

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7678994号
(P7678994)

(45)発行日 令和7年5月19日(2025.5.19)

(24)登録日 令和7年5月9日(2025.5.9)

(51)国際特許分類	F I	
C 0 7 H 19/06 (2006.01)	C 0 7 H 19/06	
C 0 7 H 21/04 (2006.01)	C 0 7 H 21/04	Z
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/09	Z Z N A

請求項の数 4 (全47頁)

(21)出願番号	特願2022-501990(P2022-501990)	(73)特許権者	504176911 国立大学法人大阪大学 大阪府吹田市山田丘1番1号
(86)(22)出願日	令和3年2月18日(2021.2.18)	(73)特許権者	597128004 国立医薬品食品衛生研究所長 神奈川県川崎市川崎区殿町三丁目25番 26号
(86)国際出願番号	PCT/JP2021/006222	(74)代理人	100182084 弁理士 中道 佳博
(87)国際公開番号	WO2021/167029	(74)代理人	100150326 弁理士 樋口 知久
(87)国際公開日	令和3年8月26日(2021.8.26)	(72)発明者	小比賀 聡 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学 法人大阪大学内
審査請求日	令和6年1月24日(2024.1.24)	(72)発明者	山口 卓男
(31)優先権主張番号	特願2020-26646(P2020-26646)		
(32)優先日	令和2年2月19日(2020.2.19)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	日本国(JP) (出願人による申告) 令和元年度、日本医療研究開発 機構 (AMED) 先端のバイオ創薬等基盤技術開発事業 「デリバリーと安全性を融合した新世代核酸医薬プラッ トフォームの構築」に係る委託研究開発、産業技術力強 化法第17条の適用を受ける特許出願		

最終頁に続く

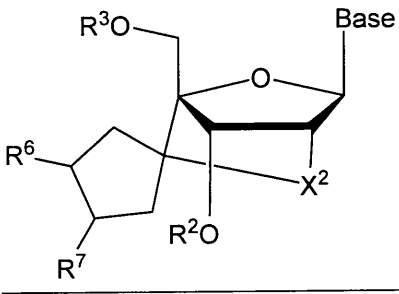
(54)【発明の名称】 架橋型ヌクレオシドおよびそれを用いたヌクレオチド

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の式で表される化合物またはその塩：

【化1】



(式中、

B a s eは、 α 群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいプリン-9-イル基または2-オキソ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル基を表し、ここで、該 α 群は、水酸基、核酸合成の保護基で保護された水酸基、炭素数1から6の直鎖アルキル基、炭素数1から6の直鎖アルコキシ基、メルカプト基、核酸合成の保護基で保護されたメ

ルカプト基、炭素数 1 から 6 の直鎖アルキルチオ基、アミノ基、炭素数 1 から 6 の直鎖アルキルアミノ基、核酸合成の保護基で保護されたアミノ基、およびハロゲン原子からなり、 R^2 および R^3 は、それぞれ独立して、水素原子、核酸合成の水酸基の保護基、分岐または環を形成していてもよい炭素数 1 から 7 のアルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数 2 から 7 のアルケニル基、前記 α 群から選択される任意の置換基を 1 以上有していてもよくそしてヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数 3 から 10 のアリール基、前記 α 群から選択される任意の置換基を 1 以上有していてもよくそしてヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数 3 から 12 のアリール部分を有するアラルキル基、前記 α 群から選択される任意の置換基を 1 以上有していてもよいアシル基、前記 α 群から選択される任意の置換基を 1 以上有していてもよいシリル基、前記 α 群から選択される任意の置換基を 1 以上有していてもよいリン酸基、核酸合成の保護基で保護されたリン酸基、 $-P(R^{4a})R^{5a}$ [式中、 R^{4a} および R^{5a} は、それぞれ独立して、水酸基、核酸合成の保護基で保護された水酸基、メルカプト基、核酸合成の保護基で保護されたメルカプト基、アミノ基、炭素数 1 から 6 のアルコキシ基、炭素数 1 から 6 のアルキルチオ基、炭素数 1 から 6 のシアノアルコキシ基、または炭素数 1 から 6 のアルキル基を有するジアルキルアミノ基を表す] を表し、

X^2 は、酸素原子、硫黄原子、 $-NH-$ 、 $-N(CH_3)-$ またはメチレン基であり、そして

R^6 および R^7 はそれぞれ独立して、水素原子、炭素数 1 から 3 の直鎖アルキル基、 $-NHR^{4b}$ [ここで、 R^{4b} は水素原子または炭素数 1 から 3 の直鎖アルキル基である]、または $-OR^{5b}$ [ここで、 R^{5b} は水素原子または炭素数 1 から 3 の直鎖アルキル基である] であり、

該保護基は、低級アルキル基；低級アルケニル基；アシル基；テトラヒドロピラニルまたはテトラヒドロチオピラニル基；テトラヒドロフラニルまたはテトラヒドロチオフラニル基；シリル基；低級アルコキシメチル基；低級アルコキシ化低級アルコキシメチル基；ハロゲノ低級アルコキシメチル基；低級アルコキシ化エチル基；ハロゲン化エチル基；1 ～ 3 個のアリール基で置換されたメチル基；低級アルキル基、低級アルコキシ基、ハロゲン原子またはシアノ基でアリール環が置換された 1 ～ 3 個のアリール基で置換されたメチル基；低級アルコキシカルボニル基；ハロゲン原子、低級アルコキシ基またはニトロ基で置換されたアリール基；ハロゲン原子またはトリ低級アルキルシリル基で置換された低級アルコキシカルボニル基；アルケニルオキシカルボニル基；あるいは低級アルコキシまたはニトロ基でアリール環が置換されていてもよいアラルキルオキシカルボニル基；であり、該低級アルキルは、分岐または環を形成していてもよい炭素数 1 から 7 のアルキルであり、該低級アルケニルは、分岐または環を形成していてもよい炭素数 2 から 7 のアルケニルであり、そして

該低級アルコキシは、分岐または環を形成していてもよい炭素数 1 から 7 のアルコキシである。

【請求項 2】

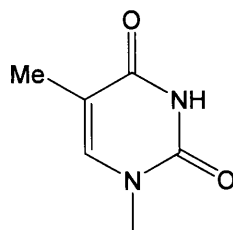
前記式において、前記 Base が、6-アミノプリン-9-イル基、2, 6-ジアミノプリン-9-イル基、2-アミノ-6-クロロプリン-9-イル基、2-アミノ-6-フルオロプリン-9-イル基、2-アミノ-6-ブロモプリン-9-イル基、2-アミノ-6-ヒドロキシプリン-9-イル基、6-アミノ-2-メトキシプリン-9-イル基、6-アミノ-2-クロロプリン-9-イル基、6-アミノ-2-フルオロプリン-9-イル基、2, 6-ジメトキシプリン-9-イル基、2, 6-ジクロロプリン-9-イル基、6-メルカプトプリン-9-イル基、2-オキソ-4-アミノ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル基、4-アミノ-2-オキソ-5-フルオロ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル基、4-アミノ-2-オキソ-5-クロロ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル基、2-オキソ-4-メトキシ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル基、2-オキソ-4-メルカプト-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル基、2-オキソ-4-ヒドロキシ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル基、2-オキソ-4-ヒドロキシ-

5-メチル-1,2-ジヒドロピリミジン-1-イル基、または4-アミノ-5-メチル-2-オキソ-1,2-ジヒドロピリミジン-1-イル基である、請求項1に記載の化合物またはその塩。

【請求項3】

前記式において、前記Baseが、以下の式：

【化2】



10

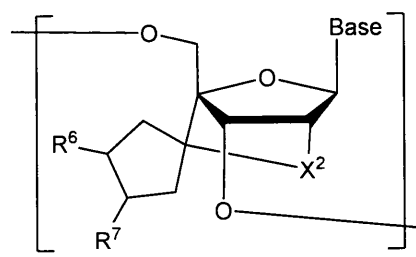
で表される基である、請求項1に記載の化合物またはその塩。

【請求項4】

以下の式で表されるヌクレオシド構造を少なくとも1つ含有するオリゴヌクレオチドまたはその薬理学上許容される塩：

20

【化3】



30

(式中、

Baseは、 α 群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいプリン-9-イル基または2-オキソ-1,2-ジヒドロピリミジン-1-イル基を表し、ここで、該 α 群は、水酸基、核酸合成の保護基で保護された水酸基、炭素数1から6の直鎖アルキル基、炭素数1から6の直鎖アルコキシ基、メルカプト基、核酸合成の保護基で保護されたメルカプト基、炭素数1から6の直鎖アルキルチオ基、アミノ基、炭素数1から6の直鎖アルキルアミノ基、核酸合成の保護基で保護されたアミノ基、およびハロゲン原子からなり、 X^2 は、酸素原子、硫黄原子、 $-NH-$ 、 $-N(CH_3)-$ またはメチレン基であり、そして

40

R^6 および R^7 はそれぞれ独立して、水素原子、炭素数1から3の直鎖アルキル基、 $-NH-$ 、 R^{4b} [ここで、 R^{4b} は水素原子または炭素数1から3の直鎖アルキル基である]、または $-OR^{5b}$ [ここで、 R^{5b} は水素原子または炭素数1から3の直鎖アルキル基である]であり、

該保護基は、低級アルキル基；低級アルケニル基；アシル基；テトラヒドロピラニルまたはテトラヒドロチオピラニル基；テトラヒドロフラニルまたはテトラヒドロチオフラニル基；シリル基；低級アルコキシメチル基；低級アルコキシ化低級アルコキシメチル基；ハロゲン低級アルコキシメチル基；低級アルコキシ化エチル基；ハロゲン化エチル基；1～3個のアリール基で置換されたメチル基；低級アルキル基、低級アルコキシ基、ハロゲン原子またはシアノ基でアリール環が置換された1～3個のアリール基で置換されたメチル

50

基；低級アルコキシカルボニル基；ハロゲン原子、低級アルコキシ基またはニトロ基で置換されたアリール基；ハロゲン原子またはトリ低級アルキルシリル基で置換された低級アルコキシカルボニル基；アルケニルオキシカルボニル基；あるいは低級アルコキシまたはニトロ基でアリール環が置換されていてもよいアラルキルオキシカルボニル基；であり、該低級アルキルは、分岐または環を形成していてもよい炭素数1から7のアルキルであり、該低級アルケニルは、分岐または環を形成していてもよい炭素数2から7のアルケニルであり、そして該低級アルコキシは、分岐または環を形成していてもよい炭素数1から7のアルコキシである）。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、架橋型ヌクレオシドおよびそれを用いたヌクレオチドに関する。より詳細には、良好なヌクレアーゼ耐性能を有しかつ効率よく製造することのできる架橋型ヌクレオシドおよびそれを用いたヌクレオチドに関する。

【背景技術】

【0002】

DNAやRNAに対して優れた結合親和性を有する人工核酸は、遺伝子診断や核酸医薬への応用が可能であり、これまで様々なタイプの人工核酸が開発されている。中でも核酸糖部の配座を架橋によってN型配座に固定化した2', 4'-BNA (2', 4'-bridged nucleic acid; 別名LNA) は、一本鎖RNA (ssRNA) に対して優れた結合親和性を有し、アンチセンス法などの様々な応用が可能な核酸医薬として期待されている（非特許文献1および2）。しかし、2', 4'-BNAは酵素耐性に乏しく、肝毒性を誘発し易いという課題を抱えている（非特許文献3）。

【0003】

これに対して、2', 4'-BNAの6'位にメチル基、メトキシメチル基などの置換基を導入した人工核酸が、ssRNAに対する結合親和性を向上させるとともに優れた酵素耐性能を有することが報告されている（非特許文献4）。しかし、6'位にこれらの置換基を導入すると異性体を生じる場合があり、煩雑な分離操作が必要とされる。

【0004】

一方、6'位にシクロプロピル基を導入した人工核酸 (scpBNA) は、異性体の分離を必要としない合成経路により合成可能であり、ssRNAに対する高い結合親和性を維持しつつ、高い酵素耐性能を有することが報告されている（特許文献1および非特許文献5）。しかし、scpBNAの合成経路において得られる各種生成物の収率は十分に満足し得るものとは言い難い。工業的な応用に応え得るより高収率で合成可能な人工核酸の開発が所望されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【文献】国際公開第2015/125783号

【非特許文献】

【0006】

【文献】S. Obikara, Tetrahedron Lett., 1997, 38, 8735-8738

【文献】S. Singha, Chem. Commun., 1998, 455-456

【文献】E. Swayzeら, Nucleic Acids Res., 2007, 35, 687-700

【文献】P.P. Sethら, J. Org. Chem., 2010, 75, 1569-1581

【文献】T. Yamaguchiら, Chem. Commun., 2015, 51, 9737-9740

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

10

20

30

40

50

本発明は、上記課題を解決するものであり、その目的とするところは、6'位に置換基が導入されており、異性体分離などの煩雑な操作を必要とすることなく、かつより高収率で製造することのできる架橋型ヌクレオシドおよびそれを用いたヌクレオチドを提供することにある。

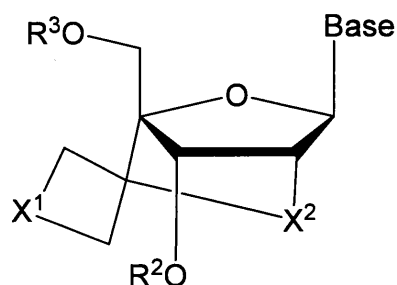
【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明は、以下の式（I）で表される化合物またはその塩：

【0009】

【化1】



(I)

【0010】

（式中、

Baseは、α群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいプリン-9-イル基または2-オキソ-1,2-ジヒドロピリミジン-1-イル基を表し、ここで、該α群は、水酸基、核酸合成の保護基で保護された水酸基、炭素数1から6の直鎖アルキル基、炭素数1から6の直鎖アルコキシ基、メルカプト基、核酸合成の保護基で保護されたメルカプト基、炭素数1から6の直鎖アルキルチオ基、アミノ基、炭素数1から6の直鎖アルキルアミノ基、核酸合成の保護基で保護されたアミノ基、およびハロゲン原子からなり、

R²およびR³は、それぞれ独立して、水素原子、核酸合成の水酸基の保護基、分岐または環を形成していてもよい炭素数1から7のアルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数2から7のアルケニル基、該α群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよくそしてヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数3から10のアリール基、該α群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよくそしてヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数3から12のアリール部分を有するアラルキル基、該α群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいアシル基、該α群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいシリル基、該α群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいリン酸基、核酸合成の保護基で保護されたリン酸基、-P(R⁴ᵃ)R⁵ᵃ [式中、R⁴ᵃおよびR⁵ᵃは、それぞれ独立して、水酸基、核酸合成の保護基で保護された水酸基、メルカプト基、核酸合成の保護基で保護されたメルカプト基、アミノ基、炭素数1から6のアルコキシ基、炭素数1から6のアルキルチオ基、炭素数1から6のシアノアルコキシ基、または炭素数1から6のアルキル基を有するジアルキルアミノ基を表す]を表し、

X¹は、炭素数1から3の直鎖アルキル基か、-NHR⁴ᵇ [ここで、R⁴ᵇは水素原子または炭素数1から3の直鎖アルキル基である]か、または-OR⁵ᵇ [ここで、R⁵ᵇは水素原子または炭素数1から3の直鎖アルキル基である]かで置換されていてもよい、炭素数2から8のアルキレン基；あるいは炭素数1から3の直鎖アルキル基か、-NHR⁴ᵇ [ここで、R⁴ᵇは水素原子または炭素数1から3の直鎖アルキル基である]か、または-OR⁵ᵇ [ここで、R⁵ᵇは水素原子または炭素数1から3の直鎖アルキル基である]かで置換されていてもよい、炭素数2から8のアルケニレン基；であり、そして

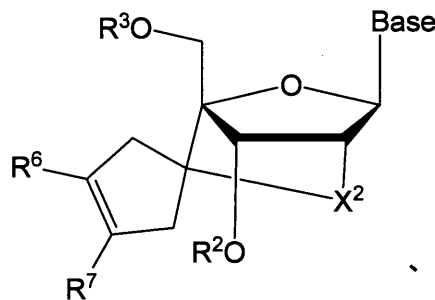
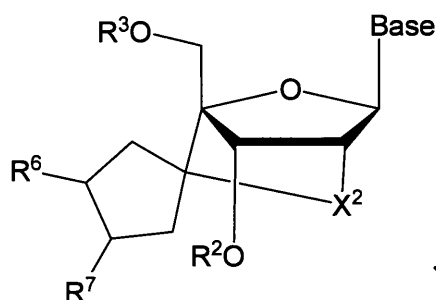
X²は、酸素原子、硫黄原子、-NH-、-N(CH₃)-またはメチレン基である。

【0011】

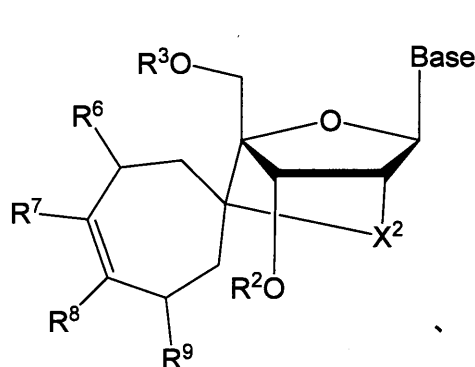
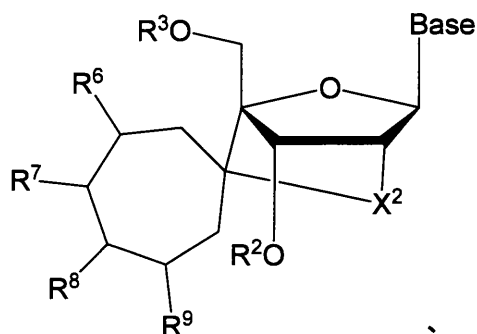
1つの実施形態では、上記式（I）は以下の式：

【0012】

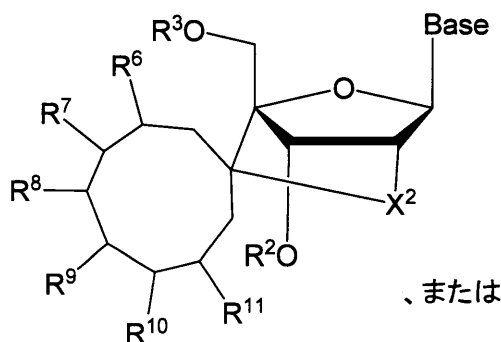
【化2】



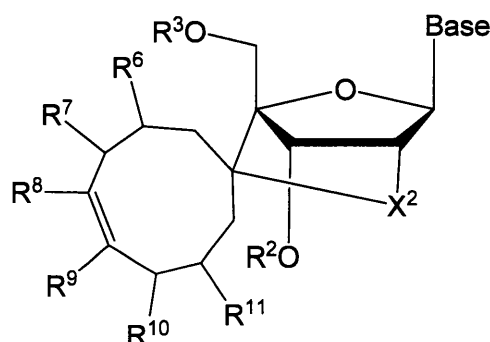
10



20



、または



30

【0013】

(式中、

Baseは、 α 群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいプリン-9-イル基または2-オキソ-1,2-ジヒドロピリミジン-1-イル基を表し、ここで、該 α 群は、水酸基、核酸合成の保護基で保護された水酸基、炭素数1から6の直鎖アルキル基、炭素数1から6の直鎖アルコキシ基、メルカプト基、核酸合成の保護基で保護されたメルカプト基、炭素数1から6の直鎖アルキルチオ基、アミノ基、炭素数1から6の直鎖アルキルアミノ基、核酸合成の保護基で保護されたアミノ基、およびハロゲン原子からなり、

40

R^2 および R^3 は、それぞれ独立して、水素原子、核酸合成の水酸基の保護基、分岐または環を形成していてもよい炭素数1から7のアルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数2から7のアルケニル基、該 α 群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよくそしてヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数3から10のアリール基、該 α 群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよくそしてヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数3から12のアリール部分を有するアラルキル基、該 α 群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいアシル基、該 α 群から選択される任意の置換基を1

50

以上有していてもよいシリル基、該 α 群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいリン酸基、核酸合成の保護基で保護されたリン酸基、 $-P(R^{4a})R^{5a}$ [式中、 R^{4a} および R^{5a} は、それぞれ独立して、水酸基、核酸合成の保護基で保護された水酸基、メルカプト基、核酸合成の保護基で保護されたメルカプト基、アミノ基、炭素数1から6のアルコキシ基、炭素数1から6のアルキルチオ基、炭素数1から6のシアノアルコキシ基、または炭素数1から6のアルキル基を有するジアルキルアミノ基を表す]を表し、

