

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4473445号
(P4473445)

(45) 発行日 平成22年6月2日 (2010.6.2)

(24) 登録日 平成22年3月12日 (2010.3.12)

(51) Int.Cl.

F I

C O 7 H 19/06 (2006.01)
 C O 7 F 7/18 (2006.01)
 C O 7 H 19/16 (2006.01)
 C O 7 H 21/02 (2006.01)
 C O 7 H 23/00 (2006.01)

C O 7 H 19/06
 C O 7 F 7/18 E
 C O 7 H 19/16
 C O 7 H 21/02 Z N A
 C O 7 H 23/00

請求項の数 11 (全 18 頁)

(21) 出願番号 特願2000-509723 (P2000-509723)
 (86) (22) 出願日 平成10年8月17日 (1998.8.17)
 (65) 公表番号 特表2001-515087 (P2001-515087A)
 (43) 公表日 平成13年9月18日 (2001.9.18)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP1998/005215
 (87) 国際公開番号 W01999/009044
 (87) 国際公開日 平成11年2月25日 (1999.2.25)
 審査請求日 平成17年7月27日 (2005.7.27)
 (31) 優先権主張番号 1931/97
 (32) 優先日 平成9年8月18日 (1997.8.18)
 (33) 優先権主張国 スイス (CH)

(73) 特許権者 503079398
 キアゲン アーゲー
 スイス, ツェーハー 4 0 5 2 パーゼ
 ル, アオフ デム ヴォルフ 3 9
 (74) 代理人 100094318
 弁理士 山田 行一
 (74) 代理人 100104282
 弁理士 鈴木 康仁
 (72) 発明者 ピッチ, ステファン
 スイス, ツェーハー 8 0 4 9 チュー
 リッヒ, レーゲンスドルファーストラッ
 サ 4 5

最終頁に続く

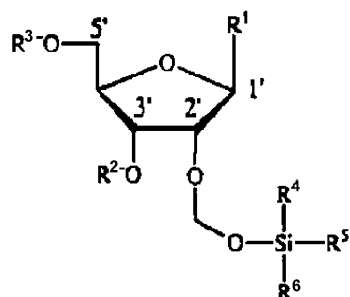
(54) 【発明の名称】 リボヌクレオシド誘導体およびその製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

D-もしくは L-リボース単位を含み、構造式：

【化 1】



[式中、R¹ はプリンまたはピリミジンファミリーの塩基またはかかる塩基の誘導体であり、

R² はプロトンまたはホスホン酸の置換された誘導体であり、

R³ はプロトンまたは適当な保護基であり、

R⁴、R⁵ および R⁶ は、合計で 6 ないし 30 個の炭素原子を含む 3 つのアルキル基である]

を有するリボヌクレオシド誘導体。

【請求項 2】

2'-O-位のシリルオキシメチル基のケイ素原子上の置換基 (R^4 、 R^5 、 R^6) がイソプロピル基であることを特徴とする請求項 1 に記載のリボヌクレオシド誘導体。

【請求項 3】

塩基 (R^1) がシトシン、グアニン、アデニン、ウラシルまたはチミンであることを特徴とする請求項 1 に記載のリボヌクレオシド誘導体。

【請求項 4】

塩基 (R^1) がアシル保護基を担持することを特徴とする請求項 1 に記載のリボヌクレオシド誘導体。

【請求項 5】

ホスホン酸 (R^2) の置換された誘導体が O-および N, N-置換されたアミノホスフィノ基であることを特徴とする請求項 1 に記載のリボヌクレオシド誘導体。

【請求項 6】

O-置換基が 2-シアノエチル基であって、N-置換基がイソプロピル基であることを特徴とする請求項 5 に記載のリボヌクレオシド誘導体。

【請求項 7】

5'-位における酸素の保護基 (R^3) がモノメトキシトリチルまたはジメトキシトリチル基であることを特徴とする請求項 1 に記載のリボヌクレオシド誘導体。

【請求項 8】

所定のヌクレオチド配列を持つ RNA-オリゴヌクレオチドの化学合成のための請求項 1 に記載のリボヌクレオシド誘導体の使用。

【請求項 9】

5'-位における酸素が保護基によって保護されているリボヌクレオシド (I I) から、塩基の存在下で環状 2', 3'-ジ-O-スタニル誘導体を調製し、このスタニル誘導体を、ケイ素原子上に 3 個のさらなる置換基を担持するシリルオキシメチルハロゲニドの添加によってリボヌクレオシド誘導体に変換することを特徴とする請求項 1 に記載のリボヌクレオシド誘導体の製造方法。

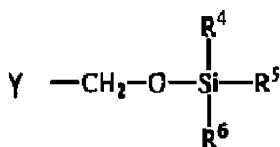
【請求項 10】

さらに、ホスホン酸の誘導体を含む基で、リボヌクレオシド誘導体を 3'-位の酸素上で置換することを特徴とする請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

式：

【化 2】



[式中、Y はハロゲンであって、 R^4 、 R^5 および R^6 はイソプロピルである] のシリルオキシメチルハロゲニド。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は核酸化学の分野に属し、リボヌクレオシド誘導体およびリボヌクレオシド誘導体の製造方法に関する。本発明のリボヌクレオシド誘導体はリボ核酸の機器合成に特に適する。

【0002】

【従来の技術】

本発明はリボ核酸 (リボ-オリゴヌクレオチド、RNA) の化学合成、特に、かかるオリゴマーの機器合成ならびにかかるオリゴマーの構造的に関連する誘導体の合成に関する。

【0003】

化学合成で調製された定義配列の純粋なオリゴヌクレオチドは、例えば、X-線回折によるまたは核磁気共鳴分光法による単位結晶の構造解析の分野で使用される。この種類の研究は、分子レベルでの生物学的プロセスの理解に寄与し、とりわけ、新規治療概念の発展を可能にする。中枢的生物学的クラスの化合物（メッセンジャーRNA、トランスファーRNA、リボソームRNA）を構成するリボ核酸は、医療化学で興味ある対象である。この意味において、潜在的にRNAと相互作用する化合物の迅速で信頼の置けるテストのためのアッセイの利用性は高度に望ましい。テストのためのかかるオリゴヌクレオチドの（酵素、生物等を用いる生産とは対照的に）化学的合成によって、目的修飾の導入が可能となり、その修飾は、例えば、所望の相互作用の簡便な定量を可能とし、あるいは特異的相互作用を正確な調査に接近可能とする。

10

【0004】

また、天然および修飾RNA-オリゴヌクレオチドは、RNA-およびDNA-オリゴヌクレオチド配列および他の化合物（アプタマーおよびリボザイム）の選択的認識および／または選択的修飾のためのツールとしての用途がある。かかる化合物の化学的合成で達成されるべき改良は、目的修飾の導入を可能とし、かくして、医療診断および治療における前記タイプの化合物の適用の分野を大幅に拡大する。

