

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2020年8月6日(06.08.2020)



(10) 国際公開番号

WO 2020/158910 A1

(51) 国際特許分類:

C07H 19/06 (2006.01) C07H 19/20 (2006.01)
C07H 19/10 (2006.01) C07H 23/00 (2006.01)
C07H 19/16 (2006.01) C12N 15/11 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2020/003597

(22) 国際出願日: 2020年1月31日(31.01.2020)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:

特願 2019-016756 2019年2月1日(01.02.2019) JP

(71) 出願人: 国立大学法人大阪大学 (OSAKA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 Osaka (JP).

(72) 発明者: 小比賀 聡(OBIKA, Satoshi); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 山口 卓男(YAMAGUCHI, Takao); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 羽瀨 貴紀(HABUCHI, Takaki); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 加藤 剛(KATO, Go); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法

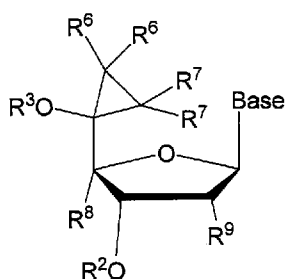
人大阪大学内 Osaka (JP). 井上 貴雄(INOUE, Takao); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 吉田 徳幸(YOSHIDA, Tokuyuki); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 杉浦 隆也(SUGIURA, Takaya); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP).

(74) 代理人: 中道 佳博, 外(NAKAMICHI, Yoshihiro et al.); 〒5300047 大阪府大阪市北区西天満3丁目2番9号 翁ビル5階 創樹国際特許事務所 Osaka (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,

(54) Title: 5'-MODIFIED NUCLEOSIDE AND NUCLEOTIDE USING SAME

(54) 発明の名称: 5'位修飾ヌクレオシドおよびそれを用いたヌクレオチド



(I)

(57) Abstract: Disclosed are a 5'-modified nucleoside and a nucleotide using the same. The nucleoside according to the present invention is represented by formula (I). The 5'-modified nucleoside according to the present invention is usable as a substitute for a phosphorothioate-modified nucleic acid which has a risk of, for example, accumulation in a specific organ. Further, this 5'-modified nucleoside requires no step for diastereomer separation in manufacturing and, therefore, can be efficiently produced industrially.

(57) 要約: 5'位修飾ヌクレオシドおよびそれを用いたヌクレオチドを開示する。本発明のヌクレオシドは、以下の式(I): で表される。本発明の5'位修飾ヌクレオシドは、特定の臓器への集積などが懸念されるホスホロチオエート修飾核酸の代替とすることができ、かつその製造においてジアステレオマーの分離工程を必要としないため、工業的生産性にも優れている。

ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

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

添付公開書類:

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

明 細 書

発明の名称：

5' 位修飾ヌクレオシドおよびそれを用いたヌクレオチド

技術分野

[0001] 本発明は、5' 位修飾ヌクレオシドおよびそれを用いたヌクレオチドに関する。より詳細には、良好なヌクレアーゼ耐性能を有しかつ効率よく製造することのできる5' 位修飾ヌクレオシドおよびそれを用いたヌクレオチドに関する。

背景技術

[0002] 核酸医薬による疾病の治療法として、アンチセンス法、アンチジーン法、アプタマー、s i R N A などがある。このうち、アンチセンス法は、疾病に関わるm R N A と相補的なオリゴヌクレオチド（アンチセンス鎖）を外部から導入し、二重鎖を形成させることにより、病原R N A の翻訳過程を阻害し、疾病の治療や予防を行う手法である。s i R N A もこれに類似しており、生体に投与した二重鎖R N A によりm R N A からタンパク質への翻訳を阻害する。一方、アンチジーン法は、病原R N A を転写するD N A 部位に対応する三重鎖形成オリゴヌクレオチドを外部から導入することによりD N A からR N A への転写を抑制する。また、アプタマーは、短い核酸分子（オリゴヌクレオチド）であるため、疾病の原因となるタンパク質などの生体成分と結合することにより機能を発揮する。

[0003] こうした核酸医薬の素材として、種々の人工核酸が開発されている。中でも核酸の糖部コンホメーションを架橋によって固定化した2' , 4' -B N A (b r i d g e d n u c l e i c a c i d 、別名L N A) は一本鎖R N A (s s R N A) に対して優れた結合親和性を有することが報告されており（非特許文献1 および2）アンチセンス法などの様々な核酸医薬への適応が期待されている。

[0004] 一方、核酸の5' 位にメチル基を導入した人工核酸は、ヌクレアーゼ耐性

能の面で優れた特性を有することが報告されている（特許文献1～3）。このため、5'位に置換基を導入した人工核酸についても診断や医薬への応用が期待されている。

[0005] しかし、このような5'位に置換基を導入した人工核酸は、その合成においてジアステレオマーの分離を必要とするため（非特許文献3および4）、製造工程が全体として煩雑となり、工業的生産に向けたさらなる開発が所望されている。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：国際公開第2010/048549号
特許文献2：国際公開第2010/048585号
特許文献3：国際公開第2010/077578号

非特許文献

[0007] 非特許文献1：S. Obikaら, T. Tetrahedron Lett. 1997, 38, 8735-8738
非特許文献2：S. Singhら, J. Chem. Commun. 1998, 455-456.
非特許文献3：Yawmanら, J. Org. Chem. 1995, 60, 788-789
非特許文献4：Manoharanら, J. Org. Chem. 2016, 81, 2261-2279

発明の概要

発明が解決しようとする課題

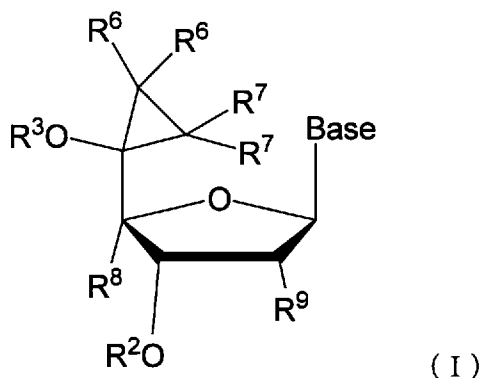
[0008] 本発明は、上記課題を解決するものであり、その目的とするところは、良好なヌクレアーゼ耐性能を有し、かつその合成経路においてジアステレオマー分離操作を必要とすることなく効率的に製造することのできる5'位が修飾されたヌクレオシドおよびそれを用いたヌクレオチドを提供することにある。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明は、以下の式（1）で表される化合物またはその塩：

[0010]

[化1]



[0011] (式中、

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

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

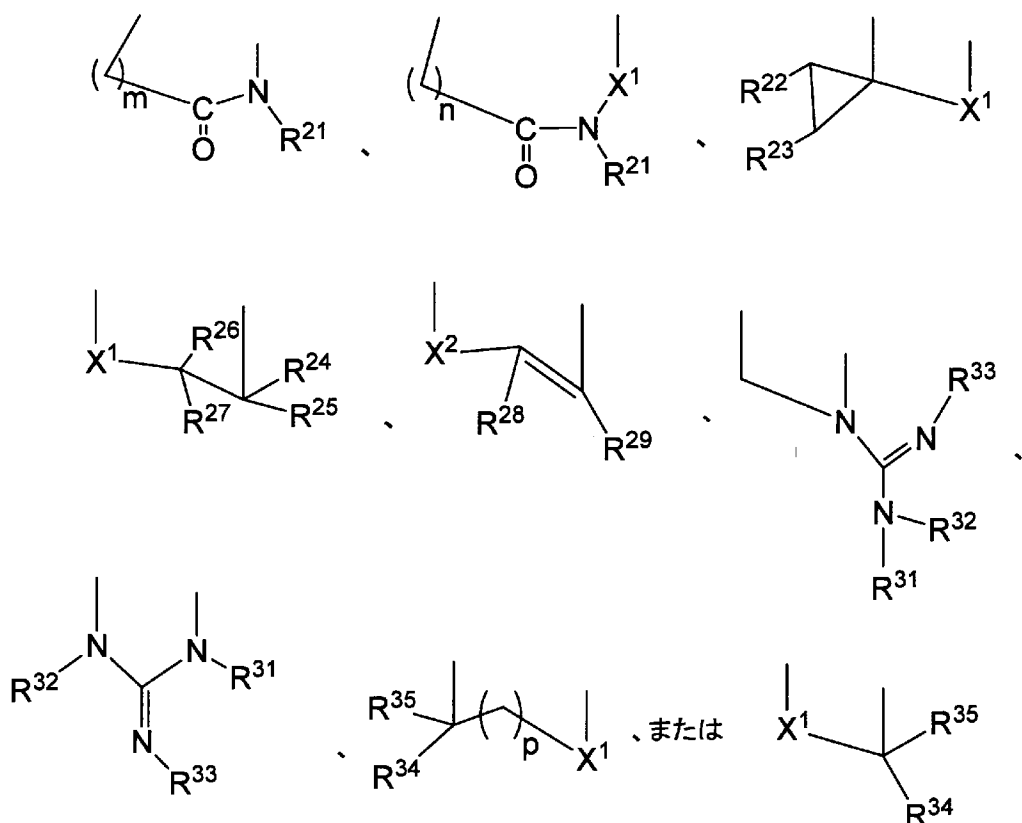
水酸基、核酸合成の保護基で保護された水酸基、メルカプト基、核酸合成の保護基で保護されたメルカプト基、アミノ基、炭素数 1 から 6 のアルコキシ基、炭素数 1 から 6 のアルキルチオ基、炭素数 1 から 6 のシアノアルコキシ基、または炭素数 1 から 6 のアルキル基を有するジアルキルアミノ基を表す] を表し、

R^6 および R^7 は、それぞれ独立して、水素原子、ハロゲン原子、またはメチル基であり、そして

R^8 は水素原子でありかつ R^9 は水素原子、ハロゲン原子；炭素数 1 から 6 の直鎖アルコキシ基で置換されていてもよい炭素数 1 から 6 の直鎖アルコキシ基；または $-OR^{10}$ [式中、 R^{10} は水素原子、または核酸合成の水酸基の保護基である] であるか、あるいは

R^8 および R^9 は一緒になって以下の式：

[0012] [化2]



[0013] [式中、

R^{21} は、水素原子、分岐または環を形成していてもよい炭素数1から6のアルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数2から6のアルケニル基、該 α 群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよくそしてヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数3から10のアリール基、該 α 群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよくそしてヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数3から12のアリール部分を有するアラルキル基、または核酸合成のアミノ基の保護基であり；

R^{22} および R^{23} は、それぞれ独立して、水素原子；ヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数3から12のアリール基で置換されていてもよく、かつ分岐または環を形成していてもよい炭素数1から6のアルキル基；またはヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数3から12のアリール部分を有するアラルキル基；であるか、あるいは

R^{22} および R^{23} は一緒になって、 $-(CH_2)_q-$ [式中、 q は2から5の整数である] を表し；

R^{24} および R^{25} は、それぞれ独立して、水素原子；水酸基；分岐または環を形成していてもよい炭素数1から6のアルキル基；分岐または環を形成していてもよい炭素数1から6のアルコキシ基；アミノ基；および核酸合成の保護基で保護されたアミノ基；からなる群から選択される基であるか、あるいは、

R^{24} および R^{25} は一緒になって、 $=C(R^{36})R^{37}$ [式中、 R^{36} および R^{37} は、それぞれ独立して、水素原子、水酸基、核酸合成の保護基で保護された水酸基、メルカプト基、核酸合成の保護基で保護されたメルカプト基、アミノ基、炭素数1から6の直鎖または分岐鎖アルコキシ基、炭素数1から6の直鎖または分岐鎖アルキルチオ基、炭素数1から6のシアノアルコキシ基、または炭素数1から6の直鎖または分岐鎖アルキルアミノ基を表す] を表し；

R^{26} および R^{27} は、それぞれ独立して、水素原子、分岐または環を形成していてもよい炭素数1から6のアルキル基、分岐または環を形成していても

よい炭素数 1 から 6 のアルコキシ基、または炭素数 1 から 6 の直鎖または分岐鎖アルキルチオ基であり；

R^{28} は、水素原子、分岐または環を形成していてもよい炭素数 1 から 6 のアルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数 1 から 6 のアルコキシ基、または炭素数 1 から 6 の直鎖または分岐鎖アルキルチオ基であり；

R^{29} は、水素原子、水酸基、分岐または環を形成していてもよい炭素数 1 から 6 のアルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数 1 から 6 のアルコキシ基、アミノ基、あるいは核酸合成の保護基で保護されたアミノ基であり；

R^{31} 、 R^{32} 、および R^{33} は、それぞれ独立して、水素原子、分岐または環を形成していてもよい炭素数 1 から 6 のアルキル基、あるいは核酸合成のアミノ基の保護基であり；

R^{34} および R^{35} は、それぞれ独立して、水素原子、水酸基、分岐または環を形成していてもよい炭素数 1 から 6 のアルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数 1 から 6 のアルコキシ基、アミノ基、または核酸合成の保護基で保護されたアミノ基であり；

m は 0 から 2 の整数であり；

n は 0 から 1 の整数であり；

p は 0 から 1 の整数であり；

X^1 は、酸素原子、硫黄原子、またはアミノ基であり；そして

X^2 は酸素原子または硫黄原子である]

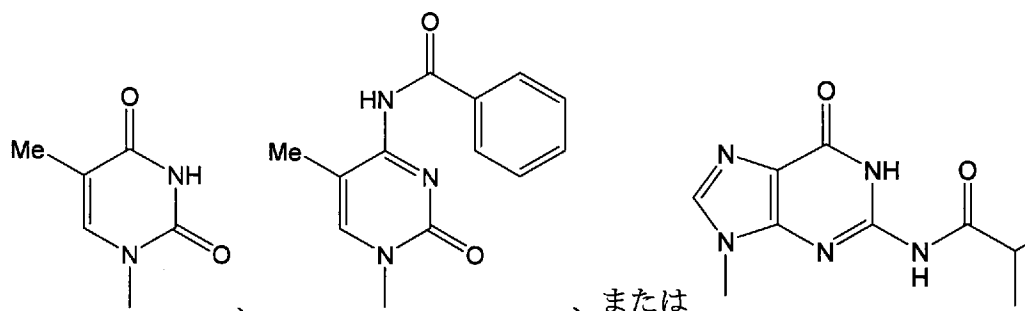
で表される二価の基を表す)である。

[0014] 1つの実施形態では、上記式(1)において、上記Baseは、6-アミノプリン-9-イル基、2, 6-ジアミノプリン-9-イル基、2-アミノ-6-クロロプリン-9-イル基、2-アミノ-6-フルオロプリン-9-イル基、2-アミノ-6-ブロモプリン-9-イル基、2-アミノ-6-ヒドロキシプリン-9-イル基、6-アミノ-2-メトキシプリン-9-イル基、6-アミノ-2-クロロプリン-9-イル基、6-アミノ-2-フルオ

ロプリン-9-イル基、2, 6-ジメトキシプリン-9-イル基、2, 6-ジクロロプリン-9-イル基、6-メルカプトプリン-9-イル基、2-オキソ-4-アミノ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル基、4-アミノ-2-オキソ-5-フルオロ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル基、4-アミノ-2-オキソ-5-クロロ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル基、2-オキソ-4-メトキシ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル基、2-オキソ-4-メルカプト-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル基、2-オキソ-4-ヒドロキシ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル基、2-オキソ-4-ヒドロキシ-5-メチル-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル基、または4-アミノ-5-メチル-2-オキソ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル基である。

[0015] 1つの実施形態では、上記式(1)において、上記Baseは、以下の式：

[0016] [化3]



[0017] で表される基である。

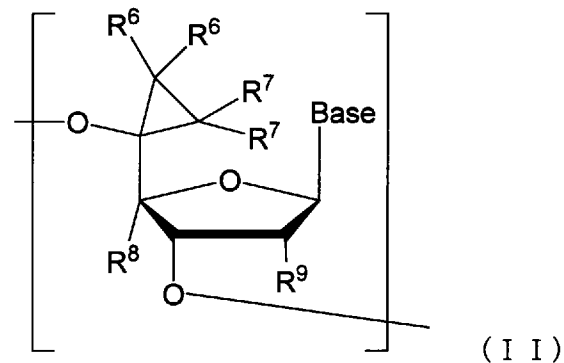
[0018] 1つの実施形態では、上記式(1)において、 R^6 および R^7 はともに水素原子である。

[0019] 1つの実施形態では、上記式(1)において、 R^8 および R^9 はともに水素原子である。

[0020] 本発明はまた、以下の式(11)で表されるヌクレオシド構造を少なくとも1つ含有するオリゴヌクレオチドまたはその薬理学上許容される塩：

[0021]

[化4]



[0022] (式中、

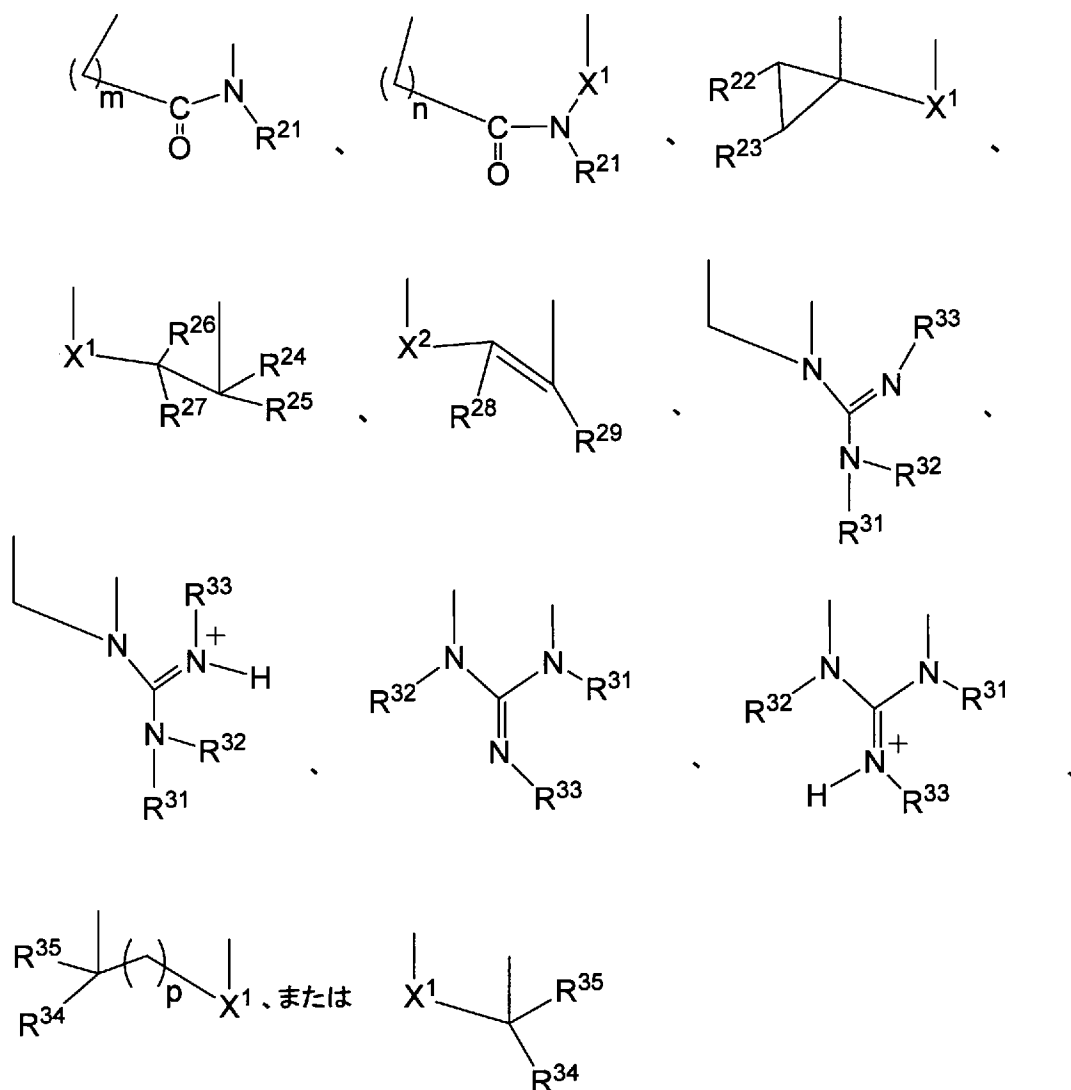
Baseは、 α 群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいプリン-9-イル基または2-オキソ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル基を表し、ここで、該 α 群は、水酸基、核酸合成の保護基で保護された水酸基、炭素数1から6の直鎖アルキル基、炭素数1から6の直鎖アルコキシ基、メルカプト基、核酸合成の保護基で保護されたメルカプト基、炭素数1から6の直鎖アルキルチオ基、アミノ基、炭素数1から6の直鎖アルキルアミノ基、核酸合成の保護基で保護されたアミノ基、およびハロゲン原子からなり、

R^6 および R^7 は、それぞれ独立して、水素原子、ハロゲン原子、またはメチル基であり、そして

R^8 は水素原子でありかつ R^9 は水素原子、ハロゲン原子、または炭素数1から6の直鎖アルコキシ基で置換されていてもよい炭素数1から6の直鎖アルコキシ基であるか、あるいは R^8 および R^9 は一緒になって以下の式：

[0023]

[化5]



[0024] [式中、

R^{21} は、水素原子、分岐または環を形成していてもよい炭素数1から6のアルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数2から6のアルケニル基、該 α 群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよくそしてヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数3から10のアリール基、該 α 群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよくそしてヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数3から12のアリール部分を有するアラルキル基、または核酸合成のアミノ基の保護基であり；

R^{22} および R^{23} は、それぞれ独立して、水素原子；ヘテロ原子を含んでもよい炭素数3から12のアリール基で置換されていてもよく、かつ分岐または環を形成していてもよい炭素数1から6のアルキル基；またはヘテロ原子を含んでもよい炭素数3から12のアリール部分を有するアラルキル基；であるか、あるいは

R^{22} および R^{23} は一緒になって、 $-(CH_2)_q-$ [式中、 q は2から5の整数である] を表し；

R^{24} および R^{25} は、それぞれ独立して、水素原子；水酸基；分岐または環を形成していてもよい炭素数1から6のアルキル基；分岐または環を形成していてもよい炭素数1から6のアルコキシ基；アミノ基；および核酸合成の保護基で保護されたアミノ基；からなる群から選択される基であるか、あるいは、

R^{24} および R^{25} は一緒になって、 $=C(R^{36})R^{37}$ [式中、 R^{36} および R^{37} は、それぞれ独立して、水素原子、水酸基、核酸合成の保護基で保護された水酸基、メルカプト基、核酸合成の保護基で保護されたメルカプト基、アミノ基、炭素数1から6の直鎖または分岐鎖アルコキシ基、炭素数1から6の直鎖または分岐鎖アルキルチオ基、炭素数1から6のシアノアルコキシ基、または炭素数1から6の直鎖または分岐鎖アルキルアミノ基を表す] を表し；

R^{26} および R^{27} は、それぞれ独立して、水素原子、分岐または環を形成していてもよい炭素数1から6のアルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数1から6のアルコキシ基、または炭素数1から6の直鎖または分岐鎖アルキルチオ基であり；

R^{28} は、水素原子、分岐または環を形成していてもよい炭素数1から6のアルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数1から6のアルコキシ基、または炭素数1から6の直鎖または分岐鎖アルキルチオ基であり；

R^{29} は、水素原子、水酸基、分岐または環を形成していてもよい炭素数1から6のアルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数1から6の

アルコキシ基、アミノ基、あるいは核酸合成の保護基で保護されたアミノ基であり；

R^{31} 、 R^{32} 、および R^{33} は、それぞれ独立して、水素原子、分岐または環を形成していてもよい炭素数1から6のアルキル基、あるいは核酸合成のアミノ基の保護基であり；

R^{34} および R^{35} は、それぞれ独立して、水素原子、水酸基、分岐または環を形成していてもよい炭素数1から6のアルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数1から6のアルコキシ基、アミノ基、または核酸合成の保護基で保護されたアミノ基であり；

m は0から2の整数であり；

n は0から1の整数であり；

p は0から1の整数であり；

X^1 は、酸素原子、硫黄原子、またはアミノ基であり；そして

X^2 は酸素原子または硫黄原子である]

で表される二価の基を表す)である。

[0025] 1つの実施形態では、上記式(11)において、 R^6 および R^7 はともに水素原子である。

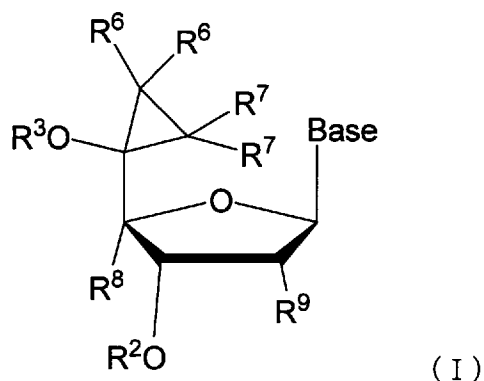
[0026] 1つの実施形態では、上記式(11)において、 R^8 および R^9 はともに水素原子である。

[0027] 本発明はまた、上記オリゴヌクレオチドまたはその薬理学上許容される塩の製造方法であって、

以下の式(1)で表される化合物またはその薬理学上許容される塩：

[0028]

[化6]



[0029] (式中、

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

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

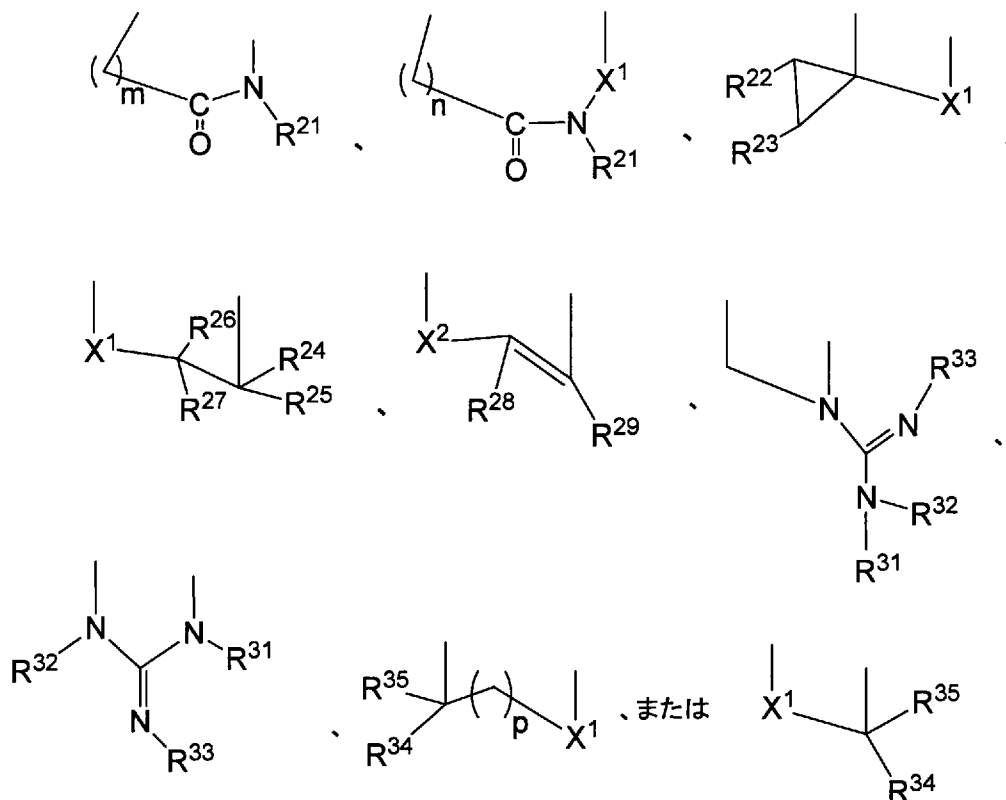
たリン酸基、 $-P(R^4)R^5$ [式中、 R^4 および R^5 は、それぞれ独立して、水酸基、核酸合成の保護基で保護された水酸基、メルカプト基、核酸合成の保護基で保護されたメルカプト基、アミノ基、炭素数1から6のアルコキシ基、炭素数1から6のアルキルチオ基、炭素数1から6のシアノアルコキシ基、または炭素数1から6のアルキル基を有するジアルキルアミノ基を表す]を表し、

R^6 および R^7 は、それぞれ独立して、水素原子、ハロゲン原子、またはメチル基であり、そして

R^8 は水素原子でありかつ R^9 は水素原子、ハロゲン原子；炭素数1から6の直鎖アルコキシ基で置換されていてもよい炭素数1から6の直鎖アルコキシ基；または $-OR^{10}$ [式中、 R^{10} は水素原子、または核酸合成の水酸基の保護基である]であるか、あるいは

R^8 および R^9 は一緒になって以下の式：

[0030] [化7]



[0031] [式中、

R^{21} は、水素原子、分岐または環を形成していてもよい炭素数1から6のアルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数2から6のアルケニル基、該 α 群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよくそしてヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数3から10のアリール基、該 α 群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよくそしてヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数3から12のアリール部分を有するアラルキル基、または核酸合成のアミノ基の保護基であり；

R^{22} および R^{23} は、それぞれ独立して、水素原子；ヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数3から12のアリール基で置換されていてもよく、かつ分岐または環を形成していてもよい炭素数1から6のアルキル基；またはヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数3から12のアリール部分を有するアラルキル基；であるか、あるいは

R^{22} および R^{23} は一緒になって、 $-(CH_2)_q-$ [式中、 q は2から5の整数である] を表し；

R^{24} および R^{25} は、それぞれ独立して、水素原子；水酸基；分岐または環を形成していてもよい炭素数1から6のアルキル基；分岐または環を形成していてもよい炭素数1から6のアルコキシ基；アミノ基；および核酸合成の保護基で保護されたアミノ基；からなる群から選択される基であるか、あるいは、

R^{24} および R^{25} は一緒になって、 $=C(R^{36})R^{37}$ [式中、 R^{36} および R^{37} は、それぞれ独立して、水素原子、水酸基、核酸合成の保護基で保護された水酸基、メルカプト基、核酸合成の保護基で保護されたメルカプト基、アミノ基、炭素数1から6の直鎖または分岐鎖アルコキシ基、炭素数1から6の直鎖または分岐鎖アルキルチオ基、炭素数1から6のシアノアルコキシ基、または炭素数1から6の直鎖または分岐鎖アルキルアミノ基を表す] を表し；

R^{26} および R^{27} は、それぞれ独立して、水素原子、分岐または環を形成し

ていてもよい炭素数 1 から 6 のアルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数 1 から 6 のアルコキシ基、または炭素数 1 から 6 の直鎖または分岐鎖アルキルチオ基であり；

R^{28} は、水素原子、分岐または環を形成していてもよい炭素数 1 から 6 のアルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数 1 から 6 のアルコキシ基、または炭素数 1 から 6 の直鎖または分岐鎖アルキルチオ基であり；

R^{29} は、水素原子、水酸基、分岐または環を形成していてもよい炭素数 1 から 6 のアルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数 1 から 6 のアルコキシ基、アミノ基、あるいは核酸合成の保護基で保護されたアミノ基であり；

R^{31} 、 R^{32} 、および R^{33} は、それぞれ独立して、水素原子、分岐または環を形成していてもよい炭素数 1 から 6 のアルキル基、あるいは核酸合成のアミノ基の保護基であり；

R^{34} および R^{35} は、それぞれ独立して、水素原子、水酸基、分岐または環を形成していてもよい炭素数 1 から 6 のアルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数 1 から 6 のアルコキシ基、アミノ基、または核酸合成の保護基で保護されたアミノ基であり；

m は 0 から 2 の整数であり；

n は 0 から 1 の整数であり；

p は 0 から 1 の整数であり；

X^1 は、酸素原子、硫黄原子、またはアミノ基であり；そして

X^2 は酸素原子または硫黄原子である]

で表される二価の基を表す)

を用いてオリゴヌクレオチドを合成する工程を包含する、方法である。

発明の効果

[0032] 本発明によれば、新規な 5' 位修飾ヌクレオシドおよびそれを用いたヌクレオチドが提供される。本発明の 5' 位修飾ヌクレオシドは、特定の臓器への集積などが懸念されるホスホロチオエート修飾核酸の代替とすることも可

能である。本発明の5'位修飾ヌクレオシドはまた、その製造においてジアステレオマーの分離工程を必要としないため、工業的生産性にも優れている。

図面の簡単な説明

[0033] [図1] 5' - T T T T T T T T X - 3' の配列の各種オリゴヌクレオチドを3' - エキソヌクレアーゼで処理した場合の、未切断オリゴヌクレオチドの割合の経時変化を示すグラフである。

[図2] 各種オリゴヌクレオチドによるジストロフィン遺伝子のエキソン58をスキップしたmRNA相対発現量を示すグラフである。

[図3] ASO1、ASO2、ASO3およびASO4の各被験オリゴヌクレオチドを投与した場合ならびに生理食塩水投与の場合のマウス肝臓中の標的遺伝子NR3C1のmRNA量を示すグラフであり、生理食塩水を投与した場合のmRNA量を100とした場合の相対値にて表す各種オリゴヌクレオチドによるアンチセンス効果を示すグラフである。

[図4] ASO1、ASO2、ASO3およびASO4の各被験オリゴヌクレオチドを投与した場合ならびに生理食塩水投与の場合の血液中のアスパラギン酸トランスアミナーゼ（AST）およびアラニントランスアミナーゼ（ALT）の活性を示すグラフであり、ASO1投与の場合のALT値およびAST値のそれぞれを100とした場合の相対値にて表す。

発明を実施するための形態

[0034] まず、本明細書中で用いられる用語を定義する。

[0035] 本明細書において、用語「炭素数1から6の直鎖アルキル基」は、炭素数1～6の任意の直鎖アルキル基をいい、具体的にはメチル基、エチル基、n-プロピル基、n-ブチル基、n-ペンチル基、またはn-ヘキシル基をいう。一方、用語「炭素数1から6のアルキル基」という場合は、炭素数1～6の任意の直鎖、分岐鎖または環状のアルキル基をいう。

[0036] 本明細書において、用語「炭素数1から6の直鎖アルコキシ基」は、炭素数1～6の任意の直鎖アルキル基を有するアルコキシ基を包含する。例えば

、メトキシ基、エトキシ基、*n*-プロポキシ基などが挙げられる。一方、用語「炭素数1から6のアルコキシ基」という場合は、炭素数1～6の任意の直鎖、分岐鎖または環状のアルコキシ基をいう。また、用語「炭素数1から6の直鎖アルコキシ基で置換されている炭素数1から6の直鎖アルコキシ基」という場合は、上記「炭素数1から6の直鎖アルコキシ基」、ならびに「炭素数1から6の直鎖アルコキシ基」を構成する1つまたはそれ以上の水素原子が、同一または異なっている他の「炭素数1から6の直鎖アルコキシ基」で置換されたアルコキシ基をいう。このような「炭素数1から6の直鎖アルコキシ基で置換されている炭素数1から6の直鎖アルコキシ基」としては、例えばメトキシ基、エトキシ基、*n*-プロポキシ基、メトキシメトキシ基、エトキシメトキシ基、*n*-プロポキシメトキシ基、メトキシエトキシ基（例えば2-メトキシエトキシ基）、エトキシエトキシ基（例えば2-エトキシエトキシ基）、および*n*-プロポキシエトキシ基が挙げられる。

