

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2007-15948

(P2007-15948A)

(43) 公開日 平成19年1月25日(2007.1.25)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C O 7 H 19/23 (2006.01)	C O 7 H 19/23 C S P	4 B O 2 4
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 C O 5 7

審査請求 未請求 請求項の数 11 O L (全 21 頁)

(21) 出願番号 特願2005-196680 (P2005-196680) (22) 出願日 平成17年7月5日 (2005.7.5)	(71) 出願人 304021417 国立大学法人東京工業大学 東京都目黒区大岡山2丁目12番1号
特許法第30条第1項適用申請有り 平成17年1月7日 東京工業大学主催の「生命理工学研究科分子生命科学専攻 平成16年度博士論文発表会」において文書をもって発表	(74) 代理人 100104684 弁理士 関根 武
特許法第30条第1項適用申請有り 平成17年3月11日 社団法人日本化学会発行の「日本化学会第85春季年会 講演予稿集 2」に発表	(74) 代理人 100100413 弁理士 渡部 温 (72) 発明者 関根 光雄 神奈川県横浜市緑区長津田町4259番地 国立大学法人 東京工業大学内 (72) 発明者 宮田 健一 神奈川県横浜市緑区長津田町4259番地 国立大学法人 東京工業大学内
最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】ヌクレオシド誘導体

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 蛍光特性に優れると共に、蛍光スペクトルが長波長シフトした、核酸塩基の誘導体を提供する。

【解決手段】 ヌクレオシド誘導体は(2-デオキシ-β-D-リボフラノシル)-ジヒドロピロロピリミドピリミジンジオン等のピリミドピリミジンを有するヌクレオシド誘導体。

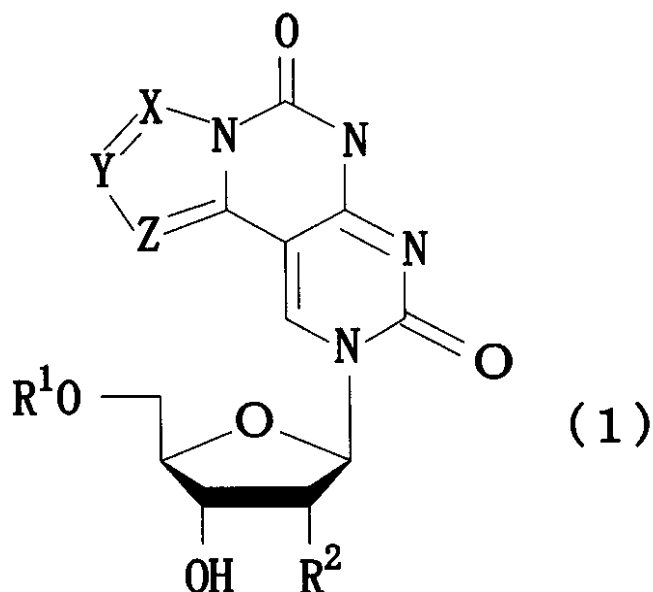
【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記一般式（1）で表わされるヌクレオシド誘導体。

【化 1】



10

20

（上記式中、 R^1 は、水素、又はアルコキシ基を有していてもよいトリチル基を表し、 R^2 は水素、アルコキシ基、アルコキシアルキルオキシ基、2-シアノエチル基、水酸基、又はハロゲンを表し、X、Y及びZは、同一であっても異なってもよく、N又はC R^3 を表わし、 R^3 は、水素、アルキル基、ニトロ基、アミノ基、ジアルキルアミノ基、シアノ基、アリール基、ヘテロアリール基、又はアルコキシ基を表わす。また、X及びY、又はY及びZが共にC R^3 で表される場合には、それらが互いに結合して環構造を形成していてもよい。）

30

【請求項 2】

X、Y及びZがCHである、請求項 1 に記載のヌクレオシド誘導体。

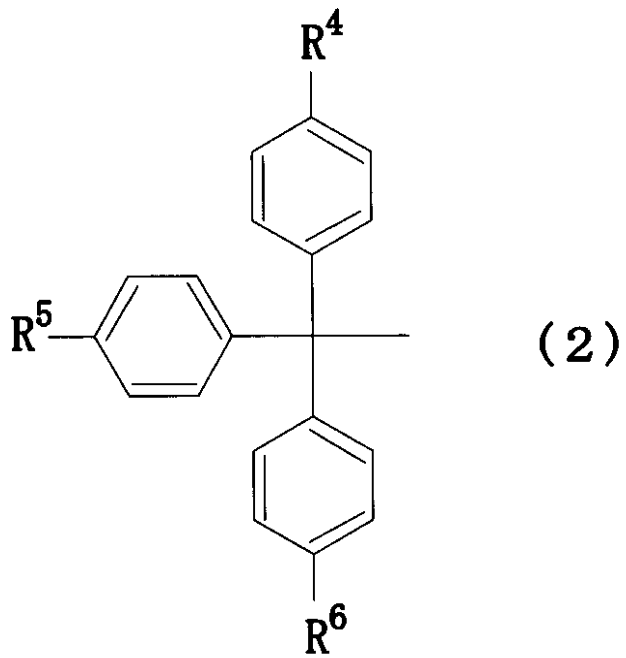
【請求項 3】

R^1 が水素である、請求項 1 又は 2 に記載のヌクレオシド誘導体。

【請求項 4】

R^1 が、下記一般式（2）で表わされる基である、請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載のヌクレオシド誘導体。

【化 2】



10

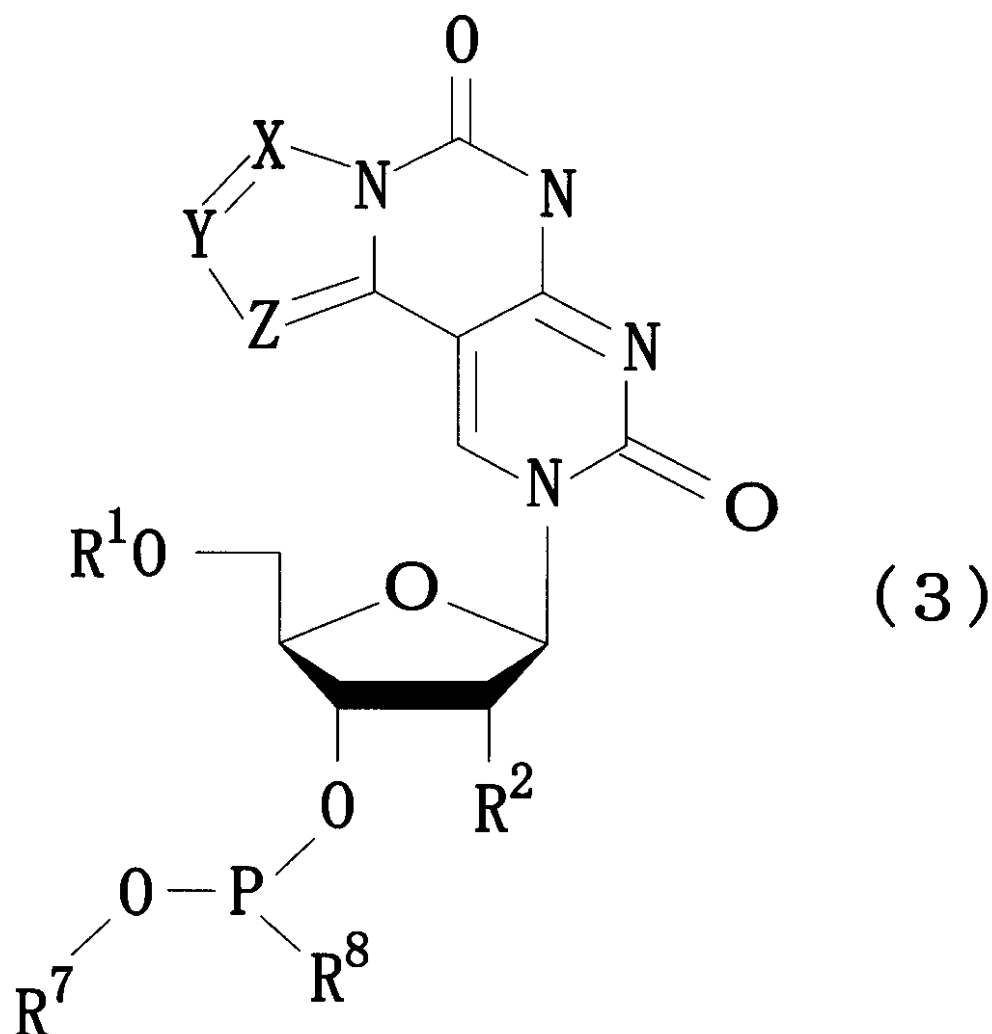
20

(上記式中、 R^4 、 R^5 、 R^6 は、同一であっても異なってもよく、水素、又はアルコキシ基である。)