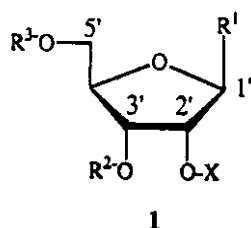
【0005】

RNA-オリゴヌクレオチドおよびその誘導体の化学的合成のための全ての公知の方法は、DNA-オリゴヌクレオチド（2'-位におけるヒドロキシ基を含むRNAとは対照的に、2'-デオキシリボ核酸）の合成のために非常に首尾よく発展してきた概念に関連する。DNA-およびRNA-オリゴヌクレオチドの機器合成は、通常、所望の長さの鎖が達成されるまで、各々1の合成サイクルの工程でさらに保護ヌクレオシド-誘導体がそれにカップリングされる固相に固定化された保護ヌクレオシド-誘導体に基づく。

20

【0006】

リボ核酸の化学合成における適用のためのリボヌクレオシド-誘導体はD-もしくはL-リボース単位を含み、以下の構造式：



30

【0007】

[式中、R¹はプリン-またはピリミジン-ファミリーの塩基またはかかる塩基の誘導体であり、

R²はプロトンまたはホスホン酸の置換された誘導体であり、

R³はプロトンまたは5'-位の酸素原子のための適当な保護基であり、

Xは2'-位の酸素原子のための保護基である]

40

を有する。

【0008】

2'-位における酸素原子のための保護基Xは、以下の条件を実質的に満たすものである。

- 保護基の導入は出来る限り単純なものでなければならず、出来る限り異性化生成物がない均一な化合物を生じなければならない。
- 保護基はカップリング条件下で絶対的に安定なものでなければならない。
- 保護基は高いカップリング収率を可能とする構造を有しなければならない。
- 保護基は調製すべき化合物の分解または化学的变化なくして完全に除去できるもので

50

なければならない。

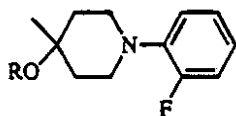
【0009】

2' 一位のためにこれまで使用されてきた保護基は、3つの以下のタイプに実質的に属している。多数のさらなるかかる保護基タイプが存在する。しかしながら、それらは、種々の理由で、完全に成功したものではなかった。

【0010】

a) 酸感受性 2' - O - アセチル - 保護基 [1] :

例: X =



2

10

【0011】

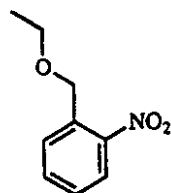
このタイプの保護基は容易に導入され、かかる保護基ならびにそれらを担持するヌクレオシドを確立するのに要する化学品は商業的に入手可能である。保護のタイプの不利は、保護基が鎖の合成で完全には安定ではない、かかる保護されたヌクレオシド-誘導体を用いると、中程度のカップリング収率が達成できるに過ぎない、および脱保護に際しての異性化が可能であるという事実である。

20

【0012】

b) 光感受性 2' - O - オルト - ニトロフェンジルオキシメチル - 保護基 [2] :

例: X =



3

30

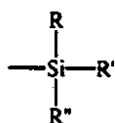
【0013】

このタイプの保護基は容易に導入でき、脱保護は完全に直交し、良好なカップリング収率が達成できる。このタイプの保護基の不利は、完全な脱保護が時々可能ではなく、保護基を確立するのに要する化学品は市場では入手できないという事実である。

【0014】

c) フッ化物感受性 2' - O - シリル - 保護基 [3] :

例: X =



4

40

【0015】

このタイプの保護基は最も成功したものである。それは産業界において十分に確立されている。というのは、初期の80年代には、必要な化学品は市場で入手できたからである。このタイプの保護基は容易かつ完全に除去でき(脱保護)、98%までのカップリング収率が、10ないし20分のオーダーのカップリング時間にて達成することができる。この

50

結果、約 35 単位までのオリゴヌクレオチドについては、50%以上のオーダーの商業的に合理的な収率がもたらされる。

【0016】

【発明が解決しようとする課題】

鎖形成の収率は、鎖に含まれる単位の数に比例する。これは、カップリング収率の増加は経済的理由で有利であるのみならず、より長い鎖を形成するのを可能にする。カップリング収率を増加させるための過去および現在の努力はカップリングパラメーターに集中しており、その結果、前記した98%の最大が得られた。

【0017】

本発明の目的は、確立された器具および確立された方法工程が依然として適用できるように、鎖形成化学に対する重要な変化無くして、RNA-鎖形成工程（カップリング収率）の収率の実質的増加である。

【0018】

【課題を解決するための手段】

この目的は、2'-OH位が保護されたリボヌクレオシド誘導体を新規保護基とカップリングさせることによって達成される。実施例に示されるように、新規リボヌクレオシドを用い、99%を超える、恐らくは99.5%を超えるカップリング収率が達成することができる。さらに、このカップリング収率は、より短いカップリング時間で達成され、これは本発明のリボヌクレオシド誘導体のさらなる利点を構成する。

【0019】

本発明のリボヌクレオシド誘導体を用いることによって達成される少なくとも1パーセントのオーダーのカップリング収率増加の結果、50単位の鎖では60ないし70%のオーダーの鎖形成収率が（公知の方法では：約35%）、100単位の鎖では40ないし60%のオーダーの鎖形成収率（公知の方法では：約13%）が得られる。

【0020】

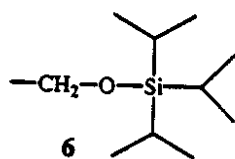
本発明のヌクレオシド誘導体は、b) および c) の下で前記した公知の保護基を持つヌクレオシド誘導体の利点を統合する（保護基の良好な導入性、保護基の良好な安定性、簡便な脱保護）が、脱保護条件下での異性化および鎖切断である、特に c) 下で言及した保護基の既知の不利を示さない。

【0021】

本発明のリボヌクレオシド誘導体は、2'-O-シリルオキシメチル保護基（構造式5）を含有し、それにより、シリルオキシメチル基のケイ素原子はさらに3つの同一または異なる置換基を含む。これらの3つの置換基は、有利には、アルキルまたはアリール置換基である。該3つのアルキルまたはアリール基はアリールアルキル組合せでもあり得、ヘテロ原子で置換することができおよび／または環形態で相互に結合することができる。それは、2'-O-シリルオキシメチル基の3つの置換基が一緒に6ないし30個の間のC-原子を含むことができることを示す。

