(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
2017 年 8 月 3 日(03.08.2017)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2017/131236 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 15/113 (2010.01) *C07C 237/10* (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01) *C07C 247/04* (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01) *C07C 271/16* (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01) *C07H 15/04* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2017/003249

(22) 国際出願日: 2017 年 1 月 30 日(30.01.2017)

(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 2016-016707 2016 年 1 月 29 日(29.01.2016) JP

(71) 出願人: 協和発酵キリン株式会社 (KYOWA HAKKO KIRIN CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1008185 東京都千代田区大手町一丁目６番１号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 上原 啓嗣(UEHARA, Keiji); 〒1008185 東京都千代田区大手町一丁目６番１号 協和発酵キリン株式会社 本社内 Tokyo (JP). 鈴木 康裕(SUZUKI, Yasuhiro); 〒1008185 東京都千代田区大手町一丁目６番１号 協和発酵キリン株式会社 本社内 Tokyo (JP). 岩井 宏徒(IWAI, Hiroto); 〒1008185 東京都千代田区大手町一丁目６番１号 協和発酵キリン株式会社 本社内 Tokyo (JP). 本間 正一(HOMMA, Masakazu); 〒1008185 東京都千代田区大手町一丁目６番１号 協和発酵キリン株式会社 本社内 Tokyo (JP). 福田 裕一(FUKUDA, Yuichi); 〒1008185 東京都千代田区大手町一丁目６番１号 協和発酵キリン株式会社 本社内 Tokyo (JP). 木内 達人(KIUCHI, Tatsuto); 〒1008185 東京都千代田区大手町一丁目６番１号 協和発酵キリン株式会社 本社内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 稲葉 良幸, 外(INABA, Yoshiyuki et al.); 〒1066123 東京都港区六本木６－１０－１ 六本木ヒルズ森タワー２３階 ＴＭＩ総合法律事務所 Tokyo (JP).

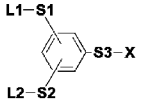
(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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)）

(54) **Title**: NUCLEIC ACID COMPLEX

(54) 発明の名称 : 核酸複合体



(57) **Abstract**: The present invention relates to the nucleic acid complex expressed by formula 1. Formula 1: (In formula 1, X is an oligonucleotide, L1 and L2 each independently represents a sugar ligand, and S1, S2 and S3 each independently represents a linker.)

(57) 要約: 本発明は、下記式１で表される核酸複合体に関する。 式１：（式１中、Ｘは、オリゴヌクレオチドであり、Ｌ１およびＬ２は、それぞれ独立して、糖リガンドであり、Ｓ１、Ｓ２およびＳ３は、それぞれ独立して、リンカーである。）

WO 2017/131236 A1

明　細　書

発明の名称 ： 核酸複合体

技術分野

[0001] 本発明は、核酸複合体および該核酸複合体を含む医薬組成物等に関する。

背景技術

[0002] 核酸医薬として、アプタマー、アンチセンス、デコイ核酸、リボザイム、ｓｉＲＮＡ、ｍｉＲＮＡおよびａｎｔｉｍｉＲＮＡ等が知られている。核酸医薬は、細胞内のあらゆる遺伝子を制御できる汎用性の高さから、今まで治療困難とされてきたさまざまな疾患への臨床応用が期待されている。

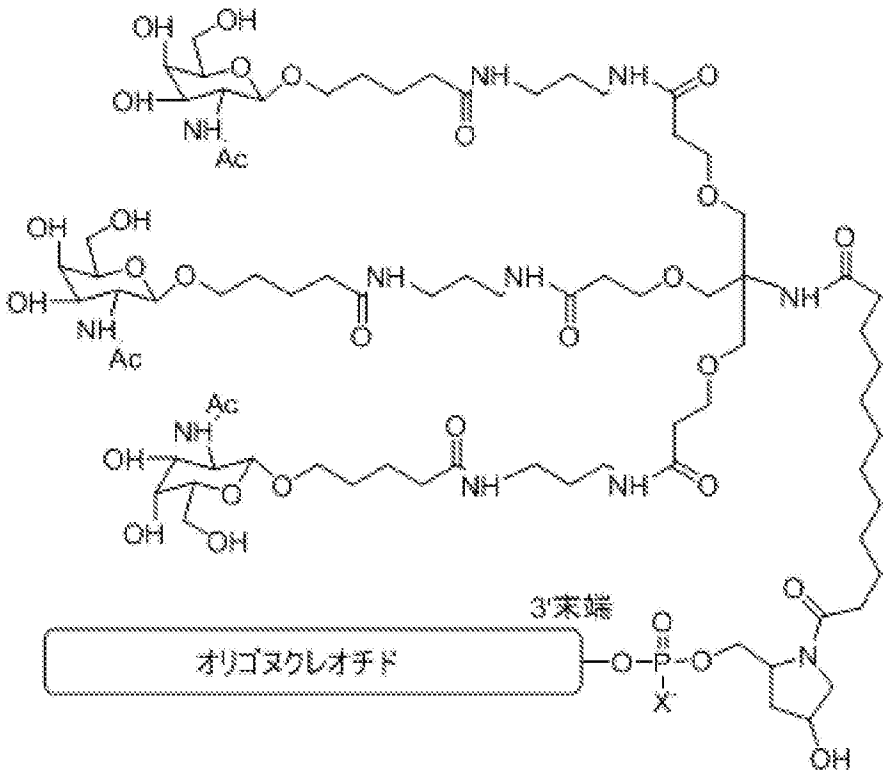
また、核酸医薬は、細胞内における標的選択性と活性の高さから抗体、低分子医薬に次ぐ、次世代医薬として期待されている。

しかしながら、核酸医薬は、標的組織への送達が困難であることが問題点として挙げられる。

[0003] インビボにおける効果的な核酸医薬の送達法の１つとして、標的化化合物と核酸との核酸複合体（コンジュゲート）を用いることが報告されている。標的化化合物としては、細胞外に発現する受容体に結合可能なリガンドが挙げられる。その中でも特に、肝細胞に極めて高発現しているアシアロ糖タンパク質受容体（ＡＳＧＰＲ）に結合可能であるリガンドとしてＮ－アセチル－Ｄ－ガラクトサミン（ＧａｌＮＡｃ）等を利用した核酸複合体が複数報告されている。近年では、これらのリガンドとｓｉＲＮＡ類とを結合した核酸複合体が肝細胞に効率的に送達されることが報告されている（非特許文献１）。

[0004] 標的化化合物とオリゴヌクレオチドの複合体として、特許文献１および２には、例えば、以下に示す核酸複合体が開示されている。

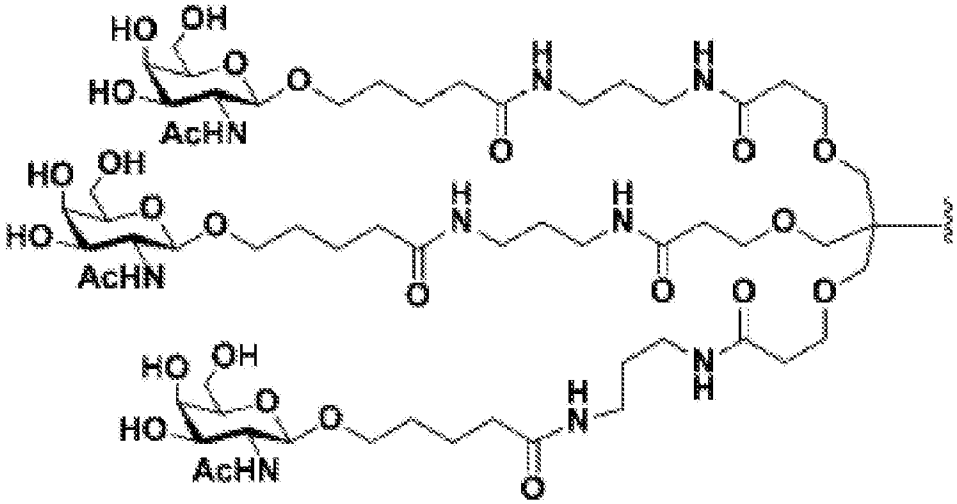
[化1]



（式中、Ａｃはアセチル基を表す。以下、本明細書において同様である。）

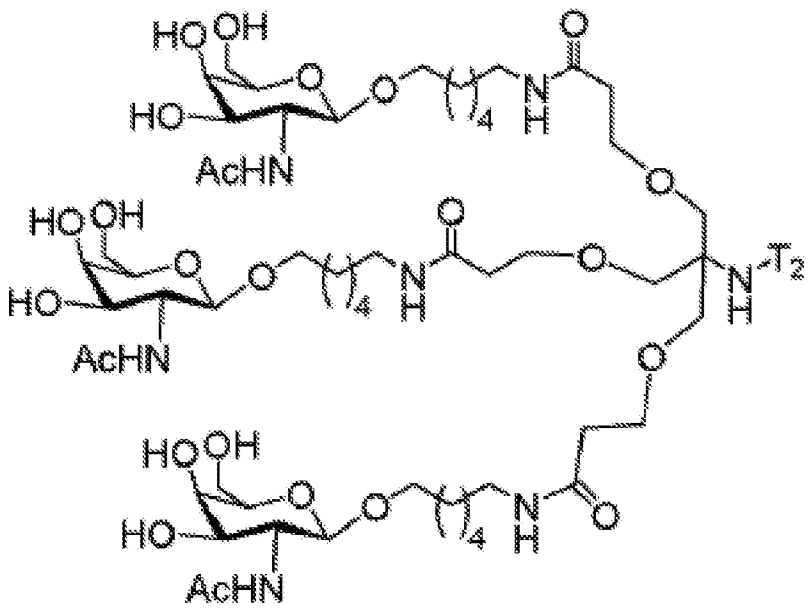
また、特許文献３には、特許文献１および２と同様の糖リガンドーテザーユニットを有する以下の構造を有する核酸複合体が開示されている。

[化2]



また、特許文献４には、糖リガンドーテザーユニットとして、以下に示す構造を有する核酸複合体が開示されている。

[化3]



先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：国際公開第２００９／０７３８０９号

特許文献2：国際公開第２０１３／０７５０３５号

特許文献3：国際公開第２０１５／１０５０８３号

特許文献4：国際公開第２０１４／１７９６２０号

非特許文献

[0006] 非特許文献1：ジャーナル・オブ・アメリカン・ケミカル・ソサイエティー（Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｓｏｃｉｅｔｙ），２０１４年，第１３６巻，ｐ１６９５８-１６９６１

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明の目的は、新規核酸複合体を提供することにある。

課題を解決するための手段

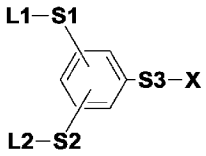
[0008] 本発明は、以下の（１）～（２２）に関する。

（１）

下記式１で表される核酸複合体。

式１：

[化4]



（式１中、

Ｘは、オリゴヌクレオチドであり、

Ｌ１およびＬ２は、それぞれ独立して、糖リガンドであり、

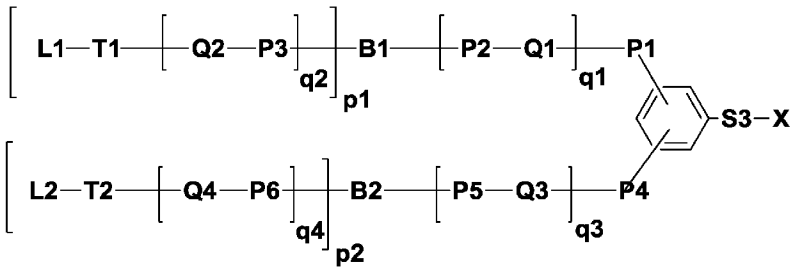
Ｓ１、Ｓ２およびＳ３は、それぞれ独立して、リンカーである。）

（２）

下記式２で表される構造を有する、（１）に記載の核酸複合体。

式２：

[化5]



（式２中、

Ｘ、Ｌ１、Ｌ２およびＳ３は、それぞれ前記と同義であり、

Ｐ１、Ｐ２、Ｐ３、Ｐ４、Ｐ５およびＰ６、ならびにＴ１およびＴ２は、それぞれ独立して、存在しないか、または、－ＣＯ－、－ＮＨ－、－Ｏ－、－Ｓ－、－Ｏ－ＣＯ－、－Ｓ－ＣＯ－、－ＮＨ－ＣＯ－、－ＣＯ－Ｏ－、－ＣＯ－Ｓ－もしくは－ＣＯ－ＮＨ－であり、

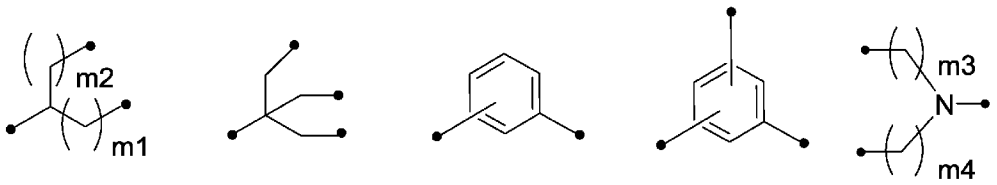
Ｑ１、Ｑ２、Ｑ３およびＱ４は、それぞれ独立して、存在しないか、または、置換もしくは無置換の炭素数１～１２のアルキレンまたは－（CH_2CH_2O）$_n$－CH_2CH_2－であり、ｎは０～９９の整数であり、

Ｂ１およびＢ２は、それぞれ独立して、結合手であるか、または、下記式

２－１で表されるいずれかの構造であり、各構造における末端の黒丸点は、それぞれ、Ｐ２またはＰ３あるいはＰ５またはＰ６との結合点であり、ｍ１、ｍ２、ｍ３およびｍ４は、それぞれ独立して、０～１０の整数であり、

式２－１：

[化6]



ｐ１およびｐ２は、それぞれ独立して、１、２または３の整数であり、

ｑ１、ｑ２、ｑ３およびｑ４は、それぞれ独立して、０～１０の整数であり、

ただし、ｐ１およびｐ２がそれぞれ２または３の整数であるとき、それぞれのＰ３およびＰ６、Ｑ２およびＱ４、Ｔ１およびＴ２ならびにＬ１およびＬ２は、同一または異なっていてもよい。）

（３）

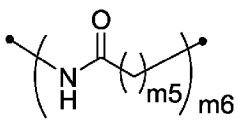
Ｐ１およびＰ４が、それぞれ独立して－ＣＯ－ＮＨ－、－ＮＨ－ＣＯ－または－Ｏ－である請求項２に記載の核酸複合体。

（４）

－（Ｐ２－Ｑ１）$_{q1}$－および－（Ｐ５－Ｑ３）$_{q3}$－がそれぞれ独立して、存在しないか、または下記式３－１～式３－３で表されるいずれかの構造である、（２）および（３）に記載の核酸複合体。

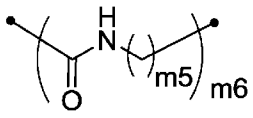
式３－１：

[化7]



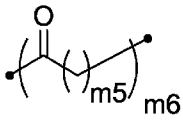
式３－２：

[化8]



式３－３：

[化9]



（式３－１～式３－３中、

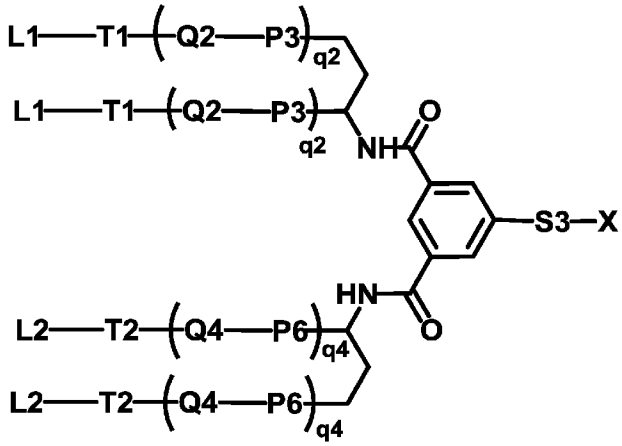
ｍ５およびｍ６は、それぞれ独立して、０～１０の整数であり、式３－１～式３－３の構造における末端の黒丸点は、それぞれ、Ｂ１またはＢ２あるいはＰ１またはＰ４との結合点である。）

（５）

下記式４－１～式４－９で表されるいずれかの構造を有する、（２）～（４）のいずれか一項に記載の核酸複合体。

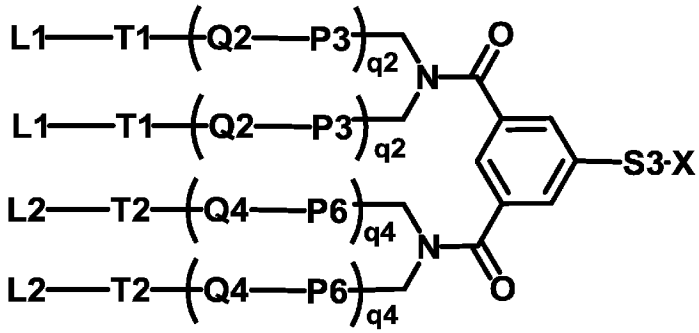
式４－１：

[化10]



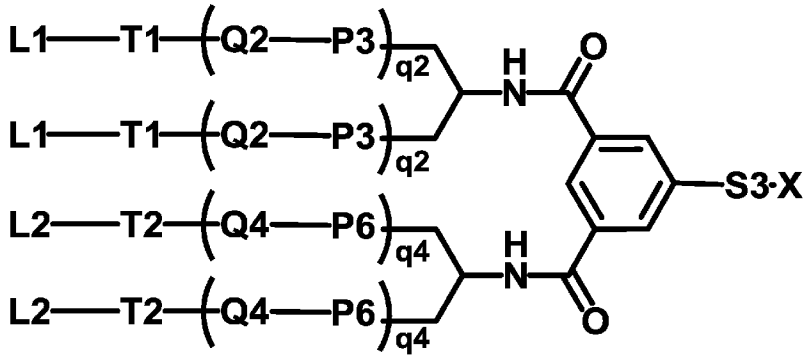
式４－２：

[化11]



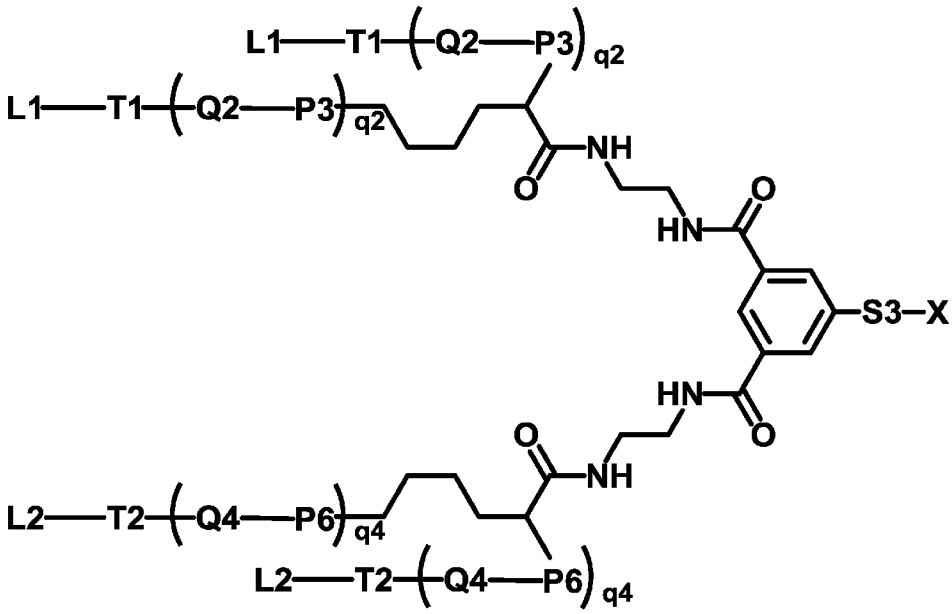
式４－３：

[化12]



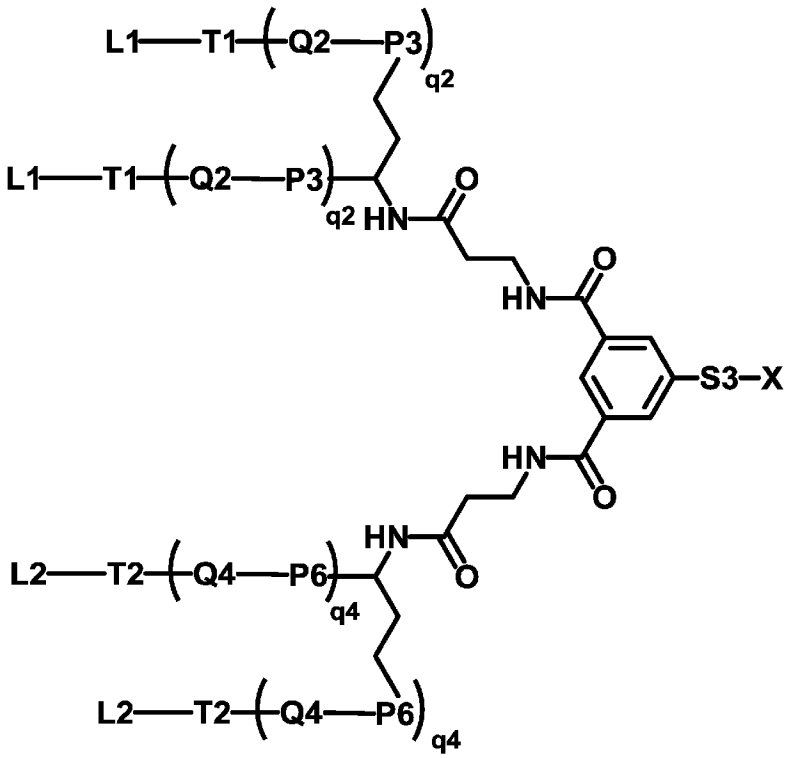
式４－４：

[化13]



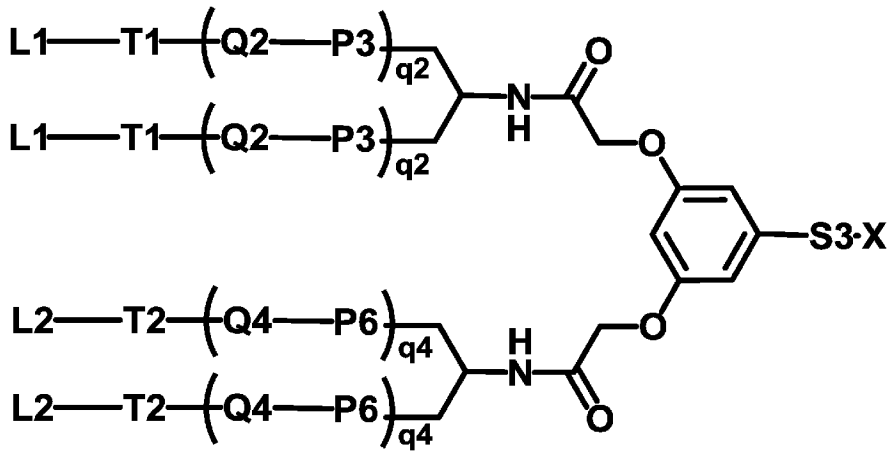
式４－５：

[化14]



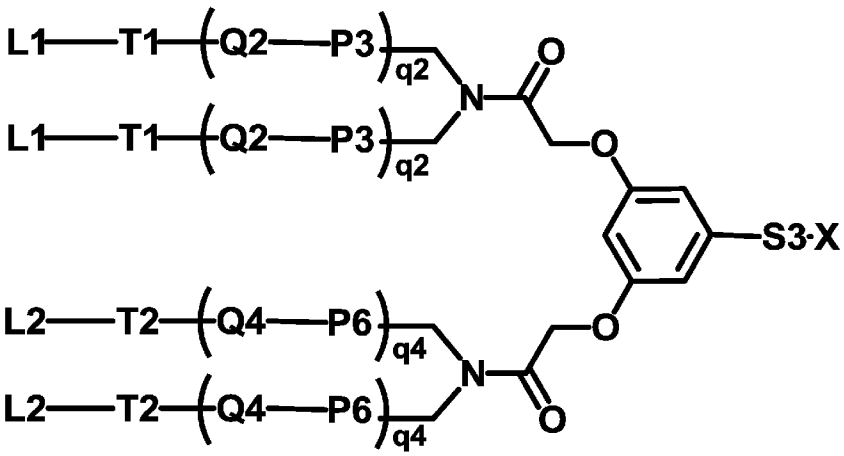
式４－６：

[化15]



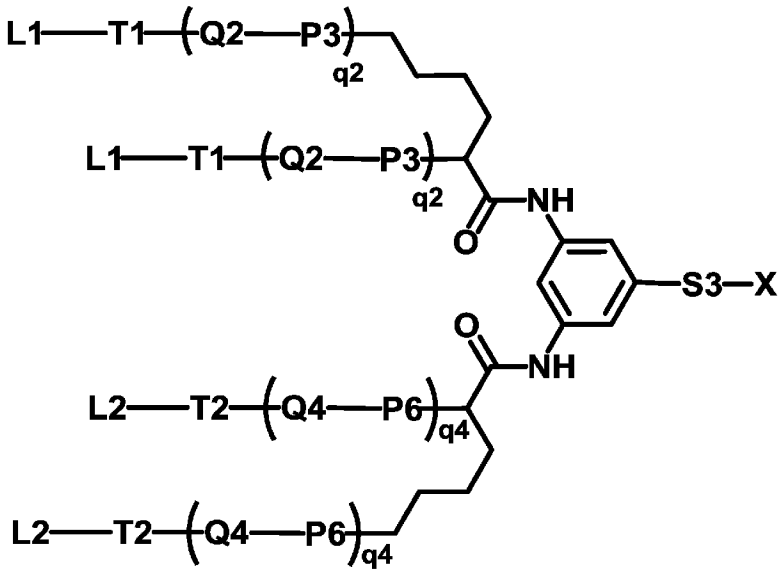
式４－７：

[化16]