X^2 は、酸素原子、硫黄原子、 $-NH-$ 、 $-N(CH_3)-$ またはメチレン基であり、そして

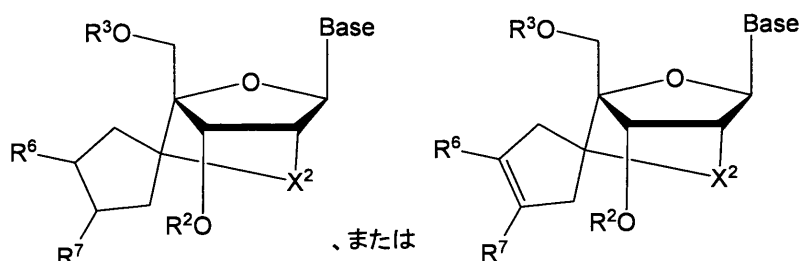
R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 、 R^{10} および R^{11} はそれぞれ独立して、水素原子、炭素数1から3の直鎖アルキル基、 $-NHR^{4b}$ [ここで、 R^{4b} は水素原子または炭素数1から3の直鎖アルキル基である]、または $-OR^{5b}$ [ここで、 R^{5b} は水素原子または炭素数1から3の直鎖アルキル基である]である)で表される。

【0014】

1つの実施形態では、上記式(I)は以下の式：

【0015】

【化3】



【0016】

(式中、

Baseは、 α 群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいプリン-9-イル基または2-オキソ-1,2-ジヒドロピリミジン-1-イル基を表し、ここで、該 α 群は、水酸基、核酸合成の保護基で保護された水酸基、炭素数1から6の直鎖アルキル基、炭素数1から6の直鎖アルコキシ基、メルカプト基、核酸合成の保護基で保護されたメルカプト基、炭素数1から6の直鎖アルキルチオ基、アミノ基、炭素数1から6の直鎖アルキルアミノ基、核酸合成の保護基で保護されたアミノ基、およびハロゲン原子からなり、

R^2 および R^3 は、それぞれ独立して、水素原子、核酸合成の水酸基の保護基、分岐または環を形成していてもよい炭素数1から7のアルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数2から7のアルケニル基、該 α 群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよくそしてヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数3から10のアリール基、該 α 群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよくそしてヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数3から12のアリール部分を有するアラキル基、該 α 群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいシリル基、該 α 群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいリン酸基、核酸合成の保護基で保護されたリン酸基、 $-P(R^{4a})R^{5a}$ [式中、 R^{4a} および R^{5a} は、それぞれ独立して、水酸基、核酸合成の保護基で保護された水酸基、メルカプト基、核酸合成の保護基で保護されたメルカプト基、アミノ基、炭素数1から6のアルコキシ基、炭素数1から6のアルキルチオ基、炭素数1から6のシアノアルコキシ基、または炭素数1から6のアルキル基を有するジアルキルアミノ基を表す]を表し、

X^2 は、酸素原子、硫黄原子、 $-NH-$ 、 $-N(CH_3)-$ またはメチレン基であり、そして

R^6 および R^7 はそれぞれ独立して、水素原子、炭素数1から3の直鎖アルキル基、

NHR^{4b} [ここで、 R^{4b} は水素原子または炭素数1から3の直鎖アルキル基である]、または $-\text{OR}^{5b}$ [ここで、 R^{5b} は水素原子または炭素数1から3の直鎖アルキル基である]で表される。

【0017】

1つの実施形態では、上記式(I)において、上記Baseは、6-アミノプリン-9-イル基、2, 6-ジアミノプリン-9-イル基、2-アミノ-6-クロロプリン-9-イル基、2-アミノ-6-フルオロプリン-9-イル基、2-アミノ-6-ブロモプリン-9-イル基、2-アミノ-6-ヒドロキシプリン-9-イル基、6-アミノ-2-メトキシプリン-9-イル基、6-アミノ-2-クロロプリン-9-イル基、6-アミノ-2-フルオロプリン-9-イル基、2, 6-ジメトキシプリン-9-イル基、2, 6-ジクロロプリン-9-イル基、6-メルカプトプリン-9-イル基、2-オキソ-4-アミノ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル基、4-アミノ-2-オキソ-5-フルオロ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル基、4-アミノ-2-オキソ-5-クロロ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル基、2-オキソ-4-メトキシ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル基、2-オキソ-4-メルカプト-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル基、2-オキソ-4-ヒドロキシ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル基、2-オキソ-4-ヒドロキシ-5-メチル-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル基、または4-アミノ-5-メチル-2-オキソ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル基である。

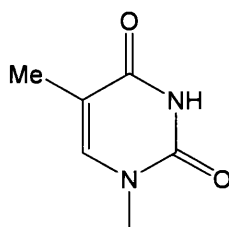
10

【0018】

1つの実施形態では、上記式(I)において、上記Baseは、以下の式：

【0019】

【化4】



30

【0020】

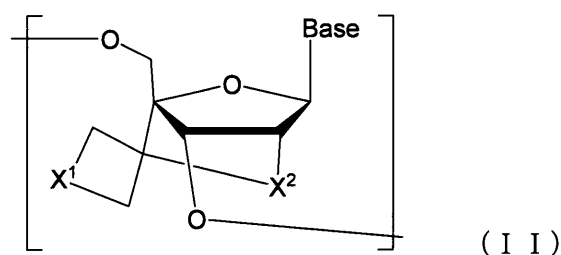
で表される基である。

【0021】

本発明はまた、以下の式(II)で表されるヌクレオシド構造を少なくとも1つ含有するオリゴヌクレオチドまたはその薬理学上許容される塩：

【0022】

【化5】



40

【0023】

(式中、

Baseは、 α 群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいプリン-9-イル基または2-オキソ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル基を表し、ここで、該

50

α 群は、水酸基、核酸合成の保護基で保護された水酸基、炭素数 1 から 6 の直鎖アルキル基、炭素数 1 から 6 の直鎖アルコキシ基、メルカプト基、核酸合成の保護基で保護されたメルカプト基、炭素数 1 から 6 の直鎖アルキルチオ基、アミノ基、炭素数 1 から 6 の直鎖アルキルアミノ基、核酸合成の保護基で保護されたアミノ基、およびハロゲン原子からなり、

X^1 は、炭素数 1 から 3 の直鎖アルキル基か、 $-NHR^{4b}$ [ここで、 R^{4b} は水素原子または炭素数 1 から 3 の直鎖アルキル基である] か、または $-OR^{5b}$ [ここで、 R^{5b} は水素原子または炭素数 1 から 3 の直鎖アルキル基である] かで置換されていてもよい、炭素数 2 から 8 のアルキレン基；あるいは炭素数 1 から 3 の直鎖アルキル基か、 $-NHR^{4b}$ [ここで、 R^{4b} は水素原子または炭素数 1 から 3 の直鎖アルキル基である] か、または $-OR^{5b}$ [ここで、 R^{5b} は水素原子または炭素数 1 から 3 の直鎖アルキル基である] かで置換されていてもよい、炭素数 2 から 8 のアルケニレン基；であり、そして

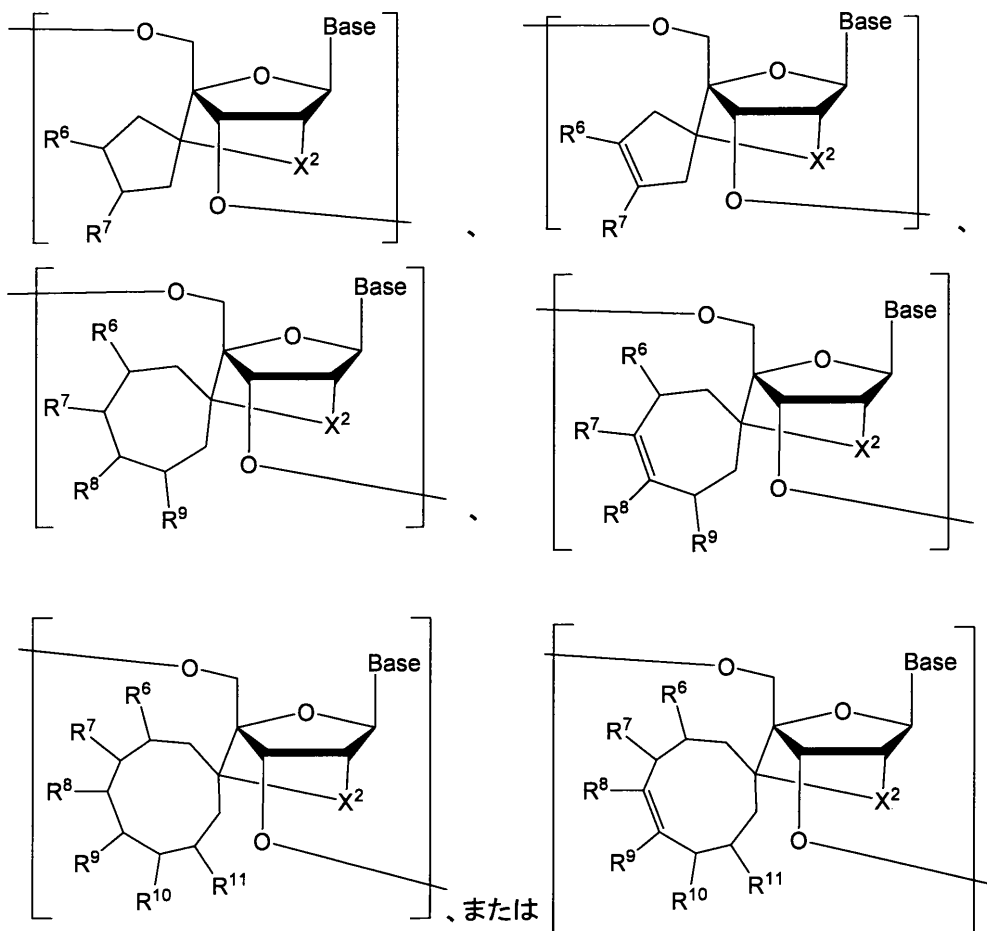
X^2 は、酸素原子、硫黄原子、 $-NH-$ 、 $-N(CH_3)-$ またはメチレン基である。

【0024】

1つの実施形態では、上記式 (I I) は以下の式：

【0025】

【化6】



【0026】

(式中、

$Base$ は、 α 群から選択される任意の置換基を 1 以上有していてもよいプリン-9-イル基または 2-オキソ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル基を表し、ここで、該 α 群は、水酸基、核酸合成の保護基で保護された水酸基、炭素数 1 から 6 の直鎖アルキル基、炭素数 1 から 6 の直鎖アルコキシ基、メルカプト基、核酸合成の保護基で保護された

メルカプト基、炭素数 1 から 6 の直鎖アルキルチオ基、アミノ基、炭素数 1 から 6 の直鎖アルキルアミノ基、核酸合成の保護基で保護されたアミノ基、およびハロゲン原子からなり、

X^2 は、酸素原子、硫黄原子、 $-NH-$ 、 $-N(CH_3)-$ またはメチレン基であり、そして

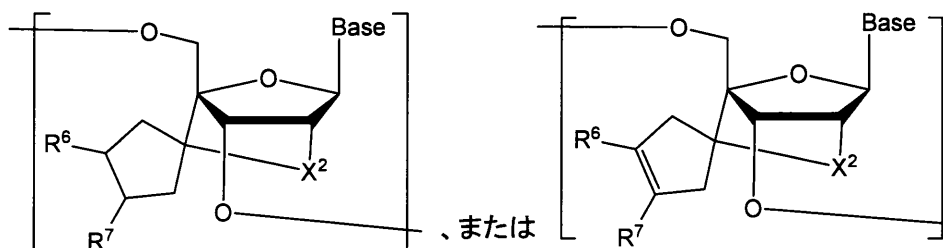
R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 、 R^{10} および R^{11} はそれぞれ独立して、水素原子、炭素数 1 から 3 の直鎖アルキル基、 $-NHR^4$ [ここで、 R^4 は水素原子または炭素数 1 から 3 の直鎖アルキル基である]、または $-OR^5$ [ここで、 R^5 は水素原子または炭素数 1 から 3 の直鎖アルキル基である] である) で表される。

【0027】

1つの実施形態では、上記式 (II) は以下の式：

【0028】

【化7】



【0029】

(式中、

Base は、 α 群から選択される任意の置換基を 1 以上有していてもよいプリン-9-イル基または 2-オキソ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル基を表し、ここで、該 α 群は、水酸基、核酸合成の保護基で保護された水酸基、炭素数 1 から 6 の直鎖アルキル基、炭素数 1 から 6 の直鎖アルコキシ基、メルカプト基、核酸合成の保護基で保護されたメルカプト基、炭素数 1 から 6 の直鎖アルキルチオ基、アミノ基、炭素数 1 から 6 の直鎖アルキルアミノ基、核酸合成の保護基で保護されたアミノ基、およびハロゲン原子からなり、

X^2 は、酸素原子、硫黄原子、 $-NH-$ 、 $-N(CH_3)-$ またはメチレン基であり、そして

R^6 および R^7 はそれぞれ独立して、水素原子、炭素数 1 から 3 の直鎖アルキル基、 $-NHR^{4b}$ [ここで、 R^{4b} は水素原子または炭素数 1 から 3 の直鎖アルキル基である]、または $-OR^{5b}$ [ここで、 R^{5b} は水素原子または炭素数 1 から 3 の直鎖アルキル基である] である) で表される。

【0030】

本発明はまた、上記オリゴヌクレオチドまたはその薬理学上許容される塩の製造方法であって、

以下の式 (I) で表される化合物またはその薬理学上許容される塩：

【0031】

10

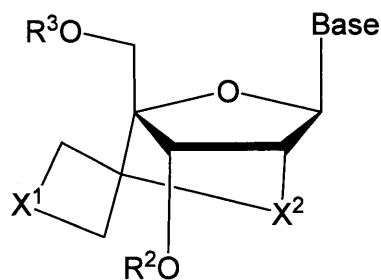
20

30

40

50

【化 8】



(I)

10

【0032】

(式中、

Baseは、 α 群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいプリン-9-イル基または2-オキソ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル基を表し、ここで、該 α 群は、水酸基、核酸合成の保護基で保護された水酸基、炭素数1から6の直鎖アルキル基、炭素数1から6の直鎖アルコキシ基、メルカプト基、核酸合成の保護基で保護されたメルカプト基、炭素数1から6の直鎖アルキルチオ基、アミノ基、炭素数1から6の直鎖アルキルアミノ基、核酸合成の保護基で保護されたアミノ基、およびハロゲン原子からなり、

R^2 および R^3 は、それぞれ独立して、水素原子、核酸合成の水酸基の保護基、分岐または環を形成していてもよい炭素数1から7のアルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数2から7のアルケニル基、該 α 群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよくそしてヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数3から10のアリール基、該 α 群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよくそしてヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数3から12のアリール部分を有するアラルキル基、該 α 群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいアシル基、該 α 群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいシリル基、該 α 群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいリン酸基、核酸合成の保護基で保護されたリン酸基、 $-P(R^{4a})R^{5a}$ [式中、 R^{4a} および R^{5a} は、それぞれ独立して、水酸基、核酸合成の保護基で保護された水酸基、メルカプト基、核酸合成の保護基で保護されたメルカプト基、アミノ基、炭素数1から6のアルコキシ基、炭素数1から6のアルキルチオ基、炭素数1から6のシアノアルコキシ基、または炭素数1から6のアルキル基を有するジアルキルアミノ基を表す]を表し、

20

X^1 は、炭素数1から3の直鎖アルキル基か、 $-NHR^{4b}$ [ここで、 R^{4b} は水素原子または炭素数1から3の直鎖アルキル基である] か、または $-OR^{5b}$ [ここで、 R^{5b} は水素原子または炭素数1から3の直鎖アルキル基である] かで置換されていてもよい、炭素数2から8のアルキレン基；あるいは炭素数1から3の直鎖アルキル基か、 $-NHR^{4b}$ [ここで、 R^{4b} は水素原子または炭素数1から3の直鎖アルキル基である] か、または $-OR^{5b}$ [ここで、 R^{5b} は水素原子または炭素数1から3の直鎖アルキル基である] かで置換されていてもよい、炭素数2から8のアルケニレン基；であり、そして

30

X^2 は、酸素原子、硫黄原子、 $-NH-$ 、 $-N(CH_3)-$ またはメチレン基である)を用いてオリゴヌクレオチドを合成する工程を包含する、方法である。

40

【発明の効果】

【0033】

本発明によれば、ssRNAに対する高い結合親和性を有し、かつ高い酵素耐性能を有する新規な6'位が修飾された架橋型ヌクレオシドおよびそれを用いたヌクレオチドが提供される。本発明の架橋型ヌクレオシドは、その製造において異性体の分離工程を必要としないため、工業的生産性にも優れている。

【図面の簡単な説明】

【0034】

【図1】5'-TTTTTTTTTX-3'の配列の各種オリゴヌクレオチドを3'-エキソ

50

ヌクレアーゼで処理した場合の、未切断オリゴヌクレオチドの割合の経時変化を示すグラフである。

【図2】各種オリゴヌクレオチド投与時のマウスの各種組織における相対的MALAT1発現レベルを示すグラフである。

【図3】各種オリゴヌクレオチド投与時のマウスの各種組織における相対的MALAT1発現レベルを示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0035】

まず、本明細書中で用いられる用語を定義する。

【0036】

本明細書において、用語「炭素数1から6の直鎖アルキル基」は、炭素数1～6の任意の直鎖アルキル基をいい、具体的にはメチル基、エチル基、n-プロピル基、n-ブチル基、n-ペンチル基、n-ヘキシル基をいう。また、用語「炭素数1から3の直鎖アルキル基」は、炭素数1～3の任意の直鎖アルキル基をいい、具体的にはメチル基、エチル基、n-プロピル基をいう。一方、用語「炭素数1から6のアルキル基」という場合は、炭素数1～6の任意の直鎖、分岐鎖または環状のアルキル基をいう。

【0037】

本明細書において、用語「炭素数1から6の直鎖アルコキシ基」は、炭素数1～6の任意の直鎖アルキル基を有するアルコキシ基を包含する。例えば、メトキシ基、エトキシ基、n-プロポキシ基などが挙げられる。一方、用語「炭素数1から6のアルコキシ基」という場合は、炭素数1～6の任意の直鎖、分岐鎖または環状のアルコキシ基をいう。また、用語「炭素数1から6の直鎖アルコキシ基で置換されていてもよい炭素数1から6の直鎖アルコキシ基」という場合は、上記「炭素数1から6の直鎖アルコキシ基」、ならびに「炭素数1から6の直鎖アルコキシ基」を構成する1つまたはそれ以上の水素原子が、同一または異なっているてもよい他の「炭素数1から6の直鎖アルコキシ基」で置換されたアルコキシ基をいう。このような「炭素数1から6の直鎖アルコキシ基で置換されていてもよい炭素数1から6の直鎖アルコキシ基」としては、例えばメトキシ基、エトキシ基、n-プロポキシ基、メトキシメトキシ基、エトキシメトキシ基、n-プロポキシメトキシ基、メトキシエトキシ基（例えば2-メトキシエトキシ基）、エトキシエトキシ基（例えば2-エトキシエトキシ基）、およびn-プロポキシエトキシ基が挙げられる。

【0038】

本明細書において、用語「炭素数1から6のシアノアルコキシ基」は、炭素数1～6の任意の直鎖、分岐鎖または環状のアルコキシ基における少なくとも1つの水素原子がシアノ基で置換された基をいう。

【0039】

本明細書において、用語「炭素数1から6の直鎖アルキルチオ基」は、炭素数1～6の任意の直鎖アルキル基を有するアルキルチオ基を包含する。例えば、メチルチオ基、エチルチオ基、n-プロピルチオ基などが挙げられる。一方、用語「炭素数1から6のアルキルチオ基」という場合は、炭素数1～6の任意の直鎖、分岐鎖または環状のアルキルチオ基をいう。

【0040】

本明細書において、用語「炭素数1から6の直鎖アルキルアミノ基」は、炭素数1～6の任意の直鎖アルキル基を有するアルキルアミノ基を1つまたは2つ有するアルキルアミノ基を包含する。例えば、メチルアミノ基、ジメチルアミノ基、エチルアミノ基、メチルエチルアミノ基、ジエチルアミノ基などが挙げられる。

【0041】

本明細書において、用語「分岐または環を形成していてもよい炭素数1から7のアルキル基」は、炭素数1～7の任意の直鎖アルキル基、炭素数3～7の任意の分岐鎖アルキル基、および炭素数3～7の任意の環状アルキル基を包含する。単に、「低級アルキル基」という場合もある。例えば、炭素数1～7の任意の直鎖アルキル基としては、メチル基、

10

20

30

40

50

エチル基、*n*-プロピル基、*n*-ブチル基、*n*-ペンチル基、*n*-ヘキシル基、および *n*-ヘプチル基が挙げられ、炭素数 3～7 の任意の分岐鎖アルキル基としては、イソプロピル基、イソブチル基、*tert*-ブチル基、イソペンチル基などが挙げられ、そして炭素数 3～7 の任意の環状アルキル基としては、シクロブチル基、シクロペンチル基、シクロヘキシル基などが挙げられる。

