

(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
2021年8月26日(26.08.2021)



(10) 国際公開番号

WO 2021/167029 A1

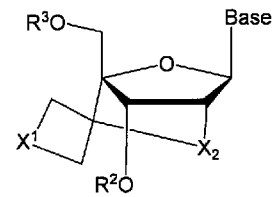
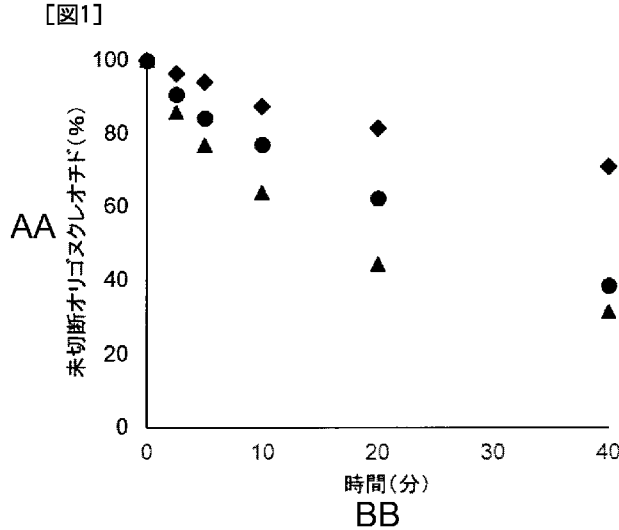
- (51) 国際特許分類:
C07H 19/06 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
C07H 21/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2021/006222
- (22) 国際出願日: 2021年2月18日(18.02.2021)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2020-026646 2020年2月19日(19.02.2020) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人大阪大学 (OSAKA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 Osaka (JP). 国立医薬品食品衛生研究所長が

代表する日本国 (JAPAN AS REPRESENTED BY DIRECTOR GENERAL OF NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES) [JP/JP]; 〒2100821 神奈川県川崎市川崎区殿町三丁目25番26号 Kanagawa (JP).

- (72) 発明者: 小比賀 聡 (OBIKA, Satoshi); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 山口卓男 (YAMAGUCHI, Takao); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 小峯飛々暉 (KOMINE, Hibiki); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 杉浦隆也 (SUGIURA, Takaya); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 井上 貴

(54) Title: BRIDGED NUCLEOSIDE AND NUCLEOTIDE USING SAME

(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



(I)

AA Uncleaved oligonucleotide (%)

BB Time (min)

(57) Abstract: Disclosed is a bridged nucleoside and a nucleotide using the same. The nucleoside according to the present invention is represented by formula (I). The bridged nucleoside of the present invention is usable as a substitute for a phosphorothioate-modified nucleic acid with concerns of accumulation in a specific organ. Also, this bridged nucleoside has high industrial productivity.

(57) 要約: 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開示する。本発明のヌクレオシドは、以下の式 (I) : で表される。本発明の架橋型ヌクレオシドは、特定の臓器への集積などが懸念されるホスホロチオエート修飾核酸の代替とすることができ、工業的生産性にも優れている。

WO 2021/167029 A1

雄(INOUE, Takao); 〒2109501 神奈川県川崎市川崎区殿町三丁目2番26号 国立医薬品食品衛生研究所内 Kanagawa (JP). 吉田 徳幸(YOSHIDA, Tokuyuki); 〒2109501 神奈川県川崎市川崎区殿町三丁目2番26号 国立医薬品食品衛生研究所内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 中道 佳博, 外(NAKAMICHI, Yoshihiro et al.); 〒5300047 大阪府大阪市北区西天満3丁目2番9号 翁ビル5階 創樹国際特許事務所 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, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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:

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

明 細 書

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

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

難しい。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] 特許文献1：国際公開第2015/125783号

非特許文献

[0006] 非特許文献1：S. Obikara, T. Tetrahedron Lett., 1997, 38, 8735-8738

非特許文献2：S. Singhら, J. Chem. Commun., 1998, 455-456

非特許文献3：E. Swayzeら, Nucleic Acids Res., 2007, 35, 687-700

非特許文献4：P.P. Sethら, J. Org. Chem., 2010, 75, 1569-1581

非特許文献5：T. Yamaguchiら, Chem. Commun., 2015, 51, 9737-9740

発明の概要

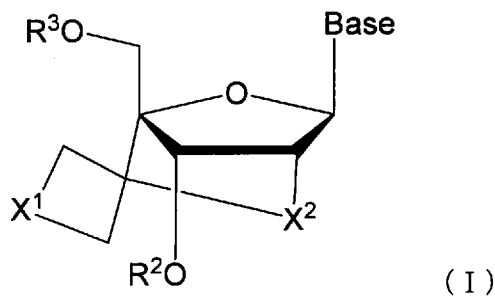
発明が解決しようとする課題

[0007] 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(1)で表される化合物またはその塩：

[0009] [化1]



[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、

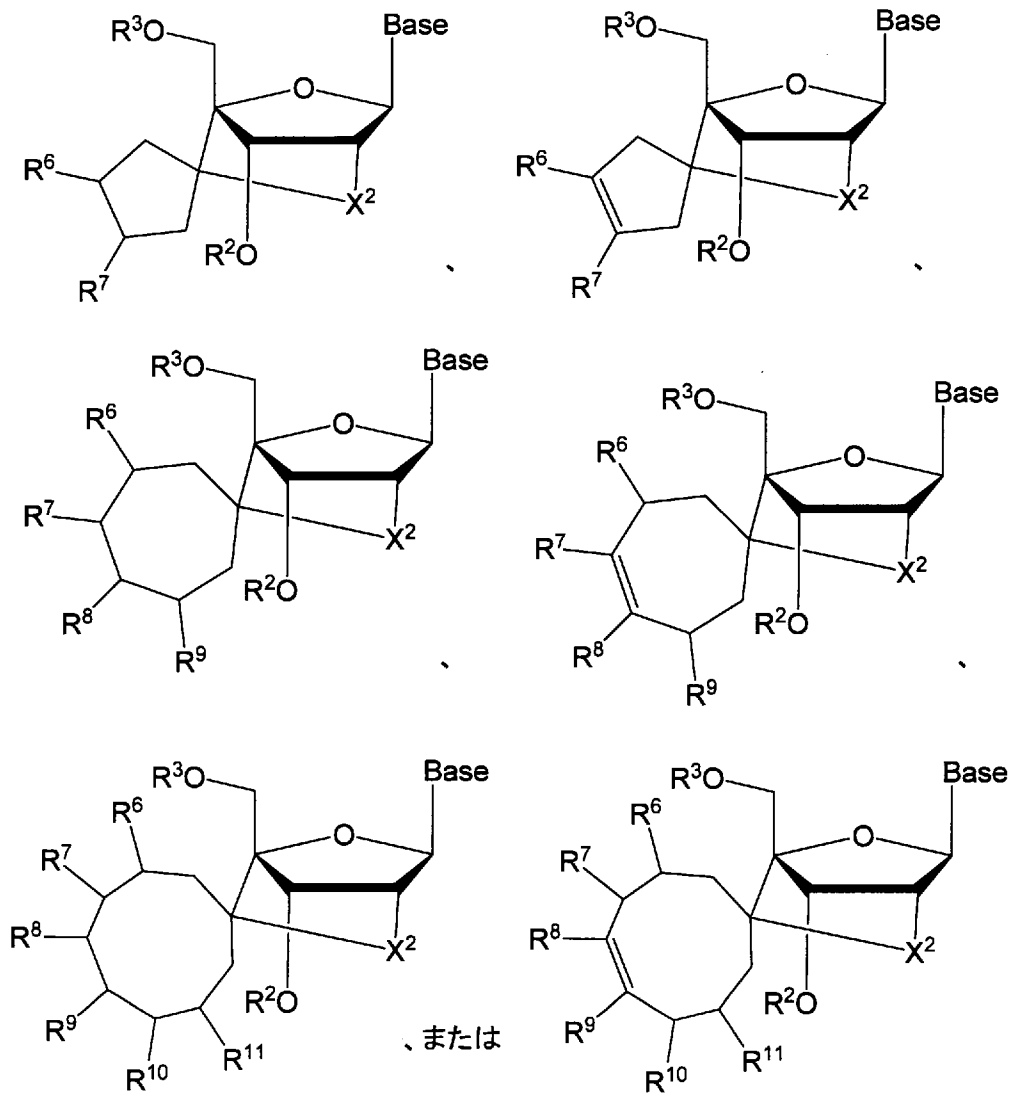
R^2 および R^3 は、それぞれ独立して、水素原子、核酸合成の水酸基の保護基、分岐または環を形成していてもよい炭素数1から7のアルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数2から7のアルケニル基、該 α 群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよくそしてヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数3から10のアリール基、該 α 群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよくそしてヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数3から12のアリール部分を有するアラルキル基、該 α 群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいアシル基、該 α 群から選択される任意の置換基を1以上有していても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

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) である。

[0011] 1つの実施形態では、上記式(1)は以下の式：

[0012] [化2]



[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、

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、

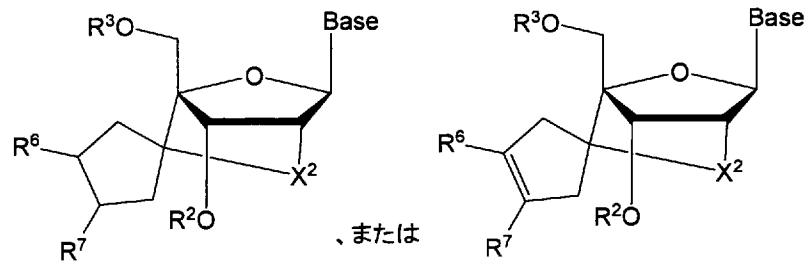
X^2 は、酸素原子、硫黄原子、 $-NH-$ 、 $-N(CH_3)-$ またはメチレン基であり、そして

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^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。

[0014] 1つの実施形態では、上記式(1)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、

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。

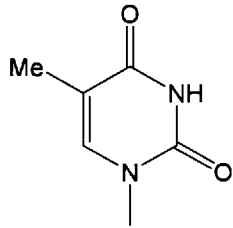
[0017] 1つの実施形態では、上記式(1)において、上記Baseは、6-アミノプリン-9-イル基、2,6-ジアミノプリン-9-イル基、2-アミノ-6-クロロプリン-9-イル基、2-アミノ-6-フルオロプリン-9-イル基、2-アミノ-6-ブロモプリン-9-イル基、2-アミノ-6-ヒドロキシプリン-9-イル基、6-アミノ-2-メトキシプリン-9-イル基、6-アミノ-2-クロロプリン-9-イル基、6-アミノ-2-フルオロプリン-9-イル基、2,6-ジメトキシプリン-9-イル基、2,6-ジクロロプリン-9-イル基、6-メルカプトプリン-9-イル基、2-オキソ-4-アミノ-1,2-ジヒドロピリミジン-1-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。

[0018] 1つの実施形態では、上記式(1)において、上記Baseは、以下の式

:

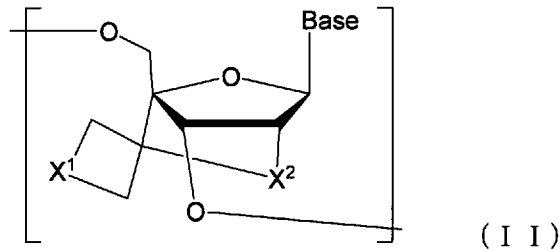
[0019] [化4]



[0020] で表される基である。

[0021] 本発明はまた、以下の式(11)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]



[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 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、