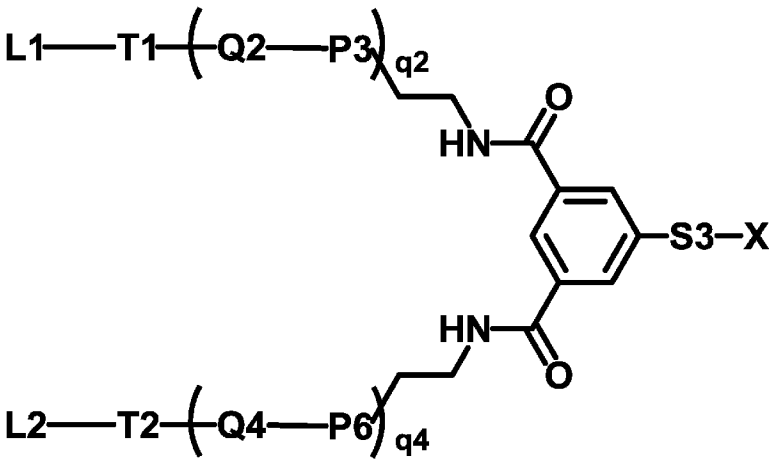
式４－８：

[化17]



式４－９：

[化18]



（式４－１～４－９中、

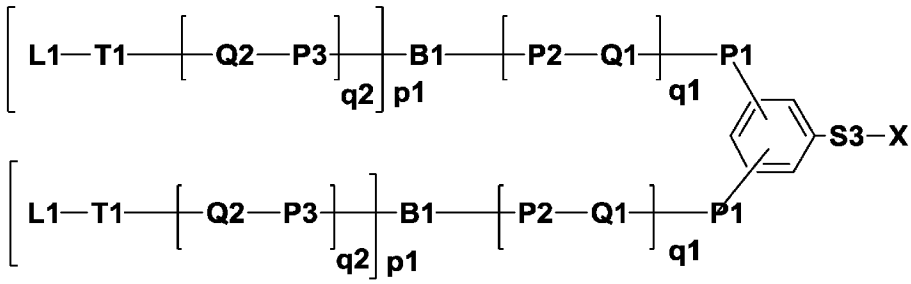
Ｘ、Ｌ１、Ｌ２、Ｓ３、Ｐ３、Ｐ６、Ｔ１、Ｔ２、Ｑ２、Ｑ４、ｑ２およびｑ４はそれぞれ前記と同義である。）

（６）

下記式５で表される構造を有する、（１）に記載の核酸複合体。

式５：

[化19]



（式５中、

Ｘ、Ｓ３、Ｐ１、Ｐ２、Ｐ３、Ｑ１、Ｑ２、Ｂ１、Ｔ１、Ｌ１、ｐ１、ｑ１およびｑ２はそれぞれ前記と同義である。）

（７）

Ｐ１が－ＣＯ－ＮＨ－、－ＮＨ－ＣＯ－または－Ｏ－である（６）に記載の核酸複合体。

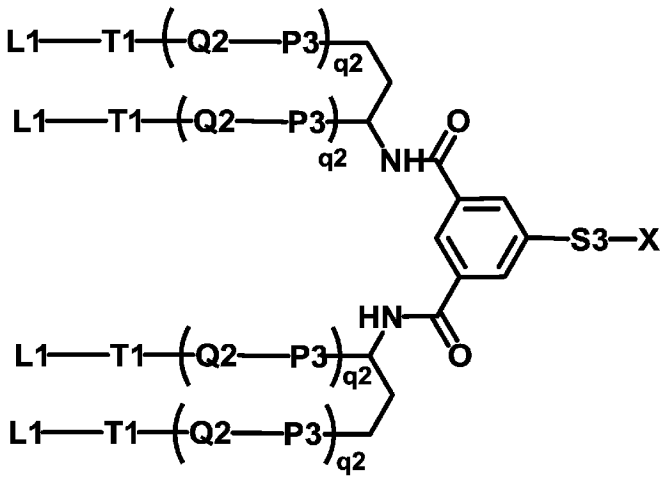
（８）

下記式６－１～式６－９で表されるいずれかの構造を有する、（６）また

は（７）に記載の核酸複合体。

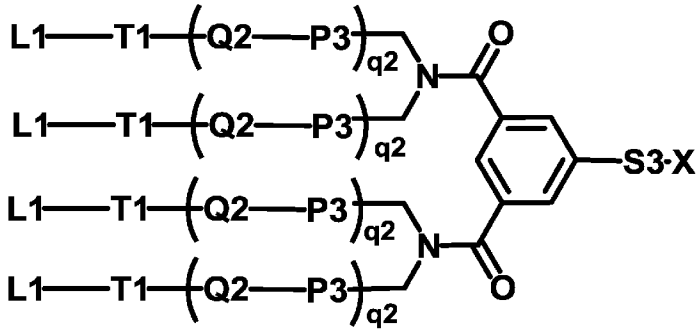
式６－１：

[化20]



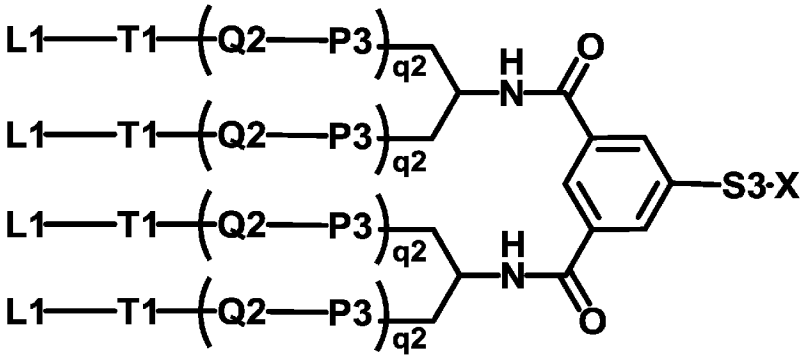
式６－２：

[化21]



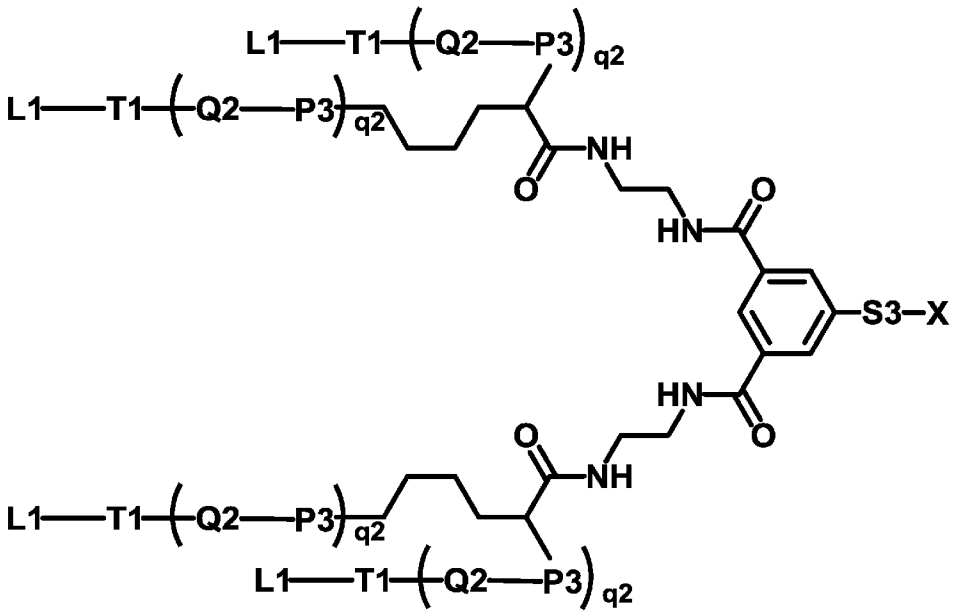
式６－３：

[化22]



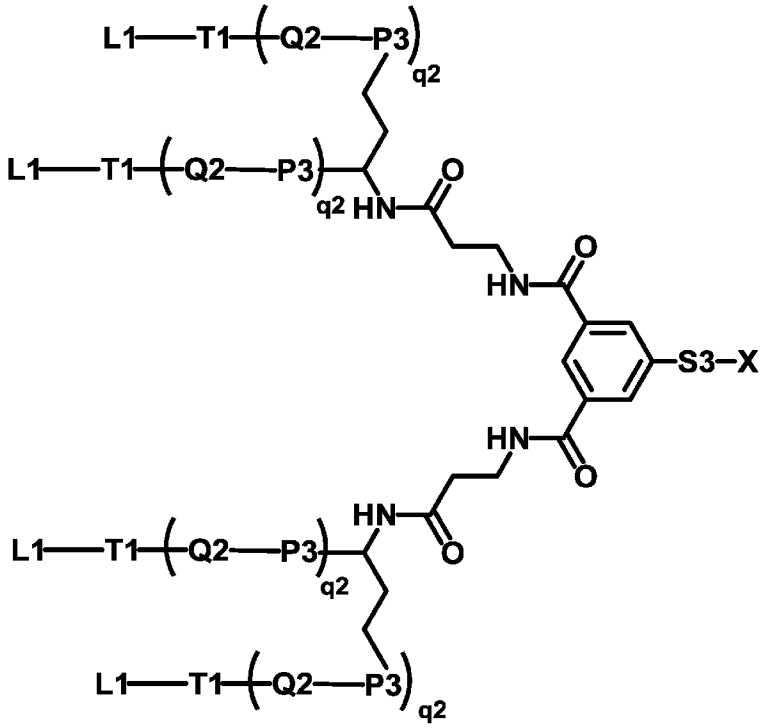
式６－４：

[化23]



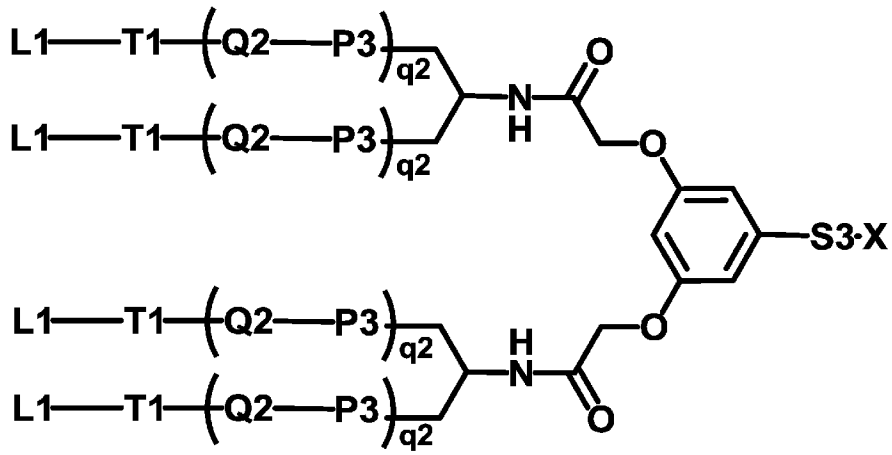
式６－５：

[化24]



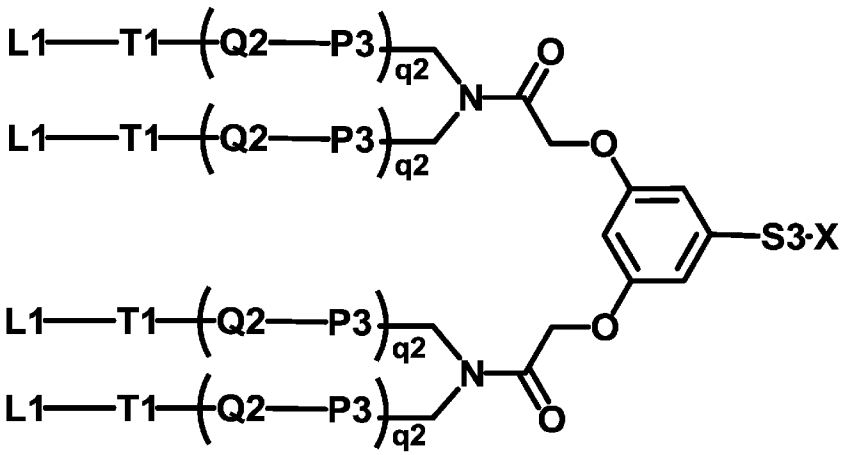
式６－６：

[化25]



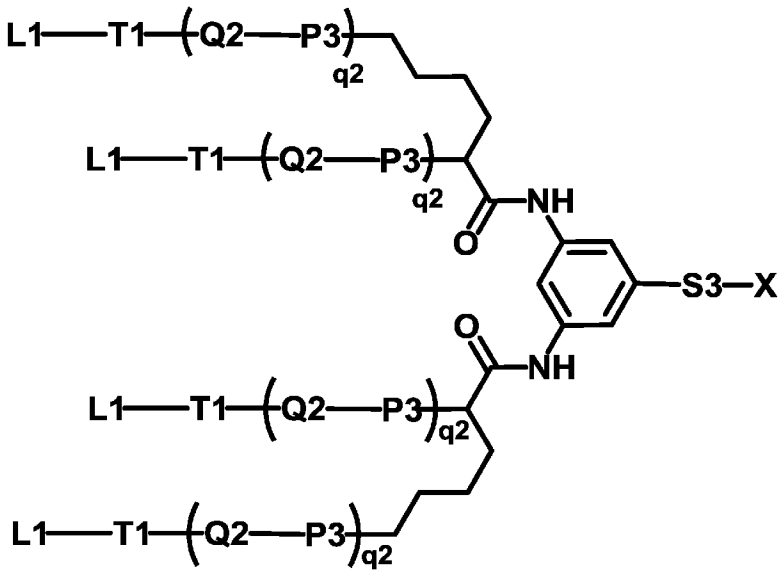
式６－７：

[化26]



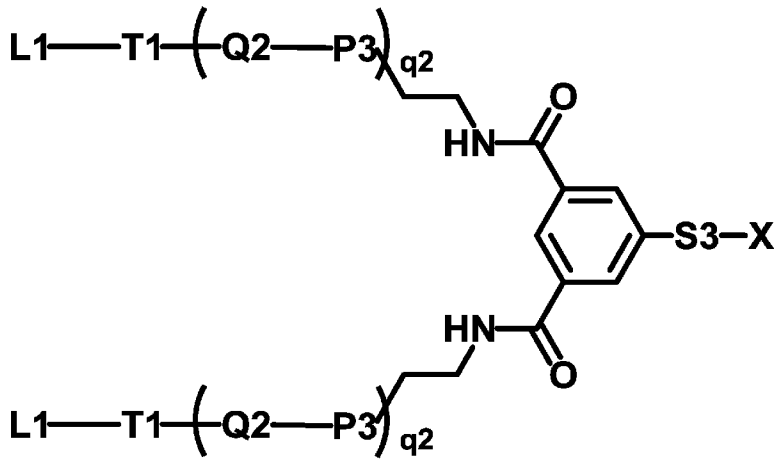
式６－８：

[化27]



式６－９：

[化28]



（式６－１～６－９中、

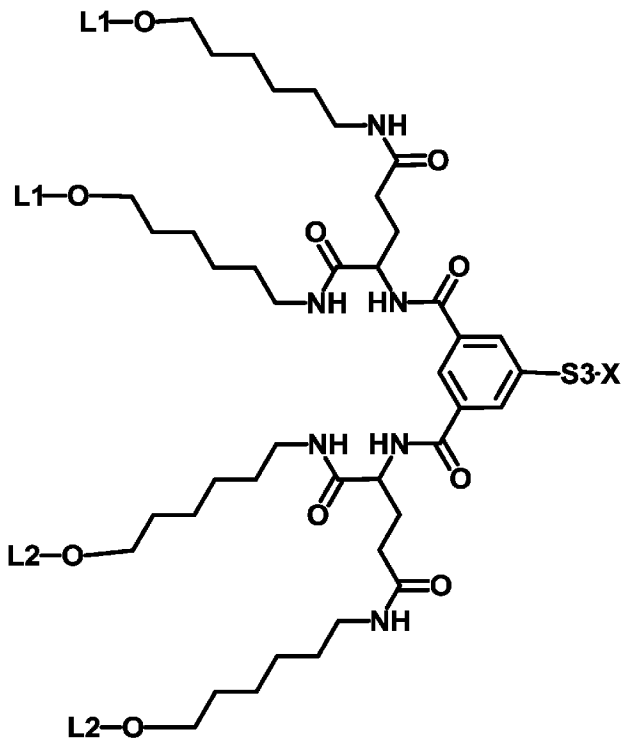
Ｘ、Ｓ３、Ｐ３、Ｑ２、Ｔ1、Ｌ１およびｑ２は、それぞれ前記と同義である。）

（９）

下記式７－１～式７－９で表されるいずれかの構造を有する、（２）～（８）に記載の核酸複合体。

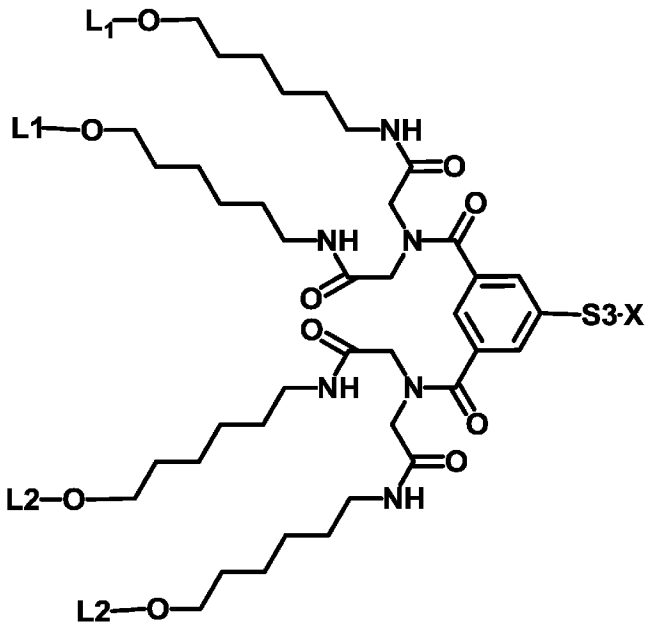
式７－１：

[化29]



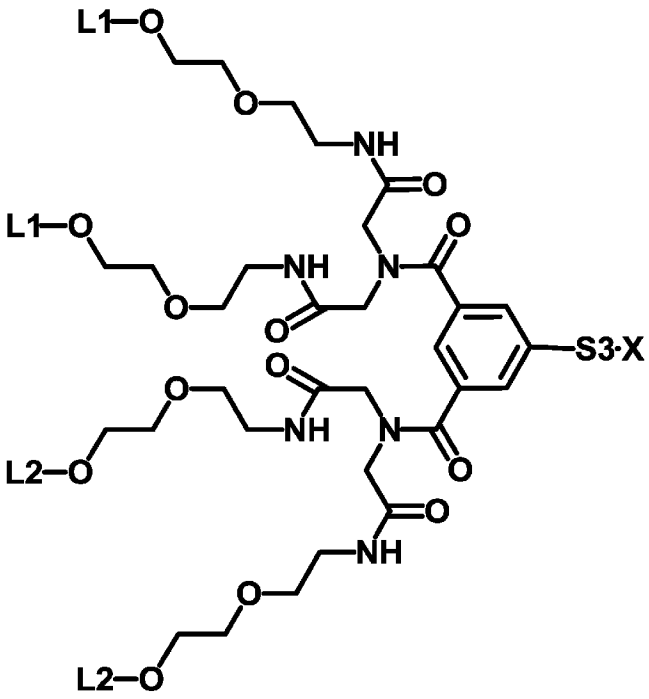
式７－２：

[化30]



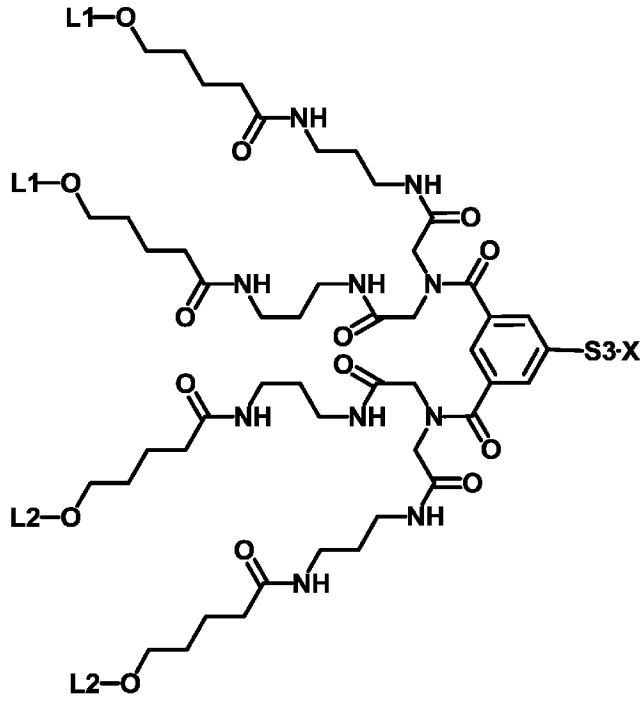
式７－３：

[化31]



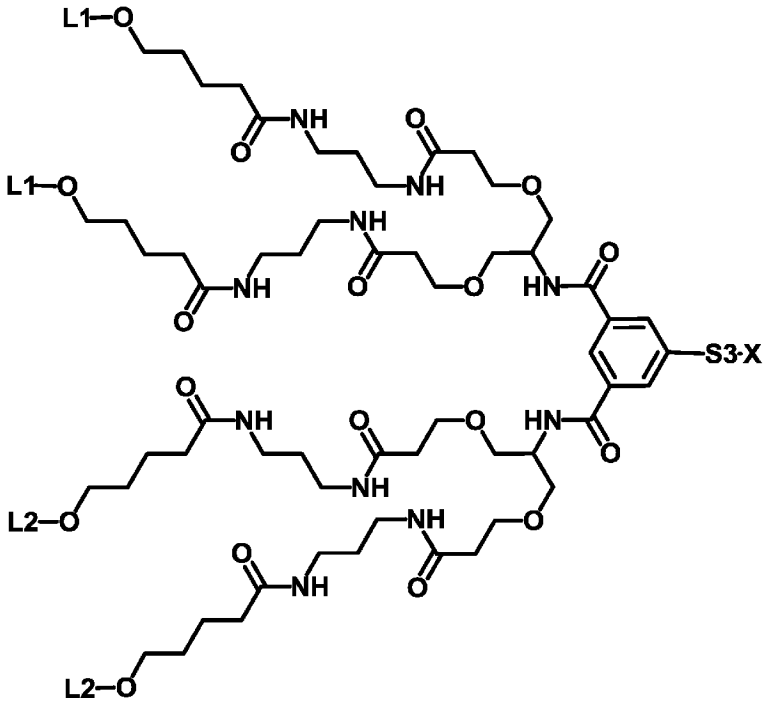
式７－４：

[化32]



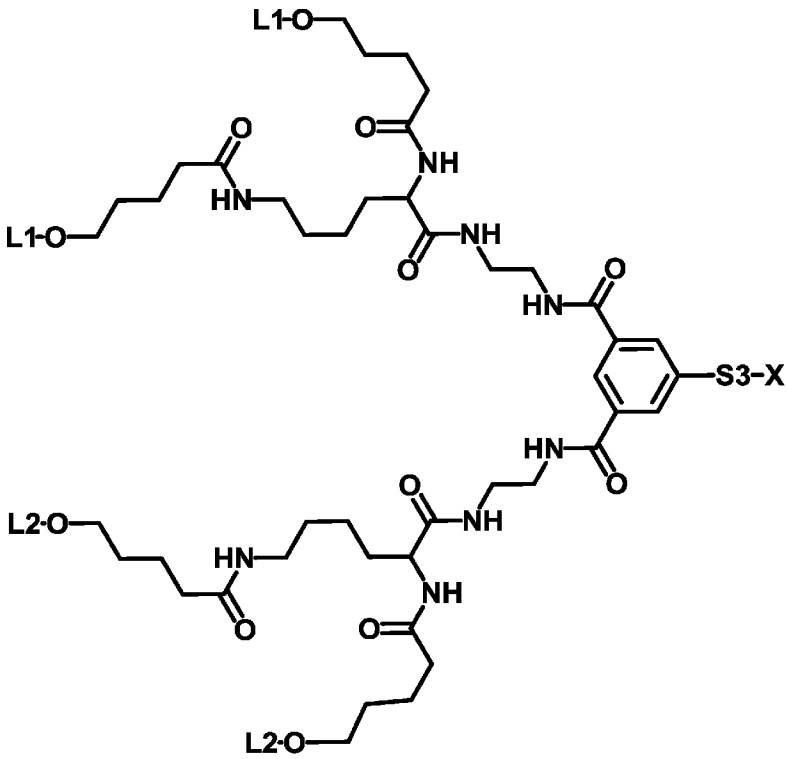
式７－５：

[化33]



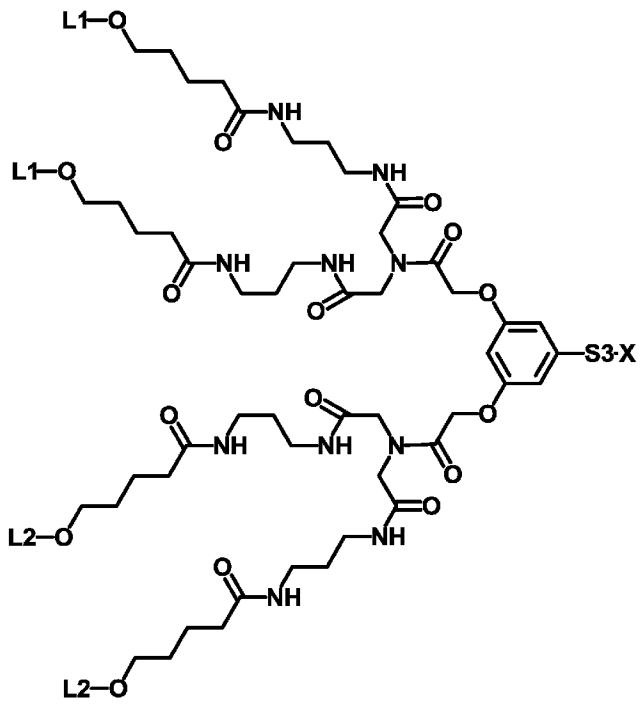
式７－６：

[化34]



