4.1 Hz, 1H), 4.46 (d, J = 11.6 Hz, 1H), 4.46 (d, J = 12.4 Hz, 1H), 4.10 (dd, J = 6.5 Hz, 2.1 Hz, 1H), 3.94-3.87 (m, 3H), 3.81 (s, 3H), 3.59-3.58 (m, 1H), 2.42 (s, 3H), 1.82-1.74 (m, 1H), 1.64-1.59 (m, 2H), 1.56 (s, 3H), 1.47-1.42 (m, 1H), 1.35 (s, 3H) ; <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 159.6, 144.8, 138.8, 133.2, 129.9, 129.9, 129.7, 128.4, 128.0, 127.8, 127.6, 113.9, 113.0, 104.0, 81.1, 77.8, 77.4, 77.0, 73.4, 71.8, 70.6, 60.5, 55.4, 27.1, 26.9, 26.8, 25.7, 21.8, 21.2, 14.3 ; HRMS (ESI) m/z Calcd for C<sub>33</sub>H<sub>40</sub>NaO<sub>9</sub>S(M+Na)<sup>+</sup>; 635.22907 found 635.22816.

30

## 【 0 1 4 5 】

(R)-5-C-Azidopropyl-5-O-benzyl-1, 2-O-isopropylidene-3-O-(4-methoxybenzyl)- -D-ribose (9)

Ar雰囲気下で化合物 (8) 4.10 g (6.70 mmol) をDMF 40 mLに溶かし、NaN<sub>3</sub> 3.65 g (56.2 mmol) を加えて60 °Cで攪拌。反応液をEtOAcとsat. NaCl aq. で生成物を抽出し、有機層をsat. NaCl aq. で洗い、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で乾燥した。溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Hexane : EtOAc = 5 : 1) で精製し、透明なオイル状化合物 (9) (2.63 g, 5.43 mmol, 81%)を得た。

40

## 【 0 1 4 6 】

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 7.34- 7.27 (m, 7H), 6.88-6.85 (m, 2H), 5.68 (d, J = 3.4 Hz, 1H), 4.70 (d, J = 11.6 Hz, 1H), 4.67 (d, J = 11.7 Hz, 1H), 4.54 (d, J = 11.7 Hz, 1H), 4.52 (t, J = 4.1 Hz, 1H), 4.49 (d, J = 11.6, 1H), 4.17 (dd, J = 8.6 Hz, 1.4 Hz, 1H), 3.96 (dd, J = 8.6 Hz, 4.8 Hz, 1H), 3.80 (s, 3H), 3.70- 3.68 (m, 1H), 3.17 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 1.75- 1.64 (m, 2H), 1.59 (s, 3H), 1.53- 1.46 (m, 2H), 1.36 (s, 3H) ; <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 159.6, 138.9, 129.9, 129.8

50

, 128.4, 127.9, 127.6, 113.9, 113.0, 104.0, 81.2, 77.9, 77.5, 77.1, 73.5, 71.8, 55.4, 51.5, 28.2, 27.1, 26.8, 25.7 ; HRMS (ESI)  $m/z$  Calcd for  $C_{26}H_{33}N_3NaO_6$  (M+Na)<sup>+</sup>; 506.22670 found 506.22941.

【 0 1 4 7 】

(R)-5-C-Azidopropyl-5-O-benzyl-1, 2-O-di-acetyl-3-O-(4-methoxybenzyl)-D-ribose (10)

化合物 (9) を50% 酢酸水溶液に溶かし、70 °Cで24時間攪拌。EtOHを加えて溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Hexane : EtOAc = 1 : 1) で精製し、透明なオイル状化合物(2.07 g, 4.67 mmol, 60%)を得た。Ar雰囲気下でこの化合物をpyridine 10.1 mLに溶かし、Ac<sub>2</sub>O 6.7 mL (72.4 mmol) を加え、室温で6時間攪拌。反応液を氷浴で冷却し、氷水に入れた。反応液をEtOAcと蒸留水で抽出し、有機層をsat. NaHCO<sub>3</sub> aq.、sat. NaCl aq. で洗い、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で乾燥した。溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Hexane : EtOAc = 4 : 1) で精製し、化合物 (10) (6.49 g, 10.5 mmol, 97%)を得た。

10

【 0 1 4 8 】

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 7.36-7.27 (m, 5H), 7.20 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 6.86-6.85 (m, 2H), 6.11 (s, 1H), 5.33 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 4.71 (d, J = 11.7 Hz, 1H), 4.55 (d, J = 11.7 Hz, 1H), 4.53 (d, J = 10.3 Hz, 1H), 4.41 (d, J = 10.3 Hz, 1H), 4.40 (dd, J = 8.3 Hz, 4.8 Hz, 1H), 4.15 (dd, J = 2.8 Hz, 7.6 Hz, 1H), 3.80 (s, 3H), 3.67-3.65 (m, 1H), 3.18-3.15 (m, 2H), 2.13(s, 3H), 1.85 (s, 3H), 1.70-1.50 (m, 4H) ; <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 170.0, 169.5, 159.7, 130.1, 129.4, 128.5, 127.7, 127.6, 114.0, 98.6, 83.8, 77.5, 75.9, 74.0, 73.1, 73.0, 55.4, 51.5, 28.0, 25.3, 21.0, 20.9 ; HRMS (ESI)  $m/z$  Calcd for  $C_{27}H_{33}N_3NaO_8$  (M+Na)<sup>+</sup> ; 550.21653 found 550.21745.

20

【 0 1 4 9 】

2'-O-Acetyl-(R)-5'-C-azidopropyl-5'-O-benzyl-3'-O-(4-methoxybenzyl)-uridine (11)

Ar雰囲気下で化合物 (10) 2.04 g (3.87 mmol)、uracil 0.74 g (6.60 mmol) をCH<sub>3</sub>CN 20 mLに溶かし、BSA 3.6 mL (13.9 mmol) を加えて55 °Cで1時間攪拌。氷浴で冷却し、TM SOTf 1.6 mL (8.75 mmol) をドロップワイズで加え、室温に戻し、55 °Cで2時間攪拌。氷浴で冷却し、sat. NaHCO<sub>3</sub> aq. 25 mLを加えて攪拌。反応液をEtOAcとsat. NaCl aq. で生成物を抽出し、有機層をsat. NaCl aq. で洗い、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で乾燥した。溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Hexane : EtOAc = 1 : 1) で精製し、透明な泡状化合物 (11) (2.04 g, 3.51 mmol, 91%)を得た。

30

【 0 1 5 0 】

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 8.82 (s, 1H), 7.39-7.29, 7.22 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 6.88 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 6.04 (d, J = 4.1 Hz, 1H), 5.23 (t, J = 5.5 Hz, 1H), 5.18 (dd, J = 7.9 Hz, 2.1 Hz, 1H), 4.73 (d, J = 11.6 Hz, 1H), 4.53 (d, J = 11.0 Hz, 1H), 4.45 (d, J = 11.0 Hz, 1H), 4.40 (d, J = 11.0 Hz, 1H), 4.30 (t, J = 6.2 Hz, 1H), 4.10 (dd, J = 5.5 Hz, 2.8 Hz, 1H), 3.81 (s, 3H), 3.75- 3.74 (m, 1H), 3.24 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 2.12 (s, 3H), 1.77-1.72 (m, 1H), 1.66-1.52 (m, 3H) ; <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 170.1, 162.9, 159.7, 150.2, 140.1, 137.7, 130.0, 129.2, 128.8, 128.3, 127.7, 114.0, 102.7, 87.4, 83.8, 78.4, 74.5, 74.2, 73.0, 72.9, 55.4, 51.4, 27.4, 25.4, 20.9 ; HRMS (ESI)  $m/z$  Calcd for  $C_{29}H_{33}KN_5O_8$  (M+Na)<sup>+</sup>; 618.19662 found 618.19882.

40

【 0 1 5 1 】

(R)-5'-C-Azidopropyl-5'-O-benzyl-3'-O-(4-methoxybenzyl)-uridine (12)

Ar雰囲気下で化合物 (11) 0.53 g (0.91 mmol) をMeOH 5.2 mLに溶かし、K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.38 g (2.75 mmol) を加えて1時間攪拌。反応液をEtOAcと蒸留水で生成物を抽出し、有機層をsat. NaCl aq. で洗い、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で乾燥した。溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムク

50

ロマトグラフィー (Hexane : EtOAc = 1 : 2) で精製し、白色の固体化合物 (12) (0.46 g, 0.86 mmol, 95%) を得た。

【 0 1 5 2 】

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 8.04 (s, 1H), 7.40-7.34 (m, 3H), 7.29-7.27 (m, 3H), 7.25-7.21 (m, 2H), 6.91-6.89 (m, 2H), 5.85 (d,  $J = 5.5$  Hz, 1H), 5.26 (dd,  $J = 8.3$  Hz, 2.3 Hz, 1H), 4.74 (d,  $J = 11.0$  Hz, 1H), 4.60 (d,  $J = 11.4$  Hz, 1H), 4.53 (d,  $J = 11.0$  Hz, 1H), 4.41 (d,  $J = 1H$ ), 4.17-4.07 (m, 3H), 3.82 (s, 3H), 3.71-3.69 (m, 1H), 3.29-3.27 (m, 2H), 2.87 (d,  $J = 7.3$  Hz, 1H), 1.78-1.59 (m, 4H) ;  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 163.0, 159.9, 150.6, 140.3, 137.7, 130.0, 128.8, 128.7, 128.3, 127.7, 114.2, 102.7, 89.4, 83.7, 78.8, 75.9, 73.5, 72.8, 72.6, 55.4, 51.5, 27.5, 25.2 ; HRMS (ESI)  $m/z$  Calcd for  $\text{C}_{28}\text{H}_{33}\text{N}_5\text{NaO}_7$  (M+Na) $^+$ ; 560.21212 found 560.21286.

