

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2017年11月2日(02.11.2017)



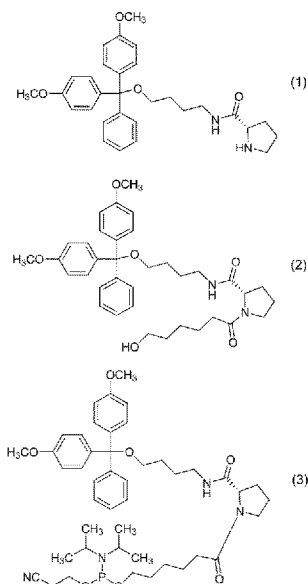
(10) 国際公開番号

WO 2017/188042 A1

- (51) 国際特許分類:
C07F 9/572 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2017/015435
- (22) 国際出願日: 2017年4月17日(17.04.2017)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2016-087783 2016年4月26日(26.04.2016) JP
- (71) 出願人: 住友化学株式会社
(SUMITOMO CHEMICAL COMPANY, LIMITED) [JP/JP]; 〒1048260 東京都中央区新川二丁目27番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 佐藤 香菜子(SATO, Kanako); 〒5550021 大阪府大阪市西淀川区歌島三丁目1番
- 21号住友化学株式会社内 Osaka (JP). 井原 秀樹 (IHARA, Hideki); 〒5550021 大阪府大阪市西淀川区歌島三丁目1番21号住友化学株式会社内 Osaka (JP).
- (74) 代理人: 中山 亨, 外(NAKAYAMA, Tohru et al.); 〒5418550 大阪府大阪市中央区北浜四丁目5番33号住友化学株式会社内 Osaka (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA,

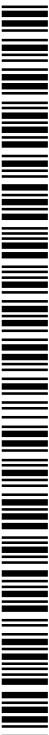
(54) Title: METHOD FOR PRODUCING MONOMER FOR SINGLE-STRANDED NUCLEIC ACID MOLECULE

(54) 発明の名称: 一本鎖核酸分子用モノマーの製造方法



(57) Abstract: A compound represented by formula (3) or an enantiomer thereof, which is a monomer that can be used for the production of a single-stranded nucleic acid molecule capable of suppressing the expression of a target gene, can be produced by: reacting a compound represented by formula (1) or an enantiomer thereof with 6-hydroxyhexanoic acid in a solvent in the presence of an additive such as 1-hydroxybenzotriazole and a condensing agent; mixing the resultant reaction mixture with water and a base such as an alkali metal hydroxide to produce a compound represented by formula (2) or an enantiomer thereof; and reacting the compound represented by formula (2) or an enantiomer thereof with 2-cyanoethyl-N,N,N',N'-tetraisopropylphosphorodiamidite in a solvent in the presence of a coupling activator such as a diisopropylaminetetrazole salt.

(57) 要約: 式(1)で示される化合物又はその鏡像異性体を溶媒中、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール等の添加剤、及び縮合剤の存在下、6-ヒドロキシヘキサン酸と反応させた後、得られた反応混合物と、水と、アルカリ金属水酸化物等の塩基とを混合して式(2)で示される化合物又はその鏡像異性体を製造し、得られた式(2)で示される化合物又はその鏡像異性体と2-シアノエチル-N,N,N',N'-テトライソプロピルホスホロジアミダイトとを、ジイソプロピルアミンテトラゾール塩等のカップリングアクチベーターの存在下、溶媒中で反応させることにより、標的遺伝子の発現を抑制可能な一本鎖核酸分子を製造するためのモノマーである式(3)で示される化合物又はその鏡像異性体を得ることができる。



WO 2017/188042 A1

RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM,
ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保
護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS,
MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ,
TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ,
DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT,
LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS,
SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

一 国際調査報告(条約第21条(3))

明 細 書

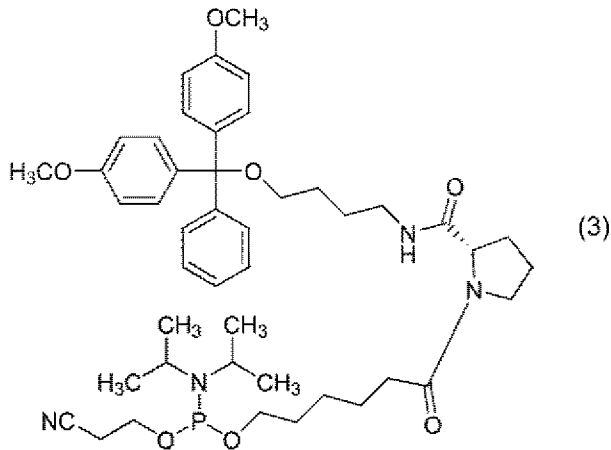
発明の名称：一本鎖核酸分子用モノマーの製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、標的遺伝子の発現を抑制可能な一本鎖核酸分子の製造に用いるモノマーの製造方法に関する。

背景技術

[0002] US 2012/0035246には標的遺伝子の発現を抑制可能な一本鎖核酸分子の製造方法が記載されており、その製造に使用するモノマーとして、実施例A3には式(3)