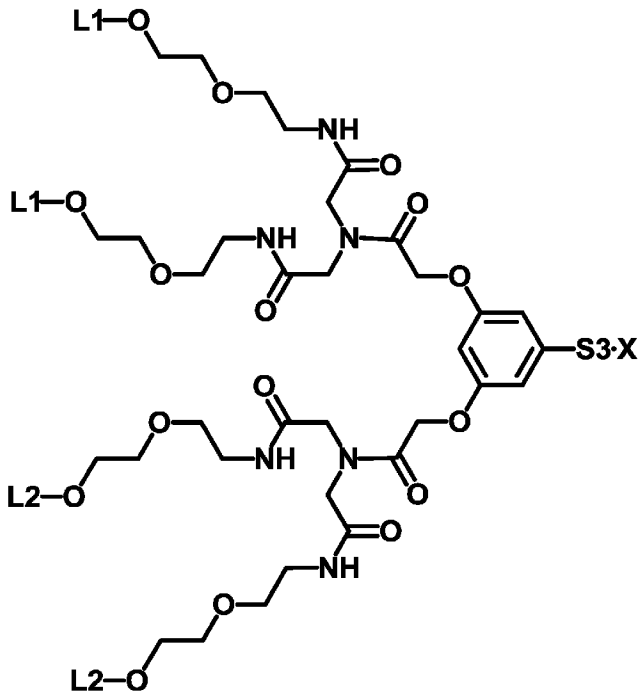
式７－７：

[化35]



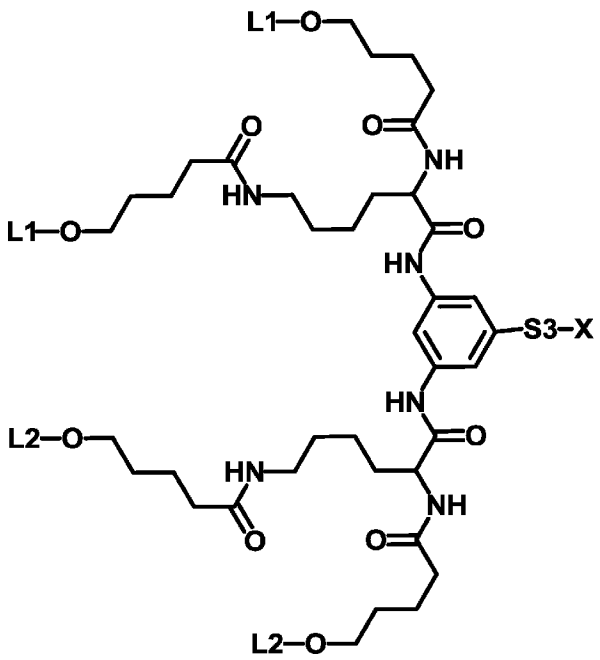
式７－８：

[化36]



式７－９：

[化37]

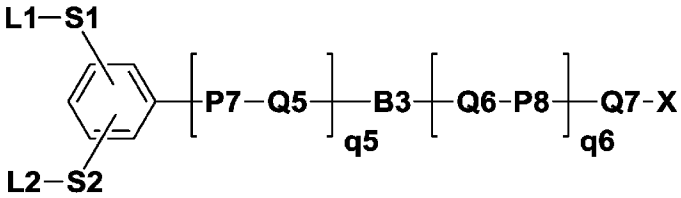


（１０）

下記式１１で表される構造を有する、（１）～（９）のいずれかに記載の核酸複合体。

式１１：

[化38]



（式１１中、

Ｘ、Ｌ１、Ｌ２、Ｓ１およびＳ２は、それぞれ前記と同義であり、

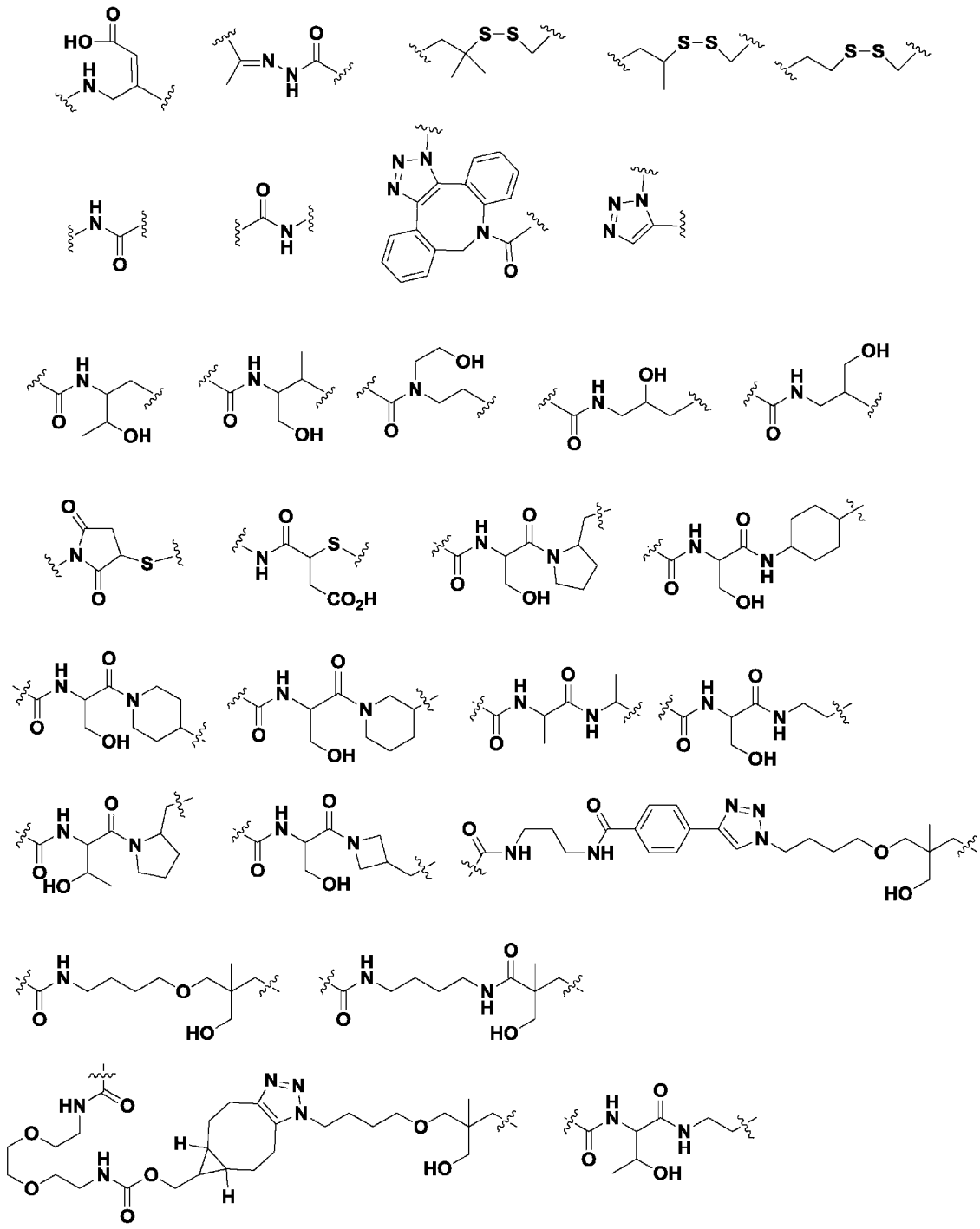
Ｐ７およびＰ８は、それぞれ独立して、存在しないか、または、－ＣＯ－、－ＮＨ－、－Ｏ－、－Ｓ－、－Ｏ－ＣＯ－、－Ｓ－ＣＯ－、－ＮＨ－ＣＯ－、－ＣＯ－Ｏ－、－ＣＯ－Ｓ－もしくは－ＣＯ－ＮＨ－であり、

Ｑ５、Ｑ６およびＱ７は、それぞれ独立して、存在しないか、または、置換もしくは無置換の炭素数１～１２のアルキレンまたは－（CH_2CH_2O）$_{n8}$－CH_2CH_2－であり、ｎ８は０～９９の整数であり、

Ｂ３は、下記式１１－１で表されるいずれかの構造であり、破線において、それぞれ、Ｑ５およびＱ６との結合手を意味し、

式１１－１：

[化39]



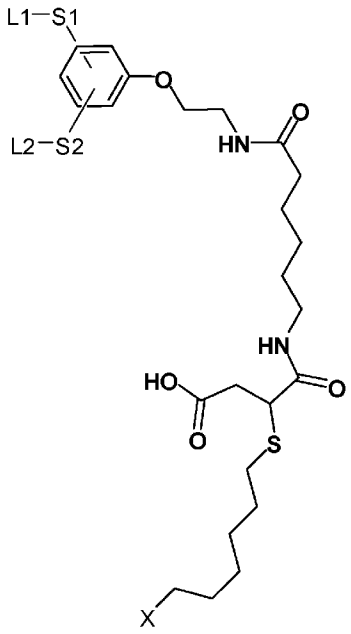
ｑ５およびｑ６は、それぞれ独立して、０～１０の整数である。）

（１１）

下記式１２－１～式１２－１２で表されるいずれかの構造を有する、（１）～（１０）のいずれかに記載の核酸複合体。

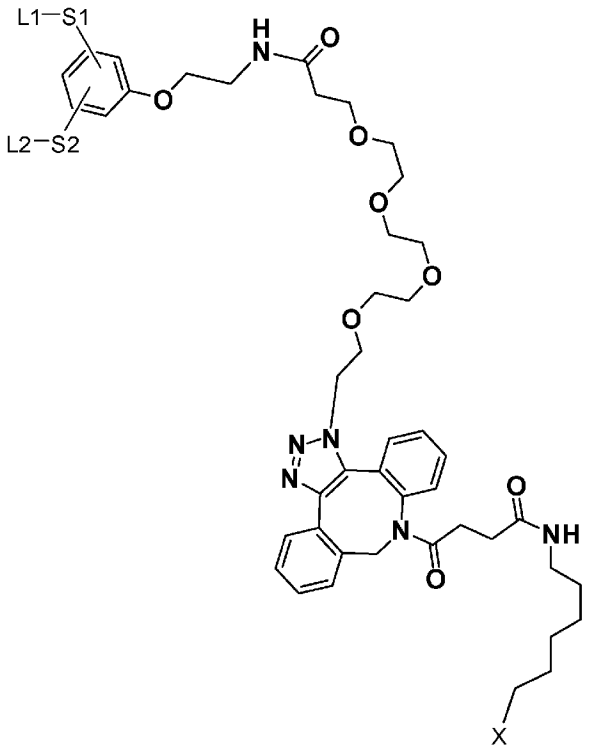
式１２－１：

[化40]



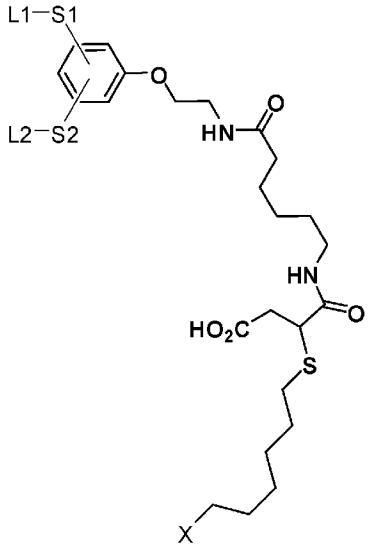
式１２－２：

[化41]



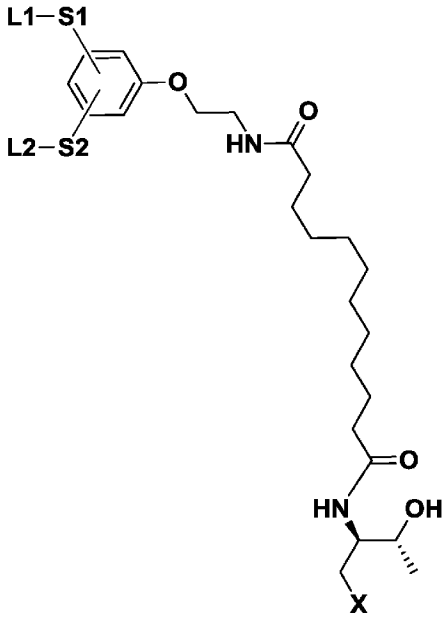
式１２－３：

[化42]



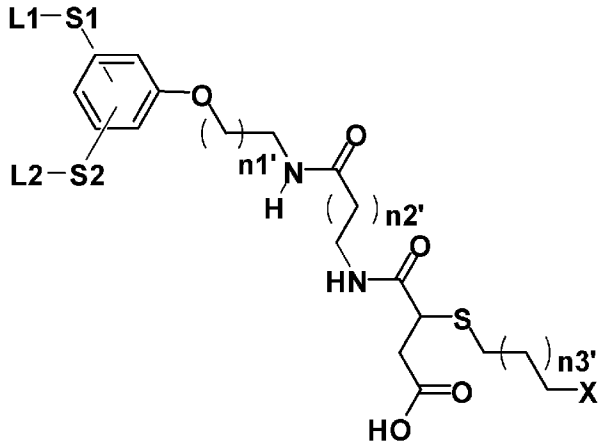
式１２－４：

[化43]



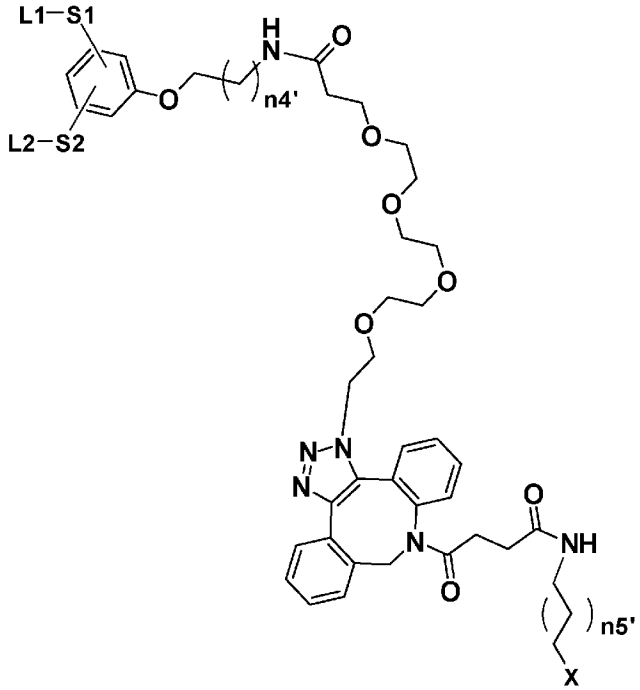
式１２－５：

[化44]



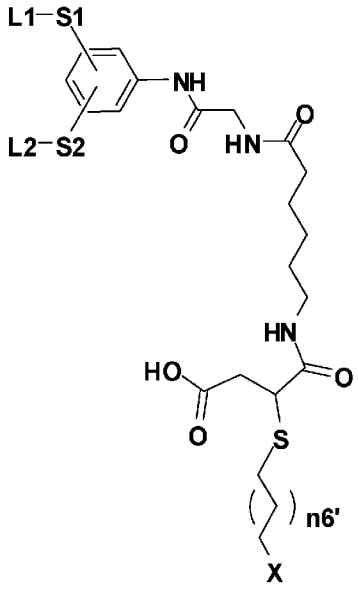
式１２－６：

[化45]



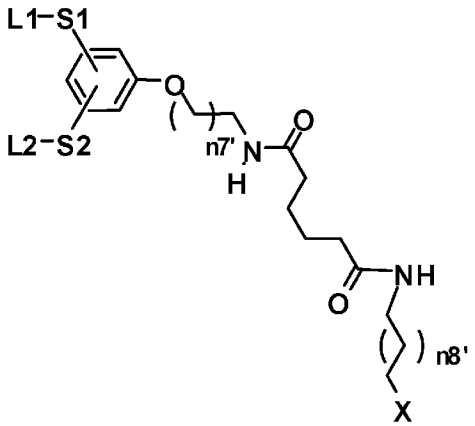
式１２－７：

[化46]



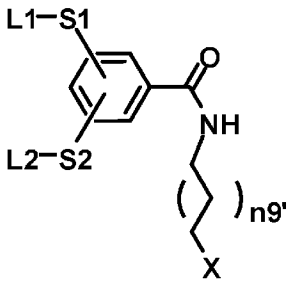
式１２－８：

[化47]



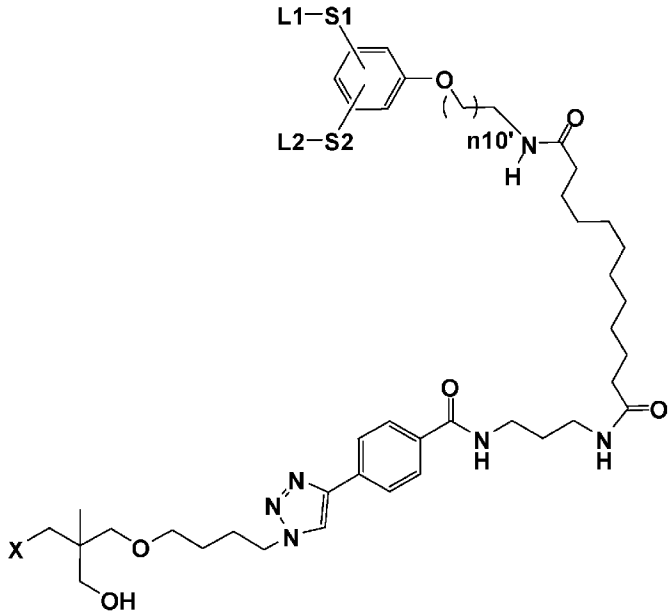
式１２－９：

[化48]



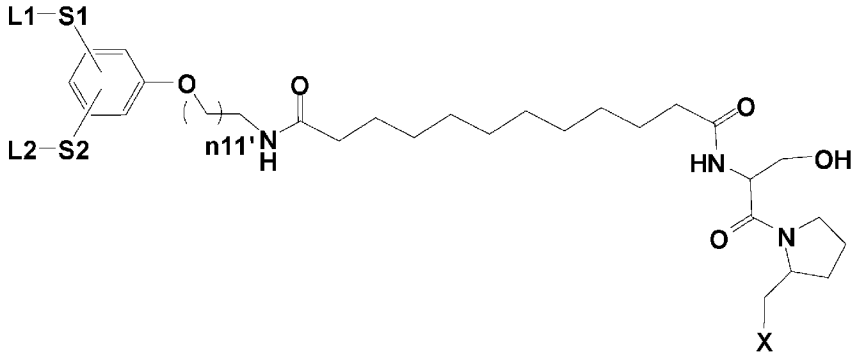
式１２－１０：

[化49]



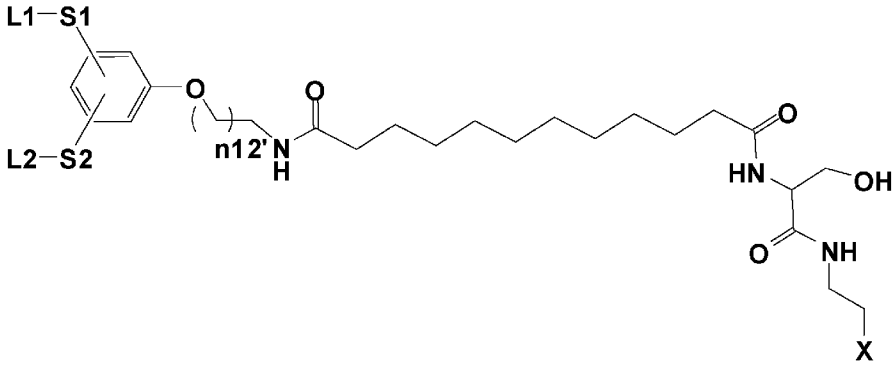
式１２－１１：

[化50]



式１２－１２：

[化51]



（式１２－１～１２－１２中、

Ｘ、Ｌ１、Ｌ２、Ｓ１およびＳ２は、それぞれ前記と同義であり、ｎ１’～ｎ１２’はそれぞれ独立して、１～１０の整数である。）

（１２）

前記糖リガンドが、マンノースまたはＮ－アセチルガラクトサミンである、（１）～（１１）のいずれかに記載の核酸複合体。

（１３）

前記オリゴヌクレオチドが修飾ヌクレオチドを含む、（１）～（１２）のいずれかに記載の核酸複合体。

（１４）

（１）～（１３）のいずれかに記載の核酸複合体を含む、医薬組成物。

（１５）

細胞内に導入するための、（１４）に記載の医薬組成物。

（１６）

前記細胞が肝細胞である、（１５）に記載の医薬組成物。

（１７）

静脈内投与または皮下投与される、（１４）～（１６）のいずれかに記載の医薬組成物。

（１８）

（１）～（１３）のいずれかに記載の核酸複合体または（１４）～（１７）のいずれかに記載の医薬組成物を、それを必要とする患者に投与することを含む、疾患の治療または予防方法。

（１９）

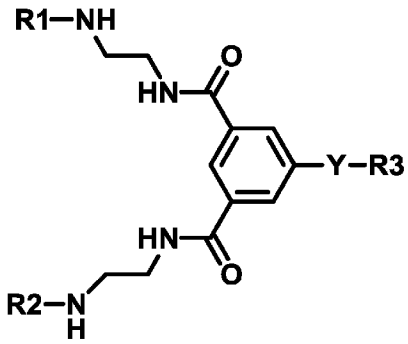
前記患者が哺乳動物である、（１８）に記載の治療または予防方法。

（２０）

下記式８で表される化合物。

式８：

[化52]



（式８中、

Ｒ１およびＲ２は、それぞれ独立して、水素原子、ｔ－ブトキシカルボニル基、ベンジルオキシカルボニル基、９－フルオレニルメチルオキシカルボニル基、－ＣＯ－Ｒ４、または－ＣＯ－Ｂ４－［（Ｐ９－Ｑ８）$_{q7}$－Ｔ３－Ｌ３］$_{p3}$であり、

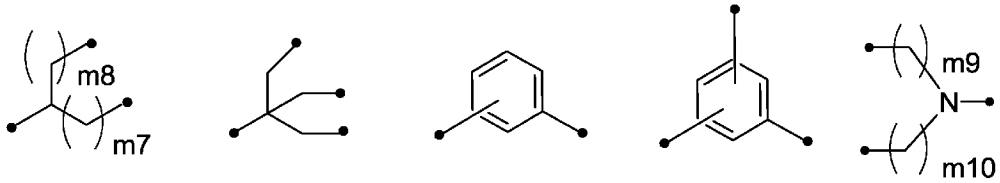
Ｐ９およびＴ３は、それぞれ独立して、存在しないか、または、－ＣＯ－、－ＮＨ－、－Ｏ－、－Ｓ－、－Ｏ－ＣＯ－、－Ｓ－ＣＯ－、－ＮＨ－ＣＯ－、－ＣＯ－Ｏ－、－ＣＯ－Ｓ－もしくは－ＣＯ－ＮＨ－であり、

Ｑ８は、存在しないか、または、置換もしくは無置換の炭素数１～１２のアルキレンまたは－（ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｏ）$_{n1}$－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－であり、ｎ１は０～９９の整数であり、

Ｂ４は、それぞれ独立して、結合手であるか、または、下記式８－１で表されるいずれかの構造であり、各構造における末端の黒丸点は、それぞれ、カルボニル基またはＰ９との結合点であり、ｍ７、ｍ８、ｍ９およびｍ１０は、それぞれ独立して、０～１０の整数であり、

式８－１：

[化53]



ｐ３は、１、２または３の整数であり、

ｑ７は、０～１０の整数であり、

Ｌ３は、糖リガンドであり、

Ｙは－Ｏ－（ＣＨ$_2$）$_{m11}$－ＮＨ－および－ＮＨ－ＣＯ－（ＣＨ$_2$）$_{m12}$－ＮＨ－であり、ｍ１１およびｍ１２は、それぞれ独立して、１～１０の整数であり、

Ｒ３は、水素原子、ｔ－ブトキシカルボニル基、ベンジルオキシカルボニル基、９－フルオレニルメチルオキシカルボニル基、－ＣＯ－Ｒ４、－ＣＯ－（ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｏ）$_{n2}$－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－Ｎ$_3$、または－ＣＯ－Ｑ９－Ｂ５－（Ｑ１０－Ｐ１０）$_{q8}$－Ｘ１であり、

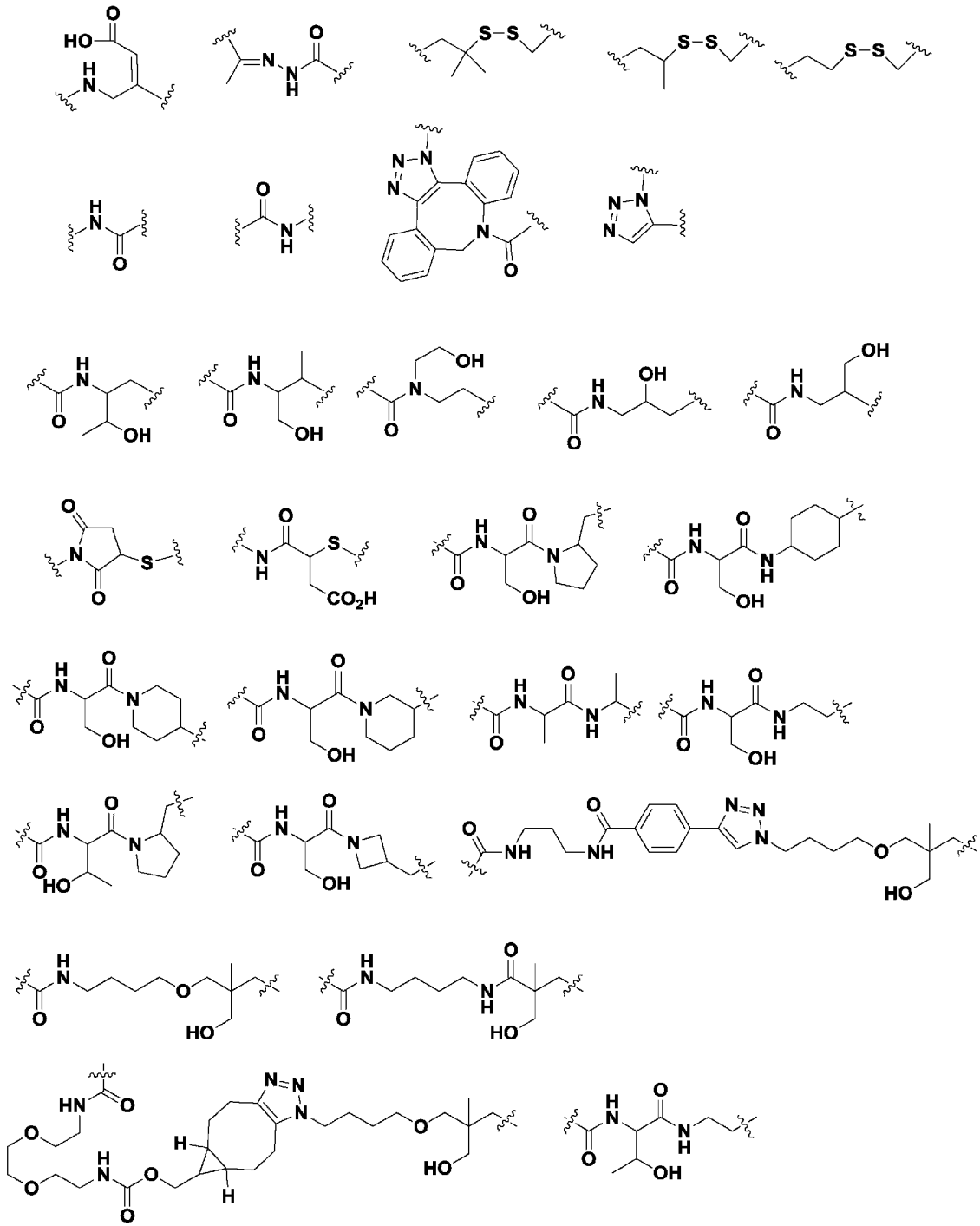
Ｐ１０は、存在しないか、または、－ＣＯ－、－ＮＨ－、－Ｏ－、－Ｓ－、－Ｏ－ＣＯ－、－Ｓ－ＣＯ－、－ＮＨ－ＣＯ－、－ＣＯ－Ｏ－、－ＣＯ－Ｓ－もしくは－ＣＯ－ＮＨ－であり、ｎ２は０～９９の整数であり、