【0022】

X =

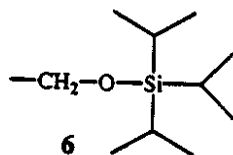


【0023】

例として、2'-O-シリルオキシメチル保護基におけるケイ素原子の3つの置換基は3つのイソプロピル基である（構造式6）。

【0024】

X =



【0025】

RNA鎖形成のために本発明リボヌクレオシド誘導体を用いることによって達成される利点は、以下のように説明することができる。

ー 本発明の2'-O-保護リボヌクレオシド誘導体におけるヌクレオシドおよび保護基の間の結合のアセタール性質のため、リボヌクレオシド-誘導体内部の異なる位置への保護基の移動は起こり得ず、特に隣接3'-O-位への移動は起こり得ない。かかる異性化は、通常の2'-O-シリル置換RNA単位（保護基cのタイプ、前記参照）の合成における重要なよく知られて問題であり〔6, 7〕、この問題は新しい保護基による本発明のリボヌクレオシド-誘導体で解決される。

ー 2'-O-シリルオキシメチル保護基はより小さい。何故ならば、それは、比較的小さく立体的に要求されないメテン単位を介してリボースに結合するからである。2'-酸素原子に直接的に結合した公知のかなり大きいトリアルキルシリル基を持つ単位（保護基c）のタイプ、前記参照）とは対照的に、これは、カップリング反応のための反応中心（3'-O-リン原子）の立体障害を減少させ、かくして、カップリング収率を増加させる。

【0026】

立体障害によって引き起こされた鎖形成の困難は本発明のリボ核酸単位の保護基のメトキシスペースーサーによって大いに減少されるので、立体効果は、ケイ素原子の3つの置換基を選択する場合に実質的に無視することができる。その代わり、さらなる基準、特に酸および/または塩基に対する安定性を考慮することができる。さらに、保護基をより高度な特異的ケースの要件に適合させることができる。

【0027】

2'-O-シリルオキシメチル保護基の分離（脱保護）は、実質的に、通常の2'-O-シリル-保護基の分離と同一条件下で、すなわち、フッ化物イオンまたはフルオロケイ酸での処理によって行うことができる。この脱保護反応は、よく確立され問題のない反応としてリボ核酸単位の使用者に知られており、この反応が本発明単位を脱保護するのに模倣することができるという事実はこれらの単位のさらなる利点である。

【0028】

本発明の化合物を調製するには、効果的で安くかつ簡便な合成方法が使用され、その方法は、望まない異性体を実質的に無い生成物を生じる（純度>99.8%）。本発明のリボヌクレオシド-誘導体を用いることによって、従前に可能であったよりも長い（40ヌクレオシド単位よりも大）鎖を持つ合成により調製されたオリゴ核酸が利用可能となり、より多い量（個々の合成当たり1-20mg）で均一で化学的に純粋な形態（所望の構造を持つ化合物の90重量%を超える）のRNA-オリゴヌクレオチドが、多くの興味深い適用で利用できるようになる。

【0029】

【発明の実施の形態】

10

20

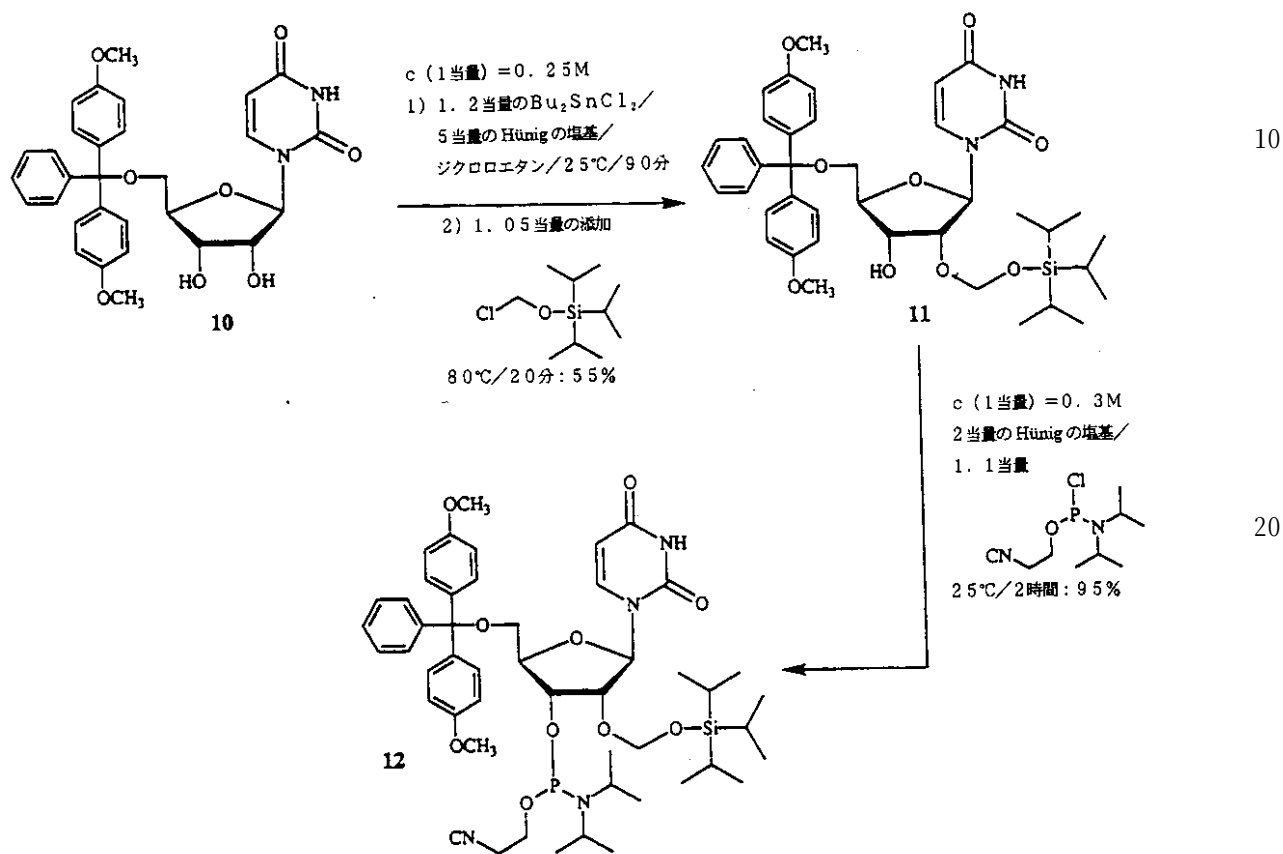
30

40

およびオリゴヌクレオチドを形成するためのそれらのカップリングの原理を知っている。リボ核酸の合成用の本発明単位の合成の単純性および優秀性のさらなる説明のために、いくつかの実施例は以下の通りである。