[0003] で示される化合物（以下、化合物(3)と記す）及びその鏡像異性体の製造が記載されている。

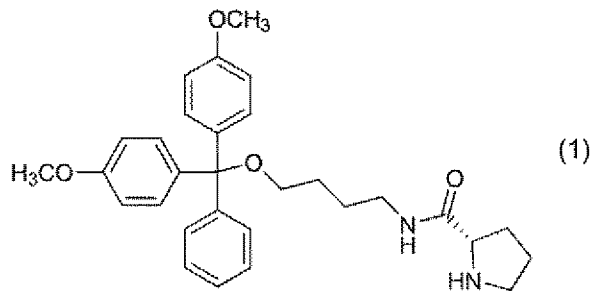
しかし、US 2012/0035246に記載の方法で得られる化合物(3)を使用した場合の一本鎖核酸分子の収量は必ずしも十分なものではなかった。

発明の概要

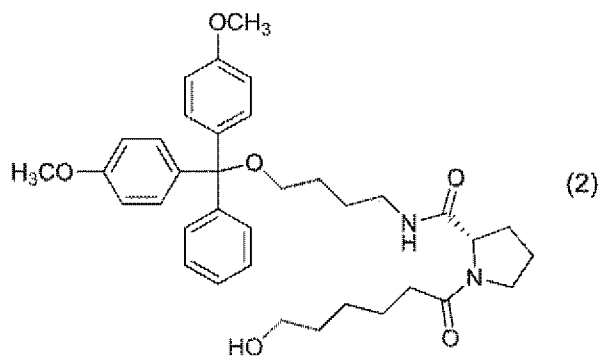
[0004] 本発明は、高い収量で一本鎖核酸分子を製造することのできる化合物(3)の製造方法を提供する。

[0005] 本発明は以下の通りである。

[1] 式(1)



[0006] で示される化合物（以下、化合物（１）と記す）又はその鏡像異性体を溶媒中、１-ヒドロキシベンゾトリアゾール、１-ヒドロキシ-７-アザベンゾトリアゾール、N-ヒドロキシコハク酸イミド、エチル（ヒドロキシイミノ）シアノアセタート、炭酸N，N'-ジスクシンイミジル、N-ヒドロキシフタルイミド、N-ヒドロキシピペリジン、３-ヒドロキシ-４-オキソ-３，４-ジヒドロ-１，２，３-ベンゾトリアジン及びN-ヒドロキシ-５-ノルボルネン-２，３-ジカルボン酸イミドからなる群より選ばれる添加剤並びに縮合剤の存在下、６-ヒドロキシヘキサン酸と反応させた後、得られた反応混合物と、水と、アルカリ金属水酸化物、アルカリ金属炭酸塩、二環式アミジン化合物、アルカリ金属アルコキシド及び第４級アンモニウム水酸化物からなる群より選ばれる塩基とを混合して式（２）



[0007] で示される化合物（以下、化合物（２）と記す）又はその鏡像異性体を製造する工程及び

前記工程で得られた式（２）で示される化合物又はその鏡像異性体と２-シアノエチル-N，N，N'，N'-テトライソプロピルホスホロジアミダイトとを、カップリングアクチベーターの存在下、溶媒中で反応させて、化合物（３）又はその鏡像異性体を得る工程

を含む化合物（3）又はその鏡像異性体の製造方法。

〔2〕 塩基がアルカリ金属水酸化物である、〔1〕に記載の製造方法。

〔3〕 縮合剤が1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド、N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド、N, N'-ジイソプロピルカルボジイミド、1, 1-カルボニルジイミダゾール、1-プロピルホスホン酸無水物環状三量体又は2-クロロ-4, 6-ジメトキシ-1, 3, 5-トリアジンである〔1〕又は〔2〕に記載の製造方法。

〔4〕 添加剤が1-ヒドロキシベンゾトリアゾール、1-ヒドロキシ-7-アザベンゾトリアゾール、N-ヒドロキシコハク酸イミド、エチル(ヒドロキシイミノ)シアノアセタート又は炭酸N, N'-ジスクシンイミジルである〔1〕～〔3〕のいずれかに記載の製造方法。

〔5〕 カップリングアクチベーターがジイソプロピルアミンテトラゾール塩、1H-テトラゾール、5-(エチルチオ)-1H-テトラゾール、5-(ベンジルチオ)-1H-テトラゾール又は4, 5-ジシアノイミダゾールである〔1〕～〔4〕のいずれかに記載の製造方法。

発明を実施するための形態

[0008] 本発明の製造方法に用いられる化合物（1）は、US 2012/0035246に記載の方法により得ることができる。より具体的には、後述の参考例4により得ることができる。

[0009] 化合物（1）を溶媒中、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール、1-ヒドロキシ-7-アザベンゾトリアゾール、N-ヒドロキシコハク酸イミド、エチル(ヒドロキシイミノ)シアノアセタート、炭酸N, N'-ジスクシンイミジル、N-ヒドロキシフタルイミド、N-ヒドロキシピペリジン、3-ヒドロキシ-4-オキソ-3, 4-ジヒドロ-1, 2, 3-ベンゾトリアジン及びN-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2, 3-ジカルボン酸イミドからなる群より選ばれる添加剤並びに縮合剤の存在下、6-ヒドロキシヘキサン酸と反応させた後、得られた反応混合物と、水と、アルカリ金属水酸化物、ア

ルカリ金属炭酸塩、二環式アミジン化合物、アルカリ金属アルコキシド及び第4級アンモニウム水酸化物からなる群より選ばれる塩基とを混合して化合物(2)を製造する工程について記載する。