[0037] 本明細書において、用語「炭素数1から6のシアノアルコキシ基」は、炭素数1～6の任意の直鎖、分岐鎖または環状のアルコキシ基における少なくとも1つの水素原子がシアノ基で置換された基をいう。

[0038] 本明細書において、用語「炭素数1から6の直鎖アルキルチオ基」は、炭素数1～6の任意の直鎖アルキル基を有するアルキルチオ基を包含する。例えば、メチルチオ基、エチルチオ基、*n*-プロピルチオ基などが挙げられる。一方、用語「炭素数1から6のアルキルチオ基」という場合は、炭素数1～6の任意の直鎖、分岐鎖または環状のアルキルチオ基をいう。

[0039] 本明細書において、用語「炭素数1から6の直鎖アルキルアミノ基」は、炭素数1～6の任意の直鎖アルキル基を有するアルキルアミノ基を1つまたは2つ有するアルキルアミノ基を包含する。例えば、メチルアミノ基、ジメチルアミノ基、エチルアミノ基、メチルエチルアミノ基、ジエチルアミノ基などが挙げられる。

[0040] 本明細書において、用語「分岐または環を形成している炭素数1か

ら7のアルキル基」は、炭素数1～7の任意の直鎖アルキル基、炭素数3～7の任意の分岐鎖アルキル基、および炭素数3～7の任意の環状アルキル基を包含する。単に、「低級アルキル基」という場合もある。例えば、炭素数1～7の任意の直鎖アルキル基としては、メチル基、エチル基、*n*-プロピル基、*n*-ブチル基、*n*-ペンチル基、*n*-ヘキシル基、および*n*-ヘプチル基が挙げられ、炭素数3～7の任意の分岐鎖アルキル基としては、イソプロピル基、イソブチル基、*tert*-ブチル基、イソペンチル基などが挙げられ、そして炭素数3～7の任意の環状アルキル基としては、シクロブチル基、シクロペンチル基、シクロヘキシル基などが挙げられる。

[0041] 本明細書において、用語「分岐または環を形成していてもよい炭素数2から7のアルケニル基」は、炭素数2～7の任意の直鎖アルケニル基、炭素数3～7の任意の分岐鎖アルケニル基、および炭素数3～7の任意の環状アルケニル基を包含する。単に、「低級アルケニル基」という場合もある。例えば、炭素数2～7の任意の直鎖アルケニル基としては、エテニル基、1-プロペニル基、2-プロペニル基、1-ブテニル基、2-ブテニル基、1-ペンテニル基、2-ペンテニル基、3-ペンテニル基、4-ペンテニル基、1-ヘキセニル基などが挙げられ、炭素数3～7の任意の分岐鎖アルケニル基としては、イソプロペニル基、1-メチル-1-プロペニル基、1-メチル-2-プロペニル基、2-メチル-1-プロペニル基、2-メチル-2-プロペニル基、1-メチル-2-ブテニル基などが挙げられ、そして炭素数3～7の任意の環状アルケニル基としては、シクロブテニル基、シクロペンテニル基、シクロヘキセニル基などが挙げられる。

[0042] 本明細書において、用語「ヘテロ原子を含んでもよい炭素数3から10のアリール基」は、炭化水素のみで構成された、炭素数6～10の任意のアリール基と、当アリール基の環構造を構成する少なくとも1つの炭素原子がヘテロ原子（例えば、窒素原子、酸素原子、および硫黄原子、ならびにこれらの組合せ）で置換された、炭素数3～12の任意のヘテロアリール基とを包含する。当該炭素数6～10のアリール基としては、フェニル基、ナフ

チル基、インデニル基、アズレニル基などが挙げられ、そして当該炭素数3～12の任意のヘテロアリール基としては、ピリジル基、ピロリル基、キノリル基、インドリル基、イミダゾリル基、フリル基、チエニル基などが挙げられる。

[0043] 本明細書において、用語「ヘテロ原子を含んでもよい炭素数3から12のアリール部分を有するアラルキル基」の例としては、ベンジル基、フェネチル基、ナフチルメチル基、3-フェニルプロピル基、2-フェニルプロピル基、4-フェニルブチル基、2-フェニルブチル基、ピリジルメチル基、インドリルメチル基、フリルメチル基、チエニルメチル基、ピロリルメチル基、2-ピリジリエチル基、1-ピリジリエチル基、3-チエニルプロピル基などが挙げられる。

[0044] 本明細書において、用語「アシル基」の例としては、脂肪族アシル基および芳香族アシル基が挙げられる。具体的には、脂肪族アシル基の例としては、ホルミル基、アセチル基、プロピオニル基、ブチリル基、イソブチリル基、ペンタノイル基、ピバロイル基、バレリル基、イソバレリル基、オクタノイル基、ノナノイル基、デカノイル基、3-メチルノナノイル基、8-メチルノナノイル基、3-エチルオクタノイル基、3,7-ジメチルオクタノイル基、ウンデカノイル基、ドデカノイル基、トリデカノイル基、テトラデカノイル基、ペンタデカノイル基、ヘキサデカノイル基、1-メチルペンタデカノイル基、14-メチルペンタデカノイル基、13,13-ジメチルテトラデカノイル基、ヘプタデカノイル基、15-メチルヘキサデカノイル基、オクタデカノイル基、1-メチルヘプタデカノイル基、ノナデカノイル基、アイコサノイル基およびヘナイコサノイル基のようなアルキルカルボニル基；スクシノイル基、グルタロイル基、アジポイル基のようなカルボキシ化アルキルカルボニル基；クロロアセチル基、ジクロロアセチル基、トリクロロアセチル基、トリフルオロアセチル基のようなハロゲノ低級アルキルカルボニル基；メトキシアセチル基のような低級アルコキシ低級アルキルカルボニル基；(E)-2-メチル-2-ブテノイル基のような不飽和アルキルカル

ボニル基が挙げられる。また、芳香族アシル基の例としては、ベンゾイル基、 α -ナフトイル基、 β -ナフトイル基のようなアリールカルボニル基；2-ブロモベンゾイル基、4-クロロベンゾイル基のようなハロゲノアリールカルボニル基；2, 4, 6-トリメチルベンゾイル基、4-トルオイル基のような低級アルキル化アリールカルボニル基；4-アニソイル基のような低級アルコキシ化アリールカルボニル基；2-カルボキシベンゾイル基、3-カルボキシベンゾイル基、4-カルボキシベンゾイル基のようなカルボキシ化アリールカルボニル基；4-ニトロベンゾイル基、2-ニトロベンゾイル基のようなニトロ化アリールカルボニル基；2-(メトキシカルボニル)ベンゾイル基のような低級アルコキシカルボニル化アリールカルボニル基；4-フェニルベンゾイル基のようなアリール化アリールカルボニル基などが挙げられる。好適には、ホルミル基、アセチル基、プロピオニル基、ブチリル基、イソブチリル基、ペンタノイル基、ピバロイル基、ベンゾイル基である。

[0045] 本明細書において、用語「シリル基」の例としては、トリメチルシリル基、トリエチルシリル基、イソプロピルジメチルシリル基、*t*-ブチルジメチルシリル基、メチルジイソプロピルシリル基、メチルジ-*t*-ブチルシリル基、トリイソプロピルシリル基のようなトリ低級アルキルシリル基；ジフェニルメチルシリル基、ブチルジフェニルブチルシリル基、ジフェニルイソプロピルシリル基、フェニルジイソプロピルシリル基のような1～2個のアリール基で置換されたトリ低級アルキルシリル基などが挙げられる。好適には、トリメチルシリル基、トリエチルシリル基、トリイソプロピルシリル基、*t*-ブチルジメチルシリル基、*t*-ブチルジフェニルシリル基であり、さらに好適にはトリメチルシリル基である。

[0046] 本明細書において、用語「ハロゲン原子」としては、例えば、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、またはヨウ素原子が挙げられる。好適には、フッ素原子または塩素原子である。

[0047] 本明細書において、用語「核酸合成のアミノ基の保護基」、「核酸合成の

水酸基の保護基」、「核酸合成の保護基で保護された水酸基」、「核酸合成の保護基で保護されたリン酸基」、「核酸合成の保護基で保護されたメルカプト基」の「保護基」とは、核酸合成の際に安定してアミノ基、水酸基、リン酸基またはメルカプト基を保護し得るものであれば、特に制限されない。具体的には、酸性または中性条件で安定であり、加水素分解、加水分解、電気分解、および光分解のような化学的方法により開裂し得る保護基のことをいう。このような保護基としては、例えば、低級アルキル基、低級アルケニル基、アシル基、テトラヒドロピラニルまたはテトラヒドロチオピラニル基、テトラヒドロフラニルまたはテトラヒドロチオフラニル基、シリル基、低級アルコキシメチル基、低級アルコキシ化低級アルコキシメチル基、ハロゲン低級アルコキシメチル基、低級アルコキシ化エチル基、ハロゲン化エチル基、1～3個のアリール基で置換されたメチル基、「低級アルキル基、低級アルコキシ基、ハロゲン原子またはシアノ基でアリール環が置換された1～3個のアリール基で置換されたメチル基」、低級アルコキシカルボニル基、「ハロゲン原子、低級アルコキシ基またはニトロ基で置換されたアリール基」、「ハロゲン原子またはトリ低級アルキルシリル基で置換された低級アルコキシカルボニル基」、アルケニルオキシカルボニル基、「低級アルコキシまたはニトロ基でアリール環が置換されていてもよいアラルキルオキシカルボニル基」などが挙げられる。

[0048] より具体的には、テトラヒドロピラニル基またはテトラヒドロチオピラニル基としては、テトラヒドロピラン-2-イル基、3-ブロモテトラヒドロピラン-2-イル基、4-メトキシテトラヒドロピラン-4-イル基、テトラヒドロチオピラン-4-イル基、4-メトキシテトラヒドロチオピラン-4-イル基などが挙げられる。テトラヒドロフラニル基またはテトラヒドロチオフラニル基としては、テトラヒドロフラン-2-イル基、テトラヒドロチオフラン-2-イル基が挙げられる。低級アルコキシメチル基としては、メトキシメチル基、1,1-ジメチル-1-メトキシメチル基、エトキシメチル基、プロポキシメチル基、イソプロポキシメチル基、ブトキシメチル基

、*t*-ブトキシメチル基などが挙げられる。低級アルコキシ化低級アルコキシメチル基としては、2-メトキシエトキシメチル基などが挙げられる。ハロゲン低級アルコキシメチル基としては、2, 2, 2-トリクロロエトキシメチル基、ビス(2-クロロエトキシ)メチル基などが挙げられる。低級アルコキシ化エチル基としては、1-エトキシエチル基、1-(イソプロポキシ)エチル基などが挙げられる。ハロゲン化エチル基としては、2, 2, 2-トリクロロエチル基などが挙げられる。1~3個のアリール基で置換されたメチル基としては、ベンジル基、 α -ナフチルメチル基、 β -ナフチルメチル基、ジフェニルメチル基、トリフェニルメチル基、 α -ナフチルジフェニルメチル基、9-アンスリルメチル基などが挙げられる。「低級アルキル基、低級アルコキシ基、ハロゲン原子またはシアノ基でアリール環が置換された1~3個のアリール基で置換されたメチル基」としては、4-メチルベンジル基、2, 4, 6-トリメチルベンジル基、3, 4, 5-トリメチルベンジル基、4-メトキシベンジル基、4-メトキシフェニルジフェニルメチル基、4, 4'-ジメトキシトリフェニルメチル基、2-ニトロベンジル基、4-ニトロベンジル基、4-クロロベンジル基、4-ブロモベンジル基、4-シアノベンジル基などが挙げられる。低級アルコキシカルボニル基としては、メトキシカルボニル基、エトキシカルボニル基、*t*-ブトキシカルボニル基、イソブトキシカルボニル基などが挙げられる。「ハロゲン原子、低級アルコキシ基またはニトロ基で置換されたアリール基」としては、4-クロロフェニル基、2-フロロフェニル基、4-メトキシフェニル基、4-ニトロフェニル基、2, 4-ジニトロフェニル基などが挙げられる。「ハロゲン原子またはトリ低級アルキルシリル基で置換された低級アルコキシカルボニル基」としては、2, 2, 2-トリクロロエトキシカルボニル基、2-トリメチルシリルエトキシカルボニル基などが挙げられる。アルケニルオキシカルボニル基としては、ビニルオキシカルボニル基、アリールオキシカルボニル基などが挙げられる。「低級アルコキシまたはニトロ基でアリール環が置換されていてもよいアラルキルオキシカルボニル基」としては、ベンジル

オキシカルボニル基、4-メトキシベンジルオキシカルボニル基、3, 4-ジメトキシベンジルオキシカルボニル基、2-ニトロベンジルオキシカルボニル基、4-ニトロベンジルオキシカルボニル基などが挙げられる。

[0049] 1つの実施形態では、「核酸合成の水酸基の保護基」としては、例えば脂肪族アシル基、芳香族アシル基、1～3個のアリール基で置換されたメチル基、「低級アルキル、低級アルコキシ、ハロゲン、シアノ基でアリール環が置換された1～3個のアリール基で置換されたメチル基」、およびシリル基が挙げられる。あるいは、1つの実施形態では、「核酸合成の水酸基の保護基」としては、例えばアセチル基、ベンゾイル基、ベンジル基、p-メトキシベンゾイル基、ジメトキシトリチル基、モノメトキシトリチル基、tert-ブチルジフェニルシリル基、tert-ブチルジメチルシリル (TBDM) 基、[(トリイソプロピルシリル) オキシ] メチル (TOM) 基、[(2-ニトロベンジル) オキシ] メチル (NBOM) 基、ビス(アセトキシエトキシ) メチルエーテル (ACE) 基、テトラヒドロ-4-メトキシ-2H-ピラン-2-イル (Mthp) 基、1-(2-シアノエトキシ) エチル (CEE) 基、2-シアノエトキシメチル (CEM) 基、tert-ブチルジチオメチル (DTM) 基、2-(4-トリルスルホニル) エトキシメチル (TEM) 基、および4-(N-ジクロロアセチル-N-メチルアミノ) ベンジルオキシメチル (4-MABOM) 基が挙げられる。

[0050] 1つの実施形態では、「核酸合成の保護基で保護された水酸基」の保護基としては、例えば脂肪族アシル基、芳香族アシル基、「1～3個のアリール基で置換されたメチル基」、「ハロゲン原子、低級アルコキシ基またはニトロ基で置換されたアリール基」、低級アルキル基、および低級アルケニル基が挙げられる。あるいは、1つの実施形態では、「核酸合成の保護基で保護された水酸基」の保護基としては、例えばベンゾイル基、ベンジル基、2-クロロフェニル基、4-クロロフェニル基、および2-プロペニル基が挙げられる。

[0051] 1つの実施形態では、「核酸合成のアミノ基の保護基」としては、例えば

アシル基、好適には、ベンゾイル基が挙げられる。

[0052] 1つの実施形態では、「核酸合成の保護基で保護されたリン酸基」の「保護基」としては、例えば低級アルキル基、シアノ基で置換された低級アルキル基、アラルキル基、「ニトロ基またはハロゲン原子でアリール環が置換されたアラルキル基」、および「低級アルキル基、ハロゲン原子、またはニトロ基で置換されたアリール基」が挙げられる。あるいは、1つの実施形態では、「核酸合成の保護基で保護されたリン酸基」の「保護基」としては、例えば2-シアノエチル基、2, 2, 2-トリクロロエチル基、ベンジル基、2-クロロフェニル基、および4-クロロフェニル基が挙げられる。

[0053] 1つの実施形態では、「核酸合成の保護基で保護されたメルカプト基」の「保護基」としては、例えば脂肪族アシル基および芳香族アシル基、好適には、ベンゾイル基が挙げられる。

[0054] 本明細書において、 $-P(R^4)R^5$ [式中、 R^4 および R^5 は、それぞれ独立して、水酸基、核酸合成の保護基で保護された水酸基、メルカプト基、核酸合成の保護基で保護されたメルカプト基、アミノ基、炭素数1から6のアルコキシ基、炭素数1から6のアルキルチオ基、炭素数1から6のシアノアルコキシ基、または炭素数1から6のアルキル基を有するジアルキルアミノ基を表す] で表される基のうち、 R^4 が OR^{4a} でありそして R^5 が NR^{5a} である基は、「ホスホロアミダイト基」という（ここで、 R^{4a} は例えば炭素数1から6のシアノアルコキシ基であり、そして R^{5a} は例えば炭素数1から6のアルキル基である）。ホスホロアミダイト基としては、好適には、式 $-P(OC_2H_4CN)(N(iPr)_2)$ で表される基、または式 $-P(OC_2H_3)(N(iPr)_2)$ で表される基が挙げられる。ここで、 iPr はイソプロピル基を表す。

[0055] 本明細書において、用語「ヌクレオシド」および「ヌクレオシド類縁体」とは、プリンまたはピリミジン塩基と糖とが結合した「ヌクレオシド」のうち非天然型のもの、ならびに、プリンおよびピリミジン以外の芳香族複素環および芳香族炭化水素環でプリンまたはピリミジン塩基との代用が可能なも

のと糖が結合したものをいう。

[0056] 本明細書において、用語「人工オリゴヌクレオチド」および「オリゴヌクレオチド類縁体」とは、同一または異なる「ヌクレオシド」または「ヌクレオシド類縁体」がリン酸ジエステル結合で例えば2～50個結合した「オリゴヌクレオチド」の非天然型誘導体をいう。そのような類縁体としては、好適には、糖部分が修飾された糖誘導体；リン酸ジエステル部分がチオエート化されたチオエート誘導体；末端のリン酸部分がエステル化されたエステル体；プリン塩基上のアミノ基がアミド化されたアミド体が挙げられ、さらに好適には、糖部分が修飾された糖誘導体が挙げられる。

[0057] 本明細書において、用語「その塩」とは、本発明の式(1)または(11)で表される化合物の塩をいう。そのような塩としては、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、リチウム塩のようなアルカリ金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩のようなアルカリ土類金属塩、アルミニウム塩、鉄塩、亜鉛塩、銅塩、ニッケル塩、コバルト塩などの金属塩；アンモニウム塩のような無機塩、*t*-オクチルアミン塩、ジベンジルアミン塩、モルホリン塩、グルコサミン塩、フェニルグリシンアルキルエステル塩、エチレンジアミン塩、*N*-メチルグルカミン塩、グアニジン塩、ジエチルアミン塩、トリエチルアミン塩、ジシクロヘキシルアミン塩、*N*, *N'*-ジベンジルエチレンジアミン塩、クロロプロカイン塩、プロカイン塩、ジエタノールアミン塩、*N*-ベンジルーフェネチルアミン塩、ピペラジン塩、テトラメチルアンモニウム塩、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン塩のような有機塩等のアミン塩；フッ化水素酸塩、塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩のようなハロゲン原子化水素酸塩、硝酸塩、過塩素酸塩、硫酸塩、リン酸塩等の無機酸塩；メタンスルホン酸塩、トリフルオロメタンスルホン酸塩、エタンスルホン酸塩のような低級アルカンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、*p*-トルエンスルホン酸塩のようなアリールスルホン酸塩、酢酸塩、リンゴ酸塩、フマル酸塩、コハク酸塩、クエン酸塩、酒石酸塩、シュウ酸塩、マレイン酸塩等の有機酸塩；および、グリシン塩、リジン塩、アルギニン塩、オルニチン塩、

グルタミン酸塩、アスパラギン酸塩のようなアミノ酸塩が挙げられる。

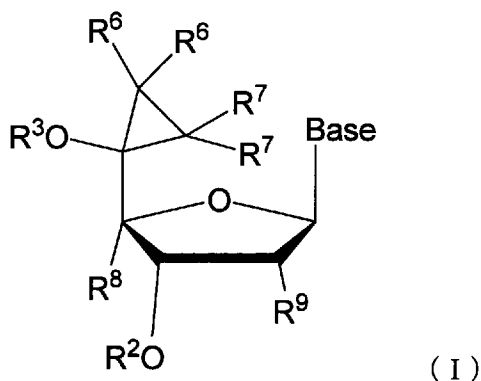
[0058] 本明細書において、用語「その薬理学上許容される塩」としては、本発明の式(1)で表されるヌクレオシド構造を少なくとも1つ含有するオリゴヌクレオチド類縁体の塩をいう。そのような塩としては、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、リチウム塩のようなアルカリ金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩のようなアルカリ土類金属塩、アルミニウム塩、鉄塩、亜鉛塩、銅塩、ニッケル塩、コバルト塩などの金属塩；アンモニウム塩のような無機塩、*t*-オクチルアミン塩、ジベンジルアミン塩、モルホリン塩、グルコサミン塩、フェニルグリシンアルキルエステル塩、エチレンジアミン塩、*N*-メチルグルカミン塩、グアニジン塩、ジエチルアミン塩、トリエチルアミン塩、ジシクロヘキシルアミン塩、*N,N'*-ジベンジルエチレンジアミン塩、クロロプロカイン塩、プロカイン塩、ジエタノールアミン塩、*N*-ベンジルーフェネチルアミン塩、ピペラジン塩、テトラメチルアンモニウム塩、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン塩のような有機塩等のアミン塩；フッ化水素酸塩、塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩のようなハロゲン原子化水素酸塩、硝酸塩、過塩素酸塩、硫酸塩、リン酸塩等の無機酸塩；メタンスルホン酸塩、トリフルオロメタンスルホン酸塩、エタンスルホン酸塩のような低級アルカンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、*p*-トルエンスルホン酸塩のようなアリールスルホン酸塩、酢酸塩、リンゴ酸塩、フマル酸塩、コハク酸塩、クエン酸塩、酒石酸塩、シュウ酸塩、マレイン酸塩等の有機酸塩；および、グリシン塩、リジン塩、アルギニン塩、オルニチン塩、グルタミン酸塩、アスパラギン酸塩のようなアミノ酸塩が挙げられる。

[0059] 以下、本発明について詳述する。

[0060] 本発明の5'位修飾ヌクレオシドは、以下の式(1)：

[0061]

[化8]



[0062] (式中、

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

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

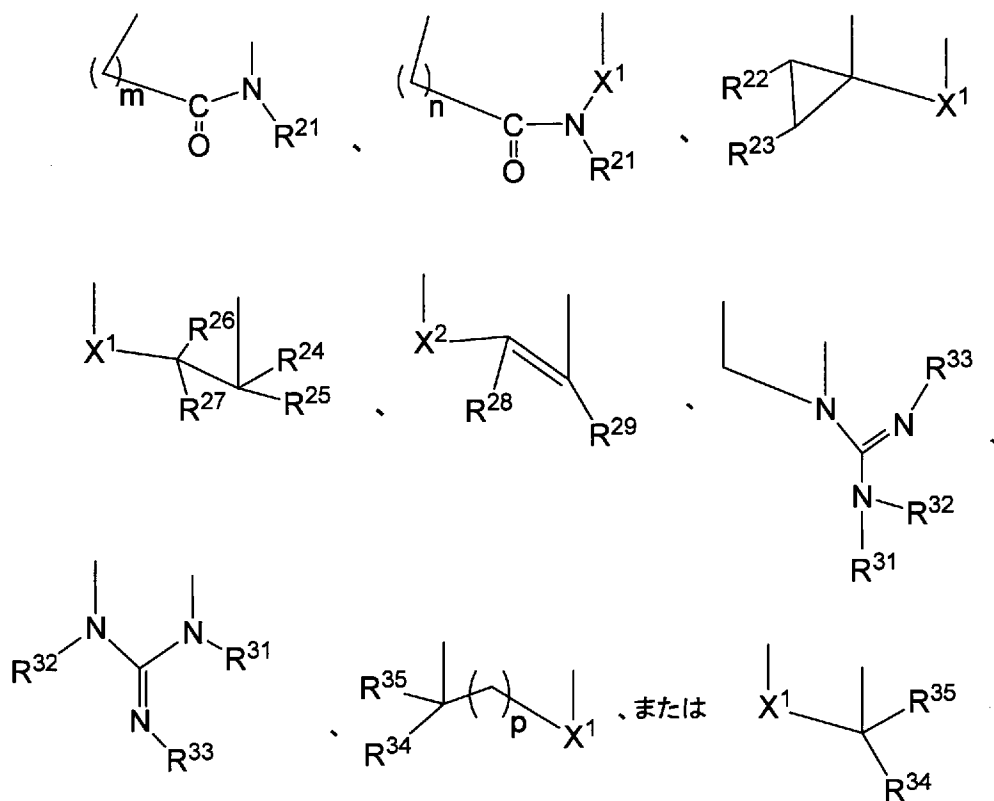
水酸基、核酸合成の保護基で保護された水酸基、メルカプト基、核酸合成の保護基で保護されたメルカプト基、アミノ基、炭素数 1 から 6 のアルコキシ基、炭素数 1 から 6 のアルキルチオ基、炭素数 1 から 6 のシアノアルコキシ基、または炭素数 1 から 6 のアルキル基を有するジアルキルアミノ基を表す] を表し、

R^6 および R^7 は、それぞれ独立して、水素原子、ハロゲン原子、またはメチル基であり、そして

R^8 は水素原子でありかつ R^9 は水素原子、ハロゲン原子；炭素数 1 から 6 の直鎖アルコキシ基で置換されていてもよい炭素数 1 から 6 の直鎖アルコキシ基；または $-OR^{10}$ [式中、 R^{10} は水素原子、または核酸合成の水酸基の保護基である] であるか、あるいは

R^8 および R^9 は一緒になって以下の式：

[0063] [化9]



[0064] [式中、

R^{21} は、水素原子、分岐または環を形成していてもよい炭素数1から6のアルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数2から6のアルケニル基、該 α 群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよくそしてヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数3から10のアリール基、該 α 群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよくそしてヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数3から12のアリール部分を有するアラルキル基、または核酸合成のアミノ基の保護基であり；

R^{22} および R^{23} は、それぞれ独立して、水素原子；ヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数3から12のアリール基で置換されていてもよく、かつ分岐または環を形成していてもよい炭素数1から6のアルキル基；またはヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数3から12のアリール部分を有するアラルキル基；であるか、あるいは

R^{22} および R^{23} は一緒になって、 $-(CH_2)_q-$ [式中、 q は2から5の整数である] を表し；

R^{24} および R^{25} は、それぞれ独立して、水素原子；水酸基；分岐または環を形成していてもよい炭素数1から6のアルキル基；分岐または環を形成していてもよい炭素数1から6のアルコキシ基；アミノ基；および核酸合成の保護基で保護されたアミノ基；からなる群から選択される基であるか、あるいは、

R^{24} および R^{25} は一緒になって、 $=C(R^{36})R^{37}$ [式中、 R^{36} および R^{37} は、それぞれ独立して、水素原子、水酸基、核酸合成の保護基で保護された水酸基、メルカプト基、核酸合成の保護基で保護されたメルカプト基、アミノ基、炭素数1から6の直鎖または分岐鎖アルコキシ基、炭素数1から6の直鎖または分岐鎖アルキルチオ基、炭素数1から6のシアノアルコキシ基、または炭素数1から6の直鎖または分岐鎖アルキルアミノ基を表す] を表し；

R^{26} および R^{27} は、それぞれ独立して、水素原子、分岐または環を形成していてもよい炭素数1から6のアルキル基、分岐または環を形成していても

よい炭素数 1 から 6 のアルコキシ基、または炭素数 1 から 6 の直鎖または分岐鎖アルキルチオ基であり；

R^{28} は、水素原子、分岐または環を形成していてもよい炭素数 1 から 6 のアルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数 1 から 6 のアルコキシ基、または炭素数 1 から 6 の直鎖または分岐鎖アルキルチオ基であり；

R^{29} は、水素原子、水酸基、分岐または環を形成していてもよい炭素数 1 から 6 のアルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数 1 から 6 のアルコキシ基、アミノ基、あるいは核酸合成の保護基で保護されたアミノ基であり；

R^{31} 、 R^{32} 、および R^{33} は、それぞれ独立して、水素原子、分岐または環を形成していてもよい炭素数 1 から 6 のアルキル基、あるいは核酸合成のアミノ基の保護基であり；

R^{34} および R^{35} は、それぞれ独立して、水素原子、水酸基、分岐または環を形成していてもよい炭素数 1 から 6 のアルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数 1 から 6 のアルコキシ基、アミノ基、または核酸合成の保護基で保護されたアミノ基であり；

m は 0 から 2 の整数であり；

n は 0 から 1 の整数であり；

p は 0 から 1 の整数であり；

X^1 は、酸素原子、硫黄原子、またはアミノ基であり；そして

X^2 は酸素原子または硫黄原子である]

で表される二価の基を表す) で表される化合物またはその塩である。

[0065] 上記式 (1) において、「Base」は、例えばプリン塩基（すなわち、プリン-9-イル基）またはピリミジン塩基（すなわち、2-オキソ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル基）である。これらの塩基は、水酸基、炭素数 1 から 6 の直鎖アルキル基、炭素数 1 から 6 の直鎖アルコキシ基、メルカプト基、炭素数 1 から 6 の直鎖アルキルチオ基、アミノ基、炭素数 1 から 6 の直鎖アルキルアミノ基、およびハロゲン原子からなる α 群より選択さ

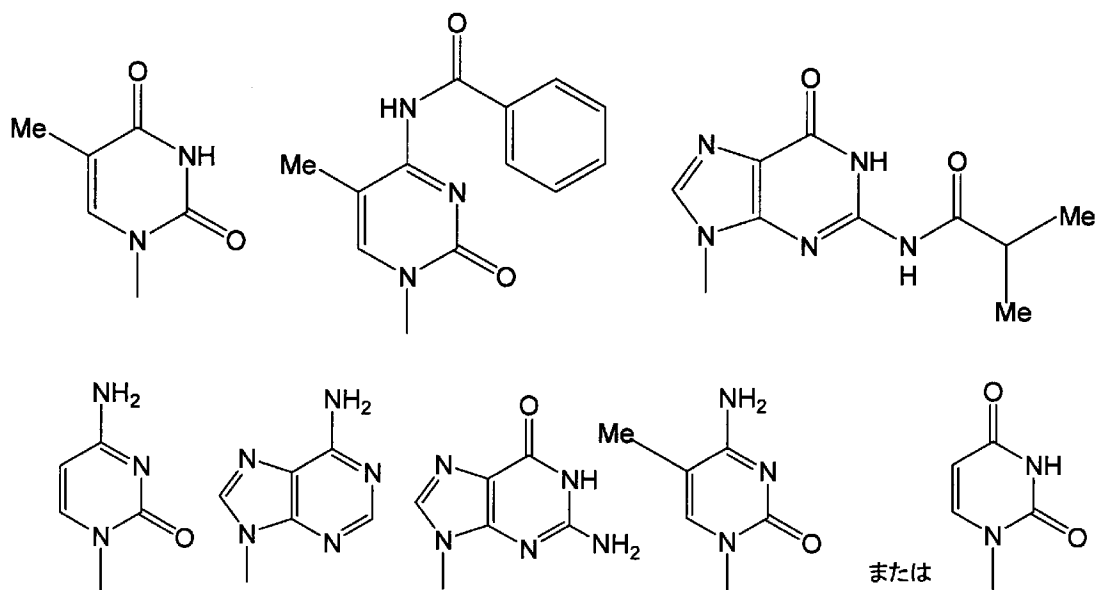
れる任意の置換基を1以上有していてもよい。

[0066] 上記「Base」の具体例としては、アデニル基、グアニル基、シトシニル基、ウラシニル基、およびチミニル基、ならびに6-アミノプリン-9-イル基、2, 6-ジアミノプリン-9-イル基、2-アミノ-6-クロロプリン-9-イル基、2-アミノ-6-フルオロプリン-9-イル基、2-アミノ-6-ブロモプリン-9-イル基、2-アミノ-6-ヒドロキシプリン-9-イル基、6-アミノ-2-メトキシプリン-9-イル基、6-アミノ-2-クロロプリン-9-イル基、6-アミノ-2-フルオロプリン-9-イル基、2, 6-ジメトキシプリン-9-イル基、2, 6-ジクロロプリン-9-イル基、6-メルカプトプリン-9-イル基、2-オキソ-4-アミノ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル基、4-アミノ-2-オキソ-5-フルオロ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル基、4-アミノ-2-オキソ-5-クロロ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル基、2-オキソ-4-メトキシ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル基、2-オキソ-4-メルカプト-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル基、2-オキソ-4-ヒドロキシ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル基、2-オキソ-4-ヒドロキシ-5-メチル-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル基、および4-アミノ-5-メチル-2-オキソ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル基が挙げられる。

[0067] あるいは、「Base」は、核酸医薬への導入という観点から、以下の構造式：

[0068]

[化10]



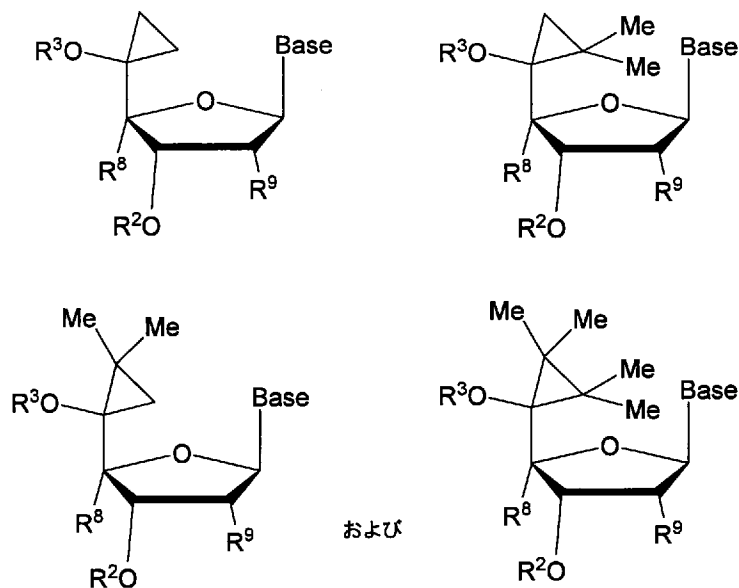
[0069] でそれぞれ表される基、ならびに 2-オキソ-4-ヒドロキシ-5-メチル-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル基、2-オキソ-4-アミノ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル基、6-アミノプリン-9-イル基、2-アミノ-6-ヒドロキシプリン-9-イル基、4-アミノ-5-メチル-2-オキソ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル基、および 2-オキソ-4-ヒドロキシ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル基が好ましい。「Base」はまた、オリゴヌクレオチドの合成の際には、上記基を構成する水酸基およびアミノ基が保護基により保護されているものであることが好ましい。