【0038】

実施例 1



【0039】

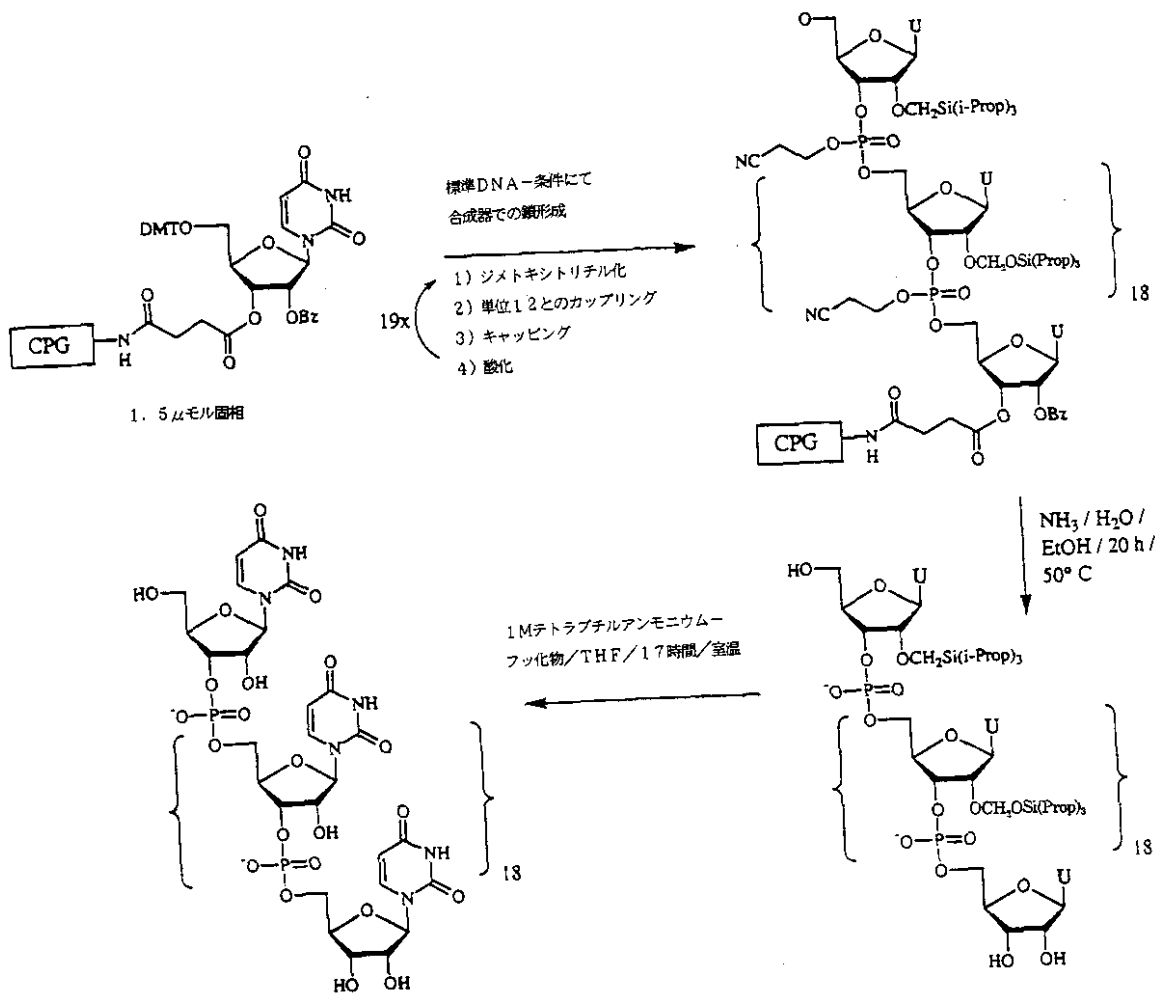
ウリジン単位 1 - { 3' - O - [(2 - シアノエトキシ) (ジイソプロピルアミノ) ホスフィノ] - 5' - O - [4, 4' - ジメトキシトリチル] - 2' - O - [トリイソプロピルシリルオキシメチル] - β - D - リボフラノシル } - ウラシル 12 の合成は、1 - [5' - O - (4, 4' - ジメトキシトリチル) - β - D - リボフラノシル] - ウリジン 10 から出発して行い、中間体生成物 11 : 1 - [5' - O - (4, 4' - ジメトキシトリチル) - 2' - O - (トリイソプロピルシリルオキシメチル) - β - D - リボフラノシル] - ウラシルを介して行った。

【0040】

保護されたリボヌクレオシド誘導体 11 は、シリカゲル上の単純なクロマトグラフィーによって異性体的に純粋な形態に精製した。

【0041】

実施例 2



10

20

略語

DMT=4, 4'-ジメトキシトリチル

Bz=ベンゾイル

CPG=アミノ官能化制御多孔性ガラス

30

【0042】

2分のカップリング時間にて、商業的に入手可能な鎖形成器具に形成されたジトリチル化アッセイによって示されるカップリング収率は以下のようにあることが判明した：

親電子体単位	求核単位	カップリング収率
アデニン	アデニン	99.6%
アデニン	シトシン	99.0%
アデニン	グアニン	99.1%
アデニン	ウラシル	99.5%
シトシン	アデニン	99.1%
シトシン	シトシン	99.3%
シトシン	グアニン	98.4%
シトシン	ウラシル	99.5%
グアニン	アデニン	99.5%
グアニン	シトシン	99.5%
グアニン	グアニン	99.9%
グアニン	ウラシル	99.9%
ウラシル	アデニン	99.5%
ウラシル	シトシン	99.1%
ウラシル	グアニン	98.4%
ウラシル	ウラシル	99.9%

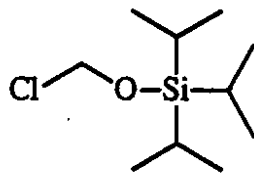
10

この結果、99.3%の平均カップリング収率となる。

【0043】

実施例3：（[8]による）（クロロメトキシ）（トリイソプロピル）シランの調製のため
の手法

20



【0044】

0.1モルのエタランチオール中の0.1モルのパラホルムアルデヒドの懸濁液を1滴の10NのNaOH水溶液で処理し、清澄な溶液が得られるまで、室温で攪拌した。50℃で1時間攪拌した後、50mlのCH₂Cl₂および0.2モルのイミダゾール、続いて0.09モルの(i-Prop)₃SiClを添加した。得られた懸濁液を室温で一晩攪拌し、400mlのヘキサンで希釈した。250mlの2M NaH₂PO₄水溶液の添加、攪拌および相分離の後、有機相を蒸発させた。残渣を250mlのCH₂Cl₂に溶解させ、0.09モルの塩化スルフリルで処理し、室温で1時間攪拌し、蒸発させ、真空中で蒸留した。生成物は無色粘性油として得られた（収率：90%）。

30

【0045】

沸点：50℃（0.1トル）。¹H-NMR（300MHz，CDCl₃）：1.08-1.10（m，21H，（i-Prop）₃Si-からのCH₃およびCH）；5.66（s，2H，CH₂Cl）。