- [0010] 溶媒としては、脱水縮合反応に不活性な溶媒、例えば、ジクロロメタン、クロロホルム等のハロゲン化炭化水素類、トルエン、キシレン等の芳香族炭化水素類、テトラヒドロフラン、2-メチルテトラヒドロフラン、メチルtert-ブチルエーテル、シクロペンチルメチルエーテル、1,4-ジオキサン、ジエチルエーテル等のエーテル類、アセトン、2-ブタノン、メチルイソブチルケトン等のケトン類、酢酸メチル、酢酸エチル等のエステル類、ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドン等のアミド類、1,3-ジメチル-2-イミダゾリジノン、N,N'-ジメチルプロピレン尿素等のウレア類、アセトニトリル、プロピオニトリル等のニトリル類、及びジメチルスルホキシド、スルホラン等の含硫黄化合物類が挙げられる。溶媒の使用量は、一般に化合物(1)の0.5~100重量倍である。
- [0011] 縮合剤としては、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド、1,1-カルボニルジイミダゾール、1-プロピルホスホン酸無水物環状三量体又は2-クロロ-4,6-ジメトキシ-1,3,5-トリアジン等の脱水縮合反応に用いられる縮合剤が挙げられる。
- [0012] 反応には、化合物(1)1モルに対して、添加剤が一般に0.1モル~20モルの割合、縮合剤が一般に1モル~10モルの割合で使用される。
- [0013] 反応には3級アミンを添加してもよい。3級アミンとしては、例えばトリエチルアミン及びジイソプロピルエチルアミンが挙げられる。3級アミンの添加量は、化合物(1)1モルに対して一般に0.1~30モルの割合である。
- [0014] 反応温度は、沸点が70℃以上の溶媒を用いる際は、通常10℃~70℃

の範囲内であり、沸点が70℃未満の溶媒を用いる際は、通常10℃～溶媒の還流温度の範囲内である。

- [0015] 反応時間は通常、0.5時間～150時間である。
- [0016] 反応後、水及び塩基と混合するに際し、通常、溶媒を留去して濃縮する。また、溶媒を留去して得た残渣に他の溶媒を加えた後、水及び塩基と混合してもよい。
- [0017] エーテル類、アミド類、ウレア類又はニトリル類を溶媒として用いる場合は、得られた反応混合物をそのまま又は溶媒を留去することにより濃縮して、水並びにアルカリ金属水酸化物、アルカリ金属炭酸塩、二環式アミジン化合物、アルカリ金属アルコキシド及び第4級アンモニウム水酸化物からなる群より選ばれる塩基と混合する。また、ハロゲン化炭化水素類、芳香族炭化水素類、エステル類、ケトン類又は含硫黄化合物類を溶媒として用いる場合は、得られた反応混合物の溶媒を留去することにより濃縮した残渣をエーテル類、アミド類、ウレア類又はニトリル類で希釈した後、水並びにアルカリ金属水酸化物、アルカリ金属炭酸塩、二環式アミジン化合物、アルカリ金属アルコキシド及び第4級アンモニウム水酸化物からなる群より選ばれる塩基と混合する。
- [0018] アルカリ金属水酸化物としては、例えば水酸化リチウム、水酸化ナトリウム及び水酸化カリウムが挙げられる。
- [0019] アルカリ金属炭酸塩としては、例えば炭酸ナトリウム、炭酸カリウム及び炭酸セシウムが挙げられる。
- [0020] 二環式アミジン化合物としては、例えばジアザビシウクロウンデセン、ジアザビシクロノネンが挙げられる
- アルカリ金属アルコキシドとしては、例えばナトリウムメトキシド及びカリウムtert-ブトキシドが挙げられる。
- [0021] 第4級アンモニウム水酸化物としては、例えば水酸化ベンジルトリメチルアンモニウム、水酸化トリエチルメチルアンモニウム及び水酸化トリブチルメチルアンモニウムが挙げられる。

- [0022] 塩基の使用量は、化合物（１）１モルに対して一般に０．１モル～１０モルの割合である。
- [0023] 水の使用量は、一般に化合物（１）の０．１～１０重量倍である。
化合物（１）、水及び塩基の混合順序は限定されず、塩基と水とを混合した後、化合物（１）と混合してもよい。
- [0024] 混合物は通常、０．５～１５０時間保持される。
- [0025] 沸点が７０℃以上の溶媒を用いる場合は、通常１０℃～７０℃の範囲内に混合物が保持され、沸点が７０℃未満の溶媒を用いる場合は、通常１０℃～溶媒の還流温度の範囲内で混合物が保持される。
- [0026] その後、有機溶媒で抽出し、濃縮することにより、化合物（２）を単離することができる。
- [0027] 次に、得られた化合物（２）と２-シアノエチル-N, N, N', N'-テトライソプロピルホスホロジアミダイトとを、カップリングアクチベーターの存在下、不活性な溶媒中で反応させて化合物（３）を得る工程について記載する。
- [0028] 溶媒としては、例えば、ジクロロメタン、クロロホルム等のハロゲン化炭化水素類、トルエン、キシレン等の芳香族炭化水素類、テトラヒドロフラン、２-メチルテトラヒドロフラン、メチルtert-ブチルエーテル、シクロペンチルメチルエーテル、１，４-ジオキサソラン、ジエチルエーテル等のエーテル類、アセトン、２-ブタノン、メチルイソブチルケトン等のケトン類、酢酸メチル、酢酸エチル等のエステル類、ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドン等のアミド類、１，３-ジメチル-２-イミダゾリジノン、N, N'-ジメチルプロピレン尿素等のウレア類、アセトニトリル、プロピオニトリル等のニトリル類、及びジメチルスルホキシド、スルホラン等の含硫黄化合物類が挙げられる。溶媒の使用量は、一般に化合物（２）の０．５～１００重量倍である。
- [0029] カップリングアクチベーターとは、ホスホロアミダイト法によるオリゴヌクレオチド合成に用いられるカップリングアクチベーターを意味し、例えばT

etrahedron, 69, 2013, 3615-3637に記載がある。カップリングアクチベーターの具体例は以下の (i)、(ii) 及び (iii) である。