Ｑ９およびＱ１０は、それぞれ独立して、存在しないか、または、置換もしくは無置換の炭素数１～１２のアルキレンまたは－（ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｏ）$_{n3}$－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－であり、ｎ３は０～９９の整数であり、

Ｂ５は、下記式８－２で表されるいずれかの構造であり、破線において、それぞれ、Ｑ９およびＱ１０との結合手を意味し、

式８－２：

[化54]



ｑ８は、０～１０の整数であり、

Ｘ１は、水素原子または固相担体であり、

Ｒ４は、ｔ－ブトキシカルボニル基、ベンジルオキシカルボニル基、９－フルオレニルメチルオキシカルボニル基で置換もしくは無置換のアミノ基、カルボキシ基、マレイミド基、およびアラルキルオキシカルボニル基からな

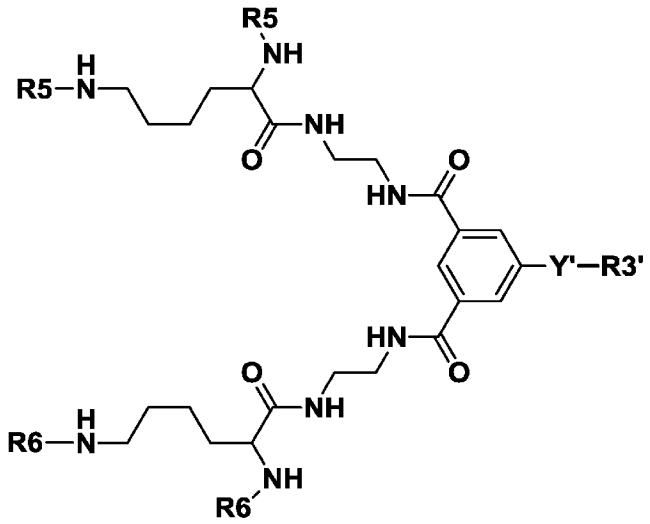
る群から選択される１または２個の置換基で置換された炭素数２～１０のアルキル基である。）

（２１）

下記式９で表される化合物。

式９：

[化55]



（式９中、

Ｒ５およびＲ６は、それぞれ独立して、水素原子、ｔ－ブトキシカルボニル基、ベンジルオキシカルボニル基、９－フルオレニルメチルオキシカルボニル基、－ＣＯ－Ｒ４’、または－ＣＯ－Ｑ１１－（Ｐ１１－Ｑ１１’）$_{q9}$－Ｔ４－Ｌ４であり、

Ｐ１１およびＴ４は、それぞれ独立して、存在しないか、または、－ＣＯ－、－ＮＨ－、－Ｏ－、－Ｓ－、－Ｏ－ＣＯ－、－Ｓ－ＣＯ－、－ＮＨ－ＣＯ－、－ＣＯ－Ｏ－、－ＣＯ－Ｓ－もしくは－ＣＯ－ＮＨ－であり、

Ｑ１１およびＱ１１’は、存在しないか、または、置換もしくは無置換の炭素数１～１２のアルキレンまたは－（ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｏ）$_{n4}$－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－であり、ｎ４は０～９９の整数であり、

ｑ９は、０～１０の整数であり、

Ｌ４は、糖リガンドであり、

Ｙ’は－Ｏ－（ＣＨ$_2$）$_{m11'}$－ＮＨ－および－ＮＨ－ＣＯ－（ＣＨ$_2$）$_{m12'}$

－ＮＨ－であり、ｍ１１’およびｍ１２’は、それぞれ独立して、１～１０の整数であり、

Ｒ３’は、水素原子、ｔ－ブトキシカルボニル基、ベンジルオキシカルボニル基、９－フルオレニルメチルオキシカルボニル基、－ＣＯ－Ｒ４’、－ＣＯ－（CH_2CH_2O）$_{n2'}$－CH_2CH_2－N_3、または－ＣＯ－Ｑ９’－Ｂ５’－（Ｑ１０’－Ｐ１０’）$_{q8'}$－Ｘ１’であり、ｎ２’は０～９９の整数であり、

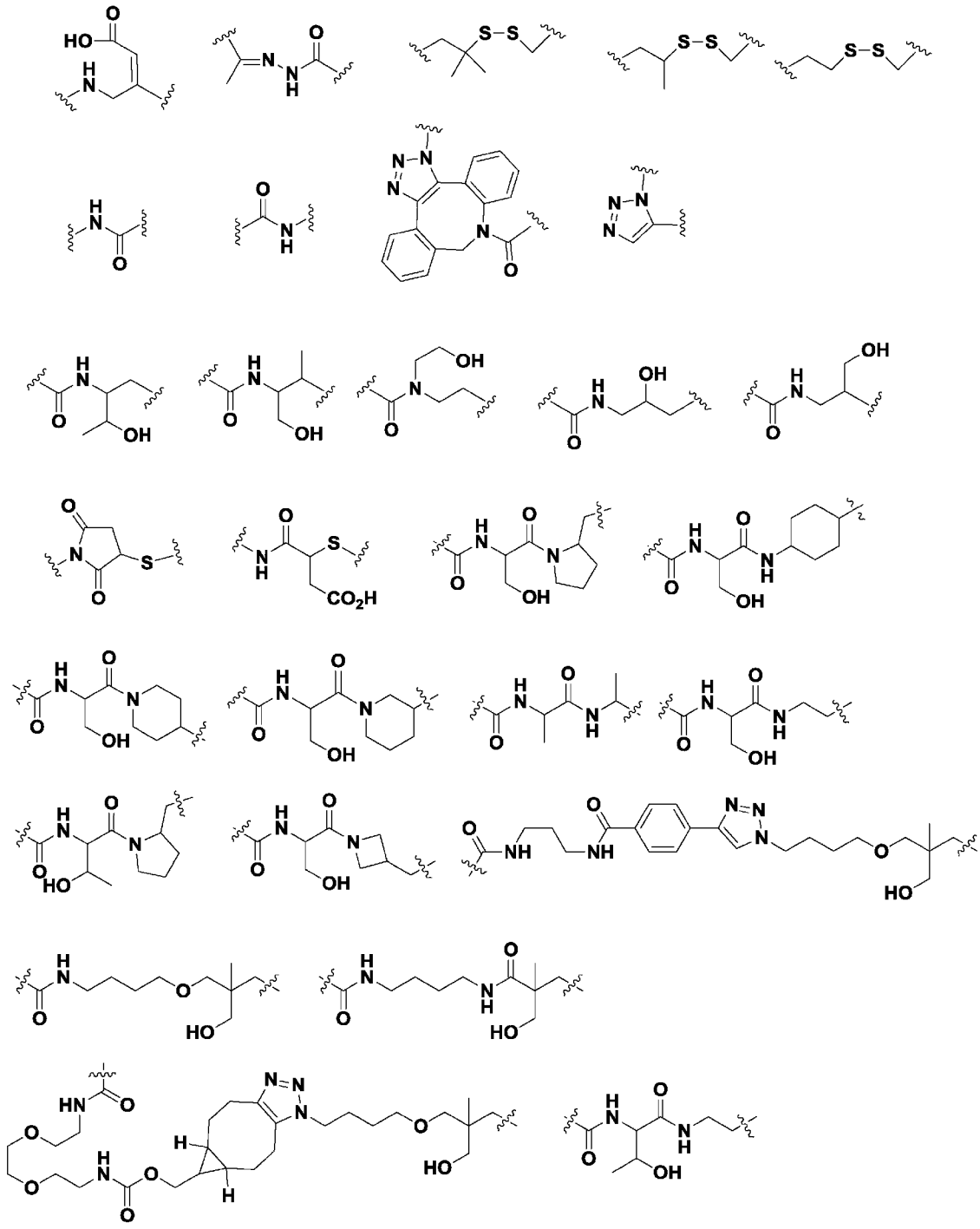
Ｐ１０’は、存在しないか、または、－ＣＯ－、－ＮＨ－、－Ｏ－、－Ｓ－、－Ｏ－ＣＯ－、－Ｓ－ＣＯ－、－ＮＨ－ＣＯ－、－ＣＯ－Ｏ－、－ＣＯ－Ｓ－もしくは－ＣＯ－ＮＨ－であり、

Ｑ９’およびＱ１０’は、それぞれ独立して、存在しないか、または、置換もしくは無置換の炭素数１～１２のアルキレンまたは－（CH_2CH_2O）$_{n3'}$－CH_2CH_2－であり、ｎ３’は０～９９の整数であり、

Ｂ５’は、下記式９－１で表されるいずれかの構造であり、破線において、それぞれ、Ｑ９’およびＱ１０’との結合手を意味し、

式９－１：

[化56]



ｑ８’は、０～１０の整数であり、

Ｘ１’は、水素原子または固相担体であり、

Ｒ４’は、ｔ－ブトキシカルボニル基、ベンジルオキシカルボニル基、９－フルオレニルメチルオキシカルボニル基で置換もしくは無置換のアミノ基、カルボキシ基、マレイミド基、およびアラルキルオキシカルボニル基から

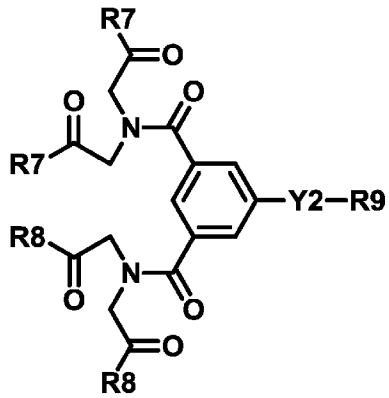
なる群から選択される１または２個の置換基で置換された炭素数２～１０のアルキル基である。）

（２２）

下記式１０で表される化合物。

式１０：

[化57]



（式１０中、

Ｒ７およびＲ８は、それぞれ独立して、ヒドロキシ基、ｔ－ブトキシ基、ベンジルオキシ基、－ＮＨ－Ｒ１０、または－ＮＨ－Ｑ１２－（Ｐ１２－Ｑ１２’）$_{q10}$－Ｔ５－Ｌ５であり、

Ｐ１２およびＴ５は、それぞれ独立して、存在しないか、または、－ＣＯ－、－ＮＨ－、－Ｏ－、－Ｓ－、－Ｏ－ＣＯ－、－Ｓ－ＣＯ－、－ＮＨ－ＣＯ－、－ＣＯ－Ｏ－、－ＣＯ－Ｓ－もしくは－ＣＯ－ＮＨ－であり、

Ｑ１２およびＱ１２‘は、存在しないか、または、置換もしくは無置換の炭素数１～１２のアルキレンまたは－（ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｏ）$_{n5}$－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－であり、ｎ５は０～９９の整数であり、

Ｌ５は、糖リガンドであり、

Ｙ２は－Ｏ－（ＣＨ$_2$）$_{m13}$－ＮＨ－および－ＮＨ－ＣＯ－（ＣＨ$_2$）$_{m14}$－ＮＨ－であり、ｍ１３およびｍ１４は、それぞれ独立して、１～１０の整数であり、

ｑ１０は、０～１０の整数であり、

Ｒ９は、水素原子、ｔ－ブトキシカルボニル基、ベンジルオキシカルボニ

ル基、９－フルオレニルメチルオキシカルボニル基、－ＣＯ－Ｒ１０、－ＣＯ－（CH_2CH_2O）$_{n6}$－CH_2CH_2－N_3、または－ＣＯ－Ｑ１３－Ｂ６－（Ｑ１４－Ｐ１３）$_{q11}$－Ｘ２であり、ｎ６は０～９９の整数であり、

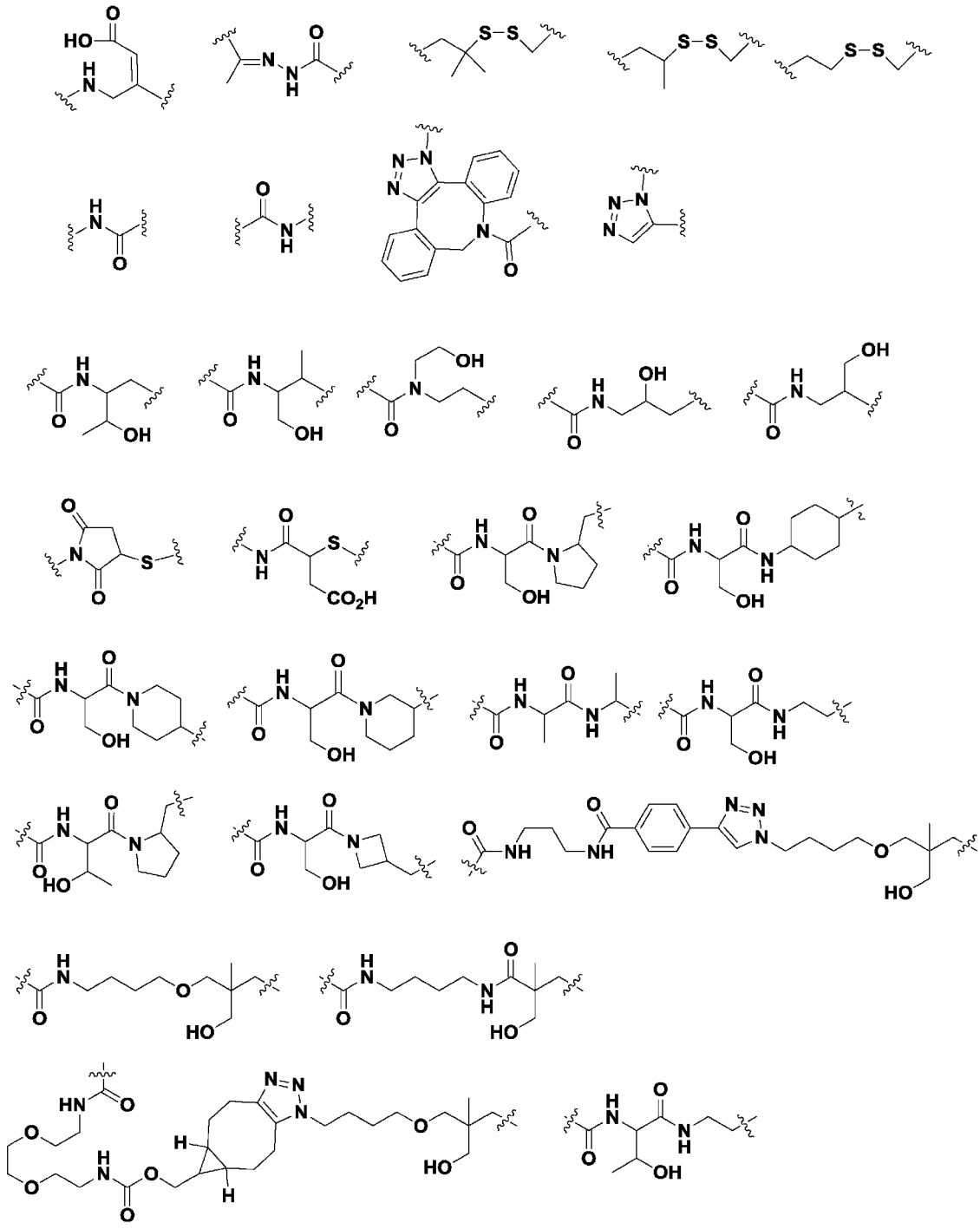
Ｐ１０は、存在しないか、または、－ＣＯ－、－ＮＨ－、－Ｏ－、－Ｓ－、－Ｏ－ＣＯ－、－Ｓ－ＣＯ－、－ＮＨ－ＣＯ－、－ＣＯ－Ｏ－、－ＣＯ－Ｓ－もしくは－ＣＯ－ＮＨ－であり、

Ｑ１３およびＱ１４は、それぞれ独立して、存在しないか、または、置換もしくは無置換の炭素数１～１２のアルキレンまたは－（CH_2CH_2O）$_{n7}$－CH_2CH_2－であり、ｎ７は０～９９の整数であり、

Ｂ６は、下記式１０－１で表されるいずれかの構造であり、破線において、それぞれ、Ｑ１３およびＱ１４との結合手を意味し、

式１０－１：

[化58]



ｑ１１は、０～１０の整数であり、

Ｘ２は、水素原子または固相担体であり、

Ｒ１０は、ｔ－ブトキシカルボニル基、ベンジルオキシカルボニル基、９－フルオレニルメチルオキシカルボニル基で置換もしくは無置換のアミノ基、カルボキシ基、マレイミド基、およびアラルキルオキシカルボニル基から

なる群から選択される１または２個の置換基で置換された炭素数２～１０のアルキル基である。）

発明の効果

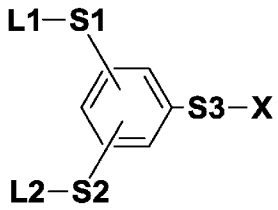
[0009] 例えば本発明の核酸複合体を含む医薬組成物を、哺乳動物に投与して、生体内において、各種関連疾患を治療することができる。

発明を実施するための形態

[0010] 本発明の核酸複合体は、下記式１で表される核酸複合体である。

式１：

[化59]



式１中、

Ｘは、オリゴヌクレオチドであり、

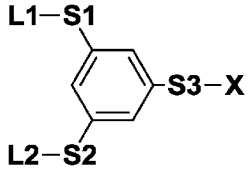
Ｌ１およびＬ２は、それぞれ独立して、糖リガンドであり、

Ｓ１、Ｓ２およびＳ３は、それぞれ独立して、リンカーである。

[0011] 本発明において、Ｓ１およびＳ２は、Ｓ３のベンゼン環上の置換位置に対して、それぞれオルト位、メタ位、パラ位でベンゼン環と結合し得るが、下記式１－１で表される核酸複合体であることが好適である。式１におけるＳ１およびＳ２のベンゼン環への結合手は、ベンゼン環上のＳ３の置換位置以外で任意の位置であり得ることを意味する。

式１－１：

[化60]



式１－１中、

Ｘ、Ｌ１、Ｌ２、Ｓ１、Ｓ２およびＳ３は、それぞれ前記と同義である。

本明細書において、前記と同義とは、式１－１中を例示して説明すると、式１－１中のＸ、Ｌ１、Ｌ２、Ｓ１およびＳ２それぞれについて、式１において前記するＸ、Ｌ１、Ｌ２、Ｓ１およびＳ２それぞれについての定義と同様の基であり得ることを意味している。

[0012] 本発明において、Ｘは、オリゴヌクレオチドであり、核酸医薬として用いることが知られたオリゴヌクレオチドを用いることができる。本発明において、核酸医薬とは、アプタマー、アンチセンス、デコイ核酸、リボザイム、ｓｉＲＮＡ、ｍｉＲＮＡおよびａｎｔｉｍｉＲＮＡ等として用いられるヌクレオチドを意味する。

本発明においては、Ｓ３とオリゴヌクレオチドは、ヌクレオチドを構成する糖部分の３’位または５’位を介してＳ３と結合するだけでなく、ヌクレオチドを構成する塩基部分を介してＳ３と結合していてもよい。本発明においては、オリゴヌクレオチドは、Ｓ３とオリゴヌクレオチドを結合する構造を有する基として理解されてよく、例えば、オリゴヌクレオチドが、－Ｏ－Ｐ（Ｚ）（Ｚ’）Ｏ－（式中、ＺおよびＺ’は、それぞれ独立して、酸素原子またはイオウ原子である。）を介してＳ３と結合している場合、Ｘとしてのオリゴヌクレオチドとしては、－Ｏ－Ｐ（Ｚ）（Ｚ’）Ｏ－オリゴヌクレオチドとして理解されてもよい。

また、オリゴヌクレオチドは、一本鎖または二本鎖のオリゴヌクレオチドであってもよい。

Ｓ３のリンカーとＸのオリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの３’末端または５’末端で結合する。オリゴヌクレオチドが二本鎖である場合には、Ｓ３のリンカーは、二本鎖核酸を構成するセンス鎖の３’末端または５’末端と結合していることが好ましいが、当該結合に限定されるものではない。

本発明において、標的ｍＲＮＡに対して相補的な塩基配列を含む核酸をアンチセンスヌクレオチドと称し、アンチセンスヌクレオチドの塩基配列に対

して相補的な塩基配列を含む核酸をセンスヌクレオチドとも称する。

[0013] 本発明で用いられる核酸複合体を構成するオリゴヌクレオチドは、哺乳動物細胞に導入された場合、標的遺伝子の発現を制御する能力を有するものであればいかなる形状でもよく、一本鎖のオリゴヌクレオチドまたは二本鎖のオリゴヌクレオチドが好適に用いられる。

[0014] オリゴヌクレオチドとしては、ヌクレオチドまたはヌクレオチドと同等の機能を有する分子の重合体であればいかなる分子であってもよく、例えばデオキシリボヌクレオチドの重合体であるＤＮＡ、リボヌクレオチドの重合体であるＲＮＡ、ＤＮＡとＲＮＡの重合体であるキメラ核酸が挙げられる。また、ＤＮＡ、ＲＮＡおよびキメラ核酸において、少なくとも一つのデオキシリボヌクレオチドやリボヌクレオチド等のヌクレオチドがヌクレオチドと同等の機能を有する分子で置換されたヌクレオチド重合体であってもよい。なお、ＲＮＡ中のウラシル（Ｕ）は、ＤＮＡにおいてはチミン（Ｔ）に一義的に読み替えられる。

ヌクレオチドと同等の機能を有する分子としては、例えば、ヌクレオチドに修飾を施したヌクレオチド誘導体等が挙げられ、例えばＤＮＡまたはＲＮＡと比較して、ヌクレアーゼ耐性の向上もしくは安定化させるため、相補鎖核酸とのアフィニティーを上げるため、細胞透過性を上げるため、または可視化させるために、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドに修飾を施した分子等が好適に用いられる。

[0015] ヌクレオチド誘導体としては、例えば糖部修飾ヌクレオチド、リン酸ジエステル結合修飾ヌクレオチド、塩基修飾ヌクレオチド等、糖部、リン酸ジエステル結合および塩基の少なくとも一つが修飾されたヌクレオチド等が挙げられる。

糖部修飾ヌクレオチドとしては、ヌクレオチドの糖の化学構造の一部あるいは全てに対し、任意の置換基で修飾もしくは置換したもの、または任意の原子で置換したものであればいかなるものでもよいが、２’－修飾ヌクレオチドが好ましく用いられる。

2’－修飾ヌクレオチドとしては、例えばリボースの2’－ＯＨ基がＯＲ、Ｒ、Ｒ’ＯＲ、ＳＨ、ＳＲ、NH_2、ＮＨＲ、NR_2、N_3、ＣＮ、Ｆ、ＣＩ、Ｂｒおよびｌからなる群（Ｒはアルキルまたはアリール、好ましくは炭素数１～６のアルキルであり、Ｒ’はアルキレン、好ましくは炭素数１～６のアルキレンである）から選択される置換基で置換された2’－修飾ヌクレオチドが挙げられ、2’－修飾としては、好ましくはＦ、メトキシ基およびエトキシ基での置換が挙げられる。また、２－（ｍｅｔｈｏｘｙ）ｅｔｈｏｘｙ基、３－ａｍｉｎｏｐｒｏｐｏｘｙ基、２－［（Ｎ，Ｎ－ｄｉｍｅｔｈｙｌａｍｉｎｏ）ｏｘｙ］ｅｔｈｏｘｙ基、３－（Ｎ，Ｎ－ｄｉｍｅｔｈｙｌａｍｉｎｏ）ｐｒｏｐｏｘｙ基、２－［２－（Ｎ，Ｎ－Ｄｉｍｅｔｈｙｌａｍｉｎｏ）ｅｔｈｏｘｙ］ｅｔｈｏｘｙ基、２－（ｍｅｔｈｙｌａｍｉｎｏ）－２－ｏｘｏｅｔｈｏｘｙ基、２－（Ｎ－ｍｅｔｈｙｌｃａｒｂａｍｏｙｌ）ｅｔｈｏｘｙ基および２－ｃｙａｎｏｅｔｈｏｘｙ　基からなる群から選択される置換基で置換された2’－修飾ヌクレオチド等も挙げられる。

