

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-175708

(P2004-175708A)

(43) 公開日 平成16年6月24日(2004.6.24)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C07D 471/04	C O 7 D 471/04	1 1 4 A
// C 1 2 N 15/09	C O 7 D 471/04	1 1 4 N
	C 1 2 N 15/00	Z N A A
		4 B O 2 4
		4 C O 6 5

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 32 頁)

(21) 出願番号	特願2002-342980 (P2002-342980)	(71) 出願人	301023364
(22) 出願日	平成14年11月26日 (2002.11.26)		株式会社ジェネティックラボ
			北海道札幌市北区北二十七条西六丁目2番
			12号
		(71) 出願人	502428401
			南川 典昭
			北海道札幌市北区北12条西6丁目 北海
			道大学大学院薬学研究科機能分子設計学講
			座薬化学分野内
		(74) 代理人	230104019
			弁護士 大野 聖二
		(74) 代理人	100106840
			弁理士 森田 耕司
		(74) 代理人	100105991
			弁理士 田中 玲子

最終頁に続く

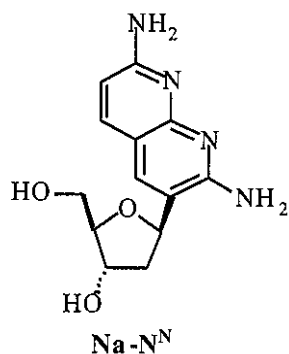
(54) 【発明の名称】 二環性ナフチリジンヌクレオシド

(57) 【要約】

【課題】核酸の高次構造をより安定化しうる塩基対モチーフを形成するための新規ヌクレオシド誘導体を提供すること。

【解決手段】塩基対形成に関与しうる4個の水素結合性官能基を有するヌクレオシド類似体であって、式I：

【化1】



式II：

【化2】

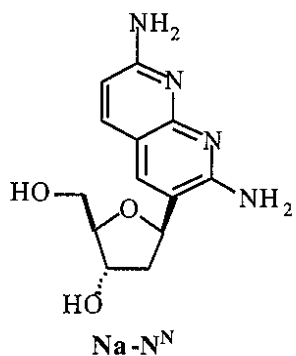
【特許請求の範囲】

【請求項 1】

塩基対形成に關与しうる 4 個の水素結合性官能基を有するヌクレオシド類似体であって、

式 I :

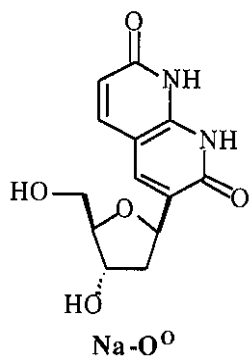
【化 1】



10

式 I I :

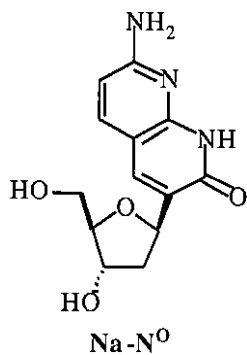
【化 2】



20

式 I I I :

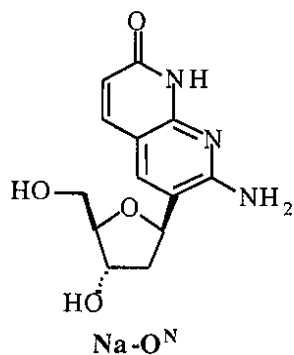
【化 3】



40

および式 I V :

【化 4】



10

からなる群より選択される構造を有するヌクレオシド類似体。

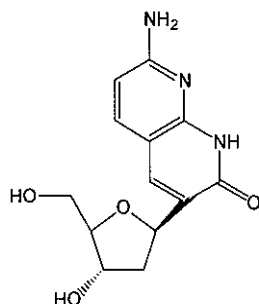
【請求項 2】

少なくとも 1 つの請求項 1 記載のヌクレオシド類似体を含むオリゴヌクレオチド。

【請求項 3】

式 I I I :

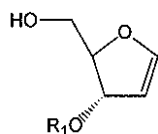
【化 5】



20

で表されるヌクレオシド類似体を製造する方法であって、式：

【化 6】

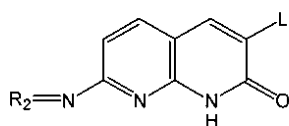


30

[式中、R₁ は水酸基の保護基である]

で表される化合物を、パラジウムの存在下で式：

【化 7】



40

[式中、R₂ はアミノ基の保護基であり、L は脱離基である]

で表される化合物と反応させ、次に脱保護することを含む方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、新規ヌクレオシド誘導体、ならびに当該ヌクレオシド誘導体を組み込んだオリ 50

ゴヌクレオチドに関する。

【0002】

【従来の技術】

DNAは遺伝情報の担い手としてその保存、伝達を行なっている。DNA二本鎖構造は主に、1)二組の相補的な塩基対(A:T, G:C)による水素結合の形成、2)この塩基対の積み重なりによる隣接塩基対でのスタッキング相互作用、および3)親水性官能基、疎水性官能基間や周りの環境との間での相互作用により、二重らせん構造を形成し、その熱的安定性を維持している。またDNA二本鎖に見られるような相互作用はDNA-RNAや核酸-蛋白質間などの分子認識にも関与しており、生体内における様々な機能の調節や発現に深く関与している。

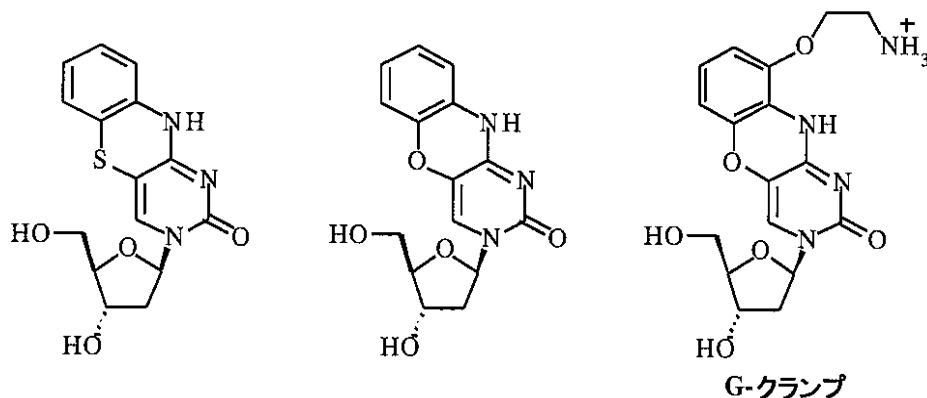
10

【0003】

近年、核酸合成技術の進歩により様々な配列を有するDNA、RNAが容易に合成可能となり、分子生物学の飛躍的な進歩をもたらされた。さらに非天然型の人工核酸が数多く開発され、アンチセンス法、アンチジーン法あるいはデコイ法をはじめとする核酸医薬品への応用が検討されている。このような用途に用いるために、これまでに多くの塩基部修飾ヌクレオシド誘導体が化学合成されDNA鎖に組み込んだ場合の諸性質が報告されている。例えば、Matteucciらは下記に示すような種々のヌクレオシド類を合成し、これらがDNA鎖中、相補鎖のグアニン塩基との塩基対によってDNA二本鎖を安定化することを見出ししている(Lin, K. Y.; Jones, R. J.; Matteucci, M. J. Am. Chem. Soc., 1995, 117, 3873-3874, Lin, K. Y.; Matteucci, M. J. Am. Chem. Soc., 1998, 120, 3531-3532)。