10

【 0 1 5 3 】

(R)-5'-C-Azidopropyl-5'-O-benzyl-3'-O-(4-methoxybenzyl)-2'-O-methyl-uridine (13)

Ar雰囲気下で化合物 (12) 0.46 g (0.86 mmol) をTHF 4.6 mLに溶かし、氷浴で冷却し、NaH 0.10 g (2.55 mmol) を加えて氷浴で5分攪拌。アルミホイルで遮光し、 $\text{CH}_3\text{I}$  0.27 mL (4.34 mmol) をドロップワイズで加えて氷浴で4時間半攪拌。その後、室温で3時間攪拌。sat.  $\text{NaHCO}_3$  aq. を少量加えて室温で攪拌。反応液をEtOAcとsat.  $\text{NaHCO}_3$  aq. で生成物を抽出し、有機層をsat.  $\text{NaCl}$  aq. で洗い、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ で乾燥した。溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Hexane : EtOAc = 2 : 3) で精製し、透明な泡状化合物 (13) (0.43 g, 0.78 mmol, 90%) を得た。

20

【 0 1 5 4 】

$^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 8.31 (s, 1H), 7.55 (d,  $J = 7.5$  Hz, 1H), 7.39- 7.33 (m, H), 5.94 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H), 4.96 (dd,  $J = 8.3$  Hz, 2.1 Hz, 1H), 4.77 (d,  $J = 11.0$  Hz, 1H), 4.56 (d,  $J = 11.6$  Hz, 1H), 4.49 (d,  $J = 11.0$  Hz, 1H), 4.41 (d,  $J = 11.0$  Hz, 1H), 4.21 (dd,  $J = 7.2$  Hz, 2.8 Hz, 1H), 4.11 (dd,  $J = 7.2$  Hz, 4.8 Hz, 1H), 3.83- 3.82 (m, 1H), 3.82 (s, 3H), 3.64 (dd,  $J = 4.8$  Hz, 2.8 Hz, 1H), 3.31- 3.24 (m, 2H), 1.88- 1.83 (m, 1H), 1.72- 1.65 (m, 3H) ;  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 163.4, 159.7, 150.1, 140.3, 137.7, 129.9, 129.2, 128.8, 128.3, 127.7, 114.0, 102.0, 87.9, 82.5, 82.5, 78.2, 73.9, 72.6, 58.6, 55.4, 51.5, 27.1, 25.3 ; HRMS (ESI)  $m/z$  Calcd for  $\text{C}_{28}\text{H}_{33}\text{N}_5\text{NaO}_7$  (M+Na) $^+$ ; 574.22777 found 574.22525.

30

【 0 1 5 5 】

(R)-5'-C-Azidopropyl-5'-O-benzyl-2'-O-methyl-uridine (14)

Ar雰囲気下で化合物 (13) 0.43 g (0.78 mmol) を $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  1.85 mLに溶かし、蒸留水 96  $\mu\text{L}$ を加えて氷浴で冷却。DDQ 0.21 g (0.94 mmol) を加えて氷浴で2時間攪拌。その後、室温で2時間攪拌。sat.  $\text{NaHCO}_3$  aq. を5 mL加え、室温で攪拌。反応液をセライトろ過し、ろ液を $\text{CHCl}_3$ とsat.  $\text{NaCl}$  aq. で生成物を抽出し、有機層を $\text{Na}_2\text{SO}_4$ で乾燥した。溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Hexane : EtOAc = 1 : 2) で精製し、白色の固体化合物 (14) (0.27 g, 0.62 mmol, 79%) を得た。

40

【 0 1 5 6 】

$^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 8.33 (s, 1H), 7.57 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H), 7.41-7.32 (m, 5H), 5.96 (d,  $J = 2.3$  Hz, 1H), 4.98 (dd,  $J = 8.2$  Hz, 2.3 Hz, 1H), 4.81 (d,  $J = 11.0$  Hz, 1H), 4.45 (d,  $J = 11.0$  Hz, 1H), 4.41-4.36 (m, 1H), 3.99 (dd,  $J = 6.9$  Hz, 2.3 Hz, 1H), 4.01-3.97 (m, 1H), 3.63 (dd,  $J = 5.5$  Hz, 2.3 Hz, 1H), 3.58 (s, 3H), 3.34 (t,  $J = 6.9$  Hz, 2H), 2.75 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H), 1.96-1.68 (m, 4H) ;  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 163.3, 150.2, 140.0, 137.6, 128.8, 128.3, 127.8, 102.2, 86.7, 84.7, 84.2, 78.3, 72.9, 67.8, 58.8, 51.5, 27.2, 25.4 ; HRMS (ESI)  $m/z$  Calcd for  $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{N}_5\text{NaO}_6$  (M+Na) $^+$ ; 454.17025 found 454.16755.

【 0 1 5 7 】

50



(R)-5'-C-Azidopropyl-5'-O-benzyl-3'-O-[(1, 1-dimethylethyl)diphenylsilyl]-2'-O-methyl-uridine (15)

Ar雰囲気下で化合物 (14) 0.27 g (0.62 mmol) をDMF 2.7 mLに溶かし、imidazole 0.42 g (6.17 mmol)、TBDPSCI 0.80 mL (3.08 mmol) を加え、室温で18時間攪拌。反応液をEtOAcと蒸留水で生成物を抽出し、有機層をsat. NaHCO<sub>3</sub> aq. とsat. NaCl aq. で洗い、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で乾燥した。溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Hexane : EtOAc = 3 : 2) で精製し、白色の泡状化合物 (15) (0.39 g, 0.59 mmol, 95%) を得た。

【 0 1 5 8 】

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 7.91 (s, 1H), 7.73-7.71 (m, 2H), 7.67-7.66 (m, 2H), 7.44 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 7.39-7.33 (m, 8H), 7.23-7.22 (m, 2H), 5.88 (d, J = 3.5 Hz, 1H), 4.94 (dd, J = 8.2 Hz, 2.8 Hz, 1H), 4.74 (d, J = 11.9 Hz, 1H), 4.41 (dd, J = 6.2 Hz, 4.8 Hz, 1H), 4.38 (d, J = 11.0 Hz, 1H), 4.22 (dd, J = 6.2 Hz, 2.1 Hz, 1H), 3.74-3.72 (m, 1H), 3.24-3.15 (m, 2H), 3.10 (dd, J = 4.8 Hz, 3.4 Hz, 1H), 3.07 (s, 3H), 1.80-1.75 (m, 1H), 1.64-1.56 (m, 3H), 1.09 (s, 9H); <sup>13</sup>C NMR(151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 163.1, 149.9, 140.1, 137.7, 136.2, 136.0, 133.0, 130.2, 130.2, 128.8, 128.2, 127.9, 127.8, 127.5, 101.9, 86.5, 84.1, 83.3, 78.7, 72.7, 69.9, 57.6, 51.3, 27.1, 27.1, 25.8, 19.5; HRMS (ESI) m/zCalcd for C<sub>36</sub>H<sub>43</sub>KN<sub>5</sub>O<sub>6</sub>Si (M+K)<sup>+</sup>; 708.26197 found 708.26246.