[0070] 本発明の 5' 位修飾ヌクレオシドでは、式 (1) の 5' 位のシクロプロパン部分を構成する 1 つの炭素原子に 2 つの同一の R^6 が結合し、かつ他の 1 つの炭素原子に 2 つの同一の R^7 が結合している。このような構造を有していることにより、本発明のヌクレオシドは当該 5' 位においてジアステレオマーの構造を有し得ず、従来の 5' 位に置換基を導入した人工核酸と比較して、その合成の際にジアステレオマーの分離を行う必要性から解放される。

[0071] このような R^6 および R^7 の組合せの観点において、上記式 (1) の例とし

ては：

[0072] [化11]

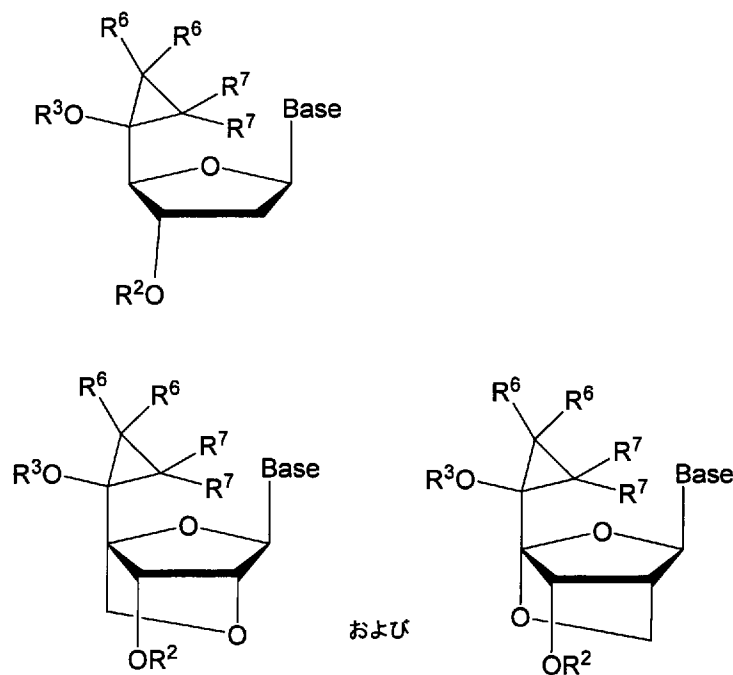


[0073] (式中、Base、 R^2 、 R^3 、 R^8 および R^9 は、上記式(1)で定義されるものと同様である)が挙げられる。本発明においては、上記式(1)の R^6 および R^7 がともに水素原子であることが好ましい。

[0074] さらに、本発明の5'位修飾ヌクレオシドでは、式(1)の2'位および4'位は、以下：

[0075]

[化12]



[0076] (式中、Base、 R^2 、 R^3 、 R^6 および R^7 は、上記式(1)で定義されるものと同様である)のように、 R^8 と R^9 とが一緒になって架橋構造を有していてもよく、あるいは R^8 および R^9 のそれぞれが水素原子であってもよい。本発明の1つの実施形態では、上記式(1)の R^8 および R^9 がともに水素原子である。

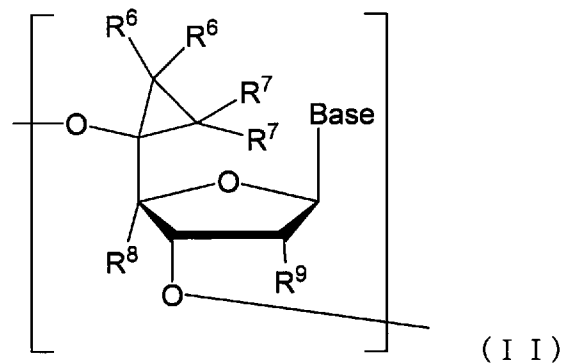
[0077] 本発明の5'位修飾ヌクレオシドは、式(1)の5'位にシクロプロパン部分が導入されていることにより、後述するオリゴヌクレオチドにおけるヌクレアーゼ耐性能が向上する。また、このようなシクロプロパン基における環のひずみは、糖部のコンホメーションに直接的に影響を及ぼすものである。このため、本発明の5'位修飾ヌクレオシドは、得られたオリゴヌクレオチドに対し、当該影響によるssRNAとの結合親和性をも一層向上させ得る。

[0078] 本発明において、オリゴヌクレオチドは、このような式(1)の5'位修飾ヌクレオシドを用い、例えば、当該分野において周知のアミダイト法、またはM. Kuwaharaら、Nucleic Acids Res., 2008年、36巻、13号、4257-4265

頁に記載されるような三リン酸化を経て容易に製造することができる。

[0079] 本発明のオリゴヌクレオチドまたはその薬理学上許容される塩（以下、これらをまとめて「本発明のオリゴヌクレオチド」を言うことがある）は、以下の式（I I）：

[0080] [化13]



[0081] （式中、

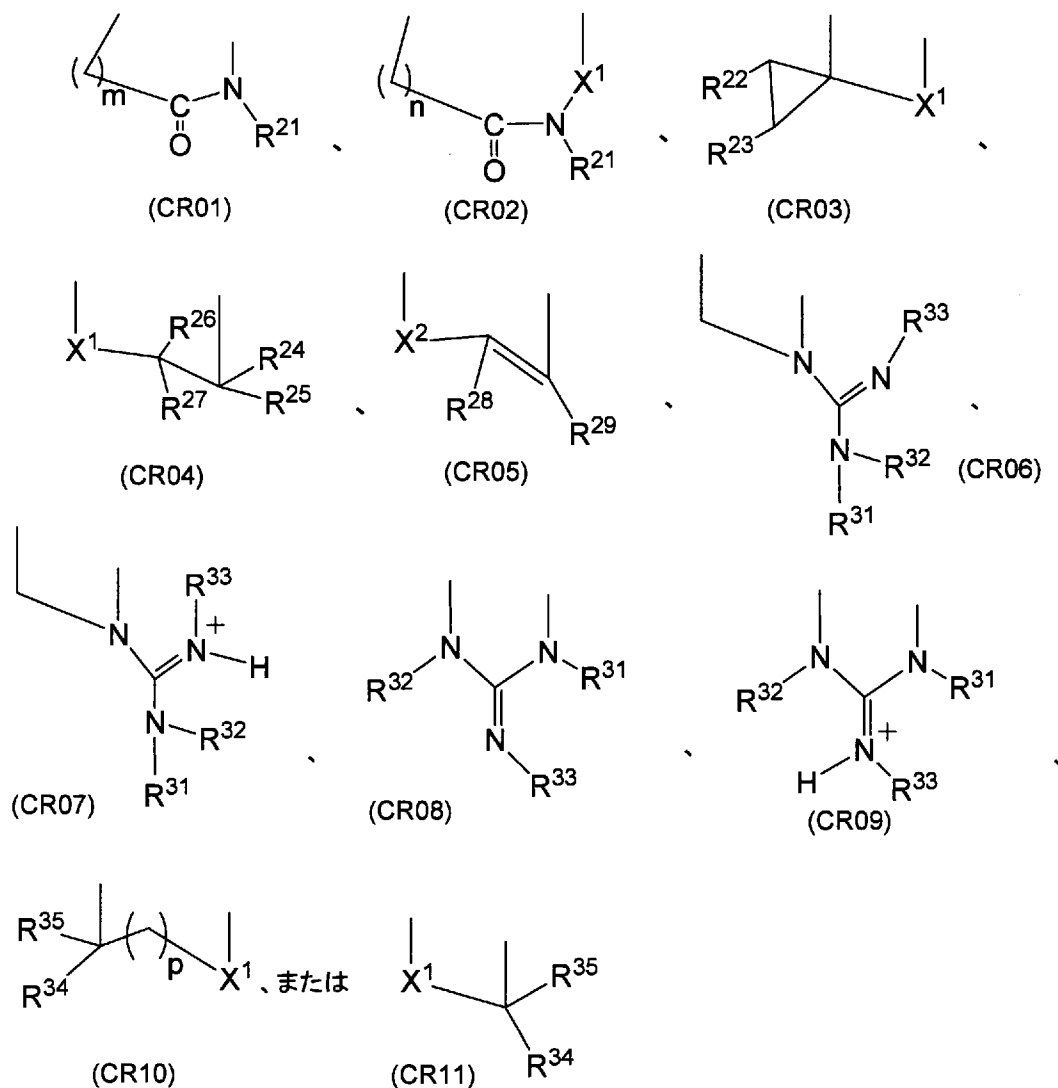
Baseは、 α 群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいプリン-9-イル基または2-オキソ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル基を表し、ここで、該 α 群は、水酸基、核酸合成の保護基で保護された水酸基、炭素数1から6の直鎖アルキル基、炭素数1から6の直鎖アルコキシ基、メルカプト基、核酸合成の保護基で保護されたメルカプト基、炭素数1から6の直鎖アルキルチオ基、アミノ基、炭素数1から6の直鎖アルキルアミノ基、核酸合成の保護基で保護されたアミノ基、およびハロゲン原子からなり、

R^6 および R^7 は、それぞれ独立して、水素原子、ハロゲン原子、またはメチル基であり、そして

R^8 は水素原子でありかつ R^9 は水素原子、ハロゲン原子、または炭素数1から6の直鎖アルコキシ基で置換されていてもよい炭素数1から6の直鎖アルコキシ基であるか、あるいは R^8 および R^9 は一緒になって以下の式（C R O 1）～（C R 1 1）：

[0082]

[化14]



[0083] [式中、

R^{21} は、水素原子、分岐または環を形成していてもよい炭素数1から6のアルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数2から6のアルケニル基、該 α 群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよくそしてヘテロ原子を含んでもよい炭素数3から10のアリール基、該 α 群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよくそしてヘテロ原子を含んでもよい炭素数3から12のアリール部分を有するアラルキル基、または核酸合成のアミノ基の保護基であり；

R^{22} および R^{23} は、それぞれ独立して、水素原子；ヘテロ原子を含んでもよい炭素数3から12のアリール基で置換されていてもよく、かつ分岐または環を形成していてもよい炭素数1から6のアルキル基；またはヘテロ原子を含んでもよい炭素数3から12のアリール部分を有するアラルキル基；であるか、あるいは

R^{22} および R^{23} は一緒になって、 $-(CH_2)_q-$ [式中、 q は2から5の整数である] を表し；

R^{24} および R^{25} は、それぞれ独立して、水素原子；水酸基；分岐または環を形成していてもよい炭素数1から6のアルキル基；分岐または環を形成していてもよい炭素数1から6のアルコキシ基；アミノ基；および核酸合成の保護基で保護されたアミノ基；からなる群から選択される基であるか、あるいは、

R^{24} および R^{25} は一緒になって、 $=C(R^{36})R^{37}$ [式中、 R^{36} および R^{37} は、それぞれ独立して、水素原子、水酸基、核酸合成の保護基で保護された水酸基、メルカプト基、核酸合成の保護基で保護されたメルカプト基、アミノ基、炭素数1から6の直鎖または分岐鎖アルコキシ基、炭素数1から6の直鎖または分岐鎖アルキルチオ基、炭素数1から6のシアノアルコキシ基、または炭素数1から6の直鎖または分岐鎖アルキルアミノ基を表す] を表し；

R^{26} および R^{27} は、それぞれ独立して、水素原子、分岐または環を形成していてもよい炭素数1から6のアルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数1から6のアルコキシ基、または炭素数1から6の直鎖または分岐鎖アルキルチオ基であり；

R^{28} は、水素原子、分岐または環を形成していてもよい炭素数1から6のアルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数1から6のアルコキシ基、または炭素数1から6の直鎖または分岐鎖アルキルチオ基であり；

R^{29} は、水素原子、水酸基、分岐または環を形成していてもよい炭素数1から6のアルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数1から6の

アルコキシ基、アミノ基、あるいは核酸合成の保護基で保護されたアミノ基であり；

R^{31} 、 R^{32} 、および R^{33} は、それぞれ独立して、水素原子、分岐または環を形成していてもよい炭素数1から6のアルキル基、あるいは核酸合成のアミノ基の保護基であり；

R^{34} および R^{35} は、それぞれ独立して、水素原子、水酸基、分岐または環を形成していてもよい炭素数1から6のアルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数1から6のアルコキシ基、アミノ基、または核酸合成の保護基で保護されたアミノ基であり；

m は0から2の整数であり；

n は0から1の整数であり；

p は0から1の整数であり；

X^1 は、酸素原子、硫黄原子、またはアミノ基であり；そして

X^2 は酸素原子または硫黄原子である]

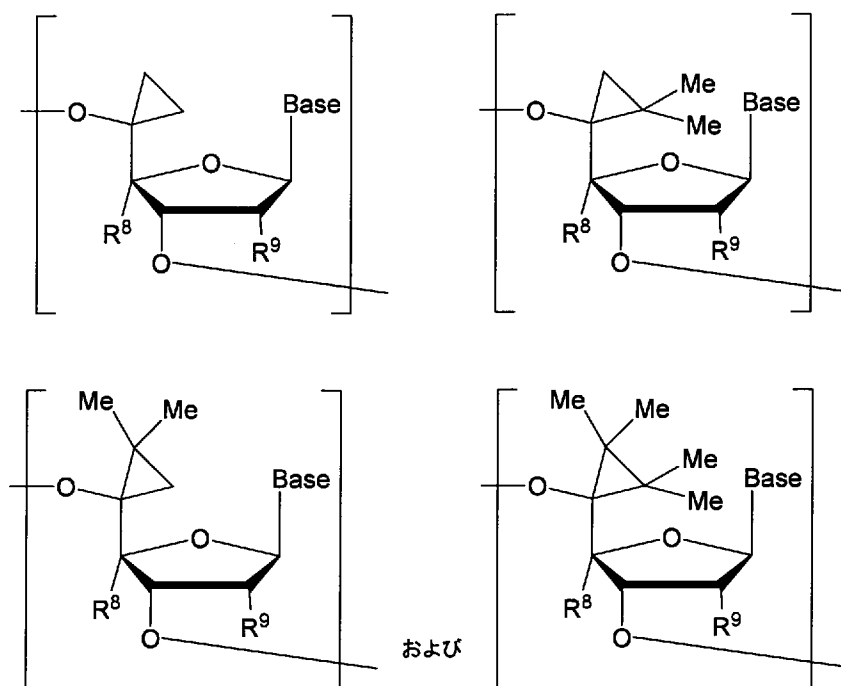
で表される二価の基を表す)で表されるヌクレオシド構造を少なくとも1つ含む。

[0084] なお、本発明において、上記式(CR01)～(CR11)で表される架橋構造のうち、式(CR07)および(CR09)で表される構造は、当該架橋構造の周辺に存在する任意のアニオン(例えば、水酸化物イオン、リン酸イオン、塩化物イオン)により電氣的に中性に保持されている。

[0085] ここで、 R^6 および R^7 の組合せの観点において、本発明のオリゴヌクレオチドに含まれる式(11)のヌクレオシド構造の例としては：

[0086]

[化15]

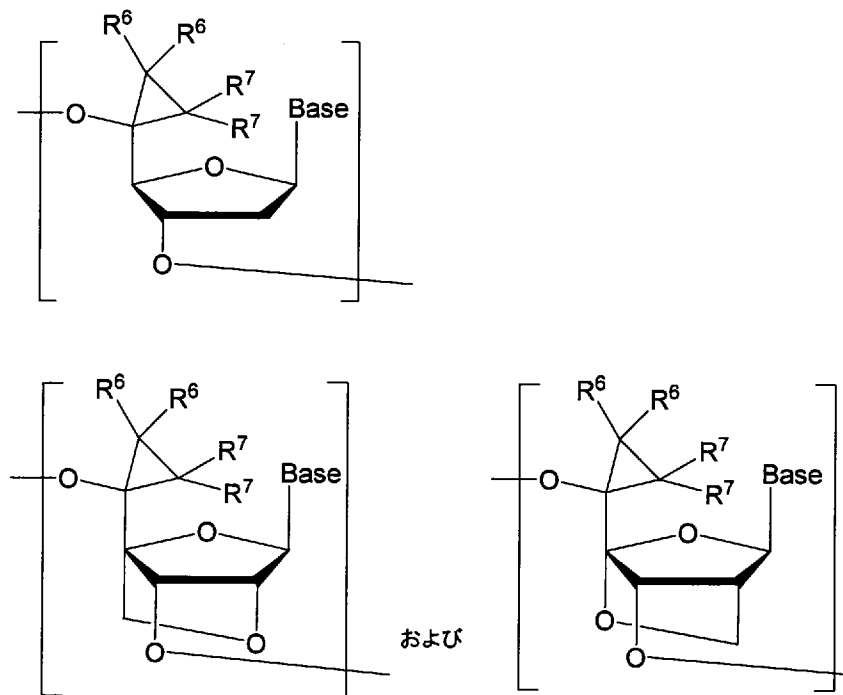


[0087] (式中、Base、 R^8 および R^9 は、上記式(11)で定義されるものと同様である)が挙げられる。本発明においては、上記式(11)の R^6 および R^7 がともに水素原子であることが好ましい。

[0088] さらに、 R^8 および R^9 の組合せの観点において、本発明のオリゴヌクレオチドに含まれる式(11)のヌクレオシド構造の例としては：

[0089]

[化16]



[0090] (式中、Base、 R^6 および R^7 は、上記式(11)で定義されるものと同様である)が挙げられる。本発明の1つの実施形態では、上記式(11)の R^6 および R^7 がともに水素原子である。

[0091] 本発明のオリゴヌクレオチドは、上記ヌクレオシド構造を、任意の位置に少なくとも1つ有する。その位置および数は、特に限定されず、目的に応じて適宜設計され得る。

[0092] このようなヌクレオシド構造を含むオリゴヌクレオチド(アンチセンス分子)は、従来の2', 4'-BNA/LNAを用いる場合と比較して、ヌクレアーゼ耐性能が飛躍的に向上する。また、公知の2', 4'-BNA/LNAに匹敵するssRNA結合親和性を有する。さらに当該オリゴヌクレオチドは、アンチセンス活性を損なうことなく肝毒性を低減させることもできる。

[0093] これらのことから、本発明の5'位修飾ヌクレオシドを用いて合成された本発明のオリゴヌクレオチドは、抗腫瘍剤、抗ウイルス剤をはじめとした、特定の遺伝子の働きを阻害または回復して疾病を治療する医薬品(アンチセ

ンス分子)としての有用性が期待される。このような有用性が期待される医薬品の例としては、筋ジストロフィー治療薬が挙げられる。

[0094] 特に、アンチセンス法では、相補センス鎖RNAに対する結合親和性および生体内DNA分解酵素への耐性の両方が必要とされる。一般的に、核酸は、一本鎖状態では、糖部の構造が絶えずDNA二重鎖に近い形と、DNA-RNA二重鎖やRNA二重鎖に近い形との間で揺らいでいることが知られている。一本鎖核酸が相補的なRNA鎖と二重鎖を形成する場合、その糖部構造は固定される。そこで、本発明の5'位修飾ヌクレオシドでは、糖部を予め二重鎖を形成する場合の状態に固定されているため、目的のRNA鎖と二重鎖を形成しやすく、安定に存在させることができる。また、核酸二重鎖は、水分子のネットワークと呼ばれる鎖のようにつながった水和水により安定化されていることも知られている。

[0095] 本発明のオリゴヌクレオチドは、例えば、賦形剤、結合剤、防腐剤、酸化安定剤、崩壊剤、滑沢剤、矯味剤などの医薬の製剤技術分野において通常用いられる補助剤を配合して、非経口投与製剤またはリポソーム製剤とすることができる。また、例えば、当該技術分野で通常用いられる医薬用担体を配合して、液剤、クリーム剤、軟膏剤などの局所用の製剤を調製することができる。

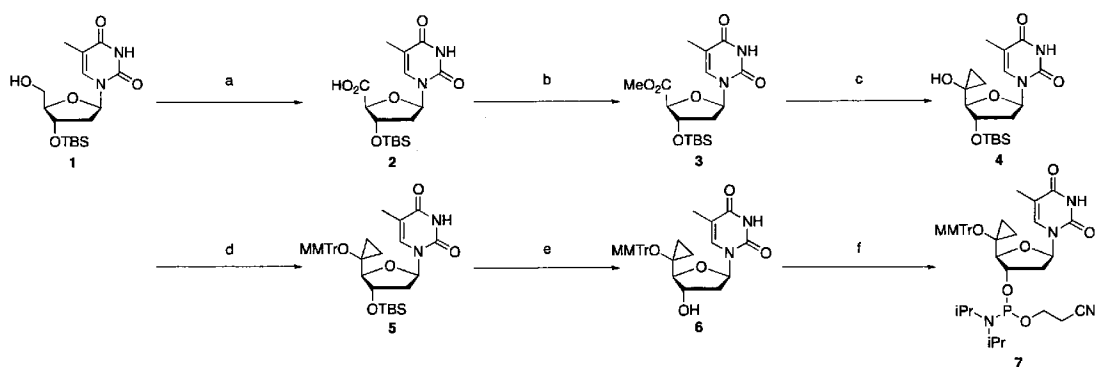
実施例

[0096] 以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例により限定されるものではない。

[0097] (実施例1：5'位修飾ヌクレオシドの合成(1))

[0098]

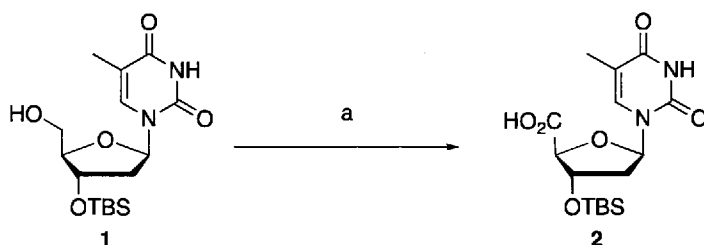
[化17]



各工程の試薬および条件: (a) TEMPO, $\text{PhI}(\text{OAc})_2$, CH_2Cl_2 , 室温, 2時間; MeCN, H_2O , 室温, 2時間; (b) EDC·HCl, MeOH, CH_2Cl_2 , 0°C , 1時間, 90% (2工程); (c) EtMgBr, $\text{Ti}(\text{OiPr})_4$, THF, 0°C から室温, 4時間, 57%; (d) MMTTrCl, AgNO_3 , ピリジン, THF, 50°C , 21時間, 79%; (e) TBAF, THF, 室温, 19時間, 92%; (f) $\text{iPr}_2\text{NP}(\text{Cl})\text{OC H}_2\text{CH}_2\text{CN}$, DIPEA, MeCN, 室温, 6.5時間, 75%.

[0099] (1-1) 化合物2の合成

[0100] [化18]

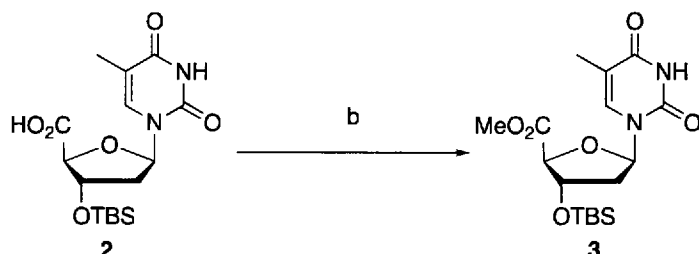


[0101] Caruthersら、Tetrahedron Lett., 1996年, 37巻, 35号, 6239-6242頁に記載の方法により作製した化合物1 (1.50g, 4.20mmol) のジクロロメタン溶液 (31mL) にヨードベンゼンジアセタート ($\text{PhI}(\text{OAc})_2$; 2.98g, 9.24mmol) と2,2,6,6-テトラメチルピペリジン1-オキシフリーラジカル (TEMPO; 151mg, 0.96mmol) とを 0°C で順次添加した。室温で2時間攪拌した後、アセトニトリル/水 (= 1 : 1 (容量比), 230 μL) を添加し、さらに室温で2時間攪拌した。反応終了後に過剰量のメタノールを加え、10分間室温で攪拌し、溶媒の減圧留去およびトルエン共沸を行って、白色固体の化合物2 (4.20mmol以下, 粗生成物) を得た。この化合物2を精製することなく即

座に次の反応に用いた。

[0102] (1-2) 化合物3の合成

[0103] [化19]



[0104] 上記で得られた化合物2 (4.20 mmol以下、粗生成物) のジクロロメタン溶液 (42 mL) にメタノール (1.70 mL, 42.0 mmol) 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·HCl; 966 mg, 5.04 mmol) を順次添加し、0℃で1時間撹拌した。反応終了後に水を添加し、酢酸エチルで抽出した。有機層を水と飽和食塩水とで洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (SiO₂, 酢酸エチル/ヘキサン=37%から58%) により精製し、化合物3 (1.44 g, 収率90%, 2工程) を白色固体として得た。

[0105] 得られた化合物3の物性データを表1に示す。

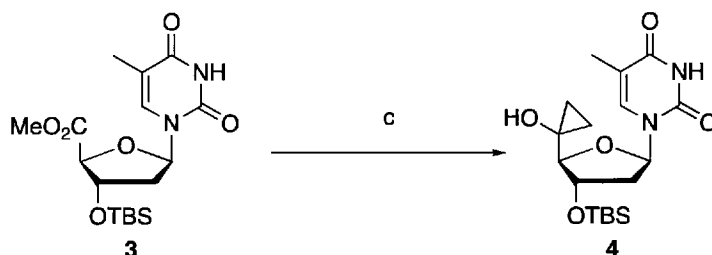
[0106] [表1]

得られた化合物3の物性データ
¹ H NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ 0.12 (s, 3H), 0.13 (s, 3H), 0.91 (s, 9H), 1.90–1.98 (m, 1H), 1.98 (s, 3H), 2.32 (dd, <i>J</i> = 4.8, 13.1 Hz, 1H), 3.82 (s, 3H), 4.46 (s, 1H), 4.52 (d, <i>J</i> = 4.1 Hz, 1H), 6.53 (dd, <i>J</i> = 5.2, 8.9 Hz, 1H), 8.09 (s, 1H), 8.67 (bs, 1H); ¹³ C NMR (76 MHz, CDCl ₃) δ -4.9, 12.8, 18.1, 25.7, 39.8, 52.7, 75.8, 85.3, 86.7, 111.4, 136.3, 150.7, 164.2, 171.9; IR (KBr): 3168, 3040, 2941, 2859, 1747, 1695, 1468, 1269, 1213, 1085, 836 cm ⁻¹ .

[0107] (1-3) 化合物4の合成

[0108]

[化20]



[0109] 窒素気流下、上記で得られた化合物 3 (455 mg, 1.18 mmol) とチタンテトライソプロポキシド ($\text{Ti}(\text{OiPr})_4$; 350 μL , 1.18 mmol) のと無水テトラヒドロフラン溶液 (12 mL) に、1.0M のエチルマグネシウムブロミド (EtMgBr) のテトラヒドロフラン溶液 (6.0 mL, 6.0 mmol) を 0°C で 2 時間かけて滴下した。滴下後、反応溶液を室温まで加温し、さらに 2 時間攪拌した。反応終了後、飽和塩化アンモニウム水溶液を加えてセライト濾過を行い、濾液を酢酸エチルで抽出した。有機層を水と飽和食塩水とで洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (SiO_2 , 酢酸エチル/ヘキサン = 50% から 71%) により精製し、化合物 4 (257 mg, 収率 57%) を白色固体として得た。

[0110] 得られた化合物 4 の物性データを表 2 に示す。

[0111] [表2]

得られた化合物 4 の物性データ
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 0.10 (s, 6H), 0.64–0.69 (m, 2H), 0.85–0.91 (m, 2H), 0.90 (s, 9H), 1.92 (d, $J = 1.4$ Hz, 3H), 2.16 (ddd, $J = 3.4, 6.5, 13.4$ Hz, 1H), 2.61 (ddd, $J = 6.5, 7.6, 13.4$ Hz, 1H), 3.31 (d, $J = 3.4$ Hz, 1H), 3.64 (s, 1H), 4.72 (ddd, $J = 3.4, 3.4, 6.5$ Hz, 1H), 6.03 (dd, $J = 6.5, 7.2$ Hz, 1H), 7.26 (s, 1H), 8.30 (bs, 1H); ^{13}C NMR (76 MHz, CDCl_3) δ -4.7, -4.6, 10.6, 12.6, 13.1, 18.0, 25.8, 39.8, 54.5, 72.6, 87.8, 93.5, 111.2, 138.0, 150.4, 163.8; IR (KBr): 3414, 3010, 2949, 1681, 1472, 1266, 1061, 840, 758 cm^{-1} ; HRMS (MALDI) $\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_5\text{NaSi}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ としての計算値: 405.1816, 実測値: 405.1820.

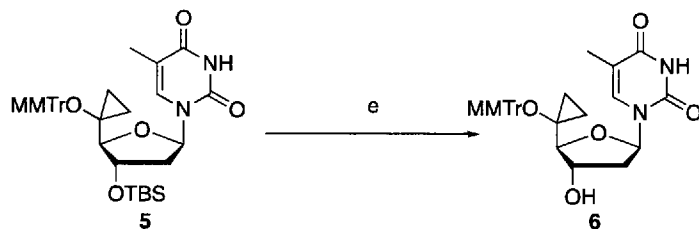
[0112] (1 – 4) 化合物 5 の合成

[0113]

Chemical reaction scheme showing the conversion of compound **4** to compound **5**. Compound **4** is a bicyclic molecule with a hydroxyl group (HO) and a trimethylsilyl ether group (OTBS). It reacts with a reagent 'd' to form compound **5**, which is the same molecule but with the hydroxyl group converted to a trimethylsilyl ether group (MMTrO).

[0118]

[化22]



[0119] 上記で得られた化合物5（2.65g，4.05mmol）のテトラヒドロフラン溶液（81mL）に、1.0Mのテトラブチルアンモニウムフルオリド（TBAF）のテトラヒドロフラン溶液（4.50mL，4.50mmol）を0℃で添加し、室温で19時間攪拌した。反応終了後、反応液を減圧留去して水を添加し、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（SiO₂，1%トリエチルアミン含有、酢酸エチル／ヘキサン＝80%から100%）により精製し、化合物6（2.02g，収率92%）を白色固体として得た。

[0120] 得られた化合物6の物性データを表4に示す。

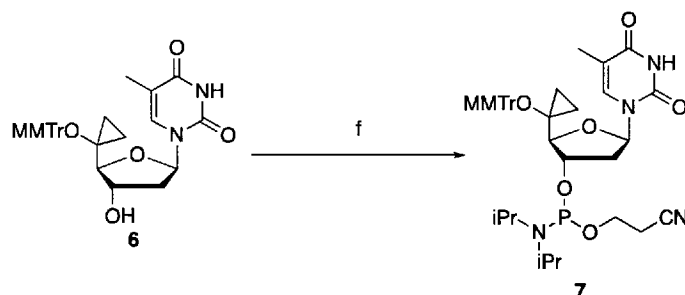
[0121] [表4]

得られた化合物6の物性データ
¹ H NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ 0.53–0.57 (m, 2H), 0.94–0.98 (m, 2H), 1.75 (d, <i>J</i> = 2.3 Hz, 1H), 1.90 (d, <i>J</i> = 0.9 Hz, 3H), 2.03 (ddd, <i>J</i> = 7.3, 6.9, 14.2 Hz, 1H), 2.17 (ddd, <i>J</i> = 13.8, 6.9, 4.6 Hz, 1H), 2.67 (d, <i>J</i> = 4.6 Hz, 1H), 3.82 (s, 3H), 4.44–4.50 (m, 1H), 5.87 (dd, <i>J</i> = 6.9, 6.9 Hz, 1H), 6.83–6.86 (m, 2H), 6.94 (d, <i>J</i> = 1.4 Hz, 1H), 7.25–7.46 (m, 12H), 8.14 (bs, 1H); ¹³ C NMR (76 MHz, CDCl ₃) δ 9.1, 10.2, 12.8, 39.5, 55.3, 59.9, 73.0, 83.5, 83.9, 87.7, 111.3, 113.1, 127.3, 127.9, 127.9, 128.5, 128.6, 131.0, 135.3, 136.1, 145.7, 145.8, 150.5, 158.9, 163.9.

[0122] (1 – 6) 化合物7の合成

[0123]

[化23]



[0124] 窒素気流下、上記で得られた化合物6（1.92g，3.56mmol）の無水アセトニトリル溶液（36mL）に、N，N-ジイソプロピルエチルアミン（DIEA；1.85mL，10.8mmol）と2-シアノエチル-N，N-ジイソプロピルホスホロクロリダート（ $iPr_2NP(Cl)OCH_2CH_2CN$ ；1.20mL，5.34mmol）を0℃で順次添加し、室温で3時間撹拌した。反応終了後に溶媒を減圧留去し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ SiO_2 ，1%トリエチルアミン含有、酢酸エチル／ヘキサン＝39%から60%）により精製し、化合物7（1.93g，収率73%）を白色固体として得た。

[0125] 得られた化合物7の物性データを表5に示す。

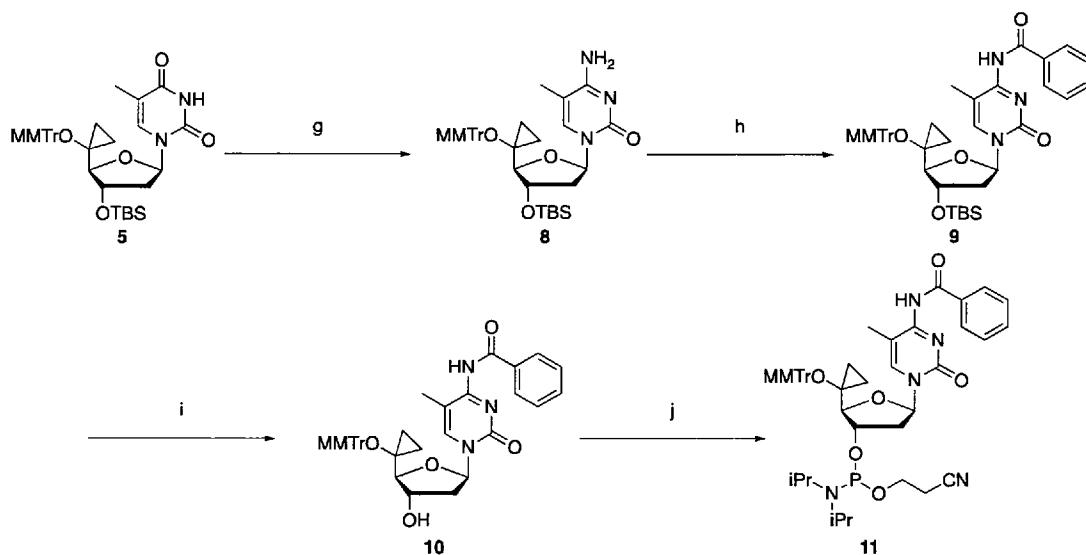
[0126] [表5]

得られた化合物7の物性データ
1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 0.45–0.62 (m, 2H), 0.92–1.03 (m, 2H), 1.08 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H), 1.14 (d, $J = 6.9$ Hz, 6H), 1.18 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H), 1.82–1.96 (m, 1H), 1.87 (d, $J = 0.9$ Hz, 3H), 2.40–2.50 (m, 2.1H), 2.60–2.65 (m, 0.9H), 2.95 (d, $J = 1.8$ Hz, 0.3H), 3.05 (s, 0.7H), 3.49–3.69 (m, 4H), 3.80 (s, 0.9H), 3.81 (s, 2.1H), 4.39–4.48 (m, 1H), 5.89–5.94 (m, 1H), 6.78–6.84 (m, 2H), 7.13–7.46 (m, 13H), 8.04 (bs, 1H); ^{31}P NMR (121.7 MHz, $CDCl_3$) δ 148.0, 149.5.