【0042】

本明細書において、用語「分岐または環を形成していてもよい炭素数 2 から 7 のアルケニル基」は、炭素数 2～7 の任意の直鎖アルケニル基、炭素数 3～7 の任意の分岐鎖アルケニル基、および炭素数 3～7 の任意の環状アルケニル基を包含する。単に、「低級アルケニル基」という場合もある。例えば、炭素数 2～7 の任意の直鎖アルケニル基としては、エテニル基、1-プロペニル基、2-プロペニル基、1-ブテニル基、2-ブテニル基、1-ペンテニル基、2-ペンテニル基、3-ペンテニル基、4-ペンテニル基、1-ヘキセニル基などが挙げられ、炭素数 3～7 の任意の分岐鎖アルケニル基としては、イソプロペニル基、1-メチル-1-プロペニル基、1-メチル-2-プロペニル基、2-メチル-1-プロペニル基、2-メチル-2-プロペニル基、1-メチル-2-ブテニル基などが挙げられ、そして炭素数 3～7 の任意の環状アルケニル基としては、シクロブテニル基、シクロペンテニル基、シクロヘキセニル基などが挙げられる。

【0043】

本明細書において、用語「ヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数 3 から 10 のアリール基」は、炭化水素のみで構成された、炭素数 6～10 の任意のアリール基と、当アリール基の環構造を構成する少なくとも 1 つの炭素原子がヘテロ原子（例えば、窒素原子、酸素原子、および硫黄原子、ならびにこれらの組合せ）で置換された、炭素数 3～12 の任意のヘテロアリール基とを包含する。当該炭素数 6～10 のアリール基としては、フェニル基、ナフチル基、インデニル基、アズレニル基などが挙げられ、そして当該炭素数 3～12 の任意のヘテロアリール基としては、ピリジル基、ピロリル基、キノリル基、インドリル基、イミダゾリル基、フリル基、チエニル基などが挙げられる。

【0044】

本明細書において、用語「ヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数 3 から 12 のアリール部分を有するアラルキル基」の例としては、ベンジル基、フェネチル基、ナフチルメチル基、3-フェニルプロピル基、2-フェニルプロピル基、4-フェニルブチル基、2-フェニルブチル基、ピリジルメチル基、インドリルメチル基、フリルメチル基、チエニルメチル基、ピロリルメチル基、2-ピリジリエチル基、1-ピリジリエチル基、3-チエニルプロピル基などが挙げられる。

【0045】

本明細書において、用語「アシル基」の例としては、脂肪族アシル基および芳香族アシル基が挙げられる。具体的には、脂肪族アシル基の例としては、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、アイコサノイル基およびヘナイコサノイル基のようなアルキルカルボニル基；スクシノイル基、グルタロイル基、アジポイル基のようなカルボキシ化アルキルカルボニル基；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のようなハロゲノ低級アルキルカルボニル基；メトキシアセチル基のような低級アルコキシ低級アルキルカルボニル基；(E)-2-メチル-2-ブテノイル基のような不飽和アルキルカルボニル基が挙げられる。また、芳香族アシル基の例としては、ベンゾイル基、 α -ナフトイル基、 β -ナフトイル基のようなアリールカル

ボニル基；2-ブロモベンゾイル基、4-クロロベンゾイル基のようなハロゲノアリールカルボニル基；2, 4, 6-トリメチルベンゾイル基、4-トルオイル基のような低級アルキル化アリールカルボニル基；4-アニソイル基のような低級アルコキシ化アリールカルボニル基；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のようなカルボキシ化アリールカルボニル基；4-ニトロベンゾイル基、2-ニトロベンゾイル基のようなニトロ化アリールカルボニル基；2-(メトキシカルボニル)ベンゾイル基のような低級アルコシカルボニル化アリールカルボニル基；4-フェニルベンゾイル基のようなアリール化アリールカルボニル基などが挙げられる。好適には、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、ベンゾイル基である。

【0046】

本明細書において、用語「炭素数2から8のアルキレン基」とは、メチレン基($-CH_2-$)の繰り返しにより構成される炭素数2~8の二価の基を指して言う。具体的な例としては、 $-CH_2CH_2-$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$ 、および $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$ が挙げられる。さらに、用語「炭素数1から3の直鎖アルキル基か、 $-NHR^{4b}$ [ここで、 R^{4b} は水素原子または炭素数1から3の直鎖アルキル基である]か、または $-OR^{5b}$ [ここで、 R^{5b} は水素原子または炭素数1から3の直鎖アルキル基である]かで置換されていてもよい、炭素数2から8のアルキレン基」とは、未置換の上記炭素数2から8のアルキレン基、すなわちメチレン基の繰り返しのみにより構成される炭素数2~8の二価の基内の少なくとも1つの水素原子が、炭素数1から3の直鎖アルキル基、 $-NHR^{4b}$ 、または $-OR^{5b}$ で置換された基を指して言う。

【0047】

本明細書において、用語「炭素数2から8のアルケニレン基」とは、 $-CH=CH-$ ；および少なくとも1つのメチレン基と、1つの炭素-炭素二重結合($-CH=CH-$)との組み合わせにより構成される炭素数2~8の二価の基；を包含して言う。具体的な例としては、 $-CH=CH_2-$ 、 $-CH_2CH=CHCH_2-$ 、および $-CH_2CH_2CH=CHCH_2CH_2-$ が挙げられる。さらに、用語「炭素数1から3の直鎖アルキル基か、 $-NHR^{4b}$ [ここで、 R^{4b} は水素原子または炭素数1から3の直鎖アルキル基である]か、または $-OR^{5b}$ [ここで、 R^{5b} は水素原子または炭素数1から3の直鎖アルキル基である]かで置換されていてもよい、炭素数2から8のアルケニレン基」とは、未置換の上記炭素数2から8のアルケニレン基内の少なくとも1つの水素原子が、炭素数1から3の直鎖アルキル基、 $-NHR^{4b}$ 、または $-OR^{5b}$ で置換された基を指して言う。

【0048】

本明細書において、用語「シリル基」の例としては、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、 τ -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 γ -ブチルシリル基、トリイソプロピルシリル基のようなトリ低級アルキルシリル基；ジフェニルメチルシリル基、ブチル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基、フェニルジイソプロピルシリル基のような1~2個のアリール基で置換されたトリ低級アルキルシリル基などが挙げられる。好適には、トリメチルシリル基、トリエチルシリル基、トリイソプロピルシリル基、 τ -ブチルジメチルシリル基、 γ -ブチルジフェニルシリル基であり、さらに好適にはトリメチルシリル基である。

【0049】

本明細書において、用語「ハロゲン原子」としては、例えば、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、またはヨウ素原子が挙げられる。好適には、フッ素原子または塩素原子である。

【0050】

本明細書において、用語「核酸合成のアミノ基の保護基」、「核酸合成の水酸基の保護基」、「核酸合成の保護基で保護された水酸基」、「核酸合成の保護基で保護されたリン酸基」、「核酸合成の保護基で保護されたメルカプト基」の「保護基」とは、核酸合成の際に安定してアミノ基、水酸基、リン酸基またはメルカプト基を保護し得るものであれば

、特に制限されない。具体的には、酸性または中性条件で安定であり、加水素分解、加水分解、電気分解、および光分解のような化学的方法により開裂し得る保護基のことをいう。このような保護基としては、例えば、低級アルキル基、低級アルケニル基、アシル基、テトラヒドロピラニルまたはテトラヒドロチオピラニル基、テトラヒドロフラニルまたはテトラヒドロチオフラニル基、シリル基、低級アルコキシメチル基、低級アルコキシ化低級アルコキシメチル基、ハロゲン低級アルコキシメチル基、低級アルコキシ化エチル基、ハロゲン化エチル基、1～3個のアリール基で置換されたメチル基、「低級アルキル基、低級アルコキシ基、ハロゲン原子またはシアノ基でアリール環が置換された1～3個のアリール基で置換されたメチル基」、低級アルコキシカルボニル基、「ハロゲン原子、低級アルコキシ基またはニトロ基で置換されたアリール基」、「ハロゲン原子またはトリ低級アルキルシリル基で置換された低級アルコキシカルボニル基」、アルケニルオキシカルボニル基、「低級アルコキシまたはニトロ基でアリール環が置換されていてもよいアラールキルオキシカルボニル基」などが挙げられる。

【0051】

より具体的には、テトラヒドロピラニル基またはテトラヒドロチオピラニル基としては、テトラヒドロピラン-2-イル基、3-ブromotetraヒドロピラン-2-イル基、4-メトキシテトラヒドロピラン-4-イル基、テトラヒドロチオピラン-4-イル基、4-メトキシテトラヒドロチオピラン-4-イル基などが挙げられる。テトラヒドロフラニル基またはテトラヒドロチオフラニル基としては、テトラヒドロフラン-2-イル基、テトラヒドロチオフラン-2-イル基が挙げられる。低級アルコキシメチル基としては、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、セ-ブトキシメチル基などが挙げられる。低級アルコキシ化低級アルコキシメチル基としては、2-メトキシエトキシメチル基などが挙げられる。ハロゲン低級アルコキシメチル基としては、2, 2, 2-トリクロロエトキシメチル基、ビス(2-クロロエトキシ)メチル基などが挙げられる。低級アルコキシ化エチル基としては、1-エトキシエチル基、1-(イソプロポキシ)エチル基などが挙げられる。ハロゲン化エチル基としては、2, 2, 2-トリクロロエチル基などが挙げられる。1～3個のアリール基で置換されたメチル基としては、ベンジル基、 α -ナフチルメチル基、 β -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、 α -ナフチルジフェニルメチル基、9-アンスリルメチル基などが挙げられる。「低級アルキル基、低級アルコキシ基、ハロゲン原子またはシアノ基でアリール環が置換された1～3個のアリール基で置換されたメチル基」としては、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、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、2-ニトロベンジル基、4-ニトロベンジル基、4-クロロベンジル基、4-ブromobenzen基、4-シアノベンジル基などが挙げられる。低級アルコキシカルボニル基としては、メトキシカルボニル基、エトキシカルボニル基、セ-ブトキシカルボニル基、イソブトキシカルボニル基などが挙げられる。「ハロゲン原子、低級アルコキシ基またはニトロ基で置換されたアリール基」としては、4-クロロフェニル基、2-フロロフェニル基、4-メトキシフェニル基、4-ニトロフェニル基、2, 4-ジニトロフェニル基などが挙げられる。「ハロゲン原子またはトリ低級アルキル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, 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などが挙げられる。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、アリールオキシカルボニル基などが挙げられる。「低級アルコキシまたはニトロ基でアリール環が置換されていてもよいアラールキルオキシカルボニル基」としては、ベンジルオキシカルボニル基、4-メトキシベンジルオキシカルボニル基、3, 4-ジメトキシベンジルオキシカルボニル基、2-ニトロベンジルオキシカルボニル基、4-ニトロベンジルオキシカルボニル基などが挙げられる。

【0052】

1つの実施形態では、「核酸合成の水酸基の保護基」としては、例えば脂肪族アシル基

、芳香族アシル基、1～3個のアリール基で置換されたメチル基、「低級アルキル、低級アルコキシ、ハロゲン、シアノ基でアリール環が置換された1～3個のアリール基で置換されたメチル基」、およびシリル基が挙げられる。あるいは、1つの実施形態では、「核酸合成の水酸基の保護基」としては、例えばアセチル基、ベンゾイル基、ベンジル基、p-メトキシベンゾイル基、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、tert-ブチルジメチルシリル (TBDMs) 基、[(トリイソプロピルシリル) オキシ] メチル (TOM) 基、[(2-ニトロベンジル) オキシ] メチル (NBOM) 基、ビス (アセトキシエトキシ) メチルエーテル (ACE) 基、テトラヒドロ-4-メトキシ-2H-ピラン-2-イル (Mthp) 基、1-(2-シアノエトキシ) エチル (CEE) 基、2-シアノエトキシメチル (CEM) 基、tert-ブチルジチオメチル (DTM) 基、2-(4-トリルスルホニル) エトキシメチル (TEM) 基、および4-(N-ジクロロアセチル-N-メチルアミノ) ベンジルオキシメチル (4-MABOM) 基が挙げられる。

【0053】

1つの実施形態では、「核酸合成の保護基で保護された水酸基」の保護基としては、例えば脂肪族アシル基、芳香族アシル基、「1～3個のアリール基で置換されたメチル基」、「ハロゲン原子、低級アルコキシ基またはニトロ基で置換されたアリール基」、低級アルキル基、および低級アルケニル基が挙げられる。あるいは、1つの実施形態では、「核酸合成の保護基で保護された水酸基」の保護基としては、例えばベンゾイル基、ベンジル基、2-クロロフェニル基、4-クロロフェニル基、および2-ブロペニル基が挙げられる。

【0054】

1つの実施形態では、「核酸合成のアミノ基の保護基」としては、例えばアシル基、好適には、ベンゾイル基が挙げられる。

【0055】

1つの実施形態では、「核酸合成の保護基で保護されたリン酸基」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、アラルキル基、「ニトロ基またはハロゲン原子でアリール環が置換されたアラルキル基」、および「低級アルキル基、ハロゲン原子、またはニトロ基で置換されたアリール基」が挙げられる。あるいは、1つの実施形態では、「核酸合成の保護基で保護されたリン酸基」の「保護基」としては、例えば2-シアノエチル基、2, 2, 2-トリクロロエチル基、ベンジル基、2-クロロフェニル基、および4-クロロフェニル基が挙げられる。

【0056】

1つの実施形態では、「核酸合成の保護基で保護されたメルカプト基」の「保護基」としては、例えば脂肪族アシル基および芳香族アシル基、好適には、ベンゾイル基が挙げられる。

【0057】

本明細書において、 $-P(R^{4a})R^{5a}$ [式中、 R^{4a} および R^{5a} は、それぞれ独立して、水酸基、核酸合成の保護基で保護された水酸基、メルカプト基、核酸合成の保護基で保護されたメルカプト基、アミノ基、炭素数1から6のアルコキシ基、炭素数1から6のアルキルチオ基、炭素数1から6のシアノアルコキシ基、または炭素数1から6のアルキル基を有するジアルキルアミノ基を表す] で表される基のうち、 R^{4a} が OR^{4c} でありそして R^{5a} が NR^{5c} である基は、「ホスホロアミダイト基」という (ここで、 R^{4c} は例えば炭素数1から6のシアノアルコキシ基であり、そして R^{5c} は例えば炭素数1から6のアルキル基である)。ホスホロアミダイト基としては、好適には、式 $-P(OC_2H_4CN)(N(iPr)_2)$ で表される基、または式 $-P(OCH_3)(N(iPr)_2)$ で表される基が挙げられる。ここで、 iPr はイソプロピル基を表す。

【0058】

本明細書において、用語「ヌクレオシド」および「ヌクレオシド類縁体」とは、プリンまたはピリミジン塩基と糖とが結合した「ヌクレオシド」のうち非天然型のもの、ならび

10

20

30

40

50

に、プリンおよびピリミジン以外の芳香族複素環および芳香族炭化水素環でプリンまたはピリミジン塩基との代用が可能なものと糖が結合したものをいう。

【0059】

本明細書において、用語「人工オリゴヌクレオチド」および「オリゴヌクレオチド類縁体」とは、同一または異なる「ヌクレオシド」または「ヌクレオシド類縁体」がリン酸ジエステル結合で例えば2～50個結合した「オリゴヌクレオチド」の非天然型誘導体をいう。そのような類縁体としては、好適には、糖部分が修飾された糖誘導体；リン酸ジエステル部分がチオエート化されたチオエート誘導体；末端のリン酸部分がエステル化されたエステル体；プリン塩基上のアミノ基がアミド化されたアミド体が挙げられる。

【0060】

本明細書において、用語「その塩」とは、本発明の式(I)または(II)で表される化合物の塩をいう。そのような塩としては、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、リチウム塩のようなアルカリ金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩のようなアルカリ土類金属塩、アルミニウム塩、鉄塩、亜鉛塩、銅塩、ニッケル塩、コバルト塩などの金属塩；アンモニウム塩のような無機塩、セーオクチルアミン塩、ジベンジルアミン塩、モルホリン塩、グルコサミン塩、フェニルグリシンアルキルエステル塩、エチレンジアミン塩、N-メチルグルカミン塩、グアニジン塩、ジエチルアミン塩、トリエチルアミン塩、ジシクロヘキシルアミン塩、N, N'-ジベンジルエチレンジアミン塩、クロロプロカイン塩、プロカイン塩、ジエタノールアミン塩、N-ベンジル-フェネチルアミン塩、ピペラジン塩、テトラメチルアンモニウム塩、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン塩のような有機塩等のアミン塩；フッ化水素酸塩、塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩のようなハロゲン原子化水素酸塩、硝酸塩、過塩素酸塩、硫酸塩、リン酸塩等の無機酸塩；メタンスルホン酸塩、トリフルオロメタンスルホン酸塩、エタンスルホン酸塩のような低級アルカンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩のようなアリースルホン酸塩、酢酸塩、リンゴ酸塩、フマル酸塩、コハク酸塩、クエン酸塩、酒石酸塩、シュウ酸塩、マレイン酸塩等の有機酸塩；および、グリシン塩、リジン塩、アルギニン塩、オルニチン塩、グルタミン酸塩、アスパラギン酸塩のようなアミノ酸塩が挙げられる。

【0061】

本明細書において、用語「その薬理学上許容される塩」としては、本発明の式(II)で表されるヌクレオシド構造を少なくとも1つ含有するオリゴヌクレオチド類縁体の塩をいう。そのような塩としては、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、リチウム塩のようなアルカリ金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩のようなアルカリ土類金属塩、アルミニウム塩、鉄塩、亜鉛塩、銅塩、ニッケル塩、コバルト塩などの金属塩；アンモニウム塩のような無機塩、セーオクチルアミン塩、ジベンジルアミン塩、モルホリン塩、グルコサミン塩、フェニルグリシンアルキルエステル塩、エチレンジアミン塩、N-メチルグルカミン塩、グアニジン塩、ジエチルアミン塩、トリエチルアミン塩、ジシクロヘキシルアミン塩、N, N'-ジベンジルエチレンジアミン塩、クロロプロカイン塩、プロカイン塩、ジエタノールアミン塩、N-ベンジル-フェネチルアミン塩、ピペラジン塩、テトラメチルアンモニウム塩、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン塩のような有機塩等のアミン塩；フッ化水素酸塩、塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩のようなハロゲン原子化水素酸塩、硝酸塩、過塩素酸塩、硫酸塩、リン酸塩等の無機酸塩；メタンスルホン酸塩、トリフルオロメタンスルホン酸塩、エタンスルホン酸塩のような低級アルカンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩のようなアリースルホン酸塩、酢酸塩、リンゴ酸塩、フマル酸塩、コハク酸塩、クエン酸塩、酒石酸塩、シュウ酸塩、マレイン酸塩等の有機酸塩；および、グリシン塩、リジン塩、アルギニン塩、オルニチン塩、グルタミン酸塩、アスパラギン酸塩のようなアミノ酸塩が挙げられる。

【0062】

以下、本発明について詳述する。

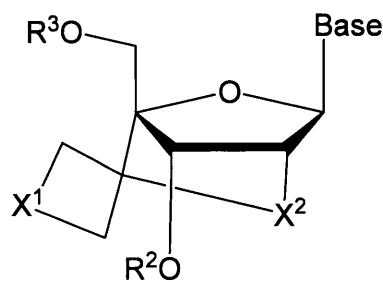
【0063】

(架橋型ヌクレオシド)

本発明の架橋型ヌクレオシドは、以下の式（I）：

【0064】

【化9】



(I)

【0065】

（式中、

Baseは、α群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいプリン-9-イル基または2-オキソ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル基を表し、ここで、該α群は、水酸基、核酸合成の保護基で保護された水酸基、炭素数1から6の直鎖アルキル基、炭素数1から6の直鎖アルコキシ基、メルカプト基、核酸合成の保護基で保護されたメルカプト基、炭素数1から6の直鎖アルキルチオ基、アミノ基、炭素数1から6の直鎖アルキルアミノ基、核酸合成の保護基で保護されたアミノ基、およびハロゲン原子からなり、

R²およびR³は、それぞれ独立して、水素原子、核酸合成の水酸基の保護基、分岐または環を形成していてもよい炭素数1から7のアルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数2から7のアルケニル基、該α群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよくそしてヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数3から10のアリール基、該α群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよくそしてヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数3から12のアリール部分を有するアラルキル基、該α群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいアシル基、該α群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいシリル基、該α群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいリン酸基、核酸合成の保護基で保護されたリン酸基、-P(R⁴ᵃ)R⁵ᵃ〔式中、R⁴ᵃおよびR⁵ᵃは、それぞれ独立して、水酸基、核酸合成の保護基で保護された水酸基、メルカプト基、核酸合成の保護基で保護されたメルカプト基、アミノ基、炭素数1から6のアルコキシ基、炭素数1から6のアルキルチオ基、炭素数1から6のシアノアルコキシ基、または炭素数1から6のアルキル基を有するジアルキルアミノ基を表す〕を表し、