【請求項 5】

下記一般式 (3) で表わされるヌクレオシド誘導体。

【化 3】



(上記式中、 R^1 は、水素、又はアルコキシ基を有していてもよいトリチル基を表し、 R^2 は水素、アルコキシ基、アルコキシアルキルオキシ基、2-シアノエチル基、水酸基、又はハロゲンを表し、X、Y及びZは、同一であっても異なってもよく、N又はC R³を表わし、 R^3 は、水素、アルキル基、ニトロ基、アミノ基、ジアルキルアミノ基、シアノ基、アリール基、ヘテロアリール基、又はアルコキシ基を表わし、 R^7 はリン酸保護基を表し、 R^8 は窒素原子上に炭素数1～6個の同一又は異なるアルキル基が2個結合したジアルキルアミノ基を表す。また、X及びY、又はY及びZが共にC R³で表される場合には、それらが互いに結合して環構造を形成していてもよい。)

【請求項 6】

X、Y及びZがCHである、請求項 5 に記載のヌクレオシド誘導体。

【請求項 7】

R^1 が水素である、請求項 5 又は 6 に記載のヌクレオシド誘導体。

【請求項 8】

R^1 が、下記一般式 (2) で表わされる基である、請求項 5 ～ 7 のいずれか 1 項に記載のヌクレオシド誘導体。

10

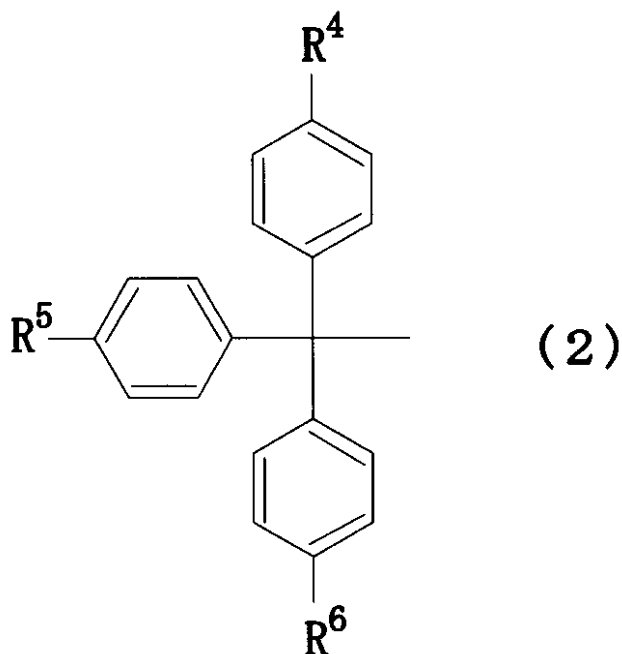
20

30

40

50

【化 4】



10

20

(上記式中、 R^4 、 R^5 、 R^6 は、同一であっても異なってもよく、水素、又はアルコキシ基である。)

【請求項 9】

請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載のヌクレオシド誘導体からなる群から選択された少なくとも 1 種のヌクレオシド誘導体を含むオリゴ核酸。

【請求項 10】

オリゴ DNA 又はオリゴ RNA である、請求項 9 に記載のオリゴ核酸。

【請求項 11】

請求項 9 又は 10 に記載のオリゴ核酸を含んでなる、遺伝子解析用プローブ。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヌクレオシド誘導体に関する。特に、蛍光特性に優れると共に、蛍光スペクトルが長波長シフトした、ヌクレオシド誘導体に関する。

【背景技術】

【0002】

DNA や RNA の構成単位であるヌクレオシドは、リボースやデオキシリボースにアデニン、チミン、グアニン、シトシン、ウラシルのいずれかの塩基が結合した化合物である。これらの塩基のうち、アデニンとチミン（ウラシル）、又はグアニンとシトシンとは互いに水素結合を介して結合する塩基対形成能を有しており、この塩基対形成能を用いた DNA と DNA、RNA と RNA、DNA と RNA 同士の分子認識は生命体の遺伝情報の維持、発現、制御の分子メカニズムである。また、この分子認識現象は遺伝子解析、遺伝子増幅、クローニング、核酸医薬による遺伝子発現制御等、遺伝子工学、分子生物学、医学における人為的遺伝子制御の手法の基板となる技術である。

40

【0003】

近年においては、化学合成された核酸が、PCR プローブや DNA チップ等に用いられ

50

たり、アンチセンスや S i R N A 等の遺伝子制御法、超分子化学等の様々な分野で用いられるようになってきている。これらの技術には、天然型の核酸のみならず、人工的に化学修飾を施して合成された機能性人工核酸が利用されるようになってきた。

【0004】

このような人工核酸として、例えば、周囲の環境によって蛍光特性が変化する人工核酸塩基を有するヌクレオシド誘導体は、D N A や R N A の高次構造の研究のみならず、リボザイム、アプタマー、アンチセンス核酸等の機能性核酸及び核酸医薬素材の標識分子として有用である。また、近年においては、塩基対形成時に塩基対を形成する塩基に応じて、その蛍光特性が変化し得る蛍光人工核酸塩基が種々報告されており、S N P s 解析等に応用されるようになってきている。このような環境応答型の蛍光人工核酸塩基には、蛍光分子を天然核酸塩基に連結したもの、又は人工核酸塩基そのものに蛍光特性を有するものがある。

10

【0005】

シトシン塩基の誘導体においては、蛍光分子を天然核酸塩基に連結したものとして、非特許文献1には、蛍光分子としてピレン残基を天然核酸塩基に直接連結した誘導体が、非特許文献2には、エチニル基を介して連結した誘導体が、非特許文献3には、フルオレン残基を連結した誘導体が報告されている。

【0006】

また、人工核酸塩基そのものに蛍光特性を有するものとしては、蛍光性シトシン塩基誘導体が種々報告されている。例えば、非特許文献4には、蛍光特性をもつ、ピリドピリミジン骨格を有する誘導体が、非特許文献5には、蛍光特性をもつ、ペンゾピリミジン骨格を有する誘導体が、非特許文献6には、蛍光特性をもつ、ピロロピリミジン骨格を有する誘導体が報告されている。

20

【0007】

また、特許文献1には、塩基対形成時に、塩基対を形成する塩基に応じて、その蛍光特性が変化し得る蛍光人工核酸塩基として、ピリミドピリミジン骨格を有する人工核酸塩基が開示されている。該公報に開示された人工核酸塩基は、天然型シトシン塩基と同様に、グアニン塩基と塩基対を形成することができるのみならず、アデニン塩基とも塩基対を形成することのできる人工核酸である。また、その蛍光特性はグアニン塩基と塩基対を形成した場合にのみ大きく消光するので、S N P s 解析に応用が可能である。

30

【0008】

上述したように、蛍光特性を有するシトシン塩基誘導体については、報告例があるが、いずれの誘導体も、蛍光特性が実用化するほどの強度を有していないため、実用化に至っていないのが現状である。また、蛍光スペクトルに関しても、更に長波長にシフトしたものが望まれている。

【0009】

【非特許文献1】Chem.Commun., 2003 p1878-1879)

【非特許文献2】Tetrahyd.Lett., 2004, vol.45 p3543-3546)

【非特許文献3】J.Am.Chem.Soc., 2004, vol.126, p6528-6529)

【非特許文献4】Nucl.Acids Res. Vol.13, p7119-128)

40

【非特許文献5】J.Am.Chem.Soc., 2003, vol.125, p9296-9297)

【非特許文献6】Tetrahyd.Lett. vol.45, p2457-2461)

【特許文献1】特開2005-15395号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

従って、本発明の目的は、蛍光特性に優れると共に、蛍光スペクトルが長波長シフトした、核酸塩基の誘導体を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0011】