10

【 0 1 5 9 】

(R)-5'-C-Azidopropyl-3'-O-[(1, 1-dimethylethyl)diphenylsilyl]-2'-O-methyl-uridine (16)

Ar雰囲気下で化合物 (15) 0.39 g (0.59 mmol) をCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 6.0 mLに溶かし、-78 °Cで10分攪拌。1 M BCl<sub>3</sub> 3.5 mL (3.5 mmol) を加えて-78 °Cで3時間攪拌。-30 °Cに昇温し、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH = 1 : 1 (v/v) の混合液 10 mLを加えて10分攪拌。さらに室温で攪拌し、CHCl<sub>3</sub>とsat. NaHCO<sub>3</sub> aq. で生成物を抽出し、有機層をsat. NaCl aq. で洗い、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で乾燥した。溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Hexane : EtOAc = 1 : 2) で精製し、白色の泡状化合物 (16) (0.34 g, 0.58 mmol, 99%) を得た。

20

【 0 1 6 0 】

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 8.09 (s, 1H), 7.73-7.72 (m, 2H), 7.68-7.66 (m, 2H), 7.42-7.38 (m, 5H), 5.73 (dd, J = 8.3 Hz, 2.1 Hz, 1H), 5.55 (d, J = 6.9 Hz, 1H), 4.35 (dd, J = 4.8 Hz, 2.0 Hz, 1H), 4.09 (dd, J = 6.9 Hz, 4.8 Hz, 1H), 4.00 (t, J = 2.1 Hz, 1H), 3.66-3.62 (m, 1H), 3.54 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 3.19 (s, 3H), 3.17-3.11 (m, 2H), 1.64-1.60 (m, 1H), 1.46-1.41 (m, 1H), 1.09 (s, 9H), 1.02-0.98 (m, 1H), 0.92-0.88 (m, 1H); <sup>13</sup>C NMR(151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 163.1, 150.4, 143.8, 136.2, 136.1, 133.2, 133.0, 130.3, 130.2, 128.0, 127.8, 102.7, 92.7, 89.9, 81.0, 71.3, 70.2, 58.5, 51.2, 29.4, 27.0, 25.7, 19.5; HRMS (ESI) m/zCalcd for C<sub>29</sub>H<sub>37</sub>N<sub>5</sub>NaO<sub>6</sub>Si (M+Na)<sup>+</sup>; 602.24108 found 602.23893.

30

【 0 1 6 1 】

(R)-5'-C-Azidopropyl-5'-O-(4, 4'-dimethoxytrityl)-3'-O-[(1, 1-dimethylethyl)diphenylsilyl]-2'-O-methyl-uridine (17)

Ar雰囲気下で化合物 (16) 0.71 g (1.22 mmol) をpyridine 4.1 mLに溶かし、DMTrCl 2.07 g (6.11 mmol)、2,6-lutidine 0.85 mL (7.34 mmol) を加え、40 °Cで48時間攪拌。反応液をEtOAcと蒸留水で生成物を抽出し、有機層をsat. NaCl aq. で洗い、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で乾燥した。溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Hexane : EtOAc = 3 : 2) で精製し、黄色の泡状化合物 (17) (0.81 g, 0.92 mmol, 75%) を得た。

40

【 0 1 6 2 】

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 7.96 (s, 1H), 7.76-7.75 (m, 2H), 7.72-7.71 (m, 2H), 7.51-7.40 (m, 6H), 6.75 (d, J = 8.9 Hz, 4H), 5.93 (d, J = 5.5 Hz, 1H), 5.06 (d, J = 6.2 Hz, 1H), 4.50-4.49 (m, 1H), 4.12-4.11 (m, 1H), 3.77 (s, 3H), 3.77 (s, 3H)

50

), 3.29-3.27 (m, 2H), 3.04 (s, 3H), 2.83-2.80 (m, 1H), 2.75-2.71 (m, 1H), 1.20-1.13 (m, 1H), 1.10 (s, 9H), 1.03-0.99 (m, 1H);  $^{13}\text{C}$  NMR(151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 163.3, 158.8, 158.7, 150.2, 146.2, 136.4, 136.0, 135.9, 135.8, 133.5, 133.0, 130.7, 130.4, 130.2, 130.1, 128.1, 127.9, 127.7, 127.0, 113.3, 113.2, 113.1, 102.4, 87.4, 86.4, 84.9, 82.6, 73.7, 70.7, 57.9, 55.3, 55.3, 51.1, 27.8, 27.0, 25.3, 19.5; HRMS (ESI)  $m/z$  Calcd for  $\text{C}_{50}\text{H}_{55}\text{KN}_5\text{O}_8\text{Si}$  (M+K) $^+$ ; 920.34570 found 920.34581.

## 【 0 1 6 3 】

(R)-5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-3'-O-[(1,1-dimethylethyl)diphenylsilyl]-2'-O-methyl-5'-C-trifluoroacetylaminopropyl-uridine (18)

Ar雰囲気下で化合物 (17) 0.17 g (0.19 mmol) をTHF 1.7 mLに溶かし、 $\text{Ph}_3\text{P}$  0.13 g (0.50 mmol)、蒸留水 0.15 mL (8.32 mmol) を加えて40 °Cで3時間攪拌。溶媒を減圧留去し、残渣を $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  1.65 mLに溶かし、 $\text{Et}_3\text{N}$  40  $\mu\text{L}$  (0.29 mmol)、 $\text{CF}_3\text{COOEt}$  70  $\mu\text{L}$  (0.59 mmol) を加えて25時間攪拌。反応液をEtOAcと蒸留水で生成物を抽出し、有機層をsat.  $\text{NaCl}$  aq. で洗い、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ で乾燥した。溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Hexane : EtOAc = 3 : 2) で精製し、黄色の泡状化合物 (18) (0.16 g, 0.17 mmol, 87%) を得た。

10

## 【 0 1 6 4 】

$^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 7.93 (s, 1H), 7.75-7.74 (m, 2H), 7.70-7.69 (m, 2H), 7.51-7.47 (m, 4H), 7.41 (t,  $J$  = 7.6 Hz, 4H), 7.28-7.27 (m, 2H), 7.21-7.17 (m, 1H), 6.95 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 1H), 6.74 (d,  $J$  = 7.6 Hz, 4H), 5.89 (d,  $J$  = 5.5 Hz, 1H), 5.87 (s, 1H), 5.13 (dd,  $J$  = 8.2 Hz, 2.0 Hz, 1H), 4.45 (t,  $J$  = 4.1 Hz, 1H), 4.11 (t,  $J$  = 3.4 Hz, 1H), 3.77 (s, 3H), 3.76 (s, 3H), 3.31 (t,  $J$  = 5.5 Hz, 1H), 3.28-3.26 (m, 1H), 3.05 (s, 3H), 2.88-2.84 (m, 2H), 1.30-1.24 (m, 2H), 1.09 (s, 9H), 1.04-0.95 (m, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR(151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 162.8, 158.9, 158.8, 150.1, 146.1, 140.6, 136.4, 136.1, 135.8, 133.8, 132.8, 130.6, 130.4, 130.3, 130.1, 128.1, 128.0, 127.9, 127.9, 127.1, 113.3, 113.2, 102.5, 87.4, 87.1, 85.2, 82.3, 73.5, 70.7, 58.0, 55.4, 55.4, 39.6, 27.7, 27.0, 25.1, 19.6; HRMS (ESI)  $m/z$  Calcd for  $\text{C}_{52}\text{H}_{56}\text{F}_3\text{KN}_3\text{O}_9\text{Si}$  (M+K) $^+$ ; 990.33750 found 990.33913.

20

## 【 0 1 6 5 】

(R)-5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-2'-O-methyl-5'-C-trifluoroacetylaminopropyl-uridine (19)

Ar雰囲気下で化合物 (18) 0.86 g (0.91 mmol) をTHF 8.6 mLに溶かし、1 M TBAF 1.4 mL (1.4 mmol) を加え、室温で6時間攪拌。溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Hexane : EtOAc = 1 : 2) で精製し、白色の固体化合物 (19) (0.55 g, 0.77 mmol, 85%) を得た。

30

## 【 0 1 6 6 】

$^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 11.41 (d,  $J$  = 1.4 Hz, 1H), 9.28 (t,  $J$  = 5.5 Hz, 1H), 7.42 (d,  $J$  = 7.6 Hz, 2H), 7.31-7.29 (m, 6H), 7.22 (t,  $J$  = 7.6 Hz, 1H), 6.89 (dd,  $J$  = 8.9 Hz, 2.1 Hz, 4H), 5.69 (d,  $J$  = 6.2 Hz, 1H), 5.29 (dd,  $J$  = 8.3 Hz, 2.0 Hz, 1H), 5.16 (d,  $J$  = 6.8 Hz, 1H), 4.11 (dd,  $J$  = 11.0 Hz, 6.2 Hz, 1H), 3.74 (s, 6H), 3.58 (t,  $J$  = 5.5 Hz, 1H), 3.30-3.29 (m, 1H), 3.27 (s, 3H), 2.92-2.86 (m, 2H), 1.33-1.23 (m, 4H);  $^{13}\text{C}$  NMR(151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 162.8, 158.2, 150.4, 146.3, 140.6, 136.2, 136.1, 130.3, 130.2, 127.9, 127.7, 126.7, 113.0, 102.0, 86.1, 85.7, 84.4, 81.2, 72.7, 67.7, 57.6, 55.0, 55.0, 27.1, 24.2; HRMS (ESI)  $m/z$  Calcd for  $\text{C}_36\text{H}_{38}\text{F}_3\text{N}_3\text{NaO}_9$  (M+Na) $^+$ ; 736.24578 found 736.24725.