20

【化8】



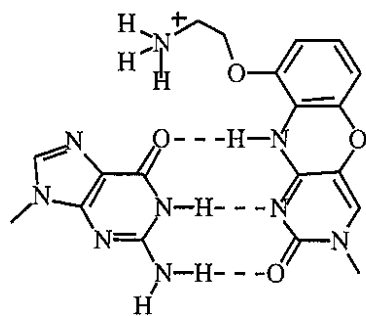
30

【0004】

G-クランプはグアニン塩基と4本の水素結合を形成し、1残基の導入によりTm値を18度も上昇させることが報告されており、現在、アンチセンス法への応用が検討されている。

【化9】

40



G-クランプ

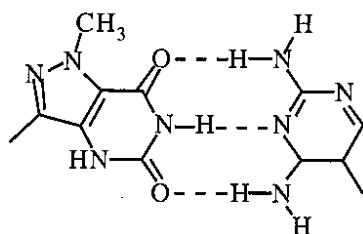
10

【0005】

また、非天然型の塩基対モチーフを考案する試みとしては、Bennerらによって :
 などの塩基対モチーフが考案され、ジェネティック・アルファベットの拡張の試みが行
 なわれている (Piccirilli, J. A.; Krauch, T.; Moroney, S. E.; Benner, S. A. Nature, 1990,
 343, 33-37, Leach, A. R.; Kollman, P. A. J. Am. Chem. Soc., 1992, 114, 3675-3683)。

【化10】

20

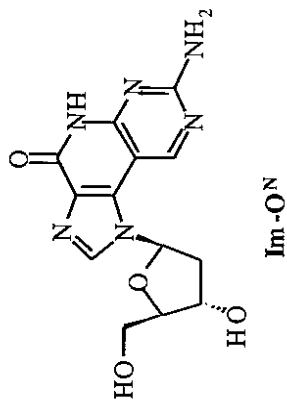


π:κ対

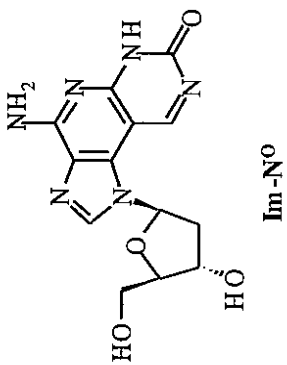
【0006】

一方、本発明者らは、これまでに4本の水素結合能を有する4種の三環性イミダゾピリド 30
 ピリミジンヌクレオシド類 (Im-N^N, Im-O^O, Im-N^O, Im-O^N)
 の合成を行なった (Kojima, N.; Ueno, Y.; Minakawa, N.; N. Matsuda, A., Nucleic Acids Symp. Ser., 1997, 37, 23-24)。

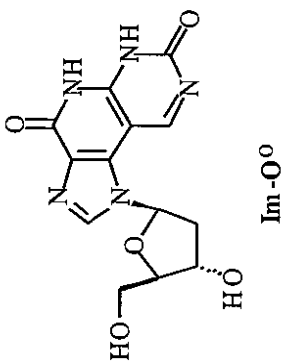
【化11】



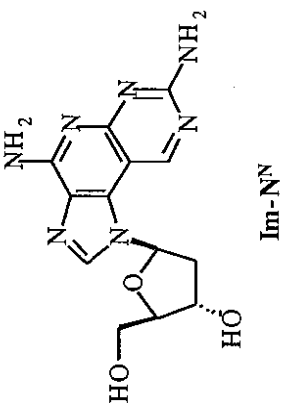
10



20



30



40

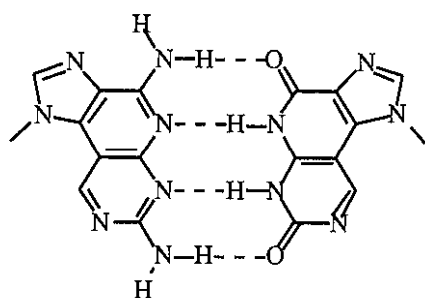
【 0 0 0 7 】

これらヌクレオシド類はDNAオリゴマーに組み込んだ場合、Im-N^N : Im-O^O間
およびIm-N^O : Im-O^N間でそれぞれ4本の水素結合による塩基対を形成し二本鎖

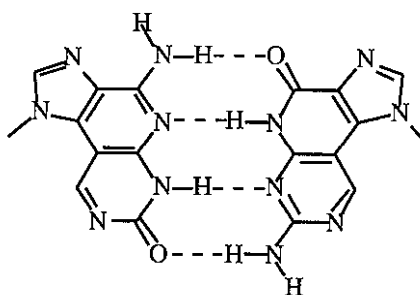
50

構造を安定化する。

【化 1 2】



Im-N^N:Im-O^O



Im-N^O:Im-O^N

10

【0008】

実際にこれら塩基対モチーフを組み込んだDNA二本鎖の熱的安定性を評価したところ、1塩基対のみの導入ではDNA二本鎖が不安定化することが分かった。さらに不連続で導入部位がふえると、その不安定化は増加した。ところが連続して3塩基対導入したところDNA二本鎖は極めて安定となり例えば、Im-O^N:Im-N^Oの塩基対導入では1塩基対あたり約6度安定化することが分かった。以上の結果から三環性イミダゾピリドピリミジンヌクレオシドは4本の水素結合および芳香環のひろがりによるスタッキング効果によってDNA二本鎖を熱的に安定化するが、同時にその塩基対導入部位前後の塩基対形成を妨げるためDNA二本鎖を不安定化させる効果もあわせもつと考えられた。1塩基対のみの導入ではその不安定効果が安定化効果を上回り、結果としてDNA二本鎖の熱的安定性が低下する(図1A)。さらに不連続で導入箇所がふえるとその不安定効果は増加する(図1B)。一方、連続して3残基導入した場合には、導入部前後に生じる不安定化よりも安定化効果が相対的に大きくなり、全体としてDNA二本鎖の熱的安定性が増加したものと考えられる(図1C)。

20

【0009】

したがって、当該技術分野においては、核酸の高次構造をより安定化しうる新規塩基対モチーフが求められている。

30

【0010】

本発明に関連する先行技術文献情報としては以下のものがある。

【非特許文献1】

Lin, K. Y.; Jones, R. J.; Matteucci, M. J. Am. Chem. Soc., 1995, 117, 3873-3874

【非特許文献2】

Lin, K. Y.; Matteucci, M. J. Am. Chem. Soc., 1998, 120, 3531-3532

【非特許文献3】

Piccirilli, J. A.; Krauch, T.; Moroney, S. E.; Benner, S. A. Nature, 1990, 343, 33-37

40

【非特許文献4】

Leach, A. R.; Kollman, P. A. J. Am. Chem. Soc., 1992, 114, 3675-3683

【非特許文献5】

Kojima, N.; Ueno, Y.; Minakawa, N.; Matsuda, A., Nucleic Acids Symp. Ser., 1997, 37, 23-24

【0011】

50

【発明が解決しようとする課題】

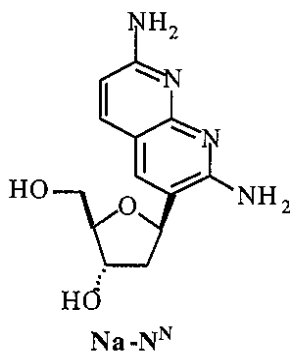
本発明は、核酸の高次構造をより安定化しうる塩基対モチーフを形成するための新規ヌクレオシド誘導体、ならびにそのようなヌクレオシド類似体を含むオリゴヌクレオチドを提供することを目的とする。