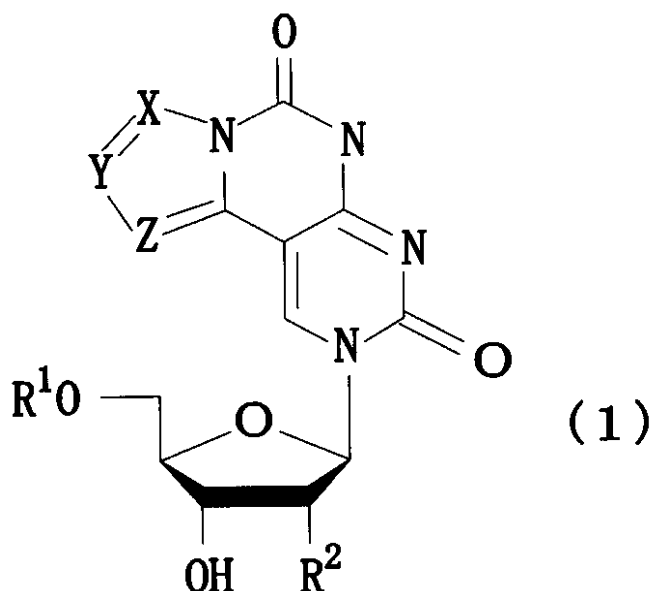
50

上記目的を達成するため、本発明者らは鋭意検討した結果、ピリミドピリミジンを修飾することにより得られる、特定の構造を有するヌクレオシド誘導体が、上記目的を達成し得るという知見を得た。

本発明は、上記知見に基づいてなされたものであり、下記一般式（１）で表わされるヌクレオシド誘導体を提供するものである。

【 0 0 1 2 】

【化 1】



【 0 0 1 3 】

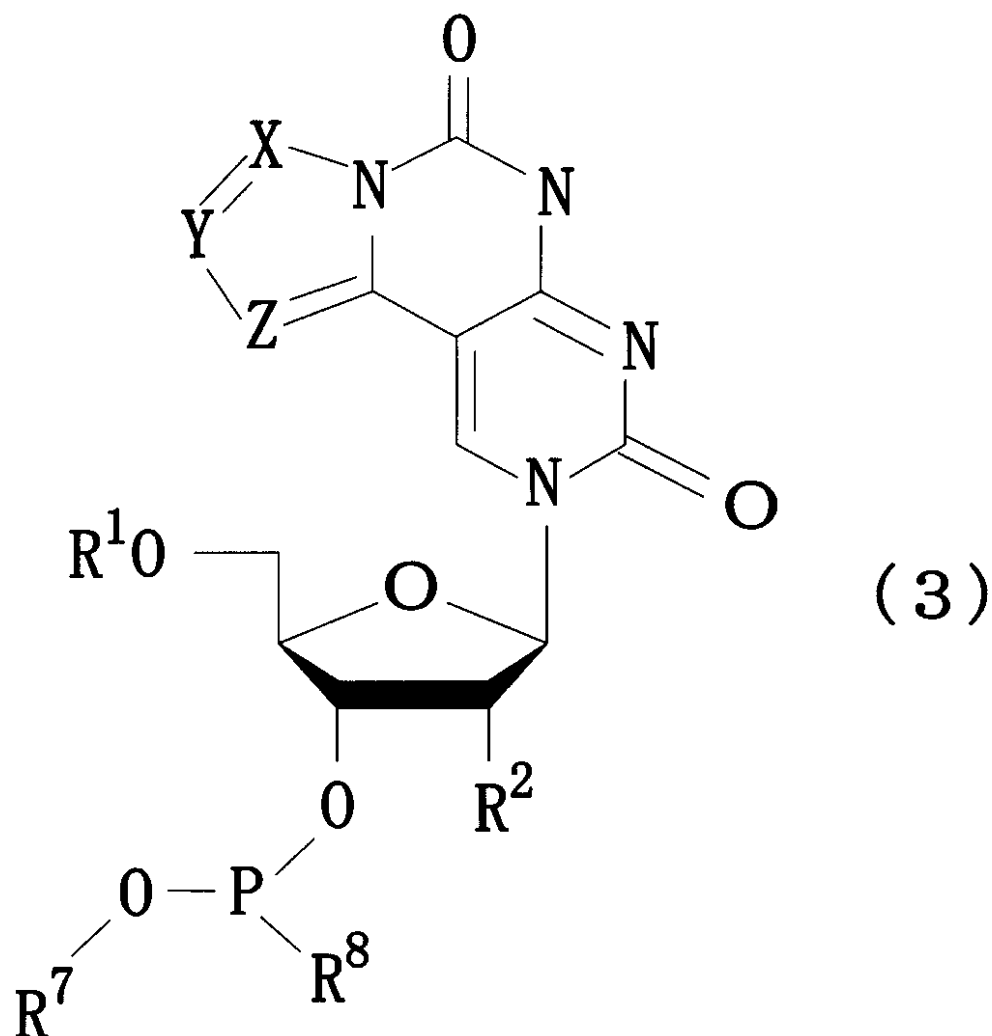
(上記式中、 R^1 は、水素、又はアルコキシ基を有していてもよいトリチル基を表し、 R^2 は水素、アルコキシ基、アルコキシアルキルオキシ基、2-シアノエチル基、水酸基、又はハロゲンを表し、X、Y及びZは、同一であっても異なってもよく、N又は CR^3 を表わし、 R^3 は、水素、アルキル基、ニトロ基、アミノ基、ジアルキルアミノ基、シアノ基、アリール基、ヘテロアリール基、又はアルコキシ基を表わす。また、X及びY、又はY及びZが共に CR^3 で表される場合には、それらが互いに結合して環構造を形成していてもよい。)

【 0 0 1 4 】

また、本発明は、下記一般式（３）で表わされるヌクレオシド誘導体を提供する。

【 0 0 1 5 】

【化 2】



【0016】

(上記式中、 R^1 は、水素、又はアルコキシ基を有していてもよいトリチル基を表し、 R^2 は水素、アルコキシ基、アルコキシアルキルオキシ基、2-シアノエチル基、水酸基、又はハロゲンを表し、X、Y及びZは、同一であっても異なってもよく、N又はCR³を表わし、 R^3 は、水素、アルキル基、ニトロ基、アミノ基、ジアルキルアミノ基、シアノ基、アリール基、ヘテロアリール基、又はアルコキシ基を表わし、 R^7 はリン酸保護基を表し、 R^8 は窒素原子上に炭素数1～6個の同一又は異なるアルキル基が2個結合したジアルキルアミノ基を表す。また、X及びY、又はY及びZが共にCR³で表される場合には、それらが互いに結合して環構造を形成していてもよい。)

【0017】

10

20

30

40

50

また、本発明は、上記ヌクレオシド誘導体を含むオリゴ核酸を提供する。

また、本発明は、上記オリゴ核酸を含んでなる、遺伝子解析用プローブを提供する。

【発明の効果】

【0018】

本発明のヌクレオシド誘導体は、優れた蛍光特性を有すると共に、蛍光スペクトルが長波長シフトしたものである。本発明のヌクレオシド誘導体の優れた蛍光特性により発する蛍光を検出することにより、例えば、ハイブリダイゼーションの様子を容易に検出することができる。従って、本発明のヌクレオシド誘導体は遺伝子検出及び遺伝子診断等の様々な分野で利用することが可能である。

【発明を実施するための最良の形態】

10

【0019】

以下、本発明のヌクレオシド誘導体について説明する。

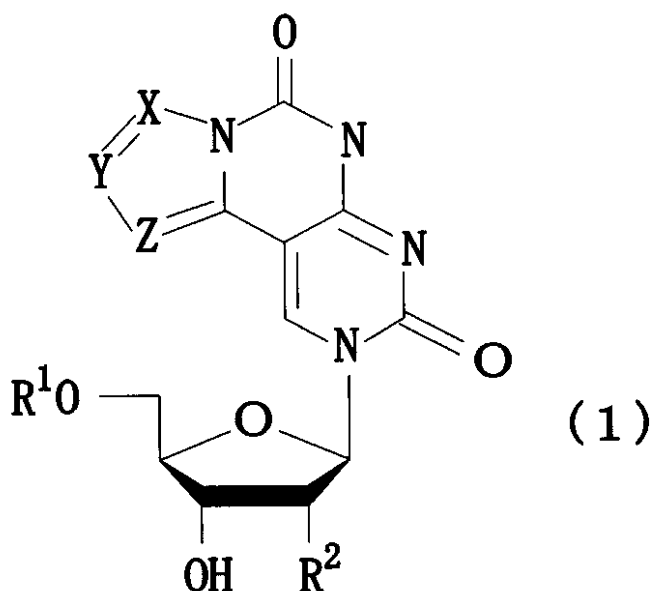
本発明は、第一の態様として、下記一般式（1）で表わされるヌクレオシド誘導体に係る。また、本発明は、第二の態様として、下記一般式（3）で表わされるヌクレオシド誘導体に係る。

