

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7016170号

(P7016170)

(45)発行日 令和4年2月4日(2022.2.4)

(24)登録日 令和4年1月27日(2022.1.27)

(51)国際特許分類

F I

C 0 7 H 19/067 (2006.01)

C 0 7 H 19/067

C S P

C 0 7 H 21/02 (2006.01)

C 0 7 H 21/02

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 K 48/00

A 6 1 K 31/712 (2006.01)

A 6 1 K 31/712

C 1 2 N 15/113 (2010.01)

C 1 2 N 15/113

Z Z N A

請求項の数 22 (全64頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2018-556753(P2018-556753)

(86)(22)出願日 平成29年12月14日(2017.12.14)

(86)国際出願番号 PCT/JP2017/044995

(87)国際公開番号 WO2018/110678

(87)国際公開日 平成30年6月21日(2018.6.21)

審査請求日 令和2年12月10日(2020.12.10)

(31)優先権主張番号 特願2016-244916(P2016-244916)

(32)優先日 平成28年12月16日(2016.12.16)

(33)優先権主張国・地域又は機関

日本国(JP)

(出願人による申告)平成28年度、国立研究開発法人日本医療研究開発機構、革新的バイオ医薬品創出基盤技術開発事業、組織特異的送達能を有するコンジュゲート s i R N A の創成、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願

(73)特許権者 504139662

国立大学法人東海国立大学機構

愛知県名古屋市千種区不老町1番

(74)代理人 110000110

特許業務法人快友国際特許事務所

(72)発明者 上野 義仁

岐阜県岐阜市柳戸1番1 国立大学法人

岐阜大学内

審査官 三上 晶子

最終頁に続く

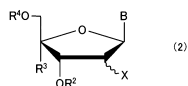
(54)【発明の名称】ヌクレオシド誘導体及びその利用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の式(2)で表される、ヌクレオシド誘導体又はその塩。

【化18】



(式(2)中、Xは、ハロゲン原子を表し、R²及びR⁴は互いに同一又は異なってもよく、水素原子、水酸基の保護基、リン酸基、保護されたリン酸基、又は-P(=O)nR⁵R⁶(nは0又は1を示し、R⁵及びR⁶は、互いに同一又は異なってもよく、水素原子、水酸基、保護された水酸基、メルカプト基、保護されたメルカプト基、低級アルコキシ基、シアノ低級アルコキシ基、アミノ基、又は置換されたアミノ基のいずれかを示す。ただし、nが1のときには、R⁵及びR⁶が共に水素原子となることはない。)を示し、R³は、それぞれ連結基を有するNHR⁷(R⁷は、水素原子、アルキル基、アルケニル基又はアミノ基の保護基を表す。ただし、R⁷が水素原子又はアミノ基の保護基のとき、連結基は、炭素数2~3のアルキレン基である。)を表し、Bは、プリン-9-イル基、2-オキソ-ピリミジン-1-イル基、置換プリン-9-イル基、又は置換2-オキソ-ピリミジン-1-イル基のいずれかを表す。)

【請求項2】

前記式(2)中、R⁷は水素原子を表す、請求項1に記載のヌクレオシド誘導体又はその

塩。

【請求項 3】

前記式 (2) 中、前記ハロゲン原子は、フッ素原子を表す、請求項 1 又は 2 に記載のヌクレオシド誘導体又はその塩。

【請求項 4】

請求項 1～3 のいずれかに記載のヌクレオシド誘導体又はその塩を含む、オリゴリボヌクレオチドに対する細胞膜透過性付与剤。

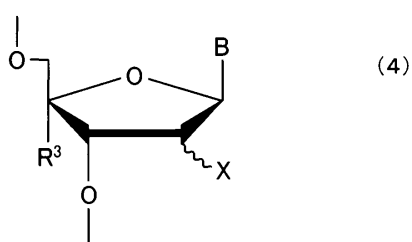
【請求項 5】

請求項 1～3 のいずれかに記載のヌクレオシド誘導体又はその塩を含む、オリゴリボヌクレオチドに対するリボヌクレアーゼ耐性付与剤。

【請求項 6】

以下の式 (4) からなる群から選択される部分構造を少なくとも 1 個備える、オリゴリボヌクレオチド誘導体又はその塩を含む RNA 干渉剤。

【化 19】



(式 (4) 中、X は、ハロゲン原子を表し、 R^3 は、それぞれ連結基を有する NHR^7 (R^7 は、水素原子、アルキル基、アルケニル基又はアミノ基の保護基を表す。ただし、 R^7 が、水素原子のとき、連結基は、炭素数 2～3 のアルキレン基である。) を表し、B は、プリン-9-イル基、2-オキソ-ピリミジン-1-イル基、置換プリン-9-イル基、又は置換 2-オキソ-ピリミジン-1-イル基のいずれかを表す。)

【請求項 7】

前記式 (4) 中、 R^7 は水素原子を表すか又は前記ハロゲン原子はフッ素原子である、請求項 6 に記載の RNA 干渉剤。

【請求項 8】

前記部分構造を少なくとも 3 個備えており、前記部分構造を 5' 末端側、中央部及び 3' 末端側に備える、請求項 6 に記載の RNA 干渉剤。

【請求項 9】

前記部分構造を少なくとも 3 個備えており、前記部分構造を 5' 末端側、中央部及び 3' 末端側に備える、請求項 7 に記載の RNA 干渉剤。

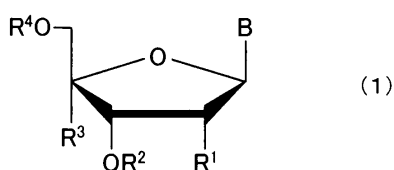
【請求項 10】

前記部分構造を少なくとも 6 個備える、請求項 6～9 のいずれかに記載のオリゴリボヌクレオチド誘導体又はその塩を含む、RNA 干渉剤。

【請求項 11】

以下の式 (1) で表される、ヌクレオシド誘導体又はその塩。

【化 20】



(式 (1) 中、 R^1 は、水素原子がアルキル基又はアルケニル基で置換された水酸基を表し、 R^2 及び R^4 は互いに同一又は異なっていてもよく、水素原子、水酸基の保護基、リン

酸基、保護されたリン酸基、又は $-P(=O)nR^5R^6$ (n は0又は1を示し、 R^5 及び R^6 は、互いに同一又は異なってもよく、水素原子、水酸基、保護された水酸基、メルカプト基、保護されたメルカプト基、低級アルコキシ基、シアノ低級アルコキシ基、アミノ基、又は置換されたアミノ基のいずれかを示す。ただし、 n が1のときには、 R^5 及び R^6 が共に水素原子となることはない。)を示し、 R^3 は、それぞれ連結基を有する NHR^7 (R^7 は、水素原子、アルキル基、アルケニル基又はアミノ基の保護基を表す。ただし、 R^7 が、水素原子又はアミノ基の保護基のとき、連結基は、炭素数2～3のアルキレン基である。)を表し、 B は、プリン-9-イル基、2-オキソ-ピリミジン-1-イル基、置換プリン-9-イル基、又は置換2-オキソ-ピリミジン-1-イル基のいずれかを表す。)

10

【請求項12】

前記式(1)中、 R^7 は、水素原子を表す、請求項11に記載のヌクレオシド誘導体又はその塩。

【請求項13】

前記式(1)中、 R^1 は水素原子がアルキル基で置換された水酸基を表す、請求項11又は12に記載のヌクレオシド誘導体又はその塩。

【請求項14】

請求項10～13のいずれかに記載のヌクレオシド誘導体又はその塩を含む、オリゴリボヌクレオチドに対する細胞膜透過性付与剤。

【請求項15】

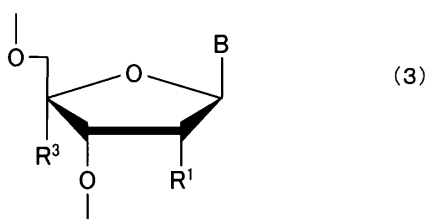
請求項11～13のいずれかに記載のヌクレオシド誘導体又はその塩を含む、オリゴリボヌクレオチドに対するリボヌクレアーゼ耐性付与剤。

20

【請求項16】

以下の式(3)で表される部分構造を備えるオリゴリボヌクレオチド誘導体又はその塩を含むRNA干渉剤。

【化21】



30

(式(3)中、 R^1 は、水素原子がアルキル基又はアルケニル基で置換された水酸基を表し、 R^3 は、それぞれ連結基を有する NHR^7 (R^7 は、水素原子、アルキル基、アルケニル基又はアミノ基の保護基を表す。ただし、 R^7 が、水素原子のとき、連結基は、炭素数2～3のアルキレン基である。)を表し、 B は、プリン-9-イル基、2-オキソ-ピリミジン-1-イル基、置換プリン-9-イル基、又は置換2-オキソ-ピリミジン-1-イル基のいずれかを表す。)

【請求項17】

前記式(3)中、 R^1 は、水素原子がアルキル基で置換された水酸基を表し、 R^7 は水素原子を表す、請求項16に記載のRNA干渉剤。

40

【請求項18】

前記部分構造を少なくとも3個備えており、前記部分構造を5'末端側、中央部及び3'末端側に備える、請求項16に記載のRNA干渉剤。

【請求項19】

前記部分構造を少なくとも3個備えており、前記部分構造を5'末端側、中央部及び3'末端側に備える、請求項17に記載のRNA干渉剤。

【請求項20】

前記部分構造を少なくとも6個備える、請求項16～19のいずれかに記載のRNA干渉

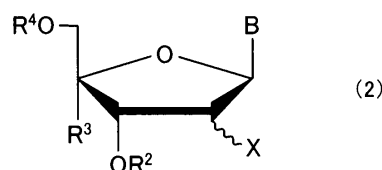
50

剤。

【請求項 2 1】

以下の式 (2) で表される、ヌクレオシド誘導体又はその塩を含有する、オリゴリボヌクレオチドに対する細胞膜透過性又はリボヌクレオチド耐性の付与剤。

【化 2 2】



10

(式 (2) 中、X は、ハロゲン原子を表し、R² 及び R⁴ は互いに同一又は異なってもよく、水素原子、水酸基の保護基、リン酸基、保護されたリン酸基、又は -P(=O)(R⁵)(R⁶) (n は 0 又は 1 を示し、R⁵ 及び R⁶ は、互いに同一又は異なってもよく、水素原子、水酸基、保護された水酸基、メルカプト基、保護されたメルカプト基、低級アルコキシ基、シアノ低級アルコキシ基、アミノ基、又は置換されたアミノ基のいずれかを示す。ただし、n が 1 のときには、R⁵ 及び R⁶ が共に水素原子となることはない。) を示し、R³ は、それぞれ連結基

を有する NHR⁷ (R⁷ は、水素原子、アルキル基、アルケニル基又はアミノ基の保護基を表す。ただし、R⁷ が水素原子のとき、連結基は、炭素数 2～3 のアルキレン基である。

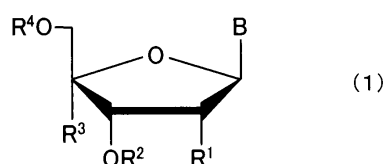
20

) を表し、B は、プリン-9-イル基、2-オキソ-ピリミジン-1-イル基、置換プリン-9-イル基、又は置換 2-オキソ-ピリミジン-1-イル基のいずれかを表す。)

【請求項 2 2】

以下の式 (1) で表される、ヌクレオシド誘導体又はその塩を含有する、オリゴリボヌクレオチドに対する細胞透過性又はリボヌクレアーゼ耐性の付与剤。

【化 2 3】



30

(式 (1) 中、R¹ は、水素原子がアルキル基又はアルケニル基で置換された水酸基を表し、R² 及び R⁴ は互いに同一又は異なってもよく、水素原子、水酸基の保護基、リン酸基、保護されたリン酸基、又は -P(=O)(R⁵)(R⁶) (n は 0 又は 1 を示し、R⁵ 及び R⁶ は、互いに同一又は異なってもよく、水素原子、水酸基、保護された水酸基、メルカプト基、保護されたメルカプト基、低級アルコキシ基、シアノ低級アルコキシ基、アミノ基、又は置換されたアミノ基のいずれかを示す。ただし、n が 1 のときには、R⁵ 及び R⁶ が共に水素原子となることはない。) を示し、R³ は、それぞれ連結基を有する NHR⁷ (R⁷ は、水素原子、アルキル基、アルケニル基又はアミノ基の保護基を表す。ただし、R⁷ が、水素原子のとき、連結基は、炭素数 2～3 のアルキレン基である。) を表し、B は、プリン-9-イル基、2-オキソ-ピリミジン-1-イル基、置換プリン-9-イル基、又は置換 2-オキソ-ピリミジン-1-イル基のいずれかを表す。)

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本明細書は、ヌクレオシド誘導体及びその利用に関する。

【背景技術】

【0002】

がんをはじめ、遺伝子変異や遺伝子発現異常が原因又は関連している疾患は多数知られて

50

いる。遺伝子の発現を抑制する *siRNA* などの RNA 医薬は、こうした疾患に有用であり、優れた医薬品ポテンシャルを有しているといえる。

【0003】

一方、*siRNA* 等は、細胞膜透過が困難であったり、ヌクレアーゼによる分解を受けやすいという問題がある。また、標的選択性は高いものの、標的組織までの選択的輸送が困難であるという問題がある。こうした点を改善するべく、脂質ナノ粒子 (LNP) などの送達用のキャリアが検討されている。また、RNA のリボースに対してアミノメチル基を導入するなどの改変する試みも行われている (非特許文献 1~4)。

【発明の概要】

【0004】

しかしながら、こうした試みにもかかわらず、RNA 医薬の有効性の一層の向上が求められている。送達用キャリアにも不十分な点があるほか、こうした RNA の改変によっても、十分な細胞膜透過性、リボヌクレアーゼ耐性及び標的組織送達性を充足することはできていない。こうしたことから、現状においても、*siRNA* 等においてその本来の優れた医薬品ポテンシャルを発揮できていない。

【0005】

本明細書は、RNA 医薬等に適用するのにより実用的なヌクレオシド及びその利用を提供することを、目的とする。

【課題を解決するための手段】

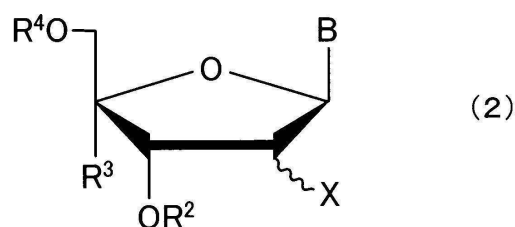
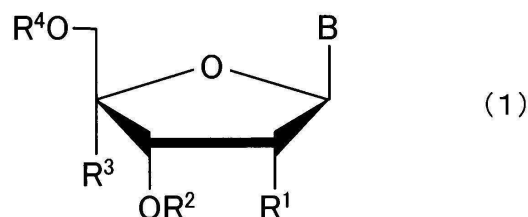
【0006】

本発明者らは、リボヌクレオチドの糖部であるリボースに着目した。リボースの第 4' 位にアミノ基などの塩基性を有する置換基を備えること、又は 2' 位の水酸基をハロゲン原子で置換することで、リボヌクレアーゼ耐性ほか細胞膜透過性を向上させうるという知見を得た。本明細書によれば、かかる知見に基づき以下の手段が提供される。

【0007】

(1) 以下の式 (1) 又は (2) で表される、ヌクレオシド誘導体又はその塩。

【化 1】



(式 (1) 中、 R^1 は、水素原子、水酸基、水素原子がアルキル基又はアルケニル基で置換された水酸基又は保護された基を表し、式 (2) 中、 X は、ハロゲン原子を表す。式 (1) 及び式 (2) 中、 R^2 及び R^4 は互いに同一又は異なっていてもよく、水素原子、水酸基の保護基、リン酸基、保護されたリン酸基、又は $-P(=O)(R^5)R^6$ (n は 0 又は 1 を示し、 R^5 及び R^6 は、互いに同一又は異なっていてもよく、水素原子、水酸基、保護された水酸基、メルカプト基、保護されたメルカプト基、低級アルコキシ基、シアノ低級アル

コキシ基、アミノ基、又は置換されたアミノ基のいずれかを示す。ただし、 n が1のときには、 R^5 及び R^6 が共に水素原子となることはない。)を示し、 R^3 は、それぞれ連結基を有する NHR^7 (R^7 は、水素原子、アルキル基、アルケニル基又はアミノ基の保護基を表す。)、アジド基、アミジノ基又はグアニジノ基を表し、 B は、プリン-9-イル基、2-オキソ-ピリミジン-1-イル基、置換プリン-9-イル基、又は置換2-オキソ-ピリミジン-1-イル基のいずれかを表す。)

(2) 前記式(1)及び式(2)中、 R^7 は水素原子を表すか又は R^3 は前記連結基を有するグアニジノ基を表す、(1)に記載のヌクレオシド誘導体又はその塩。

(3) 前記式(1)及び式(2)中、 R^3 の前記連結基は、炭素数2以上6以下のアルキレン基を表す、(1)又は(2)に記載のヌクレオシド誘導体又はその塩。

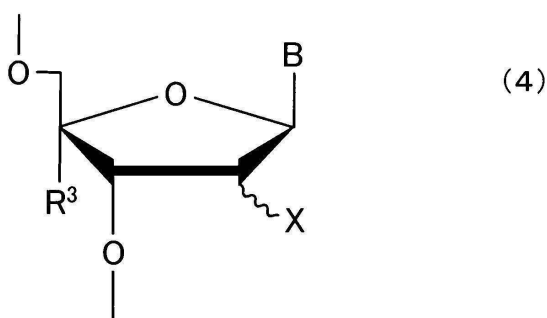
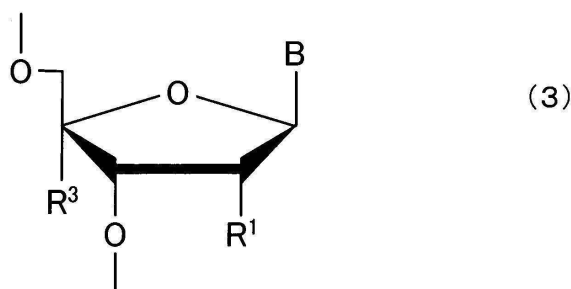
(4) 前記式(1)及び式(2)中、 R^3 の前記連結基は、炭素数2以上6以下のアルキレン基を表し、 R^7 は水素原子を表す、(1)～(3)のいずれかに記載のヌクレオシド誘導体又はその塩。

(5) (1)～(4)のいずれかに記載のヌクレオシド誘導体を含む、オリゴヌクレオチドに対する細胞膜透過性付与剤。

(6) (1)～(4)のいずれかに記載のヌクレオシド誘導体を含む、オリゴヌクレオチドに対するリボヌクレアーゼ耐性付与剤。

(7) 以下の式(3)及び式(4)からなる群から選択される部分構造を少なくとも1個備える、オリゴヌクレオチド誘導体又はその塩。

【化2】



(式(3)中、 R^1 は、水素原子、ハロゲン原子、水酸基、水素原子がアルキル基又はアルケニル基で置換された水酸基又は保護された水酸基を表し、式(4)中、 X は、ハロゲン原子を表す。式(3)及び式(4)中、 R^3 は、それぞれ連結基を有する NHR^7 (R^7 は、水素原子、アルキル基、アルケニル基又はアミノ基の保護基を表す。)、アジド基、アミジノ基又はグアニジノ基を表し、 B は、プリン-9-イル基、2-オキソ-ピリミジン-1-イル基、置換プリン-9-イル基、又は置換2-オキソ-ピリミジン-1-イル基のいずれかを表す。)

(8) 前記部分構造を少なくとも2個備える、(7)に記載のオリゴヌクレオチド誘導体又はその塩。

(9) 前記部分構造を少なくとも3個備えており、前記オリゴヌクレオチドを5'末端側、

中央部及び3'末端側に備える、(7)又は(8)に記載のオリゴヌクレオチド誘導体又はその塩。

(10) 前記部分構造を少なくとも6個備える、(7)～(9)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド誘導体又はその塩。

(11) 前記オリゴヌクレオチドは、オリゴリボヌクレオチドである、(7)～(10)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド誘導体又はその塩。

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図1】オリゴヌクレオチド合成のためのモノマーの構造を示す図である。

【図2】リンカーの構造を示す図である。

【図3】オリゴヌクレオチドの融解温度の評価結果を示す図である。

【図4】オリゴヌクレオチドの融解温度の評価結果を示す図である。

【図5】リボヌクレアーゼ耐性の実験結果を示す図である。

【図6】リボヌクレアーゼ耐性の他の評価結果を示す図である。

【図7】アミノアルキル基修飾による細胞膜透過性の評価結果を示す図である。

【図8】アミノアルキル基修飾による細胞膜透過性の他の評価結果を示す図である。

【図9】パッセンジャー鎖のウリジンユニットを2'-フルオロアミノエチルウリジン又は2'-O-メチルアミノエチルウリジンで置換したsiRNAによるRNAi活性の評価結果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0009】

本明細書の開示は、RNA医薬に好適な実用性のあるヌクレオシド誘導体又はその塩及びその利用に関する。本明細書に開示されるヌクレオシド誘導体又はその塩（以下、単に、本ヌクレオシド誘導体ともいう。）によれば、リボヌクレアーゼ耐性を有するとともに、細胞膜透過性に優れている。このため、従来のRNA医薬に用いられてきた送達用のLNPなどのキャリアを用いない投与に好適なオリゴヌクレオチドを提供できる。

【0010】

また、本ヌクレオシド誘導体は、RNAを用いた検出プローブなど試薬としても有用である。すなわち、種々のRNA試薬に好適なオリゴヌクレオチドを提供できる。

【0011】

本明細書に開示されるヌクレオシド誘導体は、従来困難であったリボースの第4'位に種々のアミノアルキル系置換基を導入し、その性質について精査したところ、予想を超える有用な特徴を見出したことに基づいている。従来、リボヌクレアーゼ耐性に関しては、リボースの2'位や3'位の置換体によることが一般的であった。本明細書に開示されるヌクレオシド誘導体によれば、予想を超えるリボヌクレアーゼ耐性と細胞膜透過性という、RNA医薬等に有用な特性を兼ね備えることができる。

【0012】

以下、本開示の代表的かつ非限定的な具体例について、適宜図面を参照して詳細に説明する。この詳細な説明は、本開示の好ましい例を実施するための詳細を当業者に示すことを単純に意図しており、本開示の範囲を限定することを意図したものではない。また、以下に開示される追加的な特徴ならびに発明は、さらに改善されたヌクレオシド誘導体及びその利用を提供するために、他の特徴や発明とは別に、又は共に用いることができる。

【0013】

また、以下の詳細な説明で開示される特徴や工程の組み合わせは、最も広い意味において本開示を実施する際に必須のものではなく、特に本開示の代表的な具体例を説明するためにのみ記載されるものである。さらに、上記及び下記の代表的な具体例の様々な特徴、ならびに、独立及び従属クレームに記載されるものの様々な特徴は、本開示の追加的かつ有用な実施形態を提供するにあたって、ここに記載される具体例のとおり、あるいは列挙された順番のとおり組み合わせなければならないものではない。

【0014】

10

20

30

40

50

本明細書及び／又はクレームに記載された全ての特徴は、実施例及び／又はクレームに記載された特徴の構成とは別に、出願当初の開示ならびにクレームされた特定事項に対する限定として、個別に、かつ互いに独立して開示されることを意図するものである。さらに、全ての数値範囲及びグループ又は集団に関する記載は、出願当初の開示ならびにクレームされた特定事項に対する限定として、それらの中間の構成を開示する意図を持ってなされている。以下、本明細書の開示の各種実施形態について詳細に説明する。

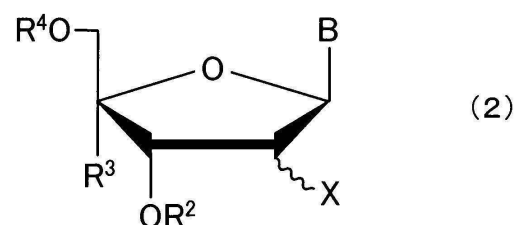
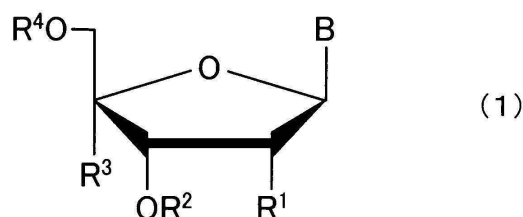
【0015】

(本ヌクレオシド誘導体)

本ヌクレオシド誘導体は、以下の式(1)又は(2)で表されるヌクレオシド誘導体又はその塩とすることができる。本ヌクレオシド誘導体は、当業者の周知の方法で、オリゴヌクレオチドの部分構造に含めることができる。

【0016】

【化3】



【0017】

本ヌクレオシド誘導体は、リボース及びデオキシリボースの第4'位に塩基性を有する置換基を備えることで、本ヌクレオシド誘導体に由来する部分構造を備えるオリゴヌクレオチドにおいて、オリゴヌクレオチドが有するリン酸基などに起因する負電荷の少なくとも一部を中和することができるという電荷調節能を備えることができる。

【0018】

また、当該部分構造を備えるオリゴヌクレオチドの細胞膜透過性を向上させることができる。

【0019】

さらに、本ヌクレオシド誘導体由来部分構造を備えるオリゴヌクレオチドにおいて、リボヌクレアーゼ耐性を向上することができる。

【0020】

本明細書中、式等で表される化合物における置換基における「低級」の意は、該置換基を構成する炭素数が、最大10個までであることを意味している。例えば、通常は炭素数1～6個、又は炭素数1～5個が例示され、さらには炭素数1～4個、又は炭素数1～3個であることが好ましい例として挙げられる。

【0021】

以下、本明細書に開示される本ヌクレオシド誘導体又はその塩及びこれらの利用について説明する。

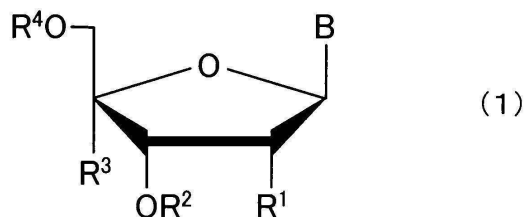
【0022】

【ヌクレオシド誘導体及びその塩】

本ヌクレオシド誘導体又はその塩の一つの態様は、以下の式（１）で表されるヌクレオシド誘導体又はその塩である。

【００２３】

【化４】



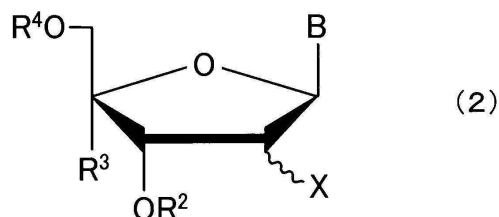
10

【００２４】

また、本ヌクレオシド誘導体又はその塩の他の一つの態様は、以下の式（２）で表されるヌクレオシド誘導体又はその塩である。

【００２５】

【化５】



20

【００２６】

〔R¹について〕

式（１）中、R¹は、水素原子、水酸基、水素原子がアルキル基又はアルケニル基で置換された水酸基又は保護された水酸基を表す。R¹が水素原子のとき、本ヌクレオシド誘導体は、デオキシリボヌクレオシド誘導体である。R¹が、水酸基、水素原子がアルキル基又はアルケニル基で置換された水酸基又は保護された水酸基であるとき、本ヌクレオシド誘導体は、リボヌクレオシド誘導体である。

30

【００２７】

〔Xについて〕

式（２）中、Xは、ハロゲン原子を表す。ハロゲン原子としては、特に限定するものではないが、塩素原子、ヨウ素原子、フッ素原子及び臭素原子等が挙げられる。R¹がハロゲン原子のとき、本ヌクレオシド誘導体は、デオキシリボヌクレオシド誘導体である。なお、ハロゲン原子は、式（２）からも明らかなように、リボースの２'位の炭素原子に対する結合方向は特に限定するものではないが、天然のリボースの水酸基に相当するようにハロゲン原子が結合することが好適である。

40

【００２８】

（アルキル基）

本明細書中、アルキル基としては、直鎖状、分枝状、環状、又はそれらの組み合わせである飽和炭化水素基が挙げられる。通常は、低級アルキル基が好ましく、例えば炭素数１～６個の低級アルキル基、又は炭素数１～５個の低級アルキル基がより好ましい例として挙げられ、さらに炭素数１～４個又は炭素数１～３個の低級アルキル基が特に好ましい例として挙げられる。直鎖状の炭素数１から４までのアルキル基としては、メチル基、エチル基、*n*-プロピル基、又*n*-ブチル基等が好適な例として挙げられ、このうち、メチル基、エチル基、*n*-プロピル基が好ましく、また例えばメチル基、エチル基が好ましく、ま

50

たとえばメチル基が好ましい。また分枝状の炭素数 1 から 4 までのアルキル基としては、イソプロピル基、イソブチル基、s-ブチル基、t-ブチル基等が挙げられ、このうち、イソプロピル基が特に好ましい例として挙げられる。又、環状の炭素数 1 から 4 までのアルキル基としては、シクロプロピル基、シクロブチル基、又はシクロプロピルメチル基等が挙げられる。