(i) アゾールカップリングアクチベーター

1H-テトラゾール；

5-(4-ニトロフェニル)-1H-テトラゾール、5-(ビス-3,5-トリフルオロメチルフェニル)-1H-テトラゾール、5-エチルチオ-1H-テトラゾール、5-ベンジルチオ-1H-テトラゾール、5-メチルチオ-1H-テトラゾール、5-メルカプト-1H-テトラゾール等の修飾テトラゾールカップリングアクチベーター；

4,5-ジシアノイミダゾール、2-ブロモ-4,5-ジシアノイミダゾール、2-ベンジル-4,5-ジシアノイミダゾール、2-ブロモ-4,5-ジエチル-カルボキシルイミダゾール等のイミダゾールカップリングアクチベーター；

1-ヒドロキシ-ベンゾトリアゾール、6-トリフルオロメチル-1-ヒドロキシ-ベンゾトリアゾール、4-ニトロ-1-ヒドロキシ-ベンゾトリアゾール等の1-ヒドロキシベンゾトリアゾールカップリングアクチベーター；

3-ニトロトリアゾール等の3-ニトロトリアゾールカップリングアクチベーター；

(ii) 塩錯体カップリングアクチベーター

ピリジン塩酸塩、トリフルオロ酢酸ピリジン塩等のピリジニウム塩錯体カップリングアクチベーター；

ベンズイミダゾールトリフルオロ酢酸塩、N-フェニルイミダゾールトリフルオロ酢酸塩等のアゾリウム塩錯体カップリングアクチベーター；

サッカリン-1-メチルイミダゾール塩等のサッカリン塩錯体カップリングアクチベーター；

ジアルキル(シアノメチル)アンモニウムテトラフルオロボレート、ジイソプロピルアミンテトラゾール塩等のアンモニウム塩錯体カップリングアク

チベーター；

(iii) ホスホロアミダイト法によるオリゴ核酸合成に用いられるその他のカップリングアクチベーター

トリクロロ酢酸、トリフルオロ酢酸、ジクロロ酢酸、2, 4-ジニトロ安息香酸等のカルボン酸カップリングアクチベーター；

塩化鉄(III)、塩化アルミニウム(III)、三フッ化ホウ素ジエチルエーテル錯体、塩化ジルコニウム(IV)、塩化ビスマス(III)等のルイス酸カップリングアクチベーター；

トリメチルクロロシラン；

2, 4-ジニトロフェノール；

反応には、化合物(2) 1モルに対して2-シアノエチル-N, N, N', N'-テトライソプロピルホスホロジアミダイトが一般に1モル~10モルの割合、カップリングアクチベーターが一般に0.1モル~10モルの割合で使用される。

[0030] 反応温度は沸点が70℃以上の溶媒を用いる際は、通常10℃~70℃の範囲内であり、沸点が70℃未満の溶媒を用いる際は、通常10℃~溶媒の還流温度の範囲内である。反応時間は通常0.5時間~150時間である。

[0031] 反応終了後は、飽和重曹水等で洗浄した後、有機層を濃縮することにより、化合物(3)を単離することができる。

[0032] また、得られた化合物(3)は、クロマトグラフィー等により精製することができる。

[0033] 一本鎖核酸分子は、ホスホロアミダイト法に基づき、化合物(3)を用いて製造することができる。

[0034] 上記の化合物(3)の製造方法は化合物(3)の鏡像異性体に適用することができる。原料となる化合物(1)の鏡像異性体は化合物(1)と同様に市販の原料より容易に調製することができる。US2012/0035246に記載されているように、化合物(3)の鏡像異性体もまた有用である。

実施例

[0035] 実施例 1

化合物 (1) 16.94 mmol (8.28 g)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 20.33 mmol (3.90 g)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール 40.62 mmol (6.22 g)、トリエチルアミン 61.00 mmol (8.50 mL) 及び無水ジクロロメタン (160 mL) を混合した。この混合液に、さらに、窒素雰囲気下室温で 6-ヒドロキシヘキサン酸 20.0 mmol (2.64 g) を加え、その後、窒素雰囲気下室温で 3 時間攪拌した。得られた混合液をジクロロメタン 800 mL で希釈し、飽和食塩水 1000 mL で 3 回洗浄した。得られた有機層を硫酸ナトリウムで乾燥した後、溶媒を減圧下で留去して 10.40 g の残渣を得た。

得られた残渣 5.20 g、テトラヒドロフラン 10.4 mL 及び水 5.2 mL を混合し、そこに水酸化リチウム一水和物 17.25 mmol (0.72 g) を加え、40°C~50°C で 6 時間攪拌した。得られた混合物を室温まで放冷した後、トルエン 26 mL 及び水 52 mL を加え、室温で 15 分攪拌した。分取した有機層を重曹水 (炭酸水素ナトリウム 2.76 g と水 52 mL とを混合) で 2 回洗浄し、減圧下で溶媒を留去した。残渣をアセトニトリル 31.2 mL に溶解した後、減圧下で溶媒を留去して化合物 (2) を得た (純度 93%、収率 85%)。