まず、本発明の第一の態様に係る、下記一般式（1）で表わされるヌクレオシド誘導体について説明する。

【0020】

【化3】

20



30

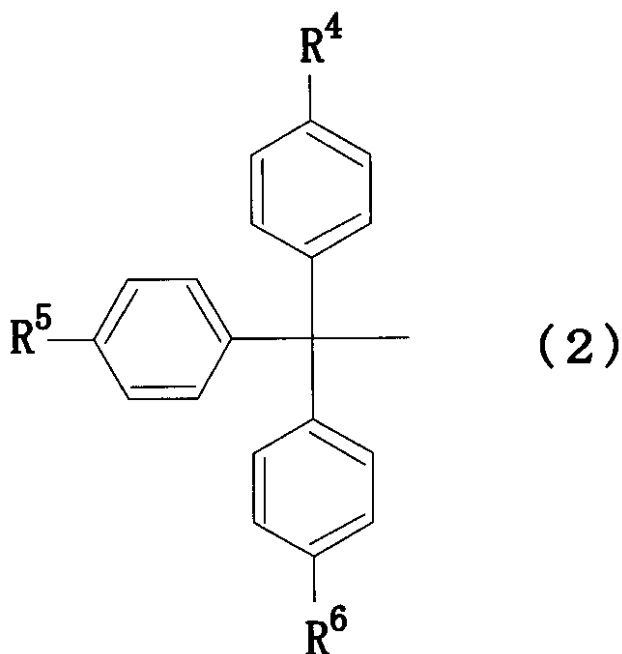
【0021】

40

上記一般式（1）において、 R^1 は、水素、又はアルコキシ基を有していてもよいトリチル基を表す。アルコキシ基としては、例えば、メトキシ基、エトキシ基、プロポキシ基、1-ブチルオキシ基、1-ペンチルオキシ基、1-ヘキシルオキシ基等が挙げられる。 R^1 としては、具体的には、下記一般式（2）で表わされる基が挙げられる。

【0022】

【化 4】



10

20

【0023】

上記一般式(2)において、 R^4 、 R^5 及び R^6 は、同一であっても異なってもよく、水素又はアルコキシ基である。アルコキシ基としては、例えば、メトキシ基、エトキシ基、プロポキシ基、1-ブチルオキシ基、1-ペンチルオキシ基、1-ヘキシルオキシ基等が挙げられる。

上記一般式(1)において、 R^2 は水素、アルコキシ基、アルコキシアルキルオキシ基、2-シアノエチル基、水酸基、又はハロゲンを表す。アルコキシ基としては、例えば、メトキシ基、エトキシ基、プロポキシ基、1-ブチルオキシ基、1-ペンチルオキシ基、1-ヘキシルオキシ基等が挙げられ、ハロゲンとしては、フッ素、塩素、臭素が挙げられる。

30

【0024】

また、上記一般式(1)において、X、Y及びZは、同一であっても異なってもよく、N又は CR^3 を表わす。ここで、 R^3 は、水素、アルキル基、ニトロ基、アミノ基、ジアルキルアミノ基、シアノ基、アリール基、ヘテロアリール基、又はアルコキシ基を表わし、アルキル基としては、メチル基、エチル基、プロピル基、n-ブチル基、イソブチル基、ペンチル基、ヘキシル基などのアルキル基を示し、イソプロピル基、sec-ブチル基、tert-ブチル基、ネオペンチル基などのように分枝したアルキル基、シクロプロピル基、シクロブチル基、シクロペンチル基、シクロヘキシル基等のシクロアルキル基を含む。

40

【0025】

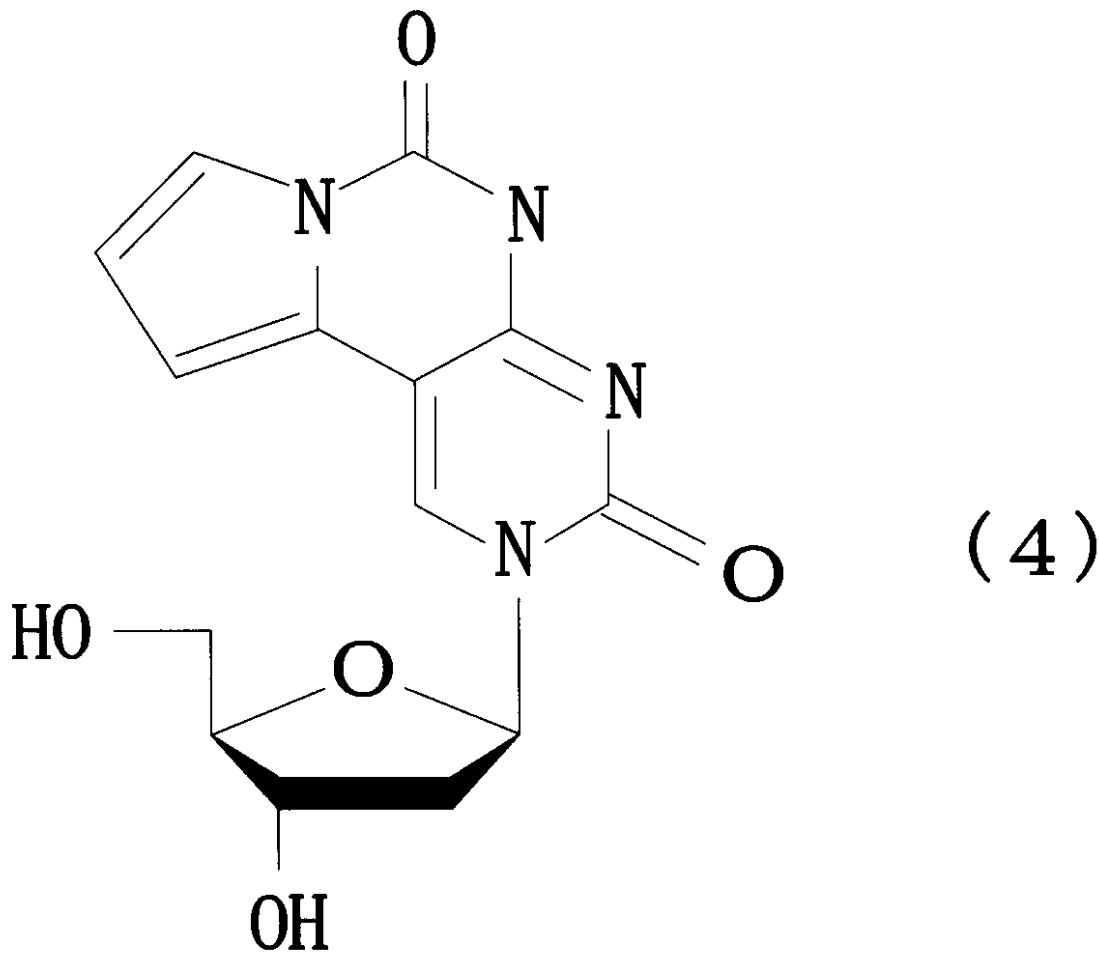
本発明の一般式(1)で表わされるヌクレオシド誘導体としては、例えば、X、Y及びZがCHであり、 R^1 及び R^2 が水素である、ピロロピリミドピリミジン誘導体(2-デオキシ- β -D-リボフラノシル)-ジヒドロピロロピリミジンジオン、下記式(4)で表わされる化合物)が挙げられる。また、本発明の一般式(1)で表わされるヌクレオシド誘導体としては、例えば、X、Y及びZがCHであり、 R^1 がアルコキシ基を有するトリチル基であり、 R^2 が水素であり、 R^4 及び R^5 がメトキシ基である、ピロロピリミドピリミジン誘導体(2-デオキシ-5-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)- β -D-リボフラノシル)-ジヒドロピロロピリミジンジオン、式(5)で表わされる化合物)が挙げられる。