[0127] （実施例2：5'位修飾ヌクレオシドの合成（2））

[0128]

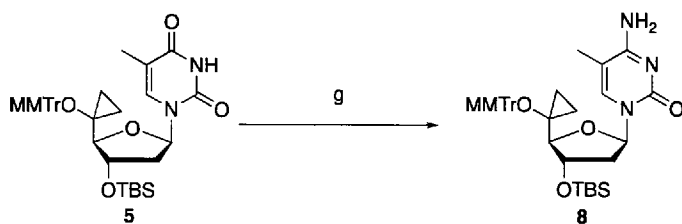
[化24]



各工程の試薬および条件: (g) 1,2,4-トリアゾール, POCl_3 , TEA, MeCN, 室温, 2時間; 飽和 NH_3 水, 1,4-ジオキサン, 室温, 5時間, 92%; (h) BzCl , ピリジン, 0°C , 1.5時間, 81%; (i) TBAF, THF, 室温, 24時間, 96%; (j) $\text{iPr}_2\text{NP}(\text{Cl})\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$, DIPEA, MeCN, 室温, 3時間, 69%.

[0129] (2-1) 化合物8の合成

[0130] [化25]



[0131] 窒素気流下、上記で得られた化合物5 (3.59g, 5.48mmol)の無水アセトニトリル溶液 (55mL) に、トリエチルアミン (TEA; 1.4mL, 82.2mmol)、1,2,4-トリアゾール (5.72g, 82.8mmol)、塩化ホスホリル (POCl_3 ; 1.50mL, 16.4mmol) を 0°C で順次添加し、室温で2時間攪拌した。次いで、1,4-ジオキサン (55mL) と28%アンモニア水 (16.4mL) とを添加し、室温で5時間攪拌した。反応終了後、反応液を減圧留去して水／飽和食

塩水混合溶液（＝１：１（容量比））を添加し、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ SiO_2 ，１％トリエチルアミン含有、メタノール／クロロホルム＝０％から３％）により精製し、化合物８（３．３１ｇ，収率９２％）を淡黄色固体として得た。

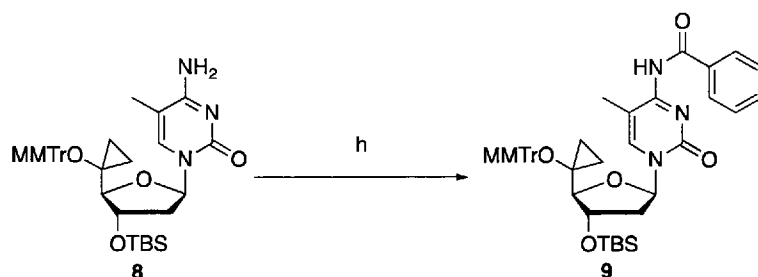
[0132] 得られた化合物８の物性データを表６に示す。

[0133] [表６]

得られた化合物８の物性データ
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ -0.04 (s, 3H), 0.01 (s, 3H), 0.41–0.56 (m, 2H), 0.76–0.99 (m, 2H), 0.80 (s, 9H), 1.75–1.82 (m, 1H), 1.84 (s, 3H), 2.38 (ddd, J = 2.3, 5.5, 13.3 Hz, 1H), 2.97 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 3.79 (s, 3H), 4.03 (ddd, J = 2.8, 2.8, 5.5 Hz, 1H), 5.94 (dd, J = 6.0, 7.3 Hz, 1H), 6.81 (d, J = 9.2 Hz, 2H), 7.20–7.48 (m, 12H), 7.53 (s, 1H); ^{13}C NMR (76 MHz, CDCl_3) δ -4.8, -4.2, 9.4, 10.1, 13.4, 17.8, 25.8, 42.2, 55.2, 58.9, 72.8, 86.1, 87.6, 87.7, 101.3, 113.0, 127.2, 127.7, 128.8, 128.8, 131.2, 136.3, 137.9, 145.9, 156.0, 158.8, 165.8.

[0134] (２－２) 化合物９の合成

[0135] [化２６]



[0136] 上記で得られた化合物８（３．２０ｇ，４．８９ｍｍｏｌ）の無水ピリジン溶液（５０ｍＬ）に、塩化ベンゾイル（ BzCl ；８５０ μL ，７．３４ｍｍｏｌ）を添加し、０℃で１．５時間攪拌した。反応終了後に水を添加し、酢酸エチルで抽出した。有機層を水で洗浄した後、溶媒の減圧留去およびトルエン共沸を行った。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ SiO_2 ，１％トリエチルアミン含有、酢酸エチル／ヘキサン＝５％から２６％）により精製し、化合物９（２．９９ｇ，収率８１％）を白色固体と

して得た。

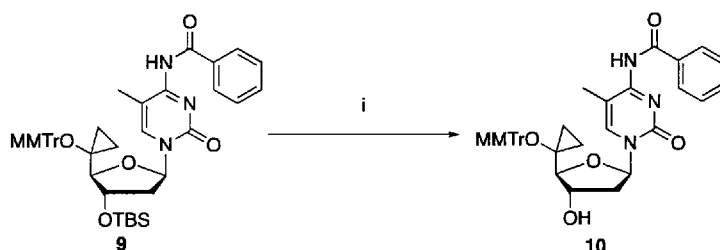
[0137] 得られた化合物 9 の物性データを表 7 に示す。

[0138] [表7]

得られた化合物 9 の物性データ
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ -0.02 (s, 3H), 0.02 (s, 3H), 0.41–0.58 (m, 2H), 0.82 (s, 9H), 0.87–1.04 (m, 2H), 1.87 (ddd, $J = 6.0, 7.8, 13.8$ Hz, 1H), 2.06 (d, $J = 0.9$ Hz, 3H), 2.30 (ddd, $J = 2.3, 6.0, 13.8$ Hz, 1H), 2.96 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 3.80 (s, 3H), 4.04 (ddd, $J = 2.3, 2.3, 5.0$ Hz, 1H), 5.97 (dd, $J = 5.5, 7.8$ Hz, 1H), 6.80–6.85 (m, 2H), 7.21–7.55 (m, 15H), 7.64 (d, $J = 0.9$ Hz, 1H), 8.30–8.33 (m, 2H), 13.33 (bs, 1H).

[0139] (2 – 3) 化合物 10 の合成

[0140] [化27]



[0141] 上記で得られた化合物 9 (2.91 g, 3.84 mmol) のテトラヒドロフラン溶液 (77 mL) に、1.0M のテトラブチルアンモニウムフルオリド (TBAF) ・テトラヒドロフラン溶液 (4.20 mL, 4.20 mmol) を 0℃ で添加し、室温で 24 時間攪拌した。反応終了後、反応液を減圧留去して水を添加し、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (SiO_2 , 1% トリエチルアミン含有、酢酸エチル/ヘキサン = 29% から 70%) により精製し、化合物 10 (2.38 g, 収率 96%) を白色固体として得た。

[0142] 得られた化合物 10 の物性データを表 8 に示す。

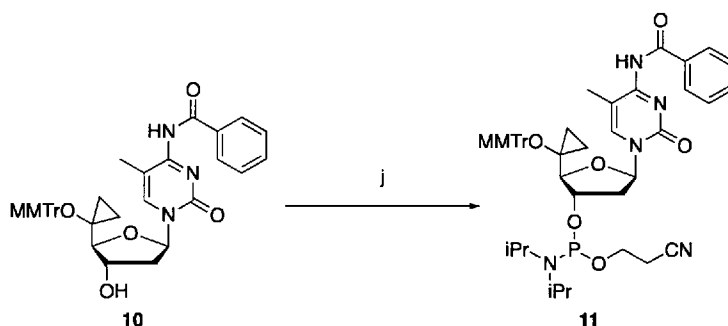
[0143]

[表8]

得られた化合物 10 の物性データ
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 0.55–0.59 (m, 2H), 0.90–0.10 (m, 2H), 1.71 (bs, 1H), 1.99–2.09 (m, 1H), 2.09 (s, 3H), 2.25 (ddd, $J = 4.6, 6.4, 13.8$ Hz, 1H), 2.72 (d, $J = 4.6$ Hz, 1H), 3.82 (s, 3H), 4.46 (d, $J = 4.1$ Hz, 1H), 5.89 (dd, $J = 6.9, 6.9$ Hz, 1H), 6.85 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.15 (s, 1H), 7.23–7.55 (m, 15H), 8.30 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H), 13.20 (bs, 1H).

[0144] (2-4) 化合物 11 の合成

[0145] [化28]



[0146] 窒素気流下、上記で得られた化合物 10 (2.29 g, 3.56 mmol) の無水アセトニトリル溶液 (36 mL) に、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (DIEPA; 1.85 mL, 10.8 mmol) と 2-シアノエチルーN, N-ジイソプロピルホスホロリダート ($i\text{Pr}_2\text{NP}(\text{Cl})\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$; 1.20 mL, 5.34 mmol) を 0°C で順次添加し、室温で 3 時間攪拌した。反応終了後に溶媒を減圧留去し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (SiO_2 , 1% トリエチルアミン含有、酢酸エチル/ヘキサン = 20% から 40%) により精製し、化合物 11 (2.08 g, 収率 69%) を黄色固体として得た。

[0147] 得られた化合物 11 の物性データを表 9 に示す。

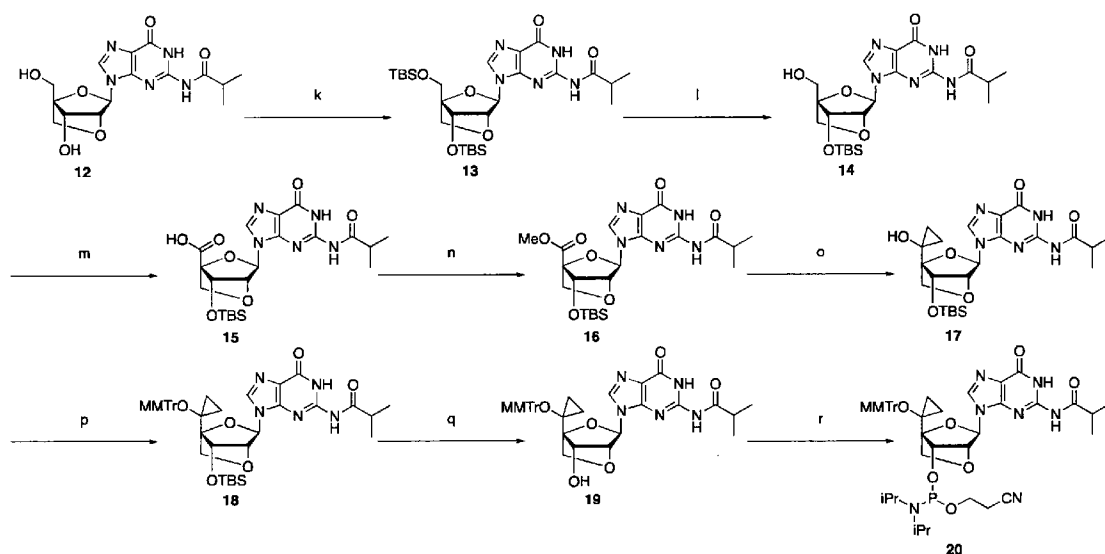
[0148]

[表9]

得られた化合物 11 の物性データ
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 0.47–0.64 (m, 2H), 0.91–1.02 (m, 2H), 1.09 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H), 1.15 (d, $J = 6.9$ Hz, 6H), 1.18 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H), 1.84–1.97 (m, 1H), 2.06 (d, $J = 0.9$ Hz, 1.2H), 2.06 (d, $J = 0.9$ Hz, 1.8H), 2.47–2.65 (m, 3H), 3.00 (d, $J = 1.4$ Hz, 0.4H), 3.10 (s, 0.6H), 3.48–3.69 (m, 4H), 3.80 (s, 1.2H), 3.81 (s, 1.8H), 4.33–4.44 (m, 1H), 5.93–5.98 (m, 1H), 6.79–6.85 (m, 2H), 7.23–7.55 (m, 16H), 8.31 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H), 13.29 (bs, 1H); ^{31}P NMR (121.7 MHz, CDCl_3) δ 148.1, 149.5.

[0149] (実施例3 : 5' 位修飾ヌクレオシドの合成 (3))

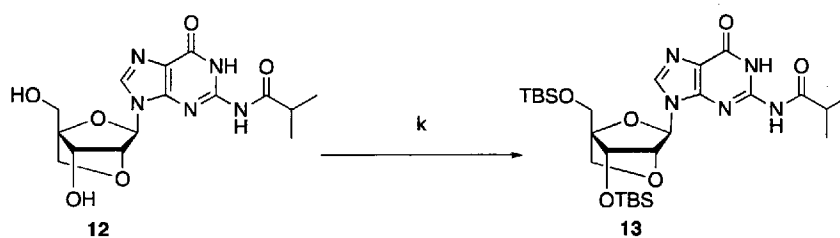
[0150] [化29]



各工程の試薬および条件: (k) TBSCl, イミダゾール, ピリジン, 還流, 20時間, 93%; (l) TFA, THF, H_2O , 0°C , 6時間, 定量的; (m) TEMPO, $\text{PhI}(\text{OAc})_2$, H_2O , CH_2Cl_2 , MeCN, 3時間, 83%; (n) EDC·HCl, $\text{CH}_2\text{ClCH}_2\text{Cl}$, 50°C , 2時間; MeOH, 60°C , 5時間, 75%; (o) EtMgBr, $\text{Ti}(\text{O}i\text{Pr})_4$, THF, 0°C から室温, 5.5時間, 22%; (p) MMTriCl, AgNO_3 , THF, ピリジン, 50°C , 2時間, 85%; (q) TBAF, THF, 室温, 1時間, 89%; (r) $i\text{Pr}_2\text{NP}(\text{Cl})\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$, DIPEA, CH_2Cl_2 , 室温, 3.5時間, 72%.

[0151] (3-1) 化合物 13 の合成

[0152] [化30]



[0153] 窒素気流下、Lomholtら、J. Org. Chem., 2001年, 66巻, 25号, 8504-8512頁に記載の方法により作製した化合物12 (11.7 g, 31.9 mmol)の無水ピリジン溶液 (320 mL) に、イミダゾール (10.9 g, 160 mmol) とtert-ブチルジメチルクロロシラン (TBSCl; 24.2 g, 161 mmol) を室温で順次添加した。17時間の加熱還流後、イミダゾール (2.16 g, 31.7 mmol) とtert-ブチルジメチルクロロシラン (TBSCl; 4.89 g, 32.4 mmol) を再度添加し、3時間加熱還流した。反応終了後に水を添加し、ピリジン溶媒を減圧留去した後、酢酸エチルで抽出した。有機層を水で洗浄した後、溶媒の減圧留去およびトルエン共沸を行った。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (SiO₂, 酢酸エチル/ヘキサン=30%, 次いで60%) により精製し、化合物13 (17.6 g, 収率93%) を白色固体として得た。

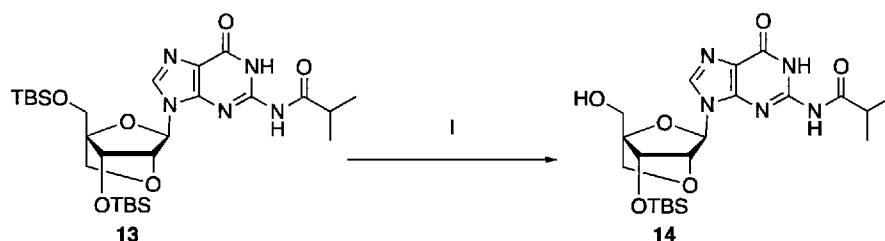
[0154] 得られた化合物 13 の物性データを表 10 に示す。

「0155」 「表10」

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 0.01 (s, 3H), 0.03 (s, 3H), 0.10 (s, 6H), 0.86 (s, 9H), 0.92 (s, 9H), 1.28 (d, *J* = 7.3 Hz, 3H), 1.29 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H), 2.58–2.72 (m, 1H), 3.80 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 3.88 (d, *J* = 11.9 Hz, 1H), 3.94 (d, *J* = 11.9 Hz, 1H), 4.00 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 4.24 (s, 1H), 4.28 (s, 1H), 5.78 (s, 1H), 7.90 (s, 1H), 8.41 (bs, 1H), 12.00 (bs, 1H).

[0156] (3-2) 化合物 14 の合成

[0157] [化,31]



[0158] 上記で得られた化合物 13 (17.6 g, 29.6 mmol) のテトラヒドロフラン溶液 (355 mL) に、トリフルオロ酢酸／水混合溶液 (= 1 : 1 (容量比), 178 mL) を添加し、0℃で6時間攪拌した。反応溶液を

飽和炭酸水素ナトリウム水溶液へ滴下し、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を減圧留去した。得られた残渣を再結晶（ヘキサン／酢酸エチル）にて精製した他、残りの濾液をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ SiO_2 ，メタノール／クロロホルム＝0％から8％）により精製し、化合物14（13.9 g，定量的）を白色固体として得た。

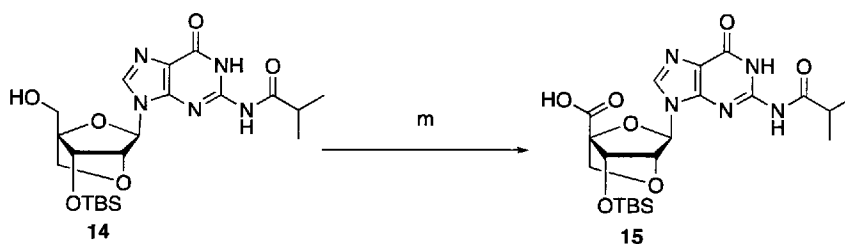
[0159] 得られた化合物14の物性データを表11に示す。

[0160] [表11]

得られた化合物14の物性データ
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 0.06 (s, 3H), 0.09 (s, 3H), 0.87 (s, 9H), 1.27 (d, $J = 1.8$ Hz, 3H), 1.29 (d, $J = 1.8$ Hz, 3H), 2.65–2.79 (m, 1H), 3.65 (bs, 1H), 3.85 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 3.89 (d, $J = 12.4$ Hz, 1H), 4.01 (d, $J = 12.4$ Hz, 1H), 4.03 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 4.29 (s, 1H), 4.50 (s, 1H), 5.83 (s, 1H), 7.86 (s, 1H), 9.01 (bs, 1H), 12.01 (bs, 1H).

[0161] (3-3) 化合物15の合成

[0162] [化32]



[0163] 上記で得られた化合物14（12.9 g，27.0 mmol）のジクロロメタン溶液（270 mL）に、アセトニトリル／水（＝1：1（容量比），1.48 mL）とヨードベンゼンジアセタート（ $\text{PhI}(\text{OAc})_2$ ；43.4 g，134.8 mmol）と2,2,6,6-テトラメチルピペリジン1-オキシフリーラジカル（TEMPO；1.29 g，8.59 mmol）を0℃で順次添加し、室温で3時間撹拌した。反応終了後にメタノール（30 mL）を添加し、20分間室温で撹拌し、溶媒の減圧留去およびトルエン共沸を行った。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ DIO_2 ，メタノール／クロロホルム＝0％から20％）により精製し

た。また、精製しきれなかった粗生成物をトリチュレーション（酢酸エチル／ヘキサン）により精製し、化合物 15（11.0 g，収率 83%）を白色固体として得た。

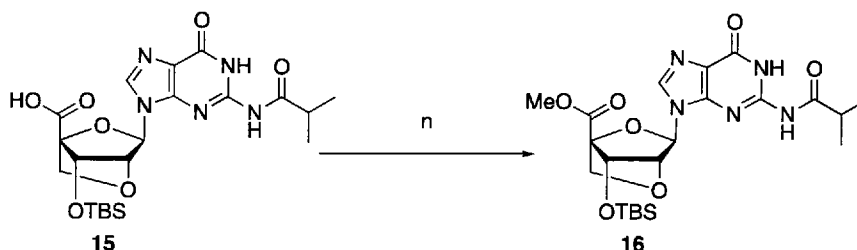
[0164] 得られた化合物 15 の物性データを表 12 に示す。

[0165] [表12]

得られた化合物 15 の物性データ
¹ H NMR (300 MHz, CD ₃ OD) δ 0.06 (s, 3H), 0.07 (s, 3H), 0.87 (s, 9H), 1.22 (d, <i>J</i> = 6.9 Hz, 6H), 2.66–2.75 (m, 1H), 4.06 (d, <i>J</i> = 7.9 Hz, 1H), 4.45 (d, <i>J</i> = 8.3 Hz, 1H), 4.49 (s, 1H), 4.59 (s, 1H), 5.97 (s, 1H), 8.12 (s, 1H).

[0166] (3-4) 化合物 16 の合成

[0167] [化,33]



[0168] 窒素気流下、上記で得られた化合物15 (11.0g, 22.3mmol) の1,2-ジクロロエタン溶液(220mL)に、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·HCl; 8.56g, 44.7mmol)を室温で添加し、50℃で2時間攪拌した。原料消失後、無水メタノール(220mL)を添加し、さらに60℃で5時間攪拌した。反応終了後、反応液を減圧留去して水を添加し、クロロホルムで抽出した。有機層を水と飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(SiO₂, メタノール/クロロホルム=0%から4%)により精製し、化合物16 (8.53g, 収率75%)を白色固体として得た。

[0169] 得られた化合物 16 の物性データを表 13 に示す。

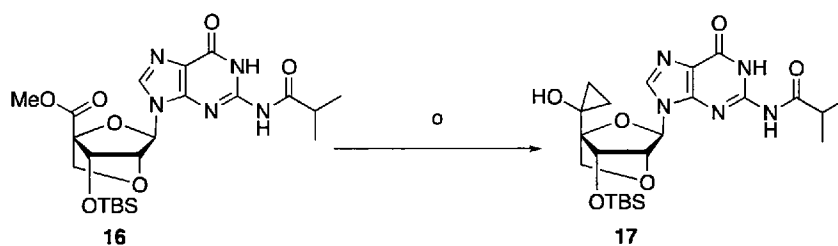
[0170]

[表13]

得られた化合物 16 の物性データ
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 0.02 (s, 6H), 0.85 (s, 9H), 1.28 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H), 1.29 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H), 2.59–2.73 (m, 1H), 3.85 (s, 3H), 4.07 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 4.39 (s, 1H), 4.47 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 4.48 (s, 1H), 5.83 (s, 1H), 7.91 (s, 1H), 8.44 (bs, 1H), 12.03 (bs, 1H); HRMS (MALDI) $\text{C}_{22}\text{H}_{33}\text{N}_5\text{O}_7\text{NaSi}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ としての計算値: 530.2041, 実測値: 530.2042.

[0171] (3 – 5) 化合物 17 の合成

[0172] [化34]



[0173] 窒素気流下、上記で得られた化合物 16 (514 mg, 1.01 mmol) とチタンテトライソプロポキシド ($\text{Ti}(\text{OiPr})_4$; 300 μL , 1.01 mmol) の無水テトラヒドロフラン溶液 (10 mL) に、1.0 M のエチルマグネシウムブロミド (EtMgBr)・テトラヒドロフラン溶液 (8.1 mL, 8.1 mmol) を 0°C で 2.5 時間掛けて滴下した。滴下後、反応溶液を室温まで加温し、さらに 3 時間攪拌した。反応終了後、飽和塩化アンモニウム水溶液を添加してセライト濾過を行い、濾液を酢酸エチルで抽出した。有機層を水と飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (NH_2-SiO_2 , メタノール／クロロホルム = 0% から 2%, 次いで 5%) により精製し、化合物 17 (114 mg, 22%) を黄色固体として得た。

[0174] 得られた化合物 17 の物性データを表 14 に示す。

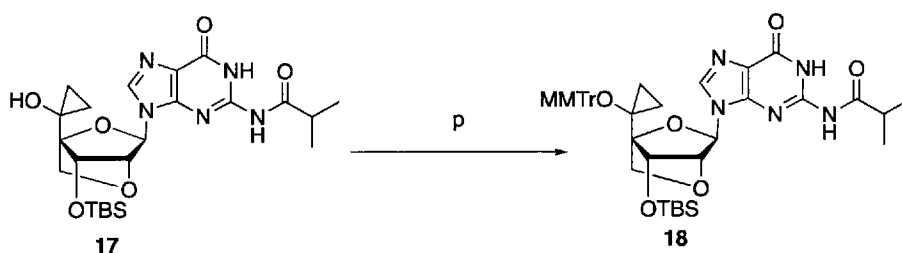
[0175]

[表14]

得られた化合物 17 の物性データ
¹ H NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ 0.06 (s, 3H), 0.09 (s, 3H), 0.64–0.69 (m, 1H), 0.78–1.08 (m, 3H), 0.88 (s, 9H), 1.29 (d, <i>J</i> = 6.9 Hz, 6H), 2.62–2.76 (m, 1H), 3.78 (d, <i>J</i> = 7.6 Hz, 1H), 3.96 (d, <i>J</i> = 7.6 Hz, 1H), 4.05 (bs, 1H), 4.30 (s, 1H), 4.50 (s, 1H), 5.85 (s, 1H), 7.89 (s, 1H), 8.65 (bs, 1H), 12.00 (bs, 1H); HRMS (MALDI) C ₂₃ H ₃₅ N ₅ O ₆ NaSi [M+Na] ⁺ としての計算値: 528.2249, 実測値: 528.2251.

[0176] (3-6) 化合物 18 の合成

[0177] [化35]



[0178] 窒素気流下、上記で得られた化合物 17 (1.59 g, 3.14 mmol) の無水ピリジン／テトラヒドロフラン混合溶液 (= 1 : 4 (容量比), 125 mL) に、4-メトキシトリチルクロリド (MMTrCl; 4.30 g, 13.9 mmol) と硝酸銀 (2.29 g, 13.5 mmol) を順次添加し、50℃で2時間攪拌した。反応終了後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を添加してセライト濾過を行い、濾液を酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和チオ硫酸ナトリウム水溶液で2回、水／飽和食塩水混合溶液 (= 1 : 1 (容量比)) で1回洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒の減圧留去およびトルエン共沸を行った。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (NH₂-SiO₂, メタノール／クロロホルム = 0% から 2%) により精製し、化合物 18 (2.08 g, 収率 85%) を黄色固体として得た。

[0179] 得られた化合物 18 の物性データを表 15 に示す。

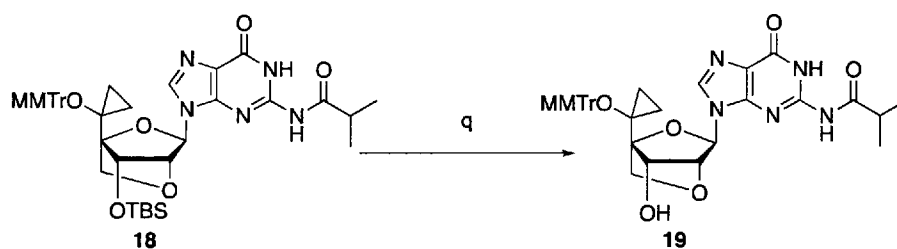
[0180]

[表15]

得られた化合物 18 の物性データ
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ -0.04 (s, 6H), 0.63–1.11 (m, 4H), 0.87 (s, 9H), 1.27 (d, J = 6.9 Hz, 6H), 2.56–2.70 (m, 1H), 3.58 (s, 1H), 3.65 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 3.75 (s, 3H), 3.80 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 4.30 (s, 1H), 5.36 (s, 1H), 6.79 (d, J = 9.2 Hz, 2H), 7.16–7.43 (m, 12H), 7.59 (s, 1H), 8.42 (bs, 1H), 11.99 (bs, 1H).

[0181] (3 – 7) 化合物 19 の合成

[0182] [化36]



[0183] 上記で得られた化合物 18 (2.01 g, 2.59 mmol) のテトラヒドロフラン溶液 (52 mL) に、1.0M のテトラブチルアンモニウムフルオリド (TBAF) ・テトラヒドロフラン溶液 (2.90 mL, 2.90 mmol) を 0℃ で添加し、室温で 1 時間攪拌した。反応終了後、反応液を減圧留去して水を添加し、酢酸エチルで抽出した。有機層を水と飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー ($\text{NH}_2\text{-SiO}_2$, メタノール／クロロホルム = 0% から 7%) により精製し、さらに水による分液精製を行って、化合物 19 (1.53 g, 89%) を淡黄色固体として得た。

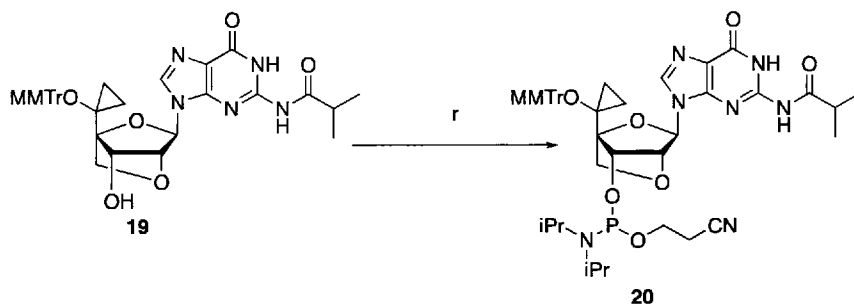
[0184] 得られた化合物 19 の物性データを表 16 に示す。

[0185] [表16]

得られた化合物 19 の物性データ
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 0.85–1.27 (m, 4H), 1.23 (d, J = 6.9 Hz, 3H), 1.26 (d, J = 7.3 Hz, 3H), 2.62–2.76 (m, 1H), 3.68 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 3.76 (s, 3H), 3.84 (s, 2H), 3.89 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 4.31 (s, 1H), 5.32 (s, 1H), 6.80 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.16–7.43 (m, 12H), 7.61 (s, 1H), 9.23 (bs, 1H), 12.04 (bs, 1H); HRMS (MALDI) $\text{C}_{37}\text{H}_{37}\text{N}_5\text{O}_7\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ としての計算値: 686.2585, 実測値: 686.2584.

[0186] (3-8) 化合物20の合成

[0187] [化37]



[0188] 窒素気流下、上記で得られた化合物19 (733 mg, 1.11 mmol) の脱酸素ジクロロメタン溶液 (11 mL) に、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (DIEA; 1.5 mL, 8.77 mmol) と2-シアノエチル-N, N-ジイソプロピルホスホロリダート ($i\text{Pr}_2\text{NP}(\text{Cl})\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$; 1.0 mL, 4.48 mmol) を0℃で順次添加し、室温で3.5時間攪拌した。反応終了後に溶媒を減圧留去し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (SiO_2 , ヘキサン: 酢酸エチル: メタノール = 15 : 15 : 1 (容量比)) により精製した後、再びシリカゲルカラムクロマトグラフィー ($\text{NH}_2\text{-SiO}_2$, メタノール/クロロホルム = 0%から3%) を行った。最終的に再沈殿 (酢酸エチル/ヘキサン) を行うことにより、化合物20 (626 mg, 収率72%) を白色固体として得た。

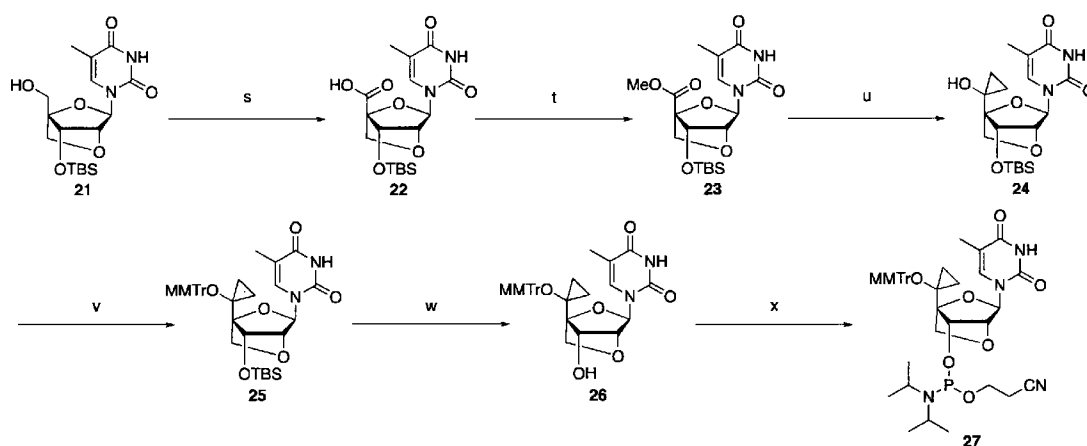
[0189] 得られた化合物20の物性データを表17に示す。

[0190] [表17]

得られた化合物20の物性データ
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 0.65–0.72 (m, 1H), 0.86–0.93 (m, 4H), 1.09–1.26 (m, 18H), 2.45–2.72 (m, 3H), 3.40–4.02 (m, 10H), 4.86 (s, 0.5H), 5.00 (s, 0.5H), 5.28 (s, 1H), 6.81 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.17–7.45 (m, 12H), 7.57 (s, 1H), 8.66 (bs, 0.5H), 8.87 (bs, 0.5H), 11.94 (bs, 0.5H), 11.98 (bs, 0.5H); ^{31}P NMR (121.7 MHz, CDCl_3) δ 142.5, 147.4; HRMS (MALDI) $\text{C}_{46}\text{H}_{54}\text{N}_7\text{O}_8\text{NaP}$ [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$ としての計算値: 886.3664, 実測値: 886.3664.