また、糖部修飾ヌクレオチドとしては、糖部に架橋構造を導入することにより２つの環状構造を有する架橋構造型人工核酸（Ｂｒｉｄｇｅｄ　Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄ）（ＢＮＡ）も好適に用いられる。具体的には、2’位の酸素原子と４’位の炭素原子がメチレンを介して架橋したロックト人工核酸（Ｌｏｃｋｅｄ　Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄ）（ＬＮＡ）［Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ　Ｌｅｔｔｅｒｓ，　３８，　８７３５　（１９９７）およびＴｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ，　５４，　３６０７　（１９９８）］、エチレン架橋構造型人工核酸（Ｅｔｈｙｌｅｎｅ　ｂｒｉｄｇｅｄ　ｎｕｃｌｅｉｃ　ａｃｉｄ）（ＥＮＡ）［Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，　３２，　ｅ１７５　（２００４）］、Ｃｏｎｓｔｒａｉｎｅｄ　Ｅｔｈｙｌ　（ｃＥｔ）［Ｔｈｅ　Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｏｒｇａｎｉｃ　Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　７５，　１５６９　（２０１０）］、Ａｍｉｄｏ－Ｂｒｉｄｇｅｄ　Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄ　（ＡｍＮＡ）［Ｃｈｅｍ　Ｂｉｏ　Ｃｈｅｍ　１３，　２５１３　（２０１２）］および2’－Ｏ，４’－Ｃ－Ｓ

ｐｉｒｏｃｙｃｌｏｐｒｏｐｙｌｅｎｅ ｂｒｉｄｇｅｄ ｎｕｃｌｅｉｃ ａｃｉｄ （ｓｃｐＢＮＡ）［Ｃｈｅｍ． Ｃｏｍｍｕｎ．， ５１， ９７３７ （２０１５）］等が挙げられる。

さらにペプチド核酸（ＰＮＡ）［Ａｃｃ． Ｃｈｅｍ． Ｒｅｓ．， ３２， ６２４ （１９９９）］、オキシペプチド核酸（ＯＰＮＡ）［Ｊ． Ａｍ． Ｃｈｅｍ． Ｓｏｃ．， １２３， ４６５３ （２００１）］、ペプチドリボ核酸（ＰＲＮＡ）［Ｊ． Ａｍ． Ｃｈｅｍ． Ｓｏｃ．， １２２， ６９００ （２０００）］等も糖部修飾ヌクレオチドとして挙げられる。

リン酸ジエステル結合修飾ヌクレオチドとしては、ヌクレオチドのリン酸ジエステル結合の化学構造の一部あるいは全てに対し、任意の置換基で修飾もしくは置換したもの、または任意の原子で置換したものであればいかなるものでもよく、例えば、リン酸ジエステル結合がホスホロチオエート結合に置換されたヌクレオチド、リン酸ジエステル結合がホスホロジチオエート結合に置換されたヌクレオチド、リン酸ジエステル結合がアルキルホスホネート結合に置換されたヌクレオチド、リン酸ジエステル結合がホスホロアミデート結合に置換されたヌクレオチド等が挙げられ、好ましくはリン酸ジエステル結合がホスホロチオエート結合に置換されたヌクレオチドが挙げられる。

塩基修飾ヌクレオチドとしては、ヌクレオチドの塩基の化学構造の一部あるいは全てに対し、任意の置換基で修飾もしくは置換したもの、または任意の原子で置換したものであればいかなるものでもよく、例えば、塩基内の酸素原子が硫黄原子で置換されたもの、水素原子が炭素数１～６のアルキル基、ハロゲン基で置換されたもの、メチル基が水素原子、ヒドロキシメチル基、炭素数２～６のアルキル基で置換されたもの、アミノ基が炭素数１～６のアルキル基、炭素数１～６のアルカノイル基、オキソ基、ヒドロキシ基等に置換されたものが挙げられる。なお、シトシン（Ｃ）の代わりに５－メチルシトシン（５－ｍＣ）を塩基修飾ヌクレオチドとして用いることも、本発明

の好ましい形態の一つである。

ヌクレオチド誘導体としては、ヌクレオチドまたは糖部、リン酸ジエステル結合もしくは塩基の少なくとも一つが修飾されたヌクレオチド誘導体に、ペプチド、蛋白質、糖、脂質、リン脂質、フェナジン、フォレート、フェナントリジン、アントラキノン、アクリジン、フルオレセイン、ローダミン、クマリン、色素等、別の化学物質を、直接またはリンカーを介して付加したものもあげられ、具体的には、５’－ポリアミン付加ヌクレオチド誘導体、コレステロール付加ヌクレオチド誘導体、ステロイド付加ヌクレオチド誘導体、胆汁酸付加ヌクレオチド誘導体、ビタミン付加ヌクレオチド誘導体、Ｃｙ５付加ヌクレオチド誘導体、Ｃｙ３付加ヌクレオチド誘導体、６－ＦＡＭ付加ヌクレオチド誘導体、およびビオチン付加ヌクレオチド誘導体等が挙げられる。

ヌクレオチド誘導体は、核酸内の他のヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体とアルキレン構造、ペプチド構造、ヌクレオチド構造、エーテル構造、エステル構造、およびこれらの少なくとも一つを組み合わせた構造等の架橋構造を形成してもよい。

オリゴヌクレオチドは、その分子中の一部あるいは全部の原子が質量数の異なる原子（同位体）で置換されたものも包含する。

[0016] 本明細書において「相補」とは、例えば、アデニンとチミンまたはウラシルとの関係、並びにグアニンとシトシンとの関係のように、緩やかな水素結合を介して2つの塩基間で塩基対合をし得る関係を意味する。

本明細書において「相補的」とは、２つのヌクレオチド配列が完全に相補する場合だけでなく、ヌクレオチド配列間で０～３０％、０～２０％または０～１０％のミスマッチ塩基を有することができ、例えば、標的ｍＲＮＡに対して相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドは、標的ｍＲＮＡの部分塩基配列と完全に相補する塩基配列において、１つまたは複数の塩基の置換を含んでよいことを意味する。具体的には、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、標的遺伝子の標的配列に対して１～８個、好ましくは１～６個、１～４

個、１～３個、特に２個または１個のミスマッチ塩基を有していてもよい。

また、「相補的」とは、一方のヌクレオチド配列が、他方のヌクレオチド配列と完全に相補する塩基配列において、１つまたは複数の塩基が付加および／または欠失した配列である場合を包含する。例えば、標的ｍＲＮＡとアンチセンスオリゴヌクレオチドとは、アンチセンスオリゴヌクレオチドにおける塩基の付加および／または欠失により、アンチセンス鎖および／または標的ｍＲＮＡ領域に１個または２個のバルジ塩基を有してもよい。

ただし、以下、「相補的」と記載する箇所において、「相補」の意味も包含する形で記載する。

[0017] 本発明で用いられるアンチセンスオリゴヌクレオチドとは、標的遺伝子をコードするＤＮＡ、標的遺伝子をコードするＤＮＡから転写されるｍＲＮＡ前駆体、ｍＲＮＡ、ｍｉｃｒｏＲＮＡ前駆体またはｍｉｃｒｏＲＮＡに対して相補的なオリゴヌクレオチドであり、当該アンチセンスオリゴヌクレオチドが標的とするＤＮＡ、ｍＲＮＡ前駆体またはｍＲＮＡと二本鎖を形成することによりＤＮＡ、ｍＲＮＡ前駆体、ｍＲＮＡ、ｍｉｃｒｏＲＮＡ前駆体またはｍｉｃｒｏＲＮＡの働きを抑制する。

アンチセンスオリゴヌクレオチドには、標的となるＤＮＡ、ｍＲＮＡ前駆体、ｍＲＮＡ、ｍｉｃｒｏＲＮＡ前駆体またはｍｉｃｒｏＲＮＡと完全に相補的であるもののみならず、ＤＮＡ、ｍＲＮＡ前駆体、ｍＲＮＡ、ｍｉｃｒｏＲＮＡ前駆体またはｍｉｃｒｏＲＮＡとストリジェントな条件でハイブリダイズできる限り、１もしくは数個のミスマッチが存在するものも含まれる。

アンチセンスオリゴヌクレオチドとは、標的遺伝子にハイブリダイズする核酸であれば、ヘアピンオリゴマー、環状オリゴマーの形態中に導入されてもよく、内部または末端のバルジまたはループ等の構造要素を含有してもよい。

[0018] アンチセンスオリゴヌクレオチドの長さは、８～８０塩基であり、８～３０塩基が好ましい。例えば、８～２０塩基、１０～２０塩基、１３～２０塩

基、１３～１６塩基、１３塩基、１４塩基、１５塩基、１６塩基、１７塩基、１８塩基、１９塩基、２０塩基であり得る。

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、細胞内に導入されると、相補的なｍＲＮＡ前駆体またはｍＲＮＡと結合し蛋白質に翻訳されるのを立体的に阻害して、標的遺伝子の発現を抑制することができる。

またアンチセンスオリゴヌクレオチドは、細胞内において、相補的なｍｉｃｒｏＲＮＡ前駆体またはｍｉｃｒｏＲＮＡと結合し、ｍｉｃｒｏＲＮＡの機能を立体的に阻害することもできる。

またアンチセンスオリゴヌクレオチドは、細胞内において、相補的なｍＲＮＡ及びｍＲＮＡ前駆体と結合し、ｍＲＮＡ及びｍＲＮＡ前駆体を切断することもある。このような例として、ＲＮＡとＤＮＡの二重鎖のＲＮＡ鎖を切断するエンドヌクレアーゼであるＲＮａｓｅＨを介した作用が知られている。本発明の細胞内のアンチセンスオリゴヌクレオチドがｍＲＮＡ及びｍＲＮＡ前駆体と二重鎖を形成するとＲＮａｓｅＨに認識され、相補的なｍＲＮＡ鎖を酵素的に分解することができる。

ＲＮａｓｅＨによるｍＲＮＡ及びｍＲＮＡ前駆体の切断を誘導するには、４～８０個の連続したＤＮＡ領域を持つアンチセンスオリゴヌクレオチドが好ましい。この場合、アンチセンスオリゴヌクレオチドは０～８０％の糖部修飾ヌクレオチドを持つことが好ましく、１０～６０％がより好ましく、２０～５０％がさらに好ましい。また、糖部修飾ヌクレオチドを持つ場合の連続したＤＮＡ領域は、４～２０個がより好ましく、４～１５個がさらに好ましく、５～１０個が最も好ましい。更に、アンチセンスオリゴヌクレオチドにおける糖部修飾ヌクレオチドの位置は、５’末端近傍および／または３’末端近傍に配置することが好ましく、５’端から全長の長さの２５％以内の位置および／または３’端から全長の長さの２５％以内の位置に配置することがより好ましい。

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、相補的なオリゴ核酸と二重鎖を形成させ、二重鎖核酸として細胞内に導入することで標的遺伝子の発現抑制を誘

導することもできる（国際公開第２００５／１１３５７１号を参照）。この場合の二重鎖核酸をリガンドで修飾する位置は、相補的なオリゴ核酸の５’末端または３’末端が好ましい。

[0019] 本発明で用いられるアンチセンスオリゴヌクレオチドは、標的遺伝子のプロモーター配列等に対して相補的な塩基配列を用いることで、標的遺伝子の発現を亢進させることもできる（国際公開第２０１３／１７３６０１号および国際公開第２０１３／１７３６３７号を参照）。

[0020] アンチセンスオリゴヌクレオチドを製造する方法としては、特に限定されず、公知の化学合成を用いる方法、あるいは、酵素的転写法等が挙げられる。公知の化学合成を用いる方法として、ホスホロアミダイト法、ホスホロチオエート法、ホスホトリエステル法、ＣＥＭ法［Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，　３５，　３２８７　（２００７）］等を挙げることができ、例えば、ＡＢＩ３９００ハイスループット核酸合成機（アプライドバイオシステムズ社製)により合成することができる。合成が終了した後は、固相からの脱離、保護基の脱保護および目的物の精製等を行う。精製により、純度９０％以上、好ましくは９５％以上のアンチセンスオリゴヌクレオチドを得るのが望ましい。本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドを製造する酵素的転写法としては、目的の塩基配列を有したプラスミドまたはＤＮＡを鋳型としてファージＲＮＡポリメラーゼ、例えば、Ｔ７、Ｔ３、またはＳＰ６ＲＮＡポリメラーゼを用いた転写による方法が挙げられる。

[0021] 本発明で用いられる二本鎖のオリゴヌクレオチドは、標的ｍＲＮＡの一部の塩基配列に対して相補的な塩基配列を含む核酸および／または該核酸の塩基配列に対して相補的な塩基配列を含む核酸であれば、いずれのオリゴヌクレオチドまたはその誘導体から構成されていてもよい。

本発明で用いられる二本鎖のオリゴヌクレオチドは、標的ｍＲＮＡ配列に対して相補的な塩基配列を含む核酸と、該核酸の塩基配列に対して相補的な塩基配列を含む核酸とが、二重鎖を形成することができればいずれの長さでもよいが、二重鎖を形成できる配列の長さは、通常１１～３５塩基であり、

１５～３０塩基が好ましく、１７～２５塩基がより好ましく、１７～２３塩基がさらに好ましく、１９～２３塩基が特に好ましい。

本発明で用いられる、標的タンパク質の発現を抑制する二本鎖のオリゴヌクレオチドとしては、標的ｍＲＮＡ配列に対して相補的な塩基配列を含む核酸であって、かつ標的タンパク質の発現を抑制する一本鎖核酸、もしくは標的ｍＲＮＡ配列に対して相補的な塩基配列を含む核酸と、該核酸の塩基配列に対して相補的な塩基配列を含む核酸とからなり、かつ標的タンパク質の発現を抑制する二本鎖核酸が好適に用いられる。

[0022] 二本鎖のオリゴヌクレオチドは、標的遺伝子のプロモーター配列等に相補的な塩基配列を含む核酸と、該核酸の塩基配列に対して相補的な塩基配列を含む核酸とからなる分子を用いることで、標的遺伝子の発現を亢進させることもできる［Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，４１，１００８６（２０１３）、Ｈｅｐａｔｏｌｏｇｙ，５９，２１６（２０１４）］。

[0023] 二本鎖のオリゴヌクレオチドとは、二本のオリゴヌクレオチドが対合し二重鎖領域を有するヌクレオチドをいう。二重鎖領域とは、二本鎖を構成するヌクレオチドまたはその誘導体が塩基対を構成して二重鎖を形成している部分をいう。二重鎖領域は、通常１１～２７塩基対であり、１５～２５塩基対が好ましく、１５～２３塩基対がより好ましく、１７～２１塩基対がさらに好ましい。

二本鎖のオリゴヌクレオチドを構成する一本鎖のオリゴヌクレオチドは、通常１１～３０塩基からなるが、１５～２９塩基からなることが好ましく、１５～２７塩基からなることがより好ましく、１５～２５塩基からなることがさらに好ましく、１７～２３塩基からなることが特に好ましい。

[0024] 二本鎖のオリゴヌクレオチドにおいて、二重鎖領域に続く３’側または５’側に二重鎖を形成しない追加のヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体を有する場合には、これを突出部（オーバーハング）と呼ぶ。突出部を有する場合には、突出部を構成するヌクレオチドはリボヌクレオチド、デオキシリ

ボヌクレオチドまたはこれらの誘導体であってもよい。

突出部を有する二本鎖のオリゴヌクレオチドとしては、少なくとも一方の鎖の３’末端または５’末端に１～６塩基、通常は１～３塩基からなる突出部を有するものが用いられるが、２塩基からなる突出部を有するものが好ましく用いられ、例えばｄＴｄＴまたはＵＵからなる突出部を有するものが挙げられる。突出部は、アンチセンスオリゴヌクレオチドのみ、センスオリゴヌクレオチドのみ、およびアンチセンスオリゴヌクレオチドとセンスオリゴヌクレオチドの両方に有することができるが、アンチセンスオリゴヌクレオチドに突出部を有する二本鎖のオリゴヌクレオチドが好ましく用いられる。なお、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、二重鎖領域とそれに続く突出部とを含む。

[0025] 二本鎖のオリゴヌクレオチドとしては、標的遺伝子の塩基配列またはその相補鎖の塩基配列と同一の配列からなる核酸を用いてもよいが、該核酸の少なくとも一方の鎖の５’末端または３’末端が１～４塩基削除された核酸と、該核酸の塩基配列に対して相補的な塩基配列を含む核酸とからなる二本鎖核酸を用いてもよい。

二本鎖のオリゴヌクレオチドは、ＲＮＡ同士が二重鎖を形成した二本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）、ＤＮＡ同士が二重鎖を形成した二本鎖ＤＮＡ（ｄｓＤＮＡ）、またはＲＮＡとＤＮＡが二重鎖を形成したハイブリッド核酸であってもよい。あるいは、二本鎖のうちの一方もしくは両方の鎖がＤＮＡとＲＮＡとのキメラ核酸であってもよい。好ましくは二本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）である。

アンチセンスオリゴヌクレオチドの５’末端から２番目のヌクレオチドは、標的ｍＲＮＡ配列の３’末端から２番目のデオキシリボヌクレオチドと相補であることが好ましく、アンチセンスオリゴヌクレオチドの５’末端から２～７番目のヌクレオチドが、標的ｍＲＮＡ配列の３’末端から２～７番目のデオキシリボヌクレオチドと完全に相補であることがより好ましく、アンチセンスオリゴヌクレオチドの５’末端から２～１１番目のヌクレオチドが

、標的ｍＲＮＡ配列の３’末端から２～１１番目のデオキシリボヌクレオチドと完全に相補であることがさらに好ましい。また、アンチセンスオリゴヌクレオチドの５’末端から１１番目のヌクレオチドが、標的ｍＲＮＡ配列の３’末端から１１番目のデオキシリボヌクレオチドと相補であることが好ましく、アンチセンスオリゴヌクレオチドの５’末端から９～１３番目のヌクレオチドが、標的ｍＲＮＡ配列の３’末端から９～１３番目のデオキシリボヌクレオチドと完全に相補であることがより好ましく、アンチセンスオリゴヌクレオチドの５’末端から７～１５番目のヌクレオチドが、標的ｍＲＮＡ配列の３’末端から７～１５番目のデオキシリボヌクレオチドと完全に相補であることがさらに好ましい。

[0026] 二本鎖核酸領域内のヌクレオチドに対して、修飾ヌクレオチドは、５０～１００％含まれることが好ましく、７０～１００％含まれることがより好ましく、９０～１００％含まれることがさらに好ましい。

[0027] 二本鎖のオリゴヌクレオチドは化学的に合成することができ、一般に固相オリゴヌクレオチド合成法を使用することによって合成することができる（たとえば、Ｕｓｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．，米国特許第５，８０４，６８３号明細書；米国特許第５，８３１，０７１号明細書；米国特許第５，９９８，２０３号明細書；米国特許第６，１１７，６５７号明細書；米国特許第６，３５３，０９８号明細書；米国特許第６，３６２，３２３号明細書；米国特許第６，４３７，１１７号明細書；米国特許第６，４６９，１５８号明細書；Ｓｃａｒｉｎｇｅ　ｅｔ　ａｌ．，米国特許第６，１１１，０８６号明細書；米国特許第６，００８，４００号明細書；米国特許第６，１１１，０８６号明細書を参照）。

ＲＮＡは、酵素的または部分／全有機合成によって生成してもよく、また修飾されたリボヌクレオチドは、インビトロで酵素的または有機合成によって導入することができる。一つの態様において、それぞれの鎖は、化学的に調製される。ＲＮＡ分子を化学的に合成する方法は、当該技術分野において公知である［Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，　３２，

９３６　（１９９８）を参照］。

[0028] 本発明で用いられるＲＮＡとしては、標的遺伝子のｍＲＮＡの連続する１５～３０塩基、好ましくは１７～２５塩基、より好ましくは１９～２３塩基の配列（以下、配列Ｘとする）および配列Ｘと相補的な塩基の配列（以下、相補的配列Ｘ’とする）を含んでいるＲＮＡがあげられ、例えば、配列Ｘを含むセンスオリゴヌクレオチドおよび相補的配列Ｘ’を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドからなる二本鎖ＲＮＡ、該センスオリゴヌクレオチドと該アンチセンスオリゴヌクレオチドとが、スペーサーオリゴヌクレオチドでつながれたヘアピン構造を有するＲＮＡが挙げられる。

配列Ｘを含むセンスオリゴヌクレオチドとしては、塩基として配列Ｘのみを含んでいるＲＮＡ（以下、配列Ｘ鎖とする）、配列Ｘ鎖の３’端もしくは５’端または両端に１～６個、好ましくは２～４個のヌクレオチドが同一または異なって付加されたＲＮＡが挙げられる。

相補的配列Ｘ’を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドとしては、塩基として相補的配列Ｘ’のみを含んでいるＲＮＡ（以下、相補的配列Ｘ’鎖とする）、相補的配列Ｘ’鎖の３’端もしくは５’端または両端に１～６個、好ましくは２～４個のヌクレオチドが同一または異なって付加された、二本鎖ＲＮＡ等が挙げられる。

[0029] 配列Ｘを含むセンスオリゴヌクレオチドと相補的配列Ｘ’を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドとが、スペーサーオリゴヌクレオチドでつながれたヘアピン構造を有するＲＮＡのスペーサーオリゴヌクレオチドとしては、６～１２塩基のヌクレオチドが好ましく、その５’端の配列は２個のＵであるのが好ましい。スペーサーオリゴヌクレオチドの例として、ＵＵＣＡＡＧＡＧＡの塩基配列からなるオリゴヌクレオチドが挙げられる。スペーサーオリゴヌクレオチドによってつながれる２つのＲＮＡの順番はどちらが５’側になってもよく、配列Ｘを含むセンス鎖が５’側になることが好ましい。

配列Ｘ鎖および相補的配列Ｘ’鎖に付加されるヌクレオチド、ならびにスペーサーオリゴヌクレオチドの塩基は、グアニン、アデニン、シトシン、チ

ミンおよびウラシルのいずれか１種または複数種でもよく、またそれぞれの塩基に結合する糖が、リボース、デオキシリボースまたは２’位の水酸基が修飾基で置換されたリボースのいずれでもよいが、付加されるヌクレオチドとしては、ウリジル酸（Ｕ）およびデオキシチミジル酸（ｄＴ）のいずれか１種または２種がより好ましい。また、配列Ｘ鎖の３’端に付加されるヌクレオチドの塩基の配列を、標的遺伝子のｍＲＮＡ内で配列Ｘと隣接するヌクレオチドの塩基の配列と同じ塩基配列としてもよい。また、相補的配列Ｘ’鎖の３’端に付加されるヌクレオチドの塩基の配列を、標的遺伝子のｍＲＮＡ内で配列Ｘと隣接するヌクレオチドの塩基の配列と相補的な塩基配列としてもよい。

[0030] 本発明で用いられるＲＮＡのより好ましい例としては、例えば、（ａ）配列Ｘを含むセンスオリゴヌクレオチドおよび相補的配列Ｘ’を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドからなる二本鎖ＲＮＡであり、配列Ｘが標的遺伝子のｍＲＮＡの連続する１９～２１塩基の配列であって、センスオリゴヌクレオチドが配列Ｘ鎖および配列Ｘ鎖の３’端に２～４個の同一または異なって付加されたヌクレオチドからなり、アンチセンスオリゴヌクレオチドが相補的配列Ｘ’鎖および相補的配列Ｘ’鎖の３’端に２～４個の同一または異なって付加されたヌクレオチドからなる二本鎖ＲＮＡ、（ｂ）配列Ｘを含むセンスオリゴヌクレオチドおよび相補的配列Ｘ’を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドからなる二本鎖ＲＮＡであり、配列Ｘが標的遺伝子のｍＲＮＡの連続する２３～２５塩基の配列であって、センスオリゴヌクレオチドが配列Ｘ鎖であり、アンチセンスオリゴヌクレオチドが相補的配列Ｘ’鎖である二本鎖ＲＮＡ、（ｃ）配列Ｘを含むセンスオリゴヌクレオチドおよび相補的配列Ｘ’を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドからなる二本鎖ＲＮＡであり、配列Ｘが標的遺伝子のｍＲＮＡの連続する２３～２７塩基の配列であって、センスオリゴヌクレオチドが配列Ｘ鎖および配列Ｘ鎖の３’端に２～４個の同一または異なって付加されたヌクレオチドからなり、アンチセンスオリゴヌクレオチドが相補的配列Ｘ’鎖および相補的配列Ｘ’鎖の３’端に２～

４個の同一または異なって付加されたヌクレオチドからなり、相補的配列Ｘ’鎖の３’端に付加されるヌクレオチドの塩基の配列が、標的遺伝子のｍＲＮＡ内で配列Ｘと隣接するヌクレオチドの塩基の配列と相補的な塩基配列である、二本鎖ＲＮＡ等が挙げられる。

また、本発明で用いられるＲＮＡとしては、好ましくはＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）を利用した該標的遺伝子の発現抑制作用を有するＲＮＡが挙げられる。

[0031] 一本鎖のオリゴヌクレオチドは、固相ホスホロアミダイト法［Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，３０，２４３５（１９９３）を参照］を使用して合成され、脱保護され、およびＮＡＰ－５カラム（Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｐｈａｒｍａｃｉａ Ｂｉｏｔｅｃｈ、Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ、ＮＪ）上で脱塩される。オリゴマーは、１５分工程のリニア勾配を使用するＡｍｅｒｓｈａｍ Ｓｏｕｒｃｅ １５Ｑカラム－１．０ｃｍ。高さ．２５ ｃｍ（Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｐｈａｒｍａｃｉａ Ｂｉｏｔｅｃｈ、Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ、ＮＪ）でのイオン交換高性能液体クロマトグラフィー（ＩＥ－ＨＰＬＣ）を使用して精製する。勾配は、９０：１０の緩衝液Ａ：Ｂから５２：４８の緩衝液Ａ：Ｂに変化し、緩衝液Ａは１００ｍｍｏｌ／Ｌ Ｔｒｉｓ ｐＨ ８．５であり、および緩衝液Ｂは、１００ｍｍｏｌ／Ｌ Ｔｒｉｓ ｐＨ ８．５（１ｍｏｌ／ＬのＮａＣｌ）である。試料は、２６０ｎｍにてモニターされ、全長オリゴヌクレオチド種に対応するピークは、収集され、プールされ、ＮＡＰ－５カラムで脱塩され、および凍結乾燥される。