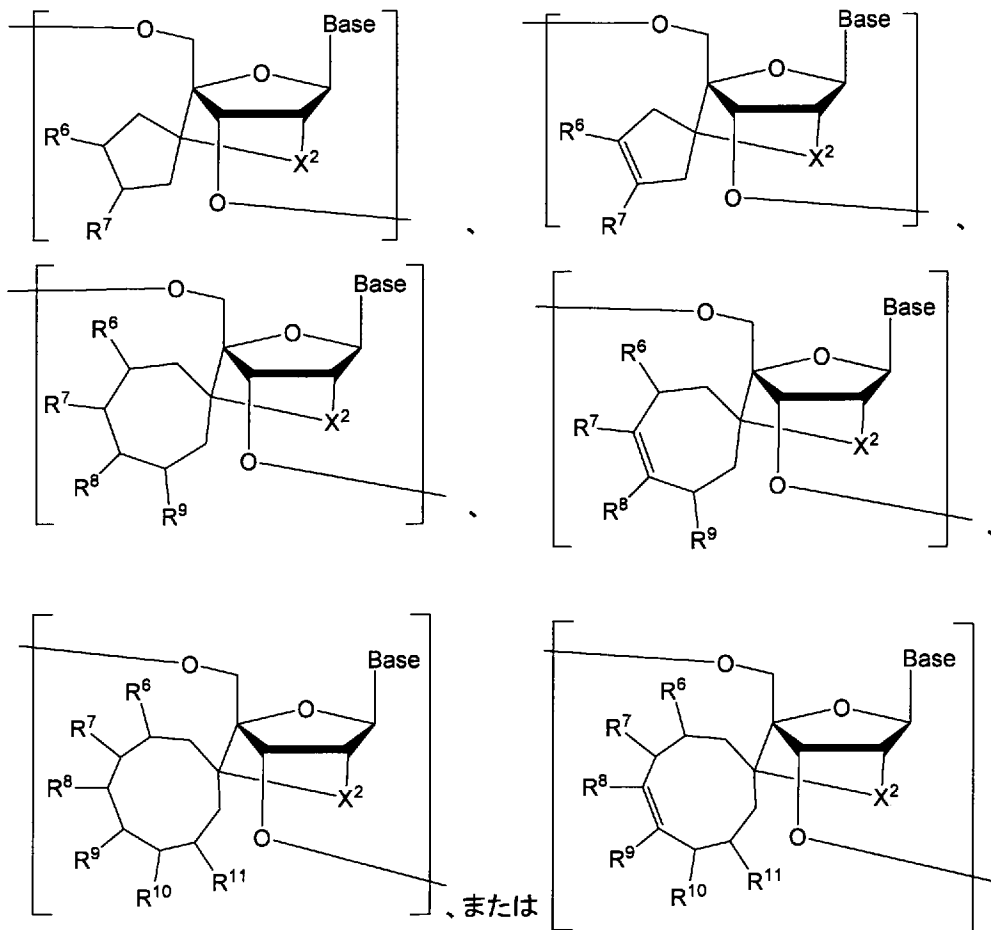
X¹は、炭素数1から3の直鎖アルキル基か、-NHR^{4b} [ここで、R^{4b}は水素原子または炭素数1から3の直鎖アルキル基である] か、または-OR⁵

^b [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)である。

[0024] 1つの実施形態では、上記式(11)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-

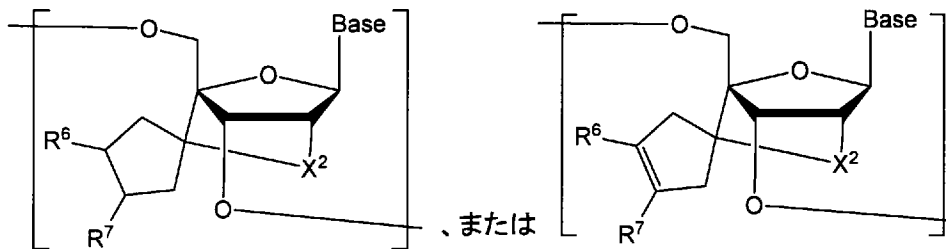
イル基を表し、ここで、該 α 群は、水酸基、核酸合成の保護基で保護された水酸基、炭素数1から6の直鎖アルキル基、炭素数1から6の直鎖アルコキシ基、メルカプト基、核酸合成の保護基で保護されたメルカプト基、炭素数1から6の直鎖アルキルチオ基、アミノ基、炭素数1から6の直鎖アルキルアミノ基、核酸合成の保護基で保護されたアミノ基、およびハロゲン原子からなり、

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(11)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、

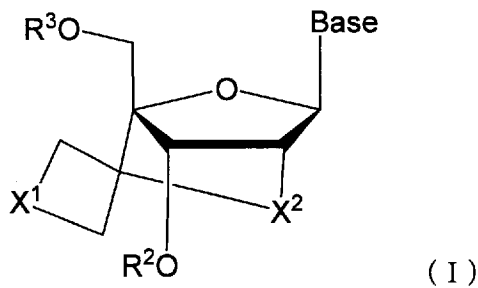
X^2 は、酸素原子、硫黄原子、 $-NH-$ 、 $-N(CH_3)-$ またはメチレン基であり、そして

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(1)で表される化合物またはその薬理学上許容される塩：

[0031] [化8]



[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、

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)

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。

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' - T T T T T T T T T X - 3' の配列の各種オリゴヌクレオチドを 3' - エキソ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、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キ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(-CH₂-)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、-CH₂CH₂-、-CH₂CH₂CH₂CH₂-、および-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-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=CH₂-、-CH₂CH=CHCH₂-、および-CH₂CH₂CH=CHCH₂CH₂-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、*t*-ブチルジメチルシリル基、メチルジイソプロピルシリル基、メチルジ-*t*-ブチルシリル基、トリエチ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、トリエチルシリル基、*t*-ブチルジメチルシリル基、*t*-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-ブロモテトラヒドロピラン-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、*t*-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-ブロモベンジル基、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、*t*-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 (TBD

MS) 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-プ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 $-P(OC_2H_5)(N(iPr)_2)$ 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(1)または(11)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、*t*-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*-ベンジルー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アルスルホン酸塩、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（I）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、*t*-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

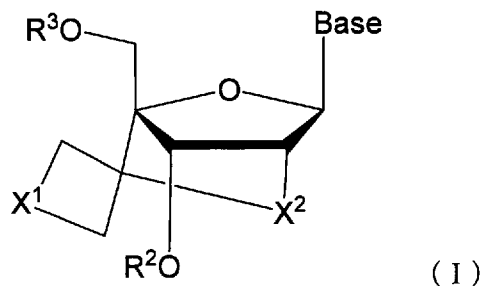
ジルーフェネチルアミン塩、ピペラジン塩、テトラメチルアンモニウム塩、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン塩のような有機塩等のアミン塩；フッ化水素酸塩、塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩のようなハロゲン原子化水素酸塩、硝酸塩、過塩素酸塩、硫酸塩、リン酸塩等の無機酸塩；メタンスルホン酸塩、トリフルオロメタンスルホン酸塩、エタンスルホン酸塩のような低級アルカンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩のようなアリールスルホン酸塩、酢酸塩、リンゴ酸塩、フマル酸塩、コハク酸塩、クエン酸塩、酒石酸塩、シュウ酸塩、マレイン酸塩等の有機酸塩；および、グリシン塩、リジン塩、アルギニン塩、オルニチン塩、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(1)：

[0064] [化9]



[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、

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、

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)である。

[0066] 上記式(1)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,

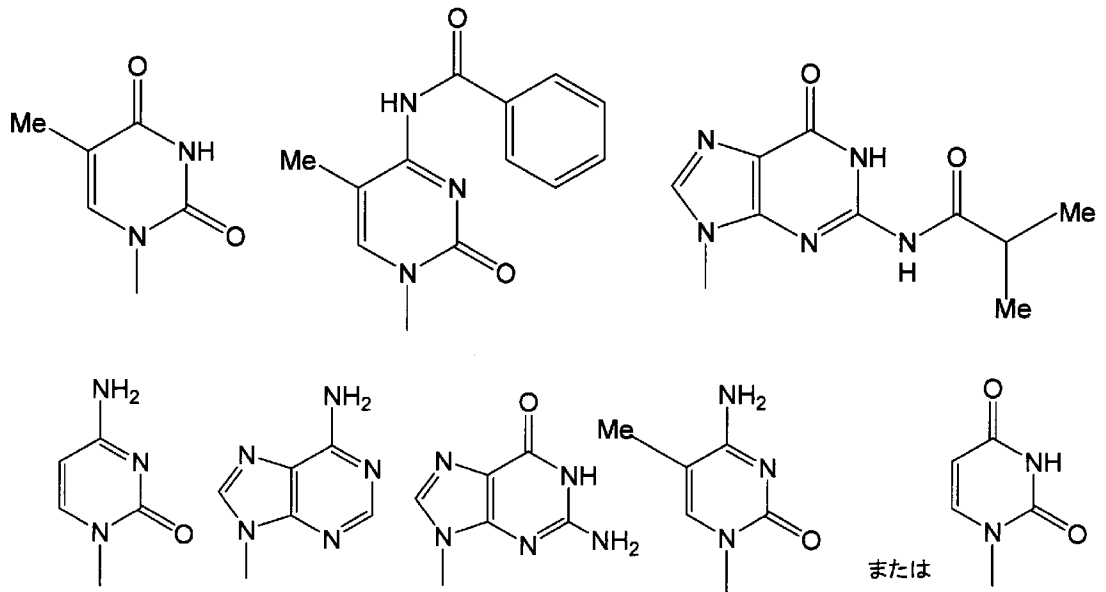
2-ジヒドロピリミジン-1-イル基)である。これらの塩基は、水酸基、炭素数1から6の直鎖アルキル基、炭素数1から6の直鎖アルコキシ基、メルカプト基、炭素数1から6の直鎖アルキルチオ基、アミノ基、炭素数1から6の直鎖アルキルアミノ基、およびハロゲン原子からなる α 群より選択される任意の置換基を1以上有していてもよい。

[0067] 上記「Base」の具体例としては、アデニル基、グアニル基、シトシニル基、ウラシニル基、およびチミニル基、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]

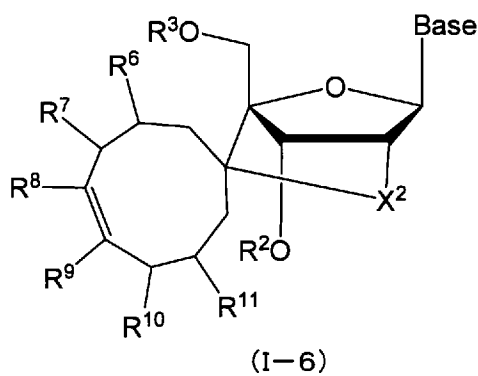
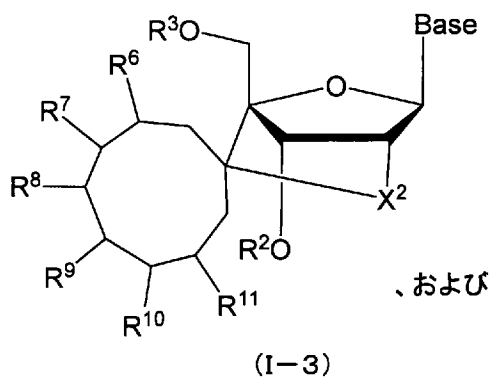
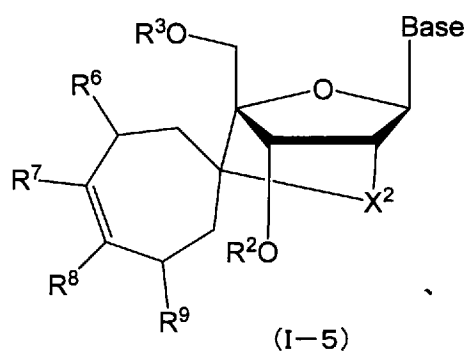
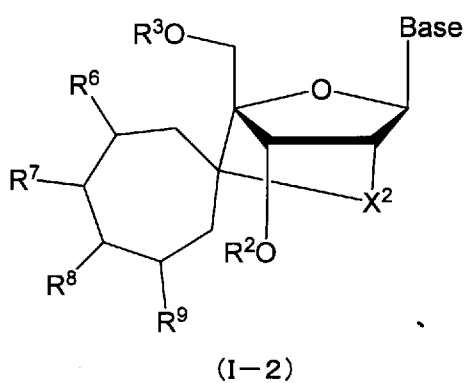
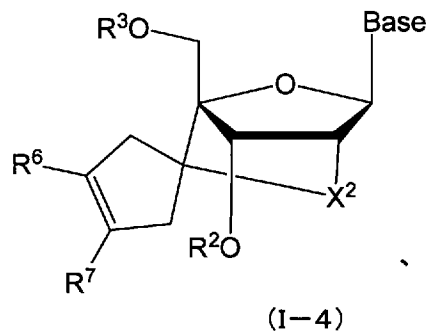
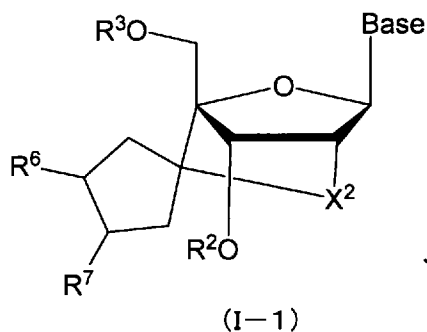