【0029】

(アルケニル基)

本明細書中、アルケニル基としては、直鎖状、分枝状、環状、又はそれらの組み合わせである飽和炭化水素基が挙げられる。通常は、低級アルケニル基が好ましく、低級アルケニル基としては、例えばエテニル基、1-プロペニル基、2-プロペニル基、1-メチル-2-プロペニル基、1-メチル-1-プロペニル基、2-メチル-1-プロペニル基、1-ブテニル基、2-ブテニル基などが挙げられる。

【0030】

(水酸基の保護基又は保護された水酸基)

本明細書において、水酸基の保護基としては、当業者に周知であって、例えば *Protective Groups in Organic Synthesis* (John Wiley and Sons, 2007 年版) を参考にすることができる。水酸基の保護基としては、代表的な例を挙げると、例えば、脂肪族アシル基、芳香族アシル基、低級アルコキシメチル基、適宜の置換基があってもよいオキシカルボニル基、適宜の置換基があってもよいテトラヒドロピラニル基、適宜の置換基があってもよいテトラチオピラニル基、合わせて 1 から 3 個の置換又は無置換のアリール基にて置換されたメチル基 (但し前述の置換アリールにおける置換基としては、低級アルキル、低級アルコキシ、ハロゲン原子、又はシアノ基を意味する。)、又はシリル基、等が例示される。

【0031】

なお、本明細書中、アルコキシ基としては、直鎖状、分枝状、環状、又はそれらの組み合わせである飽和アルキルエーテル基が挙げられる。低級アルコキシ基が好ましく、低級アルコキシ基としては、例えば炭素数 1 ~ 6 個の低級アルコキシ基、又は炭素数 1 ~ 5 個の低級アルコキシ基が挙げられ、さらには炭素数 1 ~ 4 個、又は炭素数 1 ~ 3 個のアルコキシ基が好ましく、炭素数 1 ~ 4 個のアルコキシ基が特に好ましい。炭素数 1 ~ 4 個のアルコキシ基としては、メトキシ基、エトキシ基、n-プロポキシ基、又はn-ブトキシ基等が好ましい例として挙げられる。また、イソプロポキシ基、イソブトキシ基、s-ブトキシ基、又はt-ブトキシ基等も好ましい例として挙げられる。また、シクロプロポキシ基、シクロブトキシ基も好ましく、シクロプロピルメトキシ基も好ましい例として挙げられる。

【0032】

本明細書中、アルキルチオ基としては、直鎖状、分枝状、環状、又はそれらの組み合わせである飽和アルキルチオ基が挙げられる。低級アルキルチオ基が好ましく、低級アルキルチオ基としては、例えば炭素数 1 ~ 6 個の低級アルキルチオ基、又は炭素数 1 ~ 5 個の低級アルキルチオ基が好ましく、さらには炭素数 1 ~ 4 個の低級アルキルチオ基、又は炭素数 1 ~ 3 個までのアルキルチオ基が特に好ましい例として挙げられる。炭素数 1 ~ 4 個の飽和アルキルチオ基としては、例えば、メチルチオ基、エチオルチオ基、n-プロピルチオ基、n-ブチルチオ基等が好ましい例として例示される。またイソプロピルチオ基、イソブチルチオ基、s-ブチルチオ基、又はt-ブチルチオ基等も好ましい例として例示される。またシクロプロピルチオ基、又はシクロブチルチオ基が好ましい例として挙げられ、さらにシクロプロピルメチルチオ基がさらに好ましい例として例示される。

【0033】

これらのうち、脂肪族アシル基、芳香族アシル基、シリル基が特に好ましい例として挙げられる。また、合わせて 1 から 3 個の置換又は無置換のアリール基にて置換されたメチル基 (但しその置換アリールにおける置換基は、前述の通り) も好ましい例として挙げられ

10

20

30

40

50

る。

【0034】

上記の脂肪族アシル基としては、例えば、アルキルカルボニル基、カルボキシアルキルカルボニル基、ハロゲノ低級アルキルカルボニル基、又は低級アルコキシ低級アルキルカルボニルが挙げられる。

【0035】

なお、前記アルキルカルボニル基におけるアルキルは前述の説明の通りである。すなわち、アルキルカルボニル基としては、例えばホルミル基、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、又はヘナイコサイル基が挙げられる。このうち、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、ピバロイル基が好ましい例として挙げられ、さらにはアセチル基が特に好ましい例として挙げられる。また前記カルボキシ化アルキルカルボニル基におけるアルキルは前述の説明の通りである。カルボキシ化の置換位置などについても適宜選択できる。すなわち、カルボキシ化アルキルカルボニル基としては、例えばスクシノイル基、グルタロイル基、アジポイル基が挙げられる。

【0036】

前記ハロゲノ低級アルキルカルボニル基における、ハロゲン、低級、及びアルキルについては前述の説明の通りである。ハロゲンの置換位置などについても適宜選択できる。すなわち、ハロゲノ低級アルキルカルボニル基としては、例えばクロロアセチル基、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が挙げられる。

【0037】

前記低級アルコキシ低級アルキルカルボニル基における、アルコキシ及びアルキル、さらに低級については前述の説明の通りである。低級アルコキシが置換する位置などについても適宜選択できる。すなわち、低級アルコキシ低級アルキルカルボニル基として、例えばメトキシアセチル基が挙げられる。

【0038】

上記の芳香族アシル基としては、例えば、アリールカルボニル基、ハロゲノアリールカルボニル基、低級アルキル化アリールカルボニル基、低級アルコキシ化アリールカルボニル基、カルボキシ化アリールカルボニル基、ニトロ化アリールカルボニル基、又はアリール化アリールカルボニル基が挙げられる。

【0039】

前記アリールカルボニル基としては、例えばベンゾイル基、 α -ナフトイル基、 β -ナフトイル基が挙げられ、さらに好ましくはベンゾイル基が挙げられる。前記ハロゲノアリールカルボニル基としては、例えば、2-ブロモベンゾイル基、4-クロロベンゾイル基が挙げられる。前記低級アルキル化アリールカルボニル基としては、2,4,6-トリメチルベンゾイル基、4-トルオイル基、3-トルオイル基、2-トルオイル基が挙げられる。前記低級アルコキシ化アリールカルボニル基としては、例えば4-アニソイル基、3-アニソイル基、2-アニソイル基が挙げられる。

【0040】

前記カルボキシ化アリールカルボニル基としては、例えば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が挙げられる。前記ニトロ化アリールカルボニル基としては、例えば、4-ニトロベンゾイル基、3-ニトロベンゾイル基、2-ニトロベンゾイル基が挙げられる。前記アリール化アリールカルボニル基と

しては、例えば、4-フェニルベンゾイル基が挙げられる。

【0041】

低級アルコキシメチル基としては、例えばメトキシメチル基、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、tert-ブトキシメチル基が挙げられる。特に好ましくはメトキシメチル基が挙げられる。

【0042】

適宜の置換基があってもよいオキシカルボニル基としては、低級アルコキシカルボニル基、ハロゲン又はシリル基で置換された低級アルコキシカルボニル基、又はアルケニルオキシカルボニル基が挙げられる。

【0043】

前記低級アルコキシカルボニル基としては、例えばメトキシカルボニル基、エトキシカルボニル基、tert-ブトキシカルボニルイソブトキシカルボニル基が挙げられる。前記ハロゲン又は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-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が挙げられる。

【0044】

前記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が挙げられる。上記の、適宜の置換基があってもよいテトラヒドロピラニル基としては、例えばテトラヒドロピラン-2-イル基、又は、3-ブromotetraヒドロピラン-2-イル基が好ましい例として挙げられ、特に好ましくはテトラヒドロピラン-2-イル基が挙げられる。

【0045】

適宜の置換基があってもよいテトラチオピラニル基としては、例えばテトラヒドロチオピラン-2-イル基、4-メトキシテトラヒドロチオピラン-4-イル基が挙げられ、さらに好ましくはテトラヒドロチオピラン-2-イル基が挙げられる。合わせて1から3個の置換又は無置換のアリール基にて置換されたメチル基、においては、前述の置換アリールにおける置換基としては、低級アルキル、低級アルコキシ、ハロゲン、又はシアノ基を意味する。

【0046】

合わせて1から3個の置換又は無置換のアリール基にて置換されたメチル基としては、例えばベンジル基、 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が挙げられ、好ましくはベンジル基、トリフェニルメチル基が挙げられる。その他に、例えば9-アンスリルメチル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が挙げられ、好ましくは、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が挙げられる。その他の種類として、例えば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が挙げられ、好ましくは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が挙げられる。さらには、例えば4-クロロベンジル基、4-bromobenzenyl基が挙げられる。またその他に、例えば4-シアノベンジル基も好ましい例として挙げられる。

【0047】

本明細書中、シリル基としては、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、tert-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tert-ブチルシリル基、トリイソプロピルシリル基、ジフェニルメチルシリル基、ジフェニルブチルシリル基、ジフェニルイソプロピルシリルフェニルジイソプロピルシリル基が挙げられる。このなかでさらに好ましくは、トリメチルシリル基、tert-ブチルジメチルシリル基、トリイソプロピルシリル基、ジフェニルメチルシリル基が挙げられ、特に好ましくは、トリメチルシリル基、tert-ブチルジメチルシリル基、ジフェニルメチルシリル基が挙げられる。

【0048】

本明細書における水酸基の保護基としては、化学的方法（例えば、加水素分解、加水分解、電気分解、又は光分解など）、又は生物学的方法（例えば、人体内で加水分解等。想像するに微生物等での誘導など）、のいずれかの方法により開裂し、脱離する置換基を意味する場合もある。水酸基の保護基としては、特に、加水素分解、又は加水分解により脱離する置換基が好ましい例として挙げられる。なお、保護された水酸基は、かかる保護基で水素原子が置換された水酸基ということができる。

【0049】

[R²及びR⁴について]

式（1）及び式（2）中、R²及びR⁴は、互いに同一又は異なってもよく、水素原子、水酸基の保護基、リン酸基、保護されたリン酸基、又は－P（＝O）_n（R⁵）R⁶を表す。水酸基の保護基は既に説明したとおりである。

10

【0050】

（保護されたリン酸基）

保護されたリン酸基における保護基は当業者公知であり、上述の参考文献や説明を参考にすることができる。

【0051】

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、シリル基で置換されたエチル基、ハロゲンで置換された低級アルキル基、低級アルケニル基、シアノ基で置換された低級アルケニル基、シクロアルキル基、シアノ基で置換された低級アルケニル基、アラルキル基、ニトロ基でアリール環が置換されたアラルキル基、ハロゲンでアリール環が置換されたアラルキル基、低級アルキル基で置換されたアリール基、ハロゲンで置換されたアリール基、又はニトロ基で置換されたアリール基が挙げられる。

20

【0052】

前記の低級アルキル基としては、前述したとおりである。前記のシアノ基で置換された低級アルキル基としては、例えば2－シアノエチル基、2－シアノ－1、1－ジメチルエチル基が挙げられ、特に好ましくは、2－シアノエチル基が挙げられる。前記のシリル基で置換されたエチル基としては、例えば2－メチルジフェニルシリルエチル基、2－トリメチルシリルエチル基、2－トリフェニルシリルエチル基が挙げられる。

【0053】

前記のハロゲンで置換された低級アルキル基としては、例えば2，2，2－トリクロロエチル基、2，2，2－トリブromoエチル基、2，2，2－トリフルオロエチル基、2，2，2－トリクロロエチル基が挙げられ、特に好ましくは、2，2，2－トリクロロエチル基が挙げられる。前記の低級アルケニル基としては、例えばエテニル基、1－プロペニル基、2－プロペニル基、1－メチル－2－プロペニル基、1－メチル－1－プロペニル基、2－メチル－1－プロペニル基、1－ブテニル基、2－ブテニル基などが挙げられる。

30

【0054】

前記のシアノ基で置換された低級アルケニル基としては、例えば2－シアノエチル基、2－シアノプロピル基、2－シアノブテニル基が挙げられる。前記のアラルキル基としては、例えばベンジル基、α－ナフチルメチル基、β－ナフチルメチル基、インデニルメチル基、フェナンスレニルメチル基、アントラセニルメチル基、ジフェニルメチル基、トリフェニルメチル基、1－フェネチル基、2－フェネチル基、1－ナフチルエチル基、2－ナフチルエチル基、1－フェニルプロピル基、2－フェニルプロピル基、3－フェニルプロピル基、1－ナフチルプロピル、2－ナフチルプロピル、3－ナフチルプロピル、1－フェニルブチル基、2－フェニルブチル基、3－フェニルブチル基、4－フェニルブチル基が挙げられ、さらに好ましくは、ベンジル基、ジフェニルメチル基、トリフェニルメチル基、1－フェネチル基、2－フェネチル基が挙げられ、特に好ましくは、ベンジル基が挙げられる。

40

【0055】

前記のニトロ基でアリール環が置換されたアラルキル基としては、2－（4－ニトロフェ

50

ニル) エチル基、0-ニトロベンジル基、4-ニトロベンジル基、2,4-ジニトロベンジル基、4-クロロ-2-ニトロベンジル基などが挙げられる。

【0056】

本明細書においてリン酸の保護基としては、化学的方法（例えば、加水素分解、加水分解、電気分解、又は光分解など）、又は生物学的方法（例えば、人体内で加水分解等。想像するに微生物等での誘導など）、のいずれかの方法により開裂し、脱離する置換基を意味する場合もある。リン酸の保護基としては、特に、加水素分解、又は加水分解により脱離する置換基が好ましい例として挙げられる。

【0057】

$(-P(=O)_n(R^5)R^6)$

本発明のヌクレオシド類縁体の R^2 及び R^4 は、 $-P(=O)_n(R^5)R^6$ となる場合がある。 n は0又は1を示し、 R^5 及び R^6 は、互いに同一又は異なってもよく、水素原子、水酸基、保護された水酸基、メルカプト基、保護されたメルカプト基、低級アルコキシ基、シアノ低級アルコキシ基、アミノ基、又は置換されたアミノ基のいずれかを示す。ただし、 n が1のときには、 R^5 及び R^6 が共に水素原子となることはない。保護された水酸基及び低級アルコキシ基については、既に説明したとおりである。

【0058】

(保護されたメルカプト基)

保護されたメルカプト基は、当業者において周知である。保護されたメルカプト基としては、例えば上記水酸基の保護基として挙げたものの他、例えばアルキルチオ基、アリールチオ基、脂肪族アシル基、芳香族アシル基が挙げられる。好ましくは、脂肪族アシル基、芳香族アシル基が挙げられ、特に好ましくは、芳香族アシル基が挙げられる。アルキルチオ基としては、低級アルキルチオ基が好ましく、例えば、メチルチオ、エチルチオ、 α -ブチルチオ基が好ましい例として挙げられる。アリールチオ基としては、例えばベンジルチオが挙げられる。また芳香族アシル基としてはベンゾイル基が挙げられる。

【0059】

前記のシアノ低級アルコキシ基としては、例えば、シアノ基が置換した直鎖状、分枝状、環状、又はそれらの組み合わせである炭素数1~5個のアルコキシ基（なお、シアノ基中の炭素の数を含めずに数えた場合）が好ましい例として挙げられ、具体的には例えば、シアノメトキシ、2-シアノエトキシ、3-シアノプロポキシ、4-シアノブトキシ、3-シアノ-2-メチルプロポキシ、又は1-シアノメチル-1,1-ジメチルメトキシ等が挙げられ、特に好ましくは、2-シアノエトキシ基が挙げられる。

【0060】

R^5 及び R^6 として、置換されたアミノ基が選択できる。そのアミノ基の置換基は、低級アルコキシ基、低級アルキルチオ基、シアノ低級アルコキシ基、又は低級アルキル基のいずれかを示す。なお前記 R^5 及び R^6 が共に、置換されたアミノ基である場合では、該置換されたアミノ基として互いに異なった置換されたアミノ基であってもよい。前記の低級アルコキシ基、低級アルキルチオ基、シアノ低級アルコキシ基、及び低級アルキル基は、前述に説明された通りである。

【0061】

$-P(=O)_n(R^5)R^6$ としては、より具体的には、ホスホロアミダイド基、 H -ホスホネート基、又はホスホニル基が好ましい例として挙げられ、ホスホロアミダイド基が特に好ましい例として挙げられる。

【0062】

$-P(=O)_n(R^5)R^6$ において、 n が0であり、 R^5 及び R^6 の少なくとも一方が置換されたアミノ基であり、他方は何であってもよい場合には、ホスホロアミダイド基となる。ホスホロアミダイド基としては、 R^5 及び R^6 の一方が置換されたアミノ基であり、他方が低級アルコキシ基、又はシアノ低級アルコキシ基であるホスホロアミダイド基が、縮合反応の反応効率が良好であり、特に好ましい。その置換されたアミノ基としては、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好ましい例として

10

20

30

40

50

挙げられ、特に好ましくはジイソプロピルアミノ基が例示される。また、 R^5 及び R^6 の他方の置換基における低級アルコキシ基としては、メトキシ基が好ましい例として挙げられる。また、シアノ低級アルコキシ基としては、2-シアノエチル基が好ましい例として挙げられる。ホスホロアミダイド基としては、具体的には、 $-P(OC_2H_4CN)(N(CH(CH_3)_2)_2)$ 、又は $-P(OCH_3)(N(CH(CH_3)_2)_2)$ が好ましい例として挙げられる。

【0063】

$-P(=O)_n(R^5)R^6$ において、 n が1であり、 R^5 及び R^6 の少なくとも一方が水素原子であり、他方は水素原子以外であれば何であってもよい場合には、 H -ホスホネート基となる。その、水素以外の置換基としては、例えば、ヒドロキシル基、メチル基、メトキシ基、チオール基等が挙げられ、特に好ましくはヒドロキシル基が例示される。

10

【0064】

また、 $-P(=O)_n(R^5)R^6$ において、 n が1であり、 R^5 及び R^6 が共に低級アルコキシ基である場合には、ホスホニル基となる。なお、 R^5 及び R^6 における低級アルコキシ基は互いに同一でも相違していてもよい。その低級アルコキシ基としては、例えば、メトキシ基、エトキシ基等が好ましい例として挙げられる。ホスホニル基としては、具体的には、 $-P(=O)(OCH_3)_2$ が挙げられる。

【0065】

本ヌクレオシド誘導体における R^2 としては、例えば、 $-P(=O)_n(R^5)R^6$ であることが特に好ましい。 $-P(=O)_n(R^5)R^6$ としては、ホスホロアミダイド基、 H -ホスホネート基、又はホスホニル基が好ましい例として挙げられる。 R^2 としては、その他にリン酸基、又は保護されたリン酸基であることも好ましい。さらに R^2 としては、水素原子、又は水酸基の保護基であることも好ましい。

20

【0066】

R^2 の具体的な他の例示としては、水素原子、アセチル基、ベンゾイル基、ベンジル基、 p -メトキシベンジル基、トリメチルシリル基、 $tert$ -ブチルジフェニルシリル基、 $-P(OC_2H_4CN)(N(CH(CH_3)_2)_2)$ 、 $-P(OCH_3)(N(CH(CH_3)_2)_2)$ 、又はホスホニル基が好ましい例として挙げられる。

【0067】

本ヌクレオシド誘導体における R^4 としては、例えば、水素原子又は水酸基の保護基が好ましい。また例えば、リン酸基、保護されたリン酸基、又は $-P(=O)_n(R^5)R^6$ であることも好ましい。 R^4 としての具体的な例示を挙げると、水素原子、アセチル基、ベンゾイル基、ベンジル基、 p -メトキシベンジル基、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、又はトリメチルシリル基が好ましい例として挙げられる。

30

【0068】

[R^3 について]

式(1)及び式(2)中、 R^3 は、それぞれ連結基を有する NHR^7 、アジド基、アミジノ基又はグアニジノ基を表すことができる。すなわち、 NHR^7 、アジド基、アミジノ基又はグアニジノ基は、それぞれが連結基を介して4'位の炭素原子に結合している。

40

【0069】

連結基としては、例えば、炭素数1個以上の2価炭化水素基を表すことができる。すなわち、2価の炭化水素基としては、炭素数1~8個以下のアルキレン基、炭素数2~8個以下のアルケニレン基などが挙げられる。

【0070】

連結基としてのアルキレン基としては、直鎖状、分枝状であってもよいが、好ましくは直鎖状である。例えば、低級アルキル基が好ましく、例えば炭素数1~6個の低級アルキル基、また例えば、炭素数2~6個の低級アルキル基が好ましく、また例えば、炭素数2~4個又は炭素数2~3個の低級アルキル基が好ましい。直鎖状の炭素数1から4までのアルキル基としては、メチレン基、エチレン基、プロパン-1、3-ジイル基、 n -ブタン

50

ー1, 1-ジイル基、n-ペンチル-1-5, -ジイル基、n-ヘキシル-1, 6-ジイル基等が挙げられる。また、例えば、ブタン-1, 2-ジイル基等が挙げられる。また例えば、エチレン基、プロパン-1, 3-ジイル基、n-ブタン-1, 1-ジイル基が特に好ましい例として挙げられる。

【0071】

連結基としてのアルケニレン基としては、直鎖状、分枝状であり、好ましくは直鎖状である。例えば、低級アルケニレン基が好ましく、低級アルケニレン基としては、例えば、エテン-1, 2-ジイル基、プロペン-1, 3-ジイル基、ブテン-1, 4-ジイル基等が挙げられる。

【0072】

式(1)で表されるヌクレオシド誘導体においては、例えばエチレン基などの炭素数2以上のアルキレン基などの2価炭化水素基であることがオリゴヌクレオチド誘導体のヌクレアーゼ耐性及び細胞膜透過性の観点から好適である。また、式(2)で表されるヌクレオシド誘導体においては、例えばエチレン基などの炭素数1以上のアルキレン基などの2価炭化水素基であってもヌクレアーゼ耐性及び細胞膜透過性の観点から好適である。

【0073】

R⁷としては、水素原子、アルキル基又はアルケニル基又はアミノ基の保護基が挙げられる。アルキル基は、既に説明したアルキル基のほか、低級アルキル基が好ましく挙げられる。アルケニル基としては、既に説明したアルケニル基のほか、低級アルケニル基が好ましく挙げられる。R⁷が水素原子などこれらの基であるとき、連結基は、炭素数2以上、また例えば3以上、また例えば4以上で、例えば6以下、また例えば5以下、また例えば4以下のアルキレン基であることが好適である。より好適には、連結基は、炭素数2以上の連結基であり、炭素数2以上のアルキレン基である。

【0074】

また、R⁷が水素原子のとき、R³は、連結基を有するNH₂ (アミノ基)、すなわち、連結基がアルキレン基やアルケニレン基のときには、アミノアルキル基やアミノアルケニル基などとなる。式(1)及び式(2)中、R³がアミノアルキル基などであることにより、本ヌクレオシド誘導体及び本ヌクレオシド誘導体に由来するモノマーユニットを備えるオリゴヌクレオチド誘導体は、周囲のpH環境において電荷が変化するという特徴を伴う電荷付与性を発揮することができる。例えば、酸性下ではカチオニックであり、生理的条件下の中性ではプラス電荷が減少して電荷ゼロとなりうる。すなわち、かかる電荷調節能によれば、pH環境を変化させることで、必要時にヌクレオシド誘導体の電荷をダイナミックに変化させたり、所望の電荷を付与したりすることができる。したがって、このような本ヌクレオシド誘導体によれば、オリゴヌクレオチドの電荷を従来とは異なる態様であるいは従来よりも一層高い自由度で調整できるようになる。以上のことから、R³がかかるアミノアルキル基などである本ヌクレオシド誘導体は、オリゴヌクレオチド等に対する電荷(正電荷)付与剤又は電荷調節剤として有用である。

【0075】

R³としては、それぞれ連結基を有する、アジド基、アミジノ基、すなわち、CH₃(NH)C(NH)- (アミジンのアミノ基から水素原子1個を除いたもの)、グアニジノ基、すなわち、NH₂(NH)C(NH)- (グアニジンのアミノ基から水素原子1個を除いたもの)が挙げられる。なかでも、グアニジノ基が挙げられる。R³が、これらの基を有するとき、連結基は、炭素数1以上、また例えば2以上などのアルキレン基又はアルケニレン基などとすることができる。なお、R³が、連結基を有するアミジノ基、グアニジノ基のときには、既述のアミノアルキル基などのときとは異なり、常にカチオニックとなる。かかる本ヌクレオシド誘導体は、R³がアミノアルキル基などである本ヌクレオシド誘導体と組み合わせて用いるのに有用である。

【0076】

アミノ基に対する保護基は、当業者に周知されており、前述の参考文献を参照することができる。具体的には、上記にて水酸基の保護基として挙げたものの他、例えばベンジル基

10

20

30

40

50

、メチルベンジル基、クロロベンジル基、ジクロロベンジル基、フルオロベンジル基、トリフルオロメチルベンジル基、ニトロベンジル基、メトキシフェニル基、メトキシメチル(MOM)基、N-メチルアミノベンジル基、N,N-ジメチルアミノベンジル基、フェナシル基、アセチル基、トリフルオロアセチル基、ピバロイル基、ベンゾイル基、フタルイミド基、アリルオキシカルボニル基、2,2,2-トリクロロエトキシカルボニル基、ベンジルオキシカルボニル基、t-ブトキシカルボニル(Boc)基、1-メチル-1-(4-ピフェニル)エトキシカルボニル(Bpoc)基、9-フルオレニルメトキシカルボニル基、ベンジルオキシメチル(BOM)基、又は2-(トリメチルシリル)エトキシメチル(SEM)基などが挙げられる。さらに好ましくは、ベンジル基、メトキシフェニル基、アセチル基、トリフルオロアセチル(TFA)基、ピバロイル基、ベンゾイル基、t-ブトキシカルボニル(Boc)基、1-メチル-1-(4-ピフェニル)エトキシカルボニル(Bpoc)基、9-フルオレニルメトキシカルボニル基、ベンジルオキシメチル(BOM)基、又は2-(トリメチルシリル)エトキシメチル(SEM)基が挙げられ、特に好ましくは、ベンジル基、メトキシフェニル基、アセチル基、ベンゾイル基、ベンジルオキシメチル基が挙げられる。

【0077】

本発明においてアミノ基の保護基としては、化学的方法(例えば、加水素分解、加水分解、電気分解、又は光分解など)、又は生物学的方法(例えば、人体内で加水分解等。想像するに微生物等での誘導など)、のいずれかの方法により開裂し、脱離する置換基を意味する場合もある。特に、加水素分解、又は加水分解により脱離する置換基がアミノ基の保護基として好ましい。

【0078】

[B：塩基について]

本ヌクレオシド誘導体におけるB：塩基としては、公知の天然塩基ほか、人工塩基が挙げられる。例えば、Bとしては、プリン-9-イル基、2-オキソ-ピリミジン-1-イル基、置換プリン-9-イル基、又は置換2-オキソ-ピリミジン-1-イル基が選択できる。

【0079】

すなわち、Bとしては、プリン-9-イル基、又は2-オキソ-ピリミジン-1-イル基が挙げられるほか、2,6-ジクロロプリン-9-イル、又は2-オキソ-ピリミジン-1-イルが挙げられる。さらに、2-オキソ-4-メトキシ-ピリミジン-1-イル、4-(1H-1,2,4-トリアゾール-1-イル)-ピリミジン-1-イル、又は2,6-ジメトキシプリン-9-イルが挙げられる。

【0080】

さらに、アミノ基が保護された2-オキソ-4-アミノ-ピリミジン-1-イル、アミノ基が保護された2-アミノ-6-ブロモプリン-9-イル、アミノ基が保護された2-アミノ-6-ヒドロキシプリン-9-イル、アミノ基及び/又は水酸基が保護された2-アミノ-6-ヒドロキシプリン-9-イル、アミノ基が保護された2-アミノ-6-クロロプリン-9-イル、アミノ基が保護された6-アミノプリン-9-イル、又はアミノ基が保護された4-アミノ-5-メチル-2-オキソ-ピリミジン-1-イル基が挙げられる。なお、水酸基及びアミノ基の各保護基については、既に説明したとおりである。

【0081】

さらに、6-アミノプリン-9-イル(アデニン)、2-アミノ-6-ヒドロキシプリン-9-イル(グアニジン)、2-オキソ-4-アミノ-ピリミジン-1-イル(シトシン)、2-オキソ-4-ヒドロキシ-ピリミジン-1-イル(ウラシル)、又は2-オキソ-4-ヒドロキシ-5-メチルピリミジン-1-イル(チミン)が挙げられる。

【0082】

さらにまた、4-アミノ-5-メチル-2-オキソ-ピリミジン-1-イル(メチルシトシン)、2,6-ジアミノプリン-9-イル、6-アミノ-2-フルオロプリン-9-イル、6-メルカプトプリン-9-イル、4-アミノ-2-オキソ-5-クロロ-ピリミジ

ン-1-イル、又は2-オキソ-4-メルカプト-ピリミジン-1-イルが挙げられる。

【0083】

また、6-アミノ-2-メトキシプリン-9-イル、6-アミノ-2-クロロプリン-9-イル、2-アミノ-6-クロロプリン-9-イル、又は2-アミノ-6-ブロモプリン-9-イルが挙げられる。