40

【0046】

イソプロピル以外の他の置換基を持つ塩化シリルオキシメチルを調製するには、ならびに他のシリルオキシメチルハロゲナイドを調製するには、前記で与えた手法を対応して適合させる。

【0047】

実施例4：2'-O-[(i-Prop)₃SiOCH₂]-保護ヌクレオシド5-8の調製のための手法



塩基＝

塩基＝

- 20

30

N⁶-ベンゾイル-9-[5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2'-O-(
[トリイソプロピルシリル]オキシ)メチル)-β-D-リボフラノシル]アデニン(5
) :

TLC: R_f 0.60 (AcOEt / ヘキサン 7 : 3)。¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): 1.03–1.15 (m, 21H, (i-Prop)₃Si-からのCH₃およびCH); 3.08 (d, J = 3.7, 1H, HO-C(3')), D₂Oでの処理に際して消失); 3.40 (d×d, J = 10.2, 4.1, 1H, H-C(5'))); 3.62 (d×d, J = 10.2, 3.5 Hz, 1H, H'-C(5'))); 3.78 (s, 6H, CH₃O-Ar); 4.31 (q, J = 4.0, 1H, H-C(4'))); 4.57 (br. q, J Å 4, 1H, H-C(3')), D₂Oでの処理に際してtに変化); 4.98 (br, t, J Å 5, 1H, H-C(2'))); 4.98および5.16 (2つのd, J = 4.7, 2H, OCH₂O); 6.24 (d, J = 5.6, 1H, H-C(1'))); 6.79–6.83 (m, 4H, 芳香族H); 7.21–7.65 (m, 12H, 芳香族H); 8.01–8.04 (m, 2H, 芳香族H); 8.21 (s, 1H, H-C(2)); 8.73 (s, H-C(8)); 8.97 (br. s, 1H, NH-C(6)), D₂Oでの処理に際して消失)。

40

N⁴-ベンゾイル-1-[5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2'-O-(

50

[(トリイソプロピルシリル) オキシ] メチル) - β -D-リボフラノシル] シトシン (6) :

収率: 50-60%

TLC: R_f 0.65 (AcOEt/ヘキサン7:3)。 ^1H -NMR (300MHz, CDCl_3): 1.02-1.18 (m, 21H, (i-Prop)₃Si-からの CH_3 およびCH); 3.34 (d, $J=8.3$, 1H, $\text{HO}-\text{C}(3')$, D_2O での処理に際して消失); 3.55 (d $\times$ d, $J=11.6$, 3.0, 1H, $\text{H}-\text{C}(5')$); 3.62 (d $\times$ d, $J=11.6$, 3.0Hz, 1H, $\text{H}'-\text{C}(5')$); 3.83 (s, 6H, $\text{CH}_3\text{O}-\text{Ar}$); 4.12 (d $\times$ t, $J=8.3$, 3.0, 1H, $\text{H}-\text{C}(4')$); 4.28 (d, $J=5.4$, 1H, $\text{H}-\text{C}(2')$); 4.41 (t $\times$ d, $J=8.3$, 5.4, 1H, $\text{H}-\text{C}(3')$, D_2O での処理に際してd $\times$ dに変化); 5.19および5.30 (2つのd, $J=4.6$, 2H, OCH_2O); 6.01 (s, 1H, $\text{H}-\text{C}(1')$); 6.84-6.92 (m, 4H, 芳香族H); 7.23-7.62 (m, 13H, 12芳香族Hおよび $\text{H}-\text{C}(5)$); 7.85-7.92 (m, 2H, 芳香族H); 8.54 (d, $J=6.5$, 1H, $\text{H}-\text{C}(6)$); 8.55 (br. s, 1H, $\text{HN}-\text{C}(4)$, D_2O での処理に際して消失)。

【0051】

N^3 -イソブチリル-9-[5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2'-O-([(トリイソプロピルシリル) オキシ] メチル)) - β -D-リボフラノシル] グアニン (7) :

収率: 80-90%

TLC: R_f 0.50 (AcOEt/ヘキサン7:3)。 ^1H -NMR (300MHz, CDCl_3): 0.66, 0.87 (2d, $J=6.9$, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 1.02-1.11 (m, 21H, (i-Prop)₃Si-からの CH_3 およびCH); 1.49 (hept, $J=6.9$, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 3.02 (d, $J=1.9$, 1H, $\text{HO}-\text{C}(3')$, D_2O での処理に際して消失); 3.00 (dd, $J=3.1$, 10.6, 1H, $\text{H}-\text{C}(5')$); 3.54 (dd, $J=2.1$, 10.6, 1H, $\text{H}'-\text{C}(5')$); 3.76, 3.77 (2s, 2 $\times$ 3H, OCH_3); 4.22 (br. q, $J_{\text{A}2}$, 1H, $\text{H}-\text{C}(4')$); 4.57 (m, 1H, $\text{H}-\text{C}(3')$, D_2O での処理に際してd $\times$ dへ変化); 4.95, 5.14 (2d, $J=4.7$, 2H, OCH_2O); 5.08 (dd, $J=5.1$, 7.2, 1H, $\text{H}-\text{C}(2')$); 5.89 (d, $J=7.2$, 1H, $\text{H}-\text{C}(1')$); 6.77-6.82 (m, 4H, 芳香族H); 7.21-7.57 (m, 9H, 芳香族H); 7.77 (br. s, $\text{NH}-\text{C}(2)$); 7.79 (s, 1H, $\text{H}-\text{C}(8)$); 11.95 (br. s, 1H, $\text{H}-\text{N}(1)$, D_2O での処理に際して消失)。

【0052】

1-[5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2'-O-([(トリイソプロピルシリル) オキシ] メチル) - β -D-リボフラノシル] ウラシル (8) :