40

## 【 0 1 6 7 】

3'-O-[2-Cyanoethoxy(diisopropylamino)phosphino]- (R)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-O-methyl-5'-C-trifluoroacetylaminopropyl-uridine (20)

Ar雰囲気下で化合物 (19) 0.19 g (0.27 mmol) をDMF 1.5 mLに溶かし、DMF 0.5 mLに溶かした1H-tetrazole 17 mg (0.25 mmol) を加え、さらに1-methylimidazole 7.8  $\mu\text{L}$  (0.

50

098 mmol)、CEOP(N(i-Pr)<sub>2</sub>)<sub>2</sub> 0.13 mL (0.40 mmol) を加えて室温で2時間半攪拌。EtOAc と sat. NaHCO<sub>3</sub> aq. で生成物を抽出し、有機層を sat. NaCl aq. で洗い、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で乾燥した。溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Hexane : EtOAc = 1 : 1) で精製し、無色の泡状化合物 (20) (0.18 g, 0.20 mmol, 73%) を得た。

【0168】

<sup>31</sup>P NMR (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 150.5, 148.7; HRMS (ESI) m/z Calcd for C<sub>45</sub>H<sub>55</sub>F<sub>3</sub>KN<sub>5</sub>NaO<sub>10</sub>P(M+K)<sup>+</sup>; 952.32757 found 952.32498.

【0169】

(CPG樹脂の合成方法)

なお、上記で取得したヌクレオシド誘導体のCPG樹脂誘導体化は以下のようにして行った。

10

【0170】

Ar 雰囲気下、化合物19をpyridine 1.5 mLに溶かし、無水コハク酸0.056 g、DMAPO 0.034 gを加えて室温で20時間攪拌。その後、EtOAcと蒸留水で生成物を抽出し、有機層をsat. NaHCO<sub>3</sub> aq.、sat. NaCl aq. で洗浄し、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で乾燥した。溶媒を減圧留去し、得られた残渣をAr 雰囲気下でDMF 1.4 mLに溶かし、CPG樹脂0.21 g (CPG-500、NH<sub>2</sub> loading : 167 μmol/g)、EDC·HCl 0.028 g加えて室温で5日間静置した。反応液を濾過し、残渣をpyridineで洗浄した。その後残渣にpyridine 13.5 mL、DMAPO 0.183 g、無水酢酸1.5 mLの混合液を加えて1日間静置した。反応液を濾過し、pyridine、EtOH、CH<sub>3</sub>CNで残渣を洗浄した後、減圧下で残渣を乾燥し、25.2 μmol/gのCPG樹脂を得た。

20

【実施例2】

【0171】

(オリゴヌクレオチドの合成)

オリゴヌクレオチドの合成は、ホスホロアミダイト法を用いた核酸自動合成機によって0.2 μmolスケールで行った。天然のヌクレオシドアミダイト体を0.1 MになるようにMeCNで希釈し、3'末端となるヌクレオシドが結合したCPG樹脂は、その活性に基づいてそれぞれ0.2 μmol相当をカラムに詰めて合成を開始した。

【0172】

合成終了後、CPG樹脂をサンプリングチューブに移し、CH<sub>3</sub>CN 900 μLとEt<sub>2</sub>NH 100 μLを加えて5分間ボルテックスで攪拌した。その後、スピンドウンし、上清を捨て、CH<sub>3</sub>CN 1 mLで2回洗浄した。CH<sub>3</sub>NH<sub>2</sub> 500 μL、NH<sub>3</sub> aq. 500 μLを加えて65 °Cで10分間インキュベートした。溶液を室温に戻した後、エッペンドルフチューブに上清を移し、H<sub>2</sub>O : EtOH = 3 : 1 (v/v) 1 mLでCPG樹脂を2回洗浄して溶液を減圧乾固した。これによりCPG樹脂上のオリゴヌクレオチドを切り出すとともに脱保護を行った。

30

【0173】

インキュベート後サンプルは減圧乾固し、次にTBDMs基を脱保護するためにサンプルをDMSO (100 μL)に溶かし、TEA·3HF (125 μL)を加えて攪拌した後、65 °Cで90分インキュベートした。インキュベート後のサンプルを0.1 M TEAA bufferで10 mLにメスアップし、希釈溶液を平衡化したSep-Pac C18逆相カラムに通してカラムに吸着させた。カラムを滅菌水で洗浄して塩を取り除き、50% CH<sub>3</sub>CN in H<sub>2</sub>O (3 mL)で溶出し、粗精製した。

40

【0174】

粗精製サンプルは減圧乾固し、残渣をloading solution (1×TBE in 90% formamide) (200 μL)に溶解させ、20% PAGE (500 V, 20 mA)によって目的のオリゴヌクレオチドを分離した。目的のオリゴヌクレオチドバンドを分取し、0.1 M TEAA buffer、1 mM EDTA水溶液 (20 mL)を加え、一晚振盪した。振盪後、溶液を平衡化したSep-Pac C18逆相カ

50

ラムに通し、カラムに吸着させた。カラムを滅菌水で洗浄して塩を取り除き、50% MeCN in H<sub>2</sub>O (3 ml) で溶出し、減圧下乾固した。

【0175】

オリゴヌクレオチドはH<sub>2</sub>O (1 ml) に溶かし、希釈液の260 nmにおける吸光度から収量を求めた。また、60 pmol相当のオリゴヌクレオチドを減圧乾固させ、3 μlの滅菌水及び3 μlのマトリックス溶液とよく混和し、プレート上で乾固した後、MALDI-TOF/MSで質量を測定した。以下に、合成したオリゴヌクレオチドを示す。

【0176】

【表1】

Name	Sequence	SEQ ID
ON 1	5'-GGC CUU UCA CUA CUC CUA CUU-3'	1
ON 2	5'-GGC CUU UCA CUA CUC CUA CUU-3'	1
ON 3	5'-GGC CUU UCA CUA CUC CUA CUU-3'	1
ON 4	5'-F UUC UUC UUC UU-3'	2

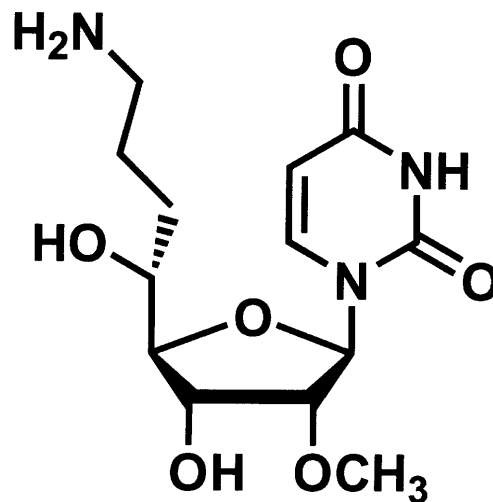
10

【0177】

上記表中、「U」は以下に示した構造を指す。また、Fは蛍光標識を指す。

【0178】

【化9】



20

30

【0179】

以下、用いた試薬について説明する。

【0180】

(TEAA buffer)

0.1 M TEAA bufferは、2 N TEAA buffer (酢酸114.38 mlにEt<sub>3</sub>N 277.6 mlを加え、H<sub>2</sub>Oで1000 mlにしてpH 7.0に調製したもの)を20倍希釈して使用した。

40

【0181】

(PAGE)

40% アクリルアミド (19:1) 溶液 (40 ml)、尿素 (33.6 g)、10× TBE buffer (8 ml) を加えて溶解し、H<sub>2</sub>Oを加え80 mlとした。最後にAPS (55 mg) を加えて溶かし、TEMED (40 μl) を加えて振り混ぜ、1.5 mm スペーサーを挟んで固定した2枚ガラス板の間に流し込み、1時間以上静置して固化させた。また、1× TBE bufferを泳動用緩衝液として用いた。

【0182】

(1 mM EDTA水溶液)

50

0.1 M EDTA 水溶液 (EDTA · 4Na 1.80 g を H<sub>2</sub>O で 40 ml に調製したものを) を 100 倍希釈して使用した。

【0183】

(オリゴヌクレオチド水溶液)

波長 260 nm での吸光度 (Abs<sub>260</sub>) が吸光度計の有効範囲になるように希釈した水溶液とした。光路長 (l) 1 cm の吸光度測定用石英セルを用いて室温にて Abs<sub>260</sub> を測定した。OD<sub>260</sub> の計算には下式を用いた。ここで V は溶液の全量を示す。

【0184】

【化10】

$$OD_{260} (M\epsilon^{-1} \cdot ml^{-1} \cdot cm^{-1}) = Abs_{260} (M\epsilon^{-1}) \cdot V^{-1} (ml^{-1}) \cdot l^{-1} (cm^{-1})$$

10

【0185】

また、N<sub>1</sub>pN<sub>2</sub>pN<sub>3</sub>p ··· N<sub>n-1</sub>pN<sub>n</sub> で表される一本鎖オリゴヌクレオチドのモル吸光係数 (ε<sub>260</sub>) の算出には次式を用いた。