【0084】

置換プリン-9-イル基、又は置換2-オキソ-ピリミジン-1-イル基それぞれにおける置換基は、水酸基、保護された水酸基、低級アルコキシ基、メルカプト基、保護されたメルカプト基、低級アルキルチオ基、アミノ基、保護されたアミノ基、低級アルキル基で置換されたアミノ基、低級アルキル基、低級アルコキシメチル基、又はハロゲン原子のいずれか一つ、又はそれらの複数の組み合わせのいずれかである。これらの置換基は、既に説明したとおりである。

【0085】

本ヌクレオシド誘導体におけるBとしては、置換プリン-9-イル基、又は置換2-オキソ-ピリミジン-1-イル基における置換基が既述の各置換基が好ましいが、これに加えてさらに、トリアゾール基、低級アルコキシメチル基が加わることも好ましい。

【0086】

置換プリン-9-イル基の好ましい例としては、例えば、6-アミノプリン-9-イル、2, 6-ジアミノプリン-9-イル、2-アミノ-6-クロロプリン-9-イル、2-アミノ-6-ブロモプリン-9-イル、2-アミノ-6-ヒドロキシプリン-9-イル、6-アミノ-2-メトキシプリン-9-イル、6-アミノ-2-クロロプリン-9-イル、6-アミノ-2-フルオロプリン-9-イル、2, 6-ジメトキシプリン-9-イル、2, 6-ジクロロプリン-9-イル、又は6-メルカプトプリン-9-イル等が挙げられる。上述の置換基中にアミノ基や水酸基があれば、それらのアミノ基及び／又は水酸基が保護化された置換基が好ましい例として挙げられる。

【0087】

置換2-オキソ-ピリミジン-1-イルとしては、例えば2-オキソ-4-アミノ-ピリミジン-1-イル、1H-(1, 2, 4-トリアゾール-1-イル)-ピリミジン-1-イル、4-1H-1, 4-アミノ-2-オキソ-5-クロロ-ピリミジン-1-イル、2-オキソ-4-メトキシ-ピリミジン-1-イル、2-オキソ-4-メルカプト-ピリミジン-1-イル、2-オキソ-4-ヒドロキシ-ピリミジン-1-イル、2-オキソ-4-ヒドロキシ-5-メチルピリミジン-1-イル、又は4-アミノ-5-メチル-2-オキソ-ピリミジン-1-イル等が挙げられる。

また、2-オキソ-4-メトキシ-ピリミジン-1-イル、又は4-(1H-1, 2, 4-トリアゾール-1-イル)-ピリミジン-1-イルが好ましい例として挙げられる。

【0088】

こうしたBのうち、置換基中にアミノ基や水酸基があれば、それらのアミノ基又は水酸基が保護化された置換基が好ましい例として挙げられる。

【0089】

本ヌクレオシド誘導体は、塩であってもよい。塩の形態は特に限定されないが、一般的には酸付加塩が例示され、分子内対イオンの形態をとっていてもよい。又は置換基の種類によっては塩基付加塩が形成される場合もある。塩としては、薬学的に許容される塩が好ましい。薬学的に許容しうる塩を形成する酸及び塩基の種類は当業者には周知であり、例えばJ. Pharm. Sci., 1-19 (1977)に記載しているものなどを参考にすることができる。例えば、酸付加塩としては、鉱酸塩、有機酸塩が挙げられる。また、一個以上の置換基が酸性部分を含有する場合、塩基付加塩も好ましい例として挙げられる。

【0090】

鉱酸塩としては、例えば、塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩、硝酸塩、硫酸塩、硫酸水素酸塩、リン酸塩、リン酸水素酸塩などが挙げられる。通常は、塩酸塩、リン酸塩、が好ましい例として挙げられる。有機酸塩としては、例えば、酢酸塩、トリフルオロ酢酸

10

20

30

40

50

塩、グルコン酸塩、乳酸塩、サリチル酸塩、クエン酸塩、酒石酸塩、アスコルビン酸塩、コハク酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、ギ酸塩、安息香酸塩、メタンスルホン酸塩、エタンスルホン酸塩、又はp-トールエンスルホン酸塩などが挙げられる。通常は、酢酸塩等が好ましい例として挙げられる。塩基付加塩としては、アルカリ金属の塩、アルカリ土類金属の塩、有機アミン塩、アミノ酸の付加塩が挙げられる。

【0091】

前記のアルカリ金属の塩としては、例えばナトリウム塩、カリウム塩などが挙げられる。また、アルカリ土類金属の塩としては、例えば、マグネシウム塩、カルシウム塩などが挙げられる。有機アミン塩としては、例えば、トリエチルアミン塩、ピリジン塩、プロカイン塩、ピコリン塩、ジシクロヘキシルアミン塩、ジエタノールアミン塩、トリエタノールアミン塩、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン塩等が例示される。また、アミノ酸の付加塩としては、例えば、アルギニン塩、リジン塩、オルニチン塩、セリン塩、グリシン塩、アスパラギン酸塩、グルタミン酸塩などが挙げられる。

【0092】

本ヌクレオシド誘導体又はその塩は、水和物又は溶媒和物として存在する場合もあり、これらの物質も本明細書の開示の範囲に含まれる。本ヌクレオシド誘導体又はその塩は、後述の合成例や公知の方法に準じて、当業者は容易に製造することができる。

【0093】

本ヌクレオシド誘導体は、オリゴヌクレオチドの少なくとも一部としてオリゴヌクレオチドに導入することで、一本鎖としてのオリゴヌクレオチド、二本鎖オリゴヌクレオチドのヌクレアーゼ耐性を向上させることができるほか、哺乳動物細胞等の細胞膜透過性を向上させることができる。すなわち、本ヌクレオシド誘導体は、それ自体は、ヌクレアーゼ耐性向上剤及び／又は細胞膜透過性付与剤として有用である。また、本ヌクレオシド誘導体は、4'に塩基性の置換基を備えることができる。これにより、オリゴヌクレオチド等におけるリン酸基などに由来する負電荷を調整することができるという電荷調節剤又は正電荷付与剤として機能することができる。

【0094】

（オリゴヌクレオチド誘導体及びその塩）

本明細書に開示されるオリゴヌクレオチド誘導体（以下、本オリゴヌクレオチド誘導体ともいう。）は、式（3）及び式（4）で表される部分構造を少なくとも1個含有することができる。式（3）及び式（4）で表される部分構造は、それぞれ、式（1）及び式（2）で表されるヌクレオシド誘導体又はその塩に基づいて取得されうる。

【0095】

10

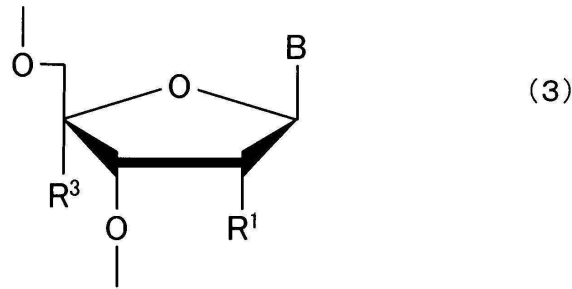
20

30

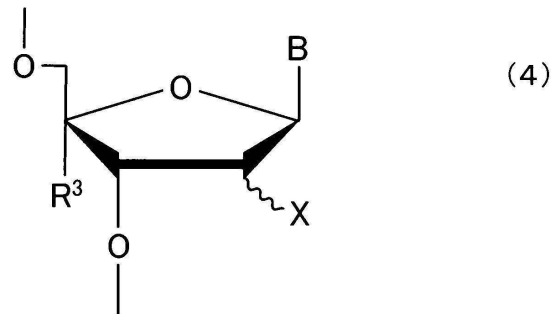
40

50

【化 6】



(3)



(4)

【0096】

式(3)及び式(4)で表される部分構造におけるR¹、X、R³及びBについては、式(1)及び式(2)におけるのとそれぞれ同義である。

【0097】

式(3)及び式(4)で表される部分構造は、本オリゴヌクレオチド誘導体中において2個以上含んでいてもよい。その場合、これらの部分構造は、互いに同一であっても異なってもよい。また、本オリゴヌクレオチド誘導体に含まれる部分構造の全体は、式(3)で表される部分構造のみから構成されていてもよいし、式(4)で表される部分構造のみから構成されていてもよい。また、式(3)で表される部分構造1又は2以上有し、かつ式(4)で表される部分構造を1又は2以上有していてもよい。

【0098】

また、式(3)及び式(4)で表される部分構造の配置としては、互いに隣り合ってもよいし、離れて存在してもよい。例えば、本オリゴヌクレオチド誘導体は、前記部分構造を少なくとも3個備えることができる。この場合、各部分構造を、本オリゴヌクレオチド誘導体の5'末端側、中央部及び3'末端側に略均等に備えることができる。部分構造を本オリゴヌクレオチド誘導体のこれら各部に略均等に備える、とは、これらの各部において、同数個を必ずしも部分構造を備えることを限定するものではなく、これら各部に少なくとも1個をそれぞれ備えることを少なくとも充足すれば足りる。例えば、各部に1～3個程度の部分構造を備える場合には、略均等ということができる。部分構造は、本オリゴヌクレオチド誘導体において、少なくとも6個備えることができる。

【0099】

式(3)で表される部分構造は、糖鎖部分がリボース又はデオキシリボースに由来していることから、本オリゴヌクレオチド誘導体は、オリゴリボヌクレオチドであってもよいし、オリゴデオキシリボヌクレオチドであってもよい。また、本オリゴヌクレオチド誘導体は、リボヌクレオチドとデオキシリボヌクレオチドとのキメラであってもよい。

【0100】

本オリゴヌクレオチド誘導体は、それ自体一本鎖であるが、オリゴリボヌクレオチド、オリゴデオキシリボヌクレオチド、及びオリゴデオキシリボ／リボヌクレオチド(キメラ鎖)とのハイブリッド、すなわち、二本鎖の形態を採ることもできる。

【0101】

10

20

30

40

50

本オリゴヌクレオチド誘導体は、式（３）及び式（４）で表される部分構造以外の部分構造としては、その他の天然のヌクレオチド、又は公知のヌクレオシド誘導体及び／又はヌクレオチド誘導体などに該当する部分構造を備えることができる。本明細書において規定する部分構造及びその他の部分構造は、互いに、例えば、リン酸ジエステル結合、リン酸モノエステル結合、チオリン酸エステル結合等によって結合されうる。

【０１０２】

本オリゴヌクレオチド誘導体は、部分構造及びその他のヌクレオシド誘導体の個数を単位として、少なくとも２個以上、さらには８個以上であることが好ましく、特に好ましくは１５個以上であることが挙げられる。上限としては特に限定されないが、例えば１００個以下であり、また例えば、８０個以下であり、また例えば、６０個以下であり、また例えば、５０個以下であり、また例えば、４０個以下であり、また例えば、３０個以下であり、また例えば、２０個以下であってもよい。

10

【０１０３】

本オリゴヌクレオチド誘導体は、式（３）及び式（４）で表される部分構造ほか、その他の部分構造において、一個以上の不斉中心を有する場合があります、立体異性体が存在する場合も同様であって、立体異性体の任意の混合物、又はラセミ体などはいずれも本発明の範囲に包含される。また互変異性体として存在しうる場合もある。

【０１０４】

本オリゴヌクレオチド誘導体は、塩であってもよい。塩の形態は特に限定されないが、薬学的に許容される塩が好ましい例として挙げられる。塩については、既述の本ヌクレオシド誘導体における塩の態様を適用することができる。本オリゴヌクレオチド誘導体又はその塩としては、水和物や溶媒和物であってもよく、これらも本発明の範囲に含まれる。

20

【０１０５】

（本ヌクレオシド誘導体及び本オリゴヌクレオチド誘導体の製造）

本ヌクレオシド誘導体及び本オリゴヌクレオチド誘導体は、当業者であれば、後段の具体的な合成例のほか、本願出願時において公知のヌクレオシド及びオリゴヌクレオチドについての合成技術に基づいて、容易に合成されうる。

【０１０６】

本ヌクレオシド誘導体及び本オリゴヌクレオチド誘導体は、例えば下記の方法により製造できるが、本発明のヌクレオシド類縁体又はオリゴヌクレオチド類縁体の製造方法は下記の方法に限定されるものではない。

30

【０１０７】

それぞれの反応において、反応時間は特に限定されないが、後述の分析手段により反応の進行状態を容易に追跡できるため、目的物の収量が最大となる時点で終了すればよい。また、それぞれの反応は必要により、例えば、窒素気流下又はアルゴン気流下などの不活性ガス雰囲気で行うことができる。それぞれの反応において、保護基による保護及びその後の脱保護が必要な場合は、後述の方法を利用することにより適宜反応を行うことができる。

【０１０８】

なお、本明細書においては、B nはベンジル基を示し、A cはアセチル基を示し、B zはベンゾイル基を示し、P M Bはp-メトキシベンジル基を示し、T rはトリフェニルメチル基を示し、T H Aは、トリフルオロアセチル基を示し、T s Oは、トシルオキシ基を示し、M M T rは4-メトキシトリフェニルメチル基を示し、D M T rは4, 4'-ジメトキシトリフェニルメチル基を示し、T M Sはトリメチルシリル基を示し、T B D M Sはtert-ブチルジメチルシリル基を示し、T B D P Sはtert-ブチルジフェニルシリル基を示し、M O Mはメトキシメチル基を示し、B O Mはベンジルオキシメチル基を示し、S E Mは2-(トリメチルシリル)エトキシメチル基を示す。

40

【０１０９】

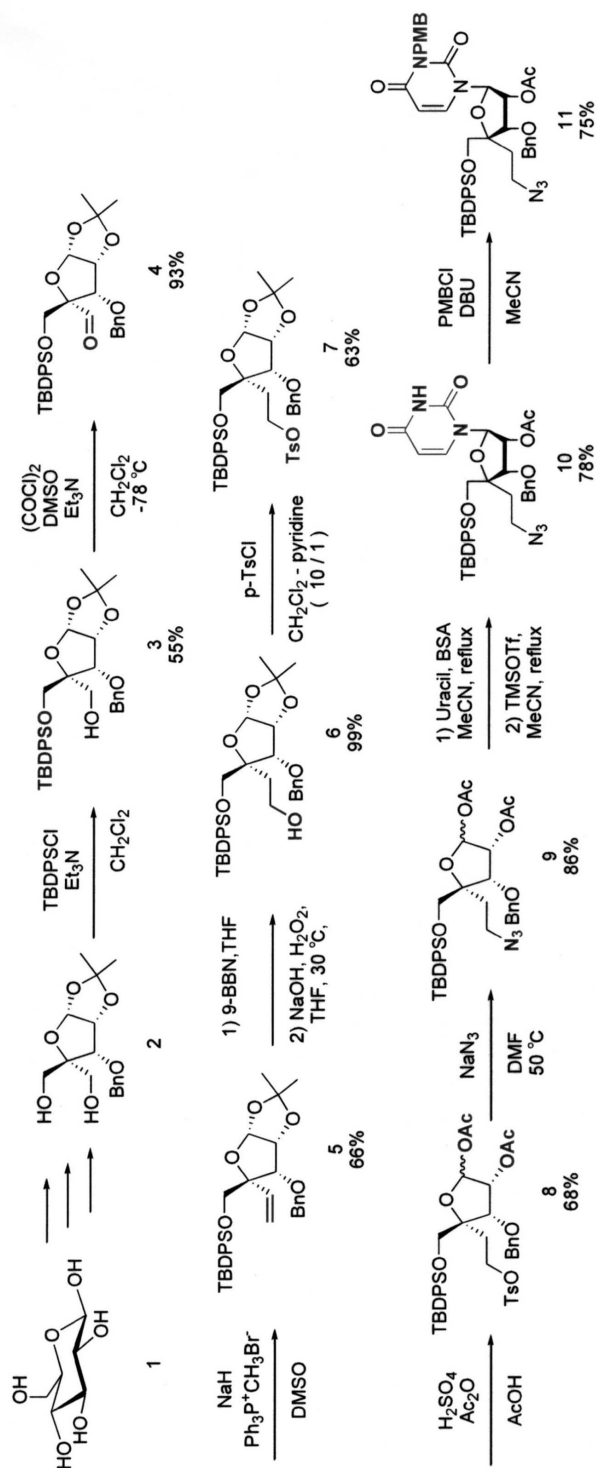
例えば、本ヌクレオシド誘導体の一例は、以下のスキームに従い合成することができる。なお、以下のスキームは、グルコースを出発物質として、チミンリボヌクレオシド誘導体

50

を合成し、本オリゴヌクレオチド誘導体の合成のためのホスホロアミダイト剤を合成するまでのスキームの一例である。

【0110】

【化7】



【0111】

10

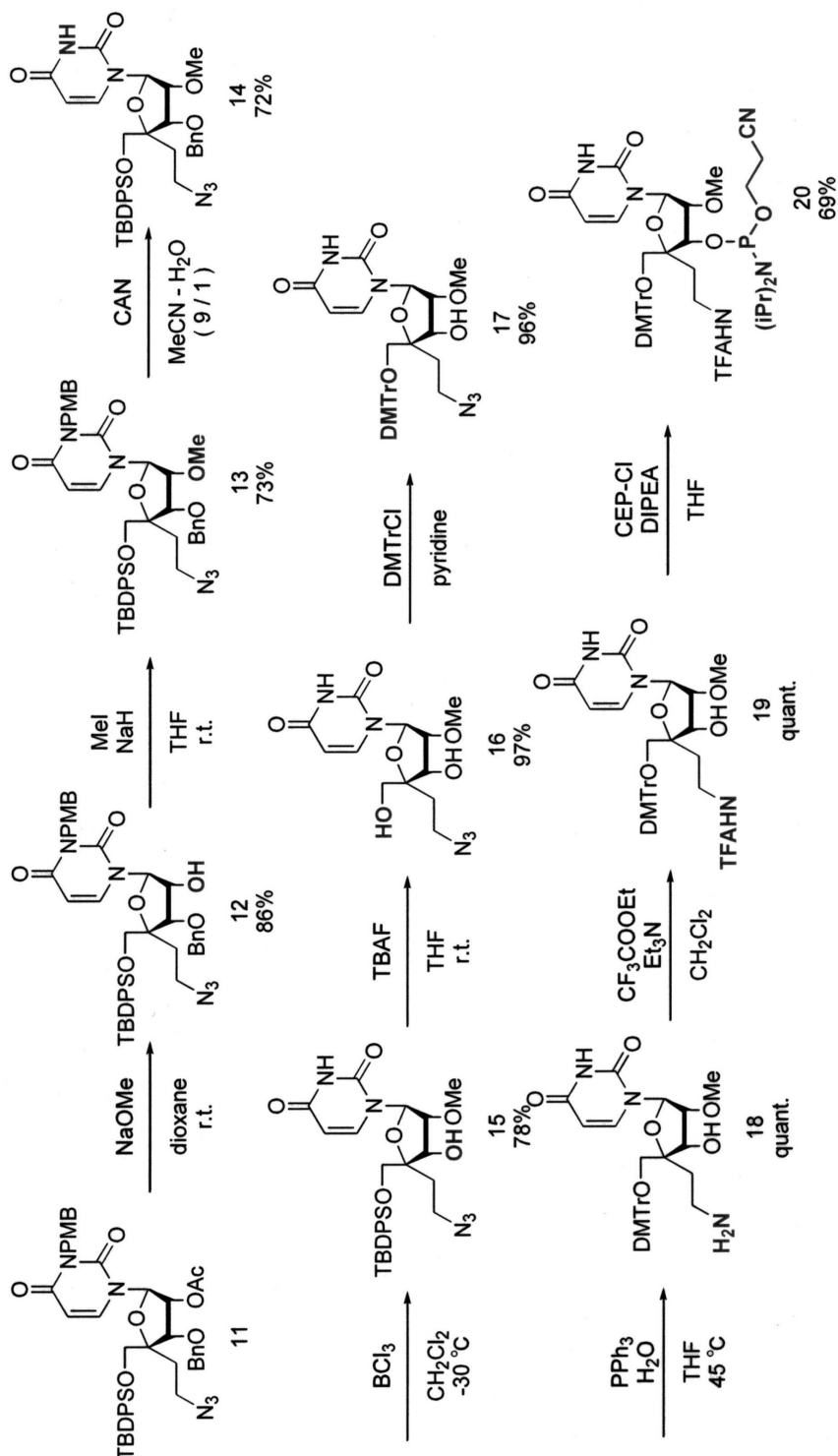
20

30

40

50

【化 8】



【0112】

常法に従い、グルコース 1 から、上記化合物 2 を取得した。化合物 2 から、Bioorganic & Medical Chemistry 11(2003)211-2226, Bioorganic & Chemistry letters(1999) 2667-2672, The Journal of Organic Chemistry 2013, 78, 9956-9962, HELVATICA CHIMICA ACTA Vol. 83 (2000) 128-151等のほか、Bioorganic & Medical Chemistry 11(2003)211-2226, Bioorganic & Chemistry letters(1999)2667-2672 の記載に基づいて化合物 3 ないし化合物 20 を得ることができる。

【0113】

式 (3) 及び (4) で表される部分構造を備える本オリゴヌクレオチド誘導体は、式 (1

）又は（２）で表される各種の本ヌクレオシド誘導体を、アミダイト剤等として利用することで容易に製造できる。すなわち、こうしたヌクレオシド誘導体を用いることで、公知のDNAシンセサイザーを用いて合成することができ、得られるオリゴヌクレオチド誘導体は、カラムを用いて精製し、生成物の純度を逆相HPLCやMALDI-TOF-MSで分析することにより、精製された本オリゴヌクレオチド誘導体を得ることができる。なお、本オリゴヌクレオチド誘導体を酸付加塩とする方法は、当業者に周知である。

【0114】

本オリゴヌクレオチド誘導体によれば、リボース4'位に連結基を介して所定のN含有基を備えることで、RNA干渉能等の生体におけるRNA機能を維持しつつ、RNAの実質電荷量を調節でき、脂溶性（ファンデルワールス分子間力）を増強し、dsRNA溶融温度をさげることを実現できる。これにより、リボヌクレアーゼ耐性を向上させることができるほか、細胞膜透過性を向上させることができる。さらに、リン酸基等によるマイナス電荷を中和し、全体としての電荷を調節することもできる。

10

【0115】

本オリゴヌクレオチド誘導体においては、本部分構造を少なくとも2個備えることができる。本部分構造を複数個備えることで、細胞膜透過性、リボヌクレアーゼ耐性等を確実に向上させ、また調整することができる。また、本オリゴヌクレオチド誘導体は、本部分構造を少なくとも3個備えることもできる。

【0116】

本オリゴヌクレオチド誘導体においては、1個又は2個以上の本部分構造の備える部位は特に限定するものではないが、例えば、5'末端側及び3'末端側のいずれか及び双方に備えることができる。5'末端側及び3'末端側とは、それぞれ、本オリゴヌクレオチドのポリマー鎖の各末端から適数个の範囲の領域をいい、それぞれ、ポリマー鎖の全構成単位の、例えば30%を超えない構成単位からなる領域をいう。上記末端からの範囲の割合は、ポリマー鎖の全長によっても異なるが、例えば25%以下、また例えば20%以下、また例えば10%以下、また例えば5%以下などとすることができる。より具体的には、5'末端側及び3'末端側とは、例えば各末端から1個～30個、また例えば例えば1個～25個、また例えば1個～20個、また例えば1個～15個、また例えば1個～10個、また例えば1個～8個、また例えば1個～6個、また例えば1個～5個、また例えば1個～4個、また例えば1～3個、また例えば例えば1～2個のヌクレオシド誘導体由来の構成単位の領域とすることができる。本オリゴヌクレオチド誘導体は、こうした末端領域のいずれかに1個又は2個以上の本部分構造を備えることができる。好ましくは、2個以上備えることができる。また、本オリゴヌクレオチド誘導体は、5'末端及び3'末端（すなわち、各末端から1個目の構成単位）のいずれか又は双方に本部分構造を備えることもできる。

20

30

【0117】

本オリゴヌクレオチド誘導体においては、1個又は2個以上の本部分構造を、5'末端側及び3'末端側以外の部分である中央部に備えることもできる。本オリゴヌクレオチド誘導体が、中央部に本部分構造を備えることで、リボヌクレアーゼ耐性及び細胞膜透過性の向上や調整が一層容易になる。また、オリゴヌクレオチド全体の電荷の調整もより容易になる。

【0118】

本オリゴヌクレオチド誘導体は、5'末端側及び3'末端側のいずれか又は双方と中央部に本部分構造を備えることもできる。好ましくは5'末端側、3'末端側及び中央部の各部に1個又は2個以上の本部分構造を備えることができる。このように、全体として、おおよそ均等にあるいは分散して本部分構造を備えることで、リボヌクレアーゼ耐性及び細胞膜透過性さらには電荷調節性を向上させることができる。本オリゴヌクレオチド誘導体の中央部には、本部分構造を2個以上備えることが、特性向上の観点から有用である。

40

【0119】

本オリゴヌクレオチド誘導体における本部分構造としては、式（3）で表されるリボヌクレオシド誘導体由来する部分構造、式（4）で表されるデオキシリボヌクレオチド誘導体由来する部分構造を用いることができる。なお、式（3）で表されるリボヌクレオシド

50

誘導体及び式(4)の部分構造は、Bの塩基として、RNAにおける塩基であるウラシル(U)他を備えることで、リボヌクレオシド誘導体の代替物として用いることができる。

【0120】

また、本部分構造は、式(3)及び(4)における R^3 が、炭素数1又は2以上のアルキレン基を連結基として、 NHR^7 を有することが、リボヌクレアーゼ耐性及び細胞膜透過性さらには電荷調節性の観点から好適である。この場合、 R^7 は、水素原子であってもよいし、炭素数1～6程度のアルキル基を有するアシル基であってもよい。当該アルキレン基は、エチレン基、プロピレン基、ブチレン基、ペンチレン基、ヘキシレン基などとすることができる。また、例えばエチレン基、プロピレン基、ブチレン基などとすることができる。また例えば例えばエチレン基、プロピレン基などとすることができる。エチレン基、プロピレン基を連結基とすることで、メチレン基を用いた場合に比較して高いリボヌクレアーゼ耐性と細胞膜透過性さらには電荷調節性を得ることができる。

10

【0121】

また、本部分構造は、連結基を備えるアミジノ基、アジド基及びグアニジノ基であってもよい。かかる官能基を備えることでも、高いリボヌクレアーゼ耐性及び細胞膜透過性を得ることができる。この場合、連結基は、炭素数1以上のアルキレン基であってもよい。

【0122】

また、本部分構造は、式(3)及び式(4)の R^3 の連結基が炭素数1～6程度のアルキル基、さらに、例えば、炭素数の下限が2以上、また例えば3以上であることが好適である。かかる構造は、リボヌクレアーゼ耐性及び細胞膜透過性に有効である。

20

【0123】

本オリゴヌクレオチド誘導体は、少なくとも本部分構造を少なくとも6個備えることが好適である。6個以上備えることで、リボヌクレアーゼ耐性や細胞膜透過性、さらには電荷調節性に有利である。

【0124】

本オリゴヌクレオチド誘導体は、例えば、siRNAとして利用できる。すなわち、二重鎖を形成したオリゴヌクレオチド誘導体は、生体内成分(RISCタンパク質)と複合体を形成して、配列特異的にmRNAを切断することにより、mRNA上の情報がリボソームにより特定のタンパク質へ翻訳されることをできなくする。また、miRNAを構成する構成物として、あるいはまたアプタマーRNAの構成物としても取り込まれて、リボヌクレアーゼ耐性や細胞膜透過性向上の特徴を生かしつつ、利用できると考えられる。さらに、他の化合物と連結してコンジュゲートを構成することもできる。さらにまた、本オリゴヌクレオチド誘導体は、リボザイムの構成物としても利用できる。また、本オリゴヌクレオチド誘導体は、RNAチップやその他の試薬としても有用である。

30

【0125】

このことから本オリゴヌクレオチド誘導体は、天然ヌクレオチドにはない特徴を生かして、抗腫瘍剤、抗ウイルス剤をはじめとする遺伝子の働きを阻害して疾病を治療する種々のRNA医薬品の構成物として、天然ヌクレオチドに優る有用性が期待される。すなわち、本オリゴヌクレオチド誘導体は、こうしたRNA医薬のほか、その原料又は中間体試薬として有用である。また、本ヌクレオシド誘導体は、こうしたRNA医薬の原料又は中間体として有用である。

40

【0126】

本オリゴヌクレオチド誘導体の電荷調節性、リボヌクレアーゼ耐性、細胞膜透過性、電荷調節能ならびに本オリゴヌクレオチド誘導体を含む種々のRNAの生物活性については、当業者であれば、適宜、後述する実施例や本願出願時における当業者の周知の手法を参照することで容易に評価することができる。