[0070] でそれぞれ表される基、ならびに2-オキソ-4-ヒドロキシ-5-メチル-1,2-ジヒドロピリミジン-1-イル基、2-オキソ-4-アミノ-1,2-ジヒドロピリミジン-1-イル基、6-アミノプリン-9-イル基、2-アミノ-6-ヒドロキシプリン-9-イル基、4-アミノ-5-メチル-2-オキソ-1,2-ジヒドロピリミジン-1-イル基、および2-オキソ-4-ヒドロキシ-1,2-ジヒドロピリミジン-1-イル基が好ましい。「Base」はまた、オリゴヌクレオチドの合成の際には、上記基を構成する水酸基およびアミノ基が保護基により保護されているものであることが好ましい。

[0071] ここで、1つの実施形態では、式(1)で表される化合物の一例としては以下の式(1-1)～(1-6)：

[0072]

[化11]



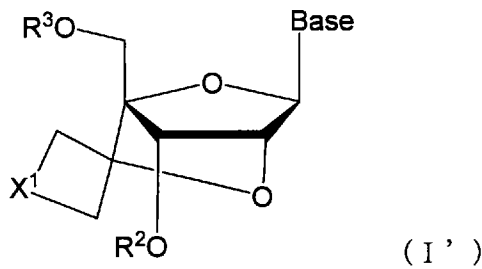
[0073] (式中、

Base、 R^2 、 R^3 、および X^2 は上記式(1)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]で表される化合物が挙げられる。ここで、例えば、上記式(1-1)

および(1-4)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(1-2)および(1-5)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(1-3)および(1-6)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。

[0074] あるいは、1つの実施形態では、式(1)で表される化合物の他の例としては、以下の式(1') :

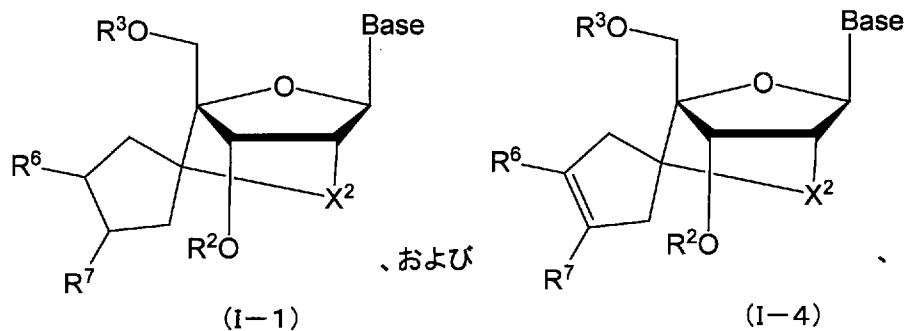
[0075] [化12]



[0076] (式中、Base、 R^2 、 R^3 、および X^1 は上記式(1)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(1)で表される化合物の別の例としては以下の式(1-1)および(1-4) :

[0078] [化13]

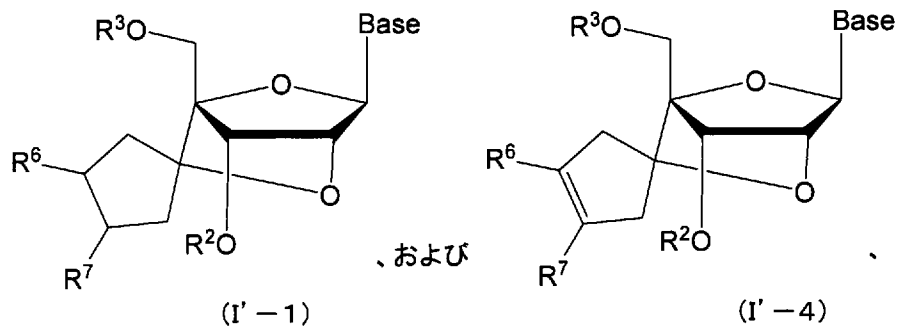


[0079] (式中、Base、 R^2 、 R^3 、および X^2 は上記式(1)で定義されるものと同様であり、そして R^6 および R^7 はそれぞれ独立して、水素原子、炭素数1から3の直鎖アルキル基、 $-NHR^{4b}$ [ここで、 R^{4b} は水素原子または炭素数1から3の直鎖アルキル基である]、または $-OR^{5b}$ [ここで、 R^{5b} は

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 (1-1) および (1-4) における R^6 および R^7 はともに水素原子である。

[0080] あるいは、1つの実施形態では、式 (1) で表される化合物のさらに別の例としては以下の式 (1'-1) および (1'-4) :

[0081] [化14]



[0082] (式中、Base、 R^2 、および R^3 は上記式 (1) 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 (1'-1) および (1'-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 (1) 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 (1) 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

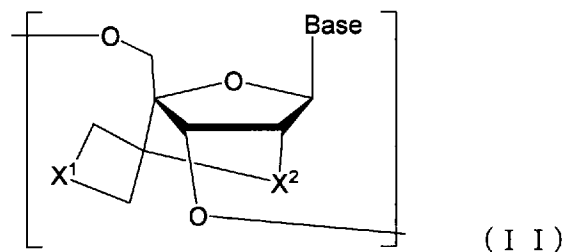
、 s s R N A との結合親和性をも一層向上させ得る。

[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) の架橋型ヌクレオチドを用い、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 (I I) :

[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、

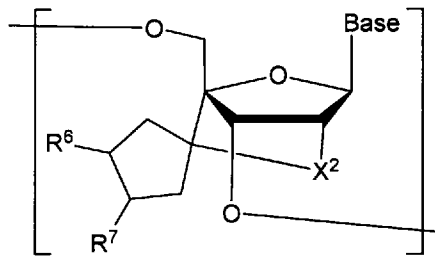
X^1 は、炭素数 1 から 3 の直鎖アルキル基か、 $-NHR^{4b}$ [ここで、 R^{4b} は水素原子または炭素数 1 から 3 の直鎖アルキル基である] か、または $-OR^5$ [ここで、 R^5 は水素原子または炭素数 1 から 3 の直鎖アルキル基である] かで置換されていてもよい、炭素数 2 から 8 のアルキレン基；あるいは炭素

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

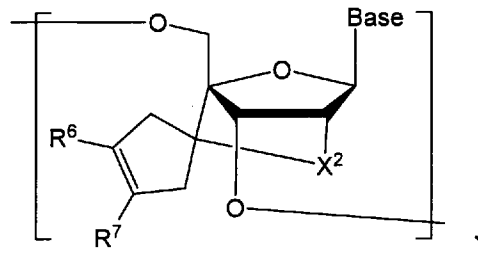
X^2 は、酸素原子、硫黄原子、 $-NH-$ 、 $-N(CH_3)-$ またはメチレン基である) で表されるヌクレオシド構造を少なくとも1つ含む。

[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(11)のヌクレオシド構造の一例としては以下の式(II-1)~(II-6)：

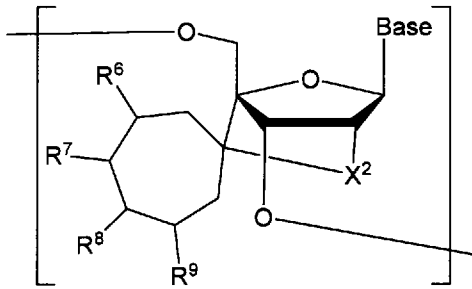
[0089] [化16]



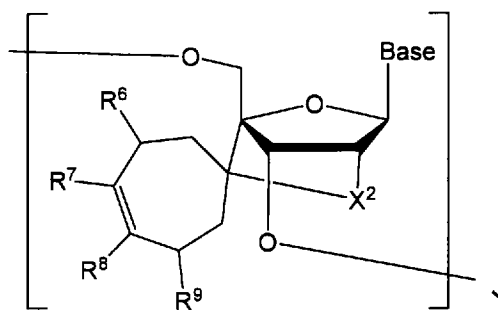
(II-1)



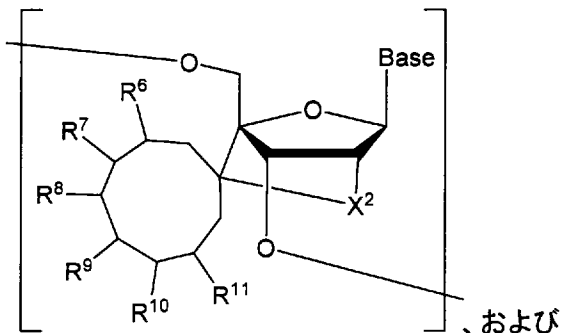
(II-4)



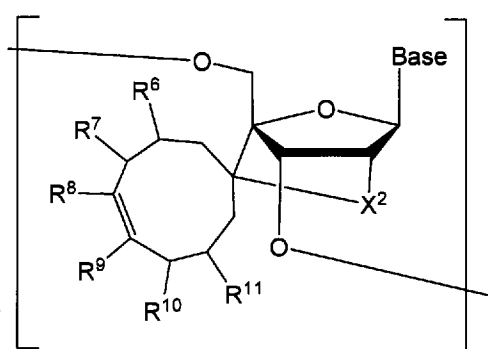
(II-2)



(II-5)



(II-3)



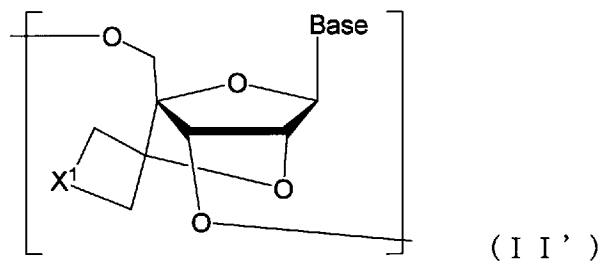
(II-6)

[0090] (式中、

Baseおよび X^2 は上記式(11)に定義した基と同様であり、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)で表されるものが挙げられる。ここで、例えば、上記式(11-1)および(11-4)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(11-2)および(11-5)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(11-3)および(11-6)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(11)のヌクレオシド構造の他の例としては以下の式(11') :

[0092] [化17]



[0093] (式中、Baseおよび X^1 は上記式(11)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。

[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(11)のヌクレオシド構造の別の例としては以下の式(11-1)および(11-4) :

[0095]

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(11'-1)および(11'-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。