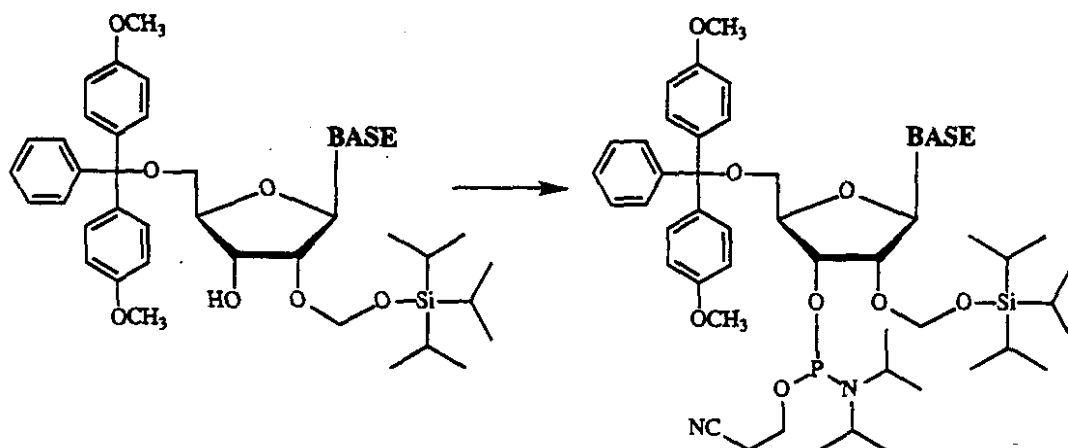
収率: 45-55%

TLC: R_f 0.75 (AcOEt/ヘキサン 3:2)。 ^1H -NMR (300MHz, CDCl_3): 1.02-1.18 (m, 21H, (i-Prop)₃Si-からの CH_3 およびCH); 3.17 (d, $J=5.5$, 1H, $\text{HO}-\text{C}(3')$, D_2O での処理に際して消失); 3.51 (d, $J=2.5$, 2H, $\text{H}-\text{C}(5')$ および $\text{H}'-\text{C}(5')$); 3.80 (s, 6H, $\text{CH}_3\text{O}-\text{Ar}$); 4.12 (d $\times$ t, $J=5.5$, 2.5, 1H, $\text{H}-\text{C}(4')$); 4.28 (d $\times$ d, $J=3.2$, 5.5, 1H, $\text{H}-\text{C}(2')$); 4.47 (q, $J=5.5$, 1H, $\text{H}-\text{C}(3')$, D_2O での処理に際してtに変化); 5.04および5.23 (2つのd, $J=5.0$, 2H, OCH_2O); 5.30 (d, $J=7.9$, 1H, $\text{H}-\text{C}(5)$); 6.03 (d, $J=3.2$, 1H, $\text{H}-\text{C}(1')$); 6.80-6.88 (m, 4H, 芳香族H); 7.24-7.42 (m, 9H, 芳香族H); 7.94 (d, $J=7.9$, 1H, $\text{H}-\text{C}(6)$); 8.56 (br

. s, 1H, H-N(3), D₂Oでの処理に際して消失)。

【0053】

実施例5：ホスホルアミダイト9-12の調製の手法



10

【0054】

塩基＝

塩基＝

- | | |
|------------------------------|-------------------------------|
| 5 N ⁶ -ベンゾイル-アデニン | 9 N ⁶ -ベンゾイル-アデニン |
| 6 N ⁴ -ベンゾイル-シトシン | 10 N ⁴ -ベンゾイル-シトシン |
| 7 N ² -イソブチル-グアニン | 11 N ² -イソブチル-グアニン |
| 8 ウラシル | 12 ウラシル |

20

30 ml の CH₂Cl₂ 中の 10 ミリモルの保護されたヌクレオシド 5-8 の溶液を 20 ミリモルの N-エチル-N, N-ジイソプロピルアミンおよび 20 ミリモルのクロロ(2-シアノエトキシ)(N, N-ジイソプロピルアミノ)ホスフィン[4]で連続的に処理した。室温で 3 時間攪拌した後、反応混合物を、溶離剤として 2% NEt₃ を含有するヘキサン/酢酸エチル混合液を用いる 150 g のシリカゲル上のカラムクロマトグラフィーに付した。生成物は無色フォーム(ジアステレオマーの混合物)として得られた。

【0055】

30

N⁶-ベンゾイル-9-[5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2'-O-([トリイソプロピルシリル]オキシ)メチル)-β-D-リボフラノシル]アデニン 3'-(2-シアノエチル)ジイソプロピルホスホルアミダイト](9)：

収率：90-95%

TLC：R_f=0.30 (ヘキサン/EtOAc 7:3)。¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃)：0.89-1.22 (m, 33H, (i-Prop)₂N-からのCH₃；(i-Prop)₃Si-からのCH₃およびCH)；2.39 (t, J=6.5, 1H, CH₂CN)；2.65 (dt, J=1.2, 6.2, 1H, CH₂CN)；3.36 (m, 1H, OCH₃)；3.51-3.73 (m, 4H, OCH₂, (i-Prop)₂N-からのCH), H-C(5')；3.77, 3.78 (2s, 6H, OCH₂)；3.84-3.99 (m, 1H, H'-C(5'))；4.37, 4.42 (2m, 1H, H-C(4'))；4.65 (m, 1H, H-C(3'))；4.94-5.02 (m, 2H, OCH₂O)；5.24 (m, 1H, H-C(2'))；6.20, 6.23 (2d, J=5.6, 1H, H-C(1'))；6.75-6.81 (m, 4H, 芳香族H)；7.21-7.61 (m, 12H, 芳香族H)；7.99-8.04 (m, 2H, 芳香族H)；8.18, 8.20 (2s, 1H, H-C(2))；8.69, 8.72 (2s, 1H, H-C(8))；9.01 (br. s, 1H, NH-C(6))。³¹P-NMR (120 MHz, CDCl₃)：150.8, 151.6。

40

【0056】

N⁴-ベンゾイル-9-[5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2'-O-(

50

[(トリイソプロピルシリル) オキシ] メチル) - β -D-リボフラノシル] シトシン
3'-[(2-シアノエチル) ジイソプロピルホスホルアミダイト] (10) :

収率: 90-95%

TLC: R_f 0.50/0.45 (ヘキサン/EtOAc 7:3) $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): 0.99-1.23 (m, 33H, (i-Prop) $_2$ N-からの CH_3 ; (i-Prop) $_3$ Si-からの CH_3 およびCH); 2.39 (t, $J=6.3$, 1H, CH_2CN); 2.61 (dt, $J=2.5, 6.2$, 1H, CH_2CN); 3.43-3.97 (m, 12H, OCH_2 , (i-Prop) $_2$ N-からのCH, HおよびH'-C(5')), OCH_3); 4.29-4.56 (m, 3H, H-C(2', 3', 4'))); 5.20 (s, 2H, OCH_2O); 6.18, 6.19 (2d, $J=2.0$, 1H, H-C(1'))); 6.84-6.89 (m, 4H, 芳香族H); 7.26-7.63 (m, 13H, 芳香族H, H-C(5)); 7.88 (m, 2H, 芳香族H); 8.41, 8.51 (2d, $J=7.5$, 1H, H-C(6)); 8.40 (br. s, 1H, NH-C(4)). $^{31}\text{P-NMR}$ (120 MHz, CDCl_3): 150.7, 150.9。

【0057】

N^2 -ベンゾイル-9-[5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2'-O-([(トリイソプロピルシリル) オキシ] メチル)) - β -D-リボフラノシル] グアニン
3'-[(2-シアノエチル) ジイソプロピルホスホルアミダイト] (11) :