【実施例】

【0127】

以下、本明細書の開示をより具体的に説明するために具体例としての実施例を記載する。以下の実施例は、本明細書の開示を説明するためのものであって、その範囲を限定するも

50

のではない。

【実施例 1】

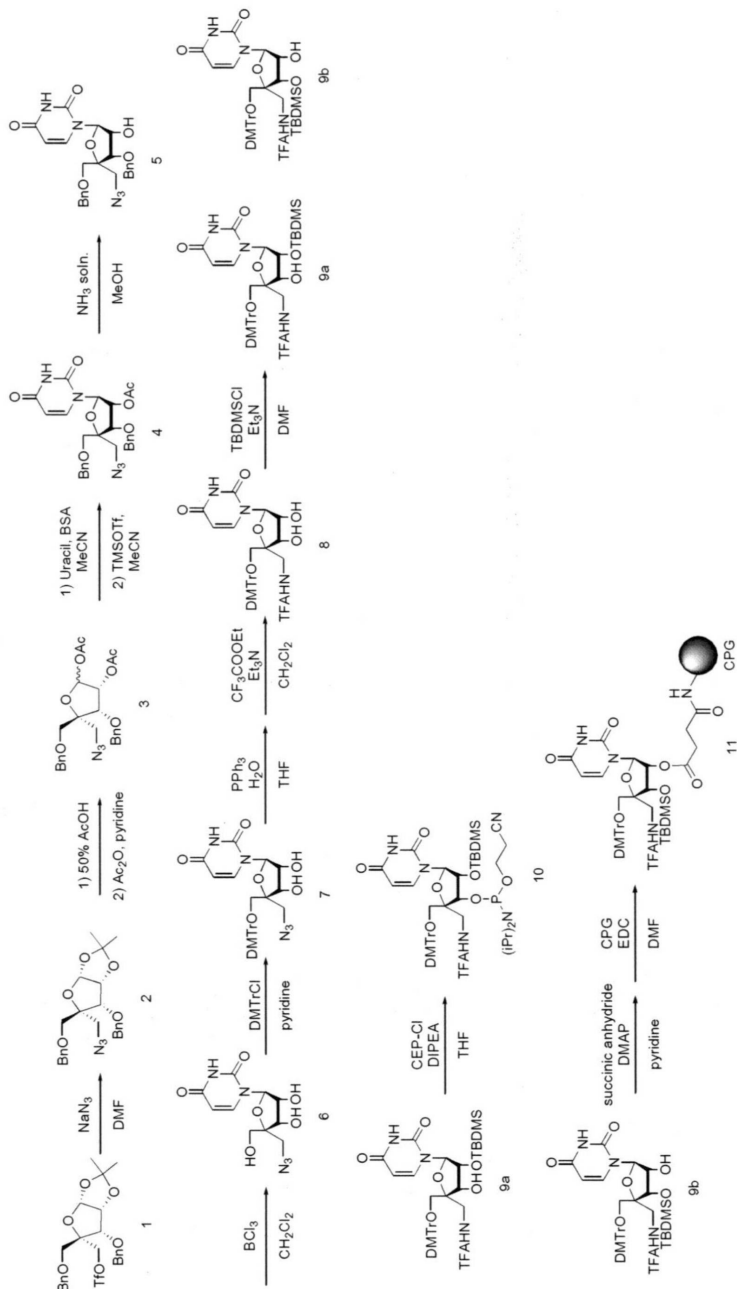
【0128】

(1) 2'-OH-4'-アミノメチルアミダイトユニット及び樹脂体

以下のスキームに従い、2'-OH-4'-アミノメチルアミダイトユニット及び樹脂体を合成した。

【0129】

【化 9】



【0130】

3,5-di-O-benzyl-4-C-[(trifluoromethanesulfonyl)oxy]methyl-1,2-O-(1-methylet

10

20

30

40

50

hylidene)- α -D-ribofuranose 1

グルコースを出発原料とし、既存の手法(Bioorganic & Medical Chemistry 11(2003) 211-2226, Bioorganic & Chemistry letters(1999)2667-2672)を用いて目的物 1 を合成した。

【0131】

3,5-di-O-benzyl-4-C-azidomethyl-1,2-O-(1-methylethylidene)- α -D-ribofuranose 2

3,5-di-O-benzyl-4-C-[(trifluoromethanesulfonyl)oxy]methyl-1,2-O-(1-methylethylidene)- α -D-ribofuranose (3.77 g, 7.09 mmol) のジメチルホルムアミド (DMF) 溶液 (80 mL) に、アルゴン雰囲気下でアジ化ナトリウム (NaN₃) (3.87 g, 59.6 mmol) を加え、60 °Cで一晩攪拌した。反応混合物の酢酸エチル溶液を飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、ろ過し、減圧下濃縮した。残渣はシリカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘキサン-酢酸エチル、4:1、v/v] により精製し、目的物2 (2.16 g, 5.08 mmol, 72%) を得た。

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 1.35 (s, 3H, CH₃), 1.65 (s, 3H, CH₃), 3.31 (d, J= 13.3 Hz, 1H), 3.44 (d, J= 10.6 Hz, 1H), 3.57 (d, J= 10.1 Hz, 1H), 4.03 (d, J= 13.3 Hz, 1H), 4.19 (d, J= 5.0 Hz, 1H), 4.47 (d, J= 11.9 Hz, 1H), 4.54 (d, J= 12.4 Hz, 2H), 4.62 (t, J= 3.7 Hz, 1H), 4.74 (d, J= 12.4 Hz, 1H), 5.77 (d, J= 4.1 Hz, 1H), 7.28-7.33 (m, 10H, Bn)

【0132】

3,5-di-O-benzyl-4-C-azidomethyl-1,2-di-O-acetyl- α -D-ribofuranose 3

3,5-di-O-benzyl-4-C-azidomethyl-1,2-O-(1-methylethylidene)- α -D-ribofuranose (1.46 g, 3.44 mmol) に50%酢酸 (29.6 mL) を加えて溶かし、100 °Cで1時間攪拌した。反応混合物をエタノールで共沸して乾燥させ、ピリジン (7.41 mL, 91.8 mmol) と無水酢酸 (Ac₂O) (4.93 mL, 52.2 mmol) を加え、アルゴン雰囲気下、室温で一晩攪拌した。反応混合物を、氷浴中で冷却し、冷水に注いだ後、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和重曹水及び飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、ろ過し、減圧下濃縮した。残渣はシリカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘキサン-酢酸エチル、4:1、v/v] で精製し、目的物3 (1.46 g, 3.11 mmol, 90%) を得た。

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 1.90 (s, 3H, CH₃), 2.13 (s, 3H, CH₃), 3.46 (ABq, J= 19.2 Hz and 15.6 Hz, 2H), 3.60 (dd, J= 11.9 Hz and 1.8 Hz, 2H), 4.35 (d, J= 5.0 Hz, 1H), 4.48 -4.52 (m, 4H), 4.60 (d, J= 11.5 Hz, 1H), 5.34 (d, J= 5.0 Hz, 1H), 6.16 (s, 1H), 7.28-7.36 (m, 10H, Bn)

【0133】

3',5'-di-O-benzyl-4'-C-azidomethyl-2'-O-acetyluridine 4

3,5-di-O-benzyl-4-C-azidomethyl-1,2-di-O-acetyl- α -D-ribofuranose (2.04 g, 4.35 mmol) のアセトニトリル溶液 (20 mL) に、アルゴン雰囲気下でウラシル (0.975 g, 8.70 mmol) とN,O-ビス(トリメチルシリル)アセトアミド (BSA) (8.51 mL, 34.8 mmol) を加え、95 °Cで30分加熱還流した。これを0 °Cに冷却し、トリフルオロメタンスルホン酸トリメチルシリル (TMSOTf) (1.57 mL, 8.70 mmol) を慎重に滴下した。再度95 °Cで15分加熱還流した後、氷浴中で冷却し、飽和重曹水を加えた。反応混合物をクロロホルムで抽出し、有機層を飽和重曹水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、ろ過し、減圧下濃縮した。残渣はシリカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘキサン-酢酸エチル、1:1、v/v] で精製し、目的物4 (1.95 g, 3.75 mmol, 86%) を得た。

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 2.12 (s, 3H, CH₃), 3.36 (d, J= 13.3 Hz, 1H), 3.48 (d, J= 10.1 Hz, 1H), 3.66 (d, J= 13.3 Hz, 1H), 3.77 (d, J= 10.1 Hz, 1H), 4.38 (d, J= 5.5 Hz, 1H), 4.42-4.48 (m, 3H), 4.63 (d, J= 11.5 Hz, 1H), 5.32 (dd, J= 7.8 Hz and 2.5 Hz, 1H), 5.40 (t, J= 5.0 Hz, 1H), 6.18 (d, J= 5.0 Hz, 1H), 7.27-7.41 (m, 10H, Bn), 7.64 (d, J= 8.3 Hz, 1H), 8.25 (s, 1H)

【0134】

3',5'-di-O-benzyl-4'-C-azidomethyluridine 5

3',5'-di-O-benzyl-4'-C-azidomethyl-2'-O-acetyluridine (1.95 g, 3.75 mmol) にアンモニア水 (16 mL) とメタノール (16 mL) を加え、室温で 1.5 時間攪拌した。反応混合物にエタノールを加え、減圧下濃縮した。残渣はシリカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘキサン-酢酸エチル、1:2、v/v] で精製し、目的物 5 (1.73 g, 3.61 mmol, 96%) を得た。

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 3.25 (d, J= 8.3 Hz, 1H), 3.42 (d, J= 12.8 Hz, 1H), 3.55 (d, J= 10.1 Hz, 1H), 3.71 (m, 2H), 4.24 (d, J= 6.0 Hz, 1H), 4.31-4.36 (m, 1H), 4.50 (2, 2H), 4.62 (d, J= 11.5 Hz, 1H), 4.73 (d, J= 11.4 Hz, 1H), 5.40 (dd, J= 7.8 Hz and 2.3 Hz, 1H), 5.89 (d, J= 4.6 Hz, 1H), 7.32-7.40 (m, 10H, Bn), 7.58 (d, J= 8.4 Hz, 1H), 8.50 (s, 1H)

[0135]

4'-C-azidomethyluridine 6

3',5'-di-O-benzyl-4'-C-azidomethyluridine (3.16g, 6.59mmol) のジクロロメタン溶液(80 mL) を、アルゴン雰囲気下、-78℃まで冷却し、1 M三塩化ホウ素ジクロロメタン溶液 (44.8 mL, 44.8 mmol) を加えて3時間攪拌した。その後-30℃に昇温して3時間攪拌した。反応混合物にジクロロメタン-メタノール (1:1、v/v、80 mL) を加え、減圧下濃縮した。残渣は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、4:1、v/v] で精製し、目的物 6 (1.31 g, 4.38 mmol, 66%) を得た。

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ : 3.15 (d, J= 5.0 Hz, 1H), 3.58-3.55 (m, 3H), 4.02 (t, J= 5.0 Hz, 1H), 4.22 (dd, J= 6.4 Hz and 5.5 Hz, 1H), 5.30 (t, J= 5.5 Hz, 1H), 5.38 (d, J= 5.0 Hz, 1H), 5.45 (d, J= 6.9 Hz, 1H), 5.68 (dd, J= 8.2 Hz and 1.8 Hz, 1H), 5.88 (d, J= 7.8 Hz, 1H), 7.82 (d, J= 8.2 Hz, 1H), 11.4 (s, 1H); ¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-d₆) δ 52.1, 62.9, 71.3, 73.0, 86.1, 87.0, 102.3, 140.8, 151.0, 163.0

[0136]

5'-O-[bis(4-methoxyphenyl)phenylmethyl]-4'-C-azidomethyluridine 7

4'-C-azidomethyluridine (0.541 g, 1.81 mmol) のピリジン溶液 (5.4 mL) に、アルゴン雰囲気下で 4, 4'-ジメトキシトリチルクロリド (DMTrCl) (0.797 g, 2.35 mmol) を加え、室温で一晩攪拌した。反応混合物を酢酸エチルで抽出し、有機層を飽和重曹水及び飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、ろ過し、減圧下濃縮した。残渣は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、12:1、v/v] で精製し、目的物 7 (0.464 g, 0.772 mmol, 43%) を得た。無色非晶質。

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 3.29 (d, J= 3.6 Hz, 1H, 3'-OH), 3.33 (d, J= 10.1 Hz, 1H, 4' (C)-CH₂), 3.39 (d, J= 10.5 Hz, 1H, 4' (C)-CH₂), 3.58 (d, J= 12.8 Hz, 1H, 5'-H), 3.67 (d, J= 13.3 Hz, 1H, 5'-H), 3.77 (s, 6H, 2×OMe), 4.38 (q, J= 5.5 Hz, 1H, 3'-H), 4.42 (q, J= 5.5 Hz, 1H, 2'-H), 4.79 (d, J= 5.0 Hz, 1H, 2'-OH), 5.41 (dd, J= 8.3 Hz and 1.9 Hz, 1H, 5-H), 5.94 (d, J= 5.5 Hz, 1H, 1'-H), 6.84 (d, J= 9.2 Hz, 5H, DMTr), 7.23-7.37 (m, 8H, DMTr), 7.59 (d, J= 8.2 Hz, 1H, 6-H), 9.65 (s, 1H, 3-NH)

[0137]

5'-O-[bis(4-methoxyphenyl)phenylmethyl]-4'-C-trifluoroacetylaminomethyluridine 8

5'-O-[bis(4-methoxyphenyl)phenylmethyl]-4'-C-azidomethyluridine (0.450 g, 0.749 mmol) のテトラヒドロフラン溶液 (15 mL) に、トリフェニルホスフィン(PPh₃) (0.491 g, 1.87 mmol) と水 (0.540 mL, 30.0 mmol) を加え、45℃で24時間攪拌した。反応混合物中のテトラヒドロフランを減圧留去した後、ジクロロメタン溶液 (4.0 mL) とした。トリフルオロ酢酸エチル(CF₃COOEt) (0.237 mL, 1.99 mmol) とトリエチルアミン (Et₃N) (0.138 mL, 0.995 mmol) を加え、室温で24時間攪拌した。反応混合物を酢酸エチルで抽出し、有機層を飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリ

10

20

30

40

50

ウムで乾燥した後、ろ過し、減圧下濃縮した。残渣は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、15:1、v/v] で精製し、目的物 8 (0.445 g, 0.663 mmol, 89%) を得た。無色非晶質。

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 1.26 (t, J= 7.4 Hz, 2H, 4' (C)-CH₂), 3.27 (d, J = 10.6 Hz,

1H, 5' -H), 3.32 (d, J= 10.7 Hz, 1H, 5' -H), 3.76 (s, 6H, 2×OMe), 4.12 (q, J = 7.3 Hz, 1H, 3' -OH), 4.35 (t, J= 5.5 Hz, 1H, 3' -H), 4.51 (q, J= 5.2 Hz, 1H, 2' -H), 5.07 (d, J= 4.1 Hz, 1H, 2' -OH), 5.44 (dd, J= 7.8 Hz and 1.8 Hz, 1H, 1' -H), 6.83 (d, J= 8.7 Hz, 4H, DMTr), 7.11 (t, J= 6.2 Hz, 1H, -NHCOCF₃), 7.22-7.34 (m, 9H, DMTr), 7.57 (d, J= 8.2 Hz, 1H, 6-H), 9.74 (s, 1H, 3-NH)

【0138】

5' -O-[bis(4-methoxyphenyl)phenylmethyl]-4' -C-trifluoroacetylaminoethyl-2' -O-[(1,1-dimethylethyl)dimethylsilyl]-uridine 9a

5' -O-[bis(4-methoxyphenyl)phenylmethyl]-4' -C-trifluoroacetylaminoethyl-3' -O-[(1,1-dimethylethyl)dimethylsilyl]-uridine 9b

5' -O-[bis(4-methoxyphenyl)phenylmethyl]-4' -C-trifluoroacetylaminoethyl uridine (0.445 g, 0.663 mmol) のジメチルホルムアミド溶液 (4.4 mL) に、アルゴン雰囲気下でトリエチルアミン (Et₃N) (0.276 mL, 1.99 mmol) と *tert*-ブチルジメチルシリルクロリド (TBDMSCl) (0.200 g, 1.33 mmol) を加えて室温で一晩攪拌した。反応混合物を酢酸エチルで抽出し、有機層を飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、ろ過し、減圧下濃縮した。残渣はシリカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘキサン-酢酸エチル、1:1、v/v] で精製し、目的物 9a (0.221 g, 0.281 mmol, 42%) 及び目的物 9b (0.142 g, 0.181 mmol, 27%) を得た。

【0139】

化合物 9a

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 0.0520 (s, 3H, Si-SH₃), 0.108 (s, 3H, Si-CH₃), 0.911 (s, 9H, *tert*-butyl), 3.10 (s, 1H, 3' -OH), 3.33 (s, 2H, 5' -OH), 3.56 (m, 1H, 4' (C)-CH₂), 3.63 (m, 1H, 4' (C)-CH₂), 3.80 (s, 6H, 2×OMe), 4.23 (d, J= 5.5 Hz, 1H, 3' -H), 4.60 (t, J= 6.2 Hz, 1H, 2' -H), 5.42 (d, J= 8.2 Hz, 1H, 5-H), 6.04 (d, J= 6.9 Hz, 1H, 1' -H), 6.84 (d, J= 8.9 Hz, 5H, DMTr), 7.20-7.22 (m, 4H, DMTr), 7.29-7.32 (m, 4H, DMTr), 7.65 (d, J= 8.2 Hz, 1H, 6-H), 8.57 (s, 1H, 3-NH)

【0140】

化合物 9b

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : -0.0305 (s, 3H, Si-CH₃), 0.0749 (s, 3H, Si-CH₃), 0.866 (s, 9H, *tert*-butyl), 3.07 (d, J= 4.1 Hz, 1H, 2' -OH), 3.22 (d, J= 10.3 Hz, 1H, 5' -H), 3.37 (d, J= 10.3 Hz, 1H, 5' -H), 3.59 (q, J= 4.7 Hz, 1H, 4' (C)-CH₂), 3.64 (q, J= 7.0 Hz, 1H, 4' (C)-CH₂), 3.79 (s, 6H, 2×OMe), 4.26 (m, 1H, 2' -H), 4.49 (d, J= 6.2 Hz, 1H, 3' -H), 5.44 (d, J= 7.6 Hz, 1H, 5-H), 5.76 (d, J= 3.5 Hz, 1H, 1' -H), 6.83 (dd, J= 8.9 Hz and 2.7 Hz, 4H, DMTr), 7.11 (s, 1H, -NHCOCF₃), 7.23-7.34 (m, 9H, DMTr), 7.57 (d, J= 8.3 Hz, 1H, 6-H), 8.55 (s, 1H, 3-NH)

【0141】

5' -O-[bis(4-methoxyphenyl)phenylmethyl]-4' -C-trifluoroaminomethyl-2' -O-[(1,1-dimethylethyl)dimethylsilyl]-3' -[2-cyanoethyl-N,N-bis(1-methylethyl)-phosphoramidite]-uridine 10

5' -O-[bis(4-methoxyphenyl)phenylmethyl]-4' -C-trifluoroacetylaminoethyl-2' -O-[(1,1-dimethylethyl)dimethylsilyl]-uridine (0.221 g, 0.281 mmol) のテトラヒドロフラン溶液 (2.2 mL) に、アルゴン雰囲気下でジイソプロピルエチルアミン (DIPEA) (0.245 mL, 0.141 mmol) とクロロ(ジイソプロピルアミノ)亜ホスフィン酸 2-シ

10

20

30

40

50

アノエチル (CEP-Cl) (0.125 mL, 0.562 mmol) を加えて室温で1時間攪拌した。反応混合物を酢酸エチルで抽出し、有機層を飽和重曹水及び飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、ろ過し、減圧下濃縮した。残渣はシリカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘキサン-酢酸エチル、2:3、v/v] で精製し、目的物10 (0.215 g, 0.218 mmol, 78%) を得た。

^{31}P -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 151.67, 152.10

【0142】

5'-O-[bis(4-methoxyphenyl)phenylmethyl]-4'-C-trifluoroacetylaminomethyl-3'-O-[(1,1-dimethylethyl)dimethylsilyl]-uridine 担持CPG担体11

5'-O-[bis(4-methoxyphenyl)phenylmethyl]-4'-C-trifluoroacetylaminomethyl-3'-O-[(1,1-dimethylethyl)dimethylsilyl]-uridine (0.142 g, 0.181 mmol) のピリジン溶液 (2.0 mL) に、アルゴン雰囲気下でN,N-ジメチル-4-アミノピリジン (DMAP) (4.2 mg, 0.362 mmol) と無水コハク酸 (72.5 mg, 0.724 mmol) を加えて室温で24時間攪拌した。反応混合物を酢酸エチルで抽出し、有機層を飽和重曹水及び飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、ろ過し、減圧下濃縮した。残渣にジメチルホルムアミド (1.9 mL) を加えて溶かし、定孔ガラス (controlled pore glass: CPG) (0.359 g) と1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩 (EDC) (36.6 mg, 0.191 mmol) を加えて3日間振盪した。CPGをフィルターで濾別し、ピリジンで洗浄後、アルゴン雰囲気下でDMAP (0.183 g)、ピリジン (13.5 mL) と無水酢酸 (1.5 mL) を加えて24時間静置した。CPGを濾別し、ピリジン、エタノール及びアセトニトリルで洗浄後乾燥させ、目的物11 (活性: 35.6 $\mu\text{mol/g}$) を得た。

【0143】

(2) 2'-OH-4'-アミノエチル樹脂体

以下のスキームに従い、2'-OH-4'-アミノエチルアミダイトユニット及び樹脂体を合成した。

【0144】

10

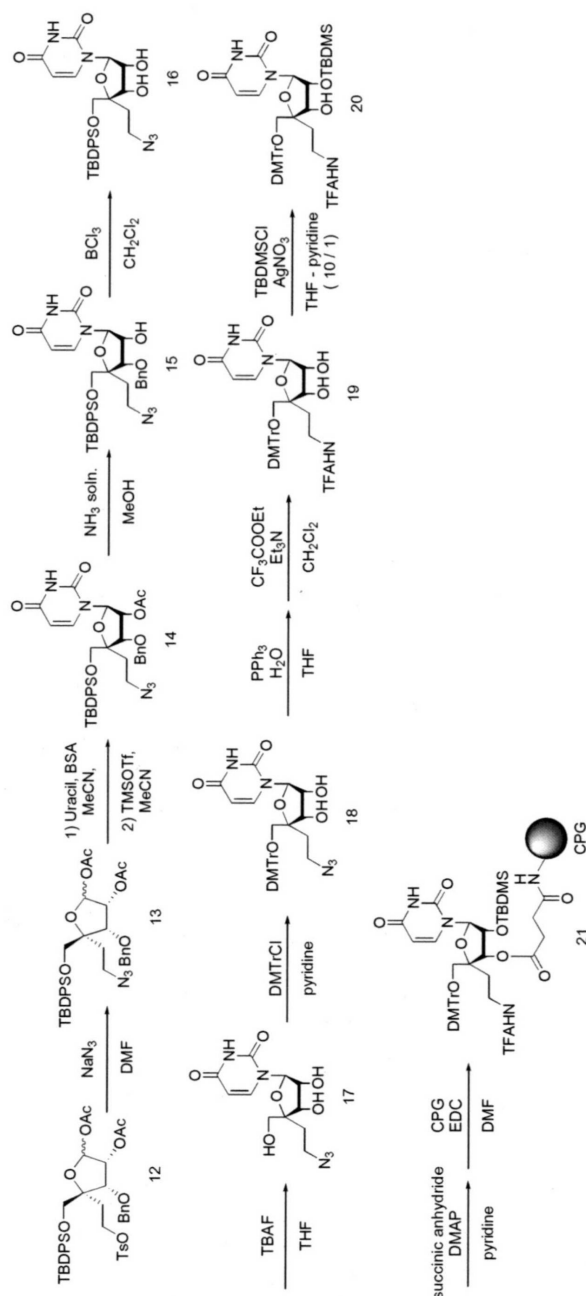
20

30

40

50

【化 10】



【 0 1 4 5 】

5-O-[(1,1-dimethylethyl)diphenylsilyl]-4-C-[[[4-methylphenyl)sulfonyl]oxy]ethyl-3-O-benzyl-1,2-di-O-acetyl- α -D-ribofuranose 12

グルコースを出発原料とし、既存の手法を用いて目的物 12を合成した。

【 0 1 4 6 】

5-O-[(1,1-dimethylethyl)diphenylsilyl]-4-C-azidoethyl-3-O-benzyl-1,2-di-O-acetyl- α -D-ribofuranose 13

5-O-[(1,1-dimethylethyl)diphenylsilyl]-4-C-[[[4-methylphenyl)sulfonyl]oxy]ethyl-3-O-benzyl-1,2-di-O-acetyl- α -D-ribofuranose (3.48 g, 4.57 mmol) のジメチ

ルホルムアミド (DMF) 溶液 (35 mL) に、アルゴン雰囲気下でアジ化ナトリウム (NaN_3) (1.04 g, 16.0 mmol) を加えて 50 °C で一晩撹拌した。反応混合物を酢酸エチルで抽出し、有機層を飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、ろ過し、減圧下濃縮した。残渣はシリカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘキサン-酢酸エチル、7:1、v/v] により精製し、目的物 13 (2.37 g, 3.75 mmol, 82%) を得た。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.07 (s, 9H), 1.81 (s, 3H), 1.97-2.05 (m, 1H), 2.10 (s, 3H), 2.14-2.21 (m, 1H), 3.25-3.31 (m, 1H), 3.39-3.46 (m, 1H), 3.60 (s, 2H), 4.32 (d, $J=5.04$ Hz, 1H), 4.52 (d, $J=11.5$ Hz, 1H), 4.59 (d, $J=11.4$ Hz, 1H), 5.35 (d, $J=5.04$ Hz, 1H), 6.14 (s, 1H), 7.27-7.46 (m, 10H), 7.62-7.65 (m, 5H)
 ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ : 19.46, 20.96, 21.11, 27.04, 31.56, 46.78, 67.99, 73.65, 74.58, 79.32, 87.08, 97.82, 127.64, 127.94, 128.02, 128.07, 128.61, 130.03, 130.13, 132.71, 133.08, 135.65, 135.75, 137.49, 169.28, 169.78

[0147]

5'-O-[(1,1-dimethylethyl)diphenylsilyl]-4'-C-azidoethyl-3'-O-benzyl-2'-O-acetyluridine 14

5-O-[(1,1-dimethylethyl)diphenylsilyl]-4-C-azidoethyl-3-O-benzyl-1,2-di-O-acetyl- α -D-ribofuranose (11.1 g, 17.6 mmol) のアセトニトリル溶液 (100 mL) に、アルゴン雰囲気下でウラシル (3.95 g, 35.2 mmol) と N,O-ビス(トリメチルシリル)アセトアミド (BSA) (34.4 mL, 141 mmol) を加え、95 °C で1時間加熱還流した。これを0 °C に冷却し、トリフルオロメタンスルホン酸トリメチルシリル (TMSOTf) (6.36 mL, 35.2 mmol) を慎重に滴下した。再度50 °C で3時間撹拌した後、氷浴中で冷却し、飽和重曹水を加えた。反応混合物をクロロホルムで抽出し、有機層を飽和重曹水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、ろ過し、減圧下濃縮した。残渣はシリカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘキサン-酢酸エチル、2:1、v/v] で精製し、目的物 14 (10.2 g, 14.9 mmol, 85%) を得た。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.10 (s, 9H), 1.65-1.73 (m, 1H), 2.05-2.14 (m, 4H), 3.23-3.30 (m, 1H), 3.35-3.41 (m, 1H), 3.56 (d, $J=11.5$ Hz, 1H), 3.86 (d, $J=11.5$ Hz, 1H), 4.39-4.42 (m, 2H), 4.61 (d, $J=11.0$ Hz, 1H), 5.32-5.39 (m, 2H), 6.13 (d, $J=5.04$ Hz, 1H), 7.33-7.49 (m, 10H), 7.57-7.64 (m, 6H), 8.02 (s, 1H)
 ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ : 19.46, 20.89, 27.18, 31.09, 46.53, 66.54, 74.59, 74.92, 86.85, 87.42, 103.07, 128.03, 128.21, 128.25, 128.39, 128.74, 130.38, 130.48, 131.91, 132.60, 135.47, 135.77, 137.10, 139.87, 150.18, 162.78, 170.09

[0148]

5'-O-[(1,1-dimethylethyl)diphenylsilyl]-4'-C-azidoethyl-3'-O-benzyluridine 15

5'-O-[(1,1-dimethylethyl)diphenylsilyl]-4'-C-azidoethyl-3'-O-benzyl-2'-O-acetyluridine (10.2 g, 14.9 mmol) にアンモニア水 (83 mL) とメタノール (83 mL) を加え、室温で一晩撹拌した。反応混合物にエタノールを加え、減圧下濃縮した。残渣はシリカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘキサン-酢酸エチル、1:1、v/v] で精製し、目的物 15 (9.39 g, 14.6 mmol, 98%) を得た。