50

また、X 及び Y、又は Y 及び Z が共に CR^3 で表される場合には、それらが互いに結合して環構造を形成していてもよい。環構造としては、例えばベンゼン環等が挙げられ、ベンゼン環にアルキル基、ニトロ基、アミノ基、ジアルキルアミノ基、シアノ基、アリール基、ヘテロアリール基、アルコキシ基等が 1 個以上結合している場合も含まれる。

【0026】

【化 5】



【0027】

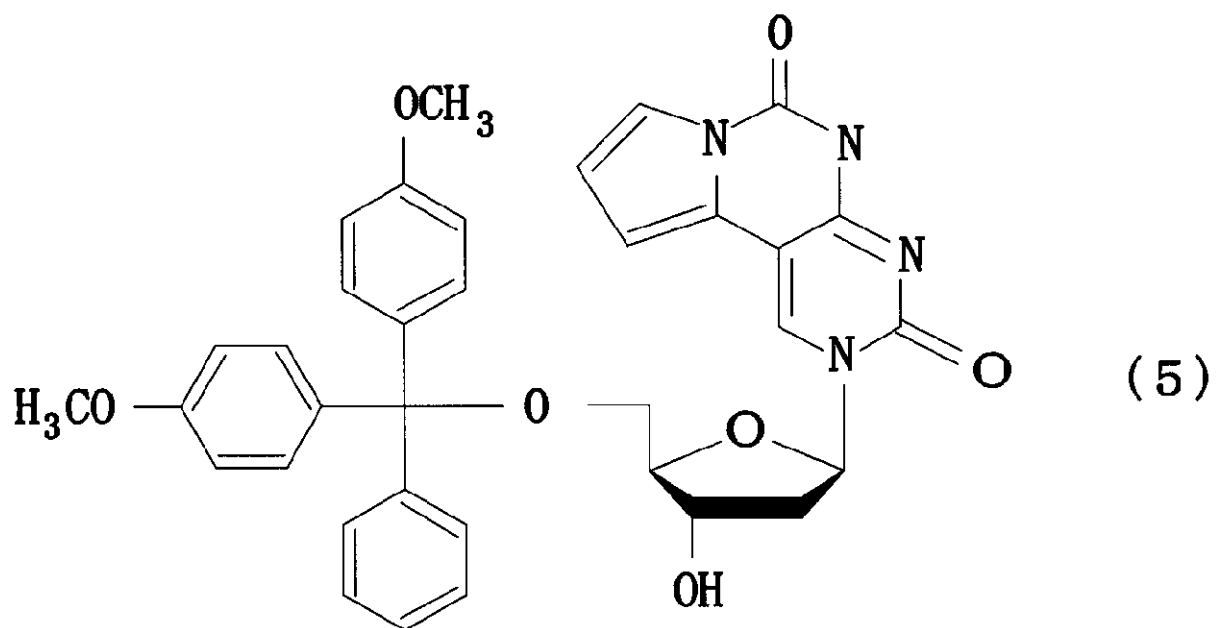
10

20

30

40

【化 6】



10

20

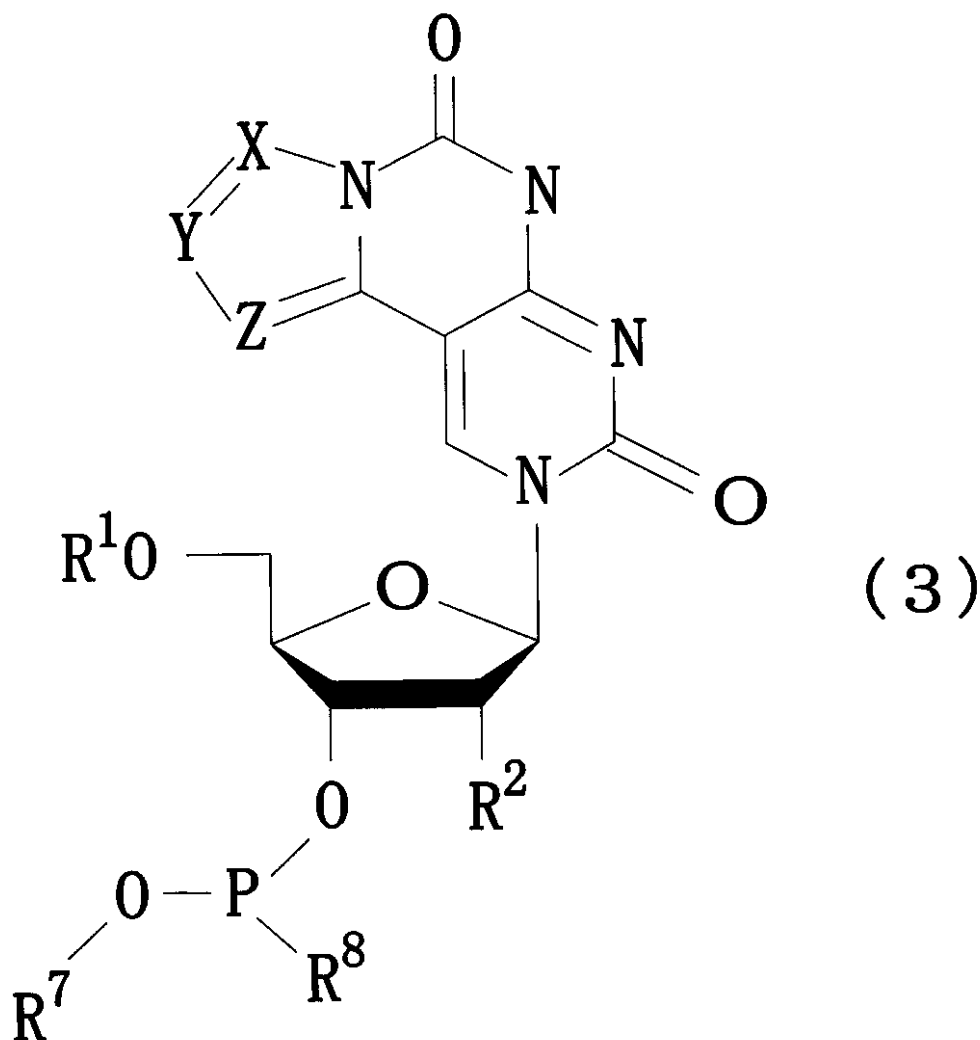
【0028】

次に、本発明の第二の態様に係る、下記一般式（1）で表わされるヌクレオシド誘導体について説明する。本発明の第二の態様に係るヌクレオシド誘導体は、下記一般式（3）で表わされる。

30

【0029】

【化 7】



【0030】

上記一般式(3)において、 R^1 は、水素、又はアルコキシ基を有していてもよいトリチル基を表す。アルコキシ基としては、例えば、メトキシ基、エトキシ基、プロポキシ基、1-ブチルオキシ基、1-ペンチルオキシ基、1-ヘキシルオキシ基等が挙げられる。また、 R^2 は水素、アルコキシ基、アルコキシアルキルオキシ基、2-シアノエチル基、水酸基、又はハロゲンを表す。アルコキシ基としては、例えば、メトキシ基、エトキシ基、メトキシ基、エトキシ基、プロポキシ基、1-ブチルオキシ基、1-ペンチルオキシ基、1-ヘキシルオキシ基等が挙げられ、ハロゲンとしては、フッ素、塩素、臭素が挙げられる。

【0031】

また、上記一般式(3)において、X、Y及びZは、同一であっても異なってもよく、N又は CR^3 を表わす。ここで、 R^3 は、水素、アルキル基、ニトロ基、アミノ基、ジアルキルアミノ基、シアノ基、アリール基、ヘテロアリール基、又はアルコキシ基を表わし、アルキル基としては、メチル基、エチル基、プロピル基、n-ブチル基、イソブチル基、ペンチル基、ヘキシル基などのアルキル基を示し、イソプロピル基、sec-ブチル基、tert-ブチル基、ネオペンチル基などのように分枝したアルキル基、シクロブ