【0012】

【課題を解決するための手段】

本発明は、塩基対形成に關与しうる4個の水素結合性官能基を有するヌクレオシド類似体であって、式I：

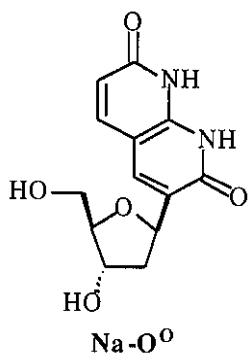
【化13】



20

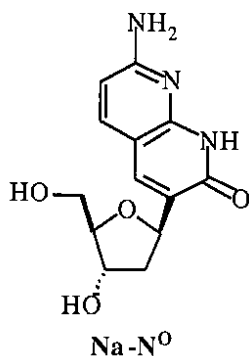
式II：

【化14】



式III：

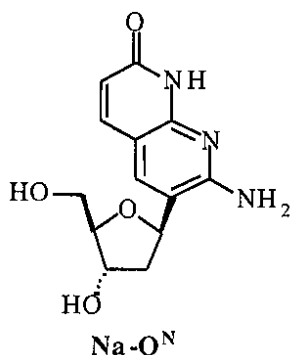
【化15】



50

および式 I V :

【化 1 6】



10

からなる群より選択される構造を有するヌクレオシド類似体を提供する。

【0013】

ここで、水素結合性官能基とは、水素結合に關与しうる官能基および原子をいい、例えば、水素、第1、第2および第3アミンまたはアミドのN、芳香族性のN、カルボニルまたはカルボン酸のO、水分子のHおよびO等が含まれるが、これに限定されない。

【0014】

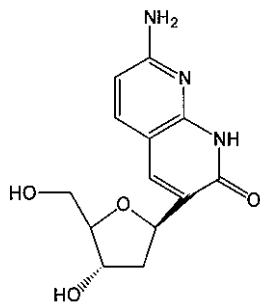
本発明はまた、少なくとも1つの上述の本発明のヌクレオシド類似体を含むオリゴヌクレオチドを提供する。

20

【0015】

本発明はまた、式 I I I :

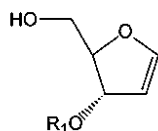
【化 1 7】



30

で表されるヌクレオシド類似体を製造する方法を提供する。該方法は、式:

【化 1 8】

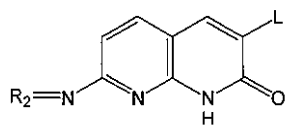


40

[式中、R₁ は水酸基の保護基である]

で表される化合物を、パラジウムの存在下で式:

【化 1 9】



[式中、 R_2 はアミン基の保護基であり、 L は脱離基である]
で表される化合物と反応させ、次に脱保護することを含む。

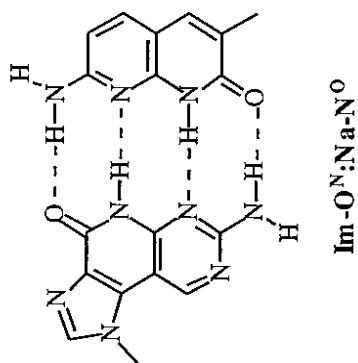
【 0 0 1 6 】

【 発明の実施の形態 】

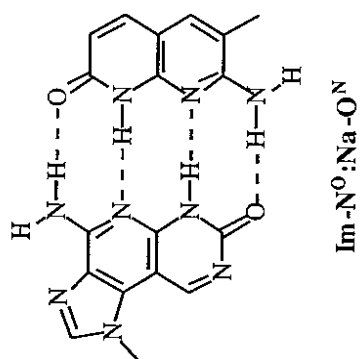
10

本発明の新規二環性ナフチリジンヌクレオシド類 ($Na - N^N$, $Na - O^O$, $Na - N^O$, $Na - O^N$) は、核酸の高次構造をより安定化できる新規塩基対モチーフである。これら化合物は先の三環性イミダゾピリドピリミジンヌクレオシド同士の塩基対のように DNA 二本鎖に歪みを生じさせることなく 4 本の水素結合を形成し、DNA 二本鎖をさらに安定化させることができる。

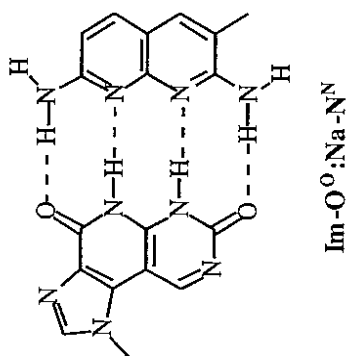
【 化 2 0 】



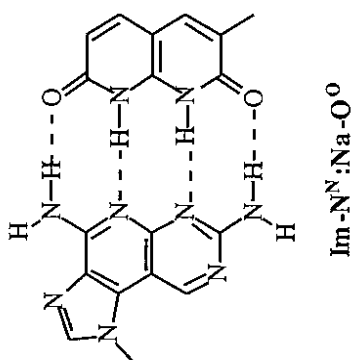
10



20



30



40

【 0 0 1 7 】

本発明のヌクレオシド類似体は、4本の水素結合によって塩基対を形成する新規な塩基対モチーフであり、これをDNAに組み込むことにより極めて有用な機能性人工核酸を創製

50

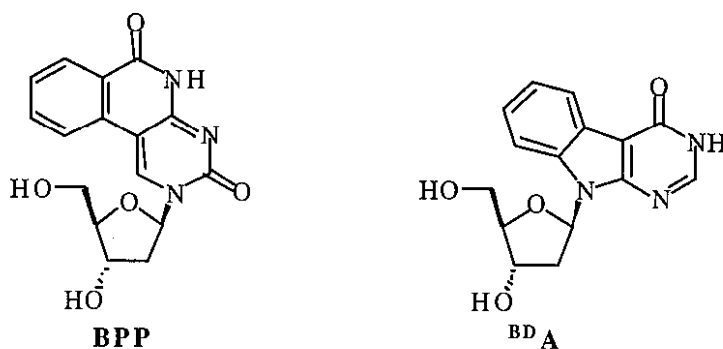
することができる。したがって、二重らせん構造をはじめとする核酸の高次構造の調節および安定化をはかり、核酸医薬品への応用に有用である。例えば、先の三環性ヌクレオシドと組み合わせることにより、熱的に極めて安定なDNA二本鎖を得ることが出来、デコイ分子として利用できることが期待できる。またこのナフチリジン塩基は天然の核酸塩基とも塩基対を形成することが期待でき、アンチセンス分子としての利用も可能と考えられる。

【0018】

さらにこの化合物は先の三環性ヌクレオシドと同様、蛍光性ヌクレオシドである。これら化合物が相補鎖側の核酸塩基によって異なる応答性をしめせばSNPsの検出法にも利用可能と考えられる。なおこのような塩基応答性蛍光ヌクレオシドとしてはBPPや^BD AなどがSaitoらのグループによって報告されている(Okamoto, A.; Tainaka, K.; Saito, I. 第17回生体機能関連化学シンポジウム, 90-91, Okamoto, A.; Tanaka, K.; Fukuta, T.; Saito, I. 第17回生体機能関連化学シンポジウム, 274-275)。