【0186】

【化11】

$$\begin{aligned} \epsilon = 2\{ & \epsilon (N_1pN_2) + \epsilon (N_2pN_3) + \cdots + \epsilon (N_{n-1}pN_n) \} \\ & - \{ \epsilon (N_2) + \epsilon (N_3) + \cdots + \epsilon (N_{n-1}) \} \end{aligned}$$

20

【0187】

ここで、(N<sub>n</sub>) はある核酸 N<sub>n</sub> の ε<sub>260</sub> を示し、(N<sub>n-1</sub>pN<sub>n</sub>) はある核酸二量体 N<sub>n-1</sub>pN<sub>n</sub> の ε<sub>260</sub> を示す。なお、オリゴヌクレオチドは水溶液とし、波長 260 nm での吸光度 (Abs<sub>260</sub>) が、吸光度計の有効範囲になるよう希釈した。光路長 (l) 1 cm の吸光度測定用石英セルを用いて、室温で Abs<sub>260</sub> を測定した。濃度 C (mol/l) の算出は次式を用いた。

30

【0188】

【化12】

$$C = Abs_{260} \cdot \epsilon_{260}^{-1} \cdot l^{-1}$$

【0189】

(マトリックス溶液)

マトリックス溶液は、3-hydroxypicolinic acid (3-HPA) (4.85 mg) と diammonium hydrogen citrate (0.8 mg) を 50% MeCN in H<sub>2</sub>O (50 μl) に溶解させて調製した。なお、diammonium hydrogen citrate は、Na<sup>+</sup> や K<sup>+</sup> が付着するのを阻害するために加えた。

40

【0190】

(40% アクリルアミド (19:1) 溶液)

アクリルアミド (190 g)、N,N-bisacrylamide (10 g) を H<sub>2</sub>O に溶かして 500 ml にして調製した。

【0191】

(10x TBE buffer)

50

Tris (109 g)、ホウ酸 (55 g)、EDTA・2Na (7.43 g) を H<sub>2</sub>O に溶かして 1000 ml にして調製した。

【実施例 3】

【0192】

(ヌクレアーゼ耐性の測定)

実施例 2 で合成したオリゴヌクレオチド ON4300 pmol を OPTI-MEM 37.5 μL に溶かし、1.1 μL を エッペンドルフチューブ に分注し、Loading buffer 5 μL を加えて 0 min のサンプルとした。残りのサンプルにリボヌクレアーゼ源としてのウシ血清 (BS) 1.2 μL を加え、37 でインキュベートした。15 min、30 min、1 h、3 h、6 h、12 h、24 h 後に 2.4 μL を Loading buffer 10 μL に入った氷上のエッペンドルフチューブ にピペティングした。そのサンプルを電気泳動後、FUJIFILM LAS4000 を用いて解析した。その結果を図 1 に示した。

10

【0193】

図 2 に示すように、オリゴヌクレオチド ON4 と同一配列の天然オリゴヌクレオチドは、ヌクレアーゼ処理から 6 ~ 12 時間後にはほぼ分解していたのに対し、オリゴヌクレオチド ON4 は、12 時間及び 24 時間経過後においても、未分解の状態を維持できるとわかった。

【実施例 4】

【0194】

(遺伝子発現抑制能の測定)

RNA 干渉能の評価には Dual luciferase reporter assay を用いた。

20

【0195】

HeLa 細胞を 8000 cell/ml になるように調製し、96 well plate の各 well に 100 μl ずつ入れ 24 時間培養した。合成した siRNA のそれぞれの鎖を TE buffer (100 mM NaCl) に溶解し、100 で 3 分加熱後、1 時間以上静置し室温に戻した。siRNA 溶液 0.5 μL、培地 (OPTI-MEM) 48 μL、RNAiMAX 0.5 μl を総量 50 μl になるように混合し、培地を吸った 96 well plate の各 well に OPTI-MEM を 40 μL ずつ入れ、さらに調製したサンプルを各 well に 10 μL ずつ加えた。その後 CO<sub>2</sub> インキュベーター 37 で 1 時間静置させ、各 well に D-MEM を 100 μl 加えて CO<sub>2</sub> インキュベーター 37 で 24 時間培養した。24 時間後、培地を吸い、24 時間冷凍保存した。ルシフェラーゼ発光の測定は、解凍後 Dual glow substrate (Firefly luciferase の基質) 24 μl を加え 5 分間振とう後、サンプル 23 μl を発光測定用の 96 well plate に移し、Firefly luciferase を測定した。その後、Stop and glow substrate (Renilla luciferase の基質) 23 μl を加え 10 分振とう後、Renilla luciferase を測定した。Renilla luciferase の発光測定値を Firefly luciferase の値で割り、% of control を用いて比較した。なお、比較例として、同一配列からなる天然のオリゴヌクレオチド (Native) を用いた。Luciferase 測定には、Luminescenser JNR II を使用した。その結果を図 2 に示す。

30

40

【0196】

図 2 に示すように、オリゴヌクレオチド ON1 ~ ON3 は、天然オリゴヌクレオチド (Native) と同等程度の遺伝子発現抑制能を示した。

【実施例 5】

【0197】

(細胞膜透過性試験)

HeLa 細胞を 20000 cell/ml になるように調製し、48 well plat

50

eの各wellに400 $\mu$ lずつ入れ24時間培養した。エッペンに乾固させたオリゴヌクレオチドON4(40pmol)をOPTI-MEM(400 $\mu$ l)に溶解させ、各ウェルの培地を吸引したのちに全量をウェルに加えた。1時間インキュベート後、ウシ血清入り培養培地(10%BS-D-MEM(WAKO))を200 $\mu$ l/well加えた。24時間後、各ウェルの培地を吸引し、1 $\times$ PBSで2回ウェルを洗浄した。その後、倒立型蛍光顕微鏡(IX70、OLYMPUS社製)を用い、細胞観察を行った結果を図3に示す。なお、比較例として、同一配列からなる天然のオリゴヌクレオチド(Native)を用いた。

【0198】

図3に示すように、天然オリゴヌクレオチド(Native)は、ほとんど細胞膜を透過しなかったのに対して、オリゴヌクレオチドON4は、優れた細胞膜糖化性を示した。

10

【実施例6】

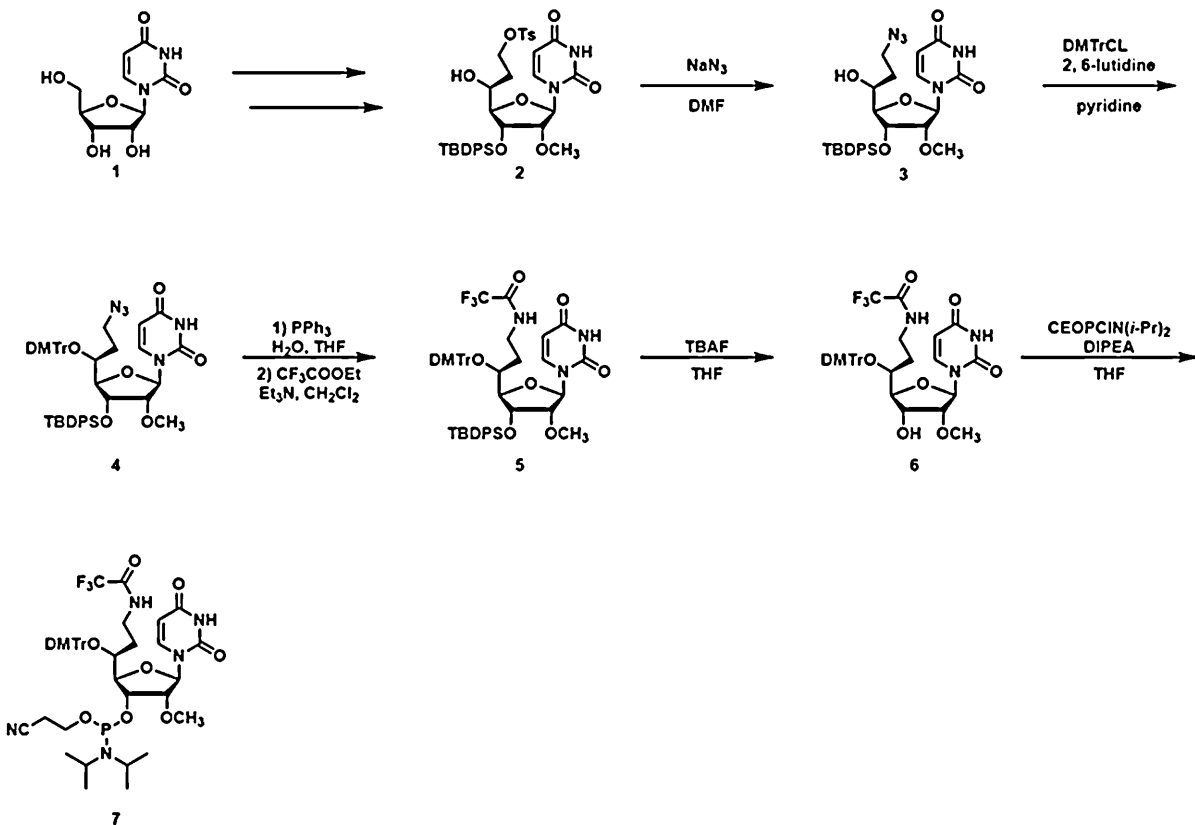
【0199】

(2)2-OCH<sub>3</sub>-5-アミノエチルアミダイトユニットの合成

以下のスキームに従い、2-OCH<sub>3</sub>-5-アミノエチルアミダイトユニットを合成した。

【0200】

【化13】



20

30

【0201】

(S)-5'-C-Azidoethyl-3'-O-[(1,1-dimethylethyl)diphenylsilyl]-2'-O-methyl-uridine (3).