得られた化合物 (2) 7.13 mmol (4.30 g) を無水アセトニトリルと混合し、室温で 3 回共沸脱水を行った。得られた残渣にジイソプロピルアミンテトラゾール塩 8.53 mmol (1.46 g) を加え、減圧下で脱気した後窒素ガスを充填した。得られた混合物に無水アセトニトリル 5 mL を加え、さらに、2-シアノエチル-N, N, N', N'-テトライソプロピルホスホロジアミダイト 8.56 mmol (2.58 g) の無水アセトニトリル溶液 3.5 mL を加えた。この混合物を、窒素雰囲気下室温で 2 時間攪拌した。得られた混合物をジクロロメタン 50 mL で希釈し、飽和重曹水 100 mL で洗浄を 3 回行った後、飽和食塩水 100 mL で洗浄した。得

られた有機層を硫酸ナトリウムで乾燥した後、溶媒を減圧下で留去した。得られた残渣を、充填剤としてアミノシリカゲルを用いたカラムクロマトグラフィー（展開溶媒 ヘキサン：酢酸エチル＝1：3、0.05%ピリジン含有）に供し、化合物（3）を得た（収率82.4%）。

[0036] 実施例2

参考例4に記載の方法で得られた化合物（1）6.00g及びクロロホルム120mLの混合物に、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩2.83g、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール4.51g及びトリエチルアミン4.47gを加えた。得られた混合物に6-ヒドロキシヘキサン酸1.95gを加え、窒素雰囲気下、室温で3時間撹拌した。得られた混合物をクロロホルムで希釈し、5%塩化ナトリウム水溶液で洗浄を3回行った。有機層の溶媒を減圧下で留去した。この残渣にテトラヒドロフラン15mLを加えた後、水酸化リチウム0.59gと水7.4mLとの混合物を加えた。得られた混合物を室温で22時間撹拌した後、トルエンを加え、水で洗浄して得られた有機層を、5%炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄を3回行った後、溶媒を減圧下で留去した。残渣をアセトニトリルと混合し、再び減圧下で溶媒を留去することにより、化合物（2）を25.80g得た。

得られた化合物（2）20.64gにアセトニトリル30mLを加えた後、ジイソプロピルアミンテトラゾール塩2.02g及び2-シアノエチル-N,N,N',N'-テトライソプロピルホスホロジアミダイト3.55gを加え、窒素雰囲気下、室温で1時間撹拌した。反応終了後、得られた混合物をトルエンで希釈し、5%炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄を3回行った。得られた有機層を硫酸マグネシウムで乾燥した後、溶媒を減圧下で留去した。得られた残渣の一部をトリエチルアミンで処理したシリカゲルを用いてカラムクロマトグラフィー（展開溶媒 ヘプタン：酢酸エチル＝50：50）を行い、化合物（3）を得た。

[0037] 実施例3

化合物(1) 20.00 g及びクロロホルム200 mLの混合物に、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩9.42 g、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール15.04 g及びトリエチルアミン14.91 gを加えた。得られた混合物に6-ヒドロキシヘキサン酸6.49 gを加え、窒素雰囲気下室温で3時間攪拌した。得られた混合物をクロロホルムで希釈し、5%塩化ナトリウム水溶液で洗浄を3回行った。有機層の溶媒を減圧下で留去し、残渣29.87 gを得た。残渣4.98 gにアセトニトリル10 mLを加えた後、水酸化ナトリウム0.55 gと水5.0 mLとの混合物を加えた。得られた混合物を30°Cで18時間攪拌した後、トルエンを加え、水で洗浄して得られた有機層を、5%炭酸水素ナトリウム水溶液で2回洗浄した後、溶媒を減圧下で留去した。残渣をアセトニトリルと混合し、再び減圧下で溶媒を留去することにより、化合物(2)を5.03 g得た。

得られた化合物(2) 5.03 gにアセトニトリル21 mLを加えた後、ジイソプロピルアミンテトラゾール塩1.40 g及び2-シアノエチル-N, N, N', N'-テトライソプロピルホスホロジアミダイト2.47 gを加え、窒素雰囲気下室温で1.5時間攪拌した。得られた混合物をトルエンで希釈し、5%炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄を3回行った。有機層を硫酸マグネシウムで乾燥した後、溶媒を減圧下で留去した。得られた残渣の一部をトリエチルアミンで処理したシリカゲルを用いてカラムクロマトグラフィー(展開溶媒 ヘプタン:酢酸エチル:トリエチルアミン=40:60:10)を行い、化合物(3)を得た。

[0038] 実施例4

化合物(1) 20.00 g及びクロロホルム200 mLの混合物に、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩9.42 g、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール15.04 g及びトリエチルアミン14.91 gを加えた。得られた混合物に6-ヒドロキシヘキサン酸6.49 gを加え、窒素雰囲気下室温で3時間攪拌した。得られた混合物をクロ