X¹は、炭素数1から3の直鎖アルキル基か、-NHR⁴ᵇ〔ここで、R⁴ᵇは水素原子または炭素数1から3の直鎖アルキル基である〕か、または-OR⁵ᵇ〔ここで、R⁵ᵇは水素原子または炭素数1から3の直鎖アルキル基である〕かで置換されていてもよい、炭素数2から8のアルキレン基；あるいは炭素数1から3の直鎖アルキル基か、-NHR⁴ᵇ〔ここで、R⁴ᵇは水素原子または炭素数1から3の直鎖アルキル基である〕か、または-OR⁵ᵇ〔ここで、R⁵ᵇは水素原子または炭素数1から3の直鎖アルキル基である〕かで置換されていてもよい、炭素数2から8のアルケニレン基；であり、そして

X²は、酸素原子、硫黄原子、-NH-、-N(CH₃)-またはメチレン基である。

【0066】

上記式（I）において、「Base」は、例えばプリン塩基（すなわち、プリン-9-イル基）またはピリミジン塩基（すなわち、2-オキソ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル基）である。これらの塩基は、水酸基、炭素数1から6の直鎖アルキル基、炭素数1から6の直鎖アルコキシ基、メルカプト基、炭素数1から6の直鎖アルキルチオ基、アミノ基、炭素数1から6の直鎖アルキルアミノ基、およびハロゲン原子からなるα群より選択される任意の置換基を1以上有していてもよい。

【0067】

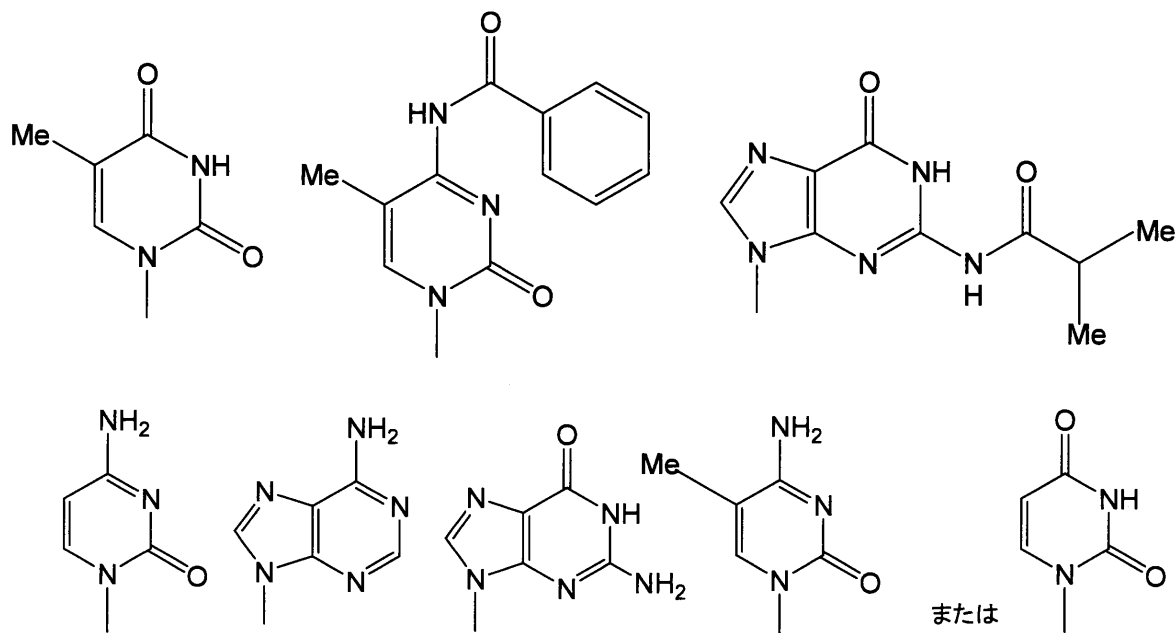
上記「Base」の具体例としては、アデニル基、グアニル基、シトシル基、ウラシル基、およびチミシル基、ならびに6-アミノプリン-9-イル基、2,6-ジアミノプリン-9-イル基、2-アミノ-6-クロロプリン-9-イル基、2-アミノ-6-フルオロプリン-9-イル基、2-アミノ-6-ブロモプリン-9-イル基、2-アミノ-6-ヒドロキシプリン-9-イル基、6-アミノ-2-メトキシプリン-9-イル基、6-アミノ-2-クロロプリン-9-イル基、6-アミノ-2-フルオロプリン-9-イル基、2,6-ジメトキシプリン-9-イル基、2,6-ジクロロプリン-9-イル基、6-メルカプトプリン-9-イル基、2-オキソ-4-アミノ-1,2-ジヒドロピリミジン-1-イル基、4-アミノ-2-オキソ-5-フルオロ-1,2-ジヒドロピリミジン-1-イル基、4-アミノ-2-オキソ-5-クロロ-1,2-ジヒドロピリミジン-1-イル基、2-オキソ-4-メトキシ-1,2-ジヒドロピリミジン-1-イル基、2-オキソ-4-メルカプト-1,2-ジヒドロピリミジン-1-イル基、2-オキソ-4-ヒドロキシ-1,2-ジヒドロピリミジン-1-イル基、2-オキソ-4-ヒドロキシ-5-メチル-1,2-ジヒドロピリミジン-1-イル基、および4-アミノ-5-メチル-2-オキソ-1,2-ジヒドロピリミジン-1-イル基が挙げられる。

【0068】

あるいは、「Base」は、核酸医薬への導入という観点から、以下の構造式：

【0069】

【化10】



【0070】

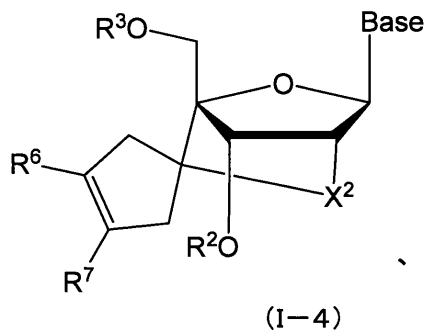
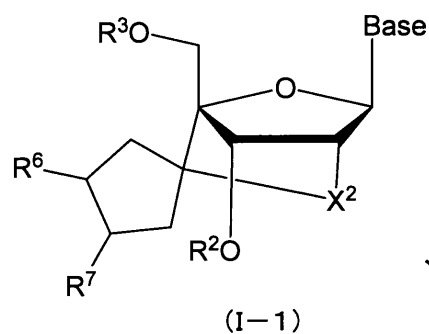
でそれぞれ表される基、ならびに2-オキソ-4-ヒドロキシ-5-メチル-1,2-ジヒドロピリミジン-1-イル基、2-オキソ-4-アミノ-1,2-ジヒドロピリミジン-1-イル基、6-アミノプリン-9-イル基、2-アミノ-6-ヒドロキシプリン-9-イル基、4-アミノ-5-メチル-2-オキソ-1,2-ジヒドロピリミジン-1-イル基、および2-オキソ-4-ヒドロキシ-1,2-ジヒドロピリミジン-1-イル基が好ましい。「Base」はまた、オリゴヌクレオチドの合成の際には、上記基を構成する水酸基およびアミノ基が保護基により保護されているものであることが好ましい。

【0071】

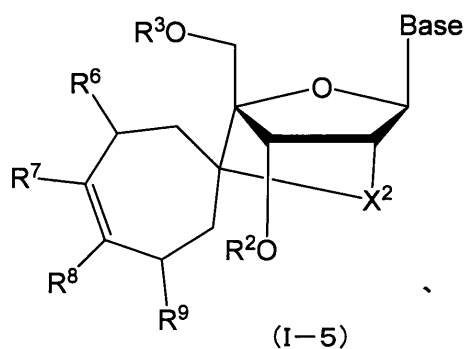
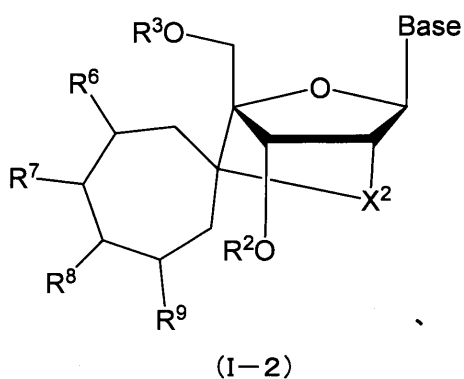
ここで、1つの実施形態では、式(I)で表される化合物の一例としては以下の式(I-1)～(I-6)：

【0072】

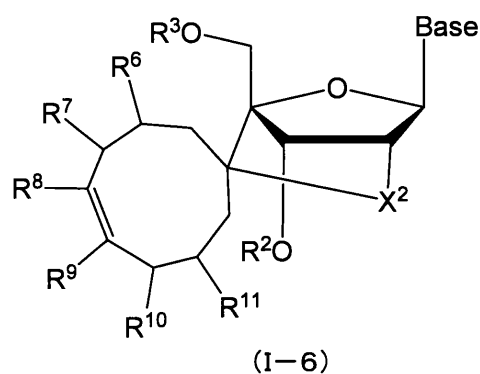
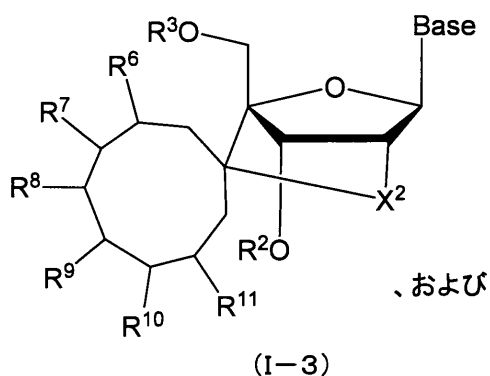
【化 1 1】



10



20



30

【0073】

(式中、

Base、 R^2 、 R^3 、および X^2 は上記式(I)で定義されるものと同様であり、そして R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 、 R^{10} および R^{11} はそれぞれ独立して、水素原子、炭素数1から3の直鎖アルキル基、 $-NHR^{4b}$ [ここで、 R^{4b} は水素原子または炭素数1から3の直鎖アルキル基である]、または $-OR^{5b}$ [ここで、 R^{5b} は水素原子または炭素数1から3の直鎖アルキル基である]である)で表される化合物が挙げられる。ここで、例えば、上記式(I-1)および(I-4)における R^6 および R^7 はともに水素原子である。あるいは、例えば、上記式(I-2)および(I-5)における R^6 、 R^7 、 R^8 、および R^9 のすべては水素原子である。あるいは、例えば、上記式(I-3)および(I-6)における R^6 、 R^7 、 R^8 、および R^9 、 R^{10} 、および R^{11} のすべては水素原子である。

40

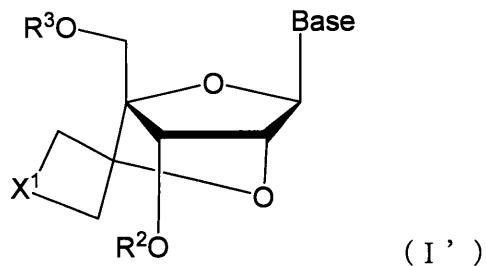
【0074】

あるいは、1つの実施形態では、式(I)で表される化合物の他の例としては、以下の式(I'):

【0075】

50

【化12】



10

【0076】

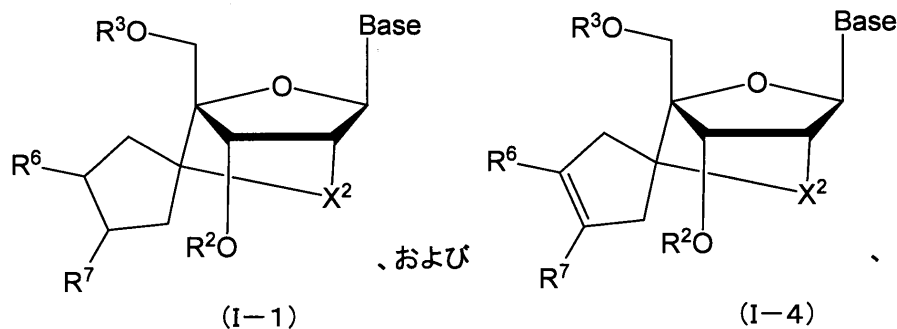
(式中、Base、 R^2 、 R^3 、および X^1 は上記式(I)で定義されるものと同様である)で表される化合物が挙げられる。

【0077】

あるいは、1つの実施形態では、式(I)で表される化合物の別の例としては以下の式(I-1)および(I-4)：

【0078】

【化13】



20

【0079】

(式中、Base、 R^2 、 R^3 、および X^2 は上記式(I)で定義されるものと同様であり、そして R^6 および R^7 はそれぞれ独立して、水素原子、炭素数1から3の直鎖アルキル基、 $-NHR^{4b}$ [ここで、 R^{4b} は水素原子または炭素数1から3の直鎖アルキル基である]、または $-OR^{5b}$ [ここで、 R^{5b} は水素原子または炭素数1から3の直鎖アルキル基である]である)で表される化合物が挙げられる。ここで、例えば、上記式(I-1)および(I-4)における R^6 および R^7 はともに水素原子である。

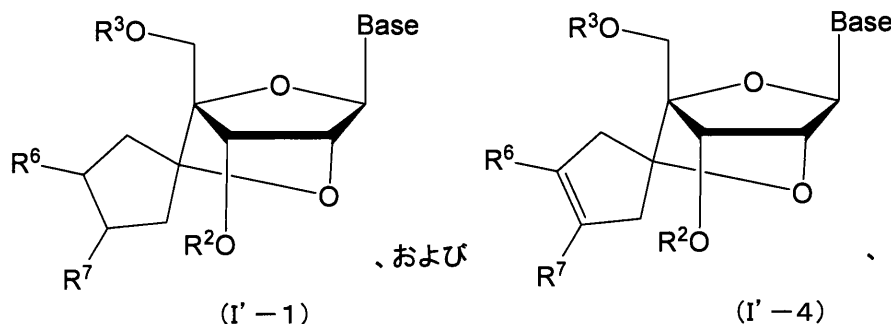
30

【0080】

あるいは、1つの実施形態では、式(I)で表される化合物のさらに別の例としては以下の式(I'-1)および(I'-4)：

【0081】

【化14】



40

50

【0082】

(式中、Base、 R^2 、および R^3 は上記式(I)で定義されるものと同様であり、そして R^6 および R^7 はそれぞれ独立して、水素原子、炭素数1から3の直鎖アルキル基、 $-NHR^{4b}$ [ここで、 R^{4b} は水素原子または炭素数1から3の直鎖アルキル基である]、または $-OR^{5b}$ [ここで、 R^{5b} は水素原子または炭素数1から3の直鎖アルキル基である]である)で表される化合物が挙げられる。ここで、例えば、上記式(I'-1)および(I'-4)における R^6 および R^7 はともに水素原子である。

【0083】

本発明の架橋型ヌクレオシドでは、上記のように式(I)の6'位に環状の置換基が導入されている。このような構造を有していることにより、本発明のヌクレオシドは当該6'位において異性体の構造を有し得ず、その合成の際に異性体の分離を行う必要性から解放される。さらに、本発明の架橋型ヌクレオシドは、式(I)の6'位に導入された環状の置換基によって後述するオリゴヌクレオチドにおけるヌクレアーゼ耐性能を向上させることができる。また、このような置換基が有する環のひずみは、糖部のコンホメーションに直接的に影響を及ぼすものである。このため、本発明の架橋型ヌクレオシドは、当該ヌクレオチドを用いて得られたオリゴヌクレオチドに対して、ssRNAとの結合親和性をも一層向上させ得る。

【0084】

(オリゴヌクレオチド)

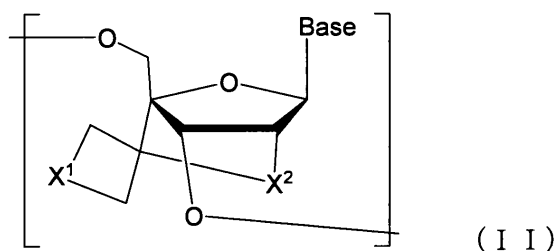
本発明において、オリゴヌクレオチドは、このような式(I)の架橋型ヌクレオシドを用い、例えば、当該分野において周知のアミダイト法、またはM. Kuwaharaら、Nucleic Acids Res., 2008年, 36巻, 13号, 4257-4265頁に記載されるような三リン酸化を経て容易に製造することができる。

【0085】

本発明のオリゴヌクレオチドまたはその薬理学上許容される塩(以下、これらをまとめて「本発明のオリゴヌクレオチド」を言うことがある)は、以下の式(II)：

【0086】

【化15】



【0087】

(式中、

Baseは、 α 群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいプリン-9-イル基または2-オキソ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル基を表し、ここで、該 α 群は、水酸基、核酸合成の保護基で保護された水酸基、炭素数1から6の直鎖アルキル基、炭素数1から6の直鎖アルコキシ基、メルカプト基、核酸合成の保護基で保護されたメルカプト基、炭素数1から6の直鎖アルキルチオ基、アミノ基、炭素数1から6の直鎖アルキルアミノ基、核酸合成の保護基で保護されたアミノ基、およびハロゲン原子からなり、

X^1 は、炭素数1から3の直鎖アルキル基か、 $-NHR^{4b}$ [ここで、 R^{4b} は水素原子または炭素数1から3の直鎖アルキル基である] か、または $-OR^{5b}$ [ここで、 R^{5b} は水素原子または炭素数1から3の直鎖アルキル基である] かで置換されていてもよい、炭素数2から8のアルキレン基；あるいは炭素数1から3の直鎖アルキル基か、 $-NHR^{4b}$ [ここで、 R^{4b} は水素原子または炭素数1から3の直鎖アルキル基である] か、または

—OR^{5b} [ここで、R^{5b}は水素原子または炭素数1から3の直鎖アルキル基である] かで置換されていてもよい、炭素数2から8のアルケニレン基；であり、そして

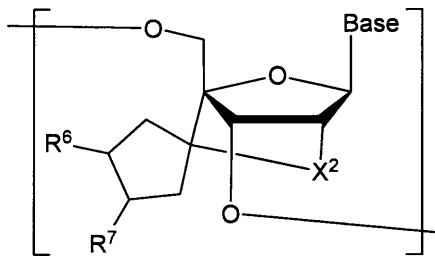
X²は、酸素原子、硫黄原子、—NH—、—N(CH₃)—またはメチレン基である)で表されるヌクレオシド構造を少なくとも1つ含む。

【0088】

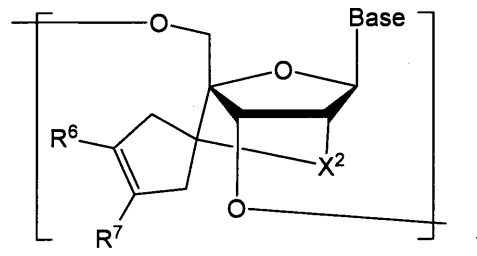
1つの実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチドに含まれる式(II)のヌクレオシド構造の一例としては以下の式(II-1)～(II-6)：

【0089】

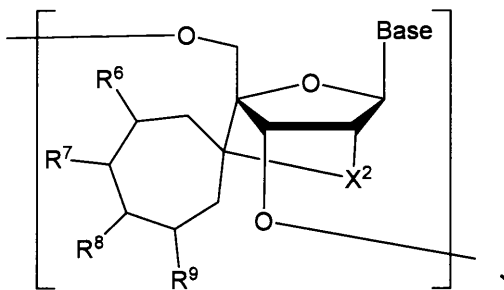
【化16】



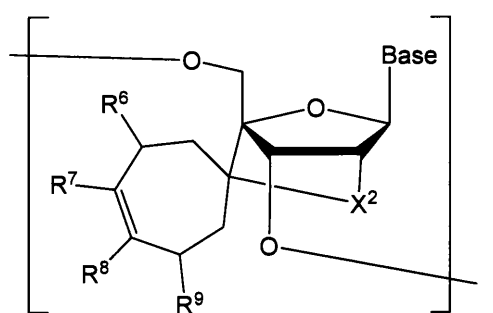
(II-1)



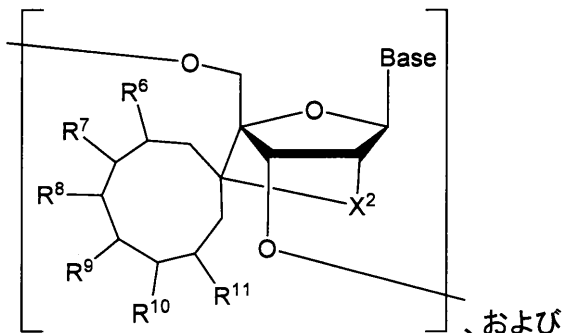
(II-4)



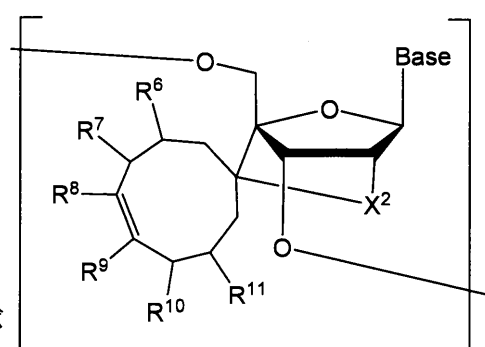
(II-2)