[0191] (実施例4: 5'位修飾ヌクレオシドの合成(4))

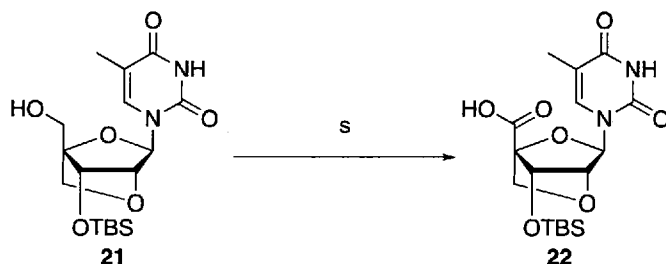
[0192] [化38]



各工程の試薬および条件: (s) TEMPO, $\text{PhI}(\text{OAc})_2$, H_2O , CH_2Cl_2 , MeCN, 室温, 14 時間, 78%; (t) EDC·HCl, $\text{CH}_2\text{ClCH}_2\text{Cl}$, 50°C , 1.5 時間; MeOH, 60°C , 2.5 時間, 6 9%; (u) EtMgBr, $\text{Ti}(\text{OiPr})_4$, THF, 0°C から室温, 5.5 時間, 35%; (v) MMTTrCl, AgN O_3 , ピリジン, THF, 50°C , 4.5 時間, 36%; (w) TBAF, THF, 室温, 1 時間, 97%; (x) $\text{iPr}_2\text{NP}(\text{Cl})\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$, DIPEA, MeCN, 室温, 4 時間, 77%.

[0193] (4 - 1) 化合物 22 の合成

[0194] [化39]



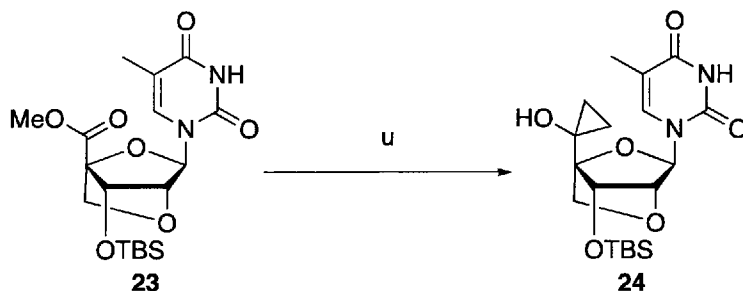
[0195] Lomholtら、J. Org. Chem., 2001年, 66巻, 25号, 8504-8512頁に記載の方法により作製した化合物 21 (295 mg, 0.77 mmol) のジクロロメタン溶液 (7.7 mL) に、アセトニトリル/水 (= 1 : 1 (容量比), 42.2 μL) とヨードベンゼンジアセタート ($\text{PhI}(\text{OAc})_2$; 548 mg, 1.70 mmol) と 2, 2, 6, 6-テトラメチルピペリジン 1-オキシフリーラジカル (TEMPO; 37 mg, 0.24 mmol) を 0°C で順次添加し、室温で 14 時間撹拌した。反応終了後にメタノール (7.7 mL) を添加し、15 分間室温で撹拌し、溶媒の減圧留去を行った。得られた残渣をトリチュレーション (酢酸エチル/ヘキサン) により精製し、化

[表19]

得られた化合物 2 3 の物性データ	
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 0.04 (s, 3H), 0.07 (s, 3H), 0.87 (s, 9H), 1.98 (d, $J = 0.9$ Hz, 3H), 3.86 (s, 3H), 4.03 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 4.20 (s, 1H), 4.40 (s, 1H), 4.43 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 5.61 (s, 1H), 7.56 (d, $J = 1.4$ Hz, 1H), 8.35 (bs, 1H).	

[0203] (4-3) 化合物 2 4 の合成

[0204] [化41]



[0205] 窒素気流下、上記で得られた化合物 2 3 (8.56 g, 20.8 mmol) とチタンテトライソプロポキシド ($\text{Ti}(\text{OiPr})_4$; 6.15 mL, 20.8 mmol) の無水テトラヒドロフラン溶液 (208 mL) に、1.0 M のエチルマグネシウムブロミド (EtMgBr) ・テトラヒドロフラン溶液 (106 mL, 106 mmol) を 0°C で 2.5 時間かけて滴下した。滴下後、反応溶液を室温まで加温し、さらに 3 時間攪拌した。反応終了後、飽和塩化アンモニウム水溶液を添加してセライト濾過を行い、濾液を酢酸エチルで抽出した。有機層を水と飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (SiO_2 , 酢酸エチル/ヘキサン = 50% から 80%) により精製し、化合物 2 4 (3.01 g, 収率 35%) を淡黄色固体として得た。

[0206] 得られた化合物 2 4 の物性データを表 2 0 に示す。

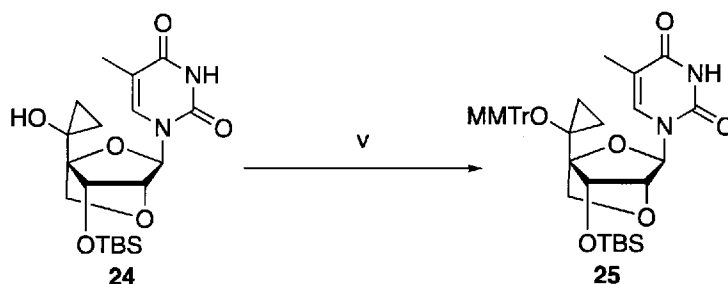
[0207]

[表20]

得られた化合物 24 の物性データ
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 0.10 (s, 6H), 0.60–1.00 (m, 4H), 0.89 (s, 9H), 1.94 (s, 3H), 2.85 (s, 1H), 3.73 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 3.93 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 4.08 (s, 1H), 4.32 (s, 1H), 5.62 (s, 1H), 7.49 (s, 1H), 8.81 (bs, 1H).

[0208] (4-4) 化合物 25 の合成

[0209] [化42]



[0210] 窒素気流下、上記で得られた化合物 24 (2.84 g, 6.92 mmol) の無水ピリジン／テトラヒドロフラン混合溶液 (= 1 : 4 (容量比), 276 mL) に、4-メトキシトリチルクロリド (MMTrCl; 9.40 g, 30.4 mmol) と硝酸銀 (5.05 g, 29.7 mmol) を順次添加し、50℃で4.5時間攪拌した。反応終了後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を添加してセライト濾過を行い、濾液を酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和チオ硫酸ナトリウム水溶液で2回、水／飽和食塩水混合溶液 (= 1 : 1 (容量比)) で1回、飽和食塩水で1回洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒の減圧留去およびトルエン共沸を行った。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー ($\text{NH}_2\text{-SiO}_2$, 酢酸エチル／ヘキサン = 60% から 100%, 次いでメタノール／酢酸エチル = 2%) により精製し、再びシリカゲルカラムクロマトグラフィー ($\text{NH}_2\text{-SiO}_2$, メタノール／クロロホルム = 0% から 1%) を行うことにより、化合物 25 (1.70 g, 収率 36%) を黄色固体として得た。

[0211] 得られた化合物 25 の物性データを表 21 に示す。

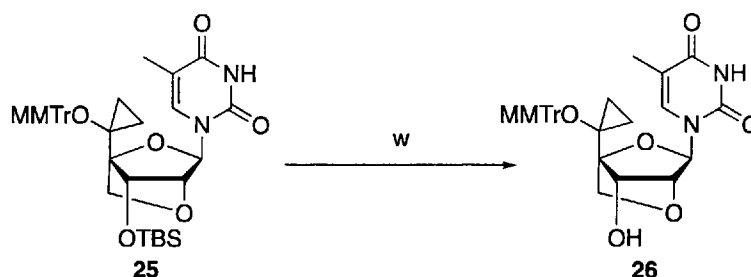
[0212]

[表21]

得られた化合物 25 の物性データ
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 0.01 (s, 3H), 0.04 (s, 3H), 0.52–0.58 (m, 1H), 0.88 (s, 9H), 1.04–1.08 (m, 3H), 1.82 (s, 3H), 3.50 (s, 1H), 3.61 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 3.65 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 3.77 (s, 3H), 4.26 (s, 1H), 5.17 (s, 1H), 6.79 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.19–7.46 (m, 13H), 8.22 (bs, 1H).

[0213] (4 – 5) 化合物 26 の合成

[0214] [化43]



[0215] 上記で得られた化合物 25 (731 mg, 1.07 mmol) のテトラヒドロフラン溶液 (21 mL) に、1.0 M のテトラブチルアンモニウムフルオリド (TBAF) ・テトラヒドロフラン溶液 (1.15 mL, 1.15 mmol) を 0℃ で添加し、室温で 1 時間攪拌した。反応終了後、反応液を減圧留去して水を添加し、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (SiO_2 , メタノール/クロロホルム = 0% から 5%) により精製し、化合物 26 (592 mg, 収率 97%) を淡黄色固体として得た。

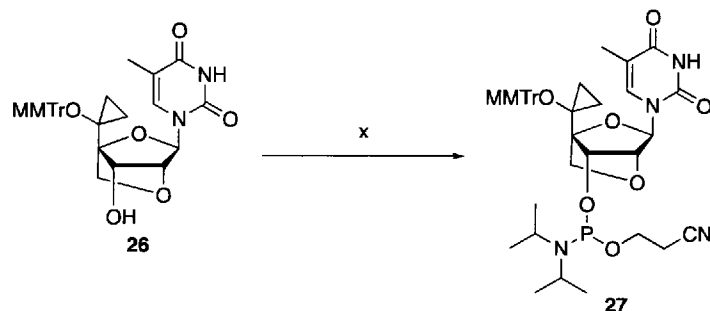
[0216] 得られた化合物 26 の物性データを表 22 に示す。

[0217] [表22]

得られた化合物 26 の物性データ
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 0.66–0.74 (m, 1H), 1.02–1.27 (m, 3H), 1.78 (d, J = 0.9 Hz, 3H), 2.09 (bs, 1H), 3.27 (s, 1H), 3.69 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 3.74 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 3.77 (s, 3H), 4.23 (s, 1H), 5.22 (s, 1H), 6.79–6.85 (m, 2H), 7.14 (d, J = 1.4 Hz, 1H), 7.19–7.46 (m, 12H), 8.56 (bs, 1H)

[0218] (4 – 6) 化合物 27 の合成

[0219] [化44]



[0220] 窒素気流下、上記で得られた化合物 26 (540 mg, 0.95 mmol) の無水アセトニトリル溶液 (9.5 mL) に、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (DIEA; 490 μ L, 2.87 mmol) と 2-シアノエチル-N, N-ジイソプロピルホスホロクロリダート (iPr₂NP(Cl)OCH₂CH₂CN; 320 μ L, 1.43 mmol) を 0°C で順次添加し、室温で 4 時間撹拌した。反応終了後に溶媒を減圧留去し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (SiO₂, 酢酸エチル/ヘキサン=50% から 77%) により精製した。最終的に再沈殿 (クロロホルム/ヘキサン) を行うことにより、化合物 27 (562 mg, 収率 77%) を白色固体として得た。

[0221] 得られた化合物 27 の物性データを表 23 に示す。

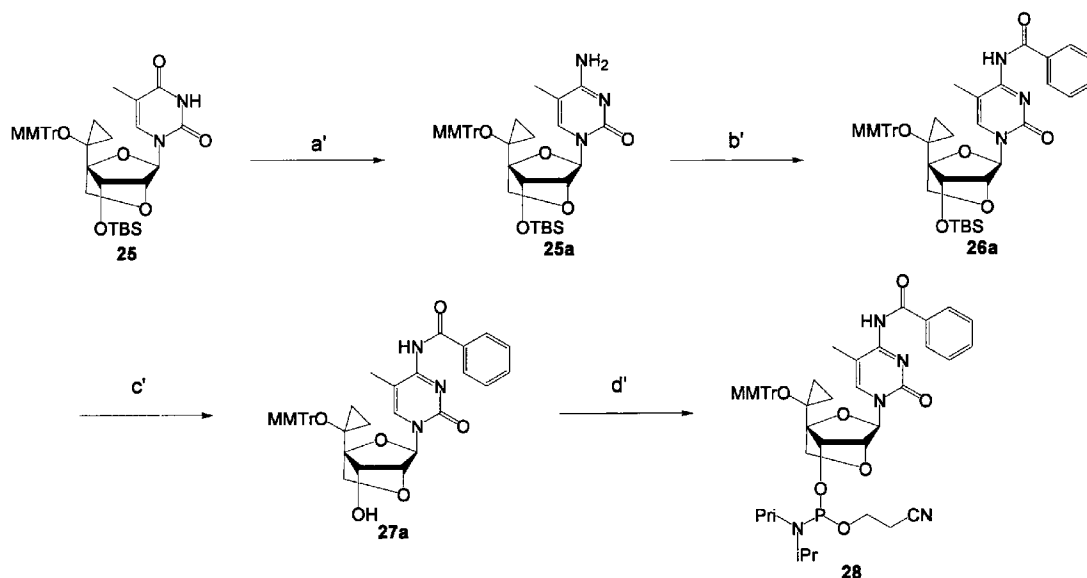
[0222] [表23]

得られた化合物 27 の物性データ
¹ H NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ 0.62–0.73 (m, 1H), 1.04–1.25 (m, 15H), 1.83 (d, J = 0.9 Hz, 1.8H), 1.85 (s, 1.2H), 2.51–2.62 (m, 2H), 3.45–3.82 (m, 10H), 4.52 (s, 1H), 5.17 (s, 0.6H), 5.20 (s, 0.4H), 6.79 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.12–7.46 (m, 13H), 8.24 (bs, 1H); ³¹ P NMR (121.7 MHz, CDCl ₃) δ 148.3, 148.7.

[0223] (実施例 5 : 5' 位修飾ヌクレオシドの合成 (5))

[0224]

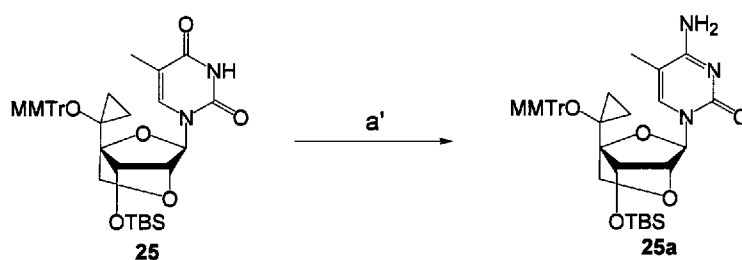
[化45]



各工程の試薬および条件:(a') 1,2,4-トリアゾール, POCl_3 , TEA, MeCN, 室温, 40分間; 飽和 NH_3 水溶液, 1,4-ジオキサン, 室温, 4時間, 94%; (b') BzCl , ピリジン, 0°C , 40分間, 79%; (c') TBAF, THF, 室温, 1時間, 89%; (d') $i\text{Pr}_2\text{NP}(\text{Cl})\text{OCH}_2\cdot\text{CH}_2\text{CN}$, DIPEA, MeCN, 室温, 3時間, 44%.

[0225] (5-1) 化合物 25a の合成

[0226] [化46]



[0227] 窒素気流下、上記で得られた化合物 25 (838 mg, 1.23 mmol) とトリエチルアミン (2.6 mL, 18.7 mmol) と 1,2,4-トリアゾール (1.28 g, 18.5 mmol) と無水アセトニトリル溶液 (12.5 mL) との混合溶液に、塩化ホスホリル (340 μL , 3.73 mmol) を 0°C で添加した。室温で 40 分間攪拌した後、反応溶液に 1,4-ジオキサン (12.5 mL) と 28% アンモニア水 3.7 mL) とを続けて添加し、室温で 4 時間攪拌した。反応終了後、反応液を減圧留去した。残

渣を酢酸エチルで希釈し、水／飽和食塩水（１：１）と飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ SiO_2 ，メタノール／クロロホルム＝０％から３％）により精製し、化合物 25a（788mg，94％）を淡黄色固体として得た。

[0228] 得られた化合物 25 a の物性データを表 24 に示す。

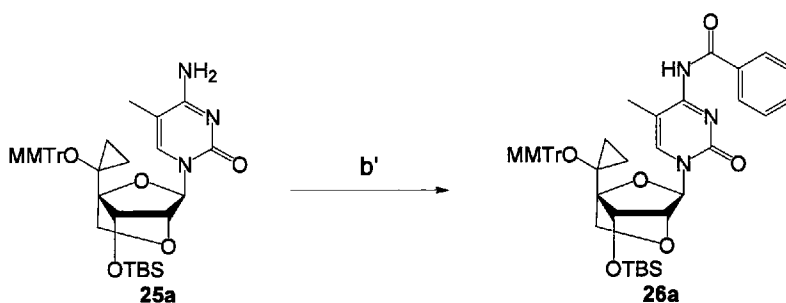
[0229] [表24]

得られた化合物 25a の物性データ

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ -0.04 (s, 3H), 0.01 (s, 3H), 0.52–0.59 (m, 1H), 0.85 (s, 9H), 0.96–1.07 (m, 3H), 1.79 (s, 3H), 3.48 (s, 1H), 3.60 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 3.62 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 3.75 (s, 3H), 4.34 (s, 1H), 5.29 (s, 1H), 6.78 (d, J = 9.2 Hz, 2H), 7.17–7.48 (m, 13H); ^{13}C NMR (76 MHz, CDCl_3) δ -5.0, -4.3, 11.1, 11.4, 13.4, 18.0, 25.7, 55.2, 57.4, 72.2, 72.5, 79.5, 87.2, 87.6, 91.3, 101.0, 112.9, 127.1, 127.7, 128.9, 131.3, 136.5, 137.4, 145.9, 146.0, 155.6, 158.8, 166.0; IR (KBr): 3084, 3013, 2950, 1664, 1611, 1504, 1254, 1058, 857, 756 cm^{-1} ; $[\alpha]_{\text{D}}^{18}$ 96.57 (c 1.00, CHCl_3); HRMS(MALDI) $\text{C}_{39}\text{H}_{47}\text{N}_3\text{O}_6\text{NaSi}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ としての計算値: 704.3132, 実測値: 704.3123

[0230] (5-2) 化合物 26 a の合成

[0231] [化,47]



[0232] 窒素気流下、上記で得られた化合物 25a (728 mg, 1.07 mmol) の無水ピリジン溶液 (10.7 mL) に塩化ベンゾイル (190 μ L, 1.64 mmol) を 0℃ で添加し、0℃ で 40 分間攪拌した。反応終了後、水を添加し、酢酸エチルで抽出した。有機層を水で洗浄した後、溶媒を減圧除去およびトルエン共沸した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (SiO₂, 酢酸エチル／ヘキサン = 4% から 25%) により精製し、化合物 26a (664 mg, 79%) を白色固体として得た。

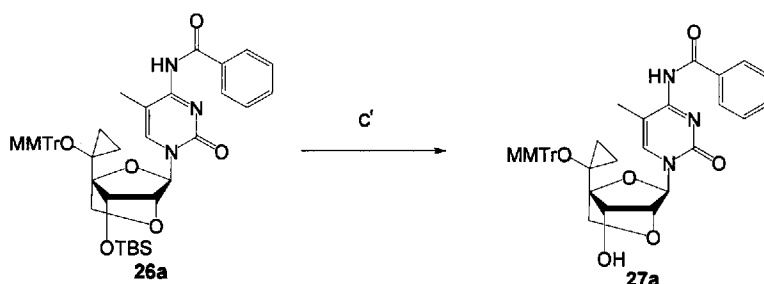
[0233] 得られた化合物 26a の物性データを表 25 に示す。

[0234] [表25]

得られた化合物 26a の物性データ
¹ H NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ 0.01 (s, 3H), 0.04 (s, 3H), 0.55–0.60 (m, 1H), 0.88 (s, 9H), 0.89–1.09 (m, 3H), 2.02 (s, 3H), 3.49 (s, 1H), 3.65 (s, 2H), 3.77 (s, 3H), 4.32 (s, 1H), 5.23 (s, 1H), 6.80 (d, <i>J</i> = 8.7 Hz, 2H), 7.19–7.53 (m, 15H), 8.09–8.12 (m, 1H), 8.29–8.33 (m, 2H); ¹³ C NMR (76 MHz, CDCl ₃) δ –5.0, –4.3, 11.3, 11.7, 13.9, 18.0, 25.7, 55.3, 57.1, 72.3, 72.6, 79.3, 87.2, 87.8, 91.8, 111.1, 112.9, 127.2, 127.7, 127.9, 128.3, 128.5, 128.9, 130.0, 130.3, 131.3, 132.6, 133.7, 136.3, 136.5, 137.0, 145.8, 145.9, 147.5, 158.8, 159.9, 179.5; IR (KBr): 2948, 1705, 1568, 1254, 1173, 1057, 856, 756 cm ^{–1} ; [α] _D ¹⁸ 113.69 (c 1.00, CHCl ₃); HRMS(MALDI) C ₄₆ H ₅₁ N ₃ O ₇ NaSi [M+Na] ⁺ としての計算値: 808.3388, 実測値:808.3386

[0235] (5 – 3) 化合物 27a の合成

[0236] [化48]



[0237] 上記で得られた化合物 26a (611 mg, 0.78 mmol) のテトラヒドロフラン溶液 (850 μL, 0.85 mmol) に、1.0 M のテトラブチルアンモニウムフルオリド (TBAF) のテトラヒドロフラン溶液 (855 μL, 0.86 mmol) を 0℃ で添加し、室温で 1 時間攪拌した。反応終了後、反応溶液を減圧留去し、酢酸エチルで希釈した。溶液を水と飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (SiO₂, 酢酸エチル/ヘキサン = 30% から 50%) により精製し、化合物 27a (464 mg, 89%) を白色固体として得た。

[0238] 得られた化合物 27a の物性データを表 26 に示す。

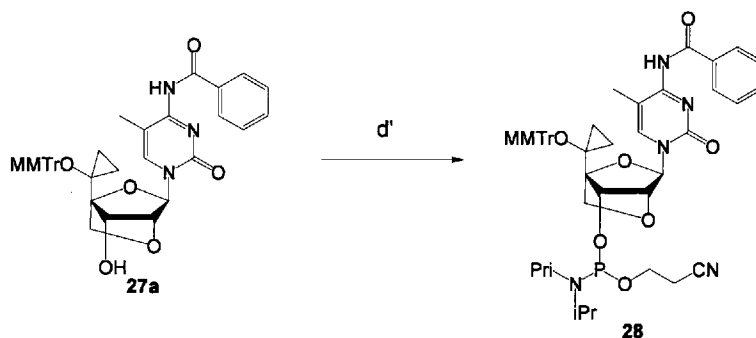
[0239]

[表26]

得られた化合物 27a の物性データ
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 0.70–0.77 (m, 1H), 1.02–1.30 (m, 3H), 1.77 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 1.97 (s, 3H), 3.26 (d, J = 6.9 Hz, 1H), 3.69 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 3.73 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 3.77 (s, 3H), 4.26 (s, 1H), 5.29 (s, 1H), 6.83 (d, J = 9.2 Hz, 2H), 7.21–7.56 (m, 16H), 8.30 (d, J = 7.3 Hz, 2H), 13.34 (bs, 1H); ^{13}C NMR (76 MHz, CDCl_3) δ 11.6, 11.7, 13.7, 55.3, 56.7, 71.6, 72.3, 80.0, 86.4, 87., 91.4, 111.1, 113.1, 127.3, 127.9, 128.2, 128.7, 128.8, 130.0, 131.1, 132.6, 135.8, 136.5, 137.1, 145.8, 145.8, 147.4, 158., 159.7, 179.7; IR (KBr): 3440, 3065, 3021, 2956, 1703, 1568, 1354, 1251, 1046, 755, 708 cm^{-1} ; $[\alpha]_{\text{D}}^{18}$ 80.80 (c 1.00, CHCl_3); HRMS(MALDI) $\text{C}_{40}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_7\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ としての計算値: 694.2529, 実測値: 694.2525

[0240] (5 – 4) 化合物 28 の合成

[0241] [化49]



[0242] 窒素気流下、上記で得られた化合物 27a (410 mg, 0.61 mmol) の無水アセトニトリル溶液 (6.1 mL) に N, N-ジイソプロピルエチルアミン (420 μL , 2.46 mmol) と 2-シアノエチル-N, N-ジイソプロピルホスホロクロリダート (270 μL , 1.21 mmol) を 0℃ で添加し、室温で 3 時間攪拌した。反応終了後、反応溶液を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (SiO_2 , 酢酸エチル/ヘキサン = 20% から 41%) により精製し、化合物 28 (236 mg, 44%) を白色固体として得た。

[0243] 得られた化合物 28 の物性データを表 27 に示す。

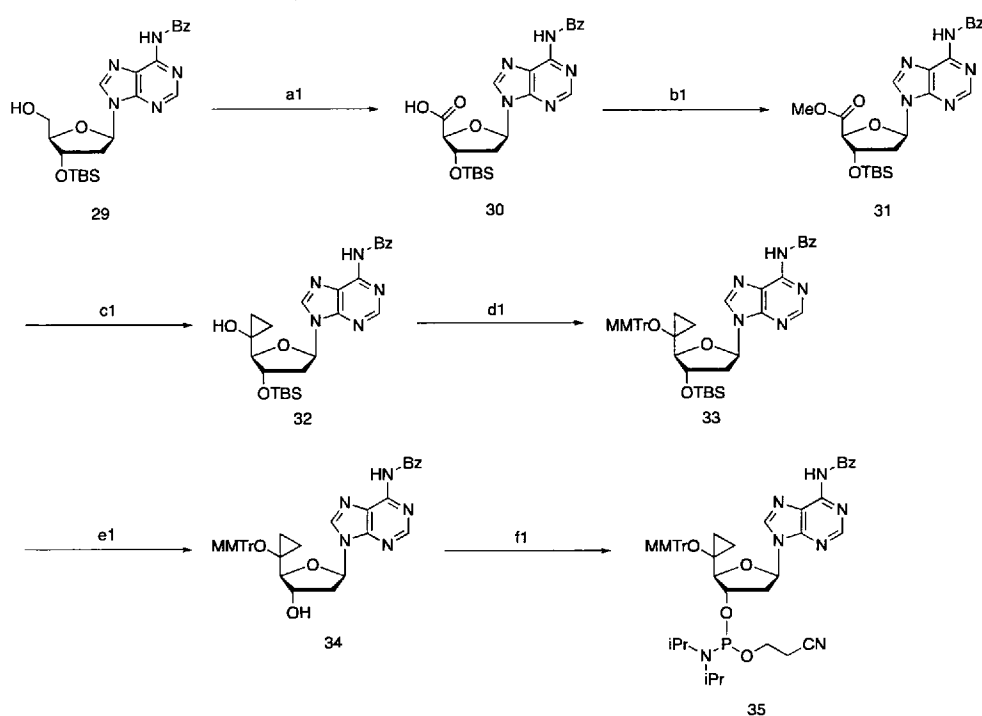
[0244]

[表27]

得られた化合物 28 の物性データ
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 0.66–0.76 (m, 1H), 1.13–1.24 (m, 15H), 2.03 (d, $J = 0.9$ Hz, 1.5H), 2.05 (d, $J = 0.9$ Hz, 1.5H), 2.46–2.60 (m, 2H), 3.46–3.81 (m, 7H), 3.76 (s, 3H), 4.58 (s, 1H), 5.21 (s, 0.5H), 5.23 (s, 0.5H), 6.80 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H), 7.18–7.55 (m, 16H), 8.32 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H), 13.34 (bs, 1H); ^{31}P NMR (121.7 MHz, CDCl_3) δ 148.5, 149.0; HRMS(MALDI) $\text{C}_{49}\text{H}_{54}\text{N}_5\text{O}_8\text{PNa}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ としての計算値:894.3608, 実測値:894.3604

[0245] (実施例 6 : 5' 位修飾ヌクレオシドの合成 (6))

[0246] [化50]

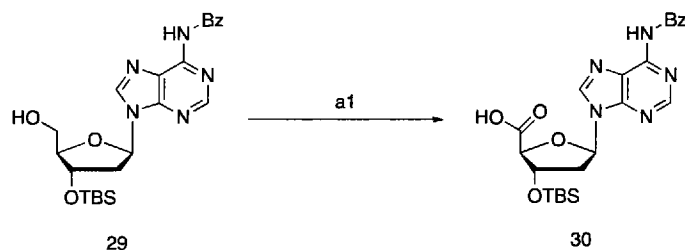


各工程の試薬および条件:(a1) TEMPO, $\text{PhI}(\text{OAc})_2$, CH_2Cl_2 , 室温, 2時間; MeCN, H_2O , 室温, 12時間; (b1) EDC $\cdot$ HCl, MeOH, CH_2Cl_2 , 0 $^\circ\text{C}$, 3時間, 71% (2工程); (c1) EtMgBr, $\text{Ti}(\text{OiPr})_4$, THF, 0 $^\circ\text{C}$ から室温, 5時間, 23%; (d1) MMTrCl, AgNO_3 , ピリジン, THF, 50 $^\circ\text{C}$, 6時間, 62%; (e1) TBAF, THF, 室温, 12時間, 86%; (f1) $\text{iPr}_2\text{NP}(\text{Cl})\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$, DIPEA, MeCN, 室温, 3時間, 69%.

[0247] (6-1) 化合物 30 の合成

[0248]

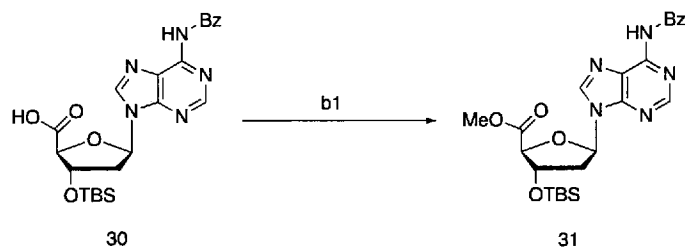
[化51]



[0249] 公知の方法（Suzukiら、*Biomacromolecules*, 2011年, 12巻, 5号, 1449–1459頁）より得られた化合物29（1.60g, 3.41mmol）のジクロロメタン溶液（17mL）にヨードベンゼンジアセテート（2.41g; 7.48mmol）と2,2,6,6-テトラメチルピペリジン1-オキシルフリーラジカル（123mg; 0.79mmol）とを0℃で順次添加し、室温で2時間攪拌した後、アセトニトリル／水（＝1：1（容量比）, 200μL）を添加し、さらに室温で12時間攪拌した。反応終了後に過剰量のメタノールを添加し、10分間室温で攪拌し、溶媒の減圧留去およびトルエン共沸を行って、黄色固体の化合物30を得た。この化合物30を精製することなく即座に次の反応に用いた。

[0250] （6－2）化合物31の合成

[0251] [化52]



[0252] 上記で得られた化合物30のジクロロメタン溶液（17mL）にメタノール（1.50mL, 36mmol）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（1.57g, 8.2mmol）を順次

添加し、0℃で3時間撹拌した。反応終了後に水を添加し、酢酸エチルで抽出した。有機層を水と飽和食塩水とで洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（SiO₂，ヘキサン／酢酸エチル＝50％）により精製し、化合物31（1.21g，収率71％，2工程）を白色固体として得た。

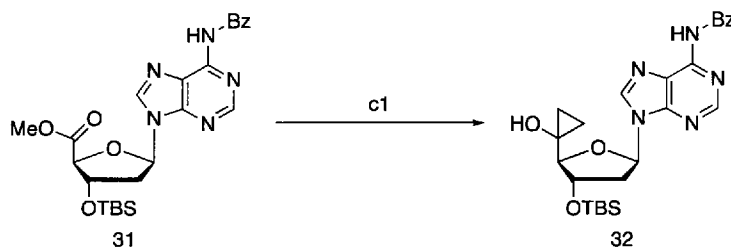
[0253] 得られた化合物31の物性データを表28に示す。

[0254] [表28]

得られた化合物31の物性データ
¹ H NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ 0.16 (s, 6H), 0.95 (s, 9H), 2.52-2.57 (m, 2H), 3.81 (s, 3H), 4.58 (s, 1H), 4.71-4.74 (m, 1H), 6.76 (dd, <i>J</i> = 7.1, 7.1 Hz, 1H), 7.53 (t, <i>J</i> = 7.4 Hz, 2H), 7.62 (t, <i>J</i> = 7.3 Hz, 1H), 8.04 (d, <i>J</i> = 6.9 Hz, 2H), 8.73 (s, 1H), 8.82 (s, 1H), 9.02 (s, 1H); ¹³ C NMR (126 MHz, CDCl ₃) δ -5.0, 18.0, 25.6, 41.2, 52.6, 75.8, 85.7, 123.0, 127.8, 128.8, 132.7, 133.7, 142.0, 149.4, 151.6, 152.6, 164.6, 171.3; HRMS(MALDI) C ₂₄ H ₃₁ N ₅ ONaSi [M+Na] ⁺ としての計算値: 520.1992 実測値: 520.1994

[0255] (6-3) 化合物32の合成

[0256] [化53]



[0257] 窒素気流下、上記で得られた化合物31（5.98g，12.0mmol）とチタンテトライソプロポキシド（4.0mL，15mmol）の無水テトラヒドロフラン溶液（120mL）に、1.0Mのエチルマグネシウムブロミドのテトラヒドロフラン溶液（60mL，60mmol）を0℃で15分かけて滴下した。滴下後、反応溶液を室温まで加温し、さらに5時間撹拌した。反応終了後、飽和塩化アンモニウム水溶液を加えてセライト濾過を行い、濾液を酢酸エチルで抽出した。有機層を水と飽和食塩水とで洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシ

リカゲルカラムクロマトグラフィー（ SiO_2 ，アセトン／クロロホルム＝10％から15％）により精製し化合物32（1.40g，収率23％）を黄色固体として得た。

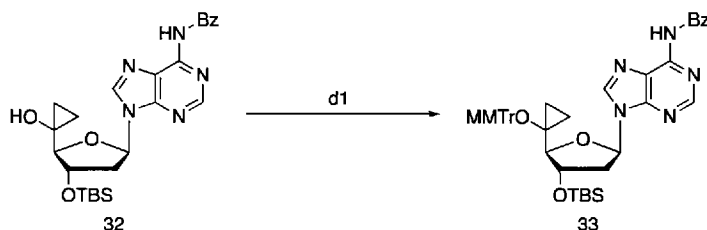
[0258] 得られた化合物32の物性データを表29に示す。

[0259] [表29]