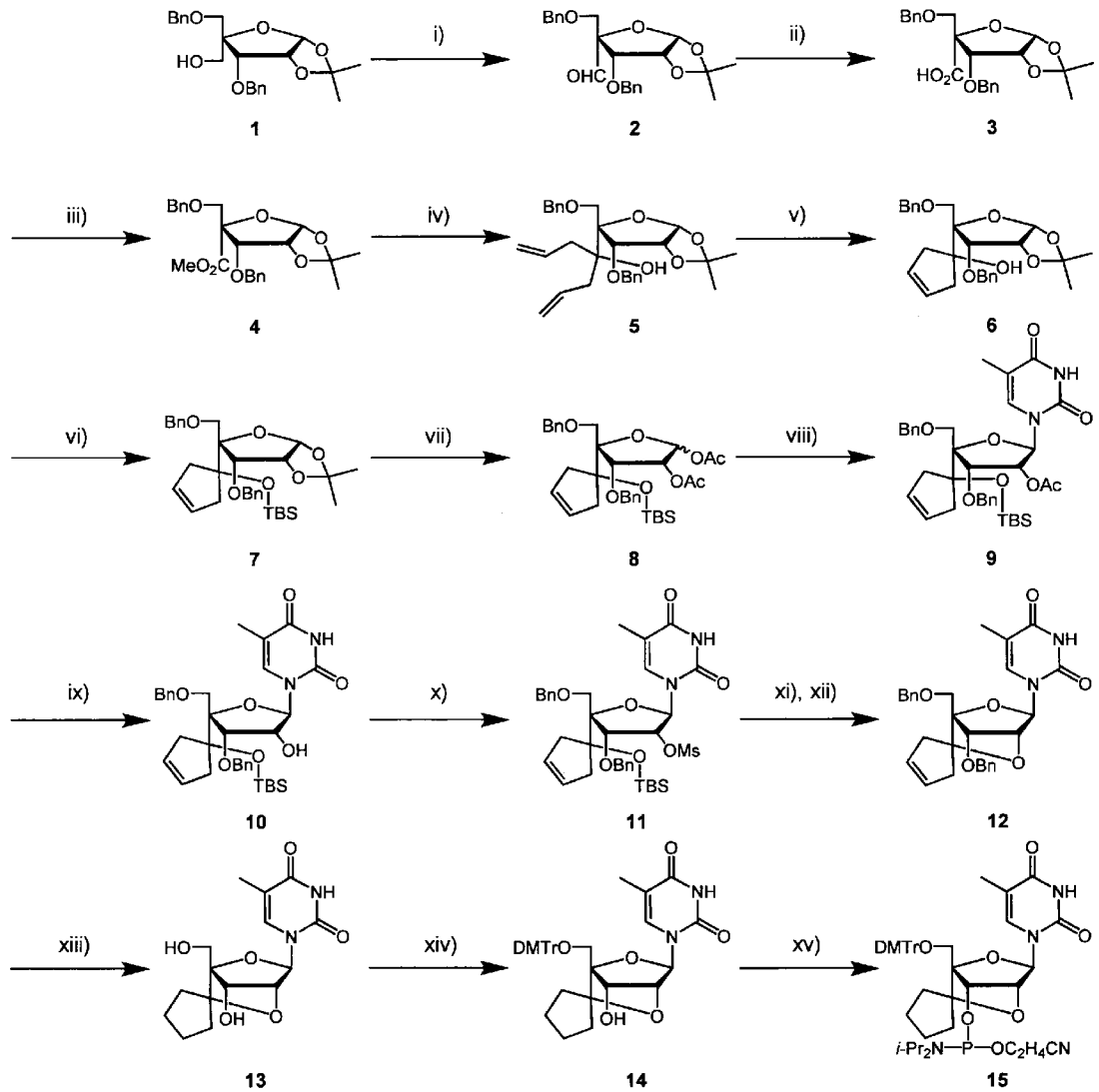
実施例

[0106] 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]

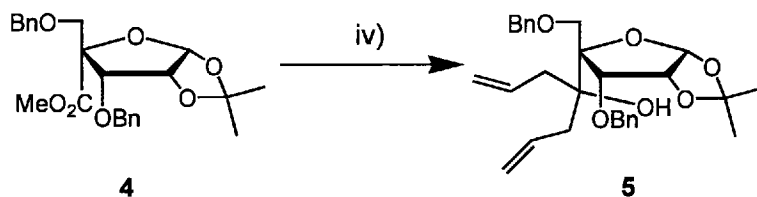


各工程の試薬および条件: (i) DMP, CH_2Cl_2 , 0°C から室温, 1時間, 94%; (ii) H_2O_2 水溶液., NaH_2PO_4 水溶液., NaClO_2 水溶液., MeCN , 0°C から室温, 2時間, 定量的.; (iii) MeI , NaHCO_3 , DMF , 室温, 22時間, 98%; (iv) アリルマグネシウムプロミド, CeCl_3 , THF , 室温, 14時間, 98%; (v) 第二世代グラブス触媒, CH_2Cl_2 , 還流下, 4時間, 90%; (vi) TBSOTf , 2,6-ルチジン, CH_2Cl_2 , 室温, 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]

[化21]



[0111] 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) ~ iii) 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(III) (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) を室温に加え、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。

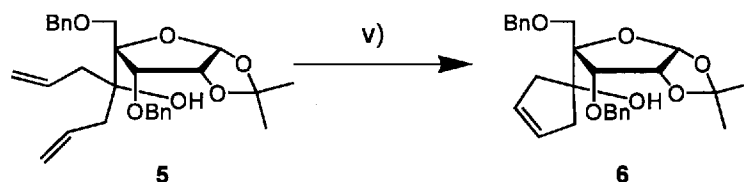
[0112] 得られた化合物5の物性データを表1に示す。

[0113] [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 (dd, <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.

[0114] (1-2) 化合物6の合成

[0115] [化22]



[0116] 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) を室温に加え、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。

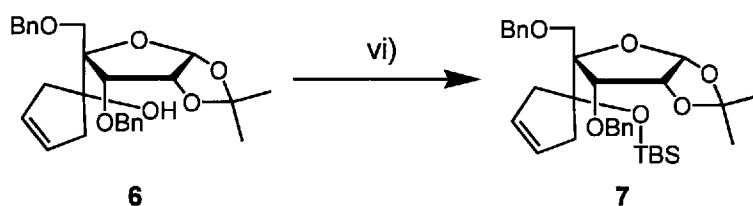
[0117] 得られた化合物6の物性データを表2に示す。

[0118] [表2]

得られた化合物6の物性データ
¹ H NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ 7.28–7.36 (m, 10H), 5.92 (d, <i>J</i> = 3.5 Hz, 1H), 5.58–5.65 (m, 2H), 4.87 (d, <i>J</i> = 11.3 Hz, 1H), 4.77 (dd, <i>J</i> = 4.1, 8.6 Hz, 1H), 4.54 (d, <i>J</i> = 12.0 Hz, 1H), 4.38–4.47 (m, 3H), 3.75 (bs, 1H), 3.53 (d, <i>J</i> = 9.6 Hz, 1H), 3.16 (m, 2H), 2.62–2.81 (m, 1H), 2.34–2.45 (m, 1H), 2.29 (d, <i>J</i> = 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) C ₂₇ H ₃₂ O ₆ Na [M+Na] ⁺ としての計算値: 475.2091, 実測値 475.2091.

[0119] (1-3) 化合物7の合成

[0120] [化23]



[0121] アルゴン雰囲気下にて、上記で得られた化合物6 (1.21 g, 2.67 mmol) の無水ジクロロメタン溶液 (31 mL) に2,6-ルチジン (2.20 mL, 19.0 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 (3.00 mL, 13.1 mmol) を0℃に加え、室温で20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＝10：0から9：1）により精製し、化合物7（1.43g，94%）を無色透明の粘性油状物質として得た。

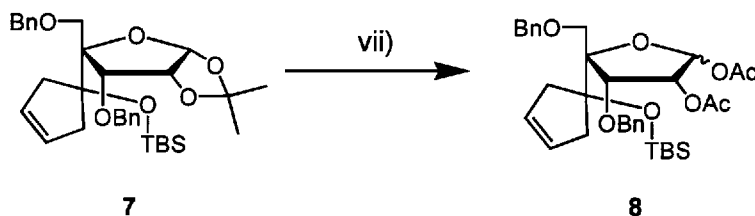
[0122] 得られた化合物7の物性データを表3に示す。

[0123] [表3]

得られた化合物7の物性データ
¹ H NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ 7.26–7.40 (m, 10H), 5.93 (d, <i>J</i> = 4.5 Hz, 1H), 5.60–5.63 (m, 2H), 4.88 (dd, <i>J</i> = 4.8, 5.9 Hz, 1H), 4.78 (d, <i>J</i> = 11.0 Hz, 1H), 4.58 (d, <i>J</i> = 11.7 Hz, 1H), 4.45 (d, <i>J</i> = 12.0 Hz, 1H), 4.38 (d, <i>J</i> = 11.0 Hz, 1H), 4.14 (d, <i>J</i> = 5.8 Hz, 1H), 3.89 (d, <i>J</i> = 8.2 Hz, 1H), 3.61 (d, <i>J</i> = 9.3 Hz, 1H), 2.88–3.15 (m, 2H), 2.39–2.70 (m, 1H), 2.20 (d, <i>J</i> = 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) C ₃₃ H ₄₆ O ₆ NaSi [M+Na] ⁺ としての計算値: 589.2956, 実測値 589.2956.

[0124] (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（911mg，1.61mmol）の酢酸溶液（1.85mL，32.3mmol）に無水酢酸（3.05mL，32.3mmol）とトリフルオロ酢酸（295μL，3.86mmol）とを0℃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（841mg，86%）を無色透明の粘性油状物質として得た。

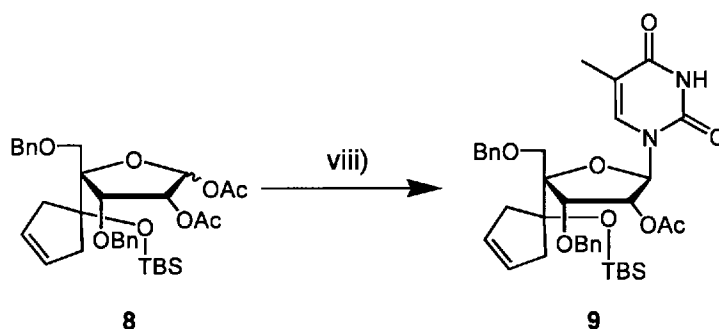
[0127] 得られた化合物8の物性データを表4に示す。

[0128] [表4]

得られた化合物 8 の物性データ
$^1\text{H NMR}$ (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) $\text{C}_{34}\text{H}_{46}\text{O}_8\text{NaSi}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 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 μL , 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 μL , 0.969 mmol) を0°C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 (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 9 (385 mg, 89%) を白色固体として得た。

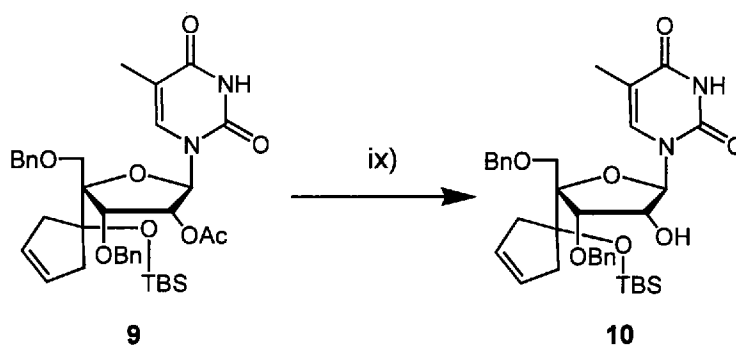
[0132] 得られた化合物 9 の物性データを表 5 に示す。

[0133] [表5]

得られた化合物 9 の物性データ
$^1\text{H NMR}$ (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); $^{13}\text{C NMR}$ (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) $\text{C}_{37}\text{H}_{48}\text{N}_2\text{O}_8\text{NaSi}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 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°C 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 (SiO_2 , 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。

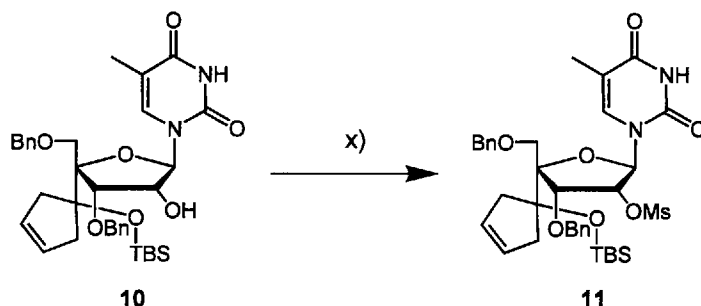
[0138]

[表6]

得られた化合物 10 の物性データ
$^1\text{H NMR}$ (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); $^{13}\text{C NMR}$ (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.