40

ウリジン(化合物(1))を出発物質として、Marie Maturano et al., Eur. J. Org. Chem., 721-730 (2012)に記載のスキーム2に準じて化合物(2)(Marieらのスキーム2における化合物15)を取得し、化合物(2)0.25g(0.36mmol)を、Ar雰囲気下でDMF 2.5mLに溶かし、 $\text{NaN}_3$  0.20g(3.0mmol)を加えて60 $^\circ\text{C}$ で18時間撹拌した。反応液よりEtOAcとsat. NaCl aq.で生成物を抽出し、有機層をsat. NaCl aq.で洗い、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ で乾燥した。溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Hexane: EtOAc = 1: 2)で精製し、白色の泡状化合物(3)(0.19g, 0.34mmol, 95%)を得た。

【0202】

50

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) d: 8.01 (s, 1H), 7.71-7.57 (m, 4H), 7.58 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H), 7.51-7.39 (m, 6H), 5.67 (d,  $J = 4.1$  Hz, 1H), 5.63 (dd,  $J = 8.2, 2.3$  Hz, 1H), 4.19 (t,  $J = 4.6$  Hz, 1H), 3.91 (dd,  $J = 5.0, 1.8$  Hz, 1H), 3.78 (t,  $J = 4.6$  Hz, 1H), 3.41 (s, 3H), 3.34 (t,  $J = 6.0$  Hz, 1H), 2.21 (s, 1H), 1.77-1.71 (m, 1H), 1.52-1.51 (m, 1H), 1.11 (s, 9H).

【 0 2 0 3 】

(S)-5'-C-Azidoethyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-O-[(1,1-dimethylethyl)diphenyl silyl]-2'-O-methyl-uridine (4)

Ar雰囲気下で化合物(3) 0.19 g (0.34 mmol) をpyridine 2.0 mLに溶かし、DMTrCl 0.58 g (1.70 mmol)、2,6-lutidine 0.23 mL (2.03 mmol) を加え、40 °Cで3日間攪拌。反応液をEtOAcと蒸留水で生成物を抽出し、有機層をsat. NaCl aq. で洗い、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ で乾燥した。溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Hexane : EtOAc = 1: 1) で精製し、黄色の泡状化合物 (4) (0.21 g, 0.24 mmol, 71%) を得た。

10

【 0 2 0 4 】

$^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) d: 8.03 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H), 7.99 (d,  $J = 2.0$  Hz, 1H), 7.60-7.58 (m, 2H), 7.47 (d,  $J = 6.9$  Hz, 2H), 7.44-7.39 (m, 2H), 7.33 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 7.28-7.25 (m, 3H), 7.23 (s, 4H), 7.13-7.08 (m, 4H), 6.77-6.73 (m, 4H), 6.14 (d,  $J = 5.5$  Hz, 1H), 5.63 (dd,  $J = 8.2, 2.7$ , 1H), 4.38 (dd,  $J = 4.8, 3.4$  Hz, 1H), 3.96 (t,  $J = 2.7$  Hz, 1H), 3.80 (s, 3), 3.79 (s, 3H), 3.68 (t,  $J = 5.5$  Hz, 1H), 3.28 (m, 1H), 3.13 (s, 3H), 2.57-2.52 (m, 1H), 2.74-2.70 (m, 1H), 1.80-1.74 (m, 1H), 1.36-1.30 (m, 1H), 0.99 (s, 9H).

20

【 0 2 0 5 】

(S)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-O-[(1,1-dimethylethyl)diphenyl silyl]-2'-O-methyl-5'-C-trifluoroacetylaminopropyl-uridine (5)

Ar雰囲気下で化合物 (4) 0.21 g (0.24 mmol) をTHF 4.0 mLに溶かし、 $\text{Ph}_3\text{P}$  0.15 g (0.60 mmol)、蒸留水 0.17 mL (9.68 mmol) を加えて40 °Cで14時間攪拌。溶媒を減圧留去し、残渣を $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  2.5 mLに溶かし、 $\text{Et}_3\text{N}$  50  $\mu\text{L}$  (0.36 mmol)、 $\text{CF}_3\text{COOEt}$  87  $\mu\text{L}$  (0.73 mmol) を加えて11時間攪拌。反応液を減圧留去した後、EtOAcと蒸留水で生成物を抽出し、有機層をsat. NaCl aq. で洗い、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ で乾燥した。溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Hexane: EtOAc = 1: 1) で精製し、黄色の泡状化合物 (5) (0.19 g, 0.20 mmol, 83%) を得た。

30

【 0 2 0 6 】

$^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) d: 8.11 (s, 1H), 7.96 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H), 7.60-7.59 (m, 2H), 7.48 (d,  $J = 6.2$  Hz, 2H), 7.45-7.38 (m, 2H), 7.34 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 7.28-7.22 (m, 6H), 7.15-7.11 (m, 4H), 6.77-6.74 (m, 4H), 6.08 (s,  $J = 5.5$  Hz, 1H), 5.84 (s, 1H), 5.66 (dd,  $J = 8.2, 2.7$  Hz, 1H), 4.41 (t,  $J = 4.8$  Hz, 1H), 3.92 (dd,  $J = 3.4, 2.0$  Hz, 1H), 3.79 (s, 3H), 3.79 (s, 3H), 3.64 (t,  $J = 5.5$  Hz, 1H), 3.24-3.21 (m, 1H), 3.13 (s, 3H), 2.80-2.69 (m, 2H), 1.72-1.66 (m, 1H), 1.32-1.28 (m, 1H), 0.98 (s, 9H).

40

【 0 2 0 7 】

(S)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-O-methyl-5'-C-trifluoroacetylaminopropyl-uridine (6)

Ar雰囲気下で化合物(5) 0.19 g (0.20 mmol) をTHF 2.0 mLに溶かし、1 M TBAF 0.30 mL (0.30 mmol) を加え、室温で10時間攪拌。溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Hexane : EtOAc = 1: 1) で精製し、白色の泡状化合物 (6) (0.12 g, 0.17 mmol, 85%) を得た。

【 0 2 0 8 】

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) d: 8.56 (s, 1H), 7.82 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H), 7.43-7.41 (m, 2H), 7.35-7.23 (m, 6H), 6.85-6.81 (m, 4H), 6.23 (s, 1H), 5.84 (d,  $J = 2.3$  Hz, 1H), 5.65 (dd,  $J = 8.3, 2.3$  Hz, 1H), 4.16-4.11 (m, 1H), 3.94 (dd,  $J = 7.4, 3.4$  Hz

50



, 1H), 3.83-3.81 (m, 1H), 3.80 (s, 3H), 3.79 (s, 3H), 3.70-3.68 (m, 1H), 3.59 (s, 3H), 3.28-3.12 (m, 2H), 2.53 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 1.80-1.71 (m, 1H), 1.65-1.61 (m, 1H).

【 0 2 0 9 】

3'-O-[2-Cyanoethoxy(diisopropylamino)phosphino]- (S)- 5'-O-(4, 4'-dimethoxytrityl)- 2'-O-methyl-5'-C-trifluoroacetylaminopropyl-uridine (7)

Ar雰囲気下で化合物 (6) 0.14 g (0.20 mmol) をTHF 1.5 mLに溶かし、DIPEA 0.17 mL (0.96 mmol), CEP-Cl 0.088 mL (0.39 mmol) を加え、室温で30分間攪拌。CHCl<sub>3</sub>とsat. NaHCO<sub>3</sub> aq. で生成物を抽出し、有機層をsat. NaCl aq. で洗い、NaSO<sub>4</sub>で乾燥した。溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Hexane : EtOAc = 1 : 2) で精製し、白色の泡状化合物 (7) (0.14 g, 0.15 mmol, 77%) を得た。

10

【 0 2 1 0 】

<sup>31</sup>P NMR (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>) d: 150.8, 150.6.