10

【化21】



20

【0019】

しかし、本発明では先の三環性ヌクレオシドとあわせて計8種類の蛍光ヌクレオシドが得られることから、より汎用性の高いSNPs検出やハイブリダイゼーション検出の蛍光プローブとして用いることができる。

30

【0020】

本発明のヌクレオシド誘導体は、以下のようにして合成することができる。

【0021】

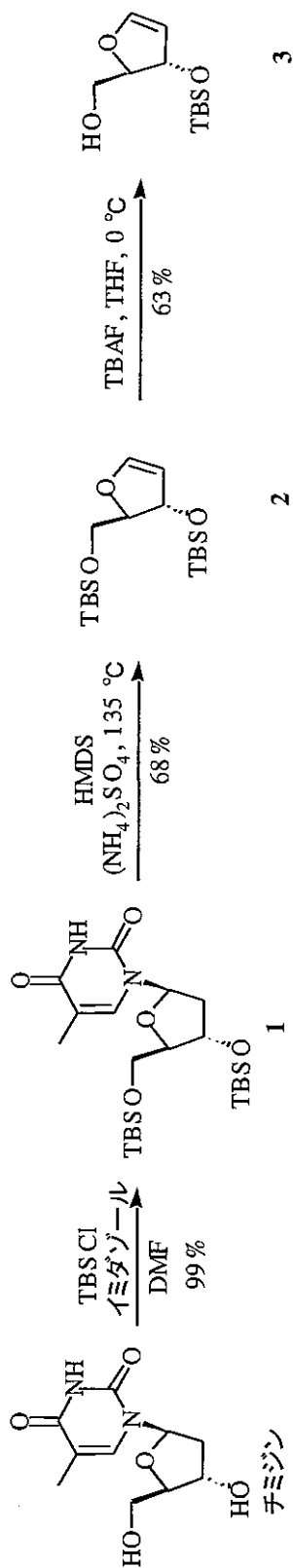
目的化合物であるナフチリジンヌクレオシド類はC-ヌクレオシドであり塩基部と糖部をそれぞれ構築した後、パラジウム触媒を用いるC-グリコシレーションを行ない合成する。

【0022】

まず、糖部は文献記載の方法に従い、チミジンの糖部水酸基をTBS基で保護した後、HMDS、硫酸アンモニウムで処理してグリカル体2を得る(Coleman, R. S.; Madaras, M. L. J. Org. Chem., 1998, 63, 5700-5703)。その後、TBAFで処理し、5位のTBS基を選択的に脱保護して化合物3とする(スキーム1)。

40

【化22】



10

20

30

40

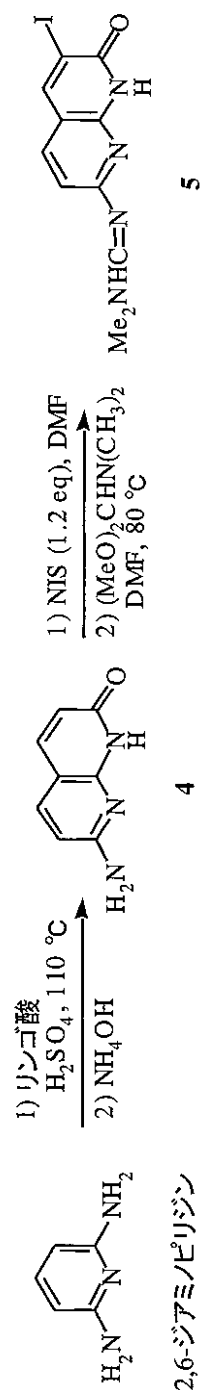
【0023】

また、塩基部は文献記載の方法に従い、2,6-ジアミノピリミジンを硫酸中リンゴ酸と反応させ、アンモニア水で中和してナフチリジン誘導体4を得る(Newkome, G. R.; Garbis, S. J.; Majestic, V. K.; Fronczek, F. R.; Chiari, G. J. *Org. Chem.*, 1981, 46, 833-839)。その後、化合物4を当量のNISで処理し、

50

アミノ基をジメチルアミジン基で保護し、6-位ヨード体5とする(スキーム2)。

【化23】



10

20

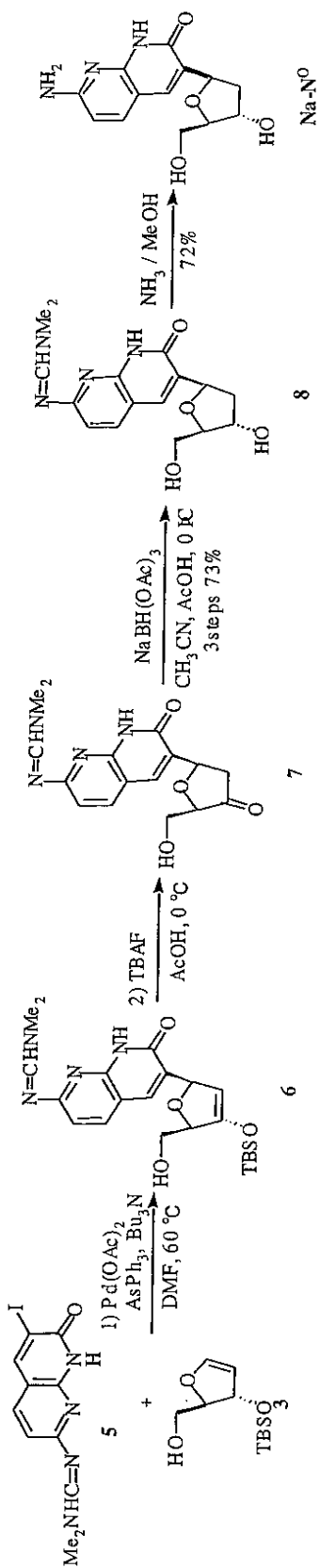
30

40

【0024】

続いて、グリカル誘導体3とナフチリジン誘導体5とのH e c k反応により化合物6とした後、T B A Fで処理し3'-位ケトン体7を得る。次にこれを還元し、ジメチルアミジン基を脱保護後、二環性ナフチリジンヌクレオシド (Na - N⁰)を合成することができる(スキーム3)(Zhang, H. C.; Daves, G. D., Jr. J. Org. Chem., 1992, 57, 4690 - 4696)。

【化24】



10

20

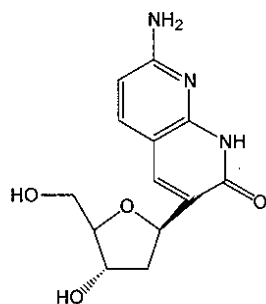
30

40

【 0 0 2 5 】

すなわち、本発明はまた、式 I I I :

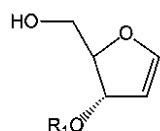
【 化 2 5 】



10

で表されるヌクレオシド類似体を製造する方法に関し、該方法は、式：

【化 2 6】

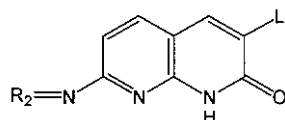


[式中、 R_1 は水酸基の保護基である]

で表される化合物を、パラジウム存在下で式：

20

【化 2 7】



[式中、 R_2 はアミン基の保護基であり、 L は脱離基である]