[0032] 各一本鎖のオリゴヌクレオチドの純度は、Ｂｅｃｋｍａｎ ＰＡＣＥ ５０００（Ｂｅｃｋｍａｎ Ｃｏｕｌｔｅｒ、Ｉｎｃ．， Ｆｕｌｌｅｒｔｏｎ， Ｃａｌｉｆ）でのキャピラリー電気泳動（ＣＥ）によって決定される。ＣＥキャピラリーは、１００μｍの内径を有し、ｓｓＤＮＡ １００Ｒ Ｇｅｌ（Ｂｅｃｋｍａｎ－Ｃｏｕｌｔｅｒ）を含む。典型的には、約０．６ｎｍｏｌｅのオリゴヌクレオチドをキャピラリーに注射して、４４４Ｖ／ｃ

ｍの電界において実行して、２６０ｎｍにおけるＵＶ吸光度によって検出される。変性トリス－ホウ酸－７ｍｏｌ／Ｌ－尿素泳動緩衝液は、Ｂｅｃｋｍａｎ－Ｃｏｕｌｔｅｒから購入する。以下に記述した実験に使用するための、ＣＥによって評価すると少なくとも９０％純粋である一本鎖のオリゴヌクレオチドが得られる。化合物同一性は、製造業者の推奨プロトコルにしたがって、Ｖｏｙａｇｅｒ　ＤＥ．ＴＭ．Ｂｉｏｓｐｅｃｔｏｍｅｔｒｙワークステーション（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ、Ｆｏｓｔｅｒ　Ｃｉｔｙ，、Ｃａｌｉｆ．）でのマトリックス支援レーザー脱離イオン化－飛行時間型（ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ）質量分光法によって検証される。一本鎖のオリゴヌクレオチドの相対的な分子質量は、予想される分子質量の０．２％以内で得ることができる。

一本鎖のオリゴヌクレオチドは、１００ｍｍｏｌ／Ｌ　酢酸カリウム、３０ｍｍｏｌ／Ｌ　ＨＥＰＥＳ、ｐＨ　７．５からなる緩衝液中に１００μｍｏｌ／Ｌ濃度にて再懸濁させる。相補的センス鎖およびアンチセンス鎖を同等のモル量で混合して、５０μｍｏｌ／Ｌ二本鎖のオリゴヌクレオチドの最終溶液を得る。試料を９５℃まで５分間加熱して、使用前に室温に冷却させる。二本鎖核酸は、－２０℃にて保存する。一本鎖のオリゴヌクレオチドは、凍結乾燥させるか、またはヌクレアーゼフリー水中に、－８０℃で貯蔵する。

[0033] Ｌ１およびＬ２は、それぞれ独立して、糖リガンドである。

本発明において、糖リガンドとしては、標的細胞に発現している受容体に結合可能な糖類（単糖、二糖、三糖および多糖等）に由来する基を意味する。本発明においては、糖リガンドがＯ－結合によりＳ１およびＳ２のリンカーに結合している場合には、糖リガンドを構成する糖類の結合に関与する水酸基を除いた部分が糖類に由来する基としての糖リガンドを意味する。

本発明においては、オリゴヌクレオチドの標的細胞となる糖リガンドを選択すればよい。

単糖としては、例えば、アロース、アルトース、アラビノース、クラジノ

ース、エリトロース、エリスルロース、フルクトース、Ｄ－フシトール、Ｌ－フシトール、フコサミン、フコース、フクロース、ガラクトサミン、Ｄ－ガラクトサミニトール、Ｎ－アセチル－ガラクトサミン、ガラクトース、グルコサミン、Ｎ－アセチル－グルコサミン、グルコサミニトール、グルコース、グルコース－６－リン酸、グロース、グリセルアルデヒド、Ｌ－グリセロ－Ｄ－マンノ－ヘプトース、グリセロール、グリセロン、グロース、イドース、リキソース、マンノサミン、マンノース、マンノース－６－リン酸、プシコース、キノボース、キノボサミン、ラムニトール、ラムノサミン、ラムノース、リボース、リブロース、セドヘプツロース、ソルボース、タガトース、タロース、酒石酸、トレオース、キシロース、およびキシルロース等が挙げられる。

二糖、三糖、多糖としては、例えば、アベクオース、アクラボース、アミセトース、アミロペクチン、アミロース、アピオース、アルカノース、アスカリロース、アスコルビン酸、ボイビノース、セロビオース、セロトリオース、セルロース、カコトリオース、カルコース、キチン、コリトース、シクロデキストリン、シマロース、デキストリン、２－デオキシリボース、２－デオキシグルコース、ジギノース、ジギタロース、ジギトキソース、エバロース、エベミトロース（ｅｖｅｍｉｔｒｏｓｅ）、フルクトオリゴ糖、ガルトオリゴ糖（ｇａｌｔｏ－ｏｌｉｇｏｓａｃｃｈａｒｉｄｅ）、ゲンチアノース、ゲンチオビオース、グルカン、グルコーゲン、グリコーゲン、ハマメロース、ヘパリン、イヌリン、イソレボグルコセノン、イソマルトース、イソマルトトリオース、イソパノース、コジビオース、ラクトース、ラクトサミン、ラクトースジアミン、ラミナラビオース、レボグルコサン、レボグルコセノン、β－マルトース、マルトリオース、マンナン－オリゴ糖、マンニノトリオース、メレチトース、メリビオース、ムラミン酸、ミカロース、ミシノース、ノイラミン酸、シアル酸含有糖鎖、ニゲロース、ノジリミシン、ノビオース、オレアンドロース、パノース、パラトース、プランテオース、プリメベロース、ラフィノース、ロジノース、ルチノース、サルメントース

、セドヘプツロース、セドヘプツロサン、ソラトリオース、ソホロース、スタキオース、ストレプトース、スクロース、α，α－トレハロース、トラハロサミン、ツラノース、チベロース、キシロビオース、ウンベリフェロース等が挙げられる。

[0034] 糖類における各単糖は、Ｄ体またはＬ体であってもよく、Ｄ体とＬ体の任意割合による混合物であってもよい。

糖類は、デオキシ糖（アルコールヒドロキシ基を水素原子に置換したもの）、アミノ糖（アルコールヒドロキシ基をアミノ基に置換したもの）、チオ糖（アルコールヒドロキシ基をチオールに置換したもの、またはＣ＝ＯをＣ＝Ｓに置換したもの、または環酸素を硫黄に置換したもの）、セレノ糖、テルロ糖、アザ糖（環炭素を窒素に置換したもの）、イミノ糖（環酸素を窒素に置換したもの）、ホスファノ糖（環酸素をリンに置換したもの）、ホスファ糖（環炭素をリンに置換したもの）、Ｃ－置換単糖（非末端炭素原子における水素原子を炭素原子で置換したもの）、不飽和単糖、アルジトール（カルボニル基をＣＨＯＨ基で置換したもの）、アルドン酸（アルデヒド基をカルボキシ基に置換したもの）、ケトアルドン酸、ウロン酸、アルダル酸等を含んでいてもよい。

アミノ糖としては、糖類におけるアミノ単糖として、ガラクトサミン、グルコサミン、マンノサミン、フコサミン、キノボサミン、ノイラミン酸、ムラミン酸、ラクトースジアミン、アコサミン、バシロサミン、ダウノサミン、デソサミン、フォロサミン、ガロサミン、カノサミン、カンソサミン（ｋａｎｓｏｓａｍｉｎｅ）、ミカミノース、ミコサミン、ペロサミン、プノイモサミン、プルプロサミン（ｐｕｒｐｕｒｏｓａｍｉｎｅ）、ロドサミン等が挙げられる。また、アミノ糖のアミノ基は、アセチル基等で置換されていてもよい。

シアル酸含有糖鎖としては、ＮｅｕＡｃを糖鎖非還元末端に含有する糖鎖が挙げられ、ＮｅｕＡｃ－Ｇａｌ－ＧｌｃＮＡｃを含有する糖鎖や、Ｎｅｕ５ＡｃαＧａｌβ（１－３）ＧｌｃＮＡｃ等が挙げられる。

糖類における各単糖は、標的細胞に発現している受容体に結合可能であることを限度として、置換基で置換されていてもよく、例えば、水酸基が置換されていてもよく、各単糖における水素原子がアジドおよび／または置換されていてもよいアリール基で１～複数置換されていてもよい。

[0035] 糖リガンドとしては、標的とする各臓器に対応して標的細胞の表面に発現する受容体に結合する糖リガンドを選択することが好ましく、例えば、標的細胞が肝細胞である場合、肝細胞表面に発現する受容体に対する糖リガンドが好ましく、アシアロ糖タンパク質受容体（ＡＳＧＰＲ）に対する糖リガンドがより好ましい。

[0036] ＡＳＧＰＲに対する糖リガンドとしては、マンノースまたはＮ－アセチルガラクトサミンが好ましく、Ｎ－アセチルガラクトサミンがより好ましい。

ＡＳＧＰＲに対してより親和性の高い糖リガンドとして、例えばＢｉｏｏｒｇａｎｉｃ Ｍｅｄｉｃｉｎａｌ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，１７，７２５４（２００９）、およびＪｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｓｏｃｉｅｔｙ，１３４，１９７８（２０１２）等に記載の糖誘導体が知られており、これらを用いてもよい。

[0037] 本発明において、Ｓ１、Ｓ２およびＳ３は、リンカーである。

Ｓ１とＳ２は、糖リガンドであるＬ１とＬ２と、ベンゼン環とを連結する構造であれば特に限定されるものではなく、核酸複合体において用いられる公知の構造を採用してもよい。Ｓ１とＳ２は、同一であってもよく、異なっていてもよい。

糖リガンドであるＬ１とＬ２は、Ｓ１およびＳ２とグリコシド結合により連結していることが好ましく、Ｓ１およびＳ２は、ベンゼン環と、例えば、－ＣＯ－、－ＮＨ－、－Ｏ－、－Ｓ－、－Ｏ－ＣＯ－、－Ｓ－ＣＯ－、－ＮＨ－ＣＯ－、－ＣＯ－Ｏ－、－ＣＯ－Ｓ－もしくは－ＣＯ－ＮＨ－結合によりそれぞれ連結していてもよい。

[0038] Ｓ３は、オリゴヌクレオチドであるＸと、ベンゼン環とを連結する構造であれば特に限定されるものではなく、核酸複合体において用いられる公知の

構造を採用してよい。

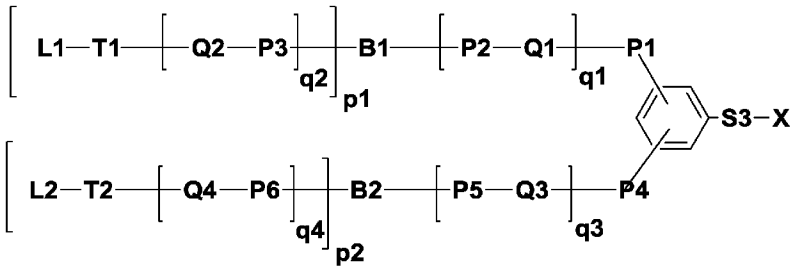
オリゴヌクレオチドであるXは、Ｓ３とホスホジエステル結合により連結していることが好ましく、Ｓ３は、ベンゼン環と、例えば、－ＣＯ－、－ＮＨ－、－Ｏ－、－Ｓ－、－Ｏ－ＣＯ－、－Ｓ－ＣＯ－、－ＮＨ－ＣＯ－、－ＣＯ－Ｏ－、－ＣＯ－Ｓ－もしくは－ＣＯ－ＮＨ－結合により連結していてもよい。

[0039] Ｓ１、Ｓ２およびＳ３のリンカーとしては、例えば、国際公開第２００９／０７３８０９号、国際公開第２０１３／０７５０３５号、国際公開第２０１５／１０５０８３号、国際公開第２０１４／１７９６２０号、国際公開第２０１５／００６７４０号に開示される構造を採用してもよい。

[0040] 本発明において、核酸複合体は、下記式２で表される構造を有する核酸複合体であることが好適である。

式２：

[化61]



式２中、

Ｘ、Ｌ１、Ｌ２およびＳ３は、それぞれ前記と同義であり、

Ｐ１、Ｐ２、Ｐ３、Ｐ４、Ｐ５およびＰ６、ならびにＴ１およびＴ２は、それぞれ独立して、存在しないか、または、－ＣＯ－、－ＮＨ－、－Ｏ－、－Ｓ－、－Ｏ－ＣＯ－、－Ｓ－ＣＯ－、－ＮＨ－ＣＯ－、－ＣＯ－Ｏ－、－ＣＯ－Ｓ－もしくは－ＣＯ－ＮＨ－であり、

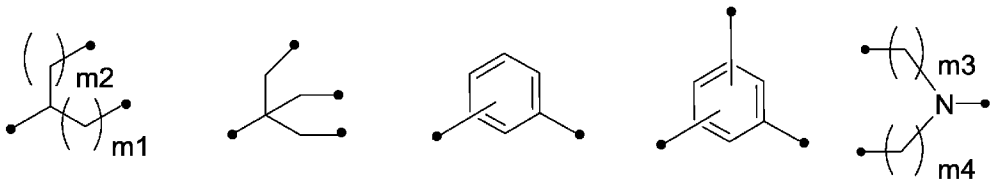
Ｑ１、Ｑ２、Ｑ３およびＱ４は、それぞれ独立して、存在しないか、または、置換もしくは無置換の炭素数１～１２のアルキレンまたは－（CH_2CH_2O）$_n$－CH_2CH_2－であり、ｎは０～９９の整数であり、

Ｂ１およびＢ２は、それぞれ独立して、結合手であるか、または、下記式

２－１で表されるいずれかの構造であり、各構造における末端の黒丸点は、それぞれ、Ｐ２またはＰ３あるいはＰ５またはＰ６との結合点であり、ｍ１、ｍ２、ｍ３およびｍ４は、それぞれ独立して、０～１０の整数であり、

式２－１：

[化62]



ｐ１およびｐ２は、それぞれ独立して、１、２または３の整数であり、

ｑ１、ｑ２、ｑ３およびｑ４は、それぞれ独立して、０～１０の整数であり、

ただし、ｐ１およびｐ２がそれぞれ２または３の整数であるとき、それぞれのＰ３およびＰ６、Ｑ２およびＱ４、Ｔ１およびＴ２ならびにＬ１およびＬ２は、同一または異なっていてもよい。

[0041] Ｐ１およびＰ４は、それぞれ独立して、存在しないか、または、－ＣＯ－、－ＮＨ－、－Ｏ－、－Ｓ－、－Ｏ－ＣＯ－、－Ｓ－ＣＯ－、－ＮＨ－ＣＯ－、－ＣＯ－Ｏ－、－ＣＯ－Ｓ－もしくは－ＣＯ－ＮＨ－であるが、－Ｏ－、－Ｏ－ＣＯ－、－ＮＨ－ＣＯ－または－ＣＯ－ＮＨ－であることが好ましく、－Ｏ－、－ＮＨ－ＣＯ－または－ＣＯ－ＮＨ－であることがより好ましく、－ＮＨ－ＣＯ－であることがさらに好ましい。

Ｐ１またはＰ４が、例えば、－ＮＨ－ＣＯ－である場合、－ＮＨ－ＣＯ－ベンゼン環という部分構造を有する。

[0042] Ｑ１、Ｑ２、Ｑ３およびＱ４は、それぞれ独立して、存在しないか、または、置換もしくは無置換の炭素数１～１２のアルキレンまたは－（CH_2CH_2O）$_n$－CH_2CH_2－であり、ｎは０～９９の整数であるが、置換もしくは無置換の炭素数１～１２のアルキレンであることが好ましく、無置換の炭素数１～１２のアルキレンであることがより好ましく、無置換の炭素数１～６のアルキレンであることがさらに好ましく、無置換の炭素数１～４のアルキ

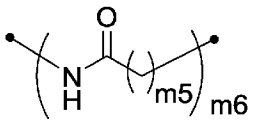
レンであることがよりさらに好ましい。

[0043] Ｐ２およびＰ５は、それぞれ独立して、存在しないか、または、－ＣＯ－、－ＮＨ－、－Ｏ－、－Ｓ－、－Ｏ－ＣＯ－、－Ｓ－ＣＯ－、－ＮＨ－ＣＯ－、－ＣＯ－Ｏ－、－ＣＯ－Ｓ－もしくは－ＣＯ－ＮＨ－であるが、存在しないか、－ＣＯ－Ｏ－または－ＣＯ－ＮＨ－であることが好ましく、存在しないか、－ＣＯ－ＮＨ－であることがより好ましい。Ｐ２およびＰ５が、例えば、－ＣＯ－ＮＨ－である場合、Ｂ１－ＣＯ－ＮＨ－Ｑ１およびＢ２－ＣＯ－ＮＨ－Ｑ３という部分構造を有する。

[0044] －（Ｐ２－Ｑ１）$_{q1}$－および－（Ｐ５－Ｑ３）$_{q3}$－がそれぞれ独立して、存在しないか、または下記式３－１～式３－３で表されるいずれかの構造であることが好適である。

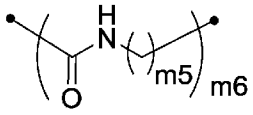
式３－１：

[化63]



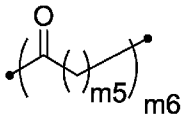
式３－２：

[化64]



式３－３：

[化65]



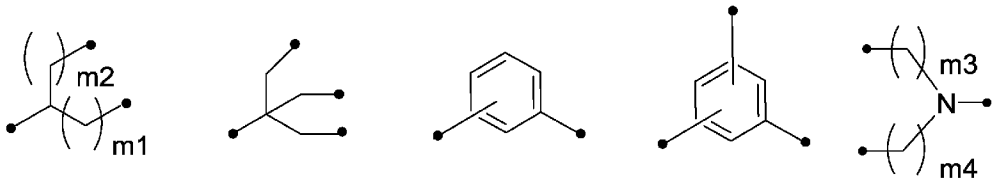
式３－１～３－３中、

ｍ５およびｍ６は、それぞれ独立して、０～１０の整数であり、式３－１～式３－３の構造における末端の黒丸点は、それぞれ、Ｂ１またはＢ２あるいはＰ１またはＰ４との結合点である。

[0045] Ｂ１およびＢ２は、それぞれ独立して、結合手であるか、または、下記式

で表されるいずれかの構造であり、各構造における末端の黒丸点は、それぞれ、Ｐ２またはＰ３あるいはＰ５またはＰ６との結合点であり、ｍ１、ｍ２、ｍ３およびｍ４は、それぞれ独立して、０～１０の整数である。

[化66]

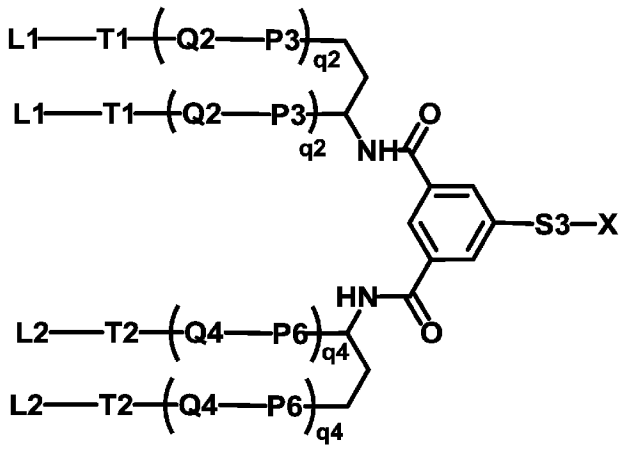


Ｂ１およびＢ２は、グルタミン酸、アスパラギン酸、リジン、イミノ二酢酸等の非天然アミノ酸を含むアミノ酸、または1，3－プロパンジオール等のアミノアルコールに由来する基であることが好ましく、Ｂ１およびＢ２がグルタミン酸およびアスパラギン酸に由来する基である場合、グルタミン酸およびアスパラギン酸のアミノ基がそれぞれ結合して、Ｐ２およびＰ５として、－ＮＨ－ＣＯ－結合であることが好ましく、Ｂ１およびＢ２がリジンに由来する基である場合、リジンのカルボキシル基がそれぞれ結合して、Ｐ２およびＰ５として、－ＣＯ－ＮＨ－結合であることが好ましく、Ｂ１およびＢ２がイミノ二酢酸に由来する基である場合、イミノ二酢酸のアミノ基がそれぞれ結合して、Ｐ２およびＰ５として、－ＣＯ－結合となることが好ましい。

[0046] 本発明において、核酸複合体は、下記式４－１～４－９で表される構造を有する核酸複合体であることが好適である。

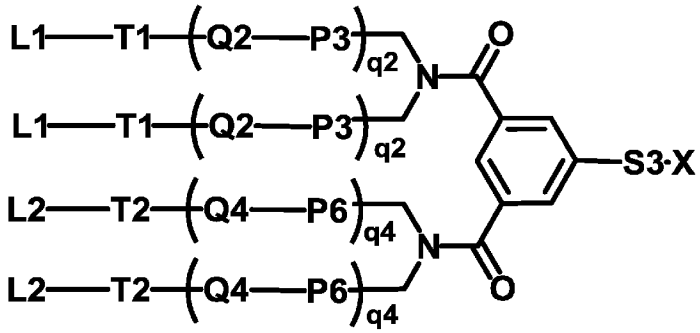
式４－１：

[化67]



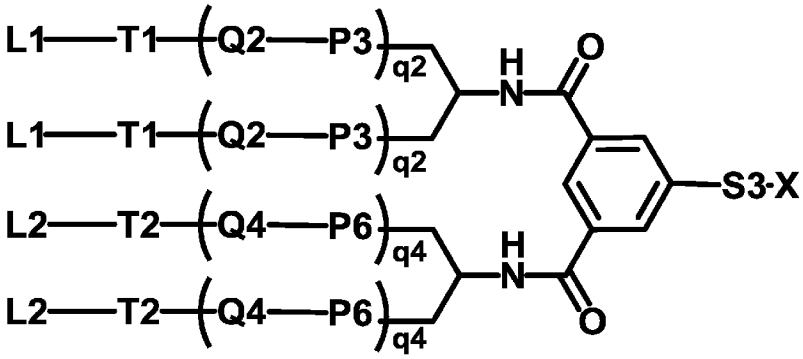
式４－２：

[化68]



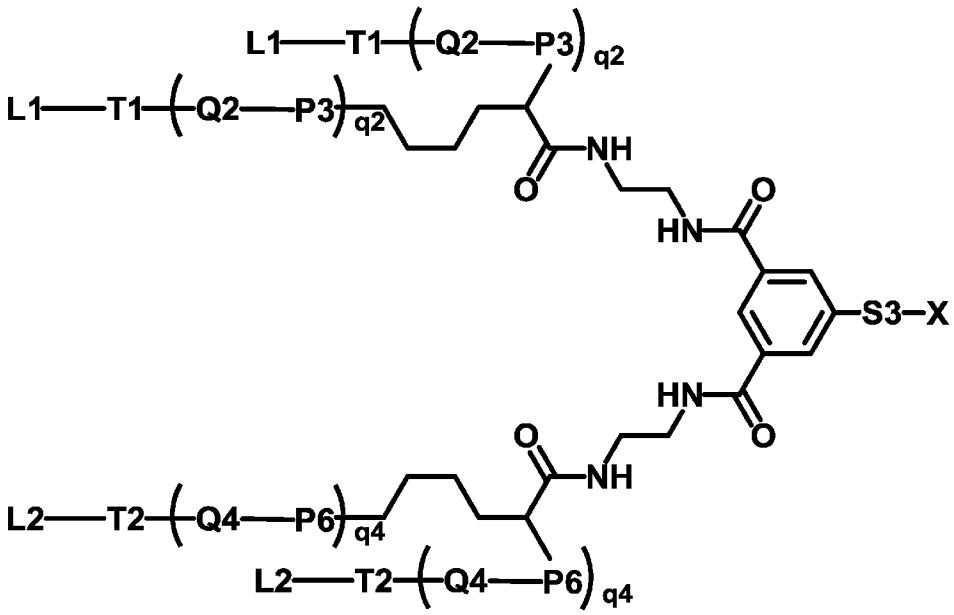
式４－３：

[化69]



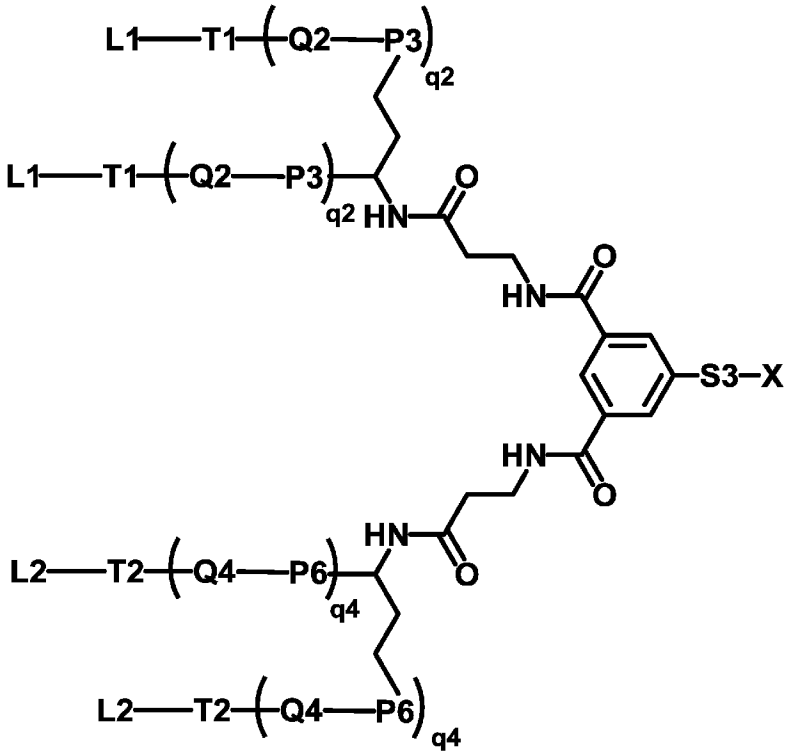
式４－４：

[化70]