[0139] (1 – 7) 化合物 11 の合成

[0140] [化27]



[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°C で加え、室温で 4 時間撹拌した。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。

[0142] 得られた化合物 11 の物性データを表 7 に示す。

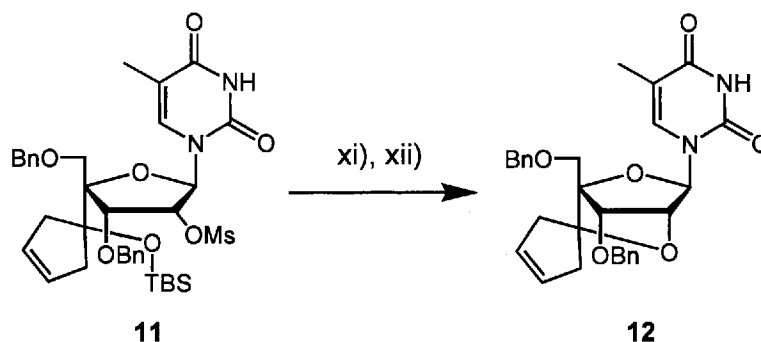
[0143]

[表7]

得られた化合物 1 1 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) $\text{C}_{36}\text{H}_{48}\text{N}_2\text{O}_9\text{Na}$ SiS $[\text{M}+\text{Na}]^+$ としての計算値: 735.2742, 実測値 735.2718.

[0144] (1 – 8) 化合物 1 2 の合成

[0145] [化28]



[0146] アルゴン雰囲気下にて、上記で得られた化合物 1 1 (992 mg, 1.39 mmol) の脱水テトラヒドロフラン溶液 (13.9 mL) 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 (4.18 mL, 4.18 mmol) を 0°C で加え、室温で 30 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 (13.9 mL) に炭酸カリウム (577 mg, 4.17 mmol) を 0°C で加え、90°C で 20 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 (SiO₂, 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。

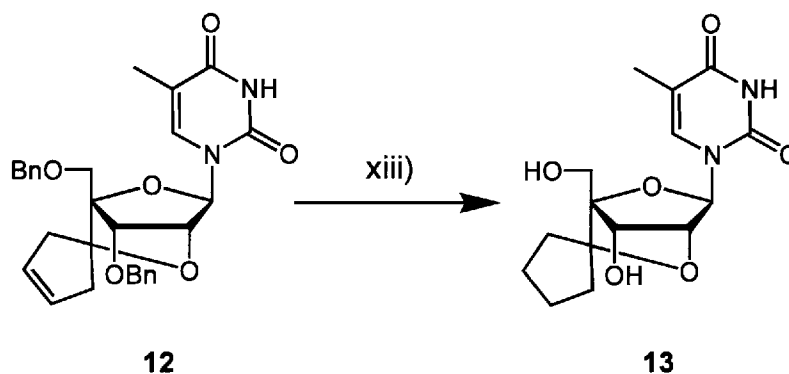
[0147] 得られた化合物 1 2 の物性データを表 8 に示す。

[0148] [表8]

得られた化合物 1 2 の物性データ
$^1\text{H NMR}$ (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, $J = 11.3$ Hz, 1H), 4.61 (s, 2 H), 4.51 (d, $J = 11.3$ Hz, 1H), 4.51 (s, 1H), 4.05 (s, 1H), 3.87 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H), 3.81 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H), 2.94 (d, $J = 18.2$ Hz, 1H), 2.66 (s, 2H), 2.58 (d, $J = 17.9$ Hz, 1H), 1.57 (s, 3H); $^{13}\text{C NMR}$ (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 (MALDI) $\text{C}_{29}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_6\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ としての計算値: 525.1996, 実測値 525.1997.

[0149] (1 - 9) 化合物 1 3 の合成

[0150] [化29]



[0151] 水素ガス雰囲気下にて、上記で得られた化合物 1 2 (1 1 0 m g , 0 . 2 1 9 m m o l) の酢酸エチル溶液 (2 . 1 5 m L) に 2 0 % 水酸化パラジウム / カーボン (4 4 m g , 4 0 重量部 (化合物 1 2 (1 0 0 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 時間攪拌した。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 (SiO_2 , クロロホルム : メタノール = 7 : 1) により精製し、化合物 1 3 (5 7 m g , 8 0 %) を白色固体として得た。

[0152] 得られた化合物 1 3 の物性データを表 9 に示す。

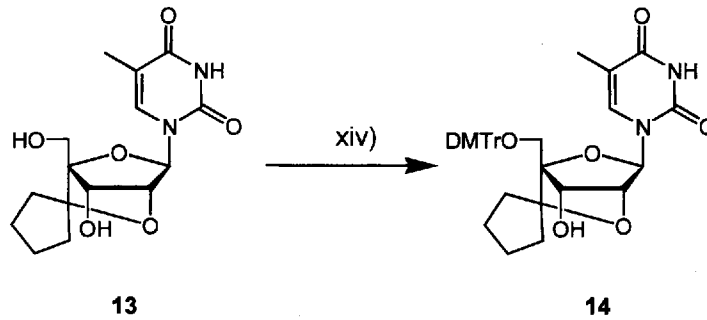
[0153]

[表9]

得られた化合物 13 の物性データ
$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CD_3OD) δ 7.78 (d, $J = 1.4$ Hz, 1H), 5.46 (s, 1H), 4.24 (s, 1H), 4.16 (s, 1H), 3.96 (d, $J = 12.7$ Hz, 1H), 3.88 (d, $J = 12.7$ Hz, 1H), 1.44–2.11 (m, 8H), 1.88 (d, $J = 1.0$ Hz, 3H); $^{13}\text{C NMR}$ (76 MHz, CD_3OD) 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) $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_6\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ としての計算値: 347.1214, 実測値 347.1209.

[0154] (1 – 10) 化合物 14 の合成

[0155] [化30]



[0156] アルゴン雰囲気下にて、上記で得られた化合物 13 (170 mg, 0.524 mmol) の無水ピリジン溶液 (5.3 mL) に 4,4'-ジメトキシトリチルクロリド (320 mg, 0.944 mmol) を 0°C で加え、室温で 8 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 (329 mg, 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。

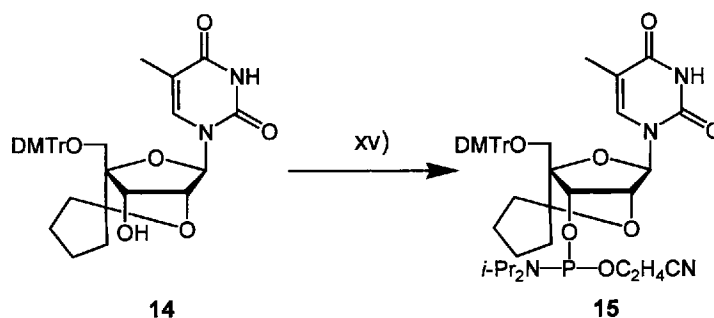
[0158]

[表10]

得られた化合物 1 4 の物性データ
$^1\text{H NMR}$ (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); $^{13}\text{C NMR}$ (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.

[0159] (1 – 1 1) 化合物 1 5 の合成

[0160] [化31]



[0161] アルゴン雰囲気下、上記で得られた化合物 1 4 (329 mg, 0.525 mmol) の無水ジクロロメタン溶液 (5.3 mL) に N,N -ジイソプロピルエチルアミン (275 μL , 1.61 mmol) と 2-シアノエチル- N,N -ジイソプロピルホスホロリダート (175 μL , 0.784 mmol) を 0°C で順次加え、室温で 8 時間攪拌した。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 1 5 (252 mg, 58%) を白色固体として得た。

[0162] 得られた化合物 1 5 の物性データを表 1 1 に示す。

[0163]

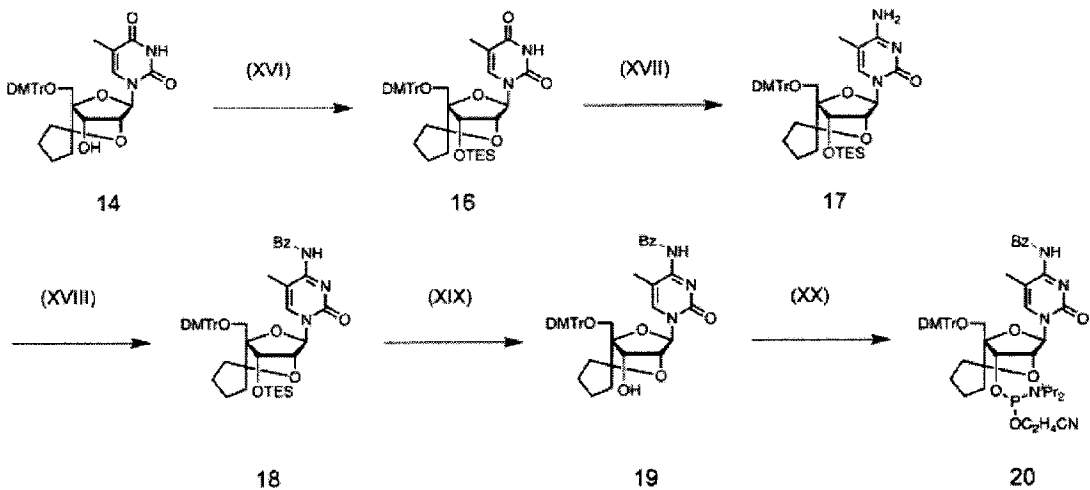
[表11]

得られた化合物 15 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, 1/2H), 4.52 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 4.37 (dd, $J = 9.3, 16.1$ Hz, 1H), 3.81 (s, 6/2H), 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.

[0164] 上記化合物 1 から化合物 15 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 15 の総収率は 22% 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 (scpBNA) の合成経路で得られる最終生成物の総収率 (18%) 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。

[0165] (実施例 2 : 架橋型ヌクレオシドの合成 (2))

[0166] [化32]

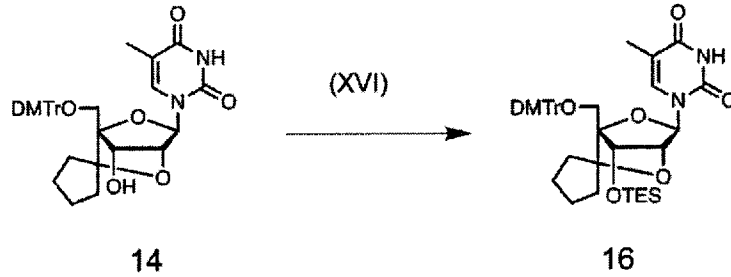


各工程の試薬および条件: (XVI) TESECl, ピリジン, 0°C から室温, 4 時間, 72%; (XVII) 1,2,4-トリアゾール, POCl_3 , MeCN, 0°C から室温, 50 分間; NH_3 水溶液, 1,4-ジオキサン, 室温, 1.5 時間, 98% (2 工程); (XVIII) BzCl, ピリジン, 0°C から室温, 2.5 時間, 62%; (XIX) TBAF, THF, 0°C から室温, 20 分間, 定量的; (XX) $(\text{Pr}_2\text{N})_2\text{POC}_2\text{H}_4\text{CN}$, DCl,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

[0167] (2-1) 化合物 16 の合成

[0168]

[化33]



[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 μmol ）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、溶媒を減圧除去した。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。

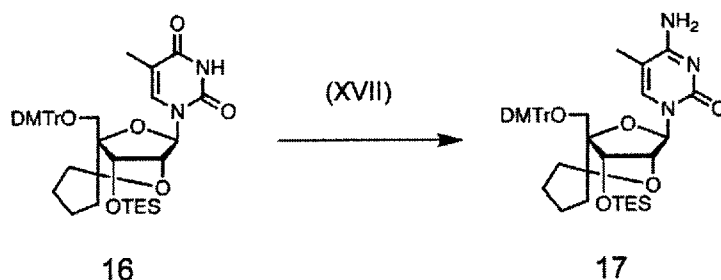
[0171] [表12]