ロピル基、シクロブチル基、シクロペンチル基、シクロヘキシル基等のシクロアルキル基を含む。

【0032】

上記一般式(3)において、 R^7 はリン酸保護基を表す。リン酸保護基としては、通常のリソ酸保護基であれば特に制限なく用いることができ、例えば、メチル基、2-シアノエチル基、2-トリメチルシリルエチル基等が挙げられる。

また、 R^8 は窒素原子上に炭素数1～6個の同一又は異なるアルキル基が2個結合したジアルキルアミノ基を表す。ジアルキルアミノ基としては、例えば、ジエチルアミノ基、ジイソプロピルアミノ基、ジメチルアミノ基等が挙げられる。

【0033】

本発明の一般式(3)で表わされるヌクレオシド誘導体としては、例えば、X、Y及びZがCHであり、 R^1 がアルコキシ基を有するトリチル基であり、 R^2 が水素であり、 R^4 及び R^5 がメトキシ基であり、 R^7 が2-シアノエチル基であり、 R^8 がジイソプロピルアミノ基である、ピロロピリミドピリミジン誘導体(2-デオキシ-5-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)- β -D-リボフラノシル)-ジヒドロピロロピリミジンジオン 3'-O-ホスホロアミダイト、式(6)で表わされる化合物)が挙げられる。

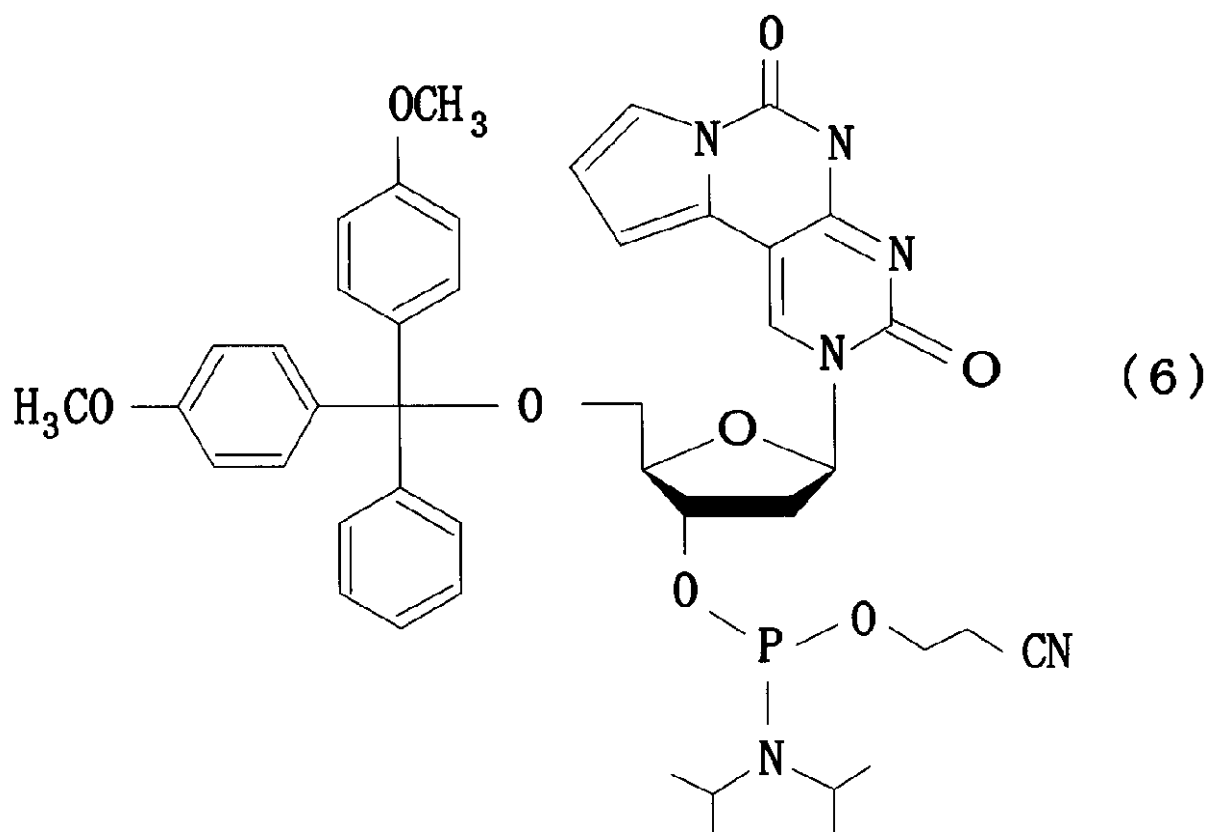
また、X及びY、又はY及びZが共に CR^3 で表される場合には、それらが互いに結合して環構造を形成していてもよい。環構造としては、例えばベンゼン環等が挙げられ、ベンゼン環にアルキル基、ニトロ基、アミノ基、ジアルキルアミノ基、シアノ基、アリール基、ヘテロアリール基、アルコキシ基等が1個以上結合している場合も含まれる。

【0034】

10

20

【化 8】



【0035】

本発明のヌクレオシド誘導体は、当業者に公知の方法を用いて合成することができる。本発明のヌクレオシド誘導体は、既知の5-ヨードシトシン誘導体から一段階で合成することができる。すなわち、既知化合物である5位をヨード化したシトシン誘導体に対し、ピロールのホウ酸誘導体を鈴木-宮浦反応によりカップリングし、同時に進行する分子内環形成反応を経ることによって合成することができる。具体的には、本明細書の実施例に記載されている方法に従って合成することができる。

【0036】

次に、本発明のオリゴ核酸について説明する。本発明のオリゴ核酸は、本発明のヌクレオシド誘導体の少なくとも1種を含む。本発明のオリゴ核酸は、その用途によっても異なるが、ヌクレオチド単位が、通常は10~100個程度からなり、その構成単位として、本発明のヌクレオシド誘導体を少なくとも1個含有してなる。本発明のオリゴ核酸は、上記ヌクレオシド誘導体を分子内に少なくとも1個含む分子全般を指し、例えば、複数ヌクレオシドの水酸基同士が互いにリン酸ジエステル結合で結合してオリゴマーを形成したオリゴヌクレオチド中に上記本発明のヌクレオシド誘導体を少なくとも1個含む分子が例として挙げられる。ここで用いられるヌクレオシドとしては、例えば、リボース-1-イルもしくは2'-デオキシリボース-1-イル基と任意の基とが結合した物質全般を意味する。例えば、2'-デオキシアデノシン、2'-デオキシグアノシン、2'-デオキシシチジン、チミジン、アデノシン、グアノシン、シチジン、ウリジン等が挙げられる。

本発明のオリゴ核酸に含まれる、ヌクレオシド、本発明のヌクレオシド誘導体の種類、

数、組み合わせ、位置等も、使用目的及び用途に応じて、当業者が適宜選択することができる。

【0037】

本発明のオリゴ核酸は、本発明のヌクレオシド誘導体を用いて、当業者に公知の任意の方法で合成することができる。本発明のオリゴ核酸は、オリゴDNA又はオリゴRNAである。本発明のオリゴ核酸は、本発明のヌクレオシド誘導体を含有了り、例えば、PCR用のDNAプローブ、DNA医薬品素材（アンチセンスDNA、デコイDNA、オリゴDNAを利用した遺伝子修復用の素材）、及び遺伝子解析用プローブ、又は遺伝子解析用のRNAプローブ、RNA医薬品素材（アンチセンスRNA、リボザイム、RNAiを利用した遺伝子発現制御）、人工酵素、アプタマー等として用いることができる。