得られた化合物32の物性データ
^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 0.10 (s, 3H), 0.11 (s, 3H), 0.59-0.64 (m, 2H), 0.84-0.87 (m, 2H), 0.90 (s, 9H), 2.23 (dd, $J = 5.8, 13$ Hz, 1H), 3.10-3.15 (m, 1H), 3.50 (s, 1H), 4.87 (d, $J = 4.6$ Hz, 1H), 6.35 (dd, $J = 5.4, 9.6$ Hz, 1H), 6.86 (s, 1H), 7.46 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H), 7.56 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H), 8.00 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 8.07 (s, 1H), 8.68 (s, 1H), 9.37 (s, 1H); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ -4.9, -4.8, 10.1, 13.2, 25.5, 25.7, 25.8, 40.7, 55.3, 74.6, 87.6, 96.0, 124.7, 127.9, 128.7, 132.8, 133.4, 142.7, 149.4, 150.3, 150.5, 151.8, 164.7; HRMS(MALDI) $\text{C}_{25}\text{H}_{33}\text{N}_5\text{O}_4\text{NaSi}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ としての計算値: 518.2200, 実測値: 518.2194

[0260] (6-4) 化合物33の合成

[0261] [化54]



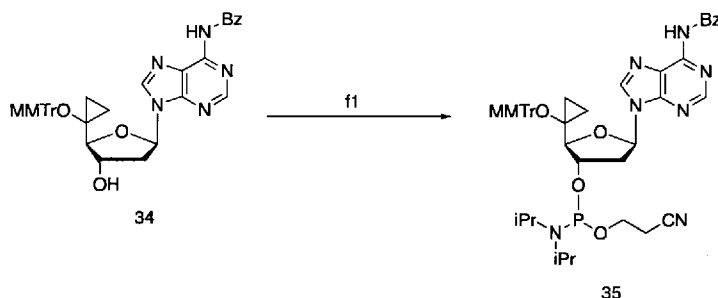
[0262] 窒素気流下、上記で得られた化合物32（890mg，1.8mmol）の無水ピリジン／テトラヒドロフラン混合溶液（＝1：4（容量比），70mL）に、4-メトキシトリチルクロリド（2.9g，94mmol）と硝酸銀（1.4g，8.3mmol）とを順次添加し、50℃で6時間撹拌した。反応終了後、飽和炭酸水素ナトリウムを添加してセライト濾過を行い、濾液を酢酸エチルで抽出した。有機層を水と飽和食塩水とで洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ SiO_2 ，1％トリエチルアミン含有、酢酸エチル／ヘキサン＝100％→メタノール／クロロホルム＝0％→10％）により精製し、化合物33（849mg，収率62％）を黄色固体として得

[表31]

得られた化合物 3 4 の物性データ
¹ H NMR (500 MHz, CDCl ₃) δ 0.43-0.46 (m, 1H), 0.65-0.68 (m, 1H), 0.88 (t, <i>J</i> = 6.9 Hz, 2H), 2.10 (s, 1H), 2.33-2.38 (m, 1H), 2.83 (s, 2H), 3.80 (s, 3H), 4.86-4.87 (m, 1H), 6.07 (dd, <i>J</i> = 6.9 Hz, 1H), 6.84 (d, 1H), 7.22-7.25 (m, 2H), 7.27-7.31 (m, 4H), 7.35-7.37 (m, 2H), 7.45-7.47 (m, 4H), 7.49-7.50 (m, 2H), 7.57 (t, <i>J</i> = 7.6Hz, 1H), 7.95 (s, 1H), 8.00 (d, <i>J</i> = 7.7Hz, 2H), 8.75(s, 1H), 9.16 (s, 1H); ¹³ C NMR (126 MHz, CDCl ₃) δ 8.4, 9.8, 38.8, 55.2, 59.9, 73.3, 83.5, 84.6, 87.5, 113.1, 123.4, 127.2, 127.9, 128.4, 128.8, 130.9, 132.7, 133.5, 136.1, 141.4, 145.9, 149.5, 151.5, 152.6, 158.9, 164.6; HRMS (MALDI) C ₃₉ H ₃₅ N ₅ O ₅ Na [M+Na] ⁺ としての計算値: 676.2536, 実測値:676.2553

[0270] (6-6) 化合物 3 5 の合成

[0271] [化56]



[0272] 窒素気流下、上記で得られた化合物 3 4 (98 mg, 0.15 mmol) を無水アセトニトリル溶媒 (1.5 mL) に N, N-ジイソプロピルエチルアミン (DIEA; 80 μL) と 2-シアノエチル N, N-ジイソプロピルホスホロリダート (iPr₂NP(CI)OCH₂CH₂CN; 55 μL) を順次添加し、室温で 3 時間攪拌した。反応終了後に溶媒を減圧留去し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (SiO₂, 酢酸エチル/ヘキサン = 150%) により精製を行った。最終的に再沈殿 (酢酸エチル/ヘキサン) を行うことにより、化合物 3 5 (88 mg, 収率 69%) を白色固体として得た。

[0273] 得られた化合物 3 5 の物性データを表 3 2 に示す。

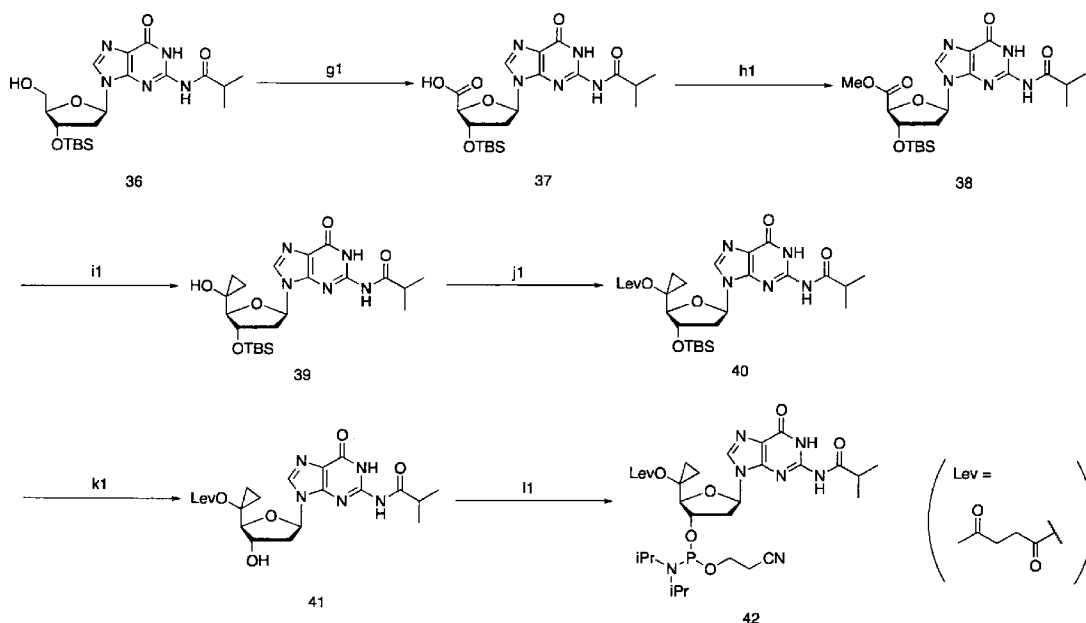
[0274]

[表32]

得られた化合物 35 の物性データ
^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 0.52-0.55 (m, 1H), 0.76-0.79 (m, 1H), 0.88-0.96 (m, 2H), 1.12-1.26 (m, 12H), 2.43-2.47 (m, 1H), 2.57-2.69 (m, 2H), 2.72-2.78 (m, 1H), 3.56-3.62 (m, 2H), 3.80 (s, 1H), 3.81 (s, 2H), 4.88-4.92 (m, 1H), 6.08-6.13 (m, 1H), 6.80 (d, $J = 8.4$ Hz, 0.6H), 6.82 (d, $J = 9.2$ Hz, 1.4 H), 7.21-7.24 (m, 4H), 7.27-7.29 (m, 2H), 7.33-7.37 (m, 2H), 7.43-7.47 (m, 4H), 7.51 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H), 7.60 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H), 8.00 (d, $J = 6.9$ Hz, 2 H), 8.04 (s, 1H), 8.75 (s, 0.7H), 8.77 (s, 0.3H), 8.99 (s, 0.7H), 9.00 (s, 0.3 H); ^{31}P NMR (202.5MHz, CDCl_3) δ 147.7, 149.7; HRMS(FAB) $\text{C}_{48}\text{H}_{53}\text{N}_7\text{O}_6\text{P}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ としての計算値:854.3795, 実測値:854.3790

[0275] (実施例 7 : 5' 位修飾ヌクレオシドの合成 (7))

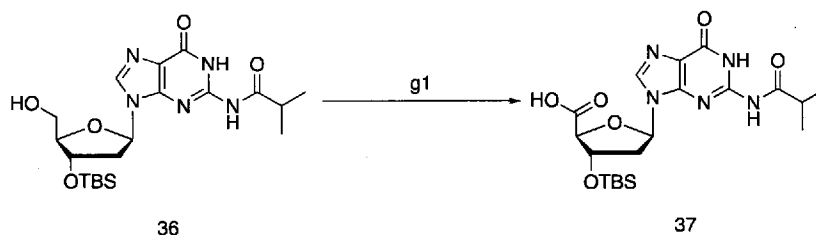
[0276] [化57]



[0277] (7-1) 化合物 37 の合成

[0278]

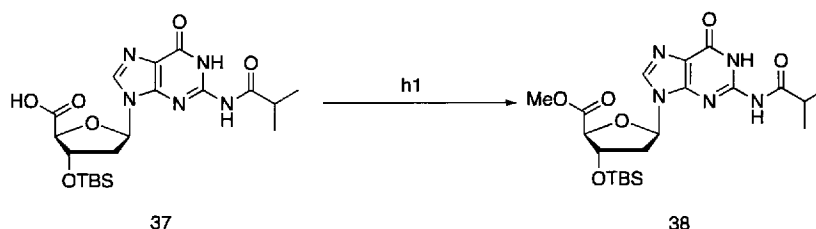
[化58]



[0279] 公知の方法 (Wexsellblattら、Bioorg. Med. Chem., 2010年, 18巻, 12号, 4485-4497頁) により得られた化合物36 (28.3g, 63mmol) のジクロロメタン溶液 (300mL) にヨードベンゼンジアセテート (44.8g, 140mmol) と 2, 2, 6, 6-テトラメチルピペリジン1-オキシフリーラジカル (2.5g, 16mmol) とを0℃で順次添加し、室温で2時間攪拌した後、アセトニトリル/水 (=1:1 (容量比), 8.0mL) を添加し、さらに室温で14時間攪拌した。反応終了後に過剰量のメタノールを加え、10分間室温で攪拌し、溶媒の減圧留去およびトルエン共沸を行って、黄色個体の化合物37を得た。この化合物37を精製することなく即座に次の反応に用いた。

[0280] (7-2) 化合物38の合成

[0281] [化59]



[0282] 上記で得られた化合物37のジクロロメタン溶液 (40mL) にメタノール (30mL, 740mmol) 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 (19g, 99mmol) を順次添加し、0℃で2時間攪拌した。反応終了後に水を添加し、酢酸エチルで抽出した。

有機層を水と飽和食塩水とで洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ SiO_2 ，メタノール／クロロホルム＝１０％）により精製し、化合物３８（２２．２ｇ，収率７４％，２工程）を白色固体として得た。

[0283] 得られた化合物 38 の物性データを表 33 に示す。

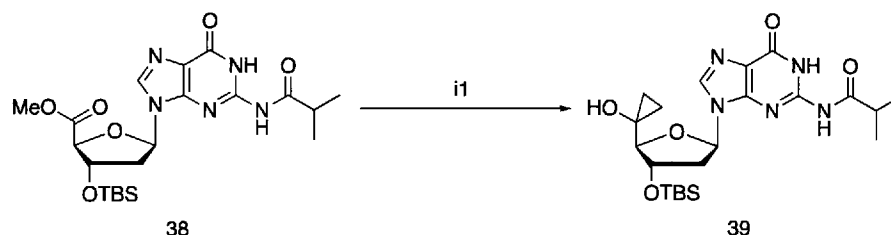
[0284] [表33]

得られた化合物 38 の物性データ

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 0.08 (s, 3H), 0.10 (s, 3H), 0.86 (s, 9H), 1.20 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H), 1.23 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H), 2.39-2.45 (m, 2H), 2.71-2.76 (m, 1H), 3.73 (s, 3H), 4.43 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 4.63 (s, 1H), 6.38 (d, $J = 7.1$, 7.1 Hz, 1H), 8.25 (s, 1H), 9.37 (s, 1H), 12.10 (s, 1H); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ -5.1, -5.0, 17.9, 18.9, 19.0, 25.5, 36.3, 40.9, 52.5, 75.5, 84.9, 85.5, 120.9, 137.5, 147.7, 148.2, 155.6, 171.0, 178.9; HRMS(MALDI) $\text{C}_{21}\text{H}_{33}\text{N}_5\text{O}_6\text{NaSi}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ としての計算値: 502.2098 実測値: 502.2074

[0285] (7-3) 化合物39の合成

[0286] [化60]



[0287] 窒素気流下、上記で得られた化合物 38 (6.02 g, 12 mmol) とチタンテトライソプロポキシド (4.0 mL, 14.7 mmol) の無水テトラヒドロフラン溶液に 1.0 M のエチルマグネシウムブロミドのテトラヒドロフラン溶液 (60 mL, 60 mmol) を 0℃ で 15 分かけて滴下した。滴下後、反応溶液を室温まで加温し、さらに 7 時間攪拌した。反応終了後、飽和塩化アンモニウム水溶液を加えてセライト濾過を行い、濾液を酢酸エチルで抽出した。有機層を水と飽和食塩水とで洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (SiO₂, アセトン／クロロホルム = 20% から 25%)

により精製し化合物 39 (2.08 g, 収率 35%) を黄色固体として得た。

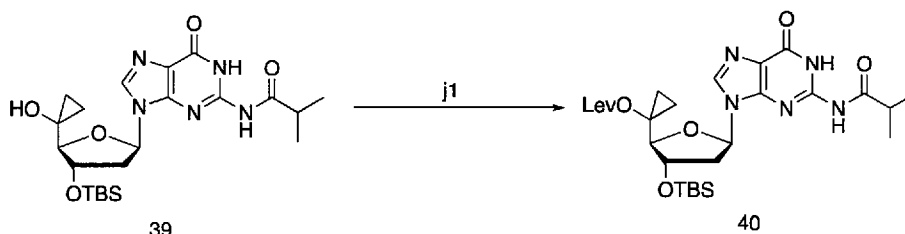
[0288] 得られた化合物 39 の物性データを表 34 に示す。

[0289] [表34]

得られた化合物 39 の物性データ
¹ H NMR (500 MHz, CDCl ₃) δ 0.09 (s, 3H), 0.10 (s, 3H), 0.61-0.69 (m, 2H), 0.81-0.87 (m, 2H), 0.89 (s, 9H), 1.21 (d, <i>J</i> = 5.4 Hz, 3H), 1.23 (d, <i>J</i> = 5.5 Hz, 3H), 2.21-2.25 (m, 1H), 2.64-2.70 (s, 1H), 2.88 (m, 1H), 3.42-3.43 (m, 1H), 4.79-4.80 (m, 1H), 5.91 (s, 1H), 6.17 (dd, <i>J</i> = 8.9, 5.7 Hz, 1H), 7.80 (s, 1H), 8.74 (s, 1H), 12.04 (s, 1H); ¹³ C NMR (126 MHz, CDCl ₃) δ -4.8, -4.7, 9.6, 13.5, 18.0, 18.9, 25.7, 36.4, 40.9, 55.5, 74.1, 86.5, 94.9, 122.7, 138.8, 147.0, 147.4, 155.2, 178.7; HRMS(MALDI) C ₂₂ H ₃₅ N ₅ O ₅ NaSi [M+Na] ⁺ としての計算値: 500.2305, 実測値:500.2291

[0290] (7-3) 化合物 40 の合成

[0291] [化61]



[0292] 窒素気流下、上記で得られた化合物 39 (256 mg, 0.54 mmol) とレブリン酸 (937 mg, 8.1 mmol) の無水ジクロロメタン溶液 (12.5 mL) に 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 (524 mg, 2.7 mmol)、N,N-ジメチルアミノピリジン (93 mg, 0.72 mmol)、N,N-ジイソプロピルエチルアミン (560 μL, 3.2 mmol) を順次添加し、25 時間攪拌した。反応終了後に水を添加し、反応液をクロロホルムで抽出した。有機層を水と飽和食塩水とで洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (SiO₂, アセトン/クロロホルム=20%およびメタノール/クロロホルム=10%) により精製し、化合物 40 (239 mg, 収率 78%) を茶色固体として

得た。

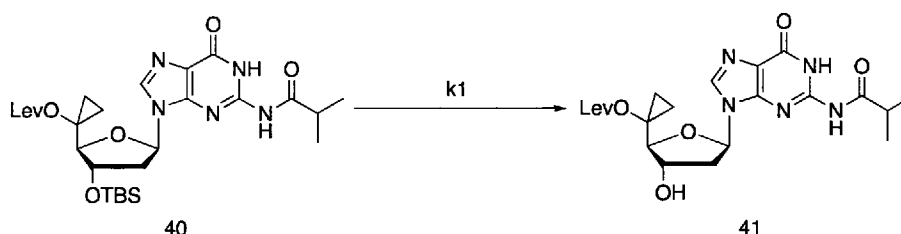
[0293] 得られた化合物40の物性データを表35に示す。

[0294] [表35]

得られた化合物40の物性データ
^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 0.84-0.89 (m, 1H), 0.91 (s, 9H), 0.96-1.06 (m, 3H), 1.27 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H), 1.27 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H), 2.19 (s, 3H), 2.31-2.41 (m, 2H), 2.51-2.64 (m, 4H), 2.72-2.79 (m, 2H), 3.73 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H), 4.76-4.78 (m, 1H), 6.14 (dd, $J = 6.3, 7.5$ Hz, 1H), 7.95 (s, 1H), 8.36 (s, 1H), 11.99 (s, 1H); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ -4.7, 0.0, 10.3, 10.9, 17.9, 19.0, 25.7, 28.2, 29.9, 36.6, 37.6, 40.5, 58.1, 72.5, 83.1, 90.6, 121.8, 137.0, 147.3, 155.4, 172.5, 178.0, 207.1; HRMS(MALDI) $\text{C}_{27}\text{H}_{41}\text{N}_5\text{O}_7\text{NaSi}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ としての計算値: 598.2673, 実測値: 598.2651

[0295] (7-4) 化合物41の合成

[0296] [化62]



[0297] 上記で得られた化合物40 (148 mg, 0.26 mmol) のテトラヒドロフラン溶液 (5.0 mL) に1.0 Mのテトラブチルアンモニウムフルオリド (TBAF) のテトラヒドロフラン溶液 (350 μL , 0.35 mmol) を0℃で添加し、室温で16時間攪拌した。反応終了後、反応液を減圧留去して水を添加し、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (SiO_2 , メタノール/クロロホルム = 10%) により精製し、化合物41 (74 mg, 収率62%) を白色固体として得た。

[0298] 得られた化合物41の物性データを表36に示す。

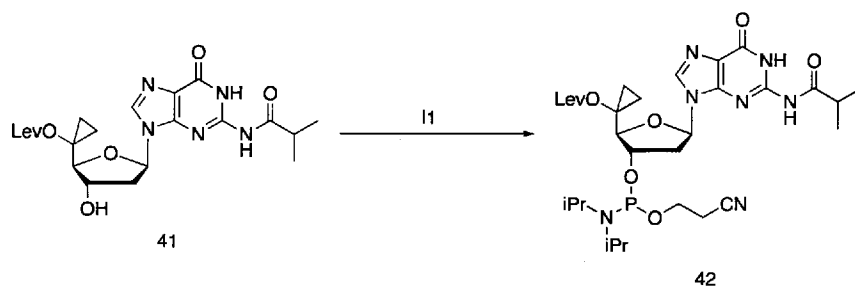
[0299]

[表36]

得られた化合物 4 1 の物性データ
^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 0.00-0.83 (m, 1H), 0.86-0.92 (m, 2H), 0.94-0.95 (m, 1H), 1.23 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H), 1.26 (d, $J = 6.9$ Hz, 1H), 2.24 (s, 3H), 2.37-2.50 (m, 2H), 2.59-2.72 (m, 1H), 2.88-2.94 (m, 1H), 3.68 (s, 1H), 3.74 (d, $J = 6.3$ Hz, 1H), 4.70 (m, 1H), 6.05 (dd, $J = 4.6$ Hz, 1H), 7.87 (s, 1H), 9.33 (s, 1H), 12.16 (s, 1H); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 9.7, 10.2, 18.9, 19.0, 28.2, 29.8, 36.0, 37.8, 39.4, 58.4, 70.9, 83.0, 87.5, 121.1, 137.8, 148.1, 148.4, 155.9, 173.2, 180.1, 207.8; HRMS(MALDI) $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{N}_5\text{O}_7\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ としての計算値: 484.1808, 実測値: 484.1790

[0300] (7-5) 化合物 4 2 の合成

[0301] [化63]



[0302] 窒素気流下、上記で得られた化合物 4 1 (67 mg, 0.15 mmol) を無水アセトニトリル溶媒 (440 μL) に N, N-ジイソプロピルエチルアミン (DIEA; 75 μL) と 2-シアノエチル N, N-ジイソプロピルホスホロリダート ($\text{iPr}_2\text{NP}(\text{Cl})\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$; 65 μL) を順次添加し、室温で 3 時間攪拌した。反応終了後に溶媒を減圧留去し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (SiO_2 , 酢酸エチル/ヘキサン = 75% から 100%, そしてメタノール/クロロホルム 5%) により精製を行った。最終的に再沈殿 (酢酸エチル/ヘキサン) を行うことにより、化合物 4 2 (70 mg, 収率 73%) を白色固体として得た。

[0303] 得られた化合物 4 2 の物性データを表 3 7 に示す。

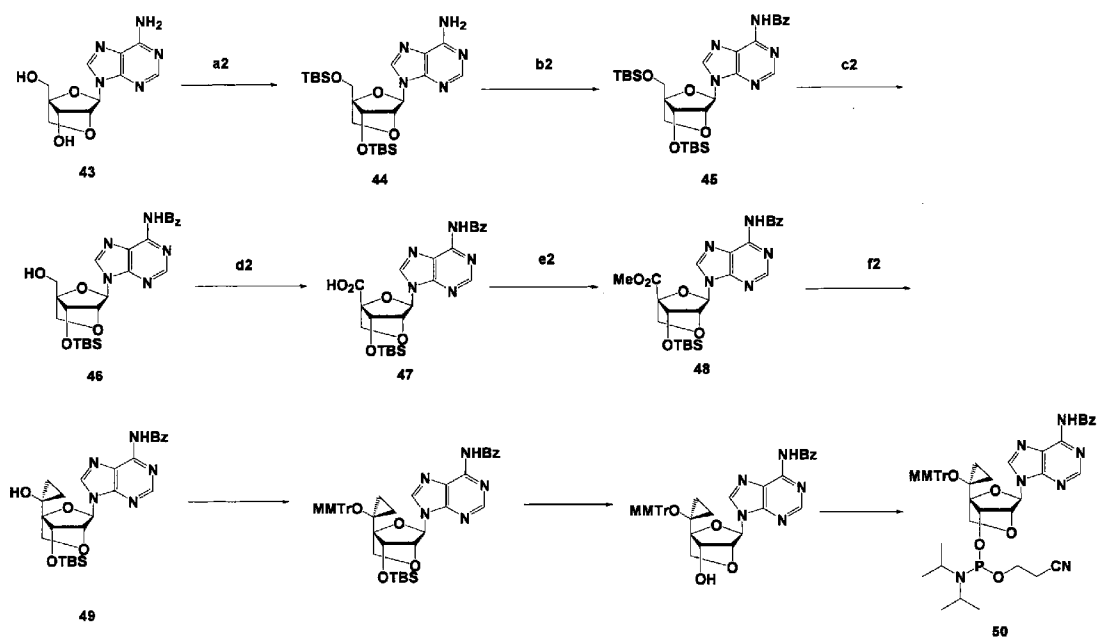
[0304]

[表37]

得られた化合物 4 2 の物性データ
^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 0.89-1.06 (m, 4H), 1.18-1.29 (m, 18H), 2.16 (s, 1.4H), 2.18 (s, 1.6H), 2.40-2.86 (m, 7H), 3.60-4.10 (m, 5H), 4.82-4.87 (m, 1H), 6.12-6.16 (m, 1H), 7.88 (s, 0.6H), 7.92 (s, 0.4H), 8.73 (s, 0.6H), 9.01 (s, 0.4H), 12.00 (s, 0.5H), 12.06 (s, 0.5H); ^{31}P NMR (202MHz, CDCl_3) δ 14 7.5, 148.8; HRMS(MALDI) $\text{C}_{30}\text{H}_{44}\text{N}_7\text{O}_8\text{PNa}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ としての計算値: 684.2881, 実測値: 684.2863

[0305] (実施例 8 : 5' 位修飾ヌクレオシドの合成 (8))

[0306] [化64]

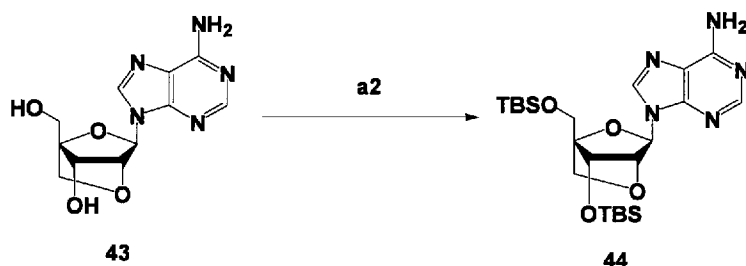


各工程の試薬および条件:(a2) TBSCl, イミダゾール, ピリジン, 還流, 13時間; (b2) BzCl, ピリジン, 70℃, 28.5時間, 28%アンモニア水溶液, THF, 40℃, 3時間; (c2) TFA, THF, H_2O , 0℃, 5時間, 66% (3工程); (d2) TEMPO, $\text{PhI}(\text{OAc})_2$, H_2O , CH_2Cl_2 , MeCN, 2.5時間, 35%; (e2) EDC·HCl, $\text{CH}_2\text{ClCH}_2\text{Cl}$, 50℃, 2.5時間; MeOH, 5 0℃, 5時間, 56%(2工程); (f) EtMgBr, $\text{Ti}(\text{OiPr})_4$, THF, 0℃から室温, 8.5時間.

[0307] (8-1) 化合物 4 4 の合成

[0308]

[化65]



[0309] 窒素気流下、化合物43（403mg，1.4mmol）の無水ピリジン溶液（17ml）に、イミダゾール（576mg，8.5mmol）とtert-ブチルジメチルクロロシラン（1.3g，8.5mmol）を室温で順次添加し、12.5時間加熱還流した。反応終了後に水および飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を添加し、ピリジン溶媒を減圧留去した後、酢酸エチルで抽出した。有機層を水と飽和食塩水とで洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を減圧留去およびトルエン共沸をし、粗生成物として化合物44（806mg）を得た。この化合物44を精製することなく、次の反応に用いた。なお、解析用に一部をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（SiO₂，酢酸エチル／ヘキサン＝30％から60％）により精製した。

[0310] 得られた化合物44の物性データを表38に示す。

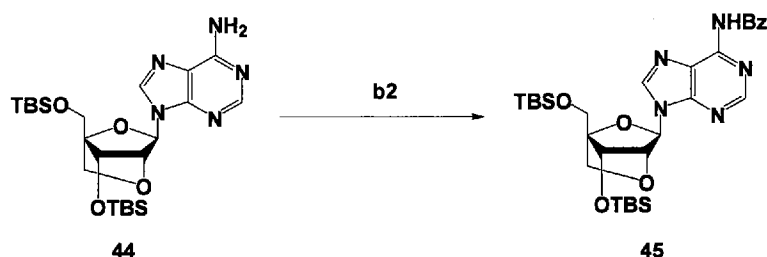
[0311] [表38]

得られた化合物44の物性データ
¹ H NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ 0.04(s, 3H), 0.05(s, 3H), 0.11(s, 3H), 0.11(s, 3H), 0.87(s, 9H), 0.93(s, 9H), 3.86(d, J = 7.6 Hz, 1H), 3.90(d, J = 12.1 Hz, 1H), 3.96(d, J = 11.7 Hz, 1H), 4.04(d, J = 7.2 Hz, 1H), 4.39(s, 1H), 4.59(s, 1H), 5.63(brs, 2H), 6.01(s, 1H), 8.08(s, 1H), 8.34(s, 1H); HRMS(MALDI) C ₂₃ H ₄₂ N ₅ O ₄ Si ₂ [M+H] ⁺ としての計算値: 508.2775 実測値: 508.2770

[0312] (8-2) 化合物45の合成

[0313]

[化66]



[0314] 上記で得られた化合物 4 4 のピリジン溶液 (8.5 ml) に、塩化ベンゾイル (390 μ l, 3.4 mmol) を 0℃ で添加し、70℃ で 12.5 時間撹拌した。反応終了後に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を 0℃ で添加し、酢酸エチルで抽出した。有機層を水と飽和食塩水とで洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を減圧留去した。その後テトラヒドロフラン (17 ml) を添加し、アンモニア水溶液 (1.7 ml) を 0℃ で添加し、40℃ で 3 時間撹拌した。反応終了後に溶媒を減圧留去し、粗生成物として化合物 4 5 (825 mg) を得た。この化合物を精製することなく、次の反応に用いた。なお、解析用に一部をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (SiO₂, 酢酸エチル/ヘキサン = 30% から 50%) により精製した。

[0315] 得られた化合物 4 5 の物性データを表 3 9 に示す。

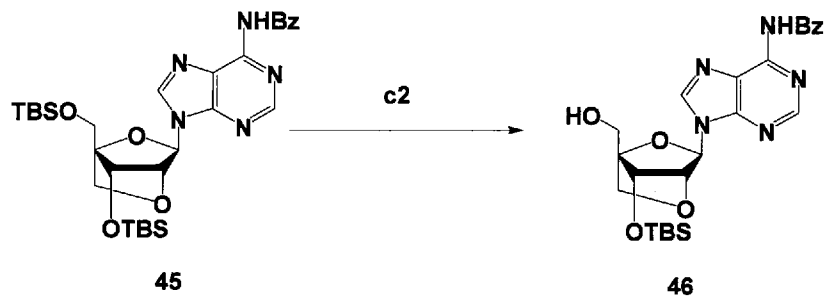
[0316] [表39]

得られた化合物 4 5 の物性データ
¹ H NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ 0.04(s, 3H), 0.06(s, 3H), 0.11(s, 3H), 0.12(s, 3H), 0.87(s, 9H), 0.92(s, 9H), 3.89(d, J = 7.6 Hz, 1H), 3.92(d, J = 10.0 Hz, 1H), 3.97(d, J = 11.7 Hz, 1H), 4.07(d, J = 7.6 Hz, 1H), 4.38(s, 1H), 4.67(s, 1H), 6.09(s, 1H) 7.53(dd, J = 6.9, 8.3 Hz, 2H), 7.62(t, J = 7.1 Hz, 1H), 8.03(d, J = 7.6 Hz, 2H), 8.27(s, 1H), 8.81(s, 1H), 9.01(brs, 1H); HRMS(MALDI) C ₃₀ H ₄₅ N ₅ O ₆ NaSi ₂ [M+Na] ⁺ としての計算値:634.2857 実測値:634.2856

[0317] (8-3) 化合物 4 6 の合成

[0318]

[化67]



[0319] 上記で得られた化合物 4 5 のテトラヒドロフラン溶液 (4 1 m l) に、トリフルオロ酢酸／水 (= 1 : 1 (容量比), 2 0 m l) を 0℃ で添加し、5 時間攪拌した。反応終了後に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を 0℃ で添加し、酢酸エチルで抽出した。有機層を水と飽和食塩水とで洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (S i O₂, メタノール／クロロホルム = 0 % から 3 %) により精製し、化合物 4 6 (4 2 5 m g, 5 0 %, 3 工程) を黄色固体として得た。

[0320] 得られた化合物 4 6 の物性データを表 4 0 に示す。

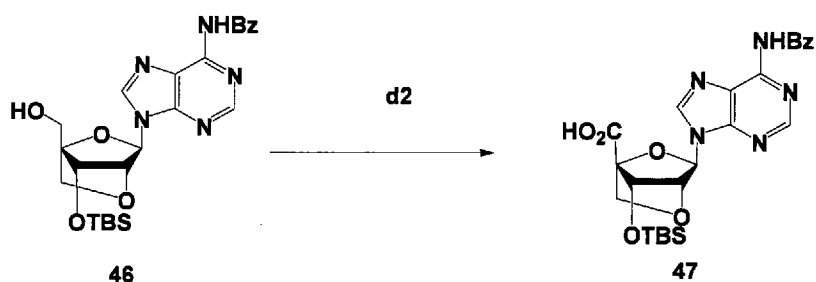
[0321] [表40]

得られた化合物 4 6 の物性データ
¹ H NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ 0.07(s, 3H), 0.09(s, 3H), 0.88(s, 9H), 3.34(b rs, 1H), 3.84(d, J = 12.6 Hz, 1H), 3.89(d, J = 7.5 Hz, 1H), 3.97(d, J = 12.6 Hz, 1H), 4.09(d, J = 7.5 Hz, 1H), 4.60(s, 1H), 4.75(s, 1H), 6.07(s, 1H), 7.53(dd, J = 7.5, 7.5 Hz, 2H), 7.62(t, J = 7.5 Hz, 1H), 8.04(d, J = 7.5 Hz, 2H), 8.17(s, 1H), 8.80(s, 1H), 9.28(brs, 1H); HRMS(MALDI) C ₂₄ H ₃₁ N ₅ O ₅ Na Si [M+Na] ⁺ としての計算値:520,1992 実測値:520.1988

[0322] (8 - 4) 化合物 4 7 の合成

[0323]

[化68]



[0324] 上記で得られた化合物46 (336 mg, 0.68 mmol) のジクロロメタン溶液 (6.8 mL) に、アセトニトリル／水 (= 1 : 1 (容量比), 37 μ L) とヨードベンゼンジアセテート (1.1 g, 3.4 mmol) を順次添加後、2, 2, 6, 6-テトラメチルピペリジン1-オキシルフリーラジカル (34 mg, 0.22 mmol) を0℃で添加し、室温で2.5時間撹拌した。反応終了後にメタノール (0.75 mL) を添加し、20分間室温で撹拌し、溶媒の減圧留去およびトルエン共沸をし、粗生成物として化合物47を得た。この化合物を精製することなく次の反応に用いた。なお、解析用に一部をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (SiO₂, 酢酸エチル／ヘキサン=30%から50%) により精製した。