(II-5)



(II-3)



(II-6)

【0090】

(式中、

BaseおよびX²は上記式(II)に定義した基と同様であり、そしてR⁶、R⁷、R⁸、R⁹、R¹⁰およびR¹¹はそれぞれ独立して、水素原子、炭素数1から3の直鎖アルキル基、—NHR^{4b} [ここで、R^{4b}は水素原子または炭素数1から3の直鎖アルキル基である]、または—OR^{5b} [ここで、R^{5b}は水素原子または炭素数1から3の直鎖アルキル基である]である)で表されるものが挙げられる。ここで、例えば、上記式(II-1)および(II-4)におけるR⁶およびR⁷はともに水素原子である。あるいは、例

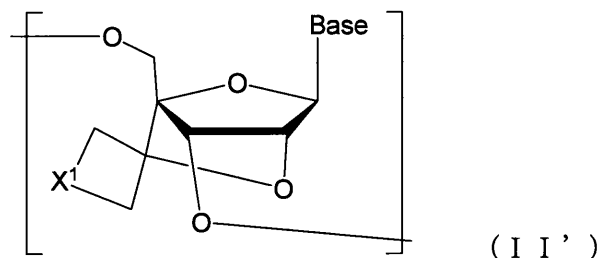
例えば、上記式 (I I - 2) および (I I - 5) における R^6 、 R^7 、 R^8 、および R^9 のすべては水素原子である。あるいは、例えば、上記式 (I I - 3) および (I I - 6) における R^6 、 R^7 、 R^8 、および R^9 、 R^{10} 、および R^{11} のすべては水素原子である。

【0091】

あるいは、1つの実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチドに含まれる式 (I I) のヌクレオシド構造の他の例としては以下の式 (I I') :

【0092】

【化17】



10

【0093】

(式中、Base および X^1 は上記式 (I I) に定義した基と同様である) で表されるものが挙げられる。

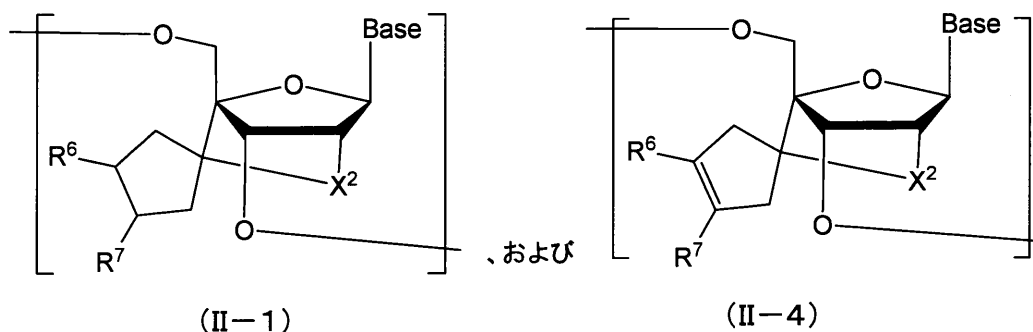
20

【0094】

あるいは、1つの実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチドに含まれる式 (I I) のヌクレオシド構造の別の例としては以下の式 (I I - 1) および (I I - 4) :

【0095】

【化18】



30

【0096】

(式中、

Base および X^2 は上記式 (I I) に定義した基と同様であり、そして R^6 および R^7 はそれぞれ独立して、水素原子、炭素数1から3の直鎖アルキル基、 $-NHR^{4b}$ [ここで、 R^{4b} は水素原子または炭素数1から3の直鎖アルキル基である]、または $-OR^{5b}$ [ここで、 R^{5b} は水素原子または炭素数1から3の直鎖アルキル基である] である) で表されるものが挙げられる。ここで、例えば、上記式 (I I - 1) および (I I - 4) における R^6 および R^7 はともに水素原子である。

40

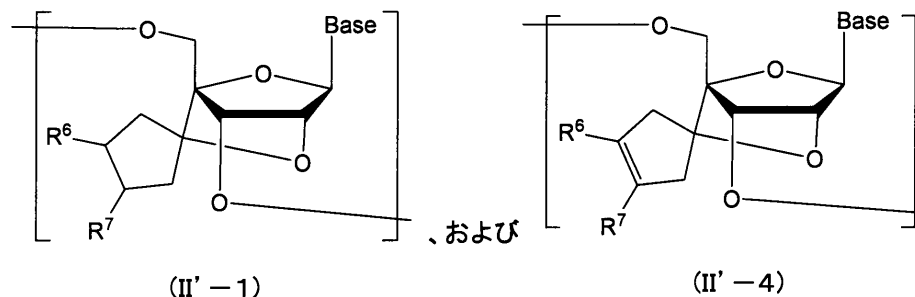
【0097】

あるいは、1つの実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチドに含まれる式 (I I) のヌクレオシド構造のさらに別の例としては以下の式 (I I' - 1) および (I I' - 4) :

【0098】

50

【化 19】



【0099】

(式中、

Baseは上記式(II)に定義した基と同様であり、そして R^6 および R^7 はそれぞれ独立して、水素原子、炭素数1から3の直鎖アルキル基、 $-NHR^{4b}$ [ここで、 R^{4b} は水素原子または炭素数1から3の直鎖アルキル基である]、または $-OR^{5b}$ [ここで、 R^{5b} は水素原子または炭素数1から3の直鎖アルキル基である]である)で表されるものが挙げられる。ここで、例えば、上記式(II'-1)および(II'-4)における R^6 および R^7 はともに水素原子である。

【0100】

本発明のオリゴヌクレオチドは、上記ヌクレオシド構造を、任意の位置に少なくとも1つ有する。その位置および数は、特に限定されず、目的に応じて適宜設計され得る。

【0101】

このようなヌクレオシド構造を含むオリゴヌクレオチド(アンチセンス分子)は、従来の2', 4'-BNA/LNAを用いる場合と比較して、ヌクレアーゼ耐性能が飛躍的に向上する。また、公知の2', 4'-BNA/LNAに匹敵するssRNA結合親和性を有する。

【0102】

これらのことから、本発明の架橋型ヌクレオシドを用いて合成された本発明のオリゴヌクレオチドは、抗腫瘍剤、抗ウイルス剤をはじめとした、特定の遺伝子の働きを阻害して疾病を治療する医薬品(アンチセンス分子)としての有用性が期待される。

【0103】

特に、アンチセンス法では、相補センス鎖RNAに対する結合親和性および生体内DNA分解酵素への耐性の両方が必要とされる。一般的に、核酸は、一本鎖状態では、糖部の構造が絶えずDNA二重鎖に近い形と、DNA-RNA二重鎖やRNA二重鎖に近い形との間に「ゆらぎ」が存在する。この「ゆらぎ」を予め二重鎖形成時の配座へと固定化することにより、標的ssRNAに対する結合親和性を向上させることができる。また、核酸分解酵素は、オリゴ核酸のリン酸ジエステル部分を切断するが、糖部等に嵩高い置換基を導入することにより、立体障害を通じてオリゴ核酸の分解を抑制することができる。

【0104】

本発明の架橋型ヌクレオシドは、上記の通り6'位に嵩高い環状の置換基を有する。このため、これを用いて得られるオリゴヌクレオチドは、上記ssRNAに対する結合親和性を向上させ、かつ優れた酵素耐性能を有することができる。

【0105】

本発明のオリゴヌクレオチドは、例えば、賦形剤、結合剤、防腐剤、酸化安定剤、崩壊剤、滑沢剤、矯味剤などの医薬の製剤技術分野において通常用いられる補助剤を配合して、非経口投与製剤またはリポソーム製剤とすることができる。また、例えば、当該技術分野で通常用いられる医薬用担体を配合して、液剤、クリーム剤、軟膏剤などの局所用の製剤を調製することができる。

【実施例】

【0106】

10

20

30

40

50

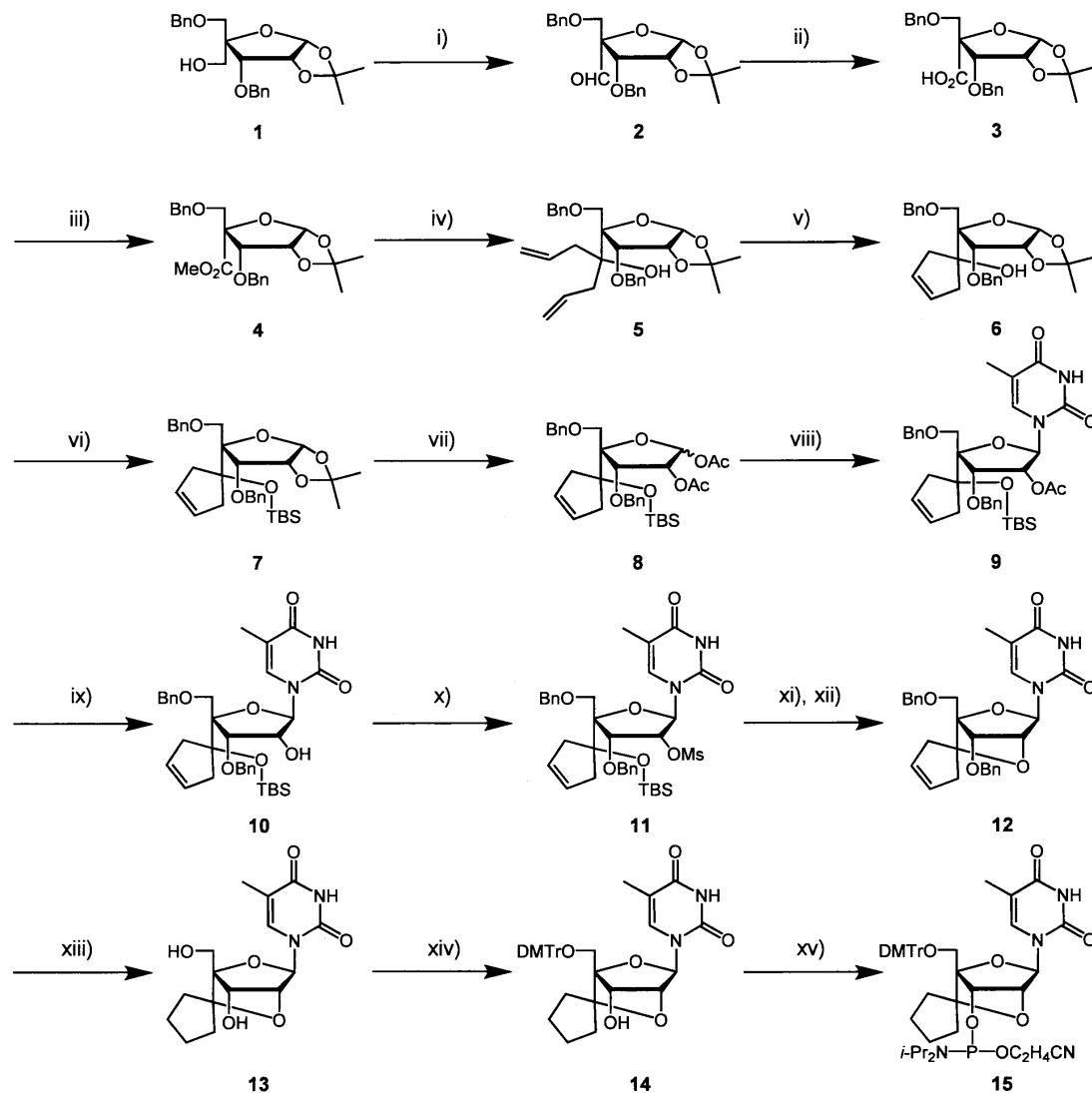
以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例により限定されるものではない。

【0107】

(実施例1：架橋型ヌクレオシドの合成(1))

【0108】

【化20】



各工程の試薬および条件: (i) DMP, CH_2Cl_2 , 0°C から室温, 1時間, 94%; (ii) H_2O_2 水溶液, NaH_2PO_4 水溶液, NaClO_2 水溶液, MeCN , 0°C から室温, 2時間, 定量的.; (iii) MeI , NaHCO_3 , DMF , 室温, 22時間, 98%; (iv) アリルマグネシウムブロミド, CeCl_3 , THF , 室温, 14時間, 98%; (v) 第二世代グラブス触媒, CH_2Cl_2 , 還流下, 4時間, 90%; (vi) TBSOTf , 2,6-ルチジン, CH_2Cl_2 , 室温, 20時間, 94%; (vii) TFA , AcO_2 , AcOH , 室温, 2時間, 86%; (viii) チミン, TMSOTf , BSA , MeCN , 還流下, 3時間, 89%; (ix) K_2CO_3 , MeOH , 室温, 5時間, 97%; (x) MsCl , ピリジン, 室温, 5時間, 定量的.; (xi) TBAF , THF , 室温, 30時間; (xii) K_2CO_3 , DMF , 90°C , 20h, (2工程で83%); (xiii) H_2 , $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$, AcOEt , 室温, 0.5時間, 80%; (xiv) DMTrCl , ピリジン, 室温, 8時間, 定量的.; (xv) 2-シアノエチル- N,N -ジイソプロピルホスホロクロリダート, DIPEA , CH_2Cl_2 , 室温, 8時間, 58%

【0109】

(1-1) 化合物5の合成

【0110】

10

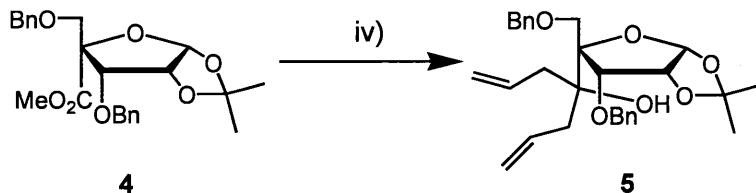
20

30

40

50

【化 2 1】



【0 1 1 1】

アルゴン雰囲気下にて、Yamaguchi, T.ら、Chem. Commun., 2015年, 51号, 9737-9740頁に記載の方法により化合物 1 から i) ~ i i i) の 3 工程を経て作製した化合物 4 (3.69 g, 8.61 mmol) および無水塩化セリウム (I I I) (7.99 g, 32.4 mmol) の無水テトラヒドロフラン溶液 (60 mL) に、アリルマグネシウムブロミド (33 mL, 33.0 mmol) を室温で加え、14 時間攪拌した。反応が終了した後に、塩化アンモニウム水溶液を加え、有機層を濃縮した。次いで、セライトでろ過し、濾液を酢酸エチルで抽出した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (SiO₂, ヘキサン：酢酸エチル = 32 : 1 から 6 : 1) により精製し、化合物 5 (4.06 g, 98%) を無色透明の油状物質として得た。

【0 1 1 2】

得られた化合物 5 の物性データを表 1 に示す。

【0 1 1 3】

【表 1】

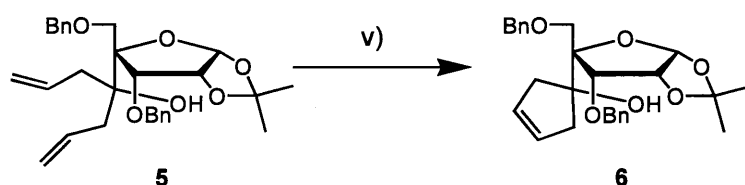
得られた化合物 5 の物性データ
¹ H NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ 7.24–7.29 (m, 10H), 5.84–5.98 (m, 3H), 4.88–5.00 (m, 4H), 4.85 (d, <i>J</i> = 10.7 Hz, 1H), 4.78 (dd, <i>J</i> = 4.1, 5.5 Hz, 1H), 4.53 (d, <i>J</i> = 12.0 Hz, 1H), 4.42 (d, <i>J</i> = 11.7 Hz, 1H), 4.37–4.41 (m, 2H), 4.02 (bs, 1H), 3.66 (d, <i>J</i> = 9.6 Hz, 1H), 3.58 (d, <i>J</i> = 9.3 Hz, 1H), 2.76 (d, <i>J</i> = 5.8, 14.4 Hz, 1H), 2.41–2.52 (m, 2H), 2.28 (dd, <i>J</i> = 7.6, 14.4 Hz, 1H), 1.61 (s, 3H), 1.39 (s, 3H); ¹³ C NMR (76 MHz, CDCl ₃) δ 137.8, 136.9, 134.9, 134.7, 128.5, 128.2, 128.1, 127.8, 127.5, 117.1, 114.7, 105.9, 92.7, 81.7, 80.9, 74.6, 73.7, 73.5, 41.2, 40.6, 27.7, 27.2; HRMS (MALDI) C ₂₉ H ₃₆ O ₆ Na [M+Na] ⁺ としての計算値: 503.2404, 実測値 503.2404.

【0 1 1 4】

(1-2) 化合物 6 の合成

【0 1 1 5】

【化 2 2】



【0 1 1 6】

アルゴン雰囲気下にて、上記で得られた化合物 5 (1.60 g, 3.54 mmol) の無水ジクロロメタン溶液 (110 mL) に第二世代グラブス触媒 (425 mg, 0.501 mmol) を室温で加え、4 時間加熱還流した。反応が終了した後に濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (SiO₂, ヘキサン：酢酸エチル = 32 : 1 から 10 : 1) により精製し、化合物 6 (1.35 g, 90%) を黄淡色の粘性油状物質として得た。

【0 1 1 7】

得られた化合物 6 の物性データを表 2 に示す。

【 0 1 1 8 】

【表 2】

得られた化合物 6 の物性データ
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.28–7.36 (m, 10H), 5.92 (d, $J = 3.5$ Hz, 1 H), 5.58–5.65 (m, 2H), 4.87 (d, $J = 11.3$ Hz, 1H), 4.77 (dd, $J = 4.1, 8.6$ Hz, 1H), 4.54 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H), 4.38–4.47 (m, 3H), 3.75 (bs, 1H), 3.53 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H), 3.16 (m, 2H), 2.62–2.81 (m, 1H), 2.34–2.45 (m, 1H), 2.29 (d, $J = 16.8$ Hz, 1H), 1.63 (s, 3H), 1.38 (s, 3H); ^{13}C NMR (76 MHz, CDCl_3) δ 138.0, 137.9, 137.2, 128.5, 128.4, 128.1, 127.4, 127.0, 114.6, 105.7, 92.1, 83.0, 80.8, 80.5, 75.1, 73.7, 73.4, 45.1, 27.3, 27.1; HRMS (MALDI) $\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{O}_6\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ としての計算値: 475.2091, 実測値 475.2091.

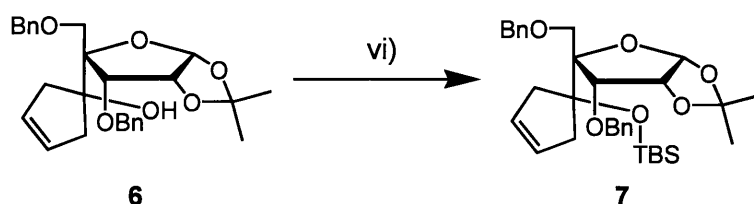
10

【 0 1 1 9 】

(1 – 3) 化合物 7 の合成

【 0 1 2 0 】

【化 2 3】



20

【 0 1 2 1 】

アルゴン雰囲気下にて、上記で得られた化合物 6 (1 . 2 1 g , 2 . 6 7 mmol) の無水ジクロロメタン溶液 (3 1 mL) に 2 , 6 - ルチジン (2 . 2 0 mL , 1 9 . 0 mmol) と *tert*-ブチルジメチルシリルトリフルオロメタンスルホン酸 (3 . 0 0 mL , 1 3 . 1 mmol) を 0 °C で加え、室温で 2 0 時間攪拌した。反応が終了した後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、有機層を酢酸エチルで抽出した。有機層を水および飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (SiO_2 , ヘキサン : 酢酸エチル = 1 0 : 0 から 9 : 1) により精製し、化合物 7 (1 . 4 3 g , 9 4 %) を無色透明の粘性油状物質として得た。

30

【 0 1 2 2 】

得られた化合物 7 の物性データを表 3 に示す。

【 0 1 2 3 】

【表 3】

得られた化合物 7 の物性データ
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.26–7.40 (m, 10H), 5.93 (d, $J = 4.5$ Hz, 1 H), 5.60–5.63 (m, 2H), 4.88 (dd, $J = 4.8, 5.9$ Hz, 1H), 4.78 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H), 4.58 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H), 4.45 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H), 4.38 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H), 4.14 (d, $J = 5.8$ Hz, 1H), 3.89 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 3.61 (d, $J = 9.3$ Hz, 1H), 2.88–3.15 (m, 2H), 2.39–2.70 (m, 1H), 2.20 (d, $J = 16.8$ Hz, 1H), 1.51 (s, 3H), 1.36 (s, 3H), 0.76 (s, 9H), -0.04 (s, 3H), -0.14 (s, 3H); ^{13}C NMR (76 MHz, CDCl_3) δ 138.5, 138.1, 128.5, 127.9, 127.7, 127.5, 127.1, 114.3, 105.6, 86.4, 82.5, 80.5, 73.8, 73.6, 45.5, 44.2, 28.0, 27.4, 26.0, 18.3, -3.46, -3.56; HRMS (MALDI) $\text{C}_{33}\text{H}_{46}\text{O}_6\text{NaSi}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ としての計算値: 589.2956, 実測値 589.2956.