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, <i>J</i> = 10.9 Hz, 1H), 3.44 (d, <i>J</i> = 10.9 Hz, 1H), 3.80 (s, 6H), 4.29 (s, 1H), 4.32 (s, 1H), 5.53 (s, 1H), 6.84 (d, <i>J</i> = 9.2 Hz, 2H), 6.84 (d, <i>J</i> = 9.2 Hz, 2H), 7.25–7.36 (m, 7H), 7.46 (d, <i>J</i> = 7.5 Hz, 2H), 7.79 (d, <i>J</i> = 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34]



[0174] 窒素気流下、上記で得られた化合物16 (329 mg, 444 μmol) 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 μL , 1.5 mmol) を0°C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°C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。

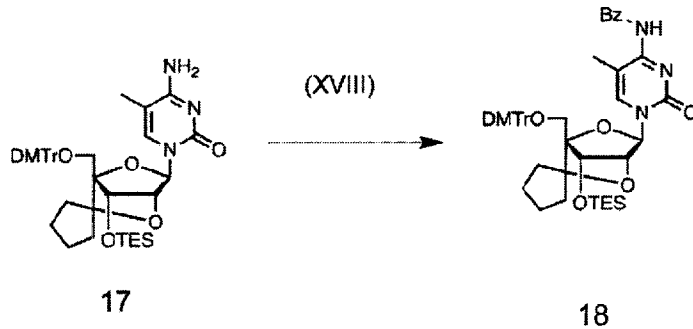
[0176] [表13]

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, $J = 10.9$ Hz, 1H), 3.44 (d, $J = 10.9$ Hz, 1H), 3.80 (s, 6H), 4.30 (s, 1H), 4.38 (s, 1H), 5.60 (s, 1H), 6.84 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 6.85 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 7.22–7.38 (m, 7H), 7.48 (d, $J = 7.5$ 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 (322mg, 0.435mmol)の無水ピリジン溶液(4.5mL)に塩化ベンゾイル(100 μ L, 0.86mmol)を0 $^{\circ}$ C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(229mg, 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。

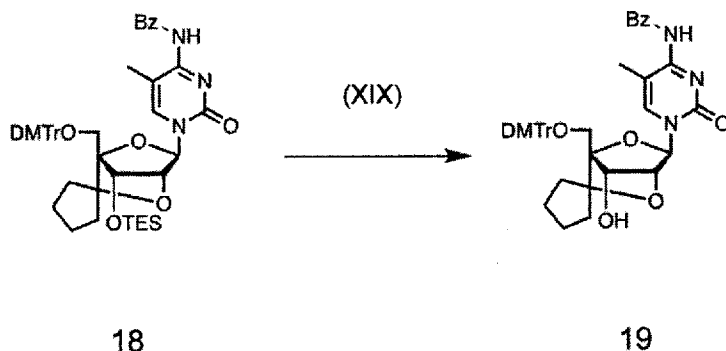
[0181] [表14]

得られた化合物18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), 1.24–1.29 (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) C ₄₉ H ₅₇ N ₃ O ₈ NaSi [M+Na] ⁺ としての計算値: 866.3813, 実測値 838.3809.

[0182] (2-4) 化合物19の合成

[0183]

[化36]



[0184] 上記で得られた化合物18 (108 mg, 121 μmol) のテトラヒドロフラン溶液 (1.2 mL) に1M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 (SiO₂, クロロホルム：メタノール＝20：1) により精製し、化合物19 (101 mg, 定量的) を白色泡状固体として得た。

[0185] 得られた化合物19の物性データを表15に示す。

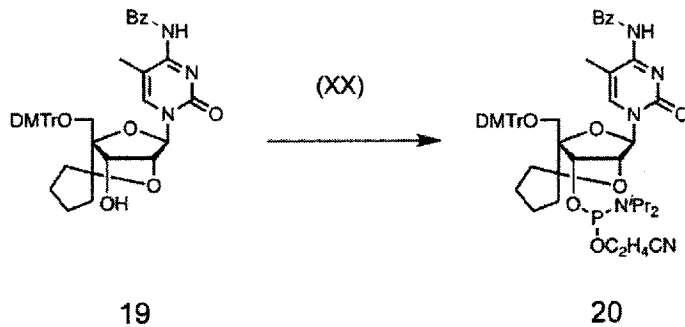
[0186] [表15]

得られた化合物19の物性データ
¹ H 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, $J = 7.2\text{Hz}$, 1H), 4.40 (s, 1H), 5.61 (s, 1H), 6.88 (d, $J = 8.9\text{Hz}$, 4H), 7.24–7.56 (m, 12H), 7.85 (s, 1H), 8.32 (d, $J = 7.2\text{Hz}$, 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) C ₄₃ H ₄₃ N ₃ O ₈ Na [M+Na] ⁺ としての計算値: 752.2948, 実測値 724.2939.

[0187] (2-5) 化合物20の合成

[0188]

[化37]



[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°C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。

[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.

[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、Proliigo社から購入した。以下のオリゴヌクレオチドを合成し

た。

ON1 : 5' -d (GCGTTYTTTGCT) - 3' (配列番号1)

ON2 : 5' -d (GCGYTYTYTGCT) - 3' (配列番号2)

ON3 : 5' -d (GCGTYYYYTGCT) - 3' (配列番号3)

ON4 : 5' -d (GCGYYYYYYGCT) - 3' (配列番号4)

ON5 : 5' -d (TTTTTTTTTTY) - 3'

ON6 : 5' -d (TTTTTTTTTYT) - 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0.1M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 Oligonucleotides Synthesizer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Activator-42 (登録商標) (Proligo社製) (0.25Mアセトニトリル溶液)を用い、縮合時間は化合物15を150秒×5に延長した。その他の操作については通常の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 (Waters社製Sep-Pak (登録商標) Plus C18 Cartridges)により精製し、さらに逆相HPLC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MALDI-TOF MS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 (10mg/mL) とクエン酸二アンモニウム水溶液 (1mg/mL) とを1:1の容量比で混合したマトリックス (1μL) 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 (50μM, 1μL) を載せて再度乾燥させ、その後MALDI-TOF MS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SHIMADZU UV-1800）を用いて260nmにおける紫外部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(GCGTYYYTTTGCT)-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(GCGTTTTTTTGCT)-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(AGCAAAAACGC)-3'（配列番号6）および一本鎖オリゴDNA 5'-d(AGCAAAAACGC)-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 μM）と塩化ナトリウム（終濃度100 mM）のリン酸緩衝液（10 mM, pH 7.2, 130 μL）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℃まで冷却し、測定を開始した。0.5℃/分で90℃または110℃まで昇温し、0.5℃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（「 $\Delta T_m/mod.$ 」）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		$T_m [\Delta T_m/mod.= T_m [修飾] - T_m [天然]] (°C)$		RNA 選択性
ID	5'-ON-3'	ssDNA	ssRNA	$T_m (RNA) - T_m (DNA) (°C)$
ON9	GCGTTTTTTGCT	51	47	-4
ON1	GCGTYTTTTGCT	52 (+1.0)	53 (+6.0)	+1
ON2	GCGYTYTYTGCT	55 (+1.3)	63 (+5.3)	+8
ON3	GCGTYYYYTGCT	53 (+0.7)	62 (+5.0)	+9
ON4	GCGYYYYYYGCT	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：



(1) X = 化合物15 (ON5 : 「scpBNA2nd-T」)

(2) X = ホスホロチオエートチミジン (「PS-T」 : 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。）

（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 μ M被験オリゴヌクレオチドと10 mM塩化マグネシウムを含む50 mMトリス塩酸緩衝液（pH 8.0）に、1.5 μ g/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 μ 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から明らかのように、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-M^eC）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ON

s 2 1、ON s 2 2、ON s 2 3 および ON d 1 の配列をそれぞれ配列番号 8 ~ 1 1 にも示す。

[0207] [表19]

ID	配列 (5'-3')	収率	算出 [M-H] ⁻	実測 [M-H] ⁻
ONs21	<u>Me</u> C [^] T [^] A [^] g [^] t [^] t [^] c [^] a [^] c [^] t [^] g [^] a [^] a [^] T [^] G [^] MeC	11%	5504.7	5504.8
ONs22	<u>Me</u> C [^] T [^] A [^] g [^] t [^] t [^] c [^] a [^] c [^] t [^] g [^] a [^] a [^] T [^] G [^] MeC	25%	5424.8	5425.9
ONs23	<u>Me</u> C [^] T [^] A [^] g [^] t [^] t [^] c [^] a [^] c [^] t [^] g [^] a [^] a [^] T [^] G [^] MeC	15%	5456.8	5457.0
ONd1	G [^] T [^] T [^] a [^] t [^] g [^] c [^] c [^] a [^] c [^] c [^] MeC [^] T [^] A	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 (C 5 7 B L / 6 J、雄) の腹腔内に、表 2 0 に示す被験オリゴヌクレオチド (2 0 m g / k g) を投与した (5 匹 / 群)。9 6 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 (A S T) およびアラニントランスアミナーゼ (A L T) の活性を自動分析装置 (F U J I F I L M 製 富士ドライケム 4 0 0 0 V) により測定した。

[0209] なお、表 2 0 に示す被験オリゴヌクレオチドについて、ON d 1 (配列番号 1 1) は、実施例 1 で作製された化合物 1 5 (s c p B N A 2 n d - 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。ON d 0 (配列番号 1 2) は、化合物 1 5 (s c p B N A 2 n d - T) をアミダイトブロックに含まない以外は ON d 1 と同様にして作製した。

[0210] [表20]

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 [^] T [^] T [^] a [^] t [^] g [^] c [^] c [^] a [^] c [^] c [^] MeC [^] T [^] 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)

[0211] 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。

[0212] [表21]

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	-

ALT/AST値: 平均 ± SD.

[0213] (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 1 5 (s c p B N A 2 n d - T) と実施例 2 で作製された化合物 2 0 (s c p B N A 2 n d - M^e C) 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 1 5 と化合物 2 0 に代えて L N A 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。

[0214] これらの 4 つのオリゴヌクレオチドの塩基配列は、M A L A T 1 に対するアンチセンス核酸として設計した。ONs01 は、化合物 1 5 と化合物 2 0 に代えて L N A 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。

[0215]

[表22]

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13)
ONs21	MeC [^] T [^] A [^] g [^] t [^] t [^] c [^] a [^] c [^] t [^] g [^] a [^] aT [^] G ^{Me} C (配列番号8)
ONs22	MeC [^] T [^] A [^] g [^] t [^] t [^] c [^] a [^] c [^] t [^] g [^] a [^] aT [^] G ^{Me} C (配列番号9)
ONs23	MeC [^] T [^] A [^] g [^] t [^] t [^] c [^] a [^] c [^] t [^] g [^] a [^] aT [^] G ^{Me} C (配列番号10)

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)

[0216] 6週齢のマウス (BALB/c AnNCrI CrIj、雌) の尾静脈に、被験オリゴヌクレオチド (20nmol : 100μM生理食塩水溶液を200μL) 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)

[0217] 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、膵臓、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。

[0218] 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。

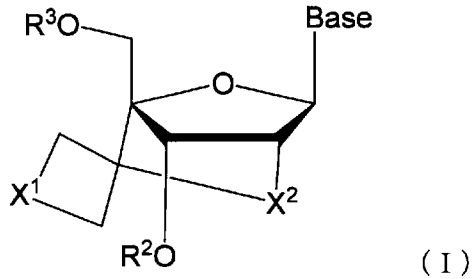
産業上の利用可能性

[0219] 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。

請求の範囲

[請求項1] 以下の式（I）で表される化合物またはその塩：

[化1]