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 1.09 (s, 9H), 1.67-1.73 (m, 1H), 2.15-2.21 (m, 1H), 3.20-3.26 (m, 1H), 3.33-3.38 (m, 1H), 3.47-3.55 (m, 2H), 3.80 (d, $J=10.9$ Hz, 1H), 4.19 (d, $J=6.30$ Hz, 1H), 4.30 (q, $J=5.75$ Hz, 1H), 4.59 (d, $J=11.5$ Hz, 1H), 4.72 (d, $J=11.5$ Hz, 1H), 5.39 (d, $J=8.60$ Hz, 1H), 5.90 (d, $J=5.70$ Hz, 1H), 7.32-7.42 (m, 9H), 7.45-7.48 (m, 2H), 7.57-7.62 (m, 5H), 9.20 (s, 1H)
 ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ : 19.44, 27.19, 31.19, 46.55, 66.86, 74.70, 74.99, 78.77, 87.23, 89.37, 102.84, 128.21, 128.25, 128.35, 128.61, 128.89, 130.39, 130.49, 131.99, 132.57, 135.49, 135.74, 136.89, 139.98, 150.83, 163.00

[0149]

5'-O-[(1,1-dimethylethyl)diphenylsilyl]-4'-C-azidoethyluridine 16

5'-O-[(1,1-dimethylethyl)diphenylsilyl]-4'-C-azidoethyl-3'-O-benzyluridine (2.42 g, 3.77 mmol) のジクロロメタン溶液 (95 mL) を、アルゴン雰囲気下、-78℃まで冷却し、1 M 三塩化ホウ素ジクロロメタン溶液 (25.6 mL, 25.6 mmol) を加えて3時間攪拌した。その後-30℃に昇温して3時間攪拌した。反応混合物にジクロロメタン-メタノール (1:1、v/v、50 mL) を加え、減圧下濃縮した。残渣はシリカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘキサン-酢酸エチル、1:1、v/v] で精製し、目的物 16 (1.91 g, 3.47 mmol, 92%) を得た。

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 1.08 (s, 9H), 1.85-1.91 (m, 1H), 2.10-2.16 (m, 1H), 3.32-3.38 (m, 2H), 3.45 (d, J=4.0 Hz, 1H), 3.66 (d, J=10.9 Hz, 1H), 3.78 (d, J=11.5 Hz, 1H), 4.33 (t, J=5.70 Hz, 1H), 4.43-4.44 (m, 1H), 5.11 (d, J=5.15 Hz, 1H), 5.38 (d, J=8.05 Hz, 1H), 5.95 (d, J=5.15 Hz, 1H), 7.40-7.48 (m, 6H), 7.61-7.64 (m, 4H), 7.74 (d, J=8.60 Hz, 1H), 10.2 (s, 1H)

¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃) δ : 19.42, 27.15, 31.12, 46.86, 67.25, 72.31, 75.93, 88.67, 89.52, 102.61, 128.22, 128.24, 130.36, 130.47, 131.95, 132.55, 135.53, 135.75, 140.26, 151.79, 163.59

【0150】

4'-C-azidoethyluridine 17

5'-O-[(1,1-dimethylethyl)diphenylsilyl]-4'-C-azidoethyluridine (0.746 g, 1.35 mmol) のテトラヒドロフラン溶液 (8.0 mL) に、アルゴン雰囲気下で1 M 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 (TBAF) (2.0 mL, 2.0 mmol) を加え、室温で24時間攪拌した。その後、溶媒を減圧下濃縮し、残渣を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、5:1、v/v] で精製し、目的物 17 (0.409 g, 1.31 mmol, 97%) を得た。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 0.958-1.02 (m, 1H), 1.10-1.18 (m, 1H), 2.54-2.64 (m, 4H), 3.15 (t, J=5.04 Hz, 1H), 3.41 (q, J=7.32 Hz, 1H), 4.40-4.43 (m, 2H), 4.50 (d, J=6.40 Hz, 1H), 4.85 (d, J=8.24 Hz, 1H), 5.01 (d, J=7.36 Hz, 1H), 7.02 (d, J=8.24 Hz, 1H), 10.5 (s, 1H)

【0151】

5'-O-[bis(4-methoxyphenyl)phenylmethyl]-4'-C-azidoethyluridine 18

4'-C-azidoethyluridine (1.19 g, 3.79 mmol) のピリジン溶液 (12 mL) に、アルゴン雰囲気下で4,4'-ジメトキシトリチルクロリド (DMTrCl) (1.93 g, 5.69 mmol) を加え、室温で7時間攪拌した。反応混合物を酢酸エチルで抽出し、有機層を飽和重曹水及び飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、ろ過し、減圧下濃縮した。残渣はシリカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘキサン-酢酸エチル、1:4、v/v] で精製し、目的物 18 (1.19 g, 1.94 mmol, 51%) を得た。

【0152】

5'-O-[bis(4-methoxyphenyl)phenylmethyl]-4'-C-trifluoroacetylaminoethyluridine 19

5'-O-[bis(4-methoxyphenyl)phenylmethyl]-4'-C-azidoethyluridine (1.19 g, 1.94 mmol) のテトラヒドロフラン溶液 (40 mL) に、トリフェニルホスフィン (PPh₃) (1.30 g, 4.95 mmol) と水 (1.43 mL, 79.32 mmol) を加え、45℃で7時間攪拌した。反応混合物中のテトラヒドロフランを減圧留去した後、ジクロロメタン溶液 (11 mL) とした。トリフルオロ酢酸エチル (CF₃COOEt) (0.691 mL, 5.79 mmol) とトリエチルアミン (Et₃N) (0.401 mL, 2.90 mmol) を加え、室温で24時間攪拌した。反応混合物を酢酸エチルで抽出し、有機層を飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、ろ過し、減圧下濃縮した。残渣はシリカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘキサン-酢酸エチル、1:2、v/v] で精製し、目的物 19 (1.05 g, 1.53 mmol, 79%) を得た。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 2.00-2.05 (m, 1H), 2.11-2.17 (m, 1H), 3.25-3.35 (m, 4H), 3.78 (s, 6H), 3.96 (s, 1H), 4.35 (s, 1H), 4.52 (s, 1H), 5.17 (s, 1H),

5.41 (d, J=7.80 Hz, 1H), 5.96 (d, J=5.96 Hz, 1H), 6.86 (d, J=8.72 Hz, 5H), 7.28-7.41 (m, 8H), 7.46 (m, 1H), 7.65 (d, J=8.24 Hz, 1H), 10.2 (s, 1H)

【0153】

5'-O-[bis(4-methoxyphenyl)phenylmethyl]-4'-C-trifluoroacetylaminoethyl-2'-O-[(1,1-dimethylethyl)dimethylsilyl]-uridine 20

5'-O-[bis(4-methoxyphenyl)phenylmethyl]-4'-C-trifluoroacetylaminoethyluridine (1.04 g, 1.53 mmol) のテトラヒドロフラン溶液 (10 mL) に、アルゴン雰囲気下でピリジン (0.753 mL, 9.33 mmol)、硝酸銀 (AgNO₃) (0.442 g, 2.60 mmol) と *tert*-ブチルジメチルシリルクロリド (TBDMSCl) (0.461 g, 3.06 mmol) を加えて室温で3時間攪拌した。反応混合物をクロロホルムで希釈後、セライトで濾過し、減圧下濃縮した。残渣はシリカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘキサン-酢酸エチル、3:2、v/v] で精製し、目的物 20 (1.13 g, 1.41 mmol, 92%) を得た。

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 0.0554 (s, 3H), 0.113 (s, 3H), 0.912 (s, 9H), 2.00 (t, J=6.18 Hz, 2H), 3.16 (d, J=1.38 Hz, 1H), 3.25-3.34 (m, 4H), 3.80 (s, 6H), 4.20 (d, J=4.14 Hz, 1H), 4.62 (t, J=5.52 Hz, 1H), 5.35 (dd, J=8.22 Hz and 2.04 Hz, 1H), 6.02 (d, J=6.84 Hz, 1H), 6.85 (d, J=8.22 Hz, 4H), 7.19-7.24 (m, 5H), 7.30-7.33 (m, 4H), 7.67 (d, J=8.28 Hz, 1H), 8.06 (s, 1H)

【0154】

5'-O-[bis(4-methoxyphenyl)phenylmethyl]-4'-C-trifluoroacetylaminoethyl-2'-O-[(1,1-dimethylethyl)dimethylsilyl]-uridine 担持 CPG 担体 21

5'-O-[bis(4-methoxyphenyl)phenylmethyl]-4'-C-trifluoroacetylaminoethyluridine (0.209 g, 0.262 mmol) のピリジン溶液 (3.0 mL) に、アルゴン雰囲気下で *N,N*-ジメチル-4-アミノピリジン (DMAP) (64.0 mg, 0.524 mmol) と無水コハク酸 (0.105 g, 1.05 mmol) を加えて室温で24時間攪拌した。反応混合物を酢酸エチルで抽出し、有機層を飽和重曹水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、ろ過し、減圧下濃縮した。残渣は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、15:1、v/v] で精製した。精製物にジメチルホルムアミド (2.77 mL) を加えて溶かし、定孔ガラス (controlled pore glass:CPG) (0.444 g) と1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩 (EDC) (51.8 mg, 0.270 mmol) を加えて4日間振盪した。CPGをフィルターで濾別し、ピリジンで洗浄後、アルゴン雰囲気下で DMAP (0.183 g)、ピリジン (13.5 mL) と無水酢酸 (1.5 mL) を加えて32時間静置した。CPGを濾別し、ピリジン、エタノール及びアセトニトリルで洗浄後乾燥させ、目的物 21 (活性: 30.7 μmol/g) を得た。

【0155】

(3) 2'-OMe-4'-アミノエチルアミダイトユニット

以下のスキームに従い、2'-OMe-4'-アミノエチルアミダイトユニットを合成した。

【0156】

10

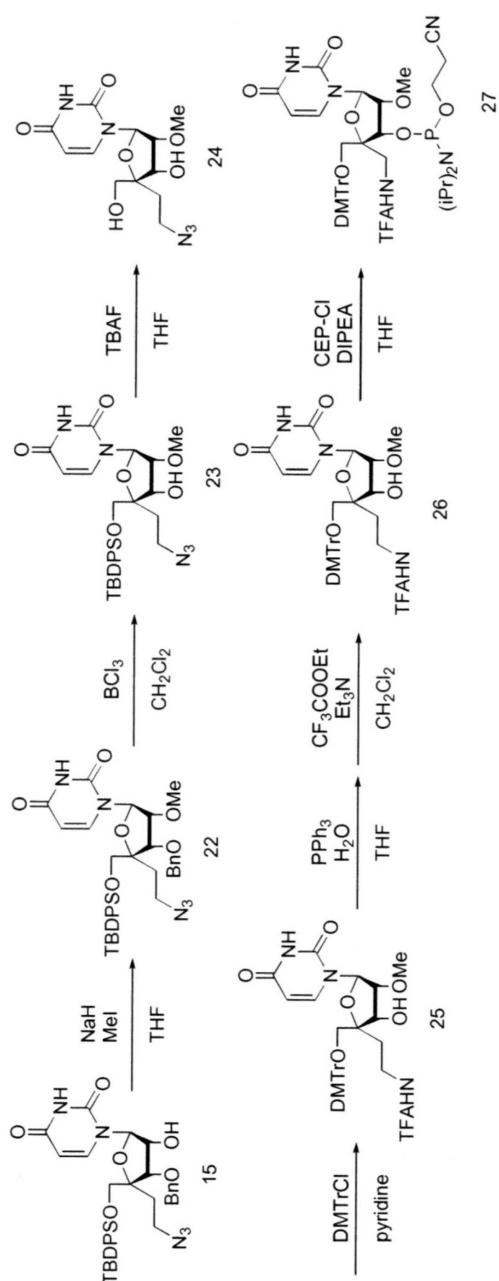
20

30

40

50

【化 1 1】



【 0 1 5 7 】

5'-O-[(1,1-dimethylethyl)diphenylsilyl]-4'-C-azidoethyl-3'-O-benzyl-2'-O-methyluridine 22

5'-O-[(1,1-dimethylethyl)diphenylsilyl]-4'-C-azidoethyl-3'-O-benzyluridine (6.06 g, 9.46 mmol) のテトラヒドロフラン溶液 (60 mL) に、アルゴン雰囲気下、氷浴下60%水素化ナトリウム(NaH) (1.14 g, 28.4 mmol) を加え、0℃で10分間撹拌した。これにヨードメタン (CH₃I) (2.94 mL, 47.3 mmol) を慎重に滴下し、遮光条件下、0℃で8時間撹拌した。反応混合物を酢酸エチルで抽出し、有機層を飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、ろ過し、減圧下濃縮した。残渣はシリ

カゲルカラムクロマトグラフィー [ヘキサン-酢酸エチル、2:1、v/v] で精製し、目的物 2

2 (4.18 g, 6.37 mmol, 67%) を得た。
 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.09 (s, 9H), 1.71-1.77 (m, 1H), 2.29-2.35 (m, 1H), 3.25-3.31 (m, 1H), 3.34-3.39 (m, 1H), 3.52 (s, 3H), 3.68 (d, $J=11.5$ Hz, 1H), 3.75 (dd, $J=5.70$ Hz and 2.30 Hz, 1H), 3.98 (d, $J=11.5$ Hz, 1H), 4.35 (d, $J=6.30$ Hz, 1H), 4.51 (d, $J=11.5$ Hz, 1H), 4.71 (d, $J=11.5$ Hz, 1H), 5.09 (dd, $J=8.00$ Hz and 1.70 Hz, 1H), 6.08 (d, $J=2.30$ Hz, 1H), 7.34-7.40 (m, 9H), 7.44-7.47 (m, 2H), 7.51 (d, $J=7.45$ Hz, 2H), 7.61 (d, $J=6.85$ Hz, 2H), 7.79 (d, $J=8.05$ Hz, 1H), 8.96 (s, 1H)

^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ : 19.57, 27.25, 31.05, 46.61, 59.45, 65.45, 73.16, 75.78, 83.96, 87.30, 88.33, 102.58, 128.00, 128.15, 128.26, 128.33, 128.73, 130.33, 130.42, 131.97, 132.89, 135.36, 135.58, 137.33, 139.98, 149.99, 163.08

【0158】

5'-O-[(1,1-dimethylethyl)diphenylsilyl]-4'-C-azidoethyl-2'-O-methyluridine 23

5'-O-[(1,1-dimethylethyl)diphenylsilyl]-4'-C-azidoethyl-3'-O-benzyl-2'-O-methyluridine (1.06 g, 1.62 mmol) のジクロロメタン溶液 (42 mL) を、アルゴン雰囲気下、 -78°C まで冷却し、1 M 三塩化ホウ素ジクロロメタン溶液 (11 mL, 11 mmol) を加えて3時間攪拌した。その後 -20°C に昇温して5時間攪拌した。反応混合物にジクロロメタン-メタノール (1:1、v/v、24 mL) を加え、減圧下濃縮した。残渣はシリカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘキサン-酢酸エチルメタノール、1:1、v/v] で精製し、目的物 23 (0.713 g, 1.26 mmol, 78%) を得た。

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 1.11 (s, 9H), 1.73-1.78 (m, 1H), 2.05-2.10 (m, 1H), 2.89 (d, $J=5.52$ Hz, 1H), 3.28-3.33 (m, 1H), 3.36-3.40 (m, 1H), 3.53 (s, 3H), 3.71 (d, $J=11.7$ Hz, 1H), 3.89-3.93 (m, 2H), 4.49 (t, $J=6.18$ Hz, 1H), 5.33 (d, $J=6.18$ Hz, 1H), 6.08 (s, $J=4.14$ Hz, 1H), 7.40-7.43 (m, 4H), 7.46-7.48 (m, 2H), 7.61 (d, $J=7.56$ Hz, 2H), 7.65 (d, $J=7.56$ Hz, 2H), 7.78 (d, $J=8.22$ Hz, 1H), 9.11 (s, 1H)

^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ : 19.52, 27.20, 30.91, 46.63, 59.39, 66.80, 70.11, 84.41, 86.66, 87.77, 102.95, 128.23, 128.28, 130.43, 130.51, 131.84, 132.68, 135.39, 135.68, 139.93, 150.31, 163.09

【0159】

4'-C-azidoethyl-2'-O-methyluridine 24

5'-O-[(1,1-dimethylethyl)diphenylsilyl]-4'-C-azidoethyl-2'-O-methyluridine (0.693 g, 1.23 mmol) のテトラヒドロフラン溶液 (7.0 mL) に、アルゴン雰囲気下で1 M 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 (TBAF) (1.85 mL, 1.85 mmol) を加え、室温で21時間攪拌した。その後、溶媒を減圧下濃縮し、残渣を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、8:1、v/v] で精製し、目的物 24 (0.390 g, 1.19 mmol, 97%) を得た。

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 0.901-0.961 (m, 1H), 1.08-1.14 (m, 1H), 2.45 (s, 3H), 2.50-2.63 (m, 4H), 3.14 (t, $J=6.30$ Hz, 1H), 3.33 (t, $J=5.75$ Hz, 1H), 4.44-4.48 (m, 2H), 4.83 (d, $J=8.05$ Hz, 1H), 5.07 (d, $J=6.90$ Hz, 1H), 7.05 (d, 8.05 Hz, 1H), 10.5 (s, 1H)

^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 30.99, 46.38, 57.45, 64.27, 69.70, 82.28, 84.98, 87.21, 102.34, 140.62, 150.75, 163.02

【0160】

5'-O-[bis(4-methoxyphenyl)phenylmethyl]-4'-C-azidoethyl-2'-O-methyluridine 25

4'-C-azidoethyl-2'-O-methyluridine (0.365 g, 1.12 mmol) のピリジン溶液 (4.0

10

20

30

40

50

mL) に、アルゴン雰囲気下で4,4'-ジメトキシトリチルクロリド (DMTrCl) (0.569 g, 1.68 mmol) を加え、室温で20時間攪拌した。反応混合物を酢酸エチルで抽出し、有機層を飽和重曹水及び飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、ろ過し、減圧下濃縮した。残渣はシリカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘキサン-酢酸エチル、1:1、v/v] で精製し、目的物25 (0.365 g, 1.12 mmol, 96%) を得た。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 1.74-1.81 (m, 1H), 2.08-2.11 (m, 1H), 2.87 (d, J=6.44 Hz, 1H), 3.18-3.23 (m, 1H), 3.26-3.30 (m, 1H), 3.35 (s, 2H), 3.58 (s, 3H), 3.80 (s, 6H), 3.93 (dd, J=5.96 Hz and 3.64 Hz, 1H), 4.10-4.15 (m, 1H), 4.61 (t, J=6.40 Hz, 1H), 5.22 (d, J=8.24 Hz, 1H), 6.03 (d, J=3.64 Hz, 1H), 6.85 (d, J=9.16 Hz, 4H), 7.24-7.25 (m, 2H), 7.26-7.35 (m, 7H), 7.81 (d, J=8.24 Hz, 1H), 8.50 (s, 1H)

【0161】

5'-O-[bis(4-methoxyphenyl)phenylmethyl]-4'-C-trifluoroacetylaminoethyl-2'-O-methyluridine 26

5'-O-[bis(4-methoxyphenyl)phenylmethyl]-4'-C-azidoethyl-2'-O-methyluridine (0.679 g, 1.08 mmol) のテトラヒドロフラン溶液 (25 mL) に、トリフェニルホスフィン(PPh₃) (0.708 g, 2.70 mmol) と水 (0.798 mL) を加え、45℃で23時間攪拌した。反応混合物中のテトラヒドロフランを減圧留去した後、ジクロロメタン溶液 (6.8 mL) とした。トリフルオロ酢酸エチル(CF₃COOEt) (0.387 mL, 3.24 mmol) とトリエチルアミン (Et₃N) (0.558 mL, 1.626 mmol) を加え、室温で一晩攪拌した。反応混合物を酢酸エチルで抽出し、有機層を飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、ろ過し、減圧下濃縮した。残渣はシリカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘキサン-酢酸エチル、2:3、v/v] で精製し、目的物26 (1.12 g, 1.39 mmol, 92%) を得た。

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 1.94-1.97 (m, 1H), 2.03-2.08 (m, 1H), 3.05 (d, J=4.60 Hz, 1H), 3.31-3.41 (m, 4H), 3.54 (s, 3H), 3.80 (s, 6H), 4.03 (t, J=5.04 Hz, 1H), 4.47 (t, J=5.04 Hz, 1H), 5.29 (d, J=8.24 Hz, 1H), 6.03 (d, J=5.04 Hz, 1H), 6.85 (d, J=8.76 Hz, 4H), 7.23-7.25 (m, 2H), 7.28-7.34 (m, 7H), 8.18 (s, 1H)

【0162】

5'-O-[bis(4-methoxyphenyl)phenylmethyl]-4'-C-trifluoroacetylaminoethyl-2'-O-methyl-3'-[2-cyanoethyl-N,N-bis(1-methylethyl)-phosphoramidite]-uridine 27

5'-O-[bis(4-methoxyphenyl)phenylmethyl]-4'-C-trifluoroacetylaminoethyl-2'-O-methyluridine (1.00 g, 1.43 mmol) のテトラヒドロフラン溶液 (10 mL) に、アルゴン雰囲気下でジイソプロピルエチルアミン (DIPEA) (1.25 mL, 7.15 mmol) とクロロ(ジイソプロピルアミノ)亜ホスフィン酸2-シアノエチル (CEP-Cl) (0.638 mL, 2.86 mmol) を加えて室温で1.5時間攪拌した。反応混合物をクロロホルムで抽出し、有機層を飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、ろ過し、減圧下濃縮した。残渣はシリカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘキサン-酢酸エチル、1:1、v/v] で精製し、目的物27 (0.884 g, 0.983 mmol, 69%) を得た。

【0163】

³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) δ : 150.94, 151.53

【0164】

(4) 2'-OH-4'-アミノプロピルアミダイトユニット及び樹脂体

以下のスキームに従い、2'-OH-4'-アミノプロピルアミダイトユニット及び樹脂体を合成した。

【0165】

10

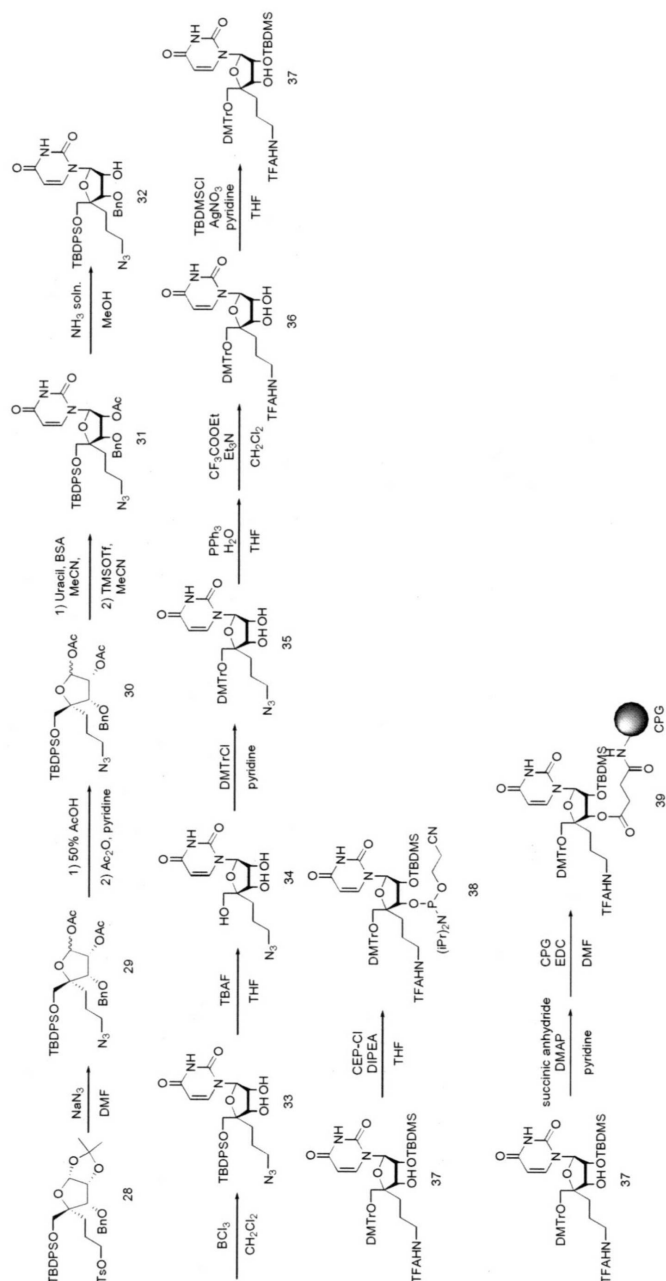
20

30

40

50

【化 1 2】



【0166】

5-O-[(1,1-dimethylethyl)diphenylsilyl]-4-C-azidopropyl-3-O-benzyl-1,2-O-(1-methylethylidene)- α -D-ribofuranose 29

5-O-[(1,1-dimethylethyl)diphenylsilyl]-4-C-[[[4-methylphenyl)sulfonyl]oxy]propyl-3-O-benzyl-1,2-O-(1-methylethylidene)- α -D-ribofuranose (8.82 g, 12.1 mmol) のジメチルホルムアミド (DMF) 溶液 (90 mL) に、アルゴン雰囲気下でアジ化ナトリウム (NaN_3) (6.59 g, 101 mmol) を加え、60°Cで一晩攪拌した。反応混合物の酢酸エチル溶液を飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、ろ過し、減圧下濃縮した。残渣はシリカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘキサン-酢酸エチル] で精製した。

10

20

30

40

50

ル、15:1、v/v]により精製し、目的物29 (5.98 g, 9.94 mmol, 82%)を得た。無色油状であった。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 0.98 (s, 9H, TBDPS), 1.36 (s, 3H, CH₃), 1.35-1.41 (m, 1H, 4-(C)-CH), 1.55-1.57 (m, 1H, 4-(C)-CH), 1.62 (s, 3H, CH₃), 1.73-1.78 (m, 1H, 4-(C-CH₂)-CH), 2.09-2.13 (m, 1H, 4-(C-CH₂)-CH), 3.18-3.23 (m, 2H, 4-(C-CH₂-CH₂)-CH₂), 3.41 (d, J = 11.0 Hz, 1H, 5-H), 3.65 (d, J = 11.0 Hz, 1H, 5-H), 4.30 (d, J = 5.48 Hz, 1H, 3-H), 4.59 (d, J = 12.4 Hz, 1H, Bn), 4.67 (dd, J = 5.52 Hz and 3.64 Hz, 1H, 2-H), 4.82 (d, J = 12.4 Hz, 1H, Bn), 5.79 (d, J = 3.68 Hz, 1H, 1-H), 7.30-7.46 (m, 10H, TBDPS), 7.59-7.64 (m, 5H, Bn)

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ : 19.33, 23.28, 26.32, 26.92, 29.03, 52.19, 66.46, 72.55, 78.12, 79.45, 87.53, 104.30, 113.32, 127.86, 127.88, 128.58, 129.85, 129.93, 132.99, 133.29, 135.68, 135.77, 138.05

HRMS (ESI) m/z Calcd for C₃₄H₄₃N₃O₅SiNa (M+Na)⁺ ; 624.28697 found 624.28993

[0167]

5-O-[(1,1-dimethylethyl)diphenylsilyl]-4-C-azidopropyl-3-O-benzyl-1,2-di-O-acetyl-α-D-ribofuranose 30

5-O-[(1,1-dimethylethyl)diphenylsilyl]-4-C-azidopropyl-3-O-benzyl-1,2-O-(1-methylethylidene)-α-D-ribofuranose (0.40 g, 0.665 mmol) に50% 酢酸 (5.70 mL) を加えて溶かし、120℃で1時間加熱還流した。反応混合物をエタノールで共沸して乾燥させ、ピリジン (1.43 mL, 17.7 mmol) と無水酢酸 (Ac₂O) (0.95 mL, 10.2 mmol) を加え、アルゴン雰囲気下、室温で一晩攪拌した。反応混合物を、氷浴中で冷却し、冷水に注いだ後、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和重曹水及び飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、ろ過し、減圧下濃縮した。残渣はシリカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘキサン-酢酸エチル、5:1、v/v] で精製し、目的物30 (0.314 g, 0.486 mmol, 74%)を得た。無色油状であった。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 1.06 (s, 9H, TBDPS), 1.10-1.14 (m, 1H, 4-(C)-CH), 1.54-1.58 (m, 1H, 4-(C)-CH), 1.74-1.77 (m, 1H, 4-(C-CH₂)-CH), 1.82 (s, 3H, CH₃), 1.84-1.90 (m, 1H, 4-(C-CH₂)-CH), 2.10 (s, 3H, CH₃), 3.19-3.23 (m, 2H, 4-(C-CH₂-CH₂)-CH₂), 3.59 (dd, J = 10.6 Hz and 13.3 Hz, 2H, 5-H₂), 4.38 (d, J = 5.52 Hz, 1H, 3-H), 4.54 (d, J = 11.4 Hz, 1H, Bn), 4.60 (d, J = 11.4 Hz, 1H, Bn), 5.36 (d, J = 5.48 Hz, 1H, 2-H), 6.13 (s, 1H, 1-H), 7.27-7.64 (m, 15H, Bn and TBDPS)

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ : 19.48, 20.95, 22.91, 27.05, 29.50, 52.12, 67.42, 73.63, 74.93, 79.26, 88.12, 97.87, 127.63, 127.74, 127.91, 127.97, 130.08, 132.88, 133.20, 135.66, 135.76, 169.45, 169.90