40

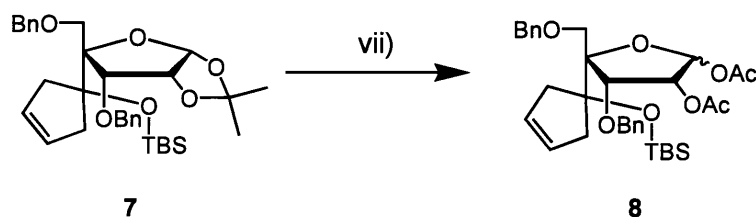
【 0 1 2 4 】

50

(1-4) 化合物 8 の合成

【0125】

【化24】



【0126】

アルゴン雰囲気下にて、上記で得られた化合物 7 (911 mg, 1.61 mmol) の酢酸溶液 (1.85 mL, 32.3 mmol) に無水酢酸 (3.05 mL, 32.3 mmol) とトリフルオロ酢酸 (295 μ L, 3.86 mmol) とを 0°C で加え、室温で 2 時間攪拌した。反応が終了した後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、有機層を酢酸エチルで抽出した。有機層を水および飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (SiO₂, ヘキサン：酢酸エチル = 9 : 1 から 4 : 1) により精製し、化合物 8 (841 mg, 86%) を無色透明の粘性油状物質として得た。

【0127】

得られた化合物 8 の物性データを表 4 に示す。

【0128】

【表 4】

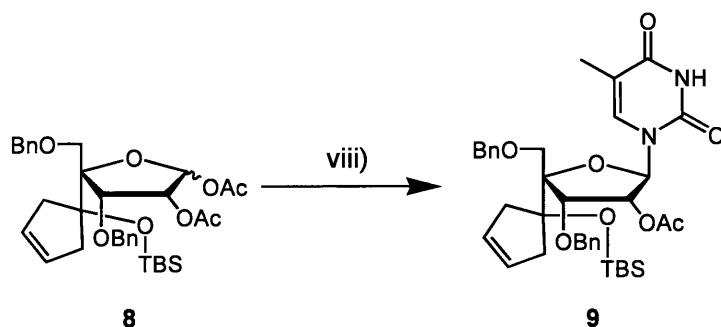
得られた化合物 8 の物性データ
¹ H NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ 7.26–7.43 (m, 10H), 6.49 (d, J = 5.1 Hz, 1/2H), 6.35 (d, J = 5.1 Hz, 1/2H), 5.67–5.71 (m, 3/2H), 5.50–5.64 (m, 3/2H), 4.62–4.74 (m, 2H), 4.32–4.56 (m, 3H), 4.00 (d, J = 10.0 Hz, 1/2H), 3.97 (d, J = 12.0 Hz, 1/2H), 3.59 (d, J = 6.9 Hz, 1/2H), 3.57 (d, J = 6.9 Hz, 1/2H), 2.82–3.18 (m, 2H), 2.44 (d, J = 18.2 Hz, 1H), 2.16–2.25 (m, 1H), 2.11 (s, 3/2H), 2.04 (s, 3/2H), 1.89 (s, 3/2H), 1.84 (s, 3/2H), 0.79 (s, 9/2H), 0.78 (s, 9/2H), -0.01 (s, 3/2H), -0.03 (s, 3/2H), -0.10 (s, 3/2H), -0.13 (s, 3/2H); HRMS (MALDI) C ₃₄ H ₄₆ O ₈ NaSi [M+Na] ⁺ としての計算値: 633.2854, 実測値 633.2851.

【0129】

(1-5) 化合物 9 の合成

【0130】

【化25】



【0131】

アルゴン雰囲気下にて、上記で得られた化合物 8 (389 mg, 0.637 mmol) の無水アセトニトリル溶液 (5.6 mL) にチミン (242 mg, 1.91 mmol),

N, O-ビス-トリメチルシリルアセトアミド (780 μ L, 3.18 mmol) を室温で順次加え、室温で1時間攪拌した。その後、アルゴン雰囲気下にて、トリメチルシリルトリフルオロメタンスルホン酸 (175 μ L, 0.969 mmol) を0℃で加え、5時間加熱還流した。反応が終了した後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、有機層を酢酸エチルで抽出した。有機層を水および飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (SiO₂, ヘキサン：酢酸エチル=9：1から4：1) により精製し、化合物9 (385 mg, 89%) を白色固体として得た。

【0132】

得られた化合物9の物性データを表5に示す。

【0133】

【表5】

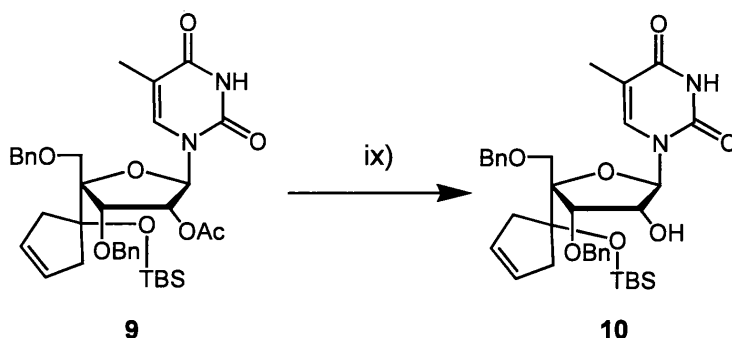
得られた化合物9の物性データ
¹ H NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ 8.33 (s, 1H), 7.66 (d, J = 1.0 Hz, 1H), 7.27–7.46 (m, 10H), 6.42 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 5.57–5.65 (m, 3H), 4.79 (d, J = 11.3 Hz, 1H), 4.70 (d, J = 11.7 Hz, 1H), 4.64 (d, J = 11.7 Hz, 1H), 4.49 (d, J = 11.3 Hz, 1H), 4.44 (d, J = 5.1 Hz, 1H), 4.06 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 3.76 (d, J = 10.0 Hz, 1H), 2.83 (d, J = 16.8 Hz, 2H), 2.57 (d, J = 17.9 Hz, 1H), 2.22 (d, J = 16.1 Hz, 1H), 1.90 (s, 3H), 1.59 (s, 3H), 0.80 (s, 9H), –0.01 (s, 3H), –0.13 (s, 3H); ¹³ C NMR (76 MHz, CDCl ₃) δ 170.7, 163.4, 150.7, 138.1, 137.1, 136.0, 129.2, 128.8, 128.3, 128.2, 127.7, 127.5, 127.3, 127.0, 111.5, 91.3, 87.4, 84.6, 81.3, 75.5, 75.0, 73.9, 73.8, 44.9, 44.5, 26.3, 20.6, 18.4, 12.2, –3.39, –3.44; HRMS (MALDI) C ₃₇ H ₄₈ N ₂ O ₈ NaSi [M+Na] ⁺ としての計算値: 699.3072, 実測値 699.3069.

【0134】

(1–6) 化合物10の合成

【0135】

【化26】



【0136】

アルゴン雰囲気下にて、上記で得られた化合物9 (986 mg, 1.46 mmol) のメタノール溶液 (14.6 mL) に炭酸カリウム (607 mg, 4.39 mmol) を0℃で加え、室温で5時間攪拌した。反応が終了した後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、有機層をジエチルエーテルで抽出した。有機層を水および飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (SiO₂, ヘキサン：酢酸エチル=4：1から1：1) により精製し、化合物10 (895 mg, 97%) を白色固体として得た。

【0137】

得られた化合物10の物性データを表6に示す。

【0138】

【表 6】

得られた化合物 10 の物性データ
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.32 (s, 1H), 7.58 (s, 1H), 7.26–7.41 (m, 10 H), 5.99 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 5.63–5.69 (m, 2H), 5.00 (d, $J = 10.3$ Hz, 1 H), 4.66 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H), 4.58 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H), 4.57 (d, $J = 11.0$ Hz, 2H), 4.22 (d, $J = 5.5$ Hz, 1H), 4.06 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 3.73 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H), 2.60–2.87 (m, 4H), 2.24 (d, $J = 16.8$ Hz, 1H), 1.63 (s, 3H), 0.82 (s, 9H), 0.04 (s, 3H), –0.03 (s, 3H); ^{13}C NMR (76 MHz, CDCl_3) δ 163.3, 150.9, 147.3, 144.8, 137.2, 137.0, 136.0, 128.9, 128.8, 128.7, 128.2, 128.1, 127.6, 111.3, 90.7, 87.6, 83.2, 75.9, 75.0, 74.0, 44.7, 44.6, 26.3, 18.5, 12.2, –3.18, –3.31; HRMS (MALDI) $\text{C}_{35}\text{H}_{46}\text{N}_2\text{O}_7\text{NaSi}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ としての計算値: 657.2966, 実測値 657.2963.

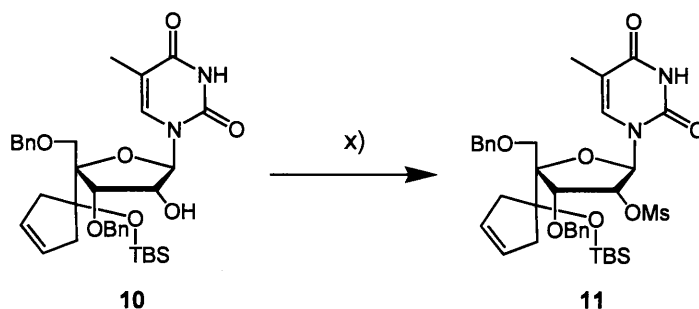
10

【0139】

(1–7) 化合物 11 の合成

【0140】

【化 27】



20

【0141】

アルゴン雰囲気下にて、上記で得られた化合物 10 (895 mg, 1.41 mmol) の脱水ピリジン溶液 (14.5 mL) にメタンスルホン酸クロリド (170 μL , 2.19 mmol) を 0℃ で加え、室温で 4 時間攪拌した。反応が終了した後、水を加え、有機層を酢酸エチルで抽出した。有機層を水および飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (SiO_2 , ヘキサン：酢酸エチル = 9 : 1 から 4 : 1) により精製し、化合物 11 (992 mg, 定量的) を白色固体として得た。

30

【0142】

得られた化合物 11 の物性データを表 7 に示す。

【0143】

【表 7】

得られた化合物 11 の物性データ
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.52 (s, 1H), 7.58 (s, 1H), 7.29–7.42 (m, 10 H), 6.40 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 5.67 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 5.65 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 5.58 (d, $J = 5.5$ Hz, 1H), 4.80 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H), 4.76 (d, $J = 11.3$ Hz, 1H), 4.69 (d, $J = 11.3$ Hz, 1H), 4.64 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H), 4.36 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H), 4.04 (d, $J = 10.0$ Hz, 1H), 3.78 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H), 2.84 (s, 3H), 2.76–2.82 (m, 2H), 2.58 (d, $J = 17.9$ Hz, 1H), 2.21 (d, $J = 16.8$ Hz, 1H), 1.59 (s, 3H), 0.81 (s, 9H), –0.01 (s, 3H), –0.12 (s, 3H); ^{13}C NMR (76 MHz, CDCl_3) δ 163.3, 150.7, 137.8, 136.7, 135.3, 129.2, 128.9, 128.3, 127.7, 127.5, 127.2, 111.9, 91.2, 87.2, 84.3, 81.3, 75.0, 74.0, 73.5, 44.7, 44.4, 38.0, 26.2, 18.3, 12.2, –3.44, –3.50; HRMS (MALDI) $\text{C}_{36}\text{H}_{48}\text{N}_2\text{O}_9\text{NaSi}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ としての計算値: 735.2742, 実測値 735.2718.

40

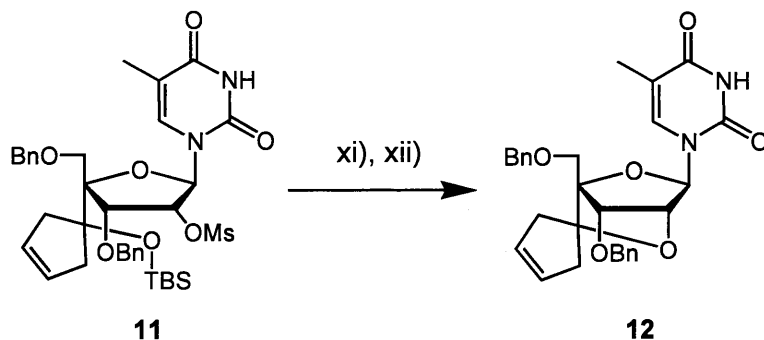
50

【 0 1 4 4 】

(1 - 8) 化合物 1 2 の合成

【 0 1 4 5 】

【化 2 8】



【 0 1 4 6 】

アルゴン雰囲気下にて、上記で得られた化合物 1 1 (9 9 2 m g , 1 . 3 9 m m o l) の脱水テトラヒドロフラン溶液 (1 3 . 9 m L) にテトラブチルアンモニウムフルオリドのテトラヒドロフラン溶液 (4 . 1 8 m L , 4 . 1 8 m m o l) を 0 ° C で加え、室温で 3 0 時間攪拌した。反応が終了した後、水を加え、有機層を酢酸エチルで抽出した。有機層を水および飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を減圧留去した。得られた残渣を精製することなく、この残渣の N , N - ジメチルホルムアミド溶液 (1 3 . 9 m L) に炭酸カリウム (5 7 7 m g , 4 . 1 7 m m o l) を 0 ° C で加え、9 0 ° C で 2 0 時間攪拌した。反応が終了した後、水を加え、有機層をジエチルエーテルで抽出した。有機層を水および飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (S i O ₂ , ヘキサン : 酢酸エチル = 4 : 1 から 1 : 2) により精製し、化合物 1 2 (5 8 3 m g , 8 3 % (2 工程)) を白色固体として得た。

【 0 1 4 7 】

得られた化合物 1 2 の物性データを表 8 に示す。

【 0 1 4 8 】

【表 8】

得られた化合物 1 2 の物性データ
¹ H NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ 8.47 (s, 1H), 7.55 (s, 1H), 7.25-7.33 (m, 10 H), 5.63-5.67 (m, 2H), 5.55 (s, 1H), 4.65 (d, <i>J</i> = 11.3 Hz, 1H), 4.61 (s, 2 H), 4.51 (d, <i>J</i> = 11.3 Hz, 1H), 4.51 (s, 1H), 4.05 (s, 1H), 3.87 (d, <i>J</i> = 11.0 Hz, 1H), 3.81 (d, <i>J</i> = 11.0 Hz, 1H), 2.94 (d, <i>J</i> = 18.2 Hz, 1H), 2.66 (s, 2H), 2.58 (d, <i>J</i> = 17.9 Hz, 1H), 1.57 (s, 3H); ¹³ C NMR (76 MHz, CDCl ₃) δ 163.8, 149.8, 137.5, 136.9, 135.1, 128.6, 128.5, 128.3, 128.1, 127.7, 127.6, 127.4, 110.0, 92.8, 88.5, 86.4, 73.9, 72.2, 64.9, 42.3, 41.5, 12.2; HRMS (M ALDI) C ₂₉ H ₃₀ N ₂ O ₆ Na [M+Na] ⁺ としての計算値: 525.1996, 実測値 525.1997.

【 0 1 4 9 】

(1 - 9) 化合物 1 3 の合成

【 0 1 5 0 】

10

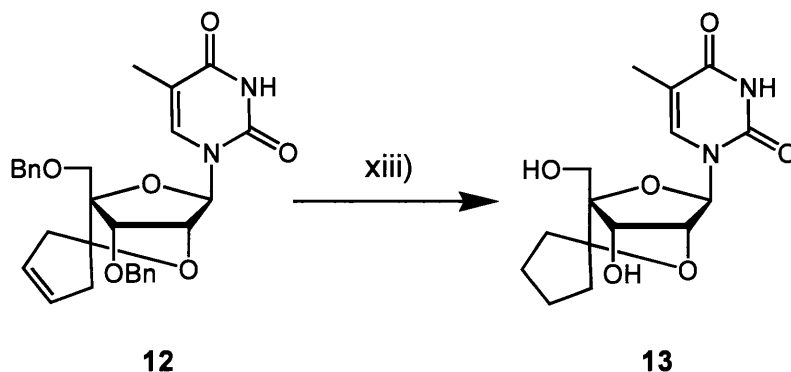
20

30

40

50

【化 29】



10

【0151】

水素ガス雰囲気下にて、上記で得られた化合物12（110mg，0.219mmol）の酢酸エチル溶液（2.15mL）に20%水酸化パラジウム／カーボン（44mg，40重量部（化合物12（100重量部）に対して））を室温に加え、数回フラスコ内を水素ガスで置換しながら室温で0.5時間撹拌した。反応が終了した後、ろ過し、酢酸エチルで洗浄した。次いで、溶媒を減圧留去し、得られた残渣をPLCプレート（SiO₂，クロロホルム：メタノール＝7：1）により精製し、化合物13（57mg，80%）を白色固体として得た。

20

【0152】

得られた化合物13の物性データを表9に示す。

【0153】

【表9】

得られた化合物13の物性データ
¹ H NMR (300 MHz, CD ₃ OD) δ 7.78 (d, <i>J</i> = 1.4 Hz, 1H), 5.46 (s, 1H), 4.24 (s, 1H), 4.16 (s, 1H), 3.96 (d, <i>J</i> = 12.7 Hz, 1H), 3.88 (d, <i>J</i> = 12.7 Hz, 1H), 1.44–2.11 (m, 8H), 1.88 (d, <i>J</i> = 1.0 Hz, 3H); ¹³ C NMR (76 MHz, CD ₃ OD) δ 168.8, 153.6, 137.0, 110.6, 95.5, 91.3, 87.7, 81.6, 72.4, 57.5, 36.8, 36.3, 26.5, 24.4, 13.0; HRMS (MALDI) C ₁₅ H ₂₀ N ₂ O ₆ Na [M+Na] ⁺ としての計算値: 347.1214, 実測値 347.1209.

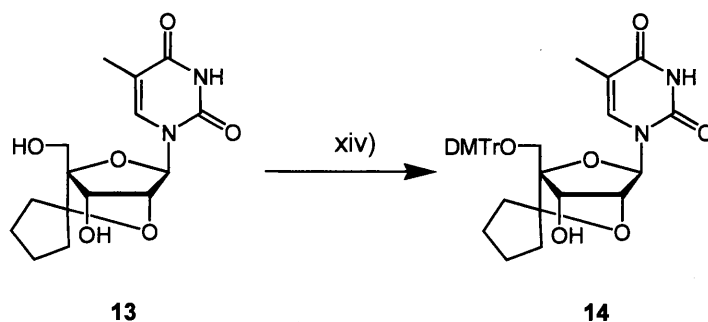
30

【0154】

(1-10) 化合物14の合成

【0155】

【化30】



40

【0156】

アルゴン雰囲気下にて、上記で得られた化合物13（170mg，0.524mmol）の無水ピリジン溶液（5.3mL）に4,4'-ジメトキシトリチルクロリド（320mg，0.944mmol）を0℃に加え、室温で8時間撹拌した。反応が終了した後、飽

50

和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、有機層を酢酸エチルで抽出した。有機層を水および飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を減圧下で留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ SiO_2 ，1%トリエチルアミン含有、ヘキサン：酢酸エチル＝4：1から1：4）により精製し、化合物14（329mg，定量的）を白色固体として得た。

【0157】

得られた化合物14の物性データを表10に示す。

【0158】

【表10】

得られた化合物14の物性データ
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.94 (s, 1H), 7.67 (s, 1H), 7.48 (d, J = 6.9 Hz, 2H), 7.24–7.49 (m, 7H), 6.86 (d, J = 8.6 Hz, 4H), 5.56 (s, 1H), 4.39 (s, 1H), 4.29 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 3.80 (s, 6H), 3.56 (d, J = 11.0 Hz, 1H), 3.49 (d, J = 11.0 Hz, 1H), 2.37 (d, J = 6.2 Hz, 1H), 1.96–2.09 (m, 1H), 1.45–1.93 (m, 6H), 1.68 (s, 3H), 1.26–1.37 (m, 1H); ^{13}C NMR (76 MHz, CDCl_3) δ 163.9, 158.6, 149.8, 144.4, 135.4, 135.3, 134.8, 130.0, 128.0, 127.1, 113.3, 110.2, 94.2, 89.6, 86.9, 86.2, 80.0, 73.0, 58.6, 55.2, 35.9, 35.8, 25.7, 23.4, 12.5; HRMS (MALDI) $\text{C}_{36}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ としての計算値: 649.2520, 実測値 649.2526.