【 0 2 1 1 】

上記スキームによれば、ウリジンや2'-O-アルキルウリジンなどのヌクレオシド誘導体を出発物質として、立体選択的なアルドール反応により化合物2などの5'-トシルオキシエチル体を短工程で得ることができ、結果として、意図するアミダイト剤を効率的に得ることができる。

【 0 2 1 2 】

本出願の明細書において参照される文献は、いずれも、その文献に記載された全ての内容を援用によりここに組み込まれるものである。

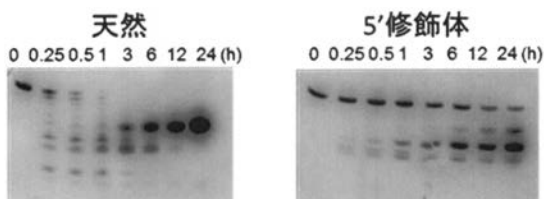
20

【 配列表フリーテキスト 】

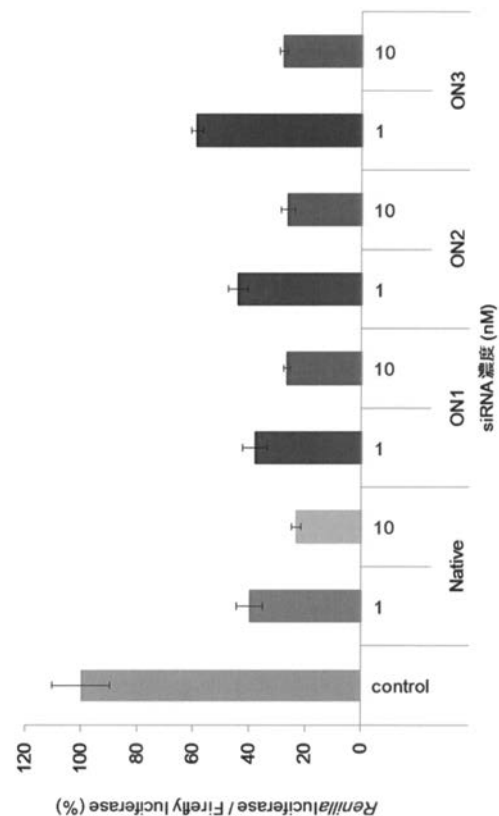
【 0 2 1 3 】

配列番号 1 ~ 2 : 人工 siRNA

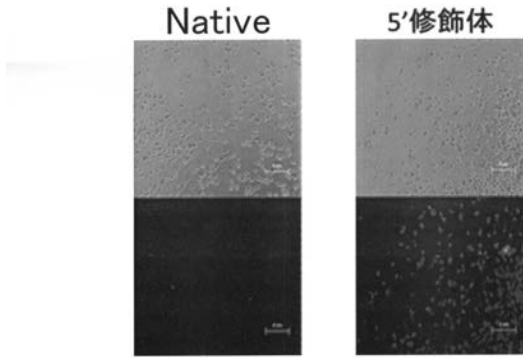
【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 3 】



## 【 配列表 】

2019088179000001.app

## 【 手続補正書 】

【 提出日 】 平成31年4月9日 (2019.4.9)

## 【 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

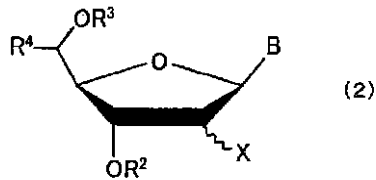
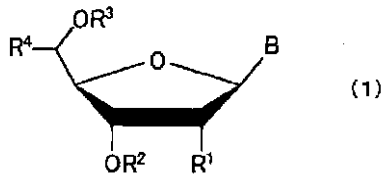
## 【 補正の内容 】

## 【 特許請求の範囲 】

## 【 請求項 1 】

以下の式 ( 1 ) 又は ( 2 ) で表される、ヌクレオシド誘導体又はその塩。

## 【化 1 4】



(式(1)中、

$R^1$  は、水酸基、水素原子がアルキル基又はアルケニル基で置換された水酸基又は保護された水酸基を表し、

式(2)中、 $X$  は、ハロゲン原子を表す。

式(1)及び式(2)中、

$R^2$  及び  $R^3$  は互いに同一又は異なってもよく、水素原子、水酸基の保護基、リン酸基、保護されたリン酸基、又は  $-P(=O)_n R^5 R^6$  ( $n$  は 0 又は 1 を示し、 $R^5$  及び  $R^6$  は、互いに同一又は異なってもよく、水素原子、水酸基、保護された水酸基、メルカプト基、保護されたメルカプト基、低級アルコキシ基、シアノ低級アルコキシ基、アミノ基、又は置換されたアミノ基のいずれかを示す。ただし、 $n$  が 1 のときには、 $R^5$  及び  $R^6$  が共に水素原子となることはない。)を示し、

$R^4$  は、それぞれ、炭素数が 2 以上のアルキレン基である連結基を有する  $NHR^7$  ( $R^7$  は、水素原子、アルキル基、アルケニル基又はアミノ基の保護基を表す。)、アジド基、アミジノ基又はグアニジノ基を表し、 $B$  は、プリン-9-イル基、2-オキソ-ピリミジン-1-イル基、置換プリン-9-イル基、又は置換 2-オキソ-ピリミジン-1-イル基のいずれかを表す。)

## 【請求項 2】

前記式(1)及び式(2)中、 $R^7$  は水素原子を表すか又は  $R^4$  は前記連結基を有するグアニジノ基を表す、請求項 1 に記載のヌクレオシド誘導体又はその塩。

## 【請求項 3】

前記式(1)及び式(2)中、 $R^4$  の前記連結基は、炭素数 2 以上 3 以下のアルキレン基を表す、請求項 1 又は 2 に記載のヌクレオシド誘導体又はその塩。

## 【請求項 4】

(削除)

## 【請求項 5】

請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載のヌクレオシド誘導体を含む、オリゴヌクレオチドに対する細胞膜透過性付与剤。

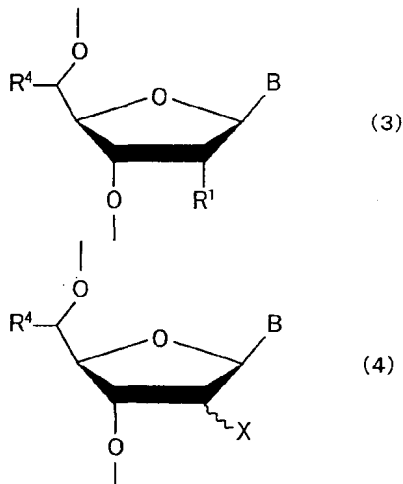
## 【請求項 6】

請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載のヌクレオシド誘導体を含む、オリゴヌクレオチドに対するリボヌクレアーゼ耐性付与剤。

## 【請求項 7】

以下の式(3)及び式(4)からなる群から選択される部分構造を少なくとも 1 個備える、オリゴヌクレオチド誘導体又はその塩。

## 【化 1 5】



(式(3)中、 $R^1$ は、ハロゲン原子、水酸基、水素原子がアルキル基又はアルケニル基で置換された水酸基又は保護された水酸基を表し、式(4)中、 $X$ は、ハロゲン原子を表す。式(3)及び式(4)中、 $R^4$ は、それぞれ、炭素数が2以上のアルキレン基である連結基を有する $NHR^7$ ( $R^7$ は、水素原子、アルキル基、アルケニル基又はアミノ基の保護基を表す。)、アジド基、アミジノ基又はグアニジノ基を表し、 $B$ は、プリン-9-イル基、2-オキソ-ピリミジン-1-イル基、置換プリン-9-イル基、又は置換2-オキソ-ピリミジン-1-イル基のいずれかを表す。)

## 【請求項 8】

前記部分構造を少なくとも2個備える、請求項7に記載のオリゴヌクレオチド誘導体又はその塩。

## 【請求項 9】

前記部分構造を少なくとも3個備えている、請求項7又は8に記載のオリゴヌクレオチド誘導体又はその塩。

## 【請求項 10】

前記部分構造を3個以上8個以下備える、請求項7～9のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド誘導体又はその塩。

## 【請求項 11】

前記部分構造を、前記オリゴヌクレオチドの5'末端側、中央部及び3'末端側に略均等に備える、請求項10に記載のオリゴヌクレオチド誘導体又はその塩。

## 【請求項 12】

請求項7～11のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド誘導体又はその塩を有効成分とする、*siRNA*剤。