ロホルムで希釈し、5%塩化ナトリウム水溶液で洗浄を3回行った。有機層の溶媒を減圧下で留去し、残渣29.87gを得た。残渣4.98gにテトラヒドロフラン10mLを加えた後、ジアザビシウクロウンデセン2.08gと水1.0mLとの混合物を加えた。得られた混合物を50℃で1872時間攪拌した後、トルエンを加え、水で洗浄して得られた有機層を、5%炭酸水素ナトリウム水溶液で2回洗浄した後、溶媒を減圧下で留去した。残渣をアセトニトリルと混合し、再び減圧下で溶媒を留去することにより、化合物(2)を8.78g得た。

得られた化合物(2)5.03gにアセトニトリル21mLを加えた後、ジイソプロピルアミンテトラゾール塩1.40g及び2-シアノエチル-N, N, N', N'-テトライソプロピルホスホロジアミダイト2.47gを加え、窒素雰囲気下室温で1.5時間攪拌した。得られた混合物をトルエンで希釈し、5%炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄を3回行った。有機層を硫酸マグネシウムで乾燥した後、溶媒を減圧下で留去した。得られた残渣の一部をトリエチルアミンで処理したシリカゲルを用いてカラムクロマトグラフィー(展開溶媒 ヘプタン:酢酸エチル:トリエチルアミン=40:60:10)を行い、化合物(3)を得た。

[0039] 実施例5

化合物(1)20.00g及びクロロホルム200mLの混合物に、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩9.42g、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール15.04g及びトリエチルアミン14.91gを加えた。得られた混合物に6-ヒドロキシヘキサン酸6.49gを加え、窒素雰囲気下室温で3時間攪拌した。得られた混合物をクロロホルムで希釈し、5%塩化ナトリウム水溶液で洗浄を3回行った。有機層の溶媒を減圧下で留去し、残渣29.87gを得た。残渣4.98gにテトラヒドロフラン10mLを加えた後、カリウムtert-ブトキシド1.53gと水5.0mLとの混合物を加えた。得られた混合物を30℃で22時間攪拌した後、トルエンを加え、水で洗浄して得られた有機層を、5%炭酸

水素ナトリウム水溶液で2回洗浄した後、溶媒を減圧下で留去した。残渣をアセトニトリルと混合し、再び減圧下で溶媒を留去することにより、化合物(2)を4.78g得た。

得られた化合物(2)4.78gにアセトニトリル21mLを加えた後、ジイソプロピルアミンテトラゾール塩1.40g及び2-シアノエチルーN,N,N',N'-テトライソプロピルホスホロジアミダイト2.47gを加え、窒素雰囲気下室温で1.5時間攪拌した。反応終了後、得られた混合物をトルエンで希釈し、5%炭酸水素ナトリウム水溶液で3回洗浄した。得られた有機層を硫酸マグネシウムで乾燥した後、溶媒を減圧下で留去した。得られた残渣の一部をトリエチルアミンで処理したシリカゲルを用いてカラムクロマトグラフィー(展開溶媒 ヘプタン:酢酸エチル:トリエチルアミン=40:60:10)を行い、化合物(3)を得た。

[0040] 実施例6

化合物(1)20.00g及びクロロホルム200mLの混合物に、1-エチルー3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩9.42g、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール15.04g及びトリエチルアミン14.91gを加えた。得られた混合物に6-ヒドロキシヘキサン酸6.49gを加え、窒素雰囲気下、室温で3時間攪拌した。得られた混合物をクロロホルムで希釈し、5%塩化ナトリウム水溶液で洗浄を3回行った。得られた有機層の溶媒を減圧下で留去し、残渣29.87gを得た。残渣4.98gにテトラヒドロフラン10mLを加えた後、水酸化ベンジルトリメチルアンモニウム水溶液(40wt%)5.70gと水1.6mLとの混合物を加えた。得られた混合物を30℃で6時間攪拌した後、トルエンを加え、水で洗浄して得られた有機層を、5%炭酸水素ナトリウム水溶液で2回洗浄した後、溶媒を減圧下で留去した。残渣をアセトニトリルと混合し、再び減圧下で溶媒を留去することにより、化合物(2)を10.21g得た。

得られた化合物(2)10.21gにアセトニトリル21mLを加えた後、ジイソプロピルアミンテトラゾール塩1.40g及び2-シアノエチルー

、2回の平均純度は94.0%であった。OD₂₆₀とは1 mL溶液 (pH=7.5) における10 mm光路長あたりのUV 260 nmの吸光度を表す。一般的にRNAでは1 OD=40 μgであることが知られていることから、2回の平均収量は1108 μgとなる。

[0044] 参考例2

US 2012/0035246の実施例(A3)の(3)及び(4)の記載にしたがって化合物(3)を製造した(収率85.5%)。得られた化合物(3)を、上記参考例1の記載にしたがって化合物(A)を得た。

[0045] 化合物(A)を2回合成した結果、2回の平均OD₂₆₀は17.8 ODであり、2回の平均純度は93.0%であった。一般的にRNAでは1 OD=40 μgであることが知られていることから、2回の平均収量は712 μgとなる。

[0046] 参考例1及び参考例2の結果に見られるように、本発明の製造方法で得られる化合物(3)を使用することにより、従来製造方法で得られる化合物(3)を使用する場合に比べて化合物(A)が高い収量で得られる。

参考例3

上記参考例2に記載の化合物(3)、実施例3~6で製造した化合物(3)を用い、上記参考例1の記載に準じて化合物(A)を得た。結果を下記表1に示す。参考例3の結果に見られるように、本発明の製造方法で得られる化合物(3)を使用することにより、従来製造方法で得られる化合物(3)を使用する場合に比べて化合物(A)が高い収量で得られる。