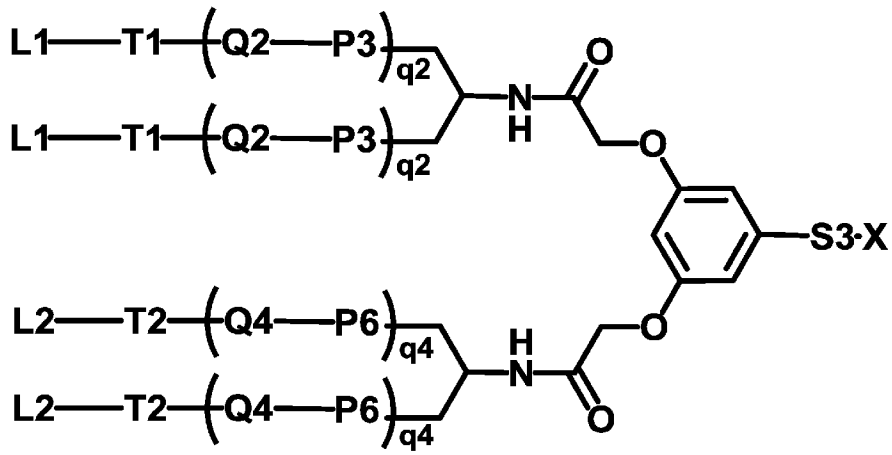
式４－５：

[化71]



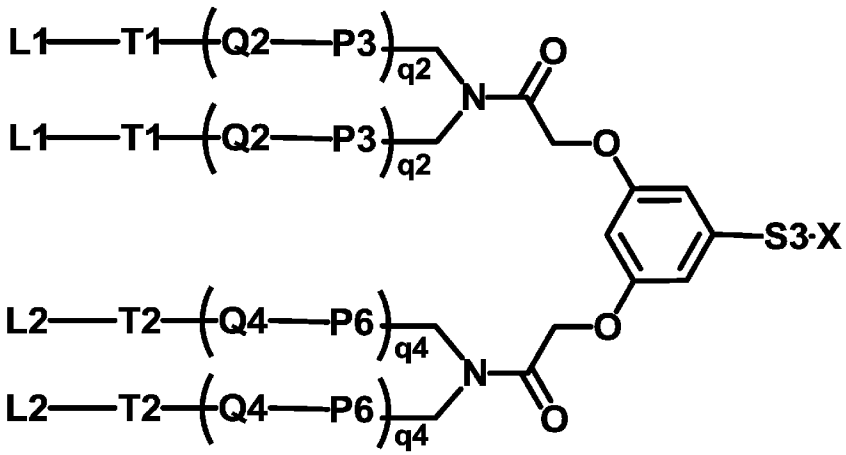
式４－６：

[化72]



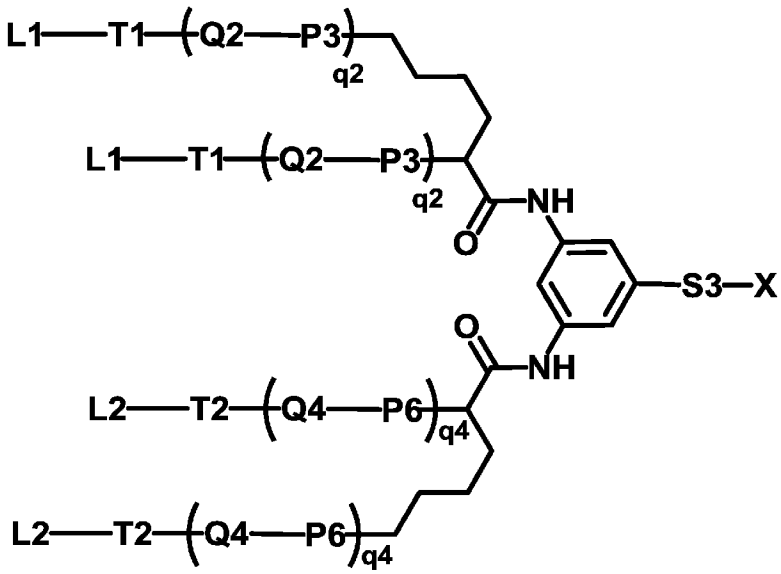
式４－７：

[化73]



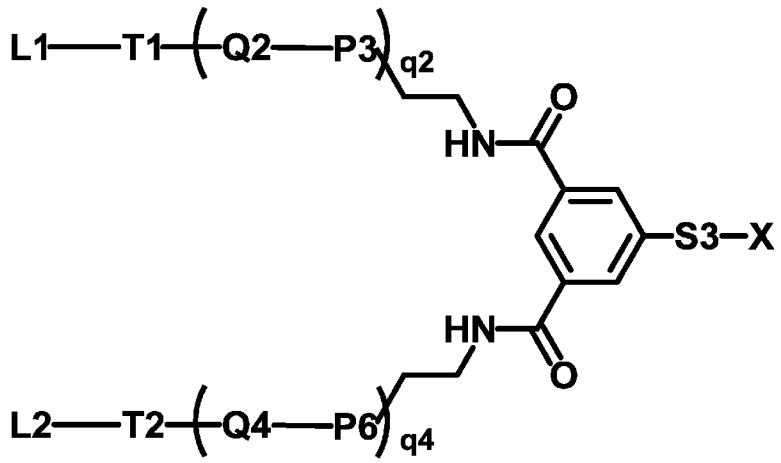
式４－８：

[化74]



式４－９：

[化75]



式４－１～４－９中、

Ｘ、Ｌ１、Ｌ２、Ｓ３、Ｐ３、Ｐ６、Ｔ１、Ｔ２、Ｑ２、Ｑ４、ｑ２およびｑ４はそれぞれ前記と同義である。

[0047] Ｐ３およびＰ６は、それぞれ独立して、存在しないか、または、－ＣＯ－、－ＮＨ－、－Ｏ－、－Ｓ－、－Ｏ－ＣＯ－、－Ｓ－ＣＯ－、－ＮＨ－ＣＯ－、－ＣＯ－Ｏ－、－ＣＯ－Ｓ－もしくは－ＣＯ－ＮＨ－であるが、－Ｏ－ＣＯ－または－ＮＨ－ＣＯ－であることが好ましく、－ＮＨ－ＣＯ－であることがより好ましい。Ｐ３およびＰ６が、例えば、－ＮＨ－ＣＯ－である場

合、それぞれ、Ｂ１－ＮＨ－ＣＯ－Ｑ２およびＢ２－ＮＨ－ＣＯ－Ｑ４という部分構造を有する。

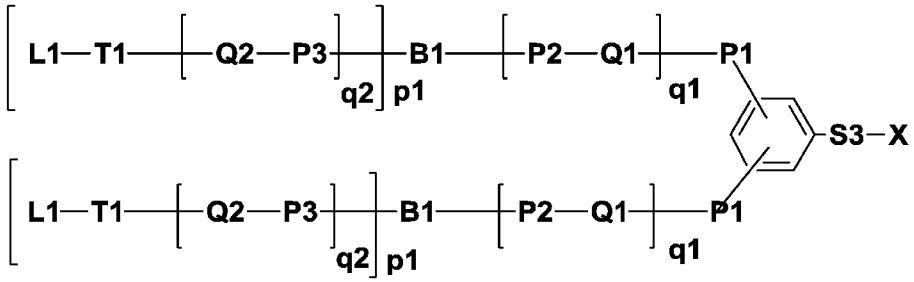
[0048] Ｔ１およびＴ２は、それぞれ独立して、存在しないか、または、－ＣＯ－、－ＮＨ－、－Ｏ－、－Ｓ－、－Ｏ－ＣＯ－、－Ｓ－ＣＯ－、－ＮＨ－ＣＯ－、－ＣＯ－Ｏ－、－ＣＯ－Ｓ－もしくは－ＣＯ－ＮＨ－であるが、－Ｏ－または－Ｓ－であることが好ましく、－Ｏ－であることがより好ましい。

[0049] 本発明において、核酸複合体は、下記式５で表される構造を有する核酸複合体であることが好適である。

式５では、式２におけるＰ１とＰ４、Ｐ２とＰ５、Ｐ３とＰ６、Ｑ１とＱ３、Ｑ２とＱ４、Ｂ１とＢ２、Ｔ１とＴ２、Ｌ１とＬ２、ｐ１とｐ２、ｑ１とｑ３ならびにｑ２とｑ４がそれぞれ同一である。

式５：

[化76]



式５中、

Ｘ、Ｓ３、Ｐ１、Ｐ２、Ｐ３、Ｑ１、Ｑ２、Ｂ１、Ｔ１、Ｌ１、ｐ１、ｑ１およびｑ２はそれぞれ前記と同義である。

また、式５におけるＸ、Ｓ３、Ｐ１、Ｐ２、Ｐ３、Ｑ１、Ｑ２、Ｂ１、Ｔ１、Ｌ１、ｐ１、ｑ１およびｑ２は、各々、上述した好適な基であって良いが、Ｐ１が－ＣＯ－ＮＨ－、－ＮＨ－ＣＯ－または－Ｏ－であることが好ましい。

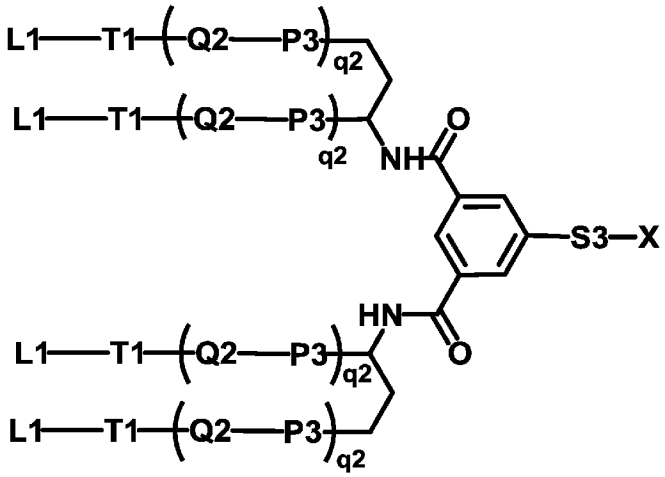
式５における－（Ｐ２－Ｑ１）$_{q1}$－は、存在しないか、または上記式３－１～式３－３で表されるいずれかの構造であることが好適である。

[0050] 本発明において、核酸複合体は、下記式６－１～６－９で表される構造を

有する核酸複合体であることが好適である。

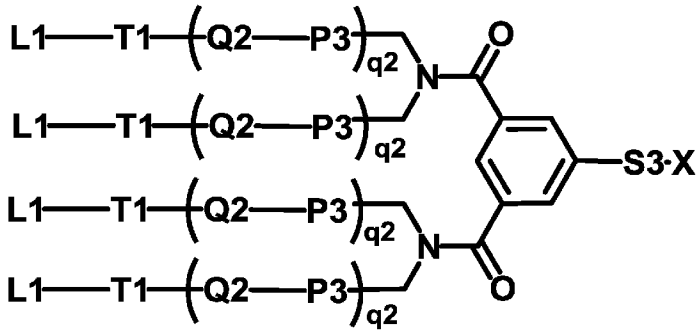
式６－１：

[化77]



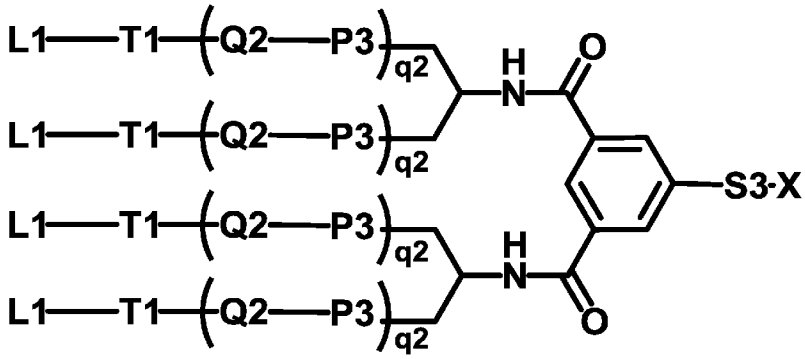
式６－２：

[化78]



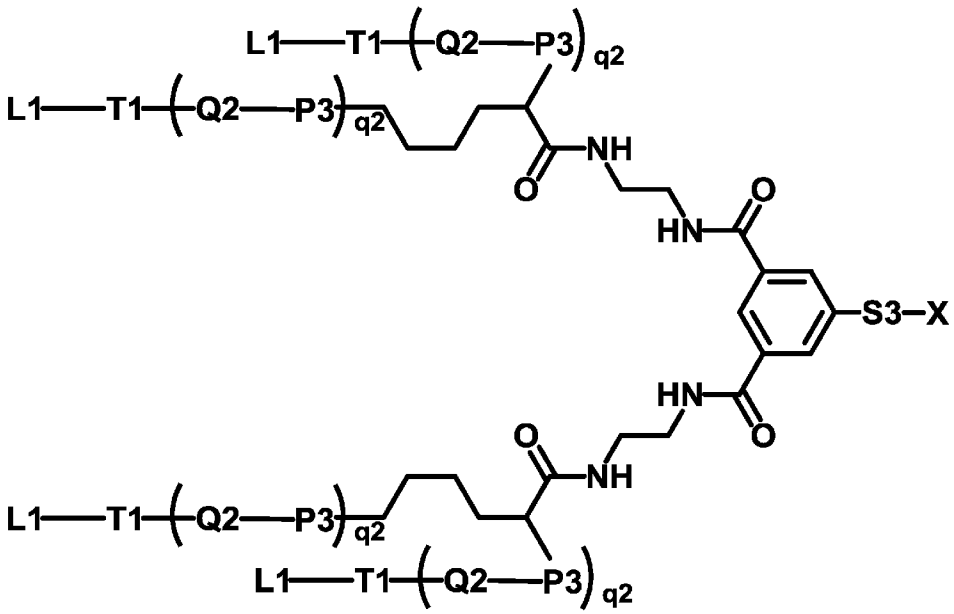
式６－３：

[化79]



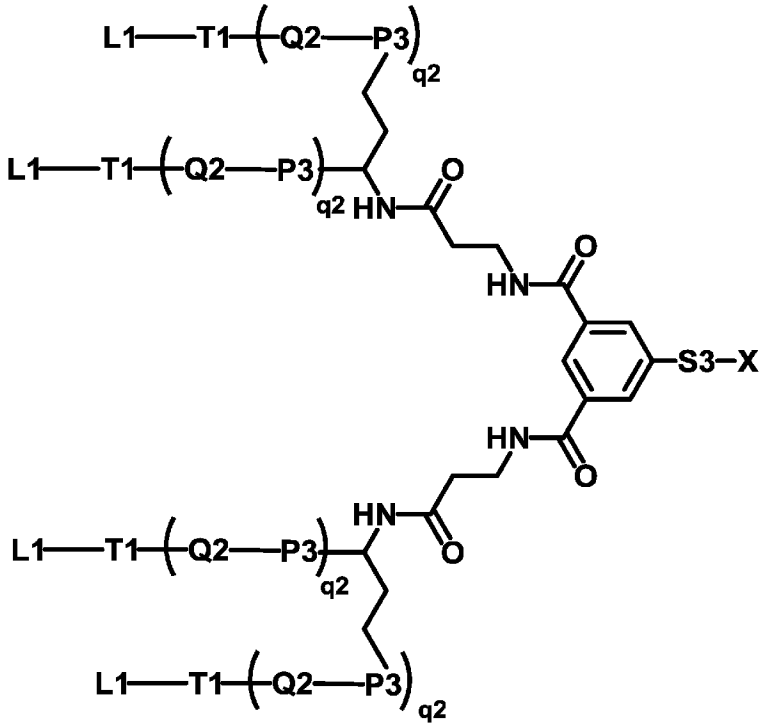
式６－４：

[化80]



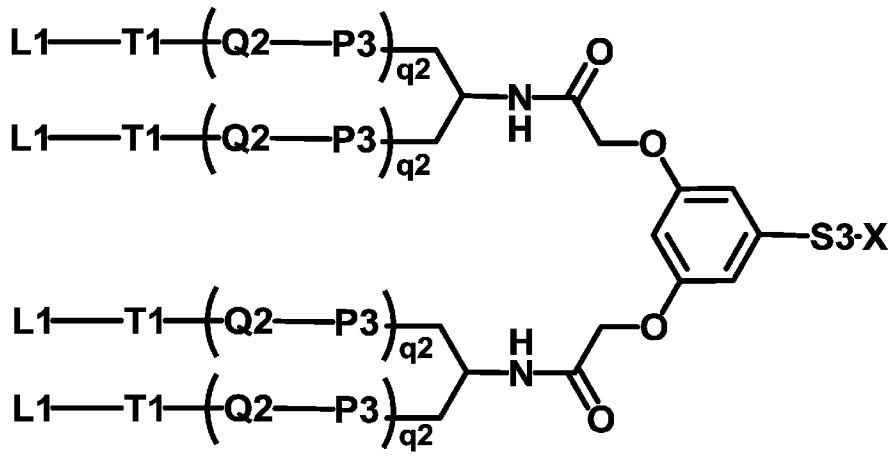
式６－５：

[化81]



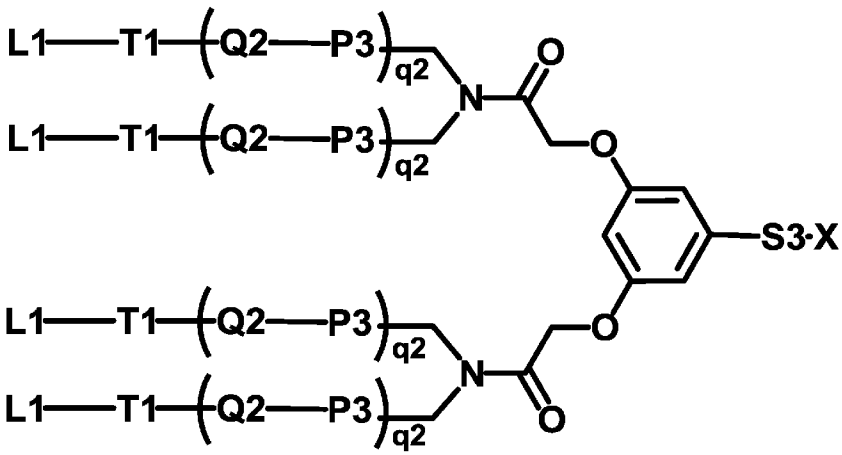
式６－６：

[化82]



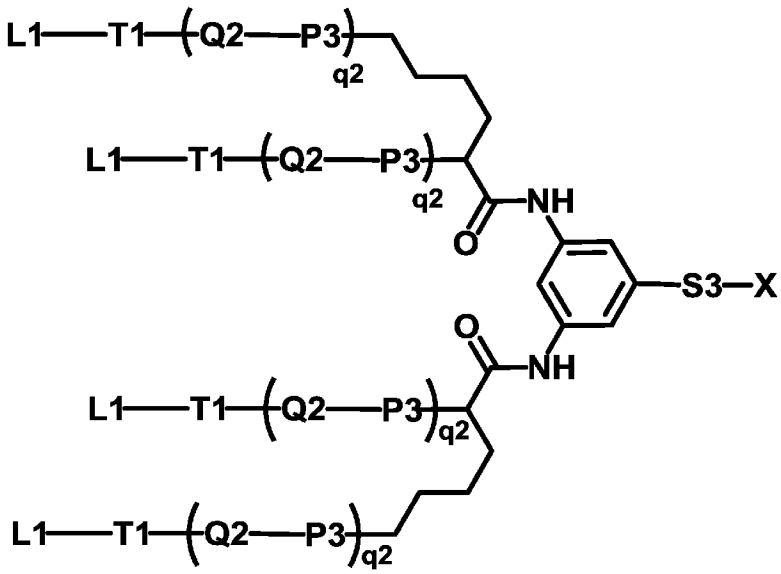
式６－７：

[化83]



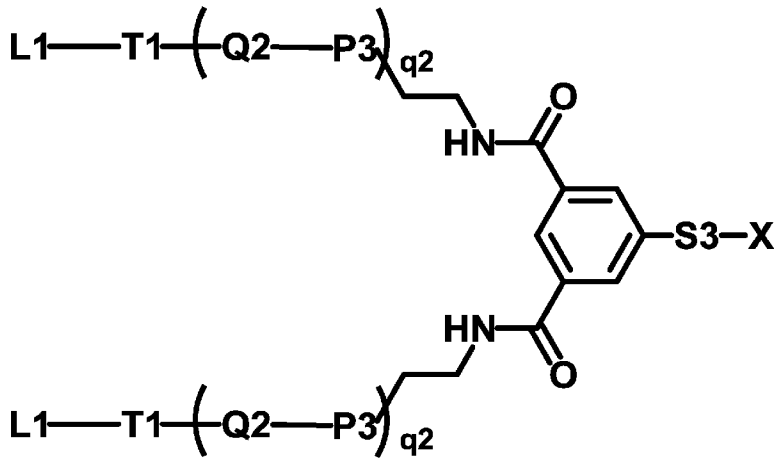
式６－８：

[化84]



式６－９：

[化85]



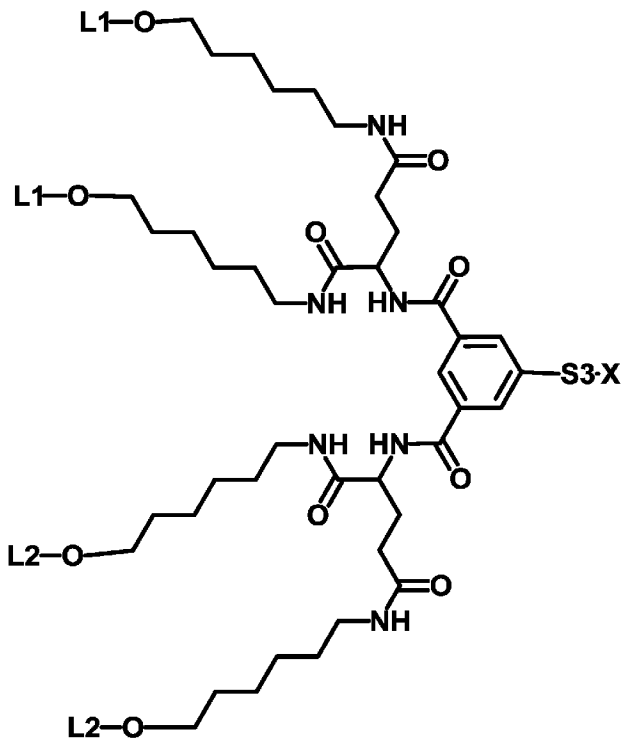
式６－１～式６－９中、

Ｘ、Ｓ３、Ｐ３、Ｑ２、Ｔ1、およびＬ１は、それぞれ前記と同義である。

[0051] 本発明において、核酸複合体は、下記式７－１～式７－９のいずれかで表される構造を有する核酸複合体であることが好適である。

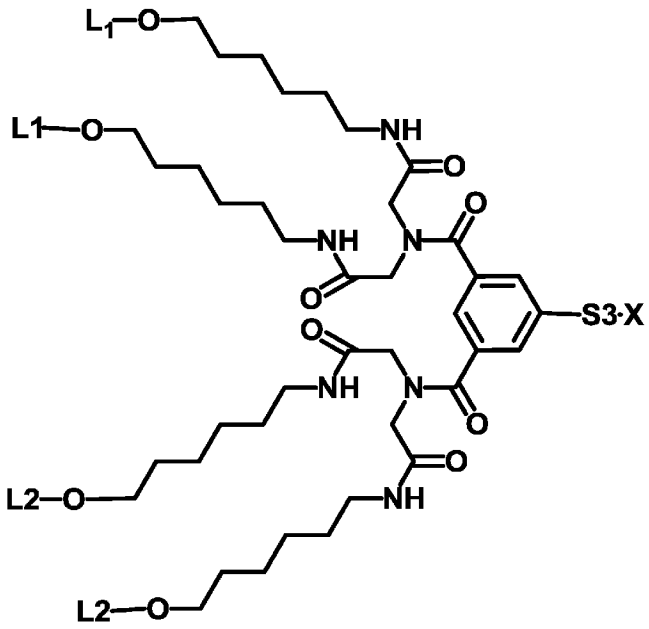
式７－１：

[化86]



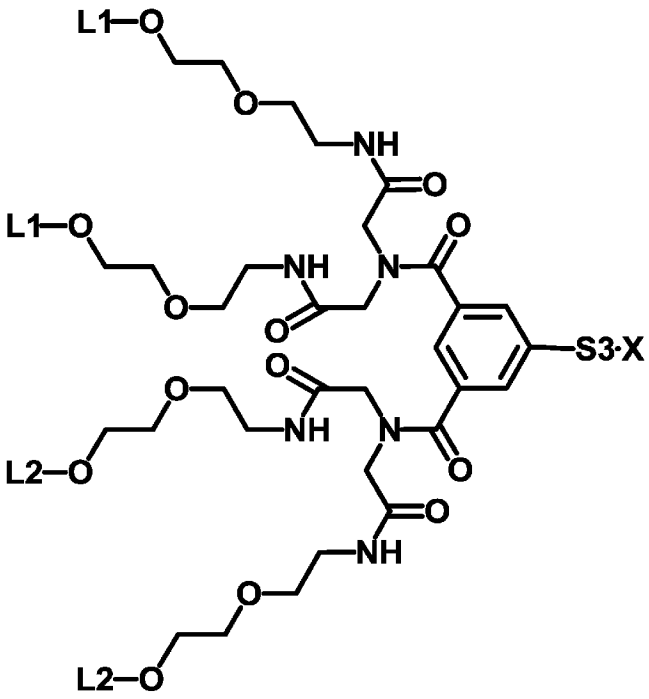
式７－２：

[化87]



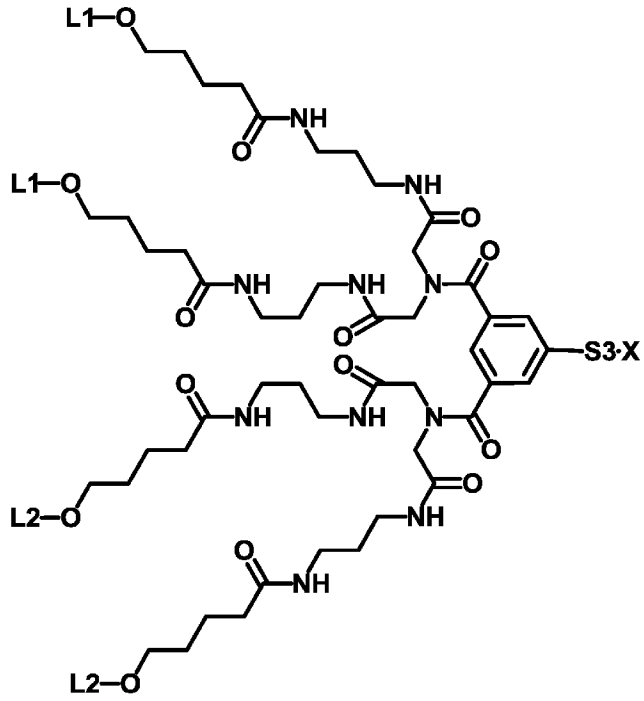
式７－３：

[化88]