[0325] 得られた化合物47の物性データを表41に示す。

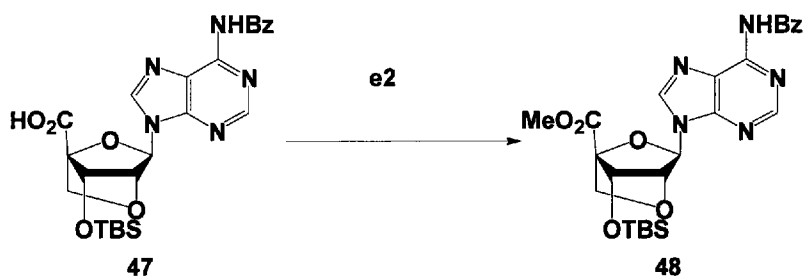
[0326] [表41]

得られた化合物47の物性データ
¹ H NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ 0.12(s, 3H), 1.13(s, 3H), 0.90(s, 9H), 4.03(d, J = 7.9 Hz, 1H), 4.52(s, 1H), 4.80(d, J = 7.9 Hz, 1H), 5.33(s, 1H), 6.25(s, 1H), 7.53(dd, J = 6.9, 7.9 Hz, 2H), 7.62(t, J = 7.5 Hz, 1H), 8.03(d, J = 7.2 Hz, 2H), 8.74(s, 1H), 8.80(s, 1H), 9.03(brs, 1H), 9.73(brs, 1H); HRMS (MALDI) C ₂₄ H ₂₉ N ₅ O ₆ NaSi [M+Na] ⁺ としての計算値:534.1785 実測値:534.1768

[0327] (8-5) 化合物48の合成

[0328]

[化69]



[0329] 窒素気流下、上記で得られた化合物47の1, 2-ジクロロエタン溶液（6.8 mL）に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（260 mg, 1.4 mmol）を添加し、50℃で2.5時間撹拌した後、無水メタノール（6.8 mL）添加し、さらに50℃で5時間撹拌した。反応終了後に水を添加し、クロロホルムで抽出した。有機層を水と飽和食塩水とで洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（SiO₂, メタノール／クロロホルム＝0％から3％）により精製し、化合物48（199 mg, 56%, 2工程）を茶色固体として得た。

[0330] 得られた化合物48の物性データを表42に示す。

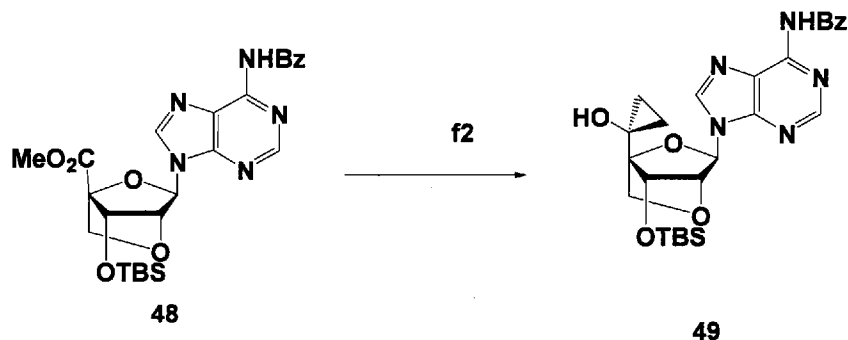
[0331] [表42]

得られた化合物48の物性データ
¹ H NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ 0.02(s, 3H), 0.07(s, 3H), 0.86(s, 9H), 3.83(s, 3H), 4.14(d, J = 7.9 Hz, 1H), 4.53(d, J = 7.9 Hz, 1H), 4.70(s, 1H), 4.88(s, 1H), 6.07(s, 1H), 7.53 (dd, J = 7.2, 7.6 Hz, 2H), 7.62 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 8.03(d, J = 7.2 Hz, 2H), 8.26 (s, 1H), 8.77 (s, 1H), 9.02 (brs, 1H); HRMS (MALDI) C ₂₅ H ₃₁ N ₅ O ₆ NaSi [M+Na] ⁺ としての計算値:548.1941 実測値:548.1915

[0332] (8-6) 化合物49の合成

[0333]

[化70]



[0334] 窒素気流下、上記で得られた化合物48 (290 mg, 0.55 mmol) とチタンテトライソプロポキシド (0.15 mL, 0.55 mmol) の無水テトラヒドロフラン溶液 (5.5 mL) に、1.0 Mのエチルマグネシウムブロミドのテトラヒドロフラン溶液 (2.7 mL, 2.7 mmol) を0℃で10分かけて滴下した。滴下後、反応溶液を室温まで加温し、さらに8.5時間攪拌した。反応終了後に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を添加し、セライト濾過を行い、濾液を酢酸エチルで抽出した。有機層を水と飽和食塩水とで洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を減圧留去し、粗生成物として化合物49 (20 mg) を得た。なお、解析用に一部をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (SiO₂, 酢酸エチル/ヘキサン=30% から50%) により精製した。

[0335] 得られた化合物49の物性データを表43に示す。

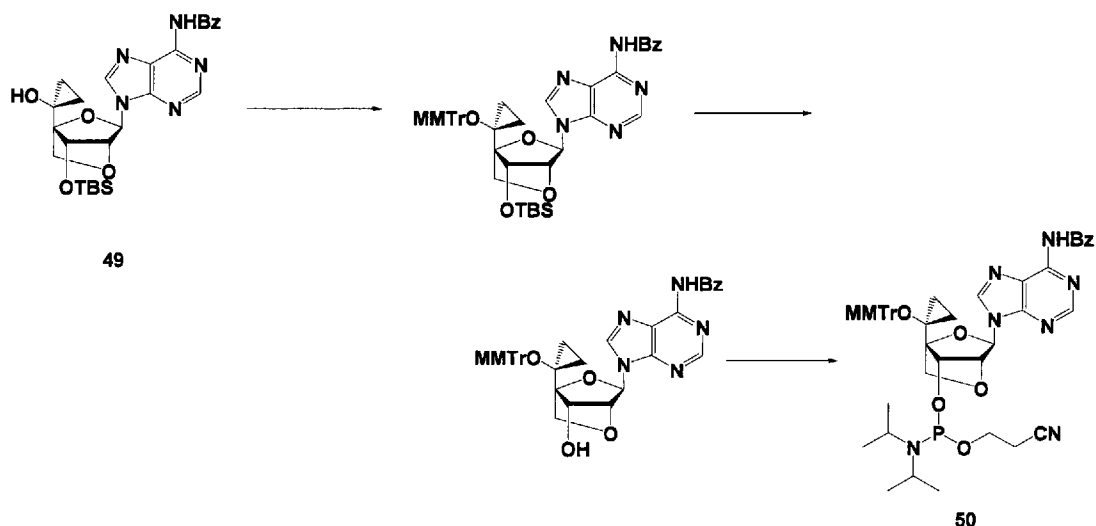
[0336] [表43]

得られた化合物49の物性データ
¹ H NMR (500 MHz, CDCl ₃) δ 0.09 (s, 3H), 0.10 (s, 3H), 0.65–0.94 (m, 4H), 0.89 (s, 9H), 3.82 (d, <i>J</i> = 7.5 Hz, 1H), 4.05 (d, <i>J</i> = 7.5 Hz, 1H), 4.67 (s, 1H), 4.71 (s, 1H), 6.08 (s, 1H), 7.53 (dd, <i>J</i> = 7.5, 8.0 Hz, 2H), 7.62 (t, <i>J</i> = 7.5 Hz, 1H), 8.03 (d, <i>J</i> = 7.5 Hz, 2H), 8.17 (s, 1H), 8.79 (s, 1H), 9.08 (brs, 1H); HRMS(MALDI) C ₂₆ H ₃₃ N ₅ O ₅ NaSi [M+Na] ⁺ としての計算値:546.2143 実測値:546.2161

[0337] (8-7) 化合物50の合成

[0338]

[化71]



[0339] 上記で得られた化合物49を用い、以下の合成スキームにしたがって、例えば上記実施例6の(6-3)～(6-6)に記載した試薬および反応条件により化合物50を得ることができる。

[0340] (実施例9) オリゴヌクレオチドの合成および精製

実施例1～3、6、7で作製された化合物7、11、20、35および42をアミダイトブロックとして用い、以下のようにしてオリゴヌクレオチドを合成した。オリゴヌクレオチドを構成する化合物7、11、20、35および42以外の化合物は、特に表記がない限り、Proligo社から購入した。

[0341] 実施例1～3、6、7で作製された化合物7、11、20、35および42から、各々0.1Mの無水アセトニトリル溶液として調製し、Gene Design社製nS-8 Oligonucleotides Synthesizerに仕込んだ。各合成をトリチルオン条件で行った。活性化剤には4,5-ジシアノイミダゾール(0.25Mアセトニトリル溶液)を用い、縮合時間は化合物7、11、20、35および42と、その次に導入するアミダイト体を240秒×4に延長した。キャッピング時間は200秒へと変更した。また、デブロッキング時間も120秒×2へと延長した。5'-cpG(化合物42)については、導入後、一度合成機からカラムを取り外し、0.5Mヒドラジン溶液と反応させることでレブリニル基の脱保護を行

なった。その他の操作については通常のホスホロアミダイト法に従って合成を行った。

[0342] 合成完了後、生成物を、28%アンモニア水溶液を用いて室温下で1.5時間処理してカラム担体からの切り出しを行い、次いで55℃で5時間以上静置することで塩基部の脱保護を行った。その後、簡易逆相カラム (Waters社製Sep-Pak (登録商標) Plus C18 Environmental Cartridges) により精製し、さらに逆相HPLCにて精製を行った。

[0343] 精製したオリゴヌクレオチドの組成をMALDI-TOF-MS測定により決定した。当該測定にあたり、まず、3-ヒドロキシピコリン酸水溶液 (10 mg/mL) とクエン酸二アンモニウム水溶液 (1 mg/mL) とを1:1の容量比で混合したマトリックス (1 μL) を乾燥させたアンカーチップ上に、オリゴヌクレオチド水溶液 (50 μM, 1 μL) を載せて再度乾燥させ、その後MALDI-TOF-MS測定を行った。分子量の測定をネガティブモードで行い、オリゴチミジル酸 (7mer、15merおよび23mer) を外部標準として用いた。また、合成したオリゴヌクレオチドの定量を、吸光度測定装置 (株式会社島津製作所製SHIMADZU UV-1800) を用いて260 nmにおける紫外吸収を測定することで行った。

[0344] (実施例10) 二重鎖形成能の評価

実施例9に記載のようにして、以下の配列のオリゴヌクレオチドを合成および精製した:

5' - d (GCGTTXTTTGCT) - 3' (配列番号1~10)

(1) X = チミジン (T) (配列番号1)

(2) X = 化合物7 (5' - シクロプロピレンチミジン (5' - cp - T)) (配列番号2)

(3) X = シチジン (C) (配列番号3)

(4) X = 化合物11 (5' - シクロプロピレン-5-メチル-2' - デオキシシチジン (5' - cp-MeC)) (配列番号4)

(5) X = アデノシン (A) (配列番号 5)

(6) X = 化合物 35 (5' - シクロプロピレン - 2' - デオキシアデノシン (5' - cp - A)) (配列番号 6)

(7) X = グアノシン (G) (配列番号 7)

(8) X = 化合物 42 (5' - シクロプロピレン - 2' - デオキシグアノシン (5' - cp - G)) (配列番号 8)

(9) X = LNA - グアニン (下記表 43 中「G^L」) (配列番号 9)

(10) X = 化合物 20 (5' - シクロプロピレン - LNA - グアニン (5' - cp - LNA - G) : 下記表 43 中「G^{cpL}」) (配列番号 10)

[0345] 以下のように標的鎖を用いて二重鎖形成能 (結合親和性) を調べた :

配列 (1) および (2) の標的鎖 : 一本鎖オリゴRNA 5' - r (AGC AAAAAACGC) - 3' (配列番号 11) および一本鎖オリゴDNA 5' - d (AGCAAAAAACGC) - 3' (配列番号 12) ;

配列 (3) および (4) の標的鎖 : 一本鎖オリゴRNA 5' - r (AGC AAAGAACGC) - 3' (配列番号 13) および一本鎖オリゴDNA 5' - d (AGCAAAGAACGC) - 3' (配列番号 14) ;

配列 (5) および (6) の標的鎖 : 一本鎖オリゴRNA 5' - r (AGC AAUAACGC) - 3' (配列番号 15) および一本鎖オリゴDNA 5' - d (AGCAAATAACGC) - 3' (配列番号 16) ; ならびに

配列 (7) ~ (10) の標的鎖 : 一本鎖オリゴRNA 5' - r (AGCAAACAACGC) - 3' (配列番号 17) および一本鎖オリゴDNA 5' - d (AGCAAACAACGC) - 3' (配列番号 18) 。

[0346] オリゴヌクレオチドの二重鎖形成能を、各種オリゴヌクレオチドと標的鎖とをアニーリング処理して二重鎖を形成させた後、 T_m 値を測定することにより調べた。より詳細には、各オリゴヌクレオチド (終濃度 4 μ M) と塩化ナトリウム (終濃度 100 mM) のリン酸緩衝液 (10 mM, pH 7.2, 130 μ L) の混合液を沸騰水中に浴し、室温までゆっくり冷却した。その後、窒素気流下で 5 $^{\circ}$ C まで冷却し、測定を開始した。0.5 $^{\circ}$ C / 分で 90 $^{\circ}$ C ま

で昇温し、0.5℃間隔で260nmにおける吸光度をプロットした。 T_m 値を中線法により算出し、独立した3回の測定における平均値とした。

[0347] 表44に二重鎖形成能の結果を示す：

- (A)：配列(1)および(2)；
- (B)：配列(3)および(4)；
- (C)：配列(5)および(6)；
- (D)：配列(7)および(8)；
- (E)：配列(7)、(9)および(10)。

表44中、一本鎖オリゴRNAに対する結果を「ssRNA」、一本鎖オリゴDNAに対する結果を「ssDNA」に示し、そして各オリゴヌクレオチドの T_m と、人工修飾核酸1塩基当たりの T_m 変動温度（「 $\Delta T_m / \text{mod.}$ 」）とを示す。

[0348]

[表44]

(A)

配列 (5' - 3')	ssRNA		ssDNA	
	T_m (°C)	$\Delta T_m/\text{mod.}$ (°C)	T_m (°C)	$\Delta T_m/\text{mod.}$ (°C)
d(GCGTTTTTTGCT)	47.8	—	51.5	—
d(GCGTTXTTTGCT)	45.7	-2.1	49.6	-1.9

 $X = 5' - \text{cp} - \text{T}$

(B)

配列 (5' - 3')	ssRNA		ssDNA	
	T_m (°C)	$\Delta T_m/\text{mod.}$ (°C)	T_m (°C)	$\Delta T_m/\text{mod.}$ (°C)
d(GCGTTCTTTGCT)	53.5	—	53.9	—
d(GCGTTXTTTGCT)	52.6	-0.9	53.3	-0.6

 $X = 5' - \text{cp} - \text{MeC}$

(C)

配列 (5' - 3')	ssRNA		ssDNA	
	T_m (°C)	$\Delta T_m/\text{mod.}$ (°C)	T_m (°C)	$\Delta T_m/\text{mod.}$ (°C)
d(GCGTTATTTGCT)	46.3	—	50.0	—
d(GCGTTXTTTGCT)	43.9	-2.4	47.9	-2.1

 $X = 5' - \text{cp} - \text{A}$

(D)

配列 (5' - 3')	ssRNA		ssDNA	
	T_m (°C)	$\Delta T_m/\text{mod.}$ (°C)	T_m (°C)	$\Delta T_m/\text{mod.}$ (°C)
d(GCGTTGTTTGCT)	52.4	—	56.1	—
d(GCGTTXTTTGCT)	50.7	-1.7	54.5	-1.6

 $X = 5' - \text{cp} - \text{G}$

(E)

配列 (5' - 3')	ssRNA		ssDNA	
	T_m (°C)	$\Delta T_m/\text{mod.}$ (°C)	T_m (°C)	$\Delta T_m/\text{mod.}$ (°C)
d(GCGTTGTTTGCT)	51.7	—	55.0	—
d(GCGTTG ^L TTTGCT)	57.2	+5.5	56.8	+1.8
d(GCGTTG ^{cpL} TTTGCT)	55.9	+4.2	56.5	+1.5

[0349] 化合物 7、11、35 または 42 を用いた場合 (配列 (2)、(4)、(

6) または (8))、一本鎖オリゴDNAおよび一本鎖オリゴRNAの両方とも、天然のオリゴヌクレオチド (配列 (1)、(3)、(5) または (7)) と比べて T_m 値はわずかに低下したのみであり、結合親和性を損なわなかった。化合物 20 を用いた場合 (配列 (10))、特に一本鎖オリゴRNAに対して、天然のオリゴヌクレオチド (配列 (7)) と比べて T_m 値が上昇し、よって、一本鎖オリゴRNAに対する高い結合親和性を示し、これは、2', 4'-BNA/LNA 含有オリゴヌクレオチド (配列 (9)) に匹敵した。

[0350] (実施例 11) ヌクレアーゼ耐性能の評価

実施例 9 に記載のようにして、以下の 10mer の配列のオリゴヌクレオチドを合成および精製し、被験オリゴヌクレオチドとして用いた：



X = チミジン (T)

X = ホスホロチオエートチミジン (ps-T)

X = 化合物 7 (5'-シクロプロピレンチミジン (5'-cp-T))

[0351] 7. 5 μ M 被験オリゴヌクレオチドと 10 mM 塩化マグネシウムを含む 50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) に、2.5 μ g/mL の 3'-エキソヌクレアーゼ (*Crotalus adamanteus* venom phosphodiesterase, CAVP) を加え、37°C でインキュベートした。インキュベーションの開始時 (0 分)、2.5 分後、5 分後、10 分後、20 分後、40 分後にそれぞれ 10 μ L ずつ試料を取り出し、逆相 HPLC で解析し、未切断のオリゴヌクレオチドの割合を算出した。また、評価は独立した 3 回の測定により導き出した。

[0352] 結果を図 1 に示す。図 1 中、白抜き丸は X = チミジン (T) の結果を表し、白抜き四角は X = ホスホロチオエートチミジン (ps-T) の結果を表し、そして黒三角は X = 化合物 7 (5'-シクロプロピレンチミジン (5'-cp-T)) を表す。図 1 から明らかなように、ホスホロチオエート化 (PS) オリゴ (X = ホスホロチオエートチミジン (ps-T)) において、ヌ

クレーアーゼ処理40分後の未切断オリゴヌクレオチドの残存率は約30%ほどであったのに対し、化合物7を含有するオリゴヌクレオチド(X=化合物7(5'-シクロプロピレンチミジン(5'-cp-T)))は、ヌクレアーゼ処理の40分後でも約70%が未切断で残存しており、分解されにくかった。このことから、5'-シクロプロピレン修飾によって、ホスホロチオエート修飾と比べて高いヌクレアーゼ耐性が獲得できることが確認された。

[0353] (実施例12) RNase H活性の評価

実施例9に記載のようにして、以下の配列(11)~(12)のオリゴヌクレオチドを合成および精製し、被験オリゴヌクレオチドとして用いた：

(11) 5'-G_mC_mG_mt t t t t t t t G_mC_mU_m-3' (配列番号19)

(12) 5'-G_mC_mG_mt t t X t t t X G_mC_mU_m-3' (配列番号20)

(13) 5'-G_mC_mG_mt X t t X t t X G_mC_mU_m-3' (配列番号21)

G_m、C_m、U_m：2'-O-メチル修飾

t = チミジン

X = 化合物7(5'-シクロプロピレンチミジン(5'-cp-T))

[0354] 50 mM トリス塩酸緩衝液(pH 8.0)と3 mM 塩化マグネシウム、75 mM 塩化カリウム、10 mM ジチオトレイトールを含む混合溶液に、被験オリゴヌクレオチド(60 pmol)とフルオレセインで標識された相補鎖RNA(5'-FAM-r(AGCAAAACGC)-3') (配列番号22)(300 pmol)を溶解させた。各試料を70℃まで加熱した後、室温までゆっくり冷却した。2.0ユニットの大腸菌由来RNase Hを各試料に加え、30℃でインキュベートした。40分後、ホルムアミド/0.1 M エチレンジアミン四酢酸混合溶液(=14:1(容量比))を試料容積の3倍量加え、反応を停止させた。切断産物を20%変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって解析した。切断率をバンドの蛍光強度比に

よって算出した。上記の配列（11）、（12）および（13）のRNase Hによる切断率の結果を以下の表45に示す。

[0355] [表45]

	配列(11)	配列(12)	配列(13)
切断率	31%	46%	27%

[0356] 化合物7を3個置きに導入したオリゴヌクレオチド（配列（12））および2個置きに導入したオリゴヌクレオチド（配列（13））は、化合物7を含まないオリゴヌクレオチド（配列（11））と同程度の切断率を示した。このことから、5'－シクロプロピレン修飾は、RNase H誘導型アンチセンスオリゴヌクレオチドへの利用も可能であることが確認された。

[0357] （実施例13）エキソスキッピング活性の評価

実施例9に記載のようにして、以下の配列のオリゴヌクレオチドを合成および精製し、被験オリゴヌクレオチドとして用いた：

SSO1：5'－tCcCtCtTgAaGgCc－3'（配列番号23）

SSO2：5'－t[^]CcCtCtTgAa[^]GgC[^]c－3'（配列番号24）

SSO3：5'－<t>CcCtCtTgAa<G>gC<c>－3'（配列番号25）

a、g、cおよびt＝DNA

A＝LNA－A、G＝LNA－G、C＝LNA－5－メチルシトシン、T＝LNA－T、

<t>＝化合物7（5'－シクロプロピレンチミジン）

<c>＝化合物11（5'－シクロプロピレン－5－メチル－2'－デオキシシチジン）

<G>＝化合物20（5'－シクロプロピレン－LNA－グアニン）

[^]＝ホスホロチオエート結合（ヌクレオチド間の結合部位のリン酸基を硫黄化（S化）した）。

[0358] ジストロフィン遺伝子のエキソン58周辺を有する評価系細胞を、Obikaら、Nucleic Acids Res., 2014年, 42巻, 12号, 8174-8187頁に記載の方法により樹立し、この樹立した細胞を、ポリ-L-リジン (PLL) でコーティングした24ウェルプレートに対して 2.0×10^5 細胞/ウェルで播種した。その24時間後、約50%コンフルエンスの細胞に対し、30 nM SSOとリポフェクタミン2000 (Invitrogen) 2.0 μ Lの混合液を、リポフェクタミン2000の添付文書に従いトランスフェクションした。その24時間後にtotal RNAの回収を行った。total RNAの抽出には、QuickGene 800およびQuickGene RNA培養細胞キットS (クラボウ) を用いた。RNA Plusモードで抽出を行い、途中で2 $\times$ RQ1 RNase-Free DNase (プロメガ) を添加した。また、cDNA化はRever-Tra Ace qPCR RT Master Mix (東洋紡株式会社製) を用いて添付文書に従い行った。続いて、PCR反応試薬として、SYBRGreen Real-time PCR Master Mix (東洋紡) を使用し、StepOnePlus (Applied Biosystems) にてPCR反応を行った。PCR反応条件は、SYBRGreen Real-time PCR Master Mix (東洋紡) の添付文書のプロトコールに対して、アニーリング温度を65℃、時間を15秒としたプロトコールで行った。ハウスキーピング遺伝子としてRPLP2を用い、ジストロフィンミニ遺伝子の発現量の補正を行った。PCRに用いたプライマー情報を以下の表46に示す。また、解析は検量線法にて行うことで、エキソン58のスキッピング活性を算出した。コントロール群として、トランスフェクション時に何も添加していないもの、および、定量PCRの際にcDNAの代わりにDEPC水 (ジエチルピロカーボネート処理水) を添加したものをを用いた。

[0359]

[表46]

遺伝子	プライマー配列 (5' -3')	遺伝子サイズ (bp)
DMD	フォワード: AGTTCTGACCAGTGGAAGCG (配列番号 26)	156
	リバーズ: CCTCAGGAGGCAGCTCTAT (配列番号 27)	
RPLP2	フォワード: TGGACAGCGTGGGTATCGAG (配列番号 28)	92
	リバーズ: CTGGGCAATGACGTCTTCAA (配列番号 29)	

[0360] 結果は図2に示した通りである。結果は、SSO1～SSO3の各オリゴヌクレオチドによるジストロフィン遺伝子のエキソン58をスキップしたmRNA相対発現量として表した。図2中、「処理なし」はトランスフェクション時に何も添加していないものであり、そして「水」は、定量PCRの際にcDNAの代わりにDEPC水を添加したものである。

[0361] 図2から明らかなように、LNAのみを導入したSSO1と比べて、5'ーシクロプロピレン修飾を導入したSSO3は、大きくエキソンスキッピング活性を向上させた。また、SSO3の活性はホスホロチオエート修飾したSSO2と同程度であることから、5'ーシクロプロピレン修飾はホスホロチオエート修飾と同等のエキソンスキッピング活性の向上能力を有していることが判明した。

[0362] (実施例13) アンチセンス活性ならびに肝毒性の評価

実施例9に記載のようにして、以下の配列のオリゴヌクレオチドを合成および精製し、被験オリゴヌクレオチドとして用いた：

ASO1 : 5' - G ^ T ^ m C ^ t ^ c ^ t ^ t ^ t ^ a ^ c ^ c ^ T ^ G ^ G - 3' (配列番号30)

ASO2 : 5' - G ^ T ^ m C X ^ c ^ t ^ t ^ t ^ a ^ c ^ c ^ T ^ G ^ G - 3' (配列番号31)

ASO3 : 5' - G ^ T ^ m C ^ t ^ c ^ t X ^ t ^ a ^ c ^ c ^ T ^ G ^ G - 3' (配列番号32)

ASO4 : 5' - G ^ T ^ m C X ^ c ^ t ^ t X ^ a ^ c ^ c ^ T ^ G ^ G -

3' (配列番号33)

a、g、cおよびt=DNA

A=LNA-A、G=LNA-G、^mC=LNA-5-メチルシトシン、T=LNA-T、

大文字(A、G、^mC、T)はLNAであり、そして小文字(a、g、c、t)はDNAである。

X=化合物7(5'-シクロプロピレンチミジン(5'-cp-T))。

^=ホスホロチオエート結合(ヌクレオチド間の結合部位のリン酸基を硫黄化(S化)した)。

[0363] 6週齢のマウス(C57BL/6NCrl、雄)の尾静脈に、上記被験オリゴヌクレオチド(20mg/kg)を投与した。コントロールとして生理食塩水を投与した。96時間後、吸入麻酔下(イソフルラン)で採血を行い、放血安楽死させた。その後、肝臓を採取し、肝臓重量の測定ならびにRNA抽出(TRIZOLでホモジナイズ後、フェノール・クロロホルム抽出)を行った。血液中のアスパラギン酸トランスアミナーゼ(AST)およびアラントランスアミナーゼ(ALT)の活性を自動分析装置(日本電子株式会社製JCA-BM6070)により測定した。また、標的遺伝子NR3C1ならびにハウスキーピング遺伝子GAPDHのmRNA発現量をリアルタイムPCR(使用キット:One Step SYBR PrimeScript RT-PCR Kit(タカラバイオ株式会社製)、プライマー配列:NR3C1 forward(actgtccagcatgccgctat)(配列番号34)、NR3C1 reverse(gcagtggttgctgaattcc)(配列番号35)、GAPDH forward(gtggtgaacggatttgccgt)(配列番号36)、GAPDH reverse(gacaagcttcccatctctcgg)(配列番号37))により測定した。

[0364] 得られた結果を図3および図4に示す。図3は、ASO1、ASO2、ASO3およびASO4の各被験オリゴヌクレオチドを投与した場合ならびに

生理食塩水投与の場合のマウス肝臓中の標的遺伝子NR3C1のmRNA量を示すグラフであり、生理食塩水を投与した場合のmRNA量を100とした場合の相対値にて表す。図4は、ASO1、ASO2、ASO3およびASO4の各被験オリゴヌクレオチドを投与した場合ならびに生理食塩水投与の場合の血液中のアスパラギン酸トランスアミナーゼ（AST）およびアラニントランスアミナーゼ（ALT）の活性を示すグラフであり、ASO1投与の場合のALT値およびAST値のそれぞれを100とした場合の相対値にて表す。

[0365] 図3に示すように、ASO1、ASO2、ASO3およびASO4の各被験オリゴヌクレオチドの間でmRNA発現量はコントロールの生理食塩水投与の場合と比べて同程度に抑制されており、よって、これらの被験オリゴヌクレオチドにおいてアンチセンス活性はほぼ同程度であった。図4に示すように、化合物7を用いないASO1と比較して、化合物7を用いたASO2、ASO3およびASO4では、肝毒性の指標となるASTおよびALTの値を有意に減少させた。このことから、5'-シクロプロピレン修飾によって、アンチセンスオリゴヌクレオチドのアンチセンス活性を損なうことなく肝毒性を減少させることができることが確認された。

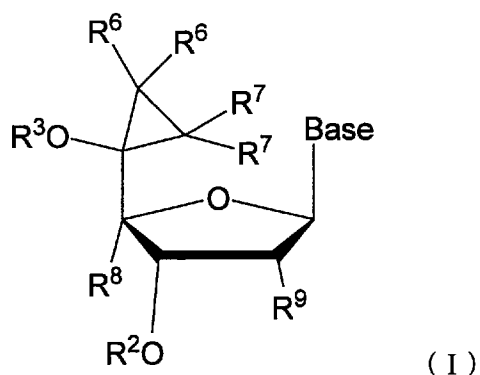
産業上の利用可能性

[0366] 本発明によれば、ホスホロチオエート修飾核酸の代替とすることが可能な新規な5'位修飾ヌクレオシドおよびそれを用いたヌクレオチドが提供される。本発明の5'位修飾ヌクレオシドはまた、その製造においてジアステレオマーの分離工程を必要としないため、工業的生産性にも優れている。本発明の5'位修飾ヌクレオシドを用いて得られるオリゴヌクレオチドは、例えば、核酸医薬への素材として有用である。

請求の範囲

[請求項1] 以下の式（I）で表される化合物またはその塩：

[化1]



（式中、

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

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

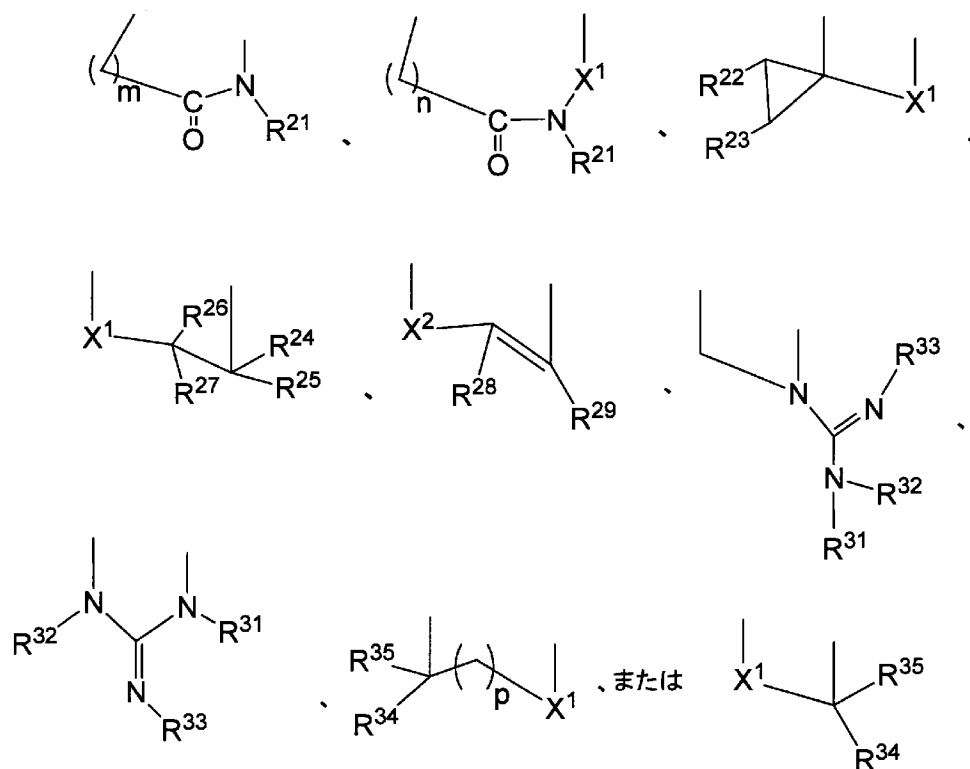
1 以上有していてもよいシリル基、該 α 群から選択される任意の置換基を 1 以上有していてもよいリン酸基、核酸合成の保護基で保護されたリン酸基、 $-P(R^4)R^5$ [式中、 R^4 および R^5 は、それぞれ独立して、水酸基、核酸合成の保護基で保護された水酸基、メルカプト基、核酸合成の保護基で保護されたメルカプト基、アミノ基、炭素数 1 から 6 のアルコキシ基、炭素数 1 から 6 のアルキルチオ基、炭素数 1 から 6 のシアノアルコキシ基、または炭素数 1 から 6 のアルキル基を有するジアルキルアミノ基を表す] を表し、

R^6 および R^7 は、それぞれ独立して、水素原子、ハロゲン原子、またはメチル基であり、そして

R^8 は水素原子でありかつ R^9 は水素原子、ハロゲン原子；炭素数 1 から 6 の直鎖アルコキシ基で置換されていてもよい炭素数 1 から 6 の直鎖アルコキシ基；または $-OR^{10}$ [式中、 R^{10} は水素原子、または核酸合成の水酸基の保護基である] であるか、あるいは

R^8 および R^9 は一緒になって以下の式：

[化2]



[式中、

R^{21} は、水素原子、分岐または環を形成していてもよい炭素数1から6のアルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数2から6のアルケニル基、該 α 群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよくそしてヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数3から10のアリール基、該 α 群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよくそしてヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数3から12のアリール部分を有するアラルキル基、または核酸合成のアミノ基の保護基であり；

R^{22} および R^{23} は、それぞれ独立して、水素原子；ヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数3から12のアリール基で置換されていてもよく、かつ分岐または環を形成していてもよい炭素数1から6のアルキル基；またはヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数3から12のアリール部分を有するアラルキル基；であるか、あるいは

R^{22} および R^{23} は一緒になって、 $-(CH_2)_q-$ [式中、 q は2から5の整数である]を表し；

R^{24} および R^{25} は、それぞれ独立して、水素原子；水酸基；分岐または環を形成していてもよい炭素数1から6のアルキル基；分岐または環を形成していてもよい炭素数1から6のアルコキシ基；アミノ基；および核酸合成の保護基で保護されたアミノ基；からなる群から選択される基であるか、あるいは、

R^{24} および R^{25} は一緒になって、 $=C(R^{36})R^{37}$ [式中、 R^{36} および R^{37} は、それぞれ独立して、水素原子、水酸基、核酸合成の保護基で保護された水酸基、メルカプト基、核酸合成の保護基で保護されたメルカプト基、アミノ基、炭素数1から6の直鎖または分岐鎖アルコキシ基、炭素数1から6の直鎖または分岐鎖アルキルチオ基、炭素数1から6のシアノアルコキシ基、または炭素数1から6の直鎖または分岐鎖アルキルアミノ基を表す]を表し；