HRMS (ESI) m/z Calcd for C₃₅H₄₃N₃O₇SiNa (M+Na)⁺ ; 668.27680 found 668.27474

[0168]

5'-O-[(1,1-dimethylethyl)diphenylsilyl]-4'-C-azidopropyl-3'-O-benzyl-2'-O-acetyluridine 31

5-O-[(1,1-dimethylethyl)diphenylsilyl]-4-C-azidopropyl-3-O-benzyl-1,2-di-O-acetyl-α-D-ribofuranose (2.76 g, 4.27 mmol) のアセトニトリル溶液 (28 mL) に、アルゴン雰囲気下でウラシル (0.957 g, 8.54 mmol) とN,O-ビス(トリメチルシリル)アセトアミド (BSA) (11.1 mL, 34.2 mmol) を加え、95℃で1時間加熱還流した。これを0℃に冷却し、トリフルオロメタンスルホン酸トリメチルシリル (TMSOTf) (1.55 mL, 8.54 mmol) を慎重に滴下した。再度95℃で15分加熱還流した後、氷浴中で冷却し、飽和重曹水を加えた。反応混合物をクロロホルムで抽出し、有機層を飽和重曹水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、ろ過し、減圧下濃縮した。残渣はシリカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘキサン-酢酸エチル、2:1、v/v] で精製し、目的物31

(2.27 g, 3.26 mmol, 76%) を得た。

【0169】

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 1.09 (s, 9H, TBDPS), 1.45-1.51 (m, 2H, 4'-(C)-CH₂), 1.64-1.69 (m, 1H, 4'-(C-CH₂)-CH), 1.82-1.89 (m, 1H, 4'-(C-CH₂)-CH), 2.11 (s, 3H, CH₃), 3.18-3.24 (m, 2H, 4'-(C-CH₂-CH₂)-CH₂), 3.56 (d, J = 11.4 Hz, 1H, 5'-H), 3.84 (d, J = 10.9 Hz, 1H, 5'-H), 4.39-4.44 (m, 2H, 3'-H and Bn), 4.61 (d, J = 11.0 Hz, 1H, Bn), 5.32-5.48 (m, 2H, 2'-H and 6-H), 6.18 (d, J = 5.04 Hz, 1H, 1'-H), 7.28-7.57 (m, 15H, Bn and TBDPS), 7.67 (d, J = 8.24 Hz, 1H, 5-H), 8.66 (s, 1H, 3-NH)

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ : 19.46, 20.90, 23.01, 23.12, 26.96, 27.17, 29.18, 51.88, 66.51, 74.63, 75.09, 77.76, 86.30, 88.18, 103.03, 128.01, 128.07, 128.20, 128.25, 128.68, 130.34, 130.46, 131.96, 132.68, 135.45, 135.68, 135.77, 137.30, 139.83, 150.28, 162.84, 170.17

HRMS (ESI) m/z Calcd for C₃₇H₄₃N₅O₇SiNa (M+Na)⁺ ; 720.28294 found 720.28484

【0170】

5'-O-[(1,1-dimethylethyl)diphenylsilyl]-4'-C-azidopropyl-3'-O-benzyluridine 32

5'-O-[(1,1-dimethylethyl)diphenylsilyl]-4'-C-azidoepropyl-3'-O-benzyl-2'-O-acetyluridine (1.57 g, 2.24 mmol) にアンモニア水 (16 mL) とメタノール (16 mL) を加え、室温で一晩攪拌した。反応混合物にエタノールを加え、減圧下濃縮した。残渣はシリカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘキサン-酢酸エチル、2:1、v/v] で精製し、目的物 32 (1.44 g, 2.19 mmol, 98%) を得た。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 1.09 (s, 9H, TBDPS), 1.37-1.41 (m, 1H, 4'-(C)-CH), 1.51-1.55 (m, 1H, 4'-(C)-CH), 1.61-1.68 (m, 1H, 4'-(C-CH₂)-CH), 1.85-1.89 (m, 1H, 4'-(C-CH₂)-CH), 3.13-3.19 (m, 2H, 4'-(C-CH₂-CH₂)-CH₂), 3.55 (d, J = 11.0 Hz, 1H, 5'-H), 3.60 (d, J = 7.80 Hz, 1H, 2'-OH), 3.78 (d, J = 11.0 Hz, 1H, 5'-H), 4.19 (d, J = 5.96 Hz, 1H, 3'-H), 4.29 (dd, J = 5.96 Hz and 12.36 Hz, 1H, 2'-H), 4.59 (d, J = 11.4 Hz, 1H, Bn), 4.74 (d, J = 11.5 Hz, 1H, Bn), 5.39 (d, J = 8.24 Hz, 1H, 6-H), 5.94 (d, J = 5.52 Hz, 1H, 1'-H), 7.34-7.60 (m, 15H, Bn and TBDPS), 7.69 (d, J = 7.80 Hz, 1H, 5-H), 9.37 (s, 1H, 3-NH)

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ : 19.42, 22.99, 27.16, 29.36, 51.92, 66.76, 74.66, 75.15, 78.84, 87.92, 88.94, 102.80, 128.17, 128.21, 128.31, 128.45, 128.78, 130.32, 130.42, 132.05, 132.64, 135.45, 135.73, 137.12, 139.95, 151.00, 163.16

HRMS (ESI) m/z Calcd for C₃₅H₄₁N₅O₆SiNa (M+Na)⁺ ; 678.27238 found 678.27027

【0171】

5'-O-[(1,1-dimethylethyl)diphenylsilyl]-4'-C-azidopropyluridine 33

5'-O-[(1,1-dimethylethyl)diphenylsilyl]-4'-C-azidopropyl-3'-O-benzyluridine (1.80 g, 2.74 mmol) のジクロロメタン溶液 (72 mL) を、アルゴン雰囲気下、-78℃まで冷却し、1 M 三塩化ホウ素ジクロロメタン溶液 (16.4 mL, 16.4 mmol) を加えて3時間攪拌した。その後-30℃に昇温して3時間攪拌した。反応混合物にジクロロメタン-メタノール (1:1、v/v、40 mL) を加え、減圧下濃縮した。残渣はシリカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘキサン-酢酸エチル、2:3、v/v] で精製し、目的物 33 (1.31 g, 2.32 mmol, 85%) を得た。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 1.08 (s, 9H, TBDPS), 1.52-1.71 (m, 3H, 4'-(C)-CH₂-CH), 1.87-1.98 (m, 1H, 4'-(C-CH₂)-CH), 3.20-3.27 (m, 2H, 4'-(C-CH₂-CH₂)-CH₂), 3.39 (s, 1H, 3'-OH), 3.66 (d, J = 11.0 Hz, 1H, 5'-H), 3.77 (d, J = 11.5 Hz, 1H, 5'-H), 4.32-4.36 (m, 1H, 3'-H), 4.38-4.42 (m, 1H, 2'-H), 5.15

(s, 1H, 2'-OH), 5.39 (d, J = 7.8 Hz, 1H, 6-H), 5.94 (d, J = 5.48 Hz, 1H, 1'-H), 7.39-7.66 (m, 10H, TBDPS), 7.77 (d, J = 8.24 Hz, 1H, 5-H), 10.24 (s, 1H, 3-NH)
¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ : 19.42, 23.33, 27.14, 29.14, 51.88, 67.01, 72.23, 76.21, 89.57, 102.51, 128.22, 130.33, 130.43, 132.03, 132.65, 135.51, 135.74, 140.32, 151.81, 163.70

HRMS (ESI) m/z Calcd for C₂₈H₃₅N₅O₆SiNa (M+Na)⁺ ; 588.22543 found 588.22729

【0172】

4'-C-azidopropyluridine 34

5'-O-[(1,1-dimethylethyl)diphenylsilyl]-4'-C-azidopropyluridine (2.07 g, 3.66 mmol) のテトラヒドロフラン溶液 (21.0 mL) に、アルゴン雰囲気下で1 M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 (TBAF) (5.49 mL, 5.49 mmol) を加え、室温で一晩攪拌した。その後、溶媒を減圧下濃縮し、残渣を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、5:1、v/v] で精製し、目的物34 (1.16 g, 3.55 mmol, 97%) を得た。無色非晶質であった。

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ : 1.52-1.68 (m, 4H, 4'-(C)-CH₂-CH₂), 3.26-3.35 (m, 2H, 4'-(C-CH₂-CH₂)-CH₂), 3.42-3.49 (m, 2H, 5'-H₂), 3.94-3.96 (m, 1H, 3'-H), 4.21-4.22 (m, 1H, 2'-H), 5.07 (d, J = 4.60 Hz, 1H, 3'-OH), 5.15 (s, 1H, 5'-OH), 5.24 (d, J = 6.44 Hz, 1H, 2'-OH), 5.65 (d, J = 8.24 Hz, 1H, 6-H), 5.80 (d, J = 7.80 Hz, 1H, 1'-H), 7.83 (d, J = 8.24 Hz, 1H, 5-H), 11.28 (s, 1H, 3-NH)

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆) δ : 22.87, 29.32, 51.41, 64.60, 71.85, 73.29, 86.05, 87.48, 102.18, 140.90, 151.07, 163.10

HRMS (ESI) m/z Calcd for C₁₂H₁₇N₅O₆Na (M+Na)⁺ ; 350.10765 found 350.10522

【0173】

5'-O-[bis(4-methoxyphenyl)phenylmethyl]-4'-C-azidopropyluridine 35

4'-C-azidopropyluridine (0.30 g, 0.917 mmol) のピリジン溶液 (3.0 mL) に、アルゴン雰囲気下で4,4'-ジメトキシトリチルクロリド (DMTrCl) (0.497 g, 1.47 mmol) を加え、室温で5.5時間攪拌した。反応混合物を酢酸エチルで抽出し、有機層を飽和重曹水及び飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、ろ過し、減圧下濃縮した。残渣はシリカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘキサン-酢酸エチル、1:1、v/v] で精製し、目的物35 (0.331 g, 0.526 mmol, 57%) を得た。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 1.46-1.56 (m, 2H, 4'-(C)-CH₂), 1.70-1.78 (m, 1H, 4'-(C-CH₂)-CH), 1.87-1.94 (m, 1H, 4'-(C-CH₂)-CH), 3.21-3.24 (m, 2H, 4'-(C-CH₂-CH₂)-CH₂), 3.27 (s, 2H, 5'-H₂), 3.41 (d, J = 4.12 Hz, 1H, 3'-H), 3.78 (s, 6H, DMTr), 4.42 (d, J = 4.12 Hz, 1H, 2'-H), 4.45 (s, 1H, 3'-OH), 5.15 (s, 1H, 2'-OH), 5.39 (d, J = 7.80 Hz, 1H, 6-H), 5.91 (d, J = 5.04 Hz, 1H, 1'-H), 6.85-7.31 (m, 13H, DMTr), 7.74 (d, J = 8.28 Hz, 1H, 5-H), 10.12 (s, 1H, 3-NH)
¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ : 23.24, 29.60, 51.83, 55.36, 65.89, 72.52, 76.16, 87.40, 89.01, 89.85, 102.42, 113.43, 127.32, 128.19, 130.24, 135.01, 135.15, 140.51, 144.19, 151.74, 158.80, 163.72

HRMS (ESI) m/z Calcd for C₃₃H₃₅N₅O₈Na (M+Na)⁺ ; 652.23833 found 652.23622

【0174】

5'-O-[bis(4-methoxyphenyl)phenylmethyl]-4'-C-trifluoroacetylaminopropyluridine 36

5'-O-[bis(4-methoxyphenyl)phenylmethyl]-4'-C-azidopropyluridine (1.22 g, 1.94 mmol) のテトラヒドロフラン溶液 (35 mL) に、トリフェニルホスフィン (PPh₃) (1.27 g, 4.85 mmol) と水 (1.40 mL, 77.6 mmol) を加え、45℃で8時間攪拌した。反応混合物中のテトラヒドロフランを減圧留去した後、ジクロロメタン溶液 (12 mL) とした。トリフルオロ酢酸エチル (CF₃COOEt) (0.69 mL, 5.82 mmol) とトリエチルアミ

10

20

30

40

50

ン (Et₃N) (0.40 mL, 2.91 mmol) を加え、室温で 2 4 時間攪拌した。反応混合物を酢酸エチルで抽出し、有機層を飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、ろ過し、減圧下濃縮した。残渣はシリカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘキサン-酢酸エチル、1:1、v/v] で精製し、目的物 3 6 (1.09 g, 1.55 mmol, 80%) を得た。
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 1.34-1.55 (m, 4H, 4'-(C)-CH₂-CH₂), 1.68-1.84 (m, 2H, 4'-(C-CH₂-CH₂)-CH₂), 3.23-3.31 (m, 4H, 5'-H₂ and 2'-OH and 3'-OH), 3.77 (s, 6H, DMTr), 4.20-4.26 (m, 1H, -NHCOCF₃), 4.40 (d, J = 5.48 Hz, 1H, 3'-H), 4.53 (t, J = 5.96 Hz, 1H, 2'-H), 5.38 (d, J = 7.80 Hz, 1H, 6-H), 5.98 (d, J = 5.96 Hz, 1H, 1'-H), 6.84-7.38 (m, 13H, DMTr), 7.69 (d, J = 7.80 Hz, 1H, 5-H), 10.35 (s, 1H, 3-NH)
¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ : 11.06, 23.08, 23.81, 29.01, 30.43, 38.79, 55.31, 68.26, 72.78, 75.49, 87.44, 88.51, 88.67, 113.42, 127.30, 128.17, 128.90, 130.21, 131.02, 134.93, 135.08, 144.14, 151.83, 158.78, 163.86
 HRMS (ESI) m/z Calcd for C₃₅H₃₆F₃N₃O₉Na (M+Na)⁺; 722.23013 found 722.23205

【0175】

5'-O-[bis(4-methoxyphenyl)phenylmethyl]-4'-C-trifluoroacetylaminopropyl-2'-O-[(1,1-dimethylethyl)dimethylsilyl]-uridine 37
 5'-O-[bis(4-methoxyphenyl)phenylmethyl]-4'-C-trifluoroacetylaminopropyluridine (1.36 g, 1.94 mmol) のテトラヒドロフラン溶液 (14 mL) に、アルゴン雰囲気下でピリジン (0.955 mL, 11.8 mmol)、硝酸銀 (AgNO₃) (0.560 g, 3.30 mmol) と *tert*-ブチルジメチルシリルクロリド (TBDMSCl) (0.526 g, 3.49 mmol) を加えて室温で 4 時間攪拌した。反応混合物をクロロホルムで希釈後、セライトで濾過し、減圧下濃縮した。残渣はシリカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘキサン-酢酸エチル、3:2、v/v] で精製し、目的物 3 7 (1.34 g, 1.64 mmol, 85%) を得た。無色非晶質であった。
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 0.0547 (s, 3H, TBDMS), 0.119 (s, 3H, TBDMS), 0.915 (s, 9H, TBDMS), 1.47-1.57 (m, 4H, 4'-(C)-CH₂-CH₂), 1.69-1.74 (m, 2H, 4'-(C-CH₂-CH₂)-CH₂), 3.05 (s, 1H, 3'-OH), 3.22-3.25 (m, 2H, 5'-H₂), 3.31-3.34 (m, 1H, -NHCOCF₃), 3.81 (s, 6H, DMTr), 4.26 (d, J = 5.52 Hz, 1H, 3'-H), 4.62 (dd, J = 5.52 Hz and 6.84 Hz, 1H, 2'-H), 5.33 (d, J = 8.28 Hz, 1H, 6-H), 6.04 (d, J = 7.32 Hz, 1H, 1'-H), 6.84-7.32 (m, 13H, DMTr), 7.71 (d, J = 8.24 Hz, 1H, 5-H), 8.11 (s, 1H, 3-NH)
¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ : 18.01, 22.93, 25.61, 30.26, 40.27, 55.40, 67.43, 73.12, 75.88, 86.89, 87.96, 102.96, 113.53, 127.54, 128.16, 128.28, 130.19, 130.30, 134.63, 134.80, 140.36, 144.08, 150.49, 157.55, 158.98, 162.82
 HRMS (ESI) m/z Calcd for C₄₁H₅₀F₃N₃O₉SiNa (M+Na)⁺; 836.31661 found 836.31586

【0176】

5'-O-[bis(4-methoxyphenyl)phenylmethyl]-4'-C-trifluoroaminopropyl-2'-O-[(1,1-dimethylethyl)dimethylsilyl]-3'-[2-cyanoethyl-N,N-bis(1-methylethyl)-phosphoramidite]-uridine 38
 5'-O-[bis(4-methoxyphenyl)phenylmethyl]-4'-C-trifluoroacetylaminopropyl-2'-O-[(1,1-dimethylethyl)dimethylsilyl]-uridine (1.13 g, 1.39 mmol) のテトラヒドロフラン溶液 (11 mL) に、アルゴン雰囲気下でジイソプロピルエチルアミン (DIPEA) (1.21 mL, 6.95 mmol) とクロロ(ジイソプロピルアミノ)亜ホスフィン酸-2-シアノエチル (CEP-Cl) (0.620 mL, 2.78 mmol) を加えて室温で 1.5 時間攪拌した。反応混合物を酢酸エチルで抽出し、有機層を飽和重曹水及び飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、ろ過し、減圧下濃縮した。残渣はシリカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘキサン-酢酸エチル、1:2、v/v] で精製し、目的物 3 8 (1.25 g, 1.23 mmol, 88%) を得た。

^{31}P NMR (202 MHz, CDCl_3) δ : 149.4626, 151.1583

HRMS (ESI) m/z Calcd for $\text{C}_{50}\text{H}_{67}\text{F}_3\text{N}_5\text{O}_{10}\text{PSiNa}$ ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$; 1036.42446 found 1036.42397

【0177】

5'-O-[bis(4-methoxyphenyl)phenylmethyl]-4'-C-trifluoroacetylaminopropyl-2'-O-[(1,1-dimethylethyl)dimethylsilyl]-uridine 担持CPG 担体 39

5'-O-[bis(4-methoxyphenyl)phenylmethyl]-4'-C-trifluoroacetylaminopropyl-2'-O-[(1,1-dimethylethyl)dimethylsilyl]-uridine (0.163 g, 0.20 mmol) のピリジン溶液 (1.7 mL) に、アルゴン雰囲気下でN,N-ジメチル-4-アミノピリジン (DMAP) (48.9 mg, 0.40 mmol) と無水コハク酸 (80.1 mg, 0.80 mmol) を加えて室温で23時間攪拌した。反応混合物を酢酸エチルで抽出し、有機層を飽和重曹水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、ろ過し、減圧下濃縮した。残渣にジメチルホルムアミド (1.98 mL) を加えて溶かし、定孔ガラス (controlled pore glass:CPG) (0.326 g) と1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩 (EDC) (38.0 mg, 0.198 mmol) を加えて5日間振盪した。CPGをフィルターで濾別し、ピリジンで洗浄後、アルゴン雰囲気下でDMAP (0.183 g)、ピリジン (13.5 mL) と無水酢酸 (1.5 mL) を加えて16時間静置した。CPGを濾別し、ピリジン、エタノール及びアセトニトリルで洗浄後乾燥させ、目的物39 (活性: 40.8 $\mu\text{mol/g}$) を得た。

【0178】

(5) 2'-OMe-4'-アミノプロピルアミダイトユニット及び樹脂体

以下のスキームに従い、2'-OMe-4'-アミノプロピルアミダイトユニット及び樹脂体を合成した。

【0179】

10

20

30

40

50

32 $\xrightarrow[\text{THF}]{\text{TBDFSO, MeI, NaH}}$ 40 $\xrightarrow[\text{CH}_2\text{Cl}_2]{\text{BCl}_3}$ 43 $\xrightarrow[\text{pyridine}]{\text{DMT-Cl}}$ 45 $\xrightarrow[\text{THF}]{\text{TBAF}}$ 46

40 $\xrightarrow[\text{THF}]{\text{CF}_3\text{COOEt, Et}_3\text{N}}$ 44 $\xrightarrow[\text{THF}]{\text{PPh}_3, \text{H}_2\text{O}}$ 45

44 $\xrightarrow[\text{pyridine}]{\text{succinic anhydride, DMAP}}$ 46 $\xrightarrow[\text{DMF}]{\text{CPG, EDC}}$ 46

50

シリカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘキサン-酢酸エチル、3:1、v/v] で精製し、目的物 40 (4.00 g, 5.98 mmol, 74%) を得た。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 1.08 (s, 9H, TBDPS), 1.39-1.46 (m, 1H, 4'-(C)-CH), 1.52-1.60 (m, 1H, 4'-(C)-CH), 1.65-1.70 (m, 1H, 4'-(C-CH₂)-CH), 1.97-2.05 (m, 1H, 4'-(C-CH₂)-CH), 3.19-3.26 (m, 2H, 4'-(C-CH₂-CH₂)-CH₂), 3.51 (s, 3H, 2'-OCH₃), 3.68 (d, J = 11.5 Hz, 1H, 5'-H), 3.74 (m, 1H, 2'-H), 3.95 (d, J = 11.5 Hz, 1H, 5'-H), 4.35 (d, J = 4.60 Hz, 1H, 3'-H), 4.52 (d, J = 11.5 Hz, 1H, Bn), 4.73 (d, J = 11.9 Hz, 1H, Bn), 5.12 (d, J = 8.24 Hz, 1H, 6-H), 6.09 (s, 1H, 1'-H), 7.35-7.63 (m, 15H, Bn and TBDPS), 7.78 (d, J = 8.24 Hz, 1H, 5-H), 9.04 (s, 1H, 3-NH)

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ : 19.56, 22.84, 27.26, 29.00, 51.85, 59.44, 65.37, 73.25, 75.93, 84.19, 87.95, 88.06, 102.59, 128.02, 128.09, 128.14, 128.25, 128.69, 130.29, 130.39, 132.07, 132.99, 135.36, 135.60, 137.49, 140.03, 150.09, 163.16

【0181】

5'-O-[(1,1-dimethylethyl)diphenylsilyl]-4'-C-azidopropyl-2'-O-methyluridine 41

5'-O-[(1,1-dimethylethyl)diphenylsilyl]-4'-C-azidopropyl-3'-O-benzyl-2'-O-methyluridine (4.00 g, 5.98 mmol) のジクロロメタン溶液 (60 mL) を、アルゴン雰囲気下、-78℃まで冷却し、1 M 三塩化ホウ素ジクロロメタン溶液 (35.9 mL, 35.9 mmol) を加えて3時間攪拌した。その後-30℃に昇温して5時間攪拌した。反応混合物にジクロロメタン-メタノール (1:1、v/v、100 mL) を加え、減圧下濃縮した。残渣はシリカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘキサン-酢酸エチル、1:1、v/v] で精製し、目的物 41 (2.99 g, 5.16 mmol, 86%) を得た。

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 1.11 (s, 9H, TBDPS), 1.49-1.56 (m, 2H, 4'-(C)-CH₂), 1.58-1.64 (m, 1H, 4'-(C-CH₂)-CH), 1.76-1.80 (m, 1H, 4'-(C-CH₂)-CH), 2.74 (d, J = 5.52 Hz, 1H, 3'-OH), 3.21-3.25 (m, 2H, 4'-(C-CH₂-CH₂)-CH₂), 3.52 (s, 3H, 2'-OCH₃), 3.70 (d, J = 11.0 Hz, 1H, 5'-H), 3.88 (d, J = 11.0 Hz, 1H, 5'-H), 3.93 (m, 1H, 2'-H), 4.49 (t, J = 5.46 Hz, 1H, 3'-H), 5.31 (d, J = 8.28 Hz, 1H, 6-H), 6.06 (d, J = 4.80 Hz, 1H, 1'-H), 7.41-7.66 (m, 10H, TBDPS), 7.08 (d, J = 7.56 Hz, 1H, 5-H), 8.04 (s, 1H, 3-NH)

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ : 19.52, 23.10, 27.21, 28.98, 51.86, 59.37, 66.76, 70.09, 84.61, 86.50, 88.46, 102.90, 128.22, 128.27, 130.39, 130.48, 131.96, 132.81, 135.41, 135.70, 140.01, 150.37, 163.12

【0182】

4'-C-azidopropyl-2'-O-methyluridine 42

5'-O-[(1,1-dimethylethyl)diphenylsilyl]-4'-C-azidopropyl-2'-O-methyluridine (2.99 g, 5.16 mmol) のテトラヒドロフラン溶液 (30.0 mL) に、アルゴン雰囲気下で1 M 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 (TBAF) (7.74 mL, 7.74 mmol) を加え、室温で一晩攪拌した。その後、溶媒を減圧下濃縮し、残渣を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、10:1、v/v] で精製し、目的物 42 (1.68 g, 4.94 mmol, 96%) を得た。

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ : 1.55-1.67 (m, 4H, 4'-(C)-CH₂-CH₂), 3.27-3.29 (m, 2H, 4'-(C-CH₂-CH₂)-CH₂), 3.32 (s, 3H, 2'-OCH₃), 3.42-3.45 (m, 2H, 5'-H₂), 3.98 (dd, J = 7.56 Hz and 4.80 Hz, 1H, 2'-H), 4.16 (t, J = 5.46 Hz, 1H, 3'-H), 5.13 (d, J = 6.18 Hz, 1H, 3'-OH), 5.20 (d, J = 5.46 Hz, 1H, 5'-OH), 5.67 (d, J = 8.28 Hz, 1H, 6-H), 5.90 (d, J = 6.84 Hz, 1H, 1'-H), 7.89 (d, J = 8.22 Hz, 1H, 5-H), 11.34 (s, 1H, 3-NH)

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆) δ : 22.77, 29.13, 51.33, 57.32, 64.24, 69.61, 82.45, 84.68, 88.00, 102.27, 140.67, 150.74, 162.95

【0183】

5'-O-[bis(4-methoxyphenyl)phenylmethyl]-4'-C-azidopropyl-2'-O-methyluridine 43

4'-C-azidopropyl-2'-O-methyluridine (1.68 g, 4.94 mmol) のピリジン溶液 (17 mL) に、アルゴン雰囲気下で4,4'-ジメトキシトリチルクロリド (DMTrCl) (2.51 g, 7.41 mmol) を加え、室温で5時間攪拌した。反応混合物を酢酸エチルで抽出し、有機層を飽和重曹水及び飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、ろ過し、減圧下濃縮した。残渣はシリカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘキサン-酢酸エチル、2:1、v/v] で精製し、目的物 43 (3.12 g, 4.85 mmol, 98%) を得た。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 1.38-1.44 (m, 1H, 4'-(C)-CH), 1.54-1.64 (m, 2H, 4'-(C)-CH-CH), 1.78-1.84 (m, 1H, 4'-(C-CH₂)-CH), 2.77 (d, J = 6.44 Hz, 1H, 3'-OH), 3.17-3.22 (m, 2H, 4'-(C-CH₂-CH₂)-CH₂), 3.34 (s, 2H, 5'-H₂), 3.57 (s, 3H, 2'-OCH₃), 3.80 (s, 6H, DMTr), 3.92 (dd, J = 4.12 Hz and 5.96 Hz, 1H, 2'-H), 4.60 (t, J = 5.96 Hz, 1H, 3'-H), 5.22 (d, J = 8.24 Hz, 1H, 6-H), 6.02 (d, J = 4.12 Hz, 1H, 1'-H), 6.84-7.36 (m, 13H, DMTr), 7.82 (d, J = 8.24 Hz, 1H, 5-H), 8.09 (s, 1H, 3-NH)

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ : 14.33, 23.00, 29.32, 51.82, 55.40, 59.50, 60.52, 65.42, 70.55, 84.72, 86.84, 87.63, 87.98, 102.67, 113.48, 127.43, 128.19, 128.33, 130.29, 130.34, 134.96, 135.18, 140.33, 144.26, 150.28, 158.94, 158.99, 163.10

【0184】

5'-O-[bis(4-methoxyphenyl)phenylmethyl]-4'-C-trifluoroacetylaminopropyl-2'-O-methyluridine 44

5'-O-[bis(4-methoxyphenyl)phenylmethyl]-4'-C-azidopropyl-2'-O-methyluridine (3.12 g, 4.85 mmol) のテトラヒドロフラン溶液 (62.4 mL) に、トリフェニルホスフィン(PPh₃) (3.18 g, 12.1 mmol) と水 (3.50 mL, 194 mmol) を加え、45℃で20時間攪拌した。反応混合物中のテトラヒドロフランを減圧留去した後、ジクロロメタン溶液 (30 mL) とした。トリフルオロ酢酸エチル(CF₃COOEt) (1.74 mL, 14.5 mmol) とトリエチルアミン (Et₃N) (1.00 mL, 7.28 mmol) を加え、室温で24時間攪拌した。反応混合物を酢酸エチルで抽出し、有機層を飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、ろ過し、減圧下濃縮した。残渣はシリカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘキサン-酢酸エチル、1:1、v/v] で精製し、目的物 44 を定量的に得た。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 1.40-1.45 (m, 1H, 4'-(C)-CH), 1.51-1.54 (m, 1H, 4'-(C)-CH), 1.63-1.67 (m, 1H, 4'-(C-CH₂)-CH), 1.72-1.78 (m, 1H, 4'-(C-CH₂)-CH), 2.88 (d, J = 4.56 Hz, 1H, 3'-OH), 3.25-3.28 (m, 2H, 4'-(C-CH₂-CH₂)-CH₂), 3.30 (d, J = 10.5 Hz, 1H, 5'-H), 3.35 (d, J = 10.1 Hz, 1H, 5'-H), 3.54 (s, 3H, 2'-OCH₃), 3.80 (s, 6H, DMTr), 4.03 (t, J = 5.04 Hz, 1H, 2'-H), 4.54 (t, J = 5.04 Hz, 1H, 3'-H), 5.26 (d, J = 8.24 Hz, 1H, 6-H), 6.03 (d, J = 5.04 Hz, 1H, 1'-H), 6.66 (m, 1H, -NHCOCF₃), 6.84-7.55 (m, 13H, DMTr), 7.74 (d, J = 8.24 Hz, 1H, 5-H), 8.17 (s, 1H, 3-NH)