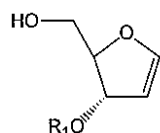
で表される化合物と反応させ、次に脱保護することを含む。

【 0 0 2 6 】

式：

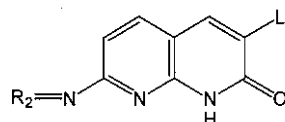
30

【化 2 8】



の化合物は、天然のヌクレオシド、例えばチミジンの 3' - OH を適当な保護基 R_1 で保護した後に、常法により塩基を除去することにより製造することができる。また、式：

【化 2 9】



40

の化合物は、2, 6 - ジアミノピリジンをリンゴ酸と反応させてナフチリジン環を形成し、次に、6 位に適当な脱離基 L を導入するとともに、アミノ基を適当な保護基 R_2 で保護することにより製造することができる。

【 0 0 2 7 】

他の二環性ナフチリジンヌクレオシド ($Na - N^N$, $Na - O^O$, $Na - O^N$) につ

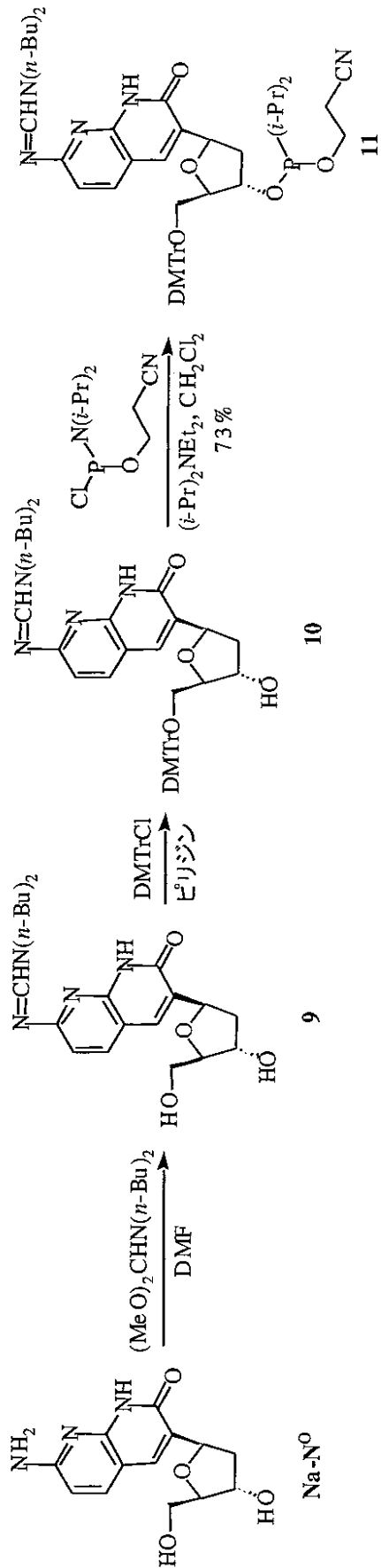
50

いても同様な方法により合成することができる。

【0028】

本発明のヌクレオシド類似体は、当該技術分野において知られる方法によりアミダイト体に変換して、オリゴヌクレオシド中に取り込ませることができる。具体的には、得られたNa-N⁰体を、塩基部のアミノ基をジブチルアミジン基で保護して化合物9とした後、常法に従い5'-水酸基をジメトキシトリチル化し、続いて3'-位水酸基をホスホロアミダイト化によりアミダイト体11へと変換する(スキーム4)。得られたアミダイト体11は、固相ホスホロアミダイト法に従って、DNAオリゴマーに導入することができる。

【化30】



10

20

30

40

【 0 0 2 9 】

すなわち、別の観点においては、本発明は上述の二環性ナフチリジンヌクレオシドを含む 50

オリゴヌクレオチドを提供する。このようにして得られる本発明のオリゴヌクレオチドは、アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、プライマー、アプタマー、アンチジーン、プローブ等として、診断、治療および研究試薬として使用することができる。好ましくは、本発明のオリゴヌクレオチドは約6から約100ヌクレオチドの長さである。本発明のより好適な実施態様においては、オリゴヌクレオチドは約12から約20ヌクレオチドの長さである。オリゴヌクレオチドは、修飾された糖、例えば2'位に置換基を有する糖を含んでいてもよく、アデニン、グアニン、シトシン、チミン、ウラシル以外の核酸塩基、例えばヒポキサンチン、5-アルキルシトシン、5-アルキルウラシル、5-ハロウラシル、6-アザピリミジン、6-アルキルピリミジン等を含んでいてもよい。また、ホスホジエステル以外のヌクレオシド間結合、例えばホスホロチオエート結合を含んでいてもよい。

【0030】

【実施例】

以下に実施例により本発明をより詳細に説明するが、これらの実施例は本発明の範囲を制限するものではない。

【0031】

実施例1

3', 5'-O-(tert-ブチルジメチルシリル)チミジン (1)
 Ar 雰囲気下、チミジン (9.7 g, 40.0 mmol) を DMF (150 mL) に溶解し、イミダゾール (13.6 g, 200.0 mmol)、TBSCl (15.0 g, 100.0 mmol) を加え、室温で2時間攪拌した。溶媒を留去し、残渣を酢酸エチル (600 mL) に溶解し、水 (200 mL) で2回、飽和食塩水 (200 mL) で1回洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を留去し、残渣を少量の酢酸エチルに溶解し、シリカゲルを加減圧下乾固しシリカゲルに吸着させた後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (7.8 x (15.0 + 3.0) cm, ヘキサン : 酢酸エチル = 3 : 1) で分離、精製して、化合物 1 (18.6 g, 39.6 mmol, 99%) を白色固体として得た。
¹H-NMR (CDCl₃) ; 8.44 (br s, 1 H, NH), 7.45 (d, 1 H, H-6, J_{6,5-Me} = 1.3 Hz), 6.31 (dd, 1 H, H-1', J_{1',2'a} = 5.9, J_{1',2'b} = 7.9 Hz), 4.38 (ddd, 1 H, H-3', J_{3',2'b} = 2.6, J_{3',2'a} = 5.9, J_{3',4'} = 5.2 Hz), 3.90 (ddd, 1 H, H-4', J_{4',3'} = 5.2, J_{4',5'a} = 2.6, J_{4',5'b} = 2.0 Hz), 3.85 (dd, 1 H, H-5'a, J_{5'a,4'} = 2.6, J_{5'a,5'b} = 11.2 Hz), 3.73 (dd, 1 H, H-5'b, J_{5'b,4'} = 2.0, J_{5'b,5'a} = 11.2 Hz), 2.22 (ddd, 1 H, H-2'a, J_{2'a,1'} = 5.9, J_{2'a,2'b} = 13.2, J_{2'a,3'} = 2.6 Hz), 1.97 (ddd, 1 H, H-2'b, J_{2'b,1'} = 7.9, J_{2'b,2'a} = 11.2, J_{2'b,3'} = 5.9 Hz), 1.89 (d, 3 H, 5-Me, J_{5-Me,6} = 1.3 Hz), 0.91 and 0.87 (each s, each 9 H, tert-Bu), 0.09 (s, 6 H, Me x 2), 0.06 and 0.05 (each s, each 3 H, Me)

【0032】

実施例2

1, 4-アンヒドロ-3, 5-ビス-O-(tert-ブチルジメチルシリル)-2-デオキシ-D-エリスロ-ペント-1-エニトール (2)
 化合物 1 (10.3 g, 21.0 mmol) を HMDS (100 mL) に溶解し、硫酸アンモニウム (5.5 g, 42.0 mmol) を加え 135 で2時間加熱