（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

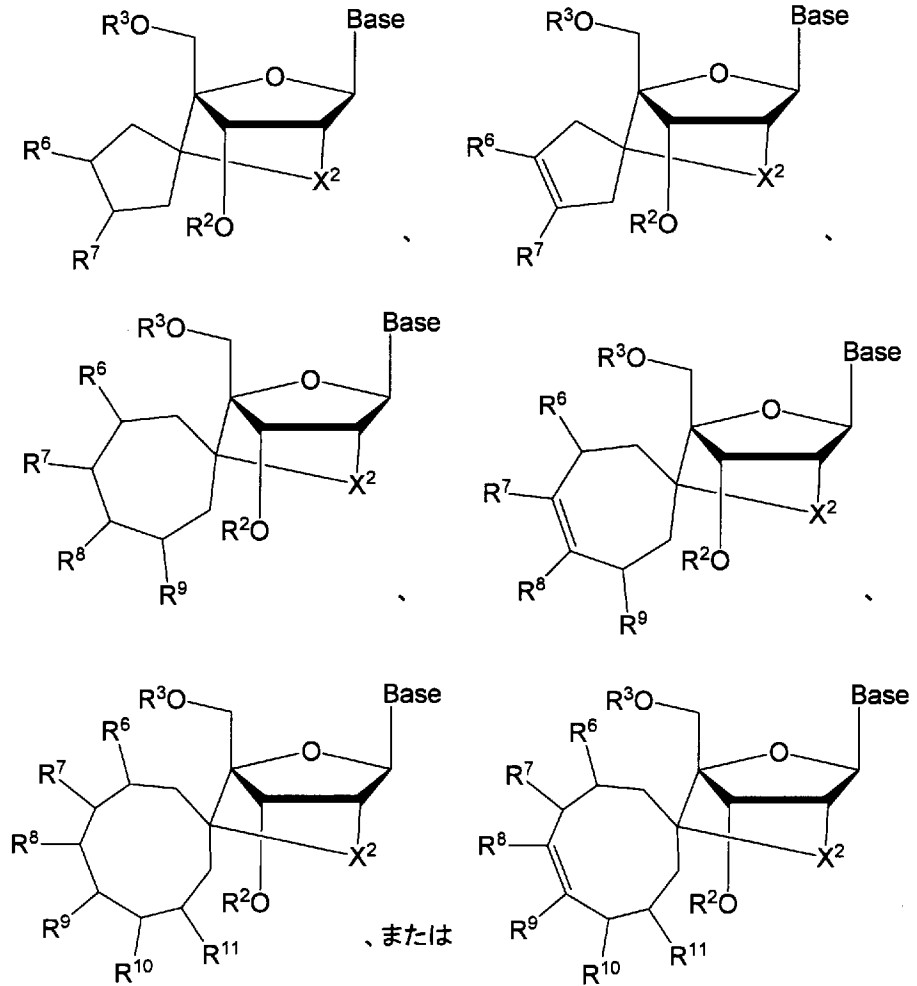
たリン酸基、 $-P(R^{4a})R^{5a}$ [式中、 R^{4a} および R^{5a} は、それぞれ独立して、水酸基、核酸合成の保護基で保護された水酸基、メルカプト基、核酸合成の保護基で保護されたメルカプト基、アミノ基、炭素数1から6のアルコキシ基、炭素数1から6のアルキルチオ基、炭素数1から6のシアノアルコキシ基、または炭素数1から6のアルキル基を有するジアルキルアミノ基を表す] を表し、

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)。

[請求項2] 前記式(1)が以下の式：

[化2]



(式中、

Baseは、 α 群から選択される任意の置換基を1以上有しているもよいプリン-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、

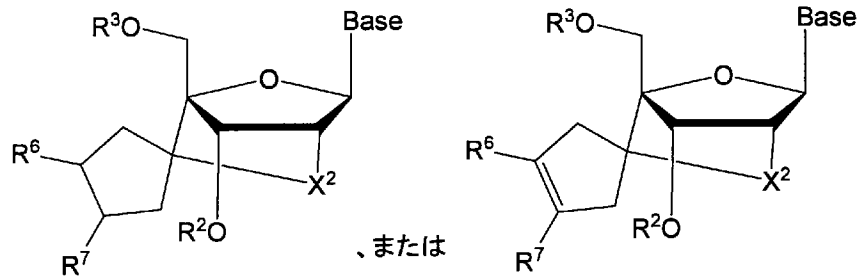
ルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数2から7のアルケニル基、該 α 群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよくそしてヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数3から10のアリール基、該 α 群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよくそしてヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数3から12のアリール部分を有するアラルキル基、該 α 群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいアシル基、該 α 群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいシリル基、該 α 群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいリン酸基、核酸合成の保護基で保護されたリン酸基、 $-P(R^{4a})R^{5a}$ [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、

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、請求項1に記載の化合物またはその塩。

[請求項3] 前記式(1)が以下の式:

[化3]



(式中、

Baseは、 α 群から選択される任意の置換基を1以上有しているもよいプリン-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以上有している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以上有している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以上有しているもよいアシル基、該 α 群から選択される任意の置換基を1以上有しているもよいシリル基、該 α 群から選択される任意の置換基を1以上有しているもよいリン酸基、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]で表される、請求項1に記載の化合物またはその塩。

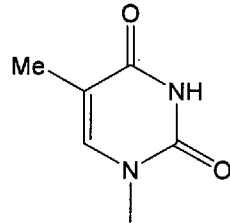
[請求項4]

前記式(1)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から3のいずれかに記載の化合物またはその塩。

[請求項5] 前記式(1)において、前記Baseが、以下の式：

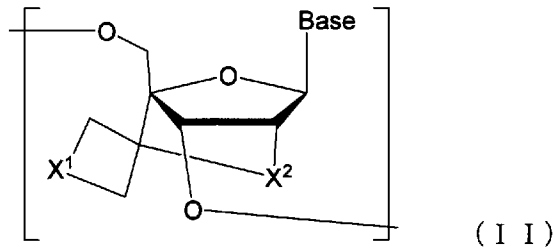
[化4]



で表される基である、請求項1から4のいずれかに記載の化合物またはその塩。

[請求項6] 以下の式(11)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：

[化5]



(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、

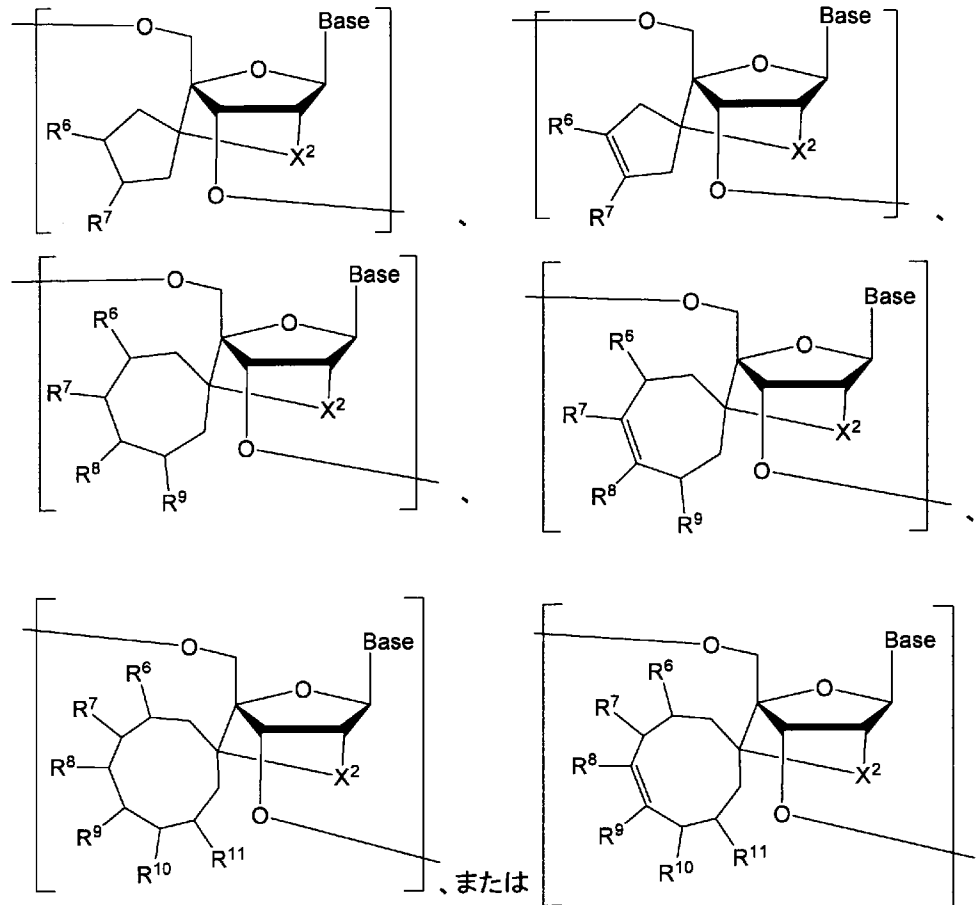
X¹は、炭素数1から3の直鎖アルキル基か、-NHR^{4b} [ここで

、 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)。

[請求項7] 前記式(11)が以下の式：

[化6]



(式中、

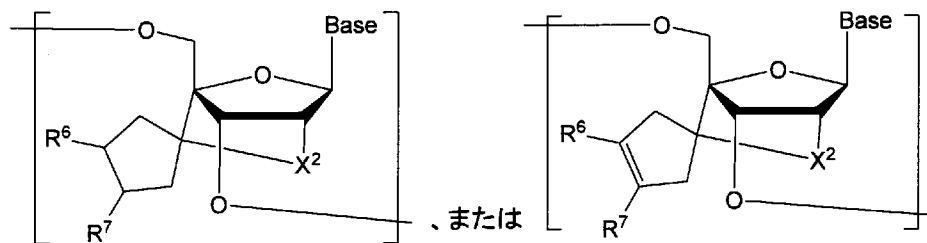
Baseは、α群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいプリン-9-イル基または2-オキソ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル基を表し、ここで、該α群は、水酸基、核酸合成の保護基で保護された水酸基、炭素数1から6の直鎖アルキル基、炭素数1から6の直鎖アルコキシ基、メルカプト基、核酸合成の保護基で保護されたメルカプト基、炭素数1から6の直鎖アルキルチオ基、アミノ基、炭素数1から6の直鎖アルキルアミノ基、核酸合成の保護基で保護されたアミノ基、およびハロゲン原子からなり、

X²は、酸素原子、硫黄原子、-NH-、N(CH₃)-またはメチレン基であり、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、請求項6に記載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。

[請求項8] 前記式(11)が以下の式:

[化7]



(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、請求項 6 に記載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。

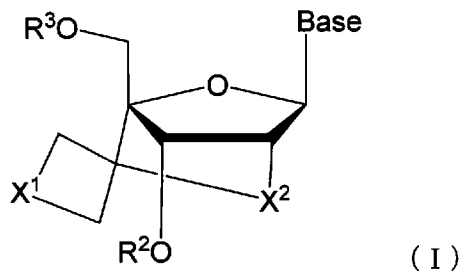
[請求項 9]

請求項 6 に記載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

:

[化 8]