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ : 14.32, 22.78, 29.38, 40.20, 55.38, 59.30, 60.52, 65.89, 70.75, 84.28, 86.43, 87.71, 87.97, 102.79, 113.48, 127.45, 128.21, 128.28, 130.26, 130.32, 132.07, 133.11, 134.81, 135.03, 140.24, 144.14, 150.39, 158.94, 158.99, 163.03

【0185】

5'-O-[bis(4-methoxyphenyl)phenylmethyl]-4'-C-trifluoroaminopropyl-2'-O-methyl-3'-[2-cyanoethyl-N,N-bis(1-methylethyl)-phosphoramidite]-uridine 45
5'-O-[bis(4-methoxyphenyl)phenylmethyl]-4'-C-trifluoroacetylaminopropyl-2'-O-methyluridine (1.55 g, 2.17 mmol) のテトラヒドロフラン溶液 (15 mL) に、アルゴン雰囲気下でジイソプロピルエチルアミン (DIPEA) (1.90 mL, 10.9 mmol) とク

ロロ(ジイソプロピルアミノ)亜ホスフィン酸-2-シアノエチル (CEP-Cl) (0.97 mL, 4.34 mmol) を加えて室温で1.5時間攪拌した。反応混合物を酢酸エチルで抽出し、有機層を飽和重曹水及び飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、ろ過し、減圧下濃縮した。残渣はシリカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘキサン-酢酸エチル、1:1、v/v] で精製し、目的物45 (1.57 g, 1.71 mmol, 79%) を得た。

^{31}P NMR (243 MHz, CDCl_3) δ : 150.57, 151.44

【0186】

5'-O-[bis(4-methoxyphenyl)phenylmethyl]-4'-C-trifluoroacetylaminopropyl-2'-O-methyluridine 担持CPG 担体 46

5'-O-[bis(4-methoxyphenyl)phenylmethyl]-4'-C-trifluoroacetylaminopropyl-2'-O-methyluridine (0.142 g, 0.20 mmol) のピリジン溶液 (1.4 mL) に、アルゴン雰囲気下でN,N-ジメチル-4-アミノピリジン (DMAP) (48.9 mg, 0.40 mmol) と無水コハク酸 (80.1 mg, 0.80 mmol) を加えて室温で24時間攪拌した。反応混合物を酢酸エチルで抽出し、有機層を飽和重曹水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、ろ過し、減圧下濃縮した。残渣にジメチルホルムアミド (2.0 mL) を加えて溶かし、定孔ガラス (controlled pore glass:CPG) (0.373 g) と1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩 (EDC) (38.3 mg, 0.20 mmol) を加えて4日間振盪した。CPGをフィルターで濾別し、ピリジンで洗浄後、アルゴン雰囲気下でDMAP (0.183 g)、ピリジン (13.5 mL) と無水酢酸 (1.5 mL) を加えて16時間静置した。CPGを濾別し、ピリジン、エタノール及びアセトニトリルで洗浄後乾燥させ、目的物46 (活性 : 35.8 $\mu\text{mol/g}$) を得た。

【0187】

(6) 2'-OMe-4' グアニジノメチルアミダイトユニット及び樹脂体

以下のスキームに従い、2'-OH-4' グアニジノメチルアミダイトユニット及び樹脂体を合成した。

【0188】

10

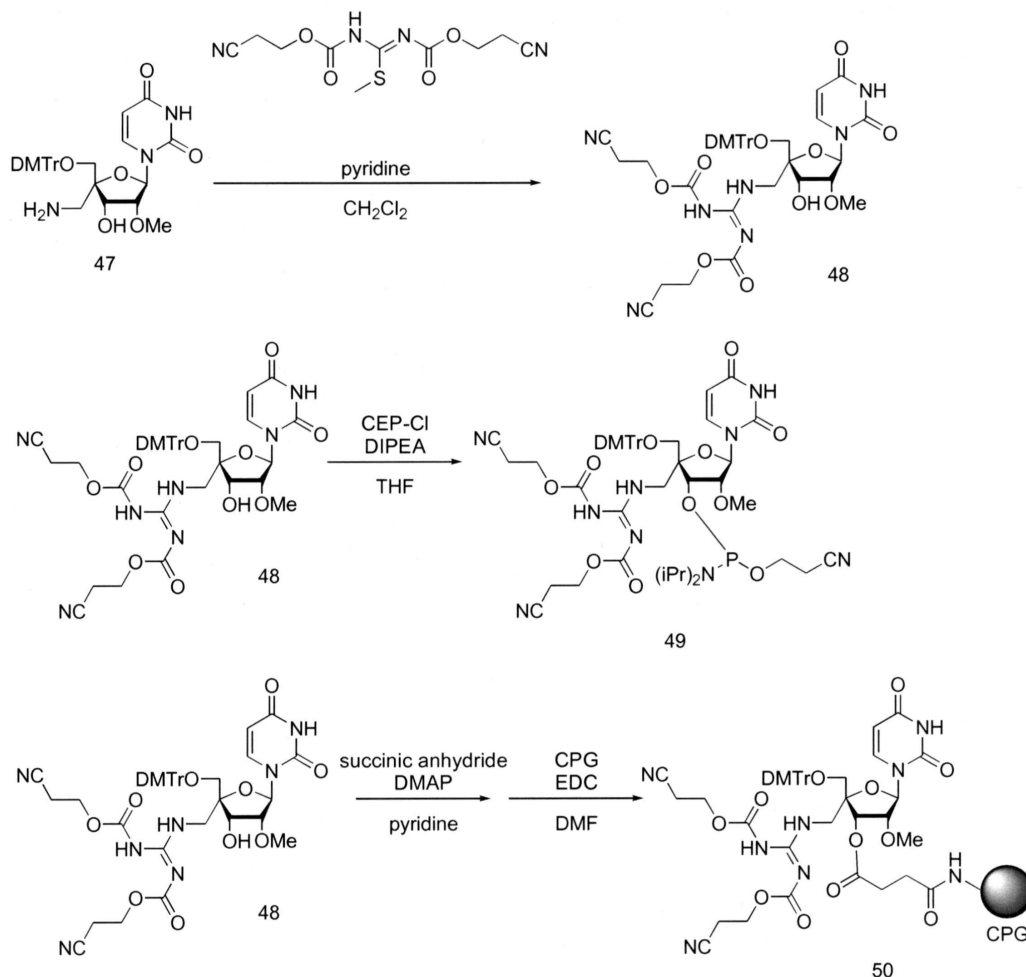
20

30

40

50

【化 14】



【0189】

5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-4'-C-aminomethyl-2'-O-methyluridine 47
グルコースを出発原料とし、既存の手法を用いて目的物 47 を合成した。

【0190】

5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-4'-C-[N,N'-bis-[(2-cyanoethoxy)carbonyl]guanidiny]-2'-O-methyluridine 48

5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-4'-C-aminomethyl-2'-O-methyluridine (0.40 g, 0.679 mmol) のジクロロメタン溶液 (4.0 mL) に、アルゴン雰囲気下で活性化した 3 Å モレキュラーシーブスを加えて 15 分間攪拌。これに N,N'-Bis-[(2-cyanoethoxy)carbonyl]-S-methyl-isothiourea (0.463 g, 2.4 mmol) のピリジン溶液 (0.263 mL, 3.26 mmol) を加え、40℃で2時間加熱還流した。反応混合物を酢酸エチルで抽出し、有機層を飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、ろ過し、減圧下濃縮した。残渣はシリカゲルカラムクロマトグラフィー [酢酸エチル] で精製し、目的物 48 (0.35 g, 0.423 mmol, 62%) を得た。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.88 (1H, s), 2.72 (2H, t, $J=6.84$ Hz), 2.80 (2H, t, $J=6.44$ Hz), 3.36 (1H, s, $J=10.5$ Hz), 3.41 (1H, d, $J=11.0$ Hz), 3.54 (3H, s), 3.69 (1H, dd, $J=5.96$ Hz), 3.83 (6H, s), 3.87 (1H, dd, $J=7.8$ Hz), 3.99 (1H, m), 4.3 (2H, t, $J=6.44$ Hz), 4.42-4.44 (2H, m), 4.56 (1H, t, $J=5.92$ Hz), 5.35 (1H, d, $J=6.88$ Hz), 6.10 (1H, d, $J=4.12$ Hz), 6.85 (4H, d, $J=8.28$ Hz), 7.26-7.37 (7H, m), 7.64 (1H, d, $J=8.24$ Hz), 8.65 (1H, t, $J=5.96$ Hz), 9.48 (1H, s), 11.63 (1H, s)

【0191】

5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-4'-C-[N,N'-bis[(2-cyanoethoxy)carbonyl]guani

dinyl]methyl-2'-O-methyl-3'-[2-cyanoethyl-N,N-bis(1-methylethyl)-phosphoramidite]-uridine 49

5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-4'-C-[N,N'-bis-[(2-cyanoethoxy)carbonyl]guanidiny]-2'-O-methyluridine (0.35 g, 0.423 mmol) のテトラヒドロフラン溶液 (3.5 mL) に、アルゴン雰囲気下でジイソプロピルエチルアミン (DIPEA) (0.37 mL, 2.12 mmol) とクロロ(ジイソプロピルアミノ)亜ホスフィン酸-2-シアノエチル (CEP-Cl) (0.19 mL, 0.846 mmol) を加えて室温で1.5時間攪拌した。反応混合物をクロロホルムで抽出し、有機層を飽和重曹水及び飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、ろ過し、減圧下濃縮した。残渣はシリカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘキサン-酢酸エチル、1:2、v/v] で精製し、目的物 49 (0.339 g, 0.330 mmol, 78%) を得た。

10

^{31}P NMR (202 MHz, CDCl_3) δ : 151.8312, 152.1004

【0192】

5'-O-[bis(4-methoxyphenyl)phenylmethyl]-4'-C-trifluoroacetylaminopropyl-2'-O-[(1,1-dimethylethyl)dimethylsilyl]-uridine 担持 CPG 担体 50

5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-4'-C-[N,N'-bis-[(2-cyanoethoxy)carbonyl]guanidiny]-2'-O-methyluridine (0.114 g, 0.139 mmol) のピリジン溶液 (1.0 mL) に、アルゴン雰囲気下でN,N-ジメチル-4-アミノピリジン (DMAP) (34.0 mg, 0.278 mmol) と無水コハク酸 (56.0 mg, 0.556 mmol) を加えて室温で2.5時間攪拌した。反応混合物を酢酸エチルで抽出し、有機層を飽和重曹水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、ろ過し、減圧下濃縮した。残渣にジメチルホルムアミド (1.28 mL) を加えて溶かし、定孔ガラス (controlled pore glass:CPG) (0.192 g) と1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩 (EDC) (24.5 mg, 0.128 mmol) を加えて4日間振盪した。CPGをフィルターで濾別し、ピリジンで洗浄後、アルゴン雰囲気下でDMAP (0.183 g)、ピリジン (13.5 mL) と無水酢酸 (1.5 mL) を加えて6.5時間静置した。CPGを濾別し、ピリジン、エタノール及びアセトニトリルで洗浄後乾燥させ、目的物 50 (活性: 41.4 $\mu\text{mol/g}$) を得た。

20

【0193】

(7) 2'-OMe-4'-アミノエチルシトシンアミダイトユニット

以下のスキームに従い、2'-OMe-4'-アミノエチルシトシンアミダイトユニットを合成した。

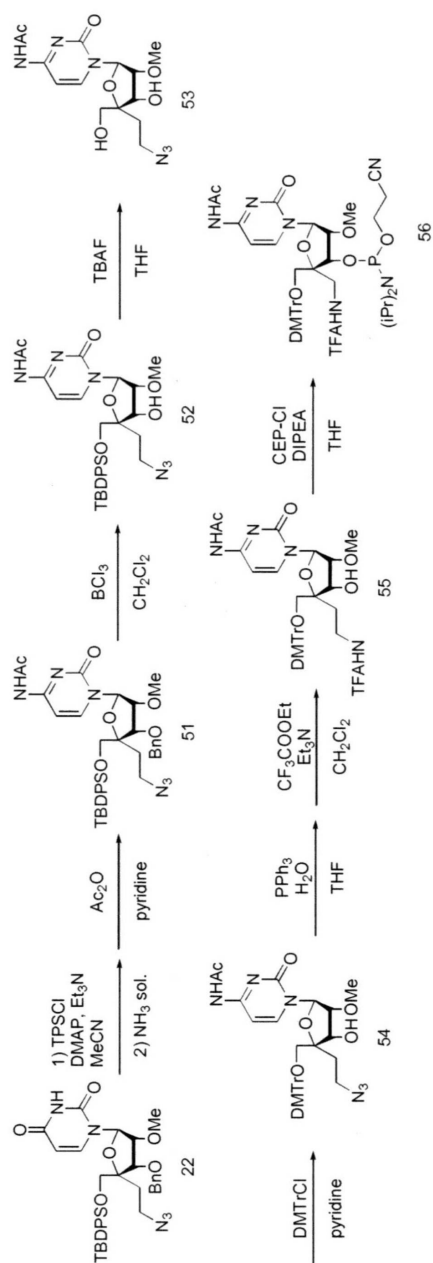
30

【0194】

40

50

【化 15】



【0195】

5'-O-[(1,1-dimethylethyl)diphenylsilyl]-4'-C-azidoethyl-3'-O-benzyl-2'-O-methyl-4-N-acetylcytosine 51

5'-O-[(1,1-dimethylethyl)diphenylsilyl]-4'-C-azidoethyl-3'-O-benzyl-2'-O-methyluridine (623.6 mg, 0.95 mmol) のアセトニトリル溶液 (10 mL) に、アルゴン雰囲気下で、トリエチルアミン (Et₃N) (0.55 mL, 4.0 mmol)、N,N-ジメチル-4-アミノピリジン (DMAP) (367 mg, 3.0 mmol) と2,4,6-トリイソプロピルベンジルスルホン酸クロリド (TPSCl) (606 mg, 3.0 mmol) を加えて1時間攪拌した。反応混合物にアンモニア水 (16 mL) を加え、1.5時間攪拌した。反応混合物を酢酸エチルで抽出し、有

機層を飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、ろ過し、減圧下濃縮した。残渣をピリジン溶液 (10 mL) とし、無水酢酸 (0.19 mL, 2.0 mmol) を加えて 1.5 時間攪拌した。反応混合物を酢酸エチルで抽出し、有機層を飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、ろ過し、減圧下濃縮した。残渣は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、20:1、v/v] で精製し、目的物 5 1 (333.4 mg, 0.48 mmol, 50%) を得た。

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 1.11 (s, 9H), 1.75-1.78 (m, 1H), 2.20 (s, 3H), 2.42-2.45 (m, 1H), 3.32-3.38 (m, 2H), 3.68-3.73 (m, 2H), 4.04 (d, J=11.48 Hz, 1H), 4.34 (d, J=5.48 Hz, 1H), 4.46 (d, J=11.44 Hz, 1H), 4.63 (d, J=11.44 Hz, 1H), 6.12 (s, 1H), 6.90 (d, J=2.93 Hz), 7.31-7.48 (m, 12H), 7.55-7.66 (m, 4H), 8.33 (d, J=8.20 Hz, 1H), 8.74 (s, 1H)

【0196】

5'-O-[(1,1-dimethylethyl)diphenylsilyl]-4'-C-azidoethyl-2'-O-methyl-4-N-acetylcytosine 52

5'-O-[(1,1-dimethylethyl)diphenylsilyl]-4'-C-azidoethyl-3'-O-benzyl-2'-O-methyl-4-N-acetylcytosine (333.4 mg, 0.48 mmol) のジクロロメタン溶液 (10 mL) を、アルゴン雰囲気下、-78℃まで冷却し、1 M 三塩化ホウ素ジクロロメタン溶液 (3.5 mL, 3.5 mmol) を加えて 3 時間攪拌した。その後 -30℃に昇温して 3 時間攪拌した。反応混合物をジクロロメタンで抽出し、有機層を飽和重曹水及び飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、ろ過し、減圧下濃縮した。残渣は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、20:1、v/v] で精製し、目的物 5 2 (225.8 mg, 0.37 mmol, 78%) を得た。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 1.12 (s, 9H), 1.71-1.75 (m, 1H), 2.13-2.21 (m, 4H), 2.85 (d, J=8.24 Hz, 1H), 3.28-3.41 (m, 2H), 3.64 (s, 3H), 3.71 (d, J=11.48 Hz, 1H), 3.82 (dd, J=3.68 Hz, 2.72 Hz, 1H), 3.97 (d, J=11.44 Hz, 1H), 4.52 (t, J=6.40 Hz, 1H), 6.12 (d, J=4.10 Hz, 1H), 7.41-7.51 (m, 6H), 7.63-7.66 (m, 4H), 8.5 (d, J=7.32 Hz, 1H), 8.47 (s, 1H)

【0197】

4'-C-azidoethyl-2'-O-methyl-4-N-acetylcytosine 53

5'-O-[(1,1-dimethylethyl)diphenylsilyl]-4'-C-azidoethyl-2'-O-methyl-4-N-acetylcytosine (225.8 mg, 0.37 mmol) のテトラヒドロフラン溶液 (5.0 mL) に、アルゴン雰囲気下で 1 M 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 (TBAF) (0.56 mL, 0.56 mmol) を加え、室温で 14 時間攪拌した。その後、溶媒を減圧下濃縮し、残渣を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、10:1、v/v] で精製し、目的物 5 3 (95.6 mg, 0.26 mmol, 70%) を得た。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 1.87-1.91 (m, 1H), 2.10-2.17 (m, 1H), 2.25 (s, 3H), 2.94 (d, J=5.04 Hz, 1H), 3.43-3.47 (m, 1H), 3.54 (s, 3H), 3.65-3.83 (m, 3H), 4.42 (t, J=5.04 Hz, 1H), 4.50 (t, J=5.04 Hz, 1H), 5.63 (d, J=5.04 Hz, 1H), 7.44 (d, J=7.32 Hz, 1H), 8.02 (d, J=7.80 Hz, 1H), 8.90 (s, 1H)

【0198】

5'-O-[bis(4-methoxyphenyl)phenylmethyl]-4'-C-azidoethyl-2'-O-methyl-4-N-acetylcytosine 54

4'-C-azidoethyl-2'-O-methyl-4-N-acetylcytosine (570.5 mg, 1.55 mmol) のピリジン溶液 (30 mL) に、アルゴン雰囲気下で 4,4'-ジメトキシトリチルクロリド (DMTrCl) (847 mg, 2.5 mmol) を加え、室温で 18.5 時間攪拌した。反応混合物を酢酸エチルで抽出し、有機層を飽和重曹水及び飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、ろ過し、減圧下濃縮した。残渣は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、20:1、v/v] で精製し、目的物 5 4 (948.9 mg, 1.41 mmol, 91%) を得た。

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 1.73-1.78 (m, 1H), 2.12-2.18 (m, 1H), 2.22 (s,

10

20

30

40

50

3H), 2.89 (d, J=6.45 Hz, 1H), 3.16-3.22 (m, 1H), 3.28-3.31 (m, 1H), 3.35 (d, J=10.9 Hz, 1H), 3.41 (d, J=10.9 Hz, 1H), 3.66 (s, 3H), 3.81 (s, 6H), 4.62 (s, 1H), 6.07 (d, J=1.70 Hz, 1H), 6.86 (d, J=8.00 Hz, 4H), 6.96 (d, J=8.70 Hz, 1H), 7.27-7.36 (m, 9H), 8.31 (d, J=7.45 Hz, 1H), 9.43 (s, 1H)

【0199】

5'-O-[bis(4-methoxyphenyl)phenylmethyl]-4'-C-trifluoroacetylaminoethyl-2'-O-methyl-4-N-acetylcytosine 55

5'-O-[bis(4-methoxyphenyl)phenylmethyl]-4'-C-azidoethyl-2'-O-methyl-4-N-acetylcytosine (948.9 mg, 1.41 mmol) のテトラヒドロフラン溶液 (15 mL) に、トリフェニルホスフィン(PPh₃) (918 mg, 3.5 mmol) と水 (1.0 mL, 56 mmol) を加え、45℃で22時間撹拌した。反応混合物中のテトラヒドロフランを減圧留去した後、ジクロロメタン溶液 (10 mL) とした。トリフルオロ酢酸エチル(CF₃COOEt) (0.5 mL, 4.2 mmol) とトリエチルアミン (Et₃N) (0.30 mL, 2.1 mmol) を加え、室温で42時間撹拌した。反応混合物をクロロホルムで抽出し、有機層を飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、ろ過し、減圧下濃縮した。残渣は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、20:1、v/v] で精製し、目的物55 (252.6 mg, 0.34 mmol, 25%) を得た。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 1.89-1.96 (m, 1H), 2.07-2.14 (m, 1H), 2.21 (s, 3H), 3.12 (d, J=12.0 Hz, 1H), 3.25-3.29 (m, 1H), 3.31-3.41 (m, 4H), 3.62 (s, 3H), 3.81 (s, 6H), 3.90 (dd, J=2.76 Hz, 3.20 Hz, 1H), 4.54 (t, J=5.96 Hz, 1H), 6.12 (d, J=5.04 Hz, 1H), 6.85 (d, J=8.72, 4H), 6.99 (d, J=8.72, 1H), 7.27-7.36 (m, 7H), 8.20 (d, J=8.72, 1H), 8.84 (s, 1H)

【0200】

5'-O-[bis(4-methoxyphenyl)phenylmethyl]-4'-C-trifluoroacetylaminoethyl-2'-O-methyl-3'-[2-cyanoethyl-N,N-bis(1-methylethyl)-phosphoramidite]-4-N-acetylcytosine 56

5'-O-[bis(4-methoxyphenyl)phenylmethyl]-4'-C-trifluoroacetylaminoethyl-2'-O-methyl-4-N-acetylcytosine (252.6 mg, 0.34 mmol) のテトラヒドロフラン溶液 (2.5 mL) に、アルゴン雰囲気下でジイソプロピルエチルアミン (DIPEA) (0.31 mL, 1.8 mmol) とクロロ(ジイソプロピルアミノ)亜ホスフィン酸2-シアノエチル (CEP-Cl) (0.16 mL, 0.72 mmol) を加えて室温で1.5時間撹拌した。反応混合物をクロロホルムで抽出し、有機層を飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、ろ過し、減圧下濃縮した。残渣はシリカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘキサン-酢酸エチル、1:5、v/v] で精製し、目的物56を定量的に得た。

³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) δ : 151.02, 151.61

【実施例2】

【0201】

(2'-F-4'-アミノエチルウリジンアミダイトユニットの合成)

以下に示すスキームにて2'-F-4'-アミノエチルウリジンアミダイトユニットを合成した。

【0202】

10

20

30

40

50

20

30

40

5'-O-[(1,1-dimethylethyl)diphenylsilyl]-4'-C-azidoethyl-3'-O-benzyluridine (0.524 g 0.817 mmol) のピリジン溶液 (4.30 mL) に、アルゴン雰囲気下、氷浴下でメタンスルホニルクロリド (MsCl) (0.13 mL, 1.63 mmol) を慎重に滴下し、6 時間攪拌した。反応物をクロロホルムで抽出し、有機層を飽和重曹水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、ろ過し、減圧下濃縮した。残渣はシリカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘキサン-酢酸エチル、1:1、v/v] で精製し、目的物 57 (0.585 g, 0.813

50

mmol, quant.) を得た。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 1.10 (s, 9H), 1.67-1.75 (m, 1H), 2.07-2.14 (m, 1H), 3.14 (s, 3H), 3.26-3.37 (m, 2H), 3.59 (d, J=11.5 Hz, 1H), 3.91 (d, J=11.4 Hz, 1H), 4.36 (d, J=5.96 Hz, 1H), 4.48 (d, J=11.0 Hz, 1H), 4.84 (d, J=11.5 Hz, 1H), 5.29-5.33 (m, 2H), 6.13 (d, J=4.12 Hz, 1H), 7.34-7.40 (m, 9H), 7.42-7.49 (m, 2H), 7.55-7.57 (m, 2H), 7.60 (m, 2H), 7.69 (d, J=8.24 Hz, 1H), 8.30 (s, 1H) [0204]

4'-C-azidoethyl-3'-O-benzyl-2,2'-anhydrouridine 58

5'-O-[(1,1-dimethylethyl)diphenylsilyl]-4'-C-azidoethyl-3'-O-benzyl-2'-O-methanesulfonyluridine (0.585 g, 0.813 mmol) のテトラヒドロフラン溶液 (6.0 mL) に、アルゴン雰囲気下で1 M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 (TBAF) (1.22 mL, 1.22 mmol) を加え、室温で2時間攪拌した。その後、溶媒を減圧下濃縮し、残渣を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、15:1、v/v] で精製し、目的物58 (0.268 g, 0.696 mmol, 86%) を得た。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 1.05-1.20 (m, 2H), 2.30-2.42 (m, 1H), 2.43-2.46 (m, 1H), 2.58 (t, J=7.80 Hz, 2H), 3.51 (s, 1H), 3.81 (d, J=11.5 Hz, 1H), 3.98 (d, J=11.9 Hz, 1H), 4.39 (t, J=5.04 Hz, 1H), 4.73 (d, J=5.96 Hz, 1H), 5.04 (d, J=7.36 Hz, 1H), 5.52 (d, J=5.96 Hz, 1H), 6.50-6.54 (m, 1H), 6.57-6.58 (m, 4H), 6.99 (d, J=7.36 Hz, 1H) [0205]

4'-C-azidoethyl-3'-O-benzyl-2'-deoxy-2'-fluorouridine 62

4'-C-azidoethyl-3'-O-benzyl-2,2'-anhydrouridine (2.50 g, 6.50 mmol) のジメチルホルムアミド溶液 (45 mL) に、アルゴン雰囲気下、氷浴下でジヒドロピラン (DHP) (15.3 mL, 169 mmol) とパラトルエンスルホン酸一水和物 (p-TsOH · H₂O) (1.36 g, 7.15 mmol) を加えて4時間攪拌した。反応物をトリエチルアミンで中和し、溶媒を減圧下濃縮し、残渣を酢酸エチルで抽出し、飽和重曹水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、ろ過し、減圧下濃縮した。残渣は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、15:1、v/v] で精製し、ジアステレオマー混合物 (5'-O-tetrahydropyranyl-4'-C-azidoethyl-3'-O-benzyl-2,2'-anhydrouridine) 59 (2.74 g, 5.84 mmol, 90%) を得た。

[0206]

続いて、ジアステレオマー混合物59 (2.74 g, 5.84 mmol) のメタノール溶液 (38 mL) に、1 M水酸化ナトリウム水溶液 (10 mL) を加えて室温で3時間攪拌した。反応物を1 M酢酸で中和し、溶媒をエタノールで共沸した。残渣を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、30:1、v/v] で精製し、ジアステレオマー混合物 (5'-O-tetrahydropyranyl-4'-C-azidoethyl-3'-O-benzyl-arabinouridine) 60 (2.82 g, 5.78 mmol, quant.) を得た。

[0207]

続いて、ジアステレオマー混合物60 (3.39 g, 6.95 mmol) のジクロロメタン溶液 (181 mL) に、アルゴン雰囲気下でピリジン (8.64 mL)、N,N-ジメチル-4-アミノピリジン (DMAP) (3.82 g, 31.3 mmol) を加えて0℃まで冷却した。反応混合物にトリフルオロメタンスルホン酸無水物 (Tf₂O) (3.42 mL, 20.9 mmol) を慎重に滴下し、0℃で1時間攪拌した。反応物をクロロホルムで抽出し、有機層を飽和重曹水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、ろ過し、減圧下濃縮した。残渣をアセトニトリルで共沸した後、テトラヒドロフラン溶液 (167 mL) とした。アルゴン雰囲気下、氷浴下でテトラブチルアンモニウムフルオリド (TBAF) (10.9 g, 3.06 mmol) のテトラヒドロフラン溶液 (34.7 mL) を慎重に滴下し、0℃で1時間攪拌した。反応混合物に更に同量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 (TBAF) (34.7 mL, 3.06 mmol) を慎重に滴下し、0℃で4時間攪拌した。反応物を減圧下濃縮し、残渣をクロロホルムで抽出し、飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、ろ過し