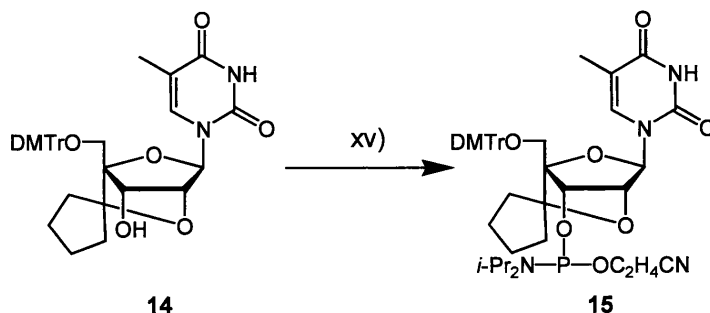
10

【0159】

(1-11) 化合物15の合成

【0160】

【化31】



30

【0161】

アルゴン雰囲気下、上記で得られた化合物14（329mg，0.525mmol）の無水ジクロロメタン溶液（5.3mL）にN，N-ジイソプロピルエチルアミン（275μL，1.61mmol）と2-シアノエチル-N，N-ジイソプロピルホスホロクロリダート（175μL，0.784mmol）を0℃で順次加え、室温で8時間撹拌した。反応が終了した後に溶媒を減圧留去し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ SiO_2 ，1%トリエチルアミン含有、ヘキサン：酢酸エチル＝4：1から2：1）と再沈殿（トルエン／ヘキサン）により精製し、化合物15（252mg，58%）を白色固体として得た。

40

【0162】

得られた化合物15の物性データを表11に示す。

【0163】

50

【表 1 1】

得られた化合物 1 5 の物性データ
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.37 (s, 1H), 7.73 (s, 1H), 7.46 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H), 7.24–7.37 (m, 7H), 6.82–6.88 (m, 4H), 5.89 (s, 1/2H), 5.58 (s, 1/2 H), 4.52 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 4.37 (dd, $J = 9.3, 16.1$ Hz, 1H), 3.81 (s, 6/2 H), 3.80 (s, 6/2H), 3.46–3.54 (m, 4H), 2.54–2.78 (m, 1H), 2.37 (dd, $J = 5.9, 12.0$ Hz, 1H), 1.93–2.07 (m, 1H), 1.60–1.89 (m, 4H), 1.65 (s, 3/2H), 1.63 (s, 3/2H), 1.41–1.55 (m, 2H), 1.25–1.29 (m, 3H), 1.16 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H), 1.12 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H), 1.07 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H), 0.98 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H); ^{31}P NMR (122 MHz, CDCl_3) δ 149.1, 148.7; HRMS (MALDI) $\text{C}_{45}\text{H}_{55}\text{N}_4\text{O}_9\text{NaP}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ としての計算値: 849.3599, 実測値 849.3658.

10

【0 1 6 4】

上記化合物 1 から化合物 1 5 を得るまでの一連の合成経路を通じて、最終的に得られた化合物 1 5 の総収率は 2 2 % であった。これは、例えば特許文献 1 および非特許文献 5 に記載される架橋型ヌクレオシド (s c p BNA) の合成経路で得られる最終生成物の総収率 (1 8 %) と比較して、高い値であり、本実施例の架橋型ヌクレオシドが効率良く合成できたことがわかる。

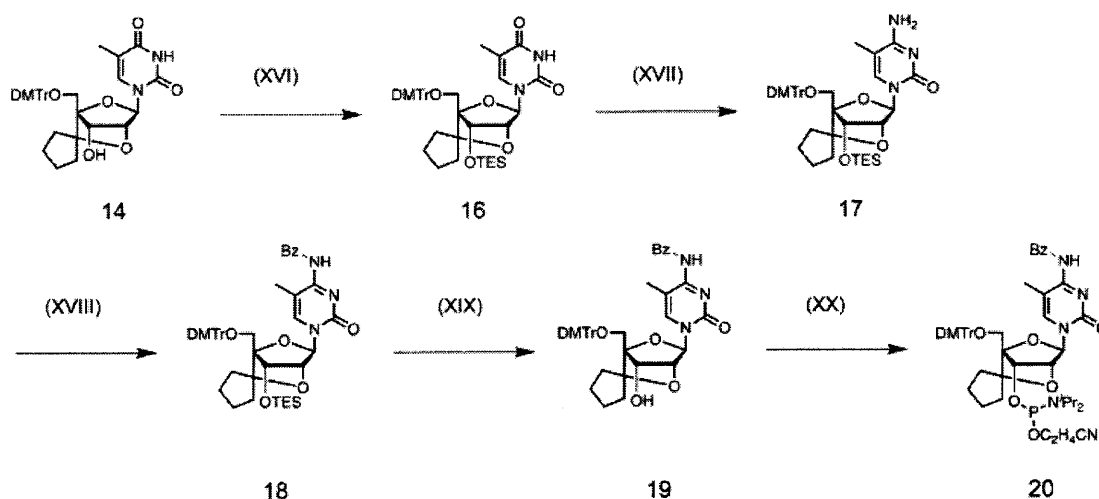
【0 1 6 5】

(実施例 2 : 架橋型ヌクレオシドの合成 (2))

【0 1 6 6】

20

【化 3 2】



30

各工程の試薬および条件: (XVI) TESCl, ピリジン, 0℃から室温, 4 時間, 72%; (XVII) 1,2,4-トリアゾール, POCl_3 , MeCN, 0℃から室温, 50分間; NH_3 水溶液, 1,4-ジオキサン, 室温, 1.5時間, 98% (2工程); (XVIII) BzCl, ピリジン, 0℃から室温, 2.5時間, 62%; (XIX) TBAF, THF, 0℃から室温, 20分間, 定量的; (XX) $(\text{Pr}_2\text{N})_2\text{POC}_2\text{H}_4\text{CN}$, DCl, CH_2Cl_2 , 室温, 2時間, 81%.

40

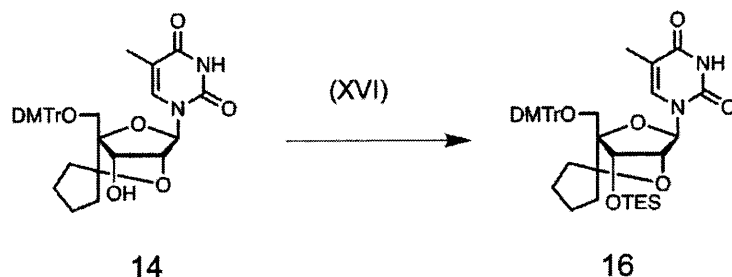
【0 1 6 7】

(2 - 1) 化合物 1 6 の合成

【0 1 6 8】

50

【化 3 3】



【0169】

窒素気流下、上記実施例 1 (1-10) で得られた化合物 14 (626 mg, 999 μ mol) の無水ピリジン溶液 (10 mL) に、クロロトリエチルシラン (0.45 mL, 3.0 mmol) を 0℃ で加え、室温で 4 時間攪拌した。反応終了後、飽和重曹水を 0℃ で加え、酢酸エチルで抽出し、水と飽和食塩水で洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥させた後、溶媒を減圧留去した。得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Si₂, n-ヘキサン：酢酸エチル = 1 : 1) で精製し、化合物 16 (531 mg, 72%) を白色泡状固体として得た。

【0170】

得られた化合物 16 の物性データを表 12 に示す。

【0171】

【表 12】

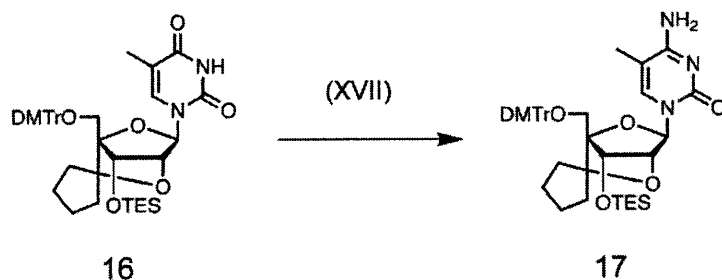
得られた化合物 16 の物性データ
¹ H NMR (500 MHz, CDCl ₃) δ 0.48–0.58 (m, 6H), 0.83–0.86 (m, 9H), 1.24–1.27 (m, 1H), 1.66 (s, 3H), 1.50–1.93 (m, 7H), 3.37 (d, J = 10.9 Hz, 1H), 3.44 (d, J = 10.9 Hz, 1H), 3.80 (s, 6H), 4.29 (s, 1H), 4.32 (s, 1H), 5.53 (s, 1H), 6.84 (d, J = 9.2 Hz, 2H), 6.84 (d, J = 9.2 Hz, 2H), 7.25–7.36 (m, 7H), 7.46 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 7.79 (d, J = 1.2 Hz, 1H), 8.22 (s, 1H); ¹³ C NMR (125.8 MHz, CDCl ₃) δ 4.7, 6.6, 12.6, 23.4, 25.5, 35.6, 35.8, 55.2, 58.5, 73.0, 80.0, 86.7, 86.8, 89.6, 94.5, 110.2, 113.2, 113.2, 127.1, 128.0, 128.1, 130.0, 130.1, 135.0, 135.3, 135.5, 144.4, 149.7, 158.7, 163.9; HRMS (MALDI) C ₄₂ H ₅₂ N ₂ O ₈ NaSi [M+Na] ⁺ としての計算値: 763.3391, 実測値 763.3369.

【0172】

(2-2) 化合物 17 の合成

【0173】

【化 3 4】



【0174】

窒素気流下、上記で得られた化合物 16 (329 mg, 444 μ mol) とトリエチルアミン (1.1 mL, 8 mmol)、1, 2, 4-トリアゾール (537 mg, 7.8 mmol) の無水アセトニトリル溶液 (4.8 mL) に、塩化ホスホリル (136 μ L, 1

． 5 mmol) を 0℃ で滴下した。室温で 1 時間攪拌した後、反応溶液に飽和重曹水を加え、酢酸エチルで抽出し、水と飽和食塩水で洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥させた後、溶媒を減圧留去した。得られた残渣の 1, 4-ジオキサン溶液 (2.0 mL) に、28 重量% アンモニア水溶液 (500 μL, 7.3 mmol) を 0℃ で加え、室温で 1.5 時間攪拌した。反応終了後、溶媒を減圧留去した。得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (SiO₂, クロロホルム：メタノール = 20 : 1) で精製し、化合物 17 (322 mg, 98%, 2 工程) を白色泡状固体として得た。

【0175】

得られた化合物 17 の物性データを表 13 に示す。

【0176】

【表 13】

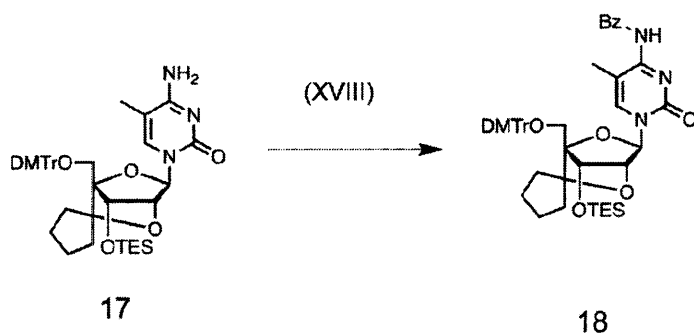
得られた化合物 17 の物性データ
¹ H NMR (500 MHz, CDCl ₃) δ 0.45–0.55 (m, 6H), 0.81–0.84 (m, 9H), 1.22–1.26 (m, 1H), 1.43–1.92 (m, 7H), 1.68 (s, 3H), 3.36 (d, <i>J</i> = 10.9 Hz, 1H), 3.44 (d, <i>J</i> = 10.9 Hz, 1H), 3.80 (s, 6H), 4.30 (s, 1H), 4.38 (s, 1H), 5.60 (s, 1H), 6.84 (d, <i>J</i> = 8.9 Hz, 2H), 6.85 (d, <i>J</i> = 8.9 Hz, 2H), 7.22–7.38 (m, 7H), 7.48 (d, <i>J</i> = 7.5 Hz, 2H), 7.84 (s, 1H); ¹³ C NMR (125.8 MHz, CDCl ₃) δ 4.7, 6.6, 13.2, 23.4, 25.6, 35.5, 35.8, 55.2, 58.7, 72.9, 80.0, 86.6, 87.3, 89.2, 94.2, 101.0, 113.1, 113.2, 127.0, 127.9, 128.1, 130.0, 130.1, 135.5, 135.6, 138.0, 144.6, 155.5, 158.6, 165.6; HRMS (MALDI) C ₄₂ H ₅₃ N ₃ O ₇ NaSi [M+Na] ⁺ としての計算値: 762.3550, 実測値 762.3565.

【0177】

(2-3) 化合物 18 の合成

【0178】

【化 35】



【0179】

窒素気流下、上記で得られた化合物 17 (322 mg, 0.435 mmol) の無水ピリジン溶液 (4.5 mL) に塩化ベンゾイル (100 μL, 0.86 mmol) を 0℃ で加え、室温で 2.5 時間攪拌した。反応終了後、飽和重曹水を加え、酢酸エチルで抽出し、水と飽和食塩水で洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥させた後、溶媒を減圧留去した。得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (SiO₂, n-ヘキサン：酢酸エチル = 5 : 1) で精製し、化合物 18 (229 mg, 62%) を白色泡状固体として得た。

【0180】

得られた化合物 18 の物性データを表 14 に示す。

【0181】

10

20

30

40

50

【表 1 4】

得られた化合物 1 8 の物性データ
^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 0.48–0.58 (m, 6H), 0.83–0.86 (m, 9H), 1.24–1.29 (m, 1H), 1.56 (s, 3H), 1.45–1.95 (m, 7H), 3.39 (d, $J = 10.3$ Hz, 1H), 3.47 (d, $J = 10.9$ Hz, 1H), 3.81 (s, 6H), 4.34 (s, 1H), 4.34 (s, 1H), 5.59 (s, 1H), 6.84–6.87 (m, 4H), 7.26–7.38 (m, 7H), 7.42–7.53 (m, 5H), 7.97 (s, 1H), 8.32 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (75.5 MHz, CDCl_3) δ 4.5, 6.5, 13.6, 23.3, 25.4, 35.4, 35.7, 55.1, 58.4, 72.8, 79.8, 86.6, 87.0, 89.6, 94.4, 111.2, 113.1, 113.1, 127.0, 127.9, 128.0, 129.7, 129.9, 130.0, 132.3, 135.2, 135.3, 136.1, 137.0, 144.3, 147.4, 158.6, 159.7, 179.4; HRMS (MALDI) $\text{C}_{49}\text{H}_{57}\text{N}_3\text{O}_8\text{NaSi}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ としての計算値: 866.3813, 実測値 838.3809.

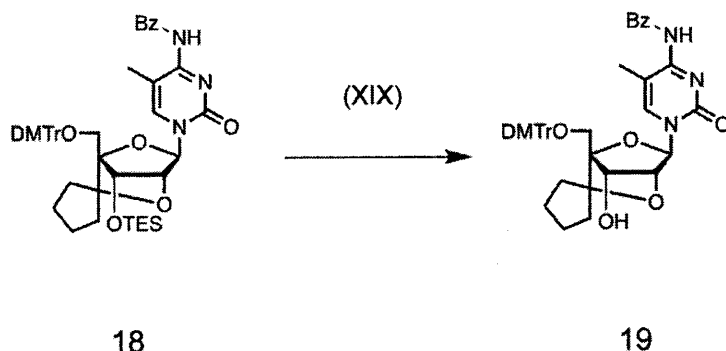
10

【0 1 8 2】

(2 – 4) 化合物 1 9 の合成

【0 1 8 3】

【化 3 6】



20

【0 1 8 4】

上記で得られた化合物 1 8 (108 mg, 121 μmol) のテトラヒドロフラン溶液 (1.2 mL) に 1 M のテトラブチルアンモニウムフルオリド／テトラヒドロフラン溶液 (120 μL , 120 μmol) を 0℃ 加え、室温で 20 分間攪拌した。反応終了後、溶媒を減圧留去した。得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (SiO_2 , クロロホルム：メタノール = 20 : 1) により精製し、化合物 1 9 (101 mg, 定量的) を白色泡状固体として得た。

30

【0 1 8 5】

得られた化合物 1 9 の物性データを表 1 5 に示す。

【0 1 8 6】

【表 1 5】

得られた化合物 1 9 の物性データ
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 1.25–1.34 (m, 1H), 1.60–2.06 (m, 7H), 1.89 (s, 3H), 3.55 (s, 2H), 3.82 (s, 6H), 4.30 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 4.40 (s, 1H), 5.61 (s, 1H), 6.88 (d, $J = 8.9$ Hz, 4H), 7.24–7.56 (m, 12H), 7.85 (s, 1H), 8.32 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (75.5 MHz, CDCl_3) δ 13.5, 23.3, 25.6, 35.6, 35.8, 55.1, 58.5, 72.6, 79.8, 86.5, 86.8, 89.6, 94.1, 111.2, 113.2, 127.0, 127.9, 129.7, 129.9, 132.4, 135.3, 135.3, 136.2, 136.8, 144.4, 147.5, 158.5, 159.7, 179.4; HRMS (MALDI) $\text{C}_{43}\text{H}_{43}\text{N}_3\text{O}_8\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ としての計算値: 752.2948, 実測値 724.2939.

40

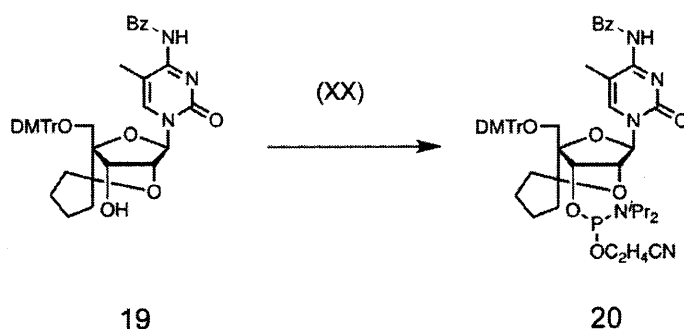
【0 1 8 7】

(2 – 5) 化合物 2 0 の合成

50

【0188】

【化37】



10

【0189】

窒素気流下、上記で得られた化合物19 (71 mg, 97.3 μmol) の無水アセトニトリル溶液 (980 μL) に2-シアノエチルN, N, N', N'-テトライソプロピルホスホジアミダイト (95 μL , 295 μmol)、4, 5-ジシアノイミダゾール (35 mg, 290 μmol) を0℃で加え、室温で2時間攪拌した。反応終了後、溶媒を減圧留去した。得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (SiO₂, 1% トリエチルアミン含有n-ヘキサン：酢酸エチル=3:1) で精製し、化合物20 (73 mg, 81%) を白色泡状固体として得た。

20

【0190】

得られた化合物20の物性データを表16に示す。

【0191】

【表16】

得られた化合物20の物性データ
¹ H NMR (500 MHz, CDCl ₃) δ 0.98 (d, J = 6.9 Hz, 2H), 1.07 (d, J = 6.3 Hz, 4H), 1.12 (d, J = 6.9 Hz, 2H), 1.15 (d, J = 6.9 Hz, 4H), 1.26–2.05 (m, 8H), 1.77 (s, 2H), 1.83 (s, 1H), 2.34–2.37 (m, 3/2H), 2.51–2.63 (m, 1/2H), 3.47–3.56 (m, 6H), 3.81 (s, 2H), 3.82 (s, 4H), 4.38 (d, J = 7.4 Hz, 1/4H), 4.42 (d, J = 9.2 Hz, 3/4H), 4.56 (s, 3/4H), 4.58 (s, 1/4H), 5.63 (s, 1H), 6.84–6.89 (m, 4H), 7.28–7.52 (m, 12H), 7.89 (s, 1/4H), 7.91 (s, 3/4H), 8.31 (d, J = 7.5 Hz, 2H); ³¹ P NMR (161.8 MHz, CDCl ₃) δ 148.9, 149.4; HRMS (MALDI) C ₅₂ H ₆₀ N ₅ O ₉ NaP [M+Na] ⁺ としての計算値: 952.4026, 実測値 952.4090.