(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

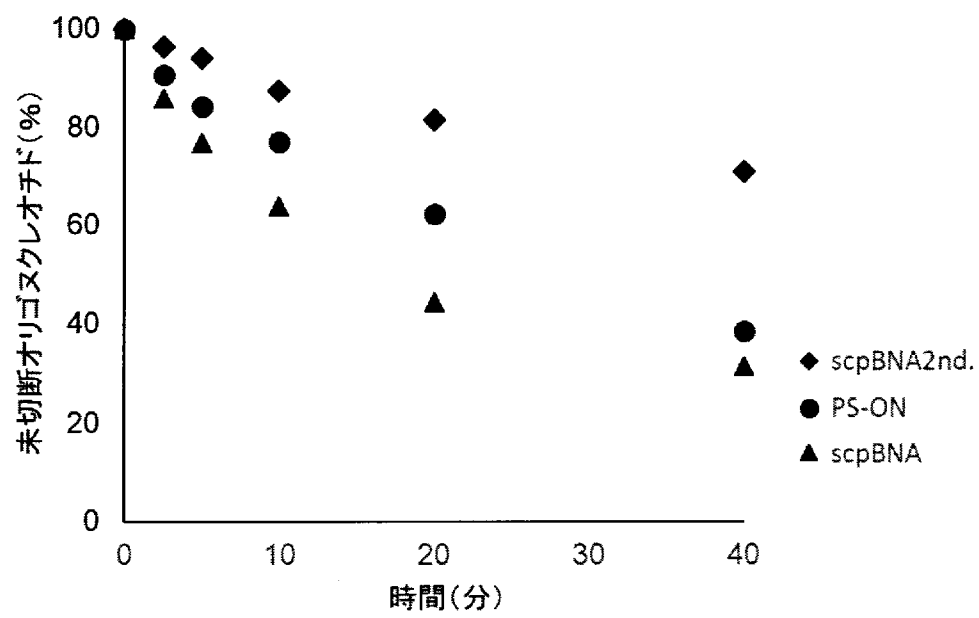
保護されたメルカプト基、炭素数1から6の直鎖アルキルチオ基、アミノ基、炭素数1から6の直鎖アルキルアミノ基、核酸合成の保護基で保護されたアミノ基、およびハロゲン原子からなり、

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、

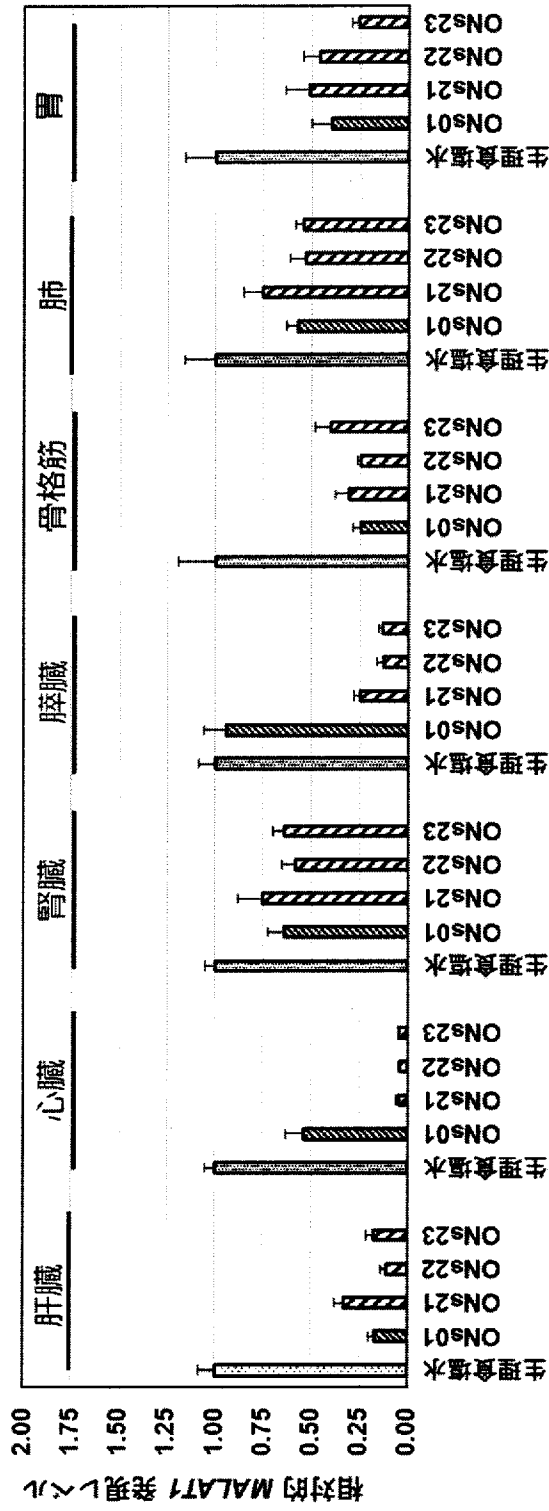
X^1 は、炭素数1から3の直鎖アルキル基か、 $-NHR^{4b}$ [ここで、 R^{4b} は水素原子または炭素数1から3の直鎖アルキル基である]か、または $-OR^{5b}$ [ここで、 R^{5b} は水素原子または炭素数1から3の直鎖アルキル基である]かで置換されていてもよい、炭素数2から8のアルキレン基；あるいは炭素数1から3の直鎖アルキル基か、 $-NHR^{4b}$ [ここで、 R^{4b} は水素原子または炭素数1から3の直鎖アルキル基である]か、または $-OR^{5b}$ [ここで、 R^{5b} は水素原子または炭素数1から3の直鎖アルキル基である]かで置換されてい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

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)
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。

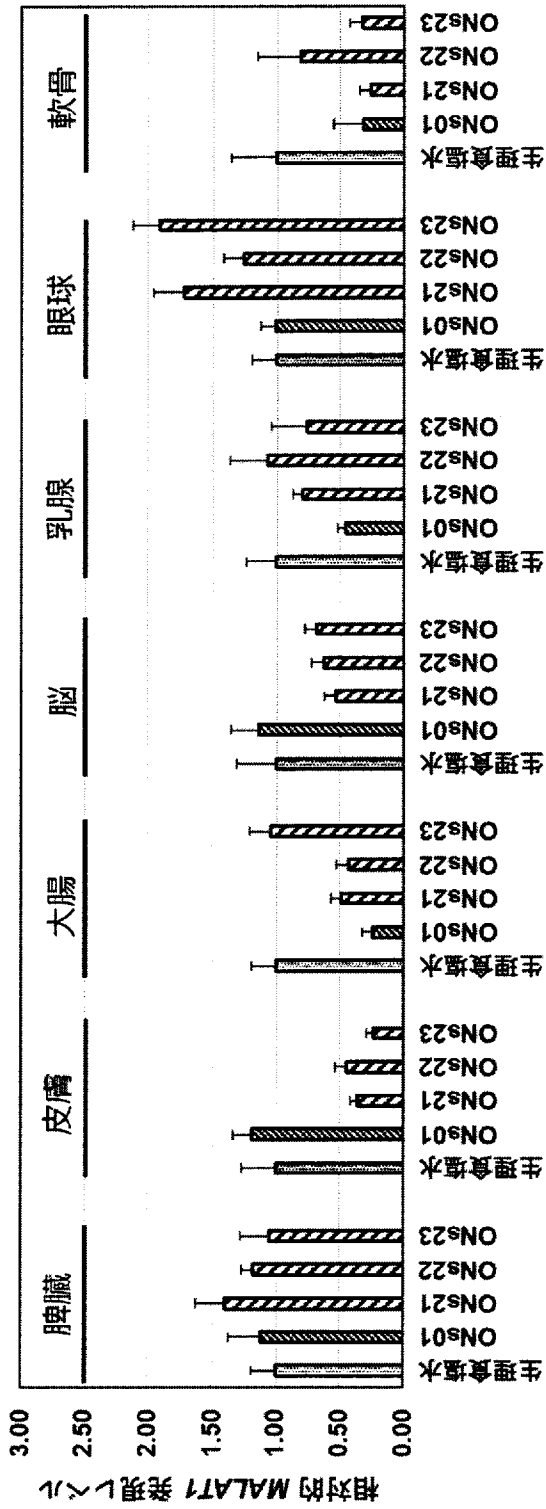
[図1]



[図2]



[図3]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/006222

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 C07H 19/06(2006.01) i; C07H 21/00(2006.01) i; C12N 15/09(2006.01) i
 FI: C07H19/06 CSP; C07H21/00; C12N15/09 Z ZNA
 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)
 C07H19/06; C07H21/00; C12N15/09

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

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2021
Registered utility model specifications of Japan	1996-2021
Published registered utility model applications of Japan	1994-2021

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
 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.
X	WO 2015/125783 A1 (OSAKA UNIVERSITY) 27 August	1-9
Y	2015 (2015-08-27) entire text, in particular, paragraphs [0011]-[0023], [0047]-[0059], examples 1-10	1-9
Y	WO 2018/155451 A1 (OSAKA UNIVERSITY) 30 August 2018 (2018-08-30) entire text, in particular, paragraphs [0014]-[0034], [0057], [0058], [0069]-[0099]	1-9
A	WO 2017/119463 A1 (OSAKA UNIVERSITY) 13 July 2017 (2017-07-13)	1-9
A	WO 2020/027227 A1 (OSAKA UNIVERSITY) 06 February 2020 (2020-02-06)	1-9
A	WO 2019/009293 A1 (OSAKA UNIVERSITY) 10 January 2019 (2019-01-10)	1-9
A	WO 2009/006478 A2 (ISIS PHARMACEUTICALS, INC.) 08 January 2009 (2009-01-08)	1-9

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 05 April 2021 (05.04.2021)	Date of mailing of the international search report 20 April 2021 (20.04.2021)
---	--

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
Information on patent family members

International application No. PCT/JP2021/006222
--

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO 2015/125783 A1	27 Aug. 2015	US 2017/0044528 A1 paragraphs [0018]- [0036], [0063]- [0072], [0094]- [0096], examples 1-10 EP 3109254 A1	
WO 2018/155451 A1	30 Aug. 2018	US 2020/0055890 A1 paragraphs [0017]- [0030], [0049], [0050], [0061]-[0126] EP 3587432 A1	
WO 2017/119463 A1	13 Jul. 2017	US 2019-0008886 A1 EP 3415524 A1	
WO 2020/027227 A1	06 Feb. 2020	(Family: none)	
WO 2019/009298 A1	10 Jan. 2019	(Family: none)	
WO 2009/006478 A2	08 Jan. 2009	US 2011/0053881 A1 EP 2176280 A2	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C07H 19/06(2006.01)i; C07H 21/00(2006.01)i; C12N 15/09(2006.01)i FI: C07H19/06 CSP; C07H21/00; C12N15/09 Z ZNA		
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）） C07H19/06; C07H21/00; C12N15/09 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 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2021年 日本国実用新案登録公報 1996-2021年 日本国登録実用新案公報 1994-2021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） CAplus/REGISTRY (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	WO 2015/125783 A1 (国立大学法人大阪大学) 27.08.2015 (2015-08-27) 文献全体、特に、[0011] ~ [0023]、[0047] ~ [0059]、 実施例1 ~ 10	1-9
Y		1-9
Y	WO 2018/155451 A1 (国立大学法人大阪大学) 30.08.2018 (2018-08-30) 文献全体、特に、[0014] ~ [0034]、[0057]、[0058]、 [0069] ~ [0099]	1-9
A	WO 2017/119463 A1 (国立大学法人大阪大学) 13.07.2017 (2017-07-13)	1-9
A	WO 2020/027227 A1 (国立大学法人大阪大学) 06.02.2020 (2020-02-06)	1-9
A	WO 2019/009298 A1 (国立大学法人大阪大学) 10.01.2019 (2019-01-10)	1-9
A	WO 2009/006478 A2 (ISIS PHARMACEUTICALS, INC.) 08.01.2009 (2009-01-08)	1-9
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" 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抵 触するものではなく、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 05.04.2021	国際調査報告の発送日 20.04.2021	
名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員（特許庁審査官） 小森 潔 4P 3762 電話番号 03-3581-1101 内線 3492	

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
 PCT/JP2021/006222

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO 2015/125783 A1	27.08.2015	US 2017/0044528 A1 [0018]-[0036], [0063]- [0072], [0094]-[0096], Ex amples 1-10 EP 3109254 A1	
WO 2018/155451 A1	30.08.2018	US 2020/0055890 A1 [0017]-[0030], [0049], [0050], [0061]-[0126] EP 3587432 A1	
WO 2017/119463 A1	13.07.2017	US 2019-0008886 A1 EP 3415524 A1	
WO 2020/027227 A1	06.02.2020	(ファミリーなし)	
WO 2019/009298 A1	10.01.2019	(ファミリーなし)	
WO 2009/006478 A2	08.01.2009	US 2011/0053881 A1 EP 2176280 A2	