収率: 90-95%

TLC: R_f 0.55 (ヘキサン/EtOAc 1:1) $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): 0.75-1.29 (m, 39H, (i-Prop) $_2$ N-からの CH_3 および(i-Prop) $_2$ CHCOO-; (i-Prop) $_3$ Si-からの CH_3 およびCH); 1.62, 1.91 (2hept, $J=6.9$, 1H, (i-Prop) $_2$ CHCOO-からのCH); 2.26 (t, $J=6.6$, 1H, CH_2CN); 2.74 (dt, $J=1.1, 6.8$, 1H; CH_2CN); 3.19 (m, 1H, OCH_2); 3.45-3.69 (m, 3H, (i-Prop) $_2$ N-からのCH, OCH_2); 3.756, 3.761, 3.765 (3s, 6H, OCH_3); 3.88-4.17 (m, 2H, H, H'-C(5'))); 4.22, 4.32 (2br. s, 1H, H-C(4'))); 4.58 (m, 1H, H-C(3'))); 4.89-4.98 (m, 2H, OCH_2O); 5.07, 5.16 (2dd, $J=4.7, 7.6$, 1H, H-C(2'))); 5.84, 5.96 (2d, $J=7.6$, 1H, H-C(1'))); 6.76-6.81 (m, 4H, 芳香族H); 7.21-7.55 (m, 9H, 芳香族H); 7.74, 7.79 (2s, 1H, H-C(8)); 7.87, 8.26 (2br. s, 1H, NH-C(2)); 11.97 (br. s, 1H, H-N(1)). $^{31}\text{P-NMR}$ (120 MHz, CDCl_3): 150.4, 150.7。

【0058】

1-[5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2'-O-([(トリイソプロピルシリル) オキシ] メチル) - β -D-リボフラノシル] ウラシル 3'-[(2-シアノエチル) ジイソプロピルホスホルアミダイト] (12) :

収率: 90-95%

TLC: R_f 0.50 (ヘキサン/EtOAc 7:3) $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): 1.02-1.18 (m, 33H, (i-Prop) $_2$ N-からの CH_3 ; (i-Prop) $_3$ Si-からの CH_3 およびCH); 2.39 (t, $J=6.6$, 1H, CH_2CN); 2.53 (m, 1H, OCH_2); 2.64 (dt, $J=1.5, 6.2$, 1H, CH_2CN); 3.39 (m, 1H, OCH_2); 3.52-3.69 (m, 3.5H, (i-Prop) $_2$ N-からのCH, H, H'-C(5'))); 3.78, 3.79, 3.80 (3s, 6H, OCH_3); 3.82-3.96 (m, 0.5H, H'-C(5'))); 4.19, 4.27 (2br. s, 1H, H-C(4'))); 4.39-4.49 (m, 2H, H-C(2', 3'))); 4.98-5.07 (m, 2H, OCH_2O

); 5.32, 5.36 (2d, J=8.1, 1H, H-C(5)); 6.12 (d, J=4.4, 0.5H, H-C(1'))); 6.13 (d, J=4.2, 0.5H, H-C(1'))); 6.81-6.86 (m, 4H, 芳香族H); 7.23-7.43 (m, 9H, 芳香族H); 7.81, 7.86 (2d, J=8.1, 1H, H-C(6)); 8.75 (br. s, 1H, H-N(2)). ³¹P-NMR (120MHz, CDCl₃): 150.9, 151.3。

【0059】

実施例6：ホスホルアミダイト9-12でのリボ核酸の合成の手法

典型的な合成において、2μモルの適当に保護された(Sigmaからの)リボヌクレオシドを負荷した商業的に入手可能な「Controlled Pore Glass (制御孔ガラス)」支持体をDNA-合成器(Pharmacia Gene Assembler)で用いた。1.3μモルスケールのDNA-オリゴヌクレオチドの合成のために開発された製造業者のオリジナルのプロトコル[10]を以下の例外において用いた：各カップリングでは、0.16mlの0.08M(=1.28μモル)のホスホルアミダイト溶液を使用し、カップリング時間を12分に調整した。ビルトイン脱トリチル化アッセイによって測定したカップリング収率は、99.9%までの個々のカップリング収率にて平均99%を超えた。

【0060】

ホスホルアミダイト9-12から得られた粗製オリゴヌクレオチドのHPLC追跡を以下の図1および2に示す。調製で使用したパラメーターは以下の通りであった：

- 1 H₂O/EtOH 1:1中の10M CH₃NH₂; 25℃、5時間
- 2 THF中の1Mテトラブチルアンモニウムフッ化物; 25℃、5時間
- 3 逆相カラム上でのクロマトグラフィー

配列r(UUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU)は87%の全カップリング収率にて製造され、配列r(GCUCGUCUGAUGAGUCCGUGAGGACGAAAGACCGU)は74%の全カップリング収率にて製造された。

【0061】

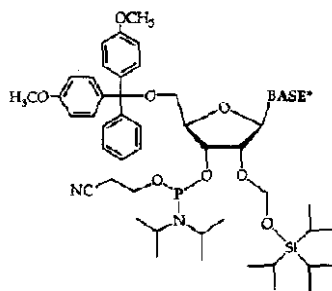
実施例7

以下の鎖は実施例2に示した方法にて、脱トリチル化アッセイによって示された以下の平均カップリング収率で合成した。

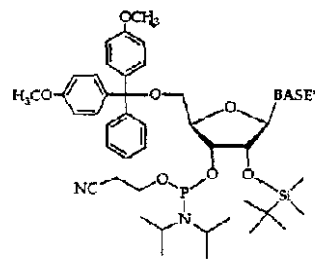
鎖配列	単位の数	スケール [μモル]	カップリング 収率 [%]
r(CCCCGAG)	7	1.5	99.2
r(AUGGCGCACGCU GGGAGA)	18	1.5	99.6
r(GGGUGAACUGGG GGAGGAUU)	20	1.5	99.4
r(GCUCGUCUGAUG AGUCCGUGAGGACG AAAGACCGU)	35	1.5	99.5
r(AAACAGAGAAGU CAACCCAGAGAAAC ACACGUUGUGGUAU AUU)	50	1.5	99.0
r(GGCCGGCAUGGU CCCAGCCUCCUCGC UGGCGCCGGCUGGG CAACAUUCGAGGG GACCGUCCCCUCGG UAAUGGCGAAUGGG AC)	84	1.5	99.5

実施例 18

本発明のリボヌクレオシド誘導体を用いるRNA鎖形成および2'-位の酸素原子上のシリル保護基を持つ公知のリボヌクレオシド誘導体の間の比較には、種々の鎖を、ホスホルアミダイトAまたはBいずれかを用いて合成した。



A



B

10

【0062】

1. 5 μ モルの固体支持体、120 μ l (0.1 M) のホスホルアミダイト溶液 (モル当量: 8) および360 μ l の0.25 M-ベンジルチオテトラゾールを用いるRNA合成では、以下の平均カップリング収率 (脱トリチル化アッセイによる) が見いだされた:

ホスホルアミダイト	カップリング時間	平均カップリング収率
A	12分	>99.5%
A	1.5分	>99.5%
B	12分	最大98%
B	1.5分	約92%

20

結果は、2つのホスホルアミダイトを用いる合成の間のカップリング時間に対する異なる依存性を明瞭に示す。

【0063】

塩基脱保護 (アンモノリシス) では、ホスホルアミダイトAからの鎖形成をエタノール/水 (1:1) 中の8 Mメチルアミンで2時間処理した。24時間までのアンモノリシスでの分解は見いだされなかった。ホスホルアミダイトBからの鎖形成を、30分間の間、技術水準に従って、水中の4 Mメチルアミンおよび7 Mアンモニアで処理した。

30

【0064】

2'-O-位の脱保護では、水中のテトラブチルアンモニウムフッ化物で、ホスホルアミダイトAからの鎖形成を3時間処理し、ホスホルアミダイトBからの鎖形成を14ないし26時間処理した。48時間までのホスホルアミダイトAからの鎖形成のさらなる処理は、いずれの鎖切断も生じなかった。

文献

- [1] B.E. Griffin, M. Jarman, C.B. Reese, *Tetrahedron* 1968, 24, 639; D.G. Norman, C.B. Reese, H.T. Serafinowska, *Tetrahedron Lett.* 1984, 25, 3015; C.B. Reese, R. Saffhill, J.E. Sulston, *Tetrahedron* 1970, 26, 1023; M.V. Rao, C.B. Reese, V. Schehlman, P.-S. Y. Chen, *Chem. Soc. Perk. Trans.* 1, 1993, 43; D.C. Capaldi, C.B. Reese, *Nucleic Acids Res.* 1994, 22, 2209; M.V. Rao, P. Macfarlane, *Nucleos. Nucleot.* 1995, 14, 911.
- [2] M.E. Schwartz, R.R. Breaker, G.T. Asteriadis, J.S. deBear, G.R. Gough, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1992, 2, 1019; S. Pitsch, *Helv. Chim. Acta* 1997, in preparation. 10
- [3] K.K. Ogilvie, K.L. Sadana, E.A. Thompson, M.A. Quilliam, J.B. Westmore, *Tetrahedron Lett.* 1974, 15, 2861; K.K. Ogilvie, S.L. Beaucage, A.L. Schiffman, N.Y. Theriault, K.L. Sadana, *Can. J. Chem.* 1978, 56, 2768; D. Flockerzi, G. Silber, R. Charubala, W. Schlosser, R.S. Varma, F. Creegan, *Liebigs Ann. Chem.* 1981, 1568; N. Usman, K.K. Ogilvie, M.-Y. Jiang, R.J. Cedergren, *J. Am. Chem. Soc.* 1987, 109, 7845; K.K. Ogilvie, N. Usman, K. Nicoghossian, R.J. Cedergren, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1988, 85, 5764. 20
- [4] N.D. Sinha, J. Biernat, H. Köster, *Tetrahedron Lett.* 1983, 24, 5843; N.D. Sinha, J. Biernat, J. McManus, H. Koster, *Nucleic Acids Res.* 1984, 12, 4539.
- [5] M.D. Matteucci, M.H. Caruthers, *Tetrahedron Lett.* 1980, 21, 3243; M.D. Matteucci, M.H. Caruthers, *J. Am. Chem. Soc.* 1981, 3185; S.L. Beaucage, M.H. Caruthers M.H., *Tetrahedron Lett.* 1981, 22, 1859; L.J. McBride, M.H. Caruthers, *ibid.* 1983, 24, 245; R.L. Letsinger, K.K. Ogilvie, *J. Am. Chem. Soc.* 1969, 91, 3350. 30
- [6] S.J. Jones and C.B. Reese, *J. Chem. Soc. Perkin I*, 1979 2762.
- [7] N. Usman, K.K. Ofilvie, M.Y. Jiang amd R.L. Cedergren, *J. Am. Chem. Soc.*, 109, 7845.
- [8] L.-L. Gundersen, T. Benneche, K. Undheim, *Acta Chem. Scand.* 1989, 43, 706. 40
- [9] G. H. Hakimelahi, Z. A. Proba, K. K. Ogilvie, *Can. J. Chem.* 1982, 60, 1106.
- [10] Pharmacia, 'User Manual for Gene Assembler Plus'.

フロントページの続き

- (72)発明者 ヴァイス, パトリック, アー.
スイス, ツェーハー 8051 チューリッヒ, リューギスラントストラッサ 241
- (72)発明者 ジェニー, ルチ
スイス, ツェーハー 8004 チューリッヒ, ロトヴァントストラッサ 65

審査官 荒木 英則

- (56)参考文献 ANTONSEN, OEYVIND, et al., PREPARATION OF MONOSILYL ETHERS OF VICINAL DIOLS, ACTA CHEM . SCAND., 1992年, 46(8), pp.757-760
- GUNDERSEN, LISE LOTTE, et al., ARYL- AND ALKYNYLTRIISOPROPOXYTITANIUM REAGENTS IN REGIOSELECTIVE CARBON-CARBON BOND FORMATION IN AZINES, TETRAHEDRON, 1992年, 48(27), pp .5647-5656
- ANTONSEN, OEYVIND, et al., CROSS ALDOL PRODUCTS FROM ALPHA.-HALOALKOXY-SILANES AND SILYL ENOL ETHERS, ACTA CHEM. SCAND., 1992年, 46(2), pp.172-177
- GUNDERSEN, LISE LOTTE, et al., CHLOROMETHOXY-SILANES AS PROTECTIVE REAGENTS FOR STERICALLY HINDERED ALCOHOLS, ACTA CHEM. SCAND., 1989年, 43(7), pp.706-709
- BENNECHE, TORE, et al., (TERT-BUTYLDIMETHYLSILOXY)METHYL CHLORIDE: SYNTHESIS AND USE AS N-PROTECTING GROUP IN PYRIMIDINONES, ACTA CHEM. SCAND., SER. B., 1988年, B42(6), pp.384-389
- USMAN, N., et al., AUTOMATED CHEMICAL SYNTHESIS LONG OLIGORIBONUCLEOTIDES USING 2'-O-SILYLATED RIBONUCLEOSIDE 3'-O-PHOSPHORAMIDITES CONTROLLED-PORE GLASS SUPPORT SYNTHESIS 43-NUCLEOTIDE SEQUENCE SIMILAR 3'-HALF MOLECULE OF AN ESCHERICHIA COLI FORMYLMETHIONINE tRNA, JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, 1987年, 109(25), pp.7845-7854

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07H 1/00-99/00
C07F 7/00- 7/18
CAplus(STN)
REGISTRY(STN)