30

【0192】

(実施例3) オリゴヌクレオチドの合成および精製 (1)

実施例1で作製された化合物15 (scpBNA2nd-T) をアミダイトブロックとして用い、以下のようにしてオリゴヌクレオチドを合成した。オリゴヌクレオチドを構成する化合物15以外の化合物は、特に表記がない限り、Proligo社から購入した。以下のオリゴヌクレオチドを合成した。

40

ON1: 5' - d (G C G T T Y T T T G C T) - 3' (配列番号1)

ON2: 5' - d (G C G Y T Y T Y T G C T) - 3' (配列番号2)

ON3: 5' - d (G C G T Y Y Y Y T G C T) - 3' (配列番号3)

ON4: 5' - d (G C G Y Y Y Y Y Y G C T) - 3' (配列番号4)

ON5: 5' - d (T T T T T T T T T Y) - 3'

ON6: 5' - d (T T T T T T T T Y T) - 3'

Y = 化合物15 (scpBNA2nd-T)

【0193】

実施例1で作製された化合物15から、各々0.1 Mの無水アセトニトリルまたは無水ジクロロメタン溶液として調製し、GeneDesign社製nS-8 Oligonu

50

c l e o t i d e s S y n t h e s i z e r に仕込んだ。各合成をトリチルオン条件で行った。活性化剤には A c t i v a t o r - 4 2 (登録商標) (P r o l i g o 社製) (0.25 M アセトニトリル溶液) を用い、縮合時間は化合物 1 5 を 1 5 0 秒 × 5 に延長した。その他の操作については通常のホスホロアミダイト法に従って合成を行った。

【0194】

合成完了後、生成物を、28%アンモニア水溶液を用いて室温下で1.5時間処理してカラム担体からの切り出しを行い、次いで55℃で10時間静置することで塩基部の脱保護を行った。その後、簡易逆相カラム (W a t e r s 社製 S e p - P a k (登録商標) P l u s C 1 8 C a r t r i d g e s) により精製し、さらに逆相 H P L C にて精製を行った。

【0195】

精製したオリゴヌクレオチドの組成を M A L D I - T O F M S 測定により決定した。当該測定にあたり、まず、3-ヒドロキシピコリン酸水溶液 (10 mg/mL) とクエン酸二アンモニウム水溶液 (1 mg/mL) とを 1 : 1 の容量比で混合したマトリックス (1 μL) を乾燥させたアンカーチップ上に、オリゴヌクレオチド水溶液 (50 μM, 1 μL) を載せて再度乾燥させ、その後 M A L D I - T O F M S 測定を行った。分子量の測定をネガティブモードで行い、オリゴチミジル酸 (7mer、9mer、11mer および 13mer) を外部標準として用いた。また、合成したオリゴヌクレオチドの定量を、吸光度測定装置 (株式会社島津製作所製 S H I M A D Z U U V - 1 8 0 0) を用いて 260 nm における紫外吸収を測定することで行った。

【0196】

この結果を以下の表 17 に示す。

【0197】

【表 17】

ID	オリゴヌクレオチド配列	収率 (%)	MALDI-TOF-MS (Mw.)	
			算出 [M-H] ⁻	実測 [M-H] ⁻
ON1	5'-d(GCGTTYTTTGCT)-3'	36	3714.5	3714.6
ON2	5'-d(GCGYTYTYTGCT)-3'	50	3878.7	3879.4
ON3	5'-d(GCGTYYYTTGCT)-3'	29	3878.7	3879.1
ON4	5'-d(GCGYYYYYYGCT)-3'	17	4125.0	4125.2
ON5	5'-d(TTTTTTTTTY)-3'	19	3061.1	3060.5
ON6	5'-d(TTTTTTTTTYT)-3'	38	3061.1	3060.7

【0198】

(実施例 4) 二重鎖形成能の評価

ON1 ~ ON4 について二重鎖形成能を調べた。対照として、天然 DNA を用いた 5' - d (G C G T T T T T T G C T) - 3' (「ON9」: 配列番号 5) もまた用いた。標的鎖として一本鎖オリゴ RNA 5' - r (A G C A A A A A C G C) - 3' (配列番号 6) および一本鎖オリゴ DNA 5' - d (A G C A A A A A C G C) - 3' (配列番号 7) を用いた。

【0199】

オリゴヌクレオチドの二重鎖形成能を、各種オリゴヌクレオチドと標的鎖とをアニーリング処理して二重鎖を形成させた後、T_m値を測定することにより調べた。より詳細には

、各オリゴヌクレオチド（終濃度 $4 \mu\text{M}$ ）と塩化ナトリウム（終濃度 100mM ）のリン酸緩衝液（ 10mM ， $\text{pH} 7.2$ ， $130 \mu\text{L}$ ）の混合液を沸騰水中に浴し、室温までゆっくり冷却した。その後、窒素気流下で 5°C まで冷却し、測定を開始した。 $0.5^\circ\text{C}/\text{分}$ で 90°C または 110°C まで昇温し、 0.5°C 間隔で 260nm における吸光度をプロットした。 T_m 値を中線法により算出し、独立した 3 回の測定における平均値とした。

【0200】

表 18 に結果を示す。表 18 中、一本鎖オリゴ RNA に対する結果を「ssRNA」、一本鎖オリゴ DNA に対する結果を「ssDNA」に示し、そして各オリゴヌクレオチドの人工修飾核酸 1 塩基当たりの T_m 変動温度（「 $\Delta T_m/\text{mod.}$ 」）と RNA 選択性（RNA に対する融解温度と DNA に対する融解温度との差）を示す。

【0201】

【表 18】

オリゴヌクレオチド配列		$T_m [\Delta T_m/\text{mod.} = T_m [\text{修飾}] - T_m [\text{天然}]] (^\circ\text{C})$		RNA 選択性
ID	5'-ON-3'	ssDNA	ssRNA	$T_m (\text{RNA}) - T_m (\text{DNA}) (^\circ\text{C})$
ON9	GCGTTTTTTGCT	51	47	-4
ON1	GCGTTYTTTGCT	52 (+1.0)	53 (+6.0)	+1
ON2	GCGYTYTYTGCT	55 (+1.3)	63 (+5.3)	+8
ON3	GCGTYYTGTCT	53 (+0.7)	62 (+5.0)	+9
ON4	GCGYYYYYTGCT	62 (+1.8)	79 (+5.3)	+17

【0202】

化合物 15 を用いた場合、一本鎖オリゴ DNA および一本鎖オリゴ RNA の両方とも、天然のオリゴヌクレオチド（ON9）と比べて高い融解温度を示した。さらに、化合物 15 を用いた場合、特に一本鎖オリゴ RNA に対して天然のオリゴヌクレオチド（ON9）と比べて T_m 値が上昇し、よって、一本鎖オリゴ RNA に対する高い結合親和性を示した。また、化合物 15 を用いた場合、RNA 選択性が見られた。

【0203】

（実施例 5）ヌクレアーゼ耐性能の評価

ON5 および以下の 10mer の配列のオリゴヌクレオチドを合成および精製し、被験オリゴヌクレオチドとして用いた：

5' - d (TTTTTTTTTTX) - 3'

(1) X = 化合物 15 (ON5: 「scpBNA2nd-T」)

(2) X = ホスホロチオエートチミジン (「PST」: ホスホロチオエート化に関しては、 0.05M の (ジメチルアミノ-メチリデン) アミノ - 3H-1, 2, 4-ジチアゾリン-3-チオン (DDTT) (ピリジン/アセトニトリル (3:2) 溶液、GLENN RESEARCH 社) を用いた。)

(3) X = スピロシクロプロピレン BNA (特許文献 1 および非特許文献 5: 「scpBNA-T」)

【0204】

$7.5 \mu\text{M}$ 被験オリゴヌクレオチドと 10mM 塩化マグネシウムを含む 50mM トリス塩酸緩衝液 ($\text{pH} 8.0$) に、 $1.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ の 3'-エキソヌクレアーゼ (Crotalus adamanteus venom phosphodiesterase, CAVP) を加え、 37°C でインキュベートした。インキュベーションの開始時 (0 分)、2.5 分後、5 分後、10 分後、20 分後、40 分後にそれぞれ $20 \mu\text{L}$ ずつ試料を取り出し、逆相 HPLC で解析し、未切断のオリゴヌクレオチドの割合を算出した。また、評価は独立した 3 回の測定により導き出した。

【0205】

結果を図1に示す。図1中、黒菱形は上記(1)の結果を表し、黒丸は上記(2)の結果を表し、そして黒三角は上記(3)を表す。図1から明らかなように、化合物15を有するオリゴヌクレオチド(上記(1))は、ヌクレアーゼ処理の40分後でも約70%が未切断で残存しており、分解されにくかった。化合物15を有するオリゴヌクレオチド(上記(1))では、ホスホロチオエート化(PS)オリゴ(上記(2))およびスピロシクロプロピレンBNAを有するオリゴヌクレオチド(上記(3))と比べて非常に高いヌクレアーゼ耐性がみられた。

【0206】

(実施例6)オリゴヌクレオチドの合成および精製(2)

実施例1で作製された化合物15(scpBNA2nd-T)と実施例2で作製された化合物20(scpBNA2nd-MeC)をアミダイトブロックとして用い、実施例3と同様にして表19に示すオリゴヌクレオチドを合成した。なお、ホスホロチオエート化に関しては、0.05Mの((ジメチルアミノ-メチリデン)アミノ)-3H-1,2,4-ジチアゾリン-3-チオン(DDTT)(ピリジン/アセトニトリル(3:2)溶液、GLEN RESEARCH社)を用いた。得られたオリゴヌクレオチドであるONs21、ONs22、ONs23およびONd1の配列をそれぞれ配列番号8~11にも示す。

【0207】

【表19】

ID	配列 (5'-3')	収率	算出 [M-H] ⁻	実測 [M-H] ⁻
ONs21	<u>MeC</u> [^] <u>T</u> [^] <u>A</u> [^] <u>g</u> [^] <u>t</u> [^] <u>t</u> [^] <u>c</u> [^] <u>a</u> [^] <u>c</u> [^] <u>t</u> [^] <u>g</u> [^] <u>a</u> [^] <u>a</u> [^] <u>T</u> [^] <u>G</u> [^] <u>MeC</u>	11%	5504.7	5504.8
ONs22	<u>MeC</u> [^] <u>T</u> [^] <u>A</u> [^] <u>g</u> [^] <u>t</u> [^] <u>t</u> [^] <u>c</u> [^] <u>a</u> [^] <u>c</u> [^] <u>t</u> [^] <u>g</u> [^] <u>a</u> [^] <u>a</u> [^] <u>T</u> [^] <u>G</u> [^] <u>MeC</u>	25%	5424.8	5425.9
ONs23	<u>MeC</u> [^] <u>T</u> [^] <u>A</u> [^] <u>g</u> [^] <u>t</u> [^] <u>t</u> [^] <u>c</u> [^] <u>a</u> [^] <u>c</u> [^] <u>t</u> [^] <u>g</u> [^] <u>a</u> [^] <u>a</u> [^] <u>T</u> [^] <u>G</u> [^] <u>MeC</u>	15%	5456.8	5457.0
ONd1	<u>G</u> [^] <u>T</u> [^] <u>T</u> [^] <u>a</u> [^] <u>t</u> [^] <u>g</u> [^] <u>c</u> [^] <u>a</u> [^] <u>c</u> [^] <u>a</u> [^] <u>c</u> [^] <u>MeC</u> [^] <u>T</u> [^] <u>A</u>	19%	4747.1	4747.1

大文字 = 2', 4'-BNA/LNA, 下線を付した大文字 = scpBNA-2nd, 小文字 = DNA

[^] = ホスホロチオエート化 (PS)

【0208】

(実施例7)毒性低減効果の評価

6週齢のマウス(C57BL/6J、雄)の腹腔内に、表20に示す被験オリゴヌクレオチド(20mg/kg)を投与した(5匹/群)。96時間後、吸入麻酔下(イソフルラン)で採血を行い、放血安楽死させた。その後、血清中のアスパラギン酸トランスアミナーゼ(AST)およびアラントランスアミナーゼ(ALT)の活性を自動分析装置(FUJIFILM製 富士ドライケム4000V)により測定した。

【0209】

なお、表20に示す被験オリゴヌクレオチドについて、ONd1(配列番号11)は、実施例1で作製された化合物15(scpBNA2nd-T)をアミダイトブロックとして用い、実施例6と同様にして作製した。ONd0(配列番号12)は、化合物15(scpBNA2nd-T)をアミダイトブロックに含まない以外はONd1と同様にして作製した。

【0210】

10

20

30

40

50

【表 2 0】

被験オリゴヌクレオチド：

ID	配列 (5'-3')
ONd0	G [^] T [^] T [^] a [^] t [^] g [^] c [^] c [^] a [^] c [^] c [^] MeC [^] T [^] A
ONd1	G [^] <u>I</u> [^] <u>I</u> [^] a [^] t [^] g [^] c [^] c [^] a [^] c [^] c [^] MeC [^] <u>I</u> [^] A

大文字 = 2', 4'-BNA/LNA, 下線を付した大文字 = scpBNA-2nd, 小文字 = DNA

^ = ホスホロチオエート化 (PS)

10

【0 2 1 1】

表 2 1 は、被験オリゴヌクレオチドを投与した場合ならびに生理食塩水投与の場合の血液中のアスパラギン酸トランスアミナーゼ (AST) およびアラニントランスアミナーゼ (ALT) の活性を示す。肝毒性を示すことが知られている ONd0 を投与した群では、マウスが 5 匹全て死亡した。一方で、ONd0 の配列の一部を本発明にて置換した ONd1 は、ほとんど ALT と AST の上昇を示しておらず、毒性の低減効果が確認された。

【0 2 1 2】

【表 2 1】

ID	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	備考
生理食塩水	22.8 ± 1.6	73.8 ± 37.5	—
ONd0	—	—	5匹全て死亡
ONd1	73.2 ± 65.3	200.2 ± 160.9	—

20

ALT/AST値：平均 ± SD.

【0 2 1 3】

(実施例 8) アンチセンス活性の評価

実施例 1 で作製された化合物 15 (scpBNA2nd-T) と実施例 2 で作製された化合物 20 (scpBNA2nd-MeC) を含むオリゴヌクレオチド (ONs21、ONs22、ONs23：実施例 6 にて作製) と、化合物 15 と化合物 20 に代えて LNA を含むオリゴヌクレオチド (ONs01) とについて、各組織におけるアンチセンス活性を調べた。

【0 2 1 4】

これらの 4 つのオリゴヌクレオチドの塩基配列は、MALAT1 に対するアンチセンス核酸として設計した。ONs01 は、化合物 15 と化合物 20 に代えて LNA をアミダイトブロックとして用い、実施例 3 と同様にして合成した。ONs21、ONs22、ONs23 および ONs01 の配列を以下の表 2 2 に示す。

40

【0 2 1 5】

50

【表 2 2】

ID	配列(5'-3')	
ONs01	MeC [^] T [^] A [^] g [^] t [^] t [^] c [^] a [^] c [^] t [^] g [^] a [^] aT [^] G [^] Me [^] C	(配列番号 1 3)
ONs21	<u>MeC[^]T[^]A[^]g[^]t[^]t[^]c[^]a[^]c[^]t[^]g[^]a[^]aT[^]G[^]Me[^]C</u>	(配列番号 8)
ONs22	<u>MeCTA[^]g[^]t[^]t[^]c[^]a[^]c[^]t[^]g[^]a[^]aTG[^]Me[^]C</u>	(配列番号 9)
ONs23	<u>MeCTA[^]g[^]t[^]t[^]c[^]a[^]c[^]t[^]g[^]a[^]aTG[^]Me[^]C</u>	(配列番号 1 0)

大文字 = 2', 4'-BNA/LNA, 下線を付した大文字 = scpBNA-2nd, 小文字 = DNA

^ = ホスホロチオエート化 (PS)

【0 2 1 6】

6週齢のマウス (BALB/cAnNCrLCrLj、雌) の尾静脈に、被験オリゴヌクレオチド (20 nmol : 100 μM 生理食塩水溶液を 200 μL) を投与した (5匹/群)。72時間後、吸入麻酔下 (イソフルラン) で採血を行い、放血安楽死させた。その後、各組織を採取し、RNA抽出 (使用キット: RNeasy) を行った。各組織におけるMALAT1のmRNA発現量をリアルタイムPCR (使用キット: One Step TB Green (登録商標) PrimeScript™ RT-PCR Kit (Perfect Real Time)、タカラバイオ株式会社製) により測定した。リアルタイムPCRでは、以下のプライマーを使用した: MALAT1 forward: a c a t t c c t t g a g g t c g g c a a (配列番号 14) MALAT1 reverse: c a c c c g c a a a g g c c t a c a t a (配列番号 15) GAPDH forward: t c a c c a c c a t g g a g a a g g c (配列番号 16) GAPDH reverse: g c t a a g c a g t t g g t g g t g c a (配列番号 17)

【0 2 1 7】

結果を図2および図3に示す。図2および図3は、各種オリゴヌクレオチド投与時のマウスの各種組織における相対的MALAT1発現レベルを示す (図2: 肝臓、心臓、腎臓、脾臓、骨格筋、肺および胃、ならびに図3: 脾臓、皮膚、大腸、脳、乳腺、眼球および軟骨)。「相対的MALAT1発現レベル」は、生理食塩水のみ投与 (オリゴヌクレオチドなし) の場合の発現レベルを1とした場合の相対値として表した。図2および図3中、結果を示す棒の表示を、コントロール (生理食塩水のみ投与)、化合物15と化合物20に代えてLNAを含むオリゴヌクレオチド (ONs01) および化合物15と化合物20を含むオリゴヌクレオチド (ONs21、ONs22、ONs23) の間で区別した。

【0 2 1 8】

化合物15と化合物20を含むオリゴヌクレオチド (ONs21, ONs22, ONs23) は、多くの組織において、化合物15と化合物20に代えてLNAを含むオリゴヌクレオチド (ONs01) と比較して同等かそれ以上の高い標的遺伝子抑制効果を示した。

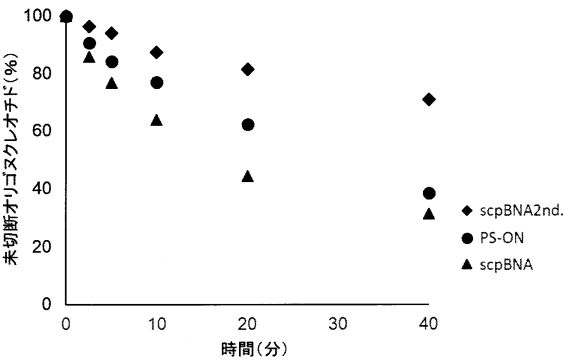
【産業上の利用可能性】

【0 2 1 9】

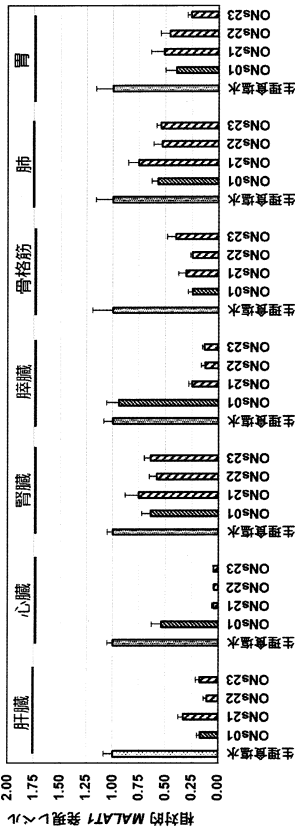
本発明によれば、ホスホロチオエート修飾核酸の代替とすることが可能な新規架橋型ヌクレオシドおよびそれを用いたヌクレオチドが提供される。本発明の架橋型ヌクレオシドを用いて得られるオリゴヌクレオチドは、例えば、核酸医薬への素材として有用である。

【図面】

【図 1】



【図 2】



10

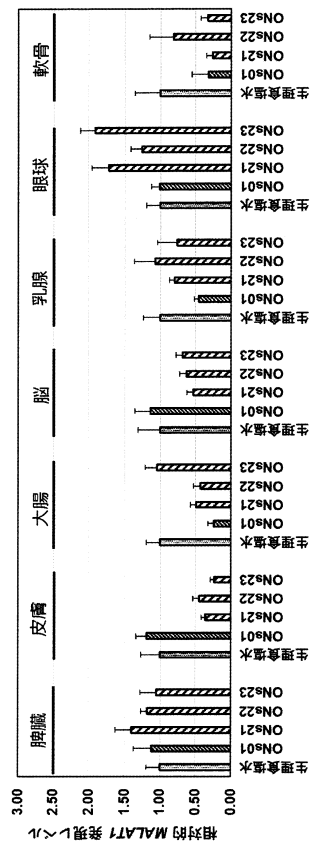
20

30

40

50

【図 3】



【配列表】

0007678994000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

- 大阪府吹田市山田丘 1 番 1 号 国立大学法人大阪大学内
(72)発明者 小峯 飛々暉
大阪府吹田市山田丘 1 番 1 号 国立大学法人大阪大学内
(72)発明者 杉浦 隆也
大阪府吹田市山田丘 1 番 1 号 国立大学法人大阪大学内
(72)発明者 井上 貴雄
神奈川県川崎市川崎区殿町三丁目 2 5 番 2 6 号 国立医薬品食品衛生研究所内
(72)発明者 吉田 徳幸
神奈川県川崎市川崎区殿町三丁目 2 5 番 2 6 号 国立医薬品食品衛生研究所内
審査官 小森 潔
(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 5 / 1 2 5 7 8 3 (WO, A 1)
国際公開第 2 0 1 8 / 1 5 5 4 5 1 (WO, A 1)
国際公開第 2 0 1 7 / 1 1 9 4 6 3 (WO, A 1)
国際公開第 2 0 2 0 / 0 2 7 2 2 7 (WO, A 1)
国際公開第 2 0 1 9 / 0 0 9 2 9 8 (WO, A 1)
国際公開第 2 0 0 9 / 0 0 6 4 7 8 (WO, A 2)
(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
C 0 7 H
C A p l u s / R E G I S T R Y (S T N)