10

【実施例】

【0038】

以下、本発明を実施例により更に詳細に説明する。なお、本発明の範囲は、かかる実施例に限定されないことはいうまでもない。

製造例 1

(2-デオキシ-β-D-リボフラノシル)-ジヒドロピロロピリミジンジオン(dC p p p)の合成

5-ヨードデオキシシチジン(177mg、0.5mmol)、酢酸パラジウム(5.6mg、0.025mmol)、トリフェニルフォスフィン-3, 3', 3''-スルホン酸ナトリウム塩(20mg、0.035mmol)、炭酸ナトリウム(53mg、1.0mmol)、及びN-(tert-ブトキシカルボニル)ピロール-2-ホウ酸(106mg、0.55mmol)を、脱気した水-アセトニトリル(2:1、v/v、5mL)に溶解し、この溶液を60℃の温度で30分間攪拌した。攪拌を行った後、溶液に、酢酸パラジウム(5.6mg、0.025mmol)、トリフェニルフォスフィン-3, 3', 3''-スルホン酸ナトリウム塩(20mg、0.035mmol)、N-(tert-ブトキシカルボニル)ピロール-2-ホウ酸(106mg、0.55mmol)を加え、さらに60℃の温度で30分間攪拌した。次いで、水(10mL)を加えたのち、半分量になるまで溶媒を減圧下留去する。溶媒留去を行った後、クロロホルム(20mL)を加え、飽和塩化ナトリウム水溶液、及び飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を用いて有機層を洗浄した。有機層を回収後、無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥し、C200シリカゲルを用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィー(クロロホルム-メタノール、99:1、v/v)により精製を行い、(dC p p p、式(4)で表わされる化合物)を得た(88mg、収率:55%)。

20

30

【0039】

¹H NMR (DMSO-d₆) δ 1.91-2.16 (1H、m)、2.22-2.36 (1H、m)、3.62-3.81 (2H、m)、3.82-3.86 (1H、m)、4.18-4.22 (1H、m)、5.06 (1H、br)、5.29 (1H、br)、6.11 (1H、dd、J=6.3Hz、J=6.3Hz)、6.44-6.49 (2H、m)、7.50-7.52 (1H、m)、8.53 (1H、s)

【0040】

40

製造例 2

2-デオキシ-5-O-(4, 4'-ジメトキシトリチル)-β-D-リボフラノシル)-ジヒドロピロロピリミジンジオンの合成

製造例1で得られた(2-デオキシ-β-D-リボフラノシル)-ジヒドロピロロピリミジンジオン(200mg、0.63mmol)を無水ピリジン(6mL)に溶解し、4, 4'-ジメトキシトリチルクロリド(235mg、0.69mmol)を加え、室温(約25℃)で3時間攪拌した。次いで、反応溶液をクロロホルム(10mL)で希釈した後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を用いて有機層を2回洗浄した。有機層の洗浄後、有機層を回収し、無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥し、C200シリカゲルを用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィー(クロロホルム)により精製を行い、2-デオキシ

50

—5—O—(4, 4'-ジメトキシトリチル)—β-D-リボフラノシル)—ジヒドロピロロピリミジンジオン(式(5)で表される化合物を得た(327mg、収率: 84%)。

【0041】

¹H NMR (CDCl₃) δ 2.19–2.30 (1H、m)、2.93–3.06 (1H、m)、3.18–3.26 (1H、m)、3.52–3.60 (1H、m)、3.62 (6H、s)、4.22–4.31 (1H、m)、4.43–4.49 (1H、m)、5.52–5.59 (1H、m)、6.08–6.12 (1H、m)、6.36 (1H、dd、J=5.9Hz、J=5.6Hz)、6.61–6.73 (4H、m)、7.04–7.38 (10H、m)、8.55 (1H、s)、10.18 (1H、br)

【0042】

製造例3

2-デオキシ-5-O-(4, 4'-ジメトキシトリチル)—β-D-リボフラノシル)—ジヒドロピロロピリミジンジオン 3'-O-ホスホロアミダイトの合成

製造例2で得られた2-デオキシ-5-O-(4, 4'-ジメトキシトリチル)—β-D-リボフラノシル)—ジヒドロピロロピリミジンジオン(400mg、0.64mmol)を無水アセトニトリルを用いて共沸脱水した後、塩化メチレン(7mL)を加えた溶解させた。次いで、ジイソプロピルアミン(54.8μL、0.39mmol)、(2-シアノエトキシ)—ビス—(N, N-ジイソプロピルアミノ)ホスフィン(245μL、0.77mmol)、及び1H-テトラゾール(27mg、0.39mmol)を加え室温(約25℃)で5時間攪拌した。次いで、反応溶液をクロロホルム(10mL)で希釈した後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を用いて有機層を2回洗浄した。有機層の洗浄後、無水硫酸ナトリウムを用いて有機層を乾燥し、C200シリカゲルを用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィー(1%トリエチルアミン、ヘキサネークロロホルム(6:4、v/v))により精製を行い、2-デオキシ-5-O-(4, 4'-ジメトキシトリチル)—β-D-リボフラノシル)—ジヒドロピロロピリミジンジオン 3'-O-ホスホロアミダイトを得た(486mg、収率: 93%)。

【0043】

¹H NMR (CDCl₃) δ 1.05–1.21 (12H、m)、2.30–2.42 (2H、m)、2.58–2.63 (1H、m)、2.79–2.93 (1H、m)、3.26–3.33 (1H、m)、3.49–3.90 (12H、m)、4.27–4.32 (1H、m)、4.53–4.68 (1H、m)、5.47–5.51 (1H、m)、6.18–6.22 (1H、m)、6.35–6.40 (1H、m)、6.76–6.82 (4H、m)、7.20–7.49 (10H、m)、8.64–8.69 (1H、m)

【0044】

比較製造例1

6-(2-デオキシ-β-D-リボフラノシル)—4, 6-ジヒドロ-1H, 3H-ピリミド[4, 5-d]ピリミジン-2, 7-ジオンの合成

2'-デオキシウリジン(10g、43.8mmol)、パラホルムアルデヒド(20g)を水酸化カリウム水溶液(200mL、0.5N)に懸濁し、65℃の温度で攪拌を行った。系内のpHを維持するように水酸化カリウム水溶液(10mL、1.0N)を加えながら7日間攪拌を行った。攪拌終了後、反応系をDowex 50Wx8(OH⁻型)、及びDowex 50Wx8(H⁺型)に通過させた後、溶媒をあらかじめ減圧留去した。残渣にメタノールを加え完全に溶かし、60N球状シリカゲル(60g)を加え、溶媒を減圧留去した。クロロホルム-メタノール(9:1、v/v)を溶出溶媒にシリカゲルクロマトグラフィーにより精製し2'-デオキシ-5-ヒドロキシメチルウリジンを得た(7.35g、28.5mmol、収率: 65%)。

【0045】

¹H NMR (DMSO-d₆) δ 2.04–2.09 (2H、m)、3.52–3

. 55 (2H, m), 3.75-3.79 (1H, m), 4.11 (1H, s), 4.12 (1H, s), 4.19-4.23 (1H, m), 4.88 (1H, t, J=5.5 Hz), 4.94 (1H, t, J=5.2 Hz), 5.23 (1H, d, J=4.3 Hz), 6.17 (1H, dd, J=6.6 Hz, J=6.9 Hz), 7.71 (1H, s), 11.30 (1H, br)

【0046】

上述のようにして得られた2'-デオキシ-5-ヒドロキシメチルウリジン (2.2 g, 8.5 mmol) を無水ジオキサンで5回共沸し、無水ジオキサン (40 mL) に懸濁した。クロトリメチルシラン (5.4 mL, 43 mmol) を加え、密栓して65℃の温度で一時間攪拌を行った。次いで、反応溶液を室温 (約25℃) に戻し、溶媒を減圧留去した後、残渣に無水ジメチルホルムアミド (40 mL) を加えた。次いで、アジ化ナトリウム (2.8 g, 43 mmol) を加え、室温で5分間攪拌を行った。水 (100 mL) を加えたのち、クロホルム-ピリジン (1:1, v/v) を有機層として逆抽出を行った。有機層を回収して溶媒を減圧留去したのち、無水ジメチルホルムアミドで5回共沸し、残渣に無水ジメチルホルムアミド (10 mL) を加えた。イミダゾール (3.5 g, 51 mmol)、t-ブチルクロロジメチルシラン (3.84 g, 25.6 mmol) を加え、室温 (約25℃) で2時間攪拌を行った。次いで、酢酸エチル (150 mL) を加え、有機層を水 (100 mL) で洗浄を行い、次いで、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (100 mL) で有機層を2度洗浄を行った。次いで、有機相を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧下留去した。ヘキサン-クロホルム (9:1, v/v) を溶出溶媒にシリカゲルクロマトグラフィーにより精製し5-アジドメチル-3', 5'-O-t-ブチルジメチルシリル-2'-デオキシウリジンを得た。 (3.95 g, 7.7 mmol、収率: 91%)