## 【 国際調査報告 】

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>		International application No. PCT/JP2018/040544
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
Int.Cl. C07H19/06(2006.01)i, A61K31/712(2006.01)i, A61K31/713(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C07H19/10(2006.01)i, C07H21/00(2006.01)i, C07H21/02(2006.01)i, C07H23/00(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) Int.Cl. C07H19/06, A61K31/712, A61K31/713, A61K48/00, A61P43/00, C07H19/10, C07H21/00, C07H21/02, C07H23/00, C12N15/113		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Published examined utility model applications of Japan		1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan		1971-2018
Registered utility model specifications of Japan		1996-2018
Published registered utility model applications of Japan		1994-2018
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CPlus/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	PRAKASH, T.P. et al, "Identification of metabolically stable 5'-phosphate analogs that support single-stranded siRNA activity", Nucleic Acids Research, 2015, vol. 43, no. 6, pp. 2993-3011	1-12
X	JP 10-506915 A (ICN PHARMACEUTICALS) 07 July 1998, claims, examples, fig. 1, 9 & US 5681940 A & WO 1996/014329 A1 & EP 789706 A1 & KR 10-0274331 B & CN 1170412 A	1-10
<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:		"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date		"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
"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)		"&" document member of the same patent family
"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		
Date of the actual completion of the international search 10 December 2018 (10.12.2018)	Date of mailing of the international search report 18 December 2018 (18.12.2018)	
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/JP2018/040544

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WANG, G. et al, "Biophysical and biochemical properties of oligodeoxynucleotides containing 4'-C- and 5'-C-substituted thymidines", Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 1999, vol. 9, no. 6, pp. 885-890	1-10
X	WANG, G. et al, "5'-C-Branched thymidines: synthesis, stereochemistry, and incorporation into oligodeoxynucleotides", Tetrahedron Letters, 1996, vol. 37, no. 16, pp. 2739-2742	1-10
X	WO 1994/022454 A1 (ISIS PHARMACEUTICALS, INC.) 13 October 1994, scheme XVI, compound 48 & US 5489677 A & EP 649429 A1 & KR 10-0155574 B	1, 3
X	HAMPTON, A. et al, "Design of substrate-site-directed irreversible inhibitors of adenosine 5'-phosphate aminohydrolase. Effect of substrate substituents on affinity for the substrate site", Journal of Medicinal Chemistry, 1976, vol. 19, no. 8, pp. 1029-1033	1-4
X	JP 5-148293 A (MECT CO., LTD.) 15 June 1993, claims, paragraph [0003], formulas (II), (III), (IV), (V), (VI) (Family: none)	1-4
P, X	梶野瞭平 他, 4'-C-及び5'-C-アミノアルキル修飾 siRNA の合成と機能評価, 日本核酸医薬学会年会講演要旨集, 25 June 2018, vol. 4th, p. 81, non-official translation (KAZINO, Ryohei et al, "Synthesis of 4'-C- and 5'-C-aminoalkyl-modified siRNA and function evaluation", Lecture abstracts of annual conference of Nucleic Acids Therapeutics Society of Japan)	1-12
P, X	梶野瞭平 他, 5'-C-アミノプロピル-2'-O-メチルヌクレオシドを含む siRNA の合成と性質, 日本化学会春季年会講演予稿集, 06 March 2018, vol. 98th, 4D7-44, non-official translation (KAZINO, Ryohei et al, "Synthesis and characteristics of siRNA including 5'-C-aminopropyl-2'-O-methyl nucleoside", Lecture proceedings of the spring annual conference of the Chemical Society of Japan)	1-12
P, X	KAJINO, R. et al, "Synthesis and Property of 5'-C-Aminoalkyl-modified siRNA", Program & Abstracts. International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 14 November 2017, vol. 44th, pp. 142-143	1-12
P, X	梶野瞭平他, 糖部 5'-アミノアルキル修飾型 siRNA の合成と性質, 中部化学関係学協会支部連合秋季大会講演予稿集, 11 November 2017, vol. 48th, p. 81, non-official translation (KAZINO, Ryohei et al, "Synthesis and characteristics of saccharide 5'-aminoalkyl-modified siRNA", Annual Meeting of Union of Chemistry-Related Societies in Chubu Area, Japan)	1-12

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 8 / 0 4 0 5 4 4									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))											
Int.Cl. C07H19/06(2006.01)i, A61K31/712(2006.01)i, A61K31/713(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C07H19/10(2006.01)i, C07H21/00(2006.01)i, C07H21/02(2006.01)i, C07H23/00(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. C07H19/06, A61K31/712, A61K31/713, A61K48/00, A61P43/00, C07H19/10, C07H21/00, C07H21/02, C07H23/00, 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>1971-2018年</td></tr> <tr><td>日本国実用新案登録公報</td><td>1996-2018年</td></tr> <tr><td>日本国登録実用新案公報</td><td>1994-2018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	1971-2018年	日本国実用新案登録公報	1996-2018年	日本国登録実用新案公報	1994-2018年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2018年										
日本国実用新案登録公報	1996-2018年										
日本国登録実用新案公報	1994-2018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), CPlus/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	PRAKASH, T.P. et al, Identification of metabolically stable 5'-phosphate analogs that support single-stranded siRNA activity, Nucleic Acids Research, 2015, Vol.43, No.6, pp.2993-3011	1-12									
X	JP 10-506915 A (アイ・シー・エヌ・フアーマシユーテイカルズ) 1998.07.07, 特許請求の範囲、実施例、図1,9 & US 5681940 A & WO 1996/014329 A1 & EP 789706 A1 & KR 10-0274331 B & CN 1170412 A	1-10									
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。											
* 引用文献のカテゴリー		の日の後に公表された文献									
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的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 10.12.2018		国際調査報告の発送日 18.12.2018									
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/J P 2 0 1 8 / 0 4 0 5 4 4
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	WANG, G. et al, Biophysical and biochemical properties of oligodeoxynucleotides containing 4'-C- and 5'-C-substituted thymidines, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 1999, Vol. 9, No. 6, pp. 885-890	1-10
X	WANG, G. et al, 5'-C-Branched thymidines: synthesis, stereochemistry, and incorporation into oligodeoxynucleotides, Tetrahedron Letters, 1996, Vol. 37, No. 16, pp. 2739-2742	1-10
X	WO 1994/022454 A1 (ISIS PHARMACEUTICALS, INC.) 1994.10.13, SCHEME XVI の化合物 48 & US 5489677 A & EP 649429 A1 & KR 10-0155574 B	1, 3
X	HAMPTON, A. et al, Design of substrate-site-directed irreversible inhibitors of adenosine 5'-phosphate aminohydrolase. Effect of substrate substituents on affinity for the substrate site, Journal of Medicinal Chemistry, 1976, Vol. 19, No. 8, pp. 1029-1033	1-4
X	JP 5-148293 A (メクト株式会社) 1993.06.15, 特許請求の範囲、[0003]、式(II)、(III)、(IV)、(V)、(VI) (ファミリーなし)	1-4
P, X	梶野瞭平 他, 4'C-及び5'C-アミノアルキル修飾 siRNA の合成と機能評価, 日本核酸医薬学会年会講演要旨集, 2018.06.25, Vol. 4th, p. 81	1-12
P, X	梶野瞭平 他, 5'-C-アミノプロピル-2'-O-メチルヌクレオシドを含む siRNA の合成と性質, 日本化学会春季年会講演予稿集, 2018.03.06, Vol. 98th, 4D7-44	1-12
P, X	KAJINO, R. et al, Synthesis and Property of 5'-C-Aminoalkyl-modified siRNA, Program & Abstracts, International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 2017.11.14, Vol. 44th, pp. 142-143	1-12
P, X	梶野瞭平 他, 糖部 5'-アミノアルキル修飾型 siRNA の合成と性質, 中部化学関係学協会支部連合秋季大会講演予稿集, 2017.11.11, Vol. 48th, p. 81	1-12



## 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	
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/113	Z N A Z

(81) 指定国・地域 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, 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

(出願人による申告) 平成 27 ~ 30 年度、文部科学省、国立研究開発法人 日本医療研究開発機構、革新的バイオ医薬品創出基盤技術開発事業、産業技術力強化法第 19 条の適用を受ける特許出願

(72) 発明者 梶野 瞭平

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 AA03 AA09 AA18 AA20 CC03 DD01 LL10 MM02 MM04  
4C086 AA01 AA03 AA04 EA16 NA20 ZB21

## 【要約の続き】

、リン酸基、保護されたリン酸基、又は  $-P(=O)_nR^5R^6$  ( $n$  は 0 又は 1 を示し、 $R^5$  及び  $R^6$  は、互いに同一又は異なってもよく、水素原子、水酸基、保護された水酸基、メルカプト基、保護されたメルカプト基、低級アルコキシ基、シアノ低級アルコキシ基、アミノ基、又は置換されたアミノ基のいずれかを示す。ただし、 $n$  が 1 のときには、 $R^5$  及び  $R^6$  が共に水素原子となることはない。) を示し、 $R^4$  は、それぞれ連結基を有する  $NHR^7$  ( $R^7$  は、水素原子、アルキル基、アルケニル基又はアミノ基の保護基を表す。)、アジド基、アミジノ基又はグアニジノ基を表し、 $B$  は、プリン - 9 - イル基、2 - オキソ - ピリミジン - 1 - イル基、置換プリン - 9 - イル基、又は置換 2 - オキソ - ピリミジン - 1 - イル基のいずれかを表す。)

(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。