攪拌した。溶媒を留去し、残渣をヘキサン (300 mL) に溶解し、水 (150 mL) で2回、飽和食塩水 (150 mL) で1回洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (4 x 8 cm, ヘキサン : エーテル = 7 : 1) で分離、精製して、化合物2 (5.3 g, 15.0 mmol, 72%) を無色液状物質として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) ; 6.45 (d, 1 H, H-1, $J_{1,2} = 2.6$ Hz), 4.99 (dd, 1 H, H-2, $J_{2,1} = 2.6$, $J_{2,3} = 5.3$ Hz), 4.84 (d, 1 H, H-3, $J_{3,2} = 5.3$, $J_{3,4} = 2.6$ Hz), 4.27 (dt, 1 H, H-4, $J_{4,3} = 2.6$, $J_{4,5a} = J_{4,5b} = 5.9$ Hz), 3.68 (dd, 1 H, H-5a, $J_{5a,4} = 5.9$, $J_{5a,5b} = 10.6$ Hz), 3.48 (dd, 1 H, H-5b, $J_{5b,4} = 5.9$, $J_{5b,5a} = 10.6$ Hz), 0.88 and 0.87 (each s, each 9 H, tert-Bu), 0.07 and 0.05 (each s, each 6 H, each Me x 2)

10

【0033】

実施例 3

1, 4 - アンヒドロ - 3 - O - (tert - ブチルジメチルシリル) - 2 - デオキシ - 5 - ヒドロキシ - D - エリスロ - ペント - 1 - エニトール (3)

Ar 雰囲気下、化合物2 (5.3 g, 15.0 mmol) を THF (40 mL) に溶解し、氷冷下 TBAF (15.7 mL, 15.7 mmol) を滴下し、同温度にて1時間攪拌した。溶媒を留去し、残渣を少量のエーテルに溶解し、シリカゲルを加減圧下乾固しシリカゲルに吸着させた後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (4 x (10.0 + 3.0) cm, ヘキサン : エーテル = 5 : 1) で分離、精製して、化合物3 (2.2 g, 9.3 mmol, 62%) を無色液状物質として得た。

20

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) ; 6.47 (d, 1 H, H-1, $J_{1,2} = 1.9$ Hz), 5.04 (dd, 1 H, H-2, $J_{2,1} = 1.9$, $J_{2,3} = 5.3$ Hz), 4.79 (dd, 1 H, H-3, $J_{3,2} = 5.3$, $J_{3,4} = 3.3$ Hz), 4.33 (ddd, 1 H, H-4, $J_{4,3} = 3.3$, $J_{4,5a} = 6.6$, $J_{4,5b} = 7.3$ Hz), 3.68 (dd, 1 H, H-5a, $J_{5a,4} = 6.6$, $J_{5a,5b} = 11.2$ Hz), 3.60 (dd, 1 H, H-5b, $J_{5b,4} = 7.3$, $J_{5b,5a} = 11.2$ Hz), 0.88 (s, 9 H, tert-Bu), 0.07 (s, 6 H, Me x 2)

30

【0034】

実施例 4

2 - アミノ - 7 - ヒドロキシ - 1, 8 - ナフチリジン (4)

2, 6 - ジアミノピリミジン (11.0 g, 0.10 mmol)、リンゴ酸 (15.0 g, 0.11 mmol) に氷冷下、硫酸 (50 mL) を加えた後、110 で2時間加熱攪拌した。反応液に氷を加えアンモニア水で中和した。析出した沈澱をろ取り、水、エタノール、アセトンで洗浄して、化合物4 (14.5 g, 0.09 mmol, 90%) を黄褐色固体として得た。

40

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) ; 11.86 (br s, 1 H, H-1), 7.63 (d, 1 H, H-4, $J_{4,3} = 9.2$ Hz), 7.62 (d, 1 H, H-5, $J_{5,6} = 8.6$ Hz), 7.03 (s, 2 H, H-4, NH_2), 6.33 (d, 1 H, H-6, $J_{6,5} = 8.6$ Hz), 6.10 (d, 1 H, H-3, $J_{3,4} = 9.2$ Hz)

【0035】

50

実施例 5

2 - (N , N - ジメチルホルムアミジノ) アミノ - 7 - ヒドロキシ - 6 - ヨード - 1 , 8 - ナフチリジン (5)

Ar 雰囲気下、化合物 4 (5 . 0 g , 31 mmol) を DMF (30 mL) に懸濁し、NIS (8 . 4 g , 37 mmol) を加え 24 時間攪拌した。沈澱をろ取り、DMF、エタノール、アセトンで洗浄し、6 - ヨード体と化合物 4 の混合物 (1 . 3 g , 6 - ヨード体 = 3 . 5 mmol , 4 = 1 . 4 mmol) を黄褐色固体として得た。

Ar 雰囲気下、6 - ヨード体と化合物 4 の混合物 (500 mg , 6 - ヨード体 = 1 . 30 mmol , 4 = 0 . 60 mmol) を DMF (10 mL) に懸濁し、1,1 - ジメトキシトリメチルアミン (0 . 28 mL , 2 . 1 mmol) を加え、80 で加熱攪拌した。12 時間後、1,1 - ジメトキシトリメチルアミン (0 . 12 mL , 0 . 90 mmol) を追加してさらに 12 時間加熱攪拌した。反応液を放冷した後、沈澱をろ取り、得られた固体を少量のクロロホルム : メタノール = 1 : 1 の混合溶媒に溶解し、シリカゲルを加え減圧下乾固しシリカゲルに吸着させた後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (1 . 8 x (11 . 0 + 3 . 0) cm , 0 5 % EtOH in CHCl₃) で分離、精製して、化合物 5 (327 mg , 0 . 95 mmol , 73 %) を黄色固体として得た。

mp 244 - 246

EI - MS (LR) : m / z 342 (M⁺)

¹H - NMR (DMSO - d₆) ; 12 . 01 (br s , 1 H , NH) , 8 . 50 (s , 1 H , CH) , 8 . 49 (s , 1 H , H - 5) , 7 . 79 (d , 1 H , H - 3 , J_{3,4} = 8 . 6 Hz) , 6 . 67 (d , 1 H , H - 4 , J_{4,3} = 8 . 6 Hz) , 3 . 10 (s , 3 H , Me) 3 . 02 (s , 3 H , Me)

¹³C - NMR (DMSO - d₆) ; 162 . 95 , 159 . 72 , 156 . 11 , 149 . 63 , 147 . 16 , 136 . 42 , 113 . 37 , 110 . 57 , 90 . 30 , 34 . 49

計算値 : C₁₁H₁₁IN₄O : C , 38 . 62 ; H , 3 . 24 ; N , 16 . 38 ; I , 37 . 09 .

実測値 : C , 38 . 42 ; H , 3 . 32 ; N , 15 . 95 ; I , 36 . 72 .