【0047】

¹H NMR (CDCl₃) δ 0.09 (6H, s), 0.12 (6H, s), 0.90 (9H, s), 0.93 (9H, s), 1.95-2.06 (1H, m), 2.27-2.34 (1H, m), 3.74-3.90 (2H, m), 3.94-3.98 (1H, m), 4.07 (1H, d, J=14.8 Hz), 4.15 (1H, d, J=14.8 Hz), 4.39-4.41 (1H, m), 6.30 (1H, dd, J=5.9 Hz, J=7.6 Hz), 7.71 (1H, s), 8.03 (1H, br); ¹³C NMR (CDCl₃) -5.5, -4.9, -4.7, 17.9, 18.3, 25.6, 25.8, 41.4, 46.9, 62.7, 71.9, 85.1, 87.8, 109.2, 138.1, 149.9, 162.8

【0048】

上述のようにして得られた5-アジドメチル-3', 5'-O-t-ブチルジメチルシリル-2'-デオキシウリジン (2.1 g, 4 mmol) を塩化メチレン (40 mL) に溶解した後、炭酸ナトリウム水溶液 (0.1 M, 80 mL) を加えた。テトラブチルアンモニウムブロマイド (644 mg, 2 mmol)、及び2, 4, 6-トリイソプロピルベンゼンスルホンクロライド (1.86 g, 6.0 mmol) を加え激しく一時間攪拌した。クロホルムで希釈し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で有機層を二度洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧下留去した。残渣に無水ジオキサン (50 mL) を加え、アンモニアガス雰囲気下、6時間攪拌を行った。溶媒を減圧留去したのち、クロホルム (20 mL) で希釈し飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で有機層を2度洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧下留去し、クロホルム-メタノール (98:2, v/v) を (溶出溶媒にシリカゲルクロマトグラフィーにより精製し5-アジドメチル-3', 5'-O-t-ブチルジメチルシリル-2'-デオキシシチジンを得た (1.33 g, 2.7 mmol、収率: 64%)。

【0049】

¹H NMR (CDCl₃) δ 0.06 (6H, s), 0.11 (6H, s), 0.88 (9H, s), 0.93 (9H, s), 1.92-2.03 (1H, m), 2.41-

2. 51 (1H, m), 3. 73-3. 92 (2H, m), 3. 94-3. 97 (1H, m), 4. 08 (2H, s), 4. 32-4. 37 (1H, m), 6. 26 (1H, dd, J=6. 2 Hz, J=6. 2 Hz), 7. 81 (1H, s)

【0050】

5-アジドメチル-3', 5'-O-*t*-ブチルジメチルシリル-2'-デオキシシチジン (1. 3 g, 2. 55 mmol) をメタノール (20 mL) に溶解し、10% Pd-C (128 mg) を加え水素ガス雰囲気下4時間攪拌を行った。反応系をセライト濾過した後、溶媒を減圧下留去した。残渣を無水ジメチルホルムアミドで5回共沸したのち、無水ジメチルホルムアミド (200 mL) に溶解した。1, 1'-カルボニル-ビス-1H-イミダゾール (455 mg, 2. 8 mmol) を加え3時間攪拌を行った。酢酸エチル (300 mL) で希釈し、有機相を水で一度洗浄し、次いで、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で2度有機相を洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。溶媒を減圧下留去し、クロロホルム-メタノール (99:1, v/v) を溶出溶媒にシリカゲルクロマトグラフィーにより精製し6-(2-デオキシ-3, 5-O-*t*-ブチルジメチルシリル-β-D-リボフラノシル)-4, 6-ジヒドロ-1H, 3H-ピリミド [4, 5-d] ピリミジン-2, 7-ジオンを得た (1. 33 g, 2. 7 mmol、収率: 85%)。

10

【0051】

¹H NMR (DMSO) δ 0. 05 (6H, s), 0. 07 (6H, s), 0. 85 (18H, s), 2. 05-2. 11 (1H, m), 2. 18-2. 27 (1H, m), 3. 71-3. 73 (2H, m), 3. 82-3. 88 (1H, m), 4. 05 (1H, d, J=14. 1 Hz), 4. 09 (1H, d, J=14. 1 Hz), 4. 28-4. 34 (1H, m), 6. 09 (1H, dd, J=6. 6 Hz, J=6. 6 Hz), 7. 32 (1H, s), 7. 79 (1H, s), 10. 10 (1H, s); ¹³C NMR (DMSO) -5. 4, -5. 4, -4. 9, -4. 7, 17. 7, 18. 0, 25. 7, 25. 7, 38. 3, 40. 5, 62. 6, 72. 0, 85. 6, 87. 2, 97. 2, 137. 9, 152. 6, 154. 0, 160. 7

20

【0052】

上述のようにして得られた6-(2-デオキシ-3, 5-O-*t*-ブチルジメチルシリル-β-D-リボフラノシル)-4, 6-ジヒドロ-1H, 3H-ピリミド [4, 5-d] ピリミジン-2, 7-ジオン (409 mg, 0. 8 mmol) を無水アセトニリルで5回共沸したのち、テトラブチルアンモニウムフルオリドハイドレート (627 mg, 2. 4 mmol, 無水テトラヒドロフラン溶液 (10 mL)) を加え、3時間攪拌を行った。次いで、水 (30 mL) に希釈し、水層をクロロホルムで3回洗浄したのち、エタノールを用いて共沸しながら溶媒を減圧下留去した。メタノール-水 (7:3, v/v) から結晶化させ6-(2-デオキシ-β-D-リボフラノシル)-4, 6-ジヒドロ-1H, 3H-ピリミド [4, 5-d] ピリミジン-2, 7-ジオン (dChpp) を得た (204 mg, 0. 71 mmol、収率: 89%)。

30

【0053】

¹H NMR (DMSO-d₆) δ 1. 91-2. 10 (1H, m), 2. 17-2. 23 (1H, m), 3. 52-3. 63 (2H, m), 3. 77-3. 83 (1H, m), 4. 09 (1H, s), 4. 18-4. 22 (1H, m), 5. 00 (1H, br), 5. 24 (1H, br), 6. 10 (1H, dd, J=6. 3 Hz, J=6. 3 Hz), 7. 33 (1H, br), 8. 03 (1H, s), 10. 07 (1H, br)

40

【0054】

実施例1

製造例1で得られたdC p p pを、10 mM リン酸ナトリウム緩衝液、pH 7. 0に1 μMになるように溶解して得られたdC p p p溶液を369 nmで励起し、蛍光スペクトルの測定を行った。また、比較として、比較製造例1で得られたdCh p pについても同様にして溶液を作製し、300 nmで励起して、蛍光スペクトルの測定を行った。結果を表1及び図1に示す。図1は、蛍光スペクトルの測定を行った結果を示すグラフであり

50

、横軸は波長、縦軸は強度を示す。

【0055】

【表1】

	製造例1	比較製造例1
励起光	369 nm	300 nm
放射光	490 nm	360 nm
ストークスシフト	121 nm	60 nm

10

【0056】

表1及び図1から明らかなように、比較製造例1によって得られたdChppは、60 nmのストークスシフトを有しているのに対し、製造例1によって得られたdCpは、490 nmに放射光を有しており、比較製造例1によって得られたdChppよりも長波長に蛍光発光を有し、かつ大きなストークスシフトを示すことがわかった。

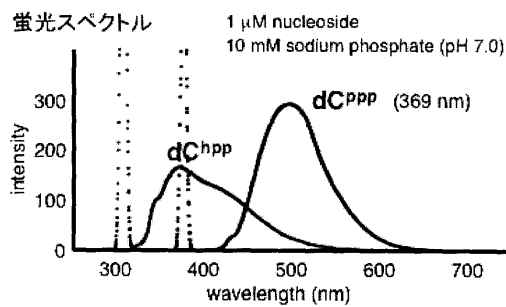
【図面の簡単な説明】

【0057】

20

【図1】 蛍光スペクトルの測定を行った結果を示すグラフである。

【図1】



フロントページの続き

(72)発明者 峯尾 良太

神奈川県横浜市緑区長津田町4 2 5 9 番地 国立大学法人 東京工業大学内

(72)発明者 清尾 康志

神奈川県横浜市緑区長津田町4 2 5 9 番地 国立大学法人 東京工業大学内

Fターム(参考) 4B024 AA11 CA09 HA14

4C057 AA18 BB02 DD01 LL50