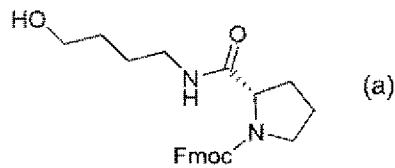
[0047] [表1]

化合物(3)	従来法*	実施例3	実施例4	実施例5	実施例6
OD ₂₆₀	44.5 OD	69.6 OD	67.4 OD	64.8 OD	64.3 OD
収量(μg)	1780	2784	2696	2593	2572

*US 2012/0035246の実施例(A3)の(3)及び(4)

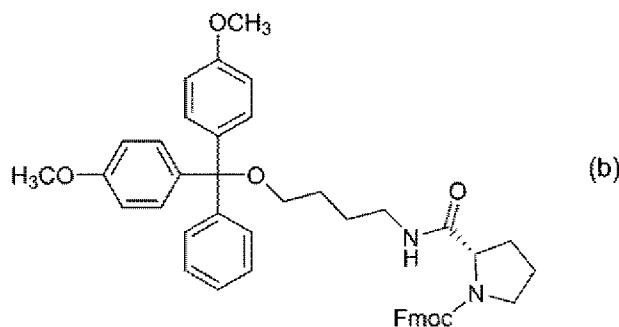
[0048] 参考例4

窒素置換した反応容器にN-[(9H-フルオレン-9-イルメトキシ)カルボニル]-L-プロリン30.00gとアセトニトリル420mLとを混合し、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール32.68gを加えた。得られた混合物に4-アミノ-1-ブタノール9.51gを加え、さらにジシクロヘキシルカルボジイミド22.02gのアセトニトリル溶液210mLを室温で滴下した後、室温で1時間攪拌した。反応終了後、生成した沈殿を濾過により除去し、得られた濾液の溶媒を減圧下で留去した。残渣にトルエンを加え、10%炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄した。得られた有機層の溶媒を減圧下で留去することにより、式(a)



[0049] [式中、Fmocは9-フルオレニルメチルオキシカルボニル基を表す。]で示される化合物を得た。

[0050] 得られた式(a)で示される化合物全量にトルエン90mLを加えて共沸脱水操作を行った。得られた式(a)で示される化合物のトルエン溶液71.72g、N,N-ジメチル-4-アミノピリジン91mg及びピリジン50mLを混合し、4,4'-ジメトキシトリチルクロリド32.64gを0~5℃で加えた後、窒素雰囲気下、室温で30分間攪拌した。反応終了後、メタノールを加えて20分間攪拌した。得られた混合物をトルエンで希釈し、5%炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄した。得られた有機層の溶媒を減圧下で留去することにより、式(b)



[0051] [式中、Fmocは9-フルオレニルメチルオキシカルボニル基を表す。]
で示される化合物を得た。

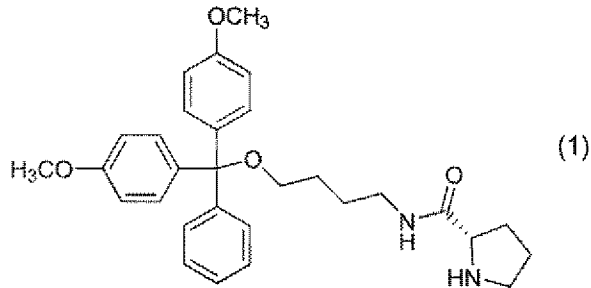
[0052] 得られた式(b)で示される化合物にトルエン50mLを加えた後、ピペリジン59.89gを0~5℃で滴下した後、窒素雰囲気下、室温で30分間攪拌した。反応終了後、減圧下で溶媒を留去した。残渣にトルエンを加え、共沸脱水操作を行った。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(展開溶媒 酢酸エチル:メタノール=80:20)に供し、化合物(1)を得た。

産業上の利用可能性

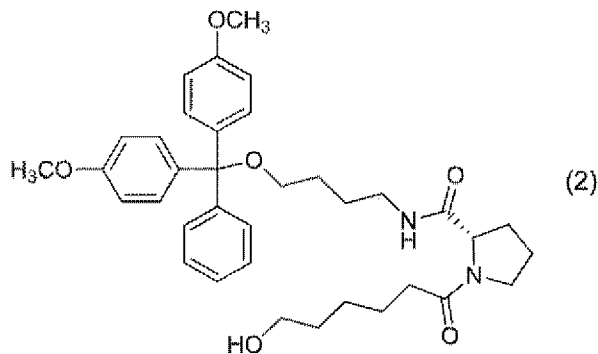
[0053] 本発明方法により、高い収量で標的遺伝子の発現を抑制可能な一本鎖核酸分子を製造することのできる化合物(3)又はその鏡像異性体を製造することができる。

請求の範囲

[請求項1] 式(1)