【 0036 】

実施例 6

6 - (- D - グリセロ - ペントフラン - 3' - ウロス - 1' - イル) - 2 - (N , N - ジメチルホルムアミジノ) アミノ - 7 - ヒドロキシ - 1 , 8 - ナフチリジン (7)

Ar 雰囲気下、酢酸パラジウム (0 . 09 g , 0 . 4 mmol)、トリフェニルアルシン (0 . 25 g , 0 . 8 mmol) を DMF (10 mL) に溶解し室温で 20 分間攪拌した。Ar 雰囲気下、化合物 5 (1 . 37 g , 4 . 0 mmol)、化合物 3 (1 . 01 g , 4 . 4 mmol)、トリブチルアミン (1 . 1 mL , 4 . 5 mmol) を DMF (10 mL) に溶解し、ここに先に調整したパラジウム溶液を加え、60 で 30 時間加熱攪拌した。化合物 6 の生成を TLC にて確認後、反応液を氷冷し酢酸 (1 . 0 mL) を加え、続いて TBAF (8 . 0 mL , 8 . 0 mmol) を加え、同温度下で 45 分間攪拌した。溶媒を留去し残渣を少量のメタノールに溶解し、シリカゲルを加え減圧下乾固しシリカゲルに吸着させた後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (3 . 0 x (13 . 0 + 3 . 0) cm , 0 10 % MeOH in CHCl₃) で分離、精製して、化合物 7 (1 . 09 g , 3 . 3 mmol , 82 %) を黄色固体として得た。

FAB - MS (LR) : m / z 330 (M⁺)

¹H - NMR (DMSO - d₆) ; 8 . 49 (s , 1 H , CH) , 8

. 0 0 (s , 1 H , H - 5) , 7 . 8 4 (d , 1 H , H - 4 , J_{4,3} = 8 . 6 Hz) , 6 . 7 0 (d , 1 H , H - 3 , J_{3,4} = 8 . 6 Hz) , 5 . 2 1 (d d , 1 H , H - 1 ' , J_{1',2'a} = 6 . 0 , J_{1',2'b} = 1 0 . 6 Hz) , 4 . 9 6 (s , 1 H , OH) , 4 . 0 2 (m , 1 H , H - 4 ') , 3 . 7 0 (m , 2 H , H - 5 ' a and H - 5 ' b) , 2 . 8 5 (d d , 1 H , H - 2 ' a , J_{2'a,1'} = 6 . 0 , J_{2'a,2'b} = 1 8 . 5 Hz) , 2 . 3 0 (d d , 1 H , H - 2 ' b , J_{2'b,1'} = 1 0 . 6 , J_{2'b,2'a} = 1 8 . 5 Hz)

【 0 0 3 7 】

10

実施例 7

2 - アミノ - 6 - (2 ' - デオキシ - - D - リボフラノシル) - 7 - ヒドロキシ - 1 , 8 - ナフチリジン (Na - N⁰)

Ar 雰囲気下、化合物 7 (1 . 0 8 g , 3 . 2 6 mmol) を氷冷し酢酸 (5 0 mL) とアセトニトリル (5 0 mL) に溶解し、NaBH(OAc)₃ (1 . 0 4 g , 4 . 9 mmol) を加え同温度下で 1 時間攪拌した。溶媒を留去し、メタノールで共沸した後、残渣を少量のメタノールに溶解し、シリカゲルを加え減圧下乾固しシリカゲルに吸着させた後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (3 . 0 × (1 3 . 0 + 4 . 0) cm , 5 2 5 % MeOH in CHCl₃) で分離、精製して、化合物 8 (1 . 1 6 g , 3 . 4 mmol , quant.) を黄色固体として得た。

20

化合物 8 (1 . 1 6 g , 3 . 4 mmol) を少量のメタノールに懸濁し、スチール封管にとりメタノール性アンモニア (1 0 0 mL) を加え、80 で 2 4 時間加熱攪拌した。溶媒を留去し、残渣を少量のメタノールに溶解し、シリカゲルを加え減圧下乾固しシリカゲルに吸着させた後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (3 . 4 × (1 0 . 0 + 2 . 0) cm , 1 0 2 5 % MeOH in CHCl₃) で分離、精製して、化合物 Na - N⁰ (0 . 6 7 g , 2 . 4 mmol , 7 2 %) を黄色固体として得た。

mp > 2 8 0

FAB - MS (LR) : m / z 2 7 8 (M⁺)

¹H - NMR (DMSO - d₆) ; 1 1 . 7 2 (b s s , 1 H , NH) , 7 . 6 9 (s , 1 H , H - 5) , 7 . 8 4 (d , 1 H , H - 4 , J_{4,3} = 8 . 6 Hz) , 6 . 7 7 (s , 2 H , NH₂) , 6 . 3 3 (d , 1 H , H - 3 , J_{3,4} = 8 . 6 Hz) , 4 . 9 8 (m , 2 H , H - 1 ' and OH) , 4 . 7 7 (m , 1 H , OH) , 4 . 1 2 (m , 1 H , H - 3 ') , 3 . 7 5 (m , 1 H , H - 4 ') , 3 . 4 5 (m , 2 H , H - 5 ' a and H - 5 ' b) , 2 . 3 1 (m , 1 H , H - 2 ' a) , 1 . 6 5 (m , 1 H , H - 2 ' b)

30

¹³C - NMR (DMSO - d₆) ; 1 6 2 . 1 5 , 1 5 9 . 9 5 , 1 4 9 . 2 1 , 1 3 7 . 0 0 , 1 3 3 . 7 3 , 1 2 7 . 5 1 , 1 0 5 . 1 2 , 1 0 4 . 6 8 , 8 7 . 1 2 , 7 4 . 6 8 , 7 2 . 3 2 , 6 2 . 4 2 , 4 1 . 2 2

40

計算値 : C₁₃H₁₅N₃O₄ · 0 . 7 2 H₂O : C , 5 3 . 8 0 ; H , 5 . 7 1 ; N , 1 4 . 4 8 .

実測値 : C , 5 3 . 6 6 ; H , 5 . 3 5 ; N , 1 4 . 3 6 .

【 0 0 3 8 】

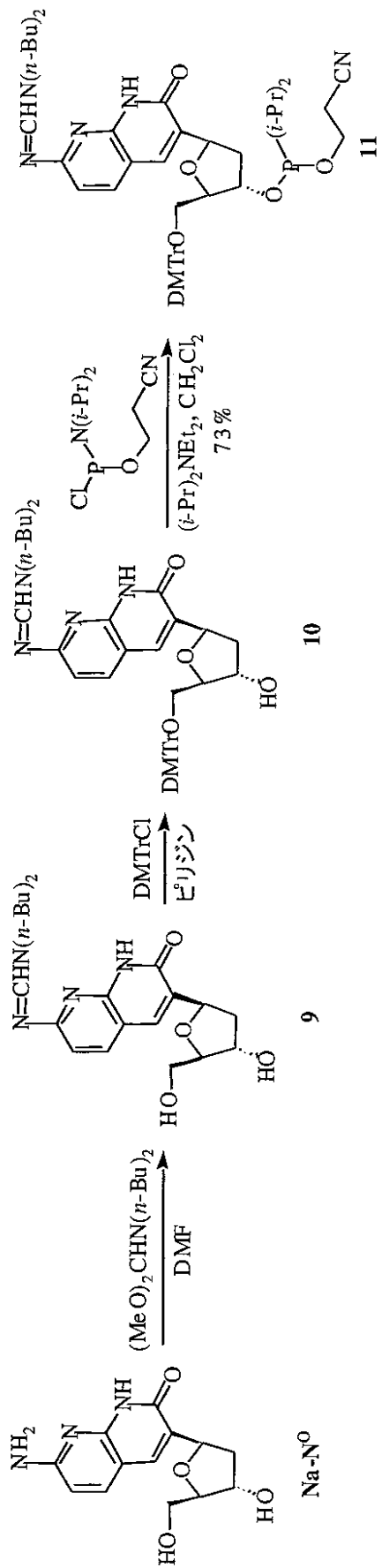
実施例 8

DNA 二本鎖の熱的安定性の測定

実施例 7 で得られた 2 - アミノ - 6 - (2 ' - デオキシ - - D - リボフラノシル) - 7 - ヒドロキシ - 1 , 8 - ナフチリジン (Na - N⁰) を、塩基部のアミノ基をジブチルアミジン基で保護して化合物 9 とした後、常法に従い 5 ' - 水酸基をジメトキシトリチル化し、続いて 3 ' - 位水酸基をホスホロアミダイト化によりアミダイト体 1 1 へと変換した