R^{26} および R^{27} は、それぞれ独立して、水素原子、分岐または環を形成していてもよい炭素数1から6のアルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数1から6のアルコキシ基、または炭素数1から6の直鎖または分岐鎖アルキルチオ基であり；

R^{28} は、水素原子、分岐または環を形成していてもよい炭素数1から6のアルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数1から6のアルコキシ基、または炭素数1から6の直鎖または分岐鎖アルキルチオ基であり；

R^{29} は、水素原子、水酸基、分岐または環を形成していてもよい炭素数1から6のアルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数1から6のアルコキシ基、アミノ基、あるいは核酸合成の保護基で保護されたアミノ基であり；

R^{31} 、 R^{32} 、および R^{33} は、それぞれ独立して、水素原子、分岐または環を形成していてもよい炭素数1から6のアルキル基、あるい

は核酸合成のアミノ基の保護基であり；

R^{34} および R^{35} は、それぞれ独立して、水素原子、水酸基、分岐または環を形成していてもよい炭素数 1 から 6 のアルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数 1 から 6 のアルコキシ基、アミノ基、または核酸合成の保護基で保護されたアミノ基であり；

m は 0 から 2 の整数であり；

n は 0 から 1 の整数であり；

p は 0 から 1 の整数であり；

X^1 は、酸素原子、硫黄原子、またはアミノ基であり；そして

X^2 は酸素原子または硫黄原子である]

で表される二価の基を表す)。

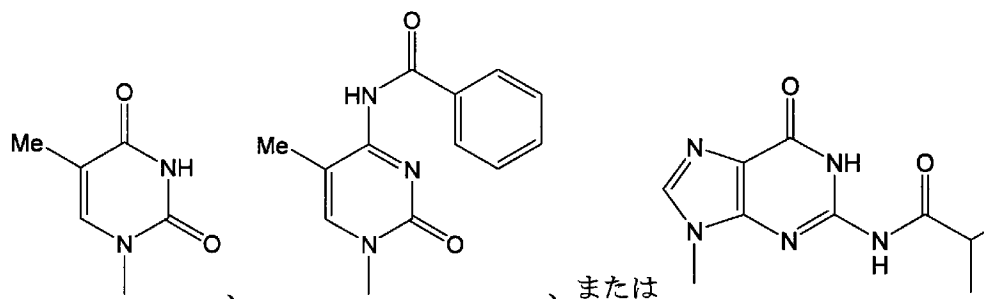
[請求項2]

前記式 (1) において、前記 Base が、6-アミノプリン-9-イル基、2, 6-ジアミノプリン-9-イル基、2-アミノ-6-クロロプリン-9-イル基、2-アミノ-6-フルオロプリン-9-イル基、2-アミノ-6-ブロモプリン-9-イル基、2-アミノ-6-ヒドロキシプリン-9-イル基、6-アミノ-2-メトキシプリン-9-イル基、6-アミノ-2-クロロプリン-9-イル基、6-アミノ-2-フルオロプリン-9-イル基、2, 6-ジメトキシプリン-9-イル基、2, 6-ジクロロプリン-9-イル基、6-メルカプトプリン-9-イル基、2-オキソ-4-アミノ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル基、4-アミノ-2-オキソ-5-フルオロ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル基、4-アミノ-2-オキソ-5-クロロ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル基、2-オキソ-4-メトキシ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル基、2-オキソ-4-メルカプト-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル基、2-オキソ-4-ヒドロキシ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル基、2-オキソ-4-ヒドロキシ-5-メチル-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル基、または4-アミノ-5-メチル-2-オ

キソー 1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル基である、請求項 1 に記載の化合物またはその塩。

[請求項3] 前記式 (I) において、前記 Base が、以下の式：

[化3]



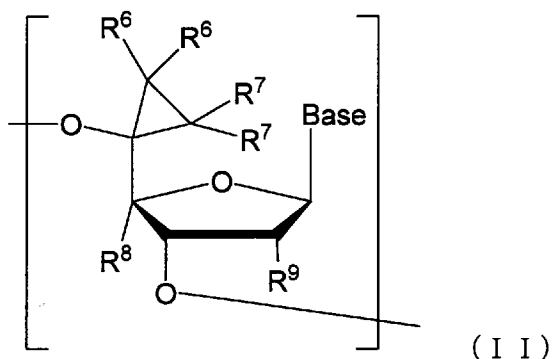
で表される基である、請求項 1 に記載の化合物またはその塩。

[請求項4] 前記式 (I) において、 R^6 および R^7 がともに水素原子である、請求項 1 から 3 のいずれかに記載の化合物またはその塩。

[請求項5] 前記式 (I) において、 R^8 および R^9 がともに水素原子である、請求項 1 から 4 のいずれかに記載の化合物またはその塩。

[請求項6] 以下の式 (II) で表されるヌクレオシド構造を少なくとも 1 つ含有するオリゴヌクレオチドまたはその薬理学上許容される塩：

[化4]



(式中、

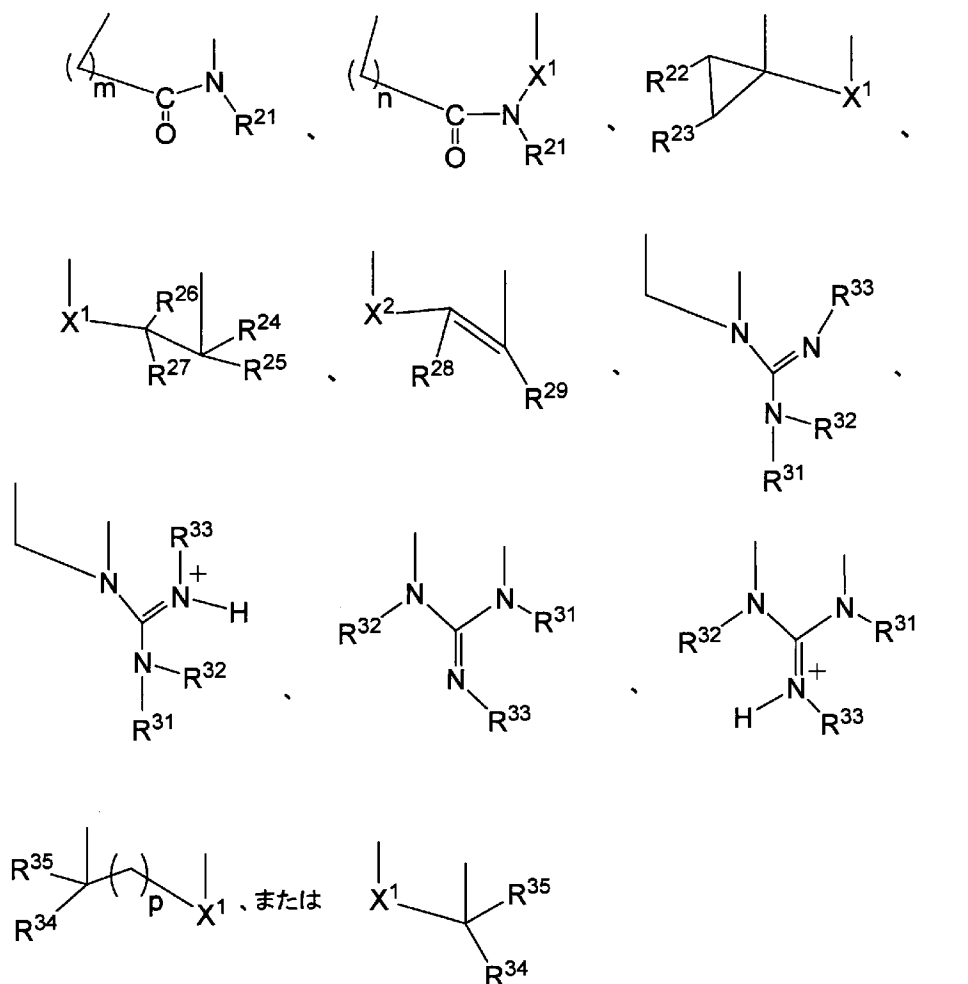
Base は、 α 群から選択される任意の置換基を 1 以上有していてもよいプリン-9-イル基または 2-オキソー 1, 2-ジヒドロピリ

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

R^6 および R^7 は、それぞれ独立して、水素原子、ハロゲン原子、またはメチル基であり、そして

R^8 は水素原子でありかつ R^9 は水素原子、ハロゲン原子、または炭素数1から6の直鎖アルコキシ基で置換されていてもよい炭素数1から6の直鎖アルコキシ基であるか、あるいは R^8 および R^9 は一緒になって以下の式：

[化5]



[式中、

R^{21} は、水素原子、分岐または環を形成していてもよい炭素数1から6のアルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数2から6のアルケニル基、該 α 群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよくそしてヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数3から10のアリール基、該 α 群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよくそしてヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数3から12のアリール部分を有するアラルキル基、または核酸合成のアミノ基の保護基であり；

R^{22} および R^{23} は、それぞれ独立して、水素原子；ヘテロ原子を

含んでいてもよい炭素数3から12のアリール基で置換されていてもよく、かつ分岐または環を形成していてもよい炭素数1から6のアルキル基；またはヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数3から12のアリール部分を有するアラルキル基；であるか、あるいは

R^{22} および R^{23} は一緒になって、 $-(CH_2)_q-$ [式中、 q は2から5の整数である] を表し；

R^{24} および R^{25} は、それぞれ独立して、水素原子；水酸基；分岐または環を形成していてもよい炭素数1から6のアルキル基；分岐または環を形成していてもよい炭素数1から6のアルコキシ基；アミノ基；および核酸合成の保護基で保護されたアミノ基；からなる群から選択される基であるか、あるいは、

R^{24} および R^{25} は一緒になって、 $=C(R^{36})R^{37}$ [式中、 R^{36} および R^{37} は、それぞれ独立して、水素原子、水酸基、核酸合成の保護基で保護された水酸基、メルカプト基、核酸合成の保護基で保護されたメルカプト基、アミノ基、炭素数1から6の直鎖または分岐鎖アルコキシ基、炭素数1から6の直鎖または分岐鎖アルキルチオ基、炭素数1から6のシアノアルコキシ基、または炭素数1から6の直鎖または分岐鎖アルキルアミノ基を表す] を表し；

R^{26} および R^{27} は、それぞれ独立して、水素原子、分岐または環を形成していてもよい炭素数1から6のアルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数1から6のアルコキシ基、または炭素数1から6の直鎖または分岐鎖アルキルチオ基であり；

R^{28} は、水素原子、分岐または環を形成していてもよい炭素数1から6のアルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数1から6のアルコキシ基、または炭素数1から6の直鎖または分岐鎖アルキルチオ基であり；

R^{29} は、水素原子、水酸基、分岐または環を形成していてもよい炭素数1から6のアルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭

素数 1 から 6 のアルコキシ基、アミノ基、あるいは核酸合成の保護基で保護されたアミノ基であり；

R^{31} 、 R^{32} 、および R^{33} は、それぞれ独立して、水素原子、分岐または環を形成していてもよい炭素数 1 から 6 のアルキル基、あるいは核酸合成のアミノ基の保護基であり；

R^{34} および R^{35} は、それぞれ独立して、水素原子、水酸基、分岐または環を形成していてもよい炭素数 1 から 6 のアルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数 1 から 6 のアルコキシ基、アミノ基、または核酸合成の保護基で保護されたアミノ基であり；

m は 0 から 2 の整数であり；

n は 0 から 1 の整数であり；

p は 0 から 1 の整数であり；

X^1 は、酸素原子、硫黄原子、またはアミノ基であり；そして

X^2 は酸素原子または硫黄原子である]

で表される二価の基を表す)。

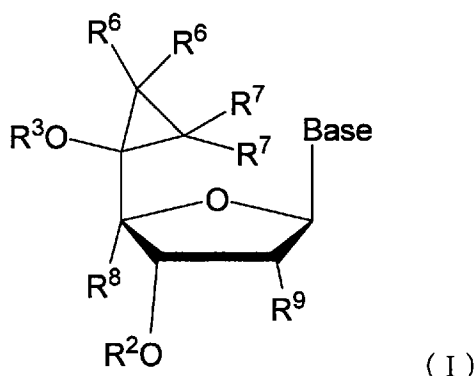
[請求項7] 前記式 (I) において、 R^6 および R^7 がともに水素原子である、請求項 6 に記載のオリゴヌクレオチドまたはその薬理学上許容される塩。

[請求項8] 前記式 (I) において、 R^8 および R^9 がともに水素原子である、請求項 6 または 7 に記載のオリゴヌクレオチドまたはその薬理学上許容される塩。

[請求項9] 請求項 6 に記載のオリゴヌクレオチドまたはその薬理学上許容される塩の製造方法であって、

以下の式 (I) で表される化合物またはその薬理学上許容される塩
:

[化6]



(式中、

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

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

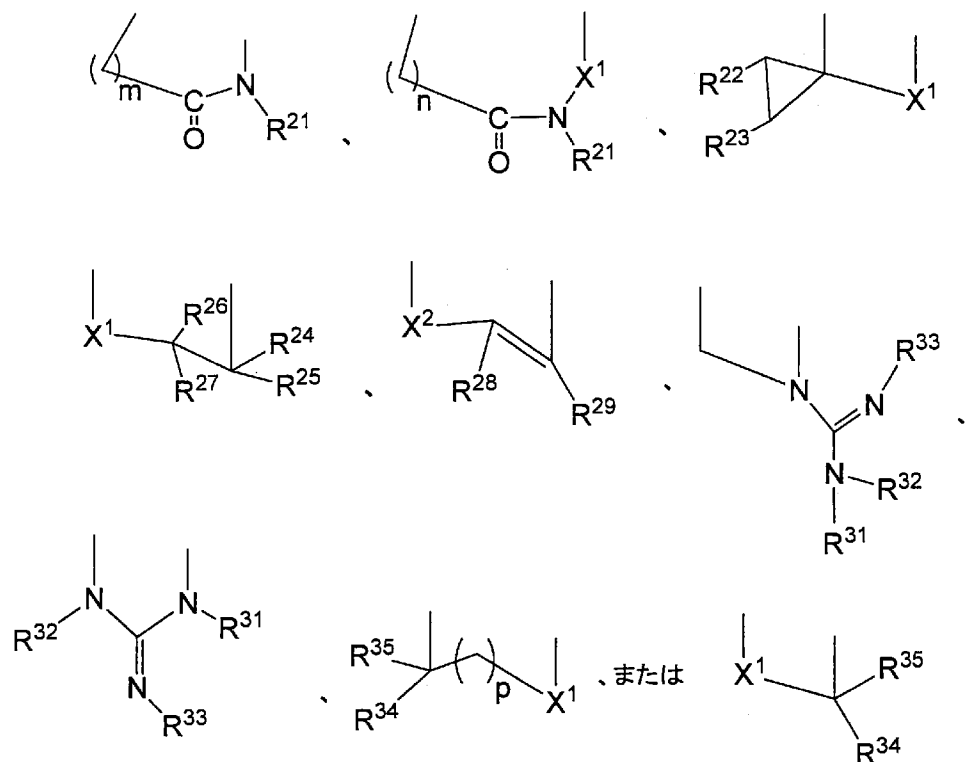
たリン酸基、 $-P(R^4)R^5$ [式中、 R^4 および R^5 は、それぞれ独立して、水酸基、核酸合成の保護基で保護された水酸基、メルカプト基、核酸合成の保護基で保護されたメルカプト基、アミノ基、炭素数1から6のアルコキシ基、炭素数1から6のアルキルチオ基、炭素数1から6のシアノアルコキシ基、または炭素数1から6のアルキル基を有するジアルキルアミノ基を表す]を表し、

R^6 および R^7 は、それぞれ独立して、水素原子、ハロゲン原子、またはメチル基であり、そして

R^8 は水素原子でありかつ R^9 は水素原子、ハロゲン原子；炭素数1から6の直鎖アルコキシ基で置換されていてもよい炭素数1から6の直鎖アルコキシ基；または $-OR^{10}$ [式中、 R^{10} は水素原子、または核酸合成の水酸基の保護基である]であるか、あるいは

R^8 および R^9 は一緒になって以下の式：

[化7]



[式中、

R^{21} は、水素原子、分岐または環を形成していてもよい炭素数 1 から 6 のアルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数 2 から 6 のアルケニル基、該 α 群から選択される任意の置換基を 1 以上有していてもよくそしてヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数 3 から 10 のアリール基、該 α 群から選択される任意の置換基を 1 以上有していてもよくそしてヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数 3 から 12 のアリール部分を有するアラルキル基、または核酸合成のアミノ基の保護基であり；

R^{22} および R^{23} は、それぞれ独立して、水素原子；ヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数 3 から 12 のアリール基で置換されていてもよく、かつ分岐または環を形成していてもよい炭素数 1 から 6 のアルキル基；またはヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数 3 から 12 のアリール部分を有するアラルキル基；であるか、あるいは

R^{22} および R^{23} は一緒になって、 $-(CH_2)_q-$ [式中、 q は 2 から 5 の整数である] を表し；

R^{24} および R^{25} は、それぞれ独立して、水素原子；水酸基；分岐または環を形成していてもよい炭素数 1 から 6 のアルキル基；分岐または環を形成していてもよい炭素数 1 から 6 のアルコキシ基；アミノ基；および核酸合成の保護基で保護されたアミノ基；からなる群から選択される基であるか、あるいは、

R^{24} および R^{25} は一緒になって、 $=C(R^{36})R^{37}$ [式中、 R^{36} および R^{37} は、それぞれ独立して、水素原子、水酸基、核酸合成の保護基で保護された水酸基、メルカプト基、核酸合成の保護基で保護されたメルカプト基、アミノ基、炭素数 1 から 6 の直鎖または分岐鎖アルコキシ基、炭素数 1 から 6 の直鎖または分岐鎖アルキルチオ基、炭素数 1 から 6 のシアノアルコキシ基、または炭素数 1 から 6 の直鎖または分岐鎖アルキルアミノ基を表す] を表し；

R^{26} および R^{27} は、それぞれ独立して、水素原子、分岐または環

を形成していてもよい炭素数 1 から 6 のアルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数 1 から 6 のアルコキシ基、または炭素数 1 から 6 の直鎖または分岐鎖アルキルチオ基であり；

R^{28} は、水素原子、分岐または環を形成していてもよい炭素数 1 から 6 のアルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数 1 から 6 のアルコキシ基、または炭素数 1 から 6 の直鎖または分岐鎖アルキルチオ基であり；

R^{29} は、水素原子、水酸基、分岐または環を形成していてもよい炭素数 1 から 6 のアルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数 1 から 6 のアルコキシ基、アミノ基、あるいは核酸合成の保護基で保護されたアミノ基であり；

R^{31} 、 R^{32} 、および R^{33} は、それぞれ独立して、水素原子、分岐または環を形成していてもよい炭素数 1 から 6 のアルキル基、あるいは核酸合成のアミノ基の保護基であり；

R^{34} および R^{35} は、それぞれ独立して、水素原子、水酸基、分岐または環を形成していてもよい炭素数 1 から 6 のアルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数 1 から 6 のアルコキシ基、アミノ基、または核酸合成の保護基で保護されたアミノ基であり；

m は 0 から 2 の整数であり；

n は 0 から 1 の整数であり；

p は 0 から 1 の整数であり；

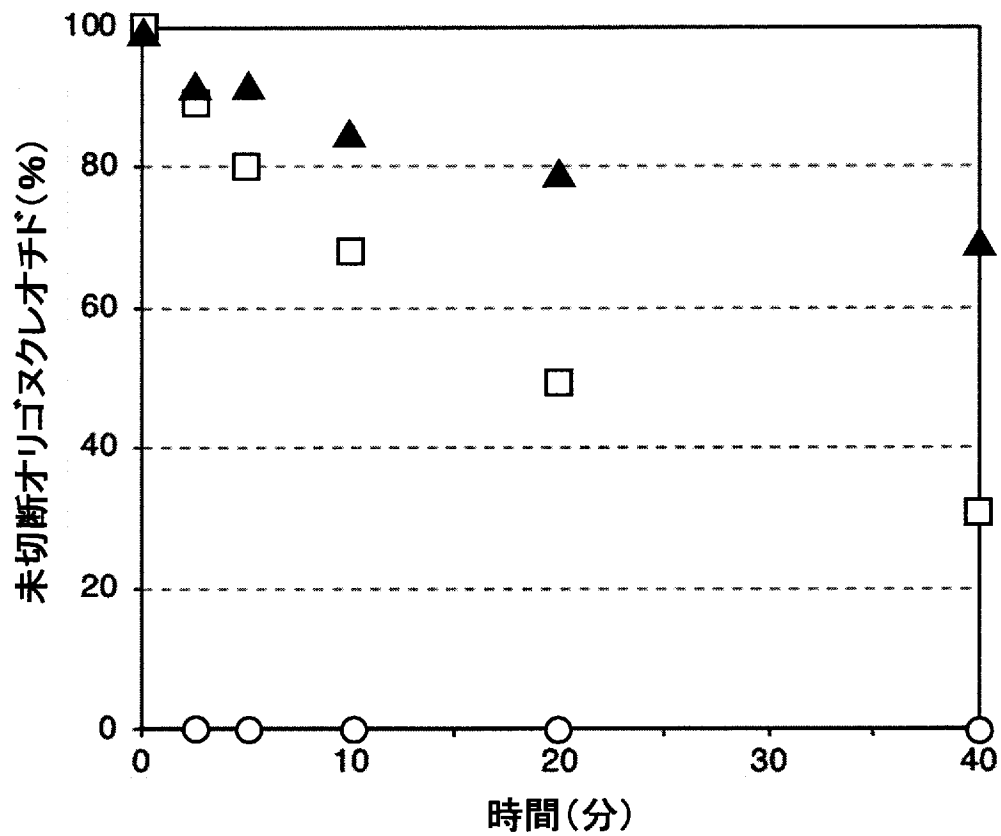
X^1 は、酸素原子、硫黄原子、またはアミノ基であり；そして

X^2 は酸素原子または硫黄原子である]

で表される二価の基を表す)

を用いてオリゴヌクレオチドを合成する工程を包含する、方法。

[図1]



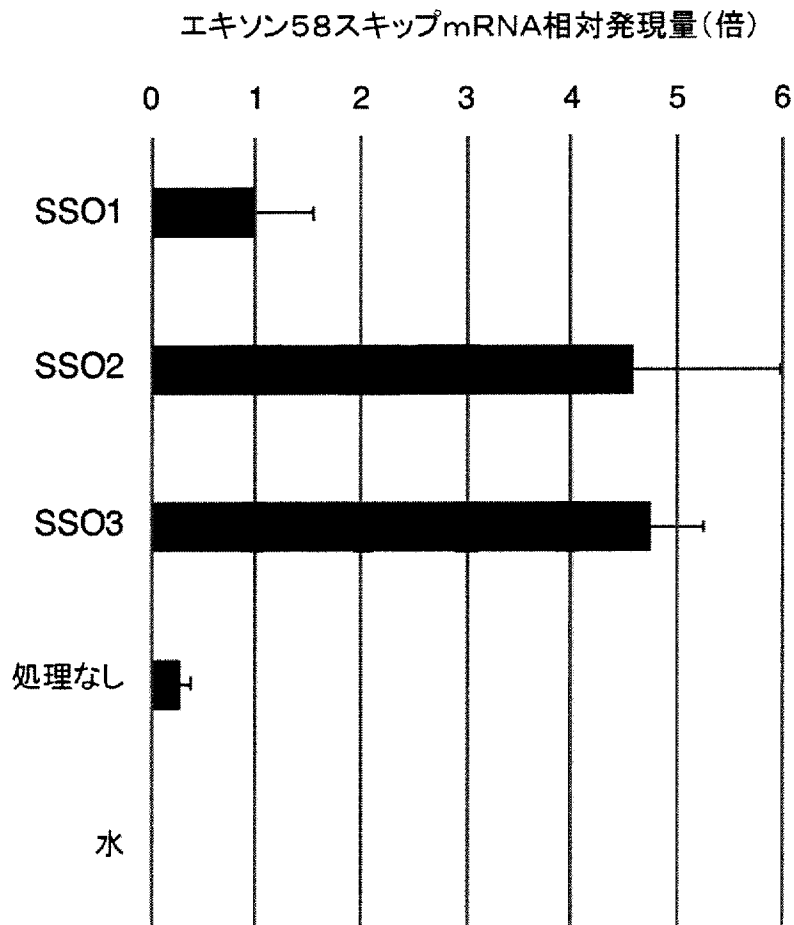
配列: 5' - TTTTTTTTTX - 3'

○ ... X = チミジン(T)

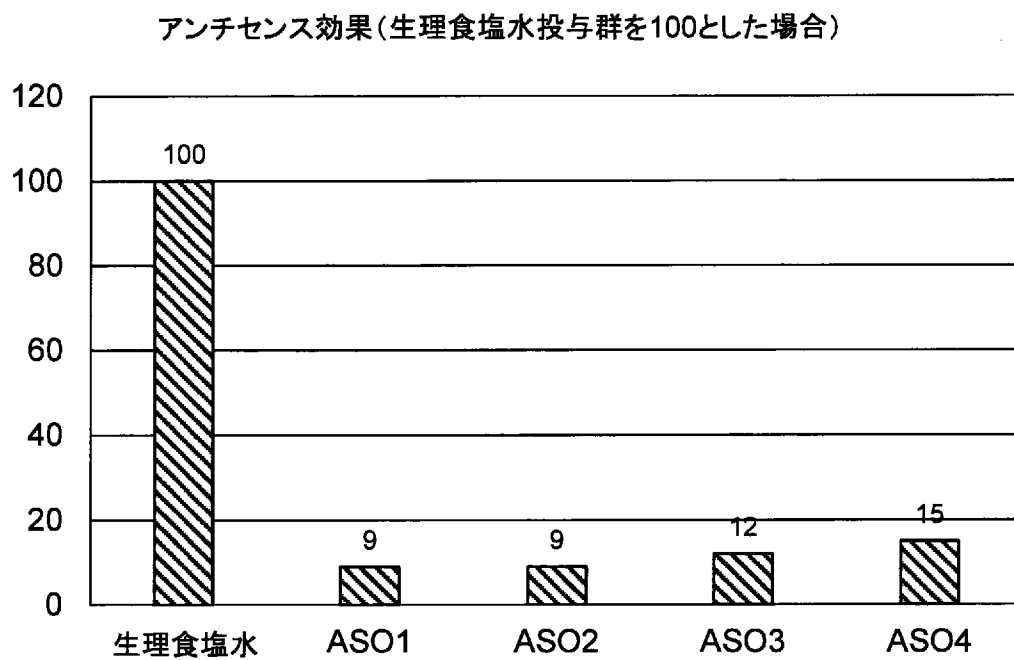
□ ... X = ホスホロチオエートチミジン(ps-T)

▲ ... X = 化合物7 (5'-シクロプロピレンチミジン(5'-cp-T))

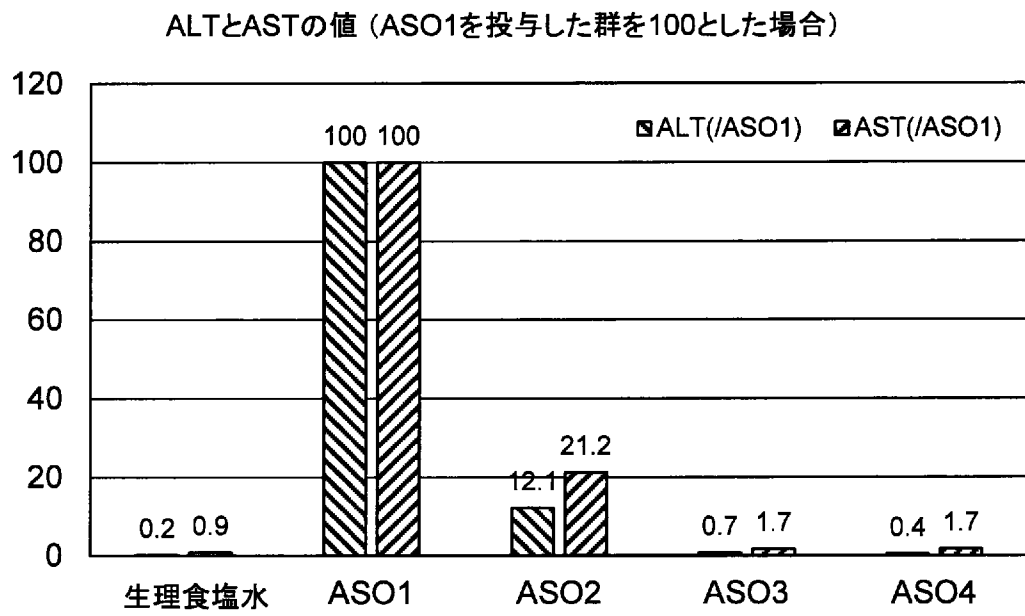
[図2]



[図3]



[図4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2020/003597

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07H 19/06(2006.01)i; C07H 19/10(2006.01)i; C07H 19/16(2006.01)i; C07H 19/20(2006.01)i; C07H 23/00(2006.01)i; C12N 15/11(2006.01)i

FI: C07H19/06 CSP; C07H19/16; C07H23/00; C07H19/10; C12N15/11 Z;
C07H19/20 ZNA

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07H19/06; C07H19/10; C07H19/16; C07H19/20; C07H23/00; C12N15/11

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

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2020
Registered utility model specifications of Japan	1996-2020
Published registered utility model applications of Japan	1994-2020

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS/REGISTRY (SrN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2015/116248 A1 (ENANTA PHARMACEUTICALS, INC.) 06.08.2015 (2015-08-06) claims, examples	1-9
A	CN 108276463 A (MI, W.) 13.07.2018 (2018-07-13) claims, examples	1-9
A	WO 2015/125783 A1 (OSAKA UNIVERSITY) 27.08.2015 (2015-08-27) claims, examples	1-9
A	HORIBA, M. et al., "Synthesis of scpBNA-mC, -A, and -G Monomers and Evaluation of the Binding Affinities of scpBNA-Modified Oligonucleotides toward Complementary ssRNA and ssDNA", the Journal of Organic Chemistry, 2016, vol. 81, no. 22, pp. 11000-11008, DOI 10.1021/acs.joc.6b02036 abstract, fig. 1, table 3	1-9
A	WO 2010/048549 A2 (ISIS PHARMACEUTICALS, INC.) 29.04.2010 (2010-04-29) claims, examples	1-9



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
06 March 2020 (06.03.2020)

Date of mailing of the international search report
17 March 2020 (17.03.2020)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2020/003597

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2007/134181 A2 (ISIS PHARMACEUTICALS, INC.) 22.11.2007 (2007-11-22) claims, examples	1-9
A	WO 94/22890 A1 (STERLING WINTHOP INC.) 13.10.1994 (1994-10-13) claims, examples	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2020/003597

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO 2015/116248 A1	06 Aug. 2015	US 2014/0219958 A1	
CN 108276463 A	13 Jul. 2018	(Family: none)	
WO 2015/125783 A1	27 Aug. 2015	US 2017/0044528 A1	
		claims, examples	
		EP 3109254 A1	
		CN 106103463 A	
WO 2010/048549 A2	29 Apr. 2010	JP 2012-506701 A	
		US 2011/0269821 A1	
		EP 2358397 A	
		CN 102264374 A	
WO 2007/134181 A2	22 Nov. 2007	JP 2009-536037 A	
		US 2007/0287831 A1	
		EP 2066684 A1	
		KR 10-2009-0034310 A	
		CN 103554205 A	
WO 94/22890 A1	13 Oct. 1994	JP 8-508490 A	
		EP 691979 A1	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C07H 19/06(2006.01)i; C07H 19/10(2006.01)i; C07H 19/16(2006.01)i; C07H 19/20(2006.01)i; C07H 23/00(2006.01)i; C12N 15/11(2006.01)i FI: C07H19/06 CSP; C07H19/16; C07H23/00; C07H19/10; C12N15/11 Z; C07H19/20 ZNA		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） C07H19/06; C07H19/10; C07H19/16; C07H19/20; C07H23/00; C12N15/11		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2020年 日本国実用新案登録公報 1996-2020年 日本国登録実用新案公報 1994-2020年		
国際調査で利用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） CAplus/REGISTRY (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	WO 2015/116248 A1 (ENANTA PHARMACEUTICALS, INC.) 06.08.2015 (2015-08-06) 請求の範囲, 実施例	1-9
A	CN 108276463 A (MI, W.) 13.07.2018 (2018-07-13) 特許請求の範囲, 実施例	1-9
A	WO 2015/125783 A1 (国立大学法人大阪大学) 27.08.2015 (2015-08-27) 請求の範囲, 実施例	1-9
A	HORIBA, M. et al., Synthesis of scpBNA-mC, -A, and -G Monomers and Evaluation of the Binding Affinities of scpBNA-Modified Oligonucleotides toward Complementary ssRNA and ssDNA, The Journal of Organic Chemistry, 2016, Vol. 81, No. 22, pp. 11000-11008, DOI 10.1021/acs.joc.6b02036 ABSTRACT, Figure 1, Table 3	1-9
A	WO 2010/048549 A2 (ISIS PHARMACEUTICALS, INC.) 29.04.2010 (2010-04-29) 請求の範囲, 実施例	1-9
A	WO 2007/134181 A2 (ISIS PHARMACEUTICALS, INC.) 22.11.2007 (2007-11-22) 請求の範囲, 実施例	1-9
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 “T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 06.03.2020		国際調査報告の発送日 17.03.2020
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		権限のある職員（特許庁審査官） 神谷 昌克 4P 8379 電話番号 03-3581-1101 内線 3492

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	WO 94/22890 A1 (STERLING WINTHOP INC.) 13.10.1994 (1994 - 10 - 13) 請求の範囲, 実施例	1-9

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2020/003597

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
WO	2015/116248	A1	06.08.2015	US	2014/0219958	A1	
CN	108276463	A	13.07.2018	(ファミリーなし)			
WO	2015/125783	A1	27.08.2015	US	2017/0044528	A1	
				特許請求の範囲, 実施例			
				EP	3109254	A1	
				CN	106103463	A	
WO	2010/048549	A2	29.04.2010	JP	2012-506701	A	
				US	2011/0269821	A1	
				EP	2358397	A	
				CN	102264374	A	
WO	2007/134181	A2	22.11.2007	JP	2009-536037	A	
				US	2007/0287831	A1	
				EP	2066684	A1	
				KR	10-2009-0034310	A	
				CN	103554205	A	
WO	94/22890	A1	13.10.1994	JP	8-508490	A	
				EP	691979	A1	