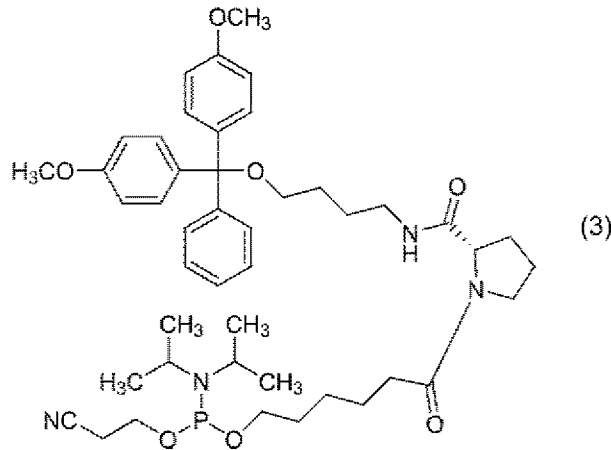
で示される化合物又はその鏡像異性体を溶媒中、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール、1-ヒドロキシ-7-アザベンゾトリアゾール、N-ヒドロキシコハク酸イミド、エチル(ヒドロキシイミノ)シアノアセタート、炭酸N,N'-ジスクシンイミジル、N-ヒドロキシフタルイミド、N-ヒドロキシピペリジン、3-ヒドロキシ-4-オキソ-3,4-ジヒドロ-1,2,3-ベンゾトリアジン、及びN-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2,3-ジカルボン酸イミドからなる群より選ばれる添加剤並びに縮合剤の存在下、6-ヒドロキシヘキサン酸と反応させた後、得られた反応混合物と、水と、アルカリ金属水酸化物、アルカリ金属炭酸塩、二環式アミジン化合物、アルカリ金属アルコキシド及び第4級アンモニウム水酸化物からなる群より選ばれる塩基とを混合して式(2)



で示される化合物又はその鏡像異性体を製造する工程、及び

前記工程で得られた式(2)で示される化合物又はその鏡像異性体と2-シアノエチル-N,N,N',N'-テトライソプロピルホス

ホロジアミダイトとを、カップリングアクチベーターの存在下、溶媒中で反応させて、式(3)



で示される化合物又はその鏡像異性体を得る工程

を含む、式(3)で示される化合物又はその鏡像異性体の製造方法。

[請求項2] 塩基がアルカリ金属水酸化物である請求項1に記載の製造方法。

[請求項3] 縮合剤が1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド、1,1-カルボニルジイミダゾール、1-プロピルホスホン酸無水物環状三量体又は2-クロロ-4,6-ジメトキシ-1,3,5-トリアジンである請求項1又は2に記載の製造方法。

[請求項4] 添加剤が1-ヒドロキシベンゾトリアゾール、1-ヒドロキシ-7-アザベンゾトリアゾール、N-ヒドロキシコハク酸イミド、エチル(ヒドロキシイミノ)シアノアセタート又は炭酸N,N'-ジスクシンイミジルである請求項1又は2に記載の製造方法。

[請求項5] カップリングアクチベーターがジイソプロピルアミンテトラゾール塩、1H-テトラゾール、5-(エチルチオ)-1H-テトラゾール、5-(ベンジルチオ)-1H-テトラゾール又は4,5-ジシアノイミダゾールである請求項1又は2に記載の製造方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2017/015435

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C07F9/572(2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07F9/572

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2017
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2017	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2017

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAPlus/REGISTRY(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2012/017919 A1 (Bonac Corp.), 09 February 2012 (09.02.2012), & JP 4965745 B2 & US 2012/0035246 A1 & EP 2436767 A1 & CN 103052711 A & KR 10-2013-0095738 A & TW 201219570 A & ES 2443346 T & DK 2674494 T3 & AU 2011274854 A	1-5
A	WO 2013/180038 A1 (Bonac Corp.), 05 December 2013 (05.12.2013), & US 2015/0105443 A1 & EP 2857513 A1 & CN 104379744 A	1-5
A	JP 2013-55913 A (Bonac Corp.), 28 March 2013 (28.03.2013), (Family: none)	1-5

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 21 June 2017 (21.06.17)	Date of mailing of the international search report 04 July 2017 (04.07.17)
--	---

Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer Telephone No.
--	---

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/015435

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2013/133221 A1 (Bonac Corp.), 12 September 2013 (12.09.2013), & JP 5536963 B2 & US 2015/0073124 A1 & US 2016/0376589 A1 & EP 2824184 A1 & CN 104271742 A	1-5

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07F9/572(2006.01)i											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07F9/572											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2017年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2017年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2017年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2017年	日本国実用新案登録公報	1996-2017年	日本国登録実用新案公報	1994-2017年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2017年										
日本国実用新案登録公報	1996-2017年										
日本国登録実用新案公報	1994-2017年										
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CPlus/REGISTRY (STN)											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示		関連する 請求項の番号								
A	WO 2012/017919 A1 (株式会社ボナック) 2012.02.09 & JP 4965745 B2 & US 2012/0035246 A1 & EP 2436767 A1 & CN 103052711 A & KR 10-2013-0095738 A & TW 201219570 A & ES 2443346 T & DK 2674494 T3 & AU 2011274854 A		1-5								
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。		<input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。									
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献									
国際調査を完了した日 21.06.2017		国際調査報告の発送日 04.07.2017									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 阿久津 江梨子 電話番号 03-3581-1101 内線 3443	4H 5808								

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	WO 2013/180038 A1 (株式会社ボナック) 2013. 12. 05 & US 2015/0105443 A1 & EP 2857513 A1 & CN 104379744 A	1-5
A	JP 2013-55913 A (株式会社ボナック) 2013. 03. 28 (ファミリーなし)	1-5
A	WO 2013/133221 A1 (株式会社ボナック) 2013. 09. 12 & JP 5536963 B2 & US 2015/0073124 A1 & US 2016/0376589 A1 & EP 2824184 A1 & CN 104271742 A	1-5