、減圧下濃縮した。残渣はシリカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘキサン-酢酸エチル、1:2、v/v] で精製し、目的物 (5'-O-tetrahydropyranyl-4'-C-azidoethyl-3'-O-benzyl-2'-fluorouridine) 61 のジアステレオマー混合物 (2.34 g, 4.78 mmol, 69%) を得た。

【0208】

続いて、ジアステレオマー混合物 (2.34 g, 4.78 mmol) のメタノール溶液 (48.0 mL) に、アルゴン雰囲気下でパトールエンズルホン酸一水和物 (p-TsOH · H₂O) (1.39 g, 7.47 mmol) を加え、室温で6時間攪拌した。反応混合物を減圧留去した後、ピリジンで3度共沸し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘキサン-酢酸エチル、5:2、v/v] で精製し、目的物 62 (1.36 g, 3.33 mmol, 70%) を得た。

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ : 1.78-1.86 (m, 1H), 1.99-2.06 (m, 1H), 3.42-3.48 (m, 3H), 3.60-3.64 (m, 1H), 4.36 (dd, J=19.3 Hz and 5.04 Hz, 1H), 4.62 (d, J=11.9 Hz, 1H), 4.70 (d, J=11.4 Hz, 1H), 5.36 (m, 0.5H), 5.42 (t, J=5.52 Hz, 1H), 5.50 (m, 0.5H), 5.65 (dd, J=7.80 Hz and 1.84 Hz, 1H), 6.04 (dd, J=17.9 Hz and 2.32 Hz, 1H), 7.31-7.35 (m, 1H), 7.36-7.37 (m, 4H), 7.91 (d, J=8.28 Hz, 1H), 11.4 (s, 1H)

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆) δ : 30.38, 46.00, 63.09, 72.30, 76.61, 76.75, 86.68, 87.45, 87.79, 91.67, 93.55, 101.77, 127.47, 127.71, 128.33, 137.89, 140.90, 150.35, 163.15

¹⁹F NMR (376 MHz, DMSO-d₆) δ : -120.08, -119.88

【0209】

4'-C-azidoethyl-2'-deoxy-2'-fluorouridine 63

4'-C-azidoethyl-3'-O-benzyl-2'-deoxy-2'-fluorouridine (0.672 g, 1.66 mmol) のジクロロメタン溶液 (27 mL) を、アルゴン雰囲気下、-78℃まで冷却し、1 M 三塩化ホウ素ジクロロメタン溶液 (13.3 mL, 13.3 mmol) を加えて3時間攪拌した。その後-30℃に昇温して5時間攪拌した。反応混合物にジクロロメタン-メタノール (1:1、v/v、25 mL) を加え、減圧下濃縮した。残渣は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、8:1、v/v] で精製し、目的物 63 (339 mg, 1.08 mmol, 65%) を得た。

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ : 1.74-1.79 (m, 1H), 1.81-2.01 (m, 1H), 3.38-3.45 (m, 3H), 3.55 (dd, J=11.9 Hz and 5.04 Hz, 1H), 4.26-4.32 (m, 1H), 5.10 (t, J=5.04 Hz, 0.5H), 5.23 (t, J=5.04 Hz, 1H), 5.35 (t, J=5.04 Hz, 1H), 5.66 (d, J=7.80 Hz, 1H), 5.79 (d, J=5.52 Hz, 1H), 6.05 (dd, J=15.1 Hz and 4.12 Hz, 1H), 7.90 (d, J=8.24 Hz, 1H), 11.4 (s, 1H)

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆) δ : 30.44, 46.15, 63.40, 69.37, 69.53, 79.20, 85.81, 86.13, 87.10, 92.26, 94.13, 102.09, 140.61, 150.53, 163.09

¹⁹F NMR (376 MHz, DMSO-d₆) δ : -123.84, -123.97

【0210】

5'-O-[bis(4-methoxyphenyl)phenylmethyl]-4'-C-azidoethyl-2'-deoxy-2'-fluorouridine 64

4'-C-azidoethyl-2'-deoxy-2'-fluorouridine (343 mg, 1.09 mmol) のピリジン溶液 (4.0 mL) に、アルゴン雰囲気下で4,4'-ジメトキシトリチルクロリド (DMTrCl) (554 mg, 1.64 mmol) を加え、室温で6時間攪拌した。反応混合物を酢酸エチルで抽出し、有機層を飽和重曹水及び飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、ろ過し、減圧下濃縮した。残渣はシリカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘキサン-酢酸エチル、1:1、v/v] で精製し、目的物 64 (615 mg, 0.996 mmol, 91%) を得た。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 1.85-1.93 (m, 1H), 2.02-2.09 (m, 1H), 2.78 (s, 1H), 3.21-3.27 (m, 1H), 3.31-3.40 (m, 3H), 3.80 (s, 6H), 4.60-4.64 (m, 1H), 5.10 (t, J=1.84 Hz, 0.5H), 5.25 (t, J=1.60 Hz, 0.5H), 5.36 (d, J=8.24 Hz, 1H), 6.14 (dd, J=15.6 Hz and 3.20 Hz, 1H), 6.85 (d, J=8.72 Hz, 4H), 7.24 (s, 3H), 7.

27-7.36 (m, 6H), 7.65 (d, J=7.80 Hz, 1H), 8.99 (s, 1H)

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ : 31.16, 46.51, 55.41, 65.70, 71.48, 71.63, 86.97, 87.19, 87.52, 87.76, 92.90, 94.80, 102.96, 113.52, 127.47, 128.23, 128.26, 130.24, 130.28, 134.82, 135.00, 140.50, 144.08, 150.18, 158.96, 163.02

¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl₃) δ : -122.41, -122.67

【0211】

5'-O-[bis(4-methoxyphenyl)phenylmethyl]-4'-C-trifluoroacetylaminethyl-2'-deoxy-2'-fluorouridine 65

5'-O-[bis(4-methoxyphenyl)phenylmethyl]-4'-C-azidoethyl-2'-deoxy-2'-fluorouridine (616 mg, 0.997 mmol) のテトラヒドロフラン溶液 (25 mL) に、トリフェニルホスフィン(PPh₃) (654 mg, 2.49 mmol) と水 (0.719 mL) を加え、45℃で15時間攪拌した。反応混合物中のテトラヒドロフランを減圧留去した後、ジクロロメタン溶液 (6.0 mL) とした。トリフルオロ酢酸エチル(CF₃COOEt) (0.35 mL, 2.93 mmol) とトリエチルアミン (Et₃N) (0.203 mL, 1.47 mmol) を加え、室温で一晩攪拌した。反応混合物を酢酸エチルで抽出し、有機層を飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、ろ過し、減圧下濃縮した。残渣はシリカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘキサン-酢酸エチル、2:3、v/v] で精製し、目的物 65 (610 mg, 0.887 mmol, 91%) を得た。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 1.90-2.11 (m, 2H), 3.31-3.42 (m, 4H), 3.80 (s, 6H), 4.60 (dd, J=13.8 Hz and 5.04 Hz, 1H), 5.14 (t, J=4.56 Hz, 0.5H), 5.28 (s, 0.5H), 5.41 (d, J=7.80 Hz, 1H), 6.15 (dd, J=15.1 Hz and 3.64 Hz, 1H), 6.86 (d, J=7.80 Hz, 4H), 7.28-7.37 (m, 10H), 7.63 (d, J=8.28 Hz, 1H), 9.55 (s, 1H)

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ : 30.94, 35.33, 55.38, 65.76, 71.47, 71.62, 87.15, 87.36, 87.83, 92.63, 94.52, 103.11, 113.53, 117.35, 127.47, 128.18, 128.26, 130.23, 134.71, 134.90, 140.58, 143.99, 150.54, 157.12, 157.48, 158.92, 163.34

¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl₃) δ : -124.43, -124.56

【0212】

5'-O-[bis(4-methoxyphenyl)phenylmethyl]-4'-C-trifluoroacetylaminethyl-2'-deoxy-2'-fluoro-3'-[2-cyanoethyl-N,N-bis(1-methylethyl)-phosphoramidite]-uridine 66

5'-O-[bis(4-methoxyphenyl)phenylmethyl]-4'-C-trifluoroacetylaminethyl-2'-deoxy-2'-fluorouridine (562 mg, 0.817 mmol) のテトラヒドロフラン溶液 (6 mL) に、アルゴン雰囲気下でジイソプロピルエチルアミン (DIPEA) (0.713 mL, 4.09 mmol) とクロロ(ジイソプロピルアミノ)亜ホスフィン酸2-シアノエチル (CEP-Cl) (0.365 mL, 1.63 mmol) を加えて室温で1時間攪拌した。反応混合物をクロロホルムで抽出し、有機層を飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、ろ過し、減圧下濃縮した。残渣はシリカゲルカラムクロマトグラフィー [ヘキサン-酢酸エチル、1:1、v/v] で精製し、目的物 66 (696 mg, 0.784 mmol, 96%) を得た。

³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) δ : 151.16, 151.69, 152.64, 152.72

【実施例3】

【0213】

(アミノアルキルRNA含有RNAオリゴマー合成)

実施例1及び2で合成したヌクレオシドを用いて、オリゴヌクレオチドを合成した。オリゴヌクレオチドの合成は、ホスホロアミダイト法を用いた核酸自動合成機によって行った。0.1-0.15 Mヌクレオシドアミダイトのアセトニトリル溶液及び、ヌクレオチド担持CPG担体を用いて合成した。合成終了後、CPG樹脂をサンプリングチューブに移し、アセトニトリル-ジエチルアミン (9:1, v/v, 1.0 mL) を加えて5分間攪拌した。上澄みを除去し、アンモニア水-メチルアミン (1:1, v/v, 1.0 mL) を加え、65℃で10分静置した。反応混合物を0.1 M トリエチルアミン-酢酸緩衝液 (TEAA) で10 mLにメスアップし

10

20

30

40

50

、平衡化したSep-Pac tC18逆相カラムに通して吸着させた。カラムを滅菌水で洗浄後、アセトニトリル-水 (1:1, v/v, 3 mL) で溶出し、減圧乾固して粗製物を得た。粗製物はloading solution (1×TBE in 90 % ホルムアミド) (200 μL) に溶解させ、20 % PAGE (500 V, 20 mA) により精製した。0.1 M トリエチルアミン-酢酸緩衝液、1 mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) 水溶液 (20 mL) を加え、一晚振盪した。振盪後、ろ液を平衡化したSep-Pac tC18逆相カラムに通し、カラムに吸着させた。カラムを滅菌水で洗浄して塩を取り除き、アセトニトリル-水 (1:1, v/v, 3 mL) で溶出し、減圧下乾固した。

【0214】

オリゴヌクレオチドは滅菌水 (1 mL) に溶かし、希釈液の260 nmにおける吸光度から収量を求めた。また、60 pmol相当のオリゴヌクレオチドを減圧乾固させ、3 μLの滅菌水及び3 μLのマトリックス溶液とよく混和し、プレート上で乾固した後、MALDI-TOF/MSで質量を測定した。

【0215】

合成した配列 (オリゴリボヌクレオチドについて配列番号1、オリゴデオキシリボヌクレオチドについて配列番号2) 及び収率・質量測定の結果を、以下の表に示す。なお、uAEは2'-OMe-4'-AEUを、uAMは2'-OMe-4'-AMUを、uGMは2'-OMe-4'-GMUを、uAPは2'-OMe-4'-APUを、uFAEは2'-F-4'-AEUを示す。これらの構造を図1に示す。また、Fは蛍光標識用に導入したFluoresceinを、小文字のa, u, c, gはそれぞれU, A, Gの2'-OMe修飾体を指す。さらに、3'末端にはアルキン-セリノールリンカーを導入し、今後クリック反応によりDDS分子を結合させるための足場とした。リンカーを図2に示す。

【0216】

【表1】

合成したオリゴヌクレオチドの塩基配列

ON1	5' - F UUC UUC UUC UUS-3'
ON2	5' - F Uu ^{AE} C UUC u ^{AE} UC Uu ^{AE} S-3'
ON3	5' - F UUC UUC Uu ^{AE} C u ^{AE} U ^{AE} S-3'
ON4	5' - F u ^{AE} U ^{AE} C u ^{AE} UC u ^{AE} UC u ^{AE} U ^{AE} S-3'
ON5	5' - F uuC uUC uUC uuS-3'
ON6	5' - AAG AAG AAG AA-3'
ON7	5' - aag aag aag aa-3'
ON8	5' - F Uu ^{AM} C UUC u ^{AM} UC Uu ^{AM} S-3'
ON9	5' - F Uu ^{GM} C UUC u ^{GM} UC Uu ^{GM} S-3'
ON10	5' - F Uu ^{AP} C UUC u ^{AP} UC Uu ^{AP} S-3'
ON11	5' - F uu ^{AP} c uuC u ^{AP} uc uu ^{AP} S-3'
ON12	5' - F UUC UUC UUC UU-3'
ON13	5' - F Uu ^{AE} C UUC u ^{AE} UC Uu ^{AE} -3'
ON14	5' - F Uu ^{FAE} C UUC u ^{FAE} UC Uu ^{FAE} -3'
ON15	5' - F Uu ^{AP} C UUC u ^{AP} UC Uu ^{AP} -3'

【0217】

10

20

30

40

50

【表 2】

合成したオリゴヌクレオチドの特性

配列	calculated mass	observed mass	OD 260	C (mM)
ON1	4175. 6	4174. 7	9. 71	99. 5
ON2	4346. 9	4346. 0	7. 20	74. 0
ON3	4346. 9	4346. 1	7. 62	78. 1
ON4	4518. 2	4518. 4	6. 10	62. 5
ON5	4259. 8	4259. 0	16. 0	163. 9
ON6	3607. 3	3606. 8	12. 5	93. 8
ON7	3761. 6	3761. 1	5. 76	43. 2
ON8	4304. 9	4303. 9	7. 84	80. 3
ON9	4430. 9	4429. 6	1. 51	15. 5
ON10	4389. 0	4388. 0	15. 0	153. 7
ON11	4501. 2	4499. 6	11. 5	117. 8
ON12	3841. 4	3842. 9	11. 4	116. 8
ON13	4012. 7	4013. 0	6. 00	61. 5
ON14	3976. 6	3977. 1	2. 30	23. 6
ON15	4054. 7	4053. 3	25. 1	257. 2

【実施例 4】

【0218】

(融解温度(T_m)の測定)

10 mMリン酸緩衝液 (pH 7.0, 100 mM NaCl) 中でアニーリングした3 μ Mの以下に示すRNA二重鎖を、5℃から70℃まで+0.5℃/minで昇温し、吸光度変化から融解温度(T_m)を算出した。結果を、図3及び4に示す。

【0219】

図3に示すように、アミノエチル修飾による、RNA二本鎖形成能の低下が確認された。相補鎖が、2'位が-OH, -OMeに関わらず一修飾辺り約2℃融解温度が低下した。

【実施例 5】

【0220】

(ウシ血清中でのリボヌクレアーゼ耐性試験)

実施例3で合成した蛍光標識オリゴヌクレオチド300 pmolをOPTI-MEM滅菌水37.5 μ Lに溶かし、リボヌクレアーゼ源としてのウシ血清1.2 μ Lを加え、37℃でインキュベートした。0, 0.5, 1, 3, 6, 12, 24時間後に反応液1.2 μ Lとloading solution (9 M urea含有)5 μ Lを混ぜて反応を停止させた。この反応溶液を20% PAGE, 500 V, 20 mAにて分離した、ルミノ・イメージアナライザー LAS4000を用いて分析した。結果を図5及び図6に示す。

【0221】

図5に示すように、まずアミノエチル修飾位置によるリボヌクレアーゼ耐性を比較した。未修飾のON1や修飾位置が3'末端にまともっているON3では0-1時間でほぼ分解が完了したのに対し、均等にアミノエチル修飾を導入したON2, 4、全てに2'-OMe修飾を導入したON5では分解速度の低下が見られた。2'-OMe修飾では6hでほぼ分解が完了したのに対し、ON2, 4では24時間経過後も全長RNAの存在が確認された。特に、均等に6ヶ所修飾を導入したON4では6時間たっても分解物がほぼ見られないことから、アミノアルキル修飾が高いリボヌクレアーゼ耐性を示すことが確認された。

【0222】

続いて、図6に示すように、アミノアルキル側鎖の鎖長の違いによるリボヌクレアーゼ耐性を比較した。その結果、導入したアルキル鎖がアミノメチル基（ON8）、アミノエチル基（ON2）、アミノプロピル基（ON10）と鎖長が長くなるに従いオリゴヌクレオチドの分解速度が低下すること、即ち、リボヌクレアーゼ耐性が向上することが確認された。

【実施例6】

【0223】

（細胞膜透過性試験）

HeLa細胞を20000 cell/mLになるように調製し、48 well plateの各wellに400 μ Lずつ入れ24時間培養した。蛍光修飾オリゴヌクレオチド(40 pmol)をOPTI-MEM(400 μ L)に溶解させ、各ウェルの培地を吸引したのちに全量をウェルに加えた。1時間インキュベート後、血清入り培養培地(10%BS入りD-MEM(WAKO))を200 μ L/well加えた。24時間後、各ウェルの培地を除去し、PBSで2回ウェルを洗浄した。その後、倒立型蛍光顕微鏡(IX70, OLYMPUS社製)を用い、細胞観察を行った。結果を図7及び図8に示す。

10

【0224】

図7に示すように、アミノエチル修飾による細胞膜透過性の顕著な向上が見られた。特にON2では11量体中3ヶ所のみに修飾をもつが、極めて高い細胞内取り込みが確認された。また、修飾位置に着目すると、3'末端に修飾を導入したON3では膜透過能がみられないことから、アミノエチル修飾を配列に対して均等に分布させることが必要であると示唆された。

20

【0225】

図8に示すように、続いて導入したアミノアルキル側鎖の鎖長の違いによるオリゴヌクレオチドの細胞膜透過能を比較した。その結果、アミノメチル基を導入したオリゴヌクレオチド(ON8)と比較して、アミノエチル基(ON2)及びアミノプロピル基(ON10)を導入したオリゴヌクレオチドで細胞膜透過能が向上する事が確認された。これは、エチル基、プロピル基による脂溶性の増加、もしくはファンデルワールス分子間力の増加によると想定される。

【実施例7】

30

【0226】

（RNA干渉能の検証）

以下に示すsiRNA二重鎖のパッセンジャー鎖におけるウリジンを、実施例1及び実施例2で合成した2'-フルオロアミノエチルウリジン及び2'-O-メチルアミノエチルウリジン並びにこれらの誘導体を用いて、実施例3に準じて2'-フルオロアミノエチル修飾siRNAと2'-O-メチルアミノエチル修飾siRNAをそれぞれ合成した。

【0227】

【化17】



40

【0228】

アミノエチル修飾siRNAのRNA干渉能の評価にはDual luciferase reporter assayを用いた。HeLa細胞(Firefly luciferase、Renilla luciferase安定発現株)を 8.0×10^3 cells/mLになるように調製し、96 well plateの各wellに100 μ Lずつ入れ24時間培養した。合成したsiRNAのそれぞれの鎖をTE buffer 10 μ Lに溶解し、95℃で3分加熱後

50

、1時間以上静置し室温に戻した。このsiRNA各量、培地 (OPTI-MEM) 各量、lipofectamin RNAiMAX (transfection試薬) 1.5 μ Lを総量50 μ Lになるように混合し、培地を吸った96 well plateの各wellに 10 μ Lずつ入れ、CO₂インキュベーター37℃で20分後培地を50 μ L加えてCO₂インキュベーター37℃で24時間培養した。24 時間後、培地を吸い、冷凍保存した。なお、siRNAは、1 nM及び10 nMの2濃度で評価した。また、ポジティブコントロールとして、天然siRNAを同様にして処理した。

【0229】

ルシフェラーゼ発光の測定は、解凍後Dual glo substrate (Firefly luciferaseの基質) 24 μ Lを加え5分間静置後、サンプル23 μ Lを発光測定用の96 well plateに移し、Firefly luciferaseを測定した。その後、Stop and glo substrate (Renilla luciferaseの基質) 23 μ Lを加え10分静置後、Renilla luciferaseを測定した。Renilla luciferaseの発光測定値をFirefly luciferaseの値で割り、% of controlを用いて比較した。なお、luciferase測定には、Luminescenser JNR IIを使用した。結果を図9に示す。

10

【0230】

図9に示すように、2'-フルオロアミノエチル修飾siRNAと2'-O-メチルアミノエチル修飾siRNAのいずれも、遺伝子発現抑制能を示した。特に、2'-フルオロアミノエチル修飾siRNAは、ポジティブコントロールである天然siRNAと同程度の遺伝子発現抑制能を示した。

【先行技術文献】

【非特許文献】

20

【0231】

【文献】HELVATICA CHIMICA ACTA Vol. 83 (2000) 128-151

The Journal of Organic Chemistry 2012, 77, 3233-3245

Bioorganic & Chemistry letters(1999)2667-2672

The Journal of Organic Chemistry 2013, 78, 9956-9962

【配列表フリーテキスト】

【0232】

配列番号1～4：合成ヌクレオチド

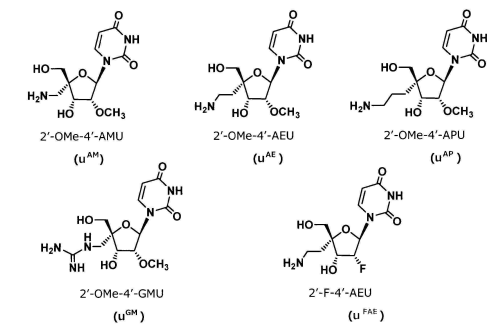
30

40

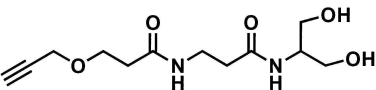
50

【図面】

【図 1】



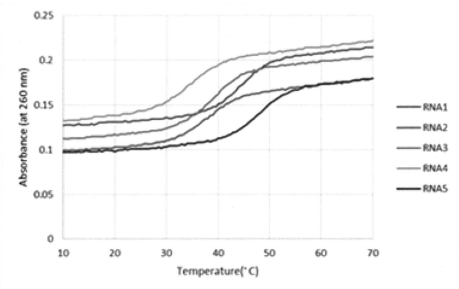
【図 2】



10

【図 3】

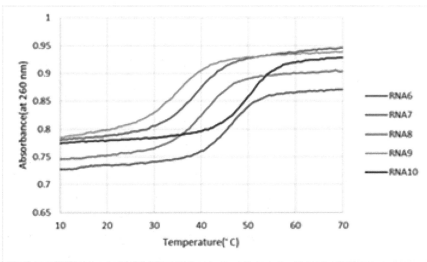
RNA二重鎖の配列と融解温度 (T _m)				
	配列	T _m (°C)	ΔT _m (°C)	ΔT _m (°C)/mod
RNA1	5'- F UUC UUC UUC UUS -3' 3'- AAG AAG AAG AA -5'	43.9		
RNA2	5'- F UuC UUC uUC UuS -3' 3'- AAG AAG AAG AA -5'	37.5	-6.4	-2.1
RNA3	5'- F UUC UUC UuC uuS -3' 3'- AAG AAG AAG AA -5'	37.7	-6.2	-2.1
RNA4	5'- F uuC uUC uUC uuS -3' 3'- AAG AAG AAG AA -5'	34.1	-9.8	-1.6
RNA5	5'- F uuC uUC uUC uuS -3' 3'- AAG AAG AAG AA -5'	47.6	3.7	0.6



温度変化に伴うUV吸収 (260 nm) の変化

【図 4】

RNA二重鎖の配列と融解温度 (T _m)				
	Sequence	T _m (°C)	ΔT _m (°C)	ΔT _m (°C)/mod
RNA6	5'- F UUC UUC UUC UUS -3' 3'- aag aag aag aa -5'	45.5		
RNA7	5'- F UuC UUC uUC UuS -3' 3'- aag aag aag aa -5'	38.7	-6.8	-2.3
RNA8	5'- F UUC UUC UuC uuS -3' 3'- aag aag aag aa -5'	39.6	-5.9	-2.0
RNA9	5'- F uuC uUC uUC uuS -3' 3'- aag aag aag aa -5'	34.2	-11.3	-1.9
RNA10	5'- F uuC uUC uUC uuS -3' 3'- aag aag aag aa -5'	49.8	4.3	0.7



温度変化に伴うUV吸収 (260 nm) の変化

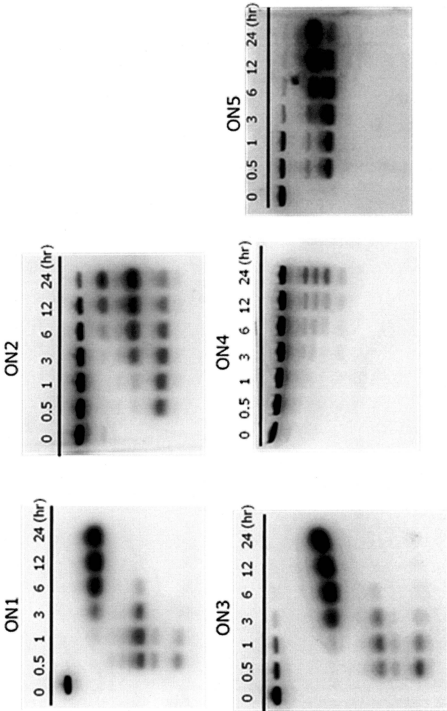
20

30

40

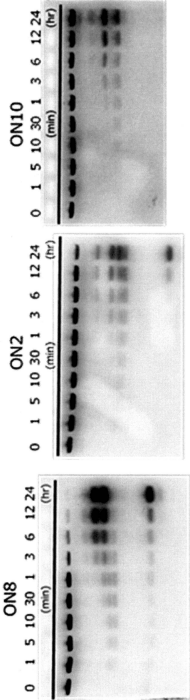
50

【図 5】



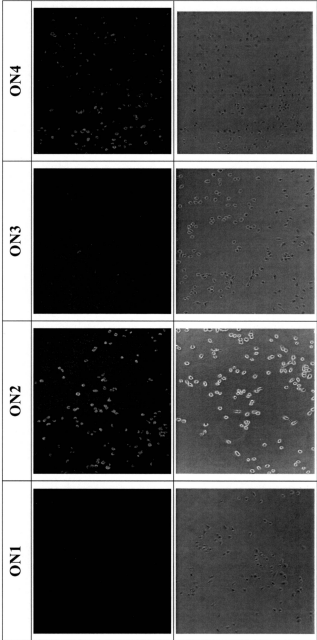
アミノエチルウリジンの修飾位置によるヌクレアーゼ耐性の比較

【図 6】



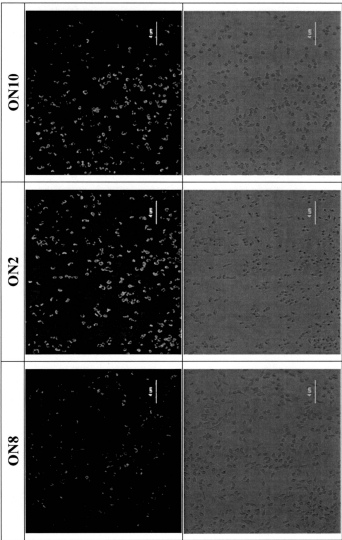
アミノアルキル側鎖の鎖長の違いによるヌクレアーゼ耐性の比較

【図 7】



アミノエチルウリジンの修飾位置による細胞取り込み能の比較

【図 8】



アミノアルキル側鎖の鎖長の違いによる細胞取り込み能の比較

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 1 2 N 9/99 (2006.01)

F I

C 1 2 N 9/99

(56)参考文献

特表 2 0 0 5 - 5 3 3 5 1 7 (J P, A)

特表 2 0 0 0 - 5 1 2 8 5 3 (J P, A)

特開平 1 1 - 1 3 0 7 9 3 (J P, A)

米国特許第 5 4 4 6 1 3 7 (U S, A)

国際公開第 2 0 1 5 / 2 0 0 2 1 9 (W O, A 1)

国際公開第 2 0 1 4 / 1 1 2 4 6 3 (W O, A 1)

上野義仁 他, ポリアミン修飾オリゴヌクレオチドの合成とアンチセンス, アンチジーン分子としての性質, 有機合成化学協会誌, 2003年, Vol.61, No.9, p.890-899

ATSUMI, N. et al, Nucleosides and nucleotides. Part 214: thermal stability of triplexes containing 4' α -C-Aminoalkyl-2, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2002年, Vol.10, No.9, pp.2933-2939UENO, Y. et al, Nucleosides and Nucleotides. Part 206: Introduction of lipophilic groups into 4' α -C-(2-aminoethyl)t, Tetrahedron, 2000年, Vol.56, No.40, pp.7903-7907KANAZAKI, M. et al, Highly Nuclease-Resistant Phosphodiester-Type Oligodeoxynucleotides Containing 4' α -C-Aminoalkylthym, Journal of the American Chemical Society, 2000年, Vol.122, No.11, pp.2422-2432

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

C 0 7 H 1 / 0 0 - 9 9 / 0 0

A 6 1 K 4 8 / 0 0

A 6 1 K 3 1 / 7 1 2

C 1 2 N 1 5 / 1 1 3

C 1 2 N 9 / 9 9

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C a p l u s / R E G I S T R Y (S T N)