50

(スキーム 4) 。
【 化 3 1 】



10

20

30

40

50

得られたアミダイト体 11 を、固相ホスホロアミダイト法に従って DNA オリゴマーに導入し、三環性イミダゾピリドピリミジンヌクレオシド $I m - O^N$ を組み込んだ DNA オリゴマーを相補鎖として、DNA 二本鎖中での熱的安定性について評価した。その結果、 $I m - O^N : N a - N^O$ 塩基対を 1 塩基対導入した場合でも、三環性イミダゾピリドピリミジン同士の塩基対と異なり、DNA 二本鎖は極めて安定となり、G : C 塩基対と比較して 8.6 度安定化することが分かった (図 2 A)。また、連続して 3 塩基対導入した場合、 T_m 値は 95.7 となり、DNA 二本鎖が 26.7 度安定化されることが明らかとなった。これは 1 塩基対あたり、8.9 度の安定化であり、1 塩基対導入した場合にも 3 塩基対導入した場合にも DNA 二本鎖を安定化することができた (図 2 B)。

【0040】

以上のことから、新規二環性ナフチリジンヌクレオシドは三環性イミダゾピリドピリミジンの相補塩基として機能し、DNA 二本鎖に歪みを生じさせることなく 4 本の水素結合を形成し、DNA 二本鎖をさらに安定化させることが明らかになった。

【0041】

【配列表】

Sequence Listing

<110> Genetic Lab Inc.

<120> Bicyclic Naphthyridine Nucleosides

<130> PGL-0006

<160> 2

<210> 1

<211> 17

10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> a model sequence for experimental use

<220>

<222> 9

<223> n is a nucleotide comprising a bicyclic naphthyridine nucleoside a
nalog

20

<400> 1

gcaccgaana aaccacg 17

<210> 2

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> a model sequence for experimental use

<220>

<222> 8

<223> n is a nucleotide comprising a bicyclic naphthyridine nucleoside a
nalog

<222> 9

40

<223> n is a nucleotide comprising a bicyclic naphthyridine nucleoside a

nalog

<222> 10

<223> n is a nucleotide comprising a bicyclic naphthyridine nucleoside a

nalog

<400> 2

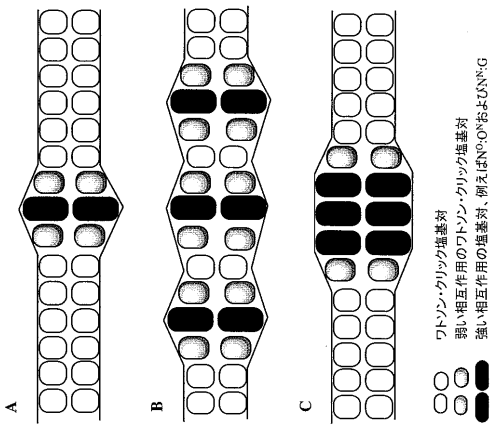
gcaccgaixx aaccacg 17

【図面の簡単な説明】

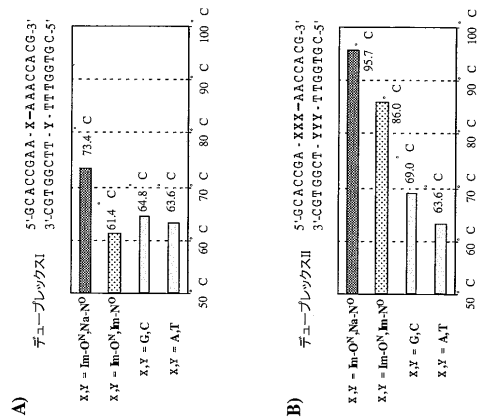
【図1】図1は、三環性イミダゾピリドピリミジンヌクレオシドを含むDNA二本鎖の模式図を示す。

【図2】図2は、本発明の二環性ナフチリジンヌクレオシドを含むDNAと三環性イミダゾピリドピリミジンヌクレオシドを含むDNAとの二本鎖の熱的安定性を示す。

【図1】



【図2】



【手続補正書】

【提出日】平成15年12月2日(2003.12.2)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0041

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0041】

【配列表】

Sequence Listing

<110> Genetic Lab Inc.

<120> Bicyclic Naphthyridine Nucleosides

<130> PGL-0006

<160> 2

<210> 1

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> a model sequence for experimental use

<220>

<221> modified_base

<222> 9

<223> n is a nucleotide comprising a bicyclic naphthyridine nucleoside analog

<400> 1

gcaccgaana aaccacg 17

<210> 2

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> a model sequence for experimental use

<220>

<221> modified_base

<222> 8

<223> n is a nucleotide comprising a bicyclic naphthyridine nucleoside analog

<220>

<221> modified_base

<222> 9

<223> n is a nucleotide comprising a bicyclic naphthyridine nucleoside analog

<220>

<221> modified_base

<222> 10

<223> n is a nucleotide comprising a bicyclic naphthyridine nucleoside analog

<400> 2

gcaccgannn aaccacg 17

フロントページの続き

(72)発明者 疋島 貞雄

北海道札幌市北区北12条西6丁目 北海道大学大学院薬学研究科機能分子設計学講座薬化学分野内

(72)発明者 南川 典昭

北海道札幌市北区北12条西6丁目 北海道大学大学院薬学研究科機能分子設計学講座薬化学分野内

(72)発明者 松田 彰

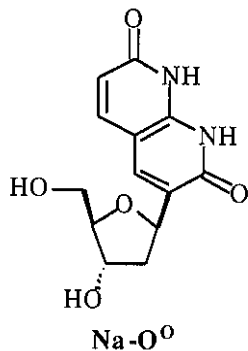
北海道札幌市北区北12条西6丁目 北海道大学大学院薬学研究科機能分子設計学講座薬化学分野内

Fターム(参考) 4B024 AA11 BA80 CA05 HA20

4C065 AA04 BB09 CC01 DD02 EE02 HH01 JJ04 JJ07 KK04 LL04

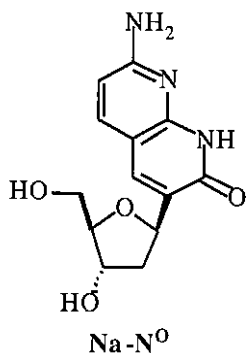
LL07 PP07 QQ04

【要約の続き】



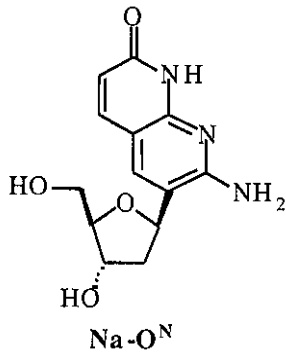
式III:

【化3】



および式IV:

【化4】



からなる群より選択される構造を有するヌクレオシド類似体、ならびに該ヌクレオシド類似体を含むオリゴヌクレオチド。

【選択図】 なし