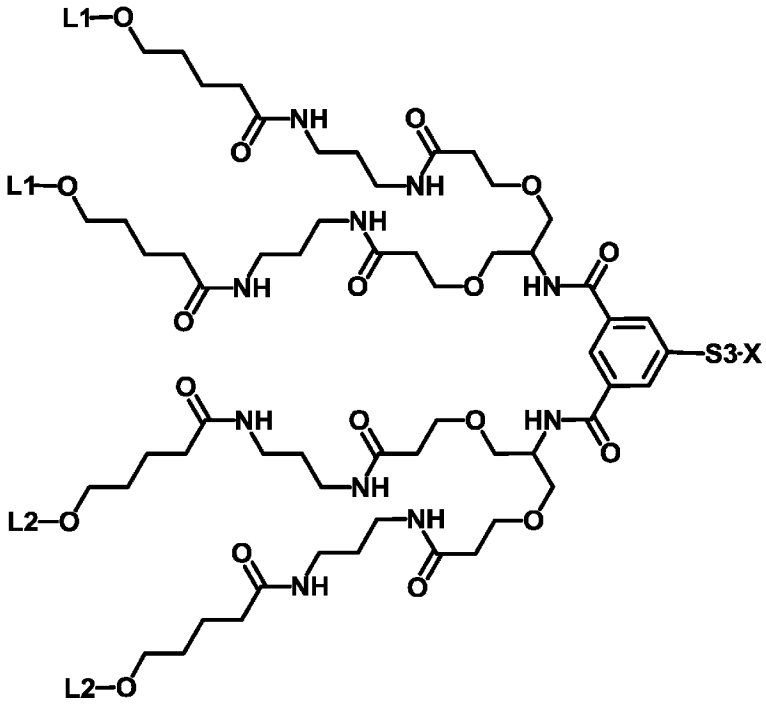
式７－４：

[化89]



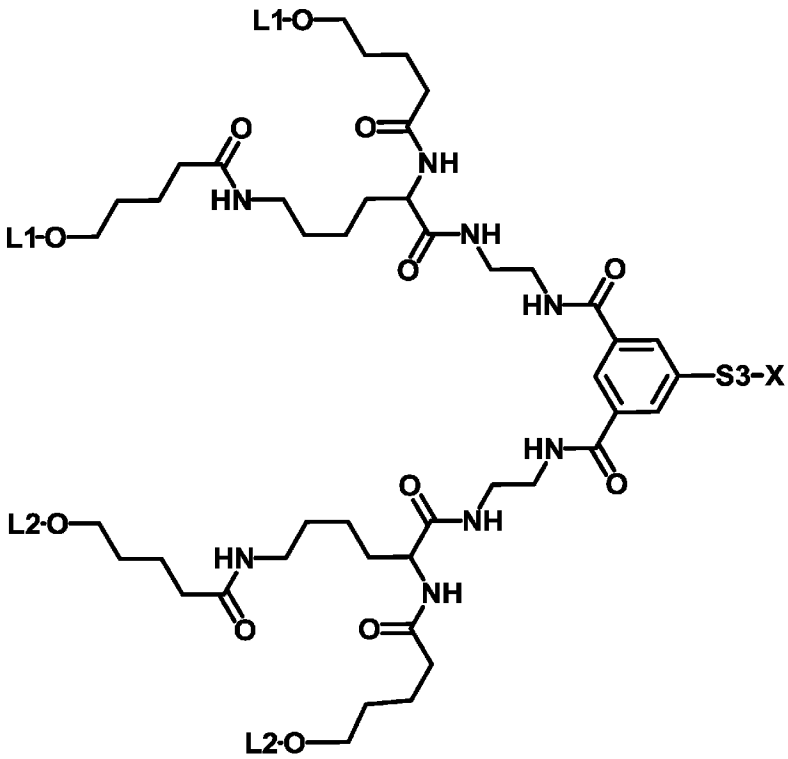
式７－５：

[化90]



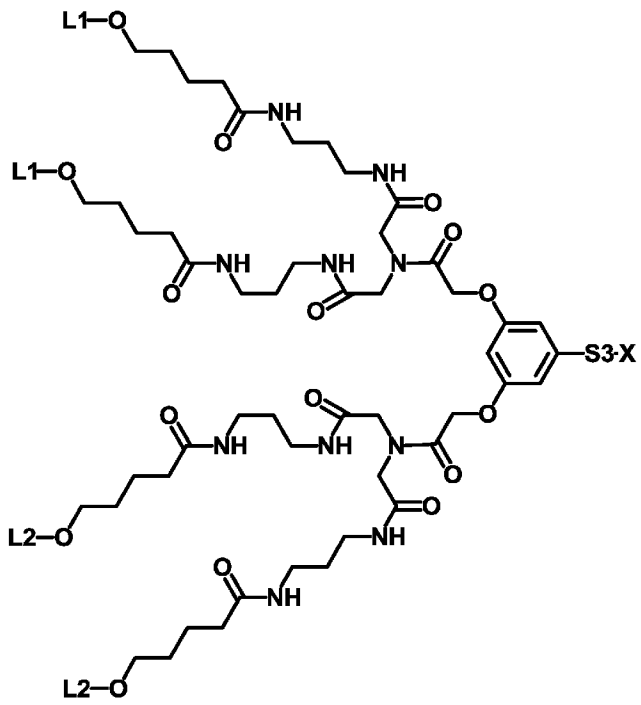
式７－６：

[化91]



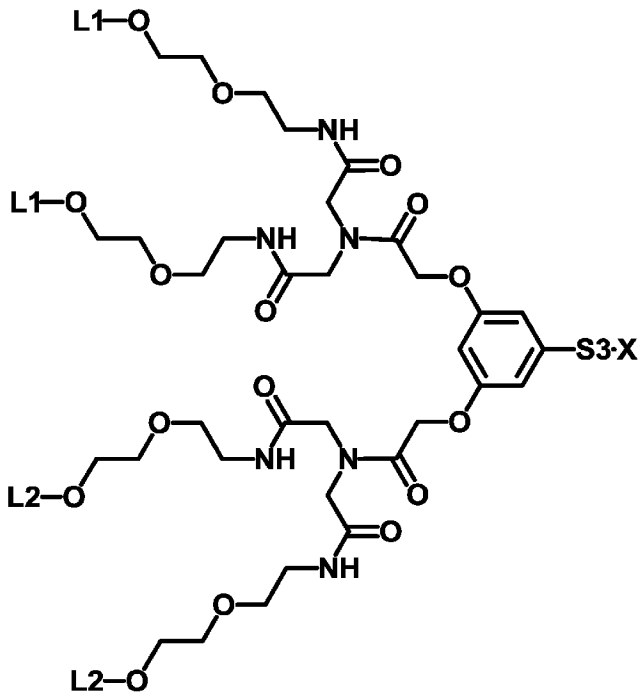
式７－７：

[化92]



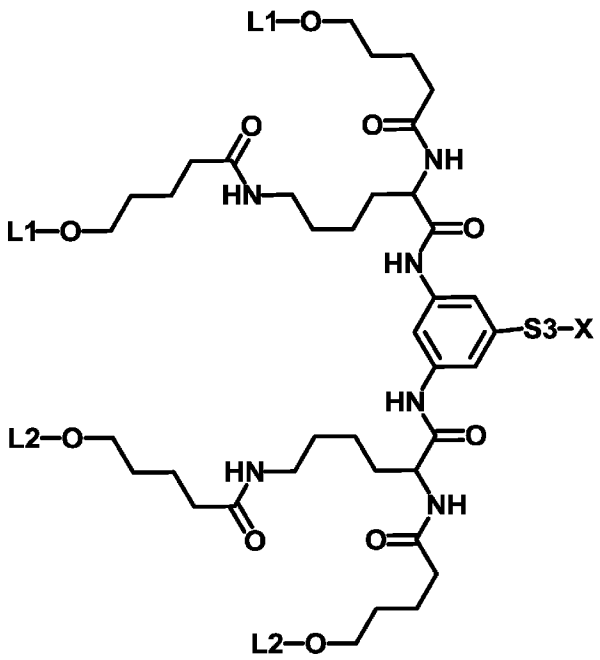
式７－８：

[化93]



式７－９：

[化94]



式７－１～式７－９中、

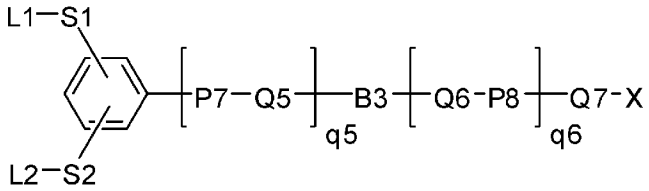
Ｘ、Ｌ１、Ｌ２およびＳ３は、それぞれ前記と同義である。Ｌ１とＬ２は同一であってもよく、異なっていてもよく、同一であることが好適である。

式７－１～式７－９において、各アルキレン基部分を鎖長の異なるアルキレン鎖を導入することにより、また、アミド結合等を他の結合に置換することにより、式７－１～式７－９で表される構造を有する核酸複合体以外の核酸誘導体を製造することもできる。

[0052] 本発明において、核酸複合体は、下記式１１で表される構造を有する核酸複合体であることが好適である。

式１１：

[化95]



式１１中、

Ｌ１、Ｌ２、Ｓ１およびＳ２は、それぞれ前記と同義であり、

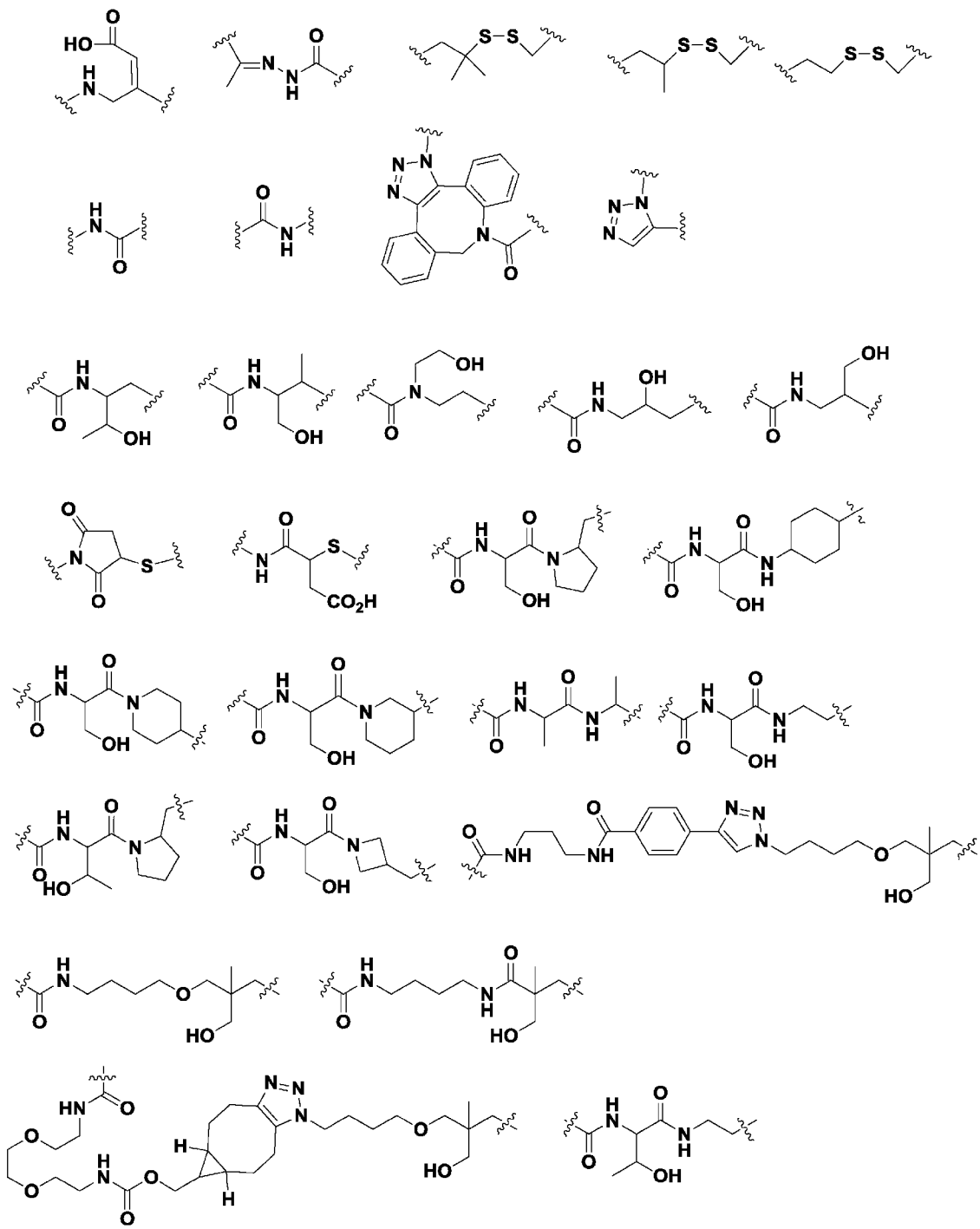
Ｐ７およびＰ８は、それぞれ独立して、存在しないか、または、－ＣＯ－、－ＮＨ－、－Ｏ－、－Ｓ－、－Ｏ－ＣＯ－、－Ｓ－ＣＯ－、－ＮＨ－ＣＯ－、－ＣＯ－Ｏ－、－ＣＯ－Ｓ－もしくは－ＣＯ－ＮＨ－であり、

Ｑ５、Ｑ６およびＱ７は、それぞれ独立して、存在しないか、または、置換もしくは無置換の炭素数１～１２のアルキレンまたは－（CH_2CH_2O）$_{n8}$－CH_2CH_2－であり、ｎ８は０～９９の整数であり、

Ｂ３は、本明細書中ではブランチャーユニットと呼ばれ、下記式１１－１で表されるいずれかの構造であり、破線において、それぞれ、Ｑ５およびＱ６との結合手を意味し、

式１１－１：

[化96]



ｑ５およびｑ６は、それぞれ独立して、０～１０の整数である。

[0053] Ｐ７は、存在しないか、または、－ＣＯ－、－ＮＨ－、－Ｏ－、－Ｓ－、－Ｏ－ＣＯ－、－Ｓ－ＣＯ－、－ＮＨ－ＣＯ－、－ＣＯ－Ｏ－、－ＣＯ－Ｓ－もしくは－ＣＯ－ＮＨ－であるが、－Ｏ－、－ＮＨ－ＣＯ－または-ＣＯ－ＮＨ－であることが好ましく、－Ｏ－または－ＮＨ－ＣＯ－であることがよ

り好ましい。Ｐ７が、例えば、－Ｏ－である場合、ベンゼン環－Ｏ－という部分構造を有する。

[0054] Ｐ８は、存在しないか、または、－ＣＯ－、－ＮＨ－、－Ｏ－、－Ｓ－、－Ｏ－ＣＯ－、－Ｓ－ＣＯ－、－ＮＨ－ＣＯ－、－ＣＯ－Ｏ－、－ＣＯ－Ｓ－もしくは－ＣＯ－ＮＨ－であるが、存在する場合、－ＣＯ－Ｏ－または－ＣＯ－ＮＨ－であることが好ましく、－ＣＯ－ＮＨ－であることがより好ましい。Ｐ８が、例えば、－ＣＯ－ＮＨ－である場合、Ｑ６－ＣＯ－ＮＨ－という部分構造を有する。

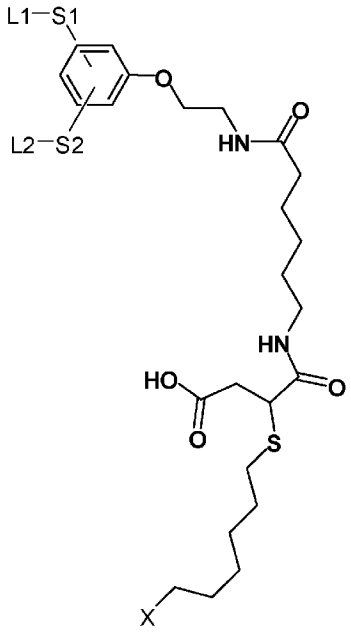
[0055] Ｑ５、Ｑ６およびＱ７は、それぞれ独立して、存在しないか、または、置換もしくは無置換の炭素数１～１２のアルキレンまたは－（CH_2CH_2O）$_{n8}$－CH_2CH_2－であり、ｎ８は０～９９の整数であるが、置換もしくは無置換の炭素数１～１２のアルキレンであることが好ましく、無置換の炭素数１～１２のアルキレンであることがより好ましく、無置換の炭素数１～６のアルキレンであることがさらに好ましく、無置換の炭素数１～４のアルキレンであることがよりさらに好ましい。

[0056] －（Ｐ７－Ｑ５）$_{q5}$－は、－Ｏ－（CH_2）$_{m15}$－ＮＨ－および－ＮＨ－ＣＯ－（CH_2）$_{m16}$－ＮＨ－であり、ｍ１５およびｍ１６は、それぞれ独立して、１～１０の整数であることが好適である。

[0057] 本発明において、核酸複合体は、下記式１２－１～式１２－１２のいずれかで表される構造を有する核酸複合体であることが好適である。

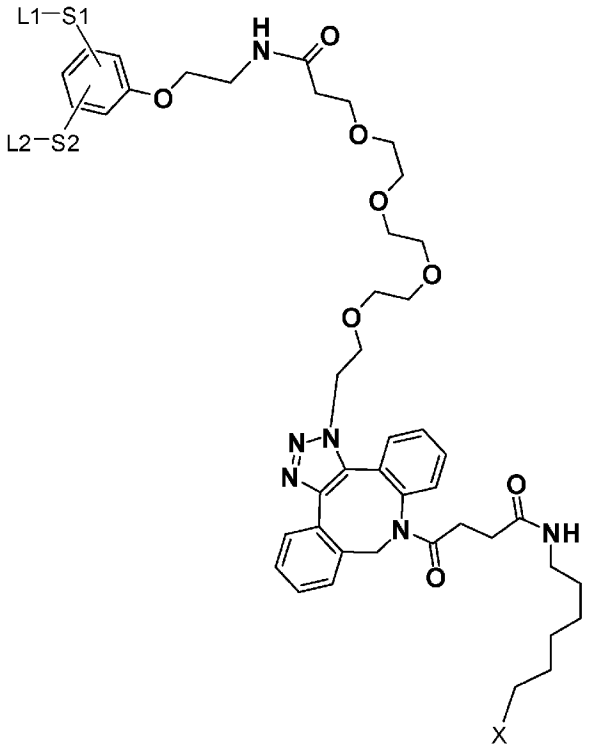
式１２－１：

[化97]



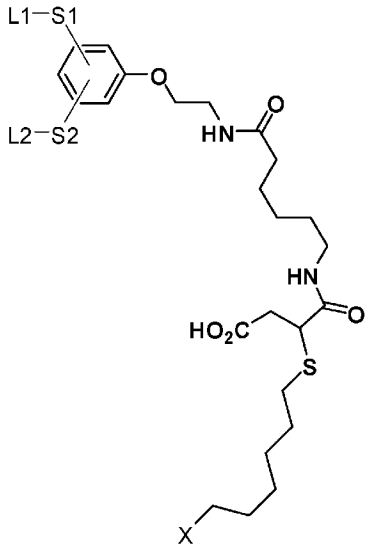
式１２－２：

[化98]



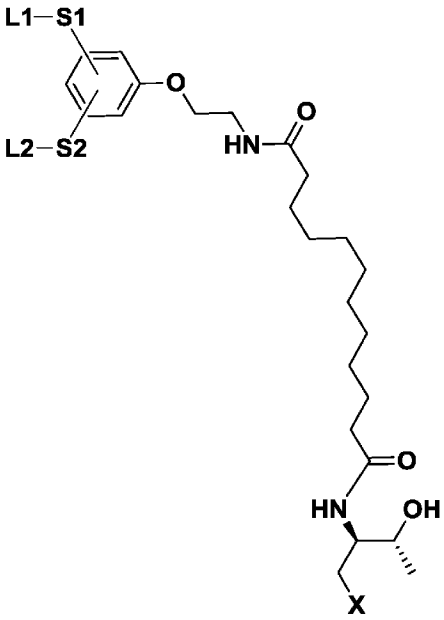
式１２－３：

[化99]



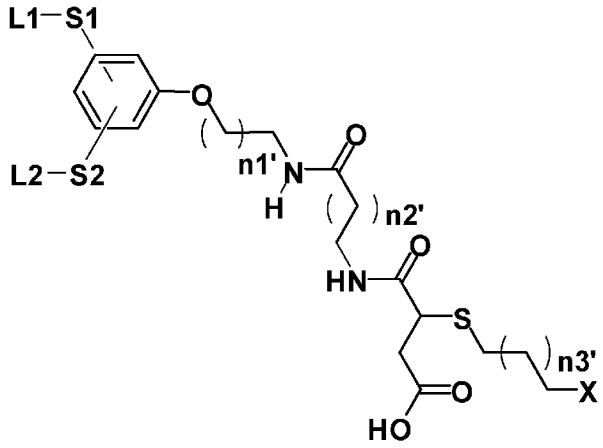
式１２－４：

[化100]



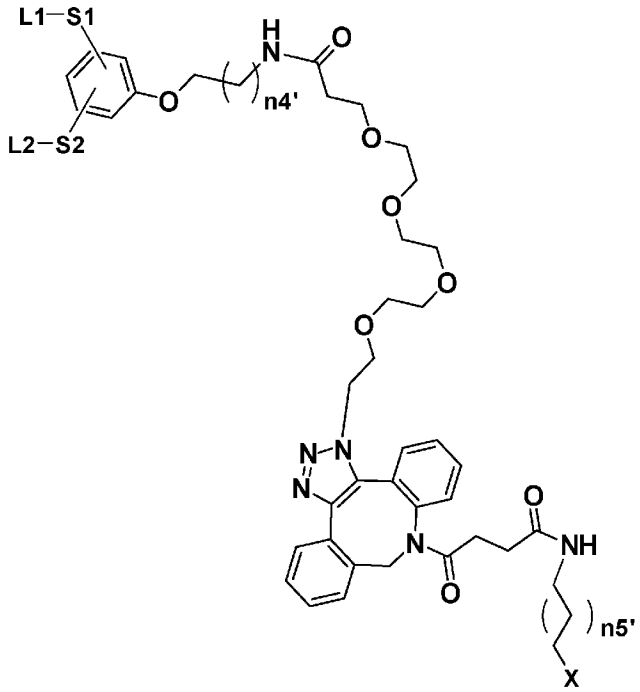
式１２－５：

[化101]



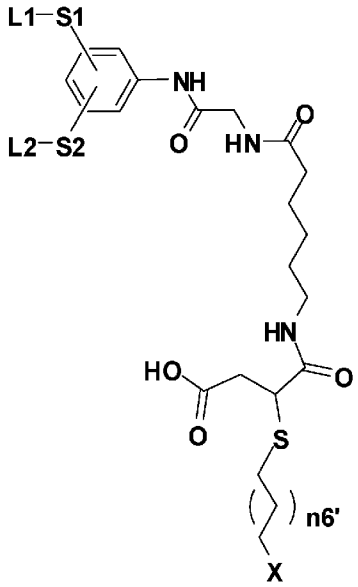
式１２－６：

[化102]



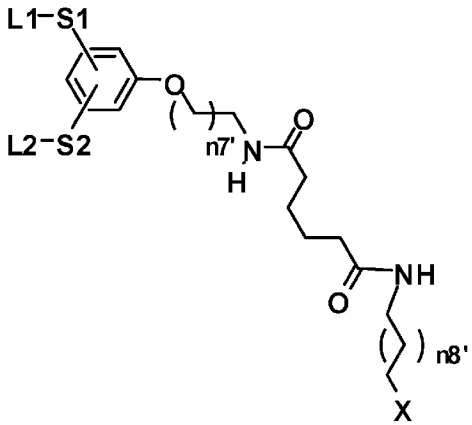
式１２－７：

[化103]



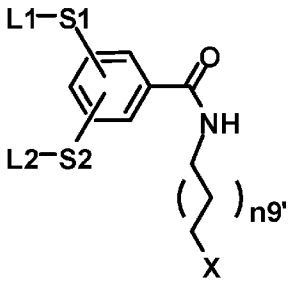
式１２－８：

[化104]



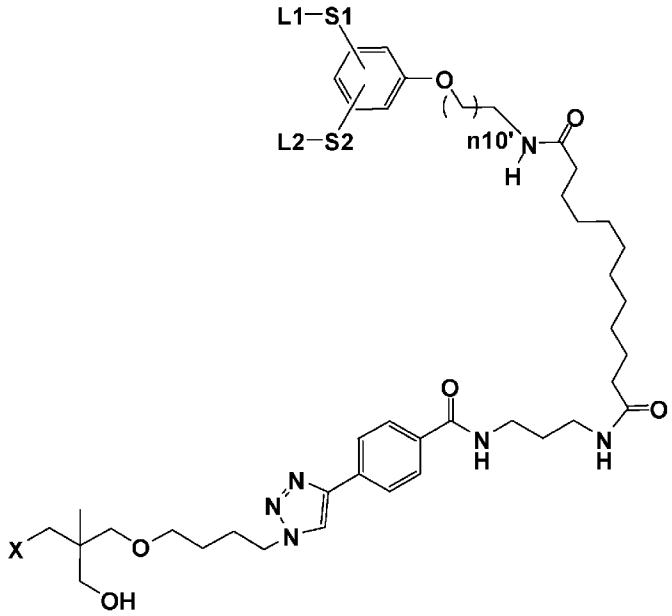
式１２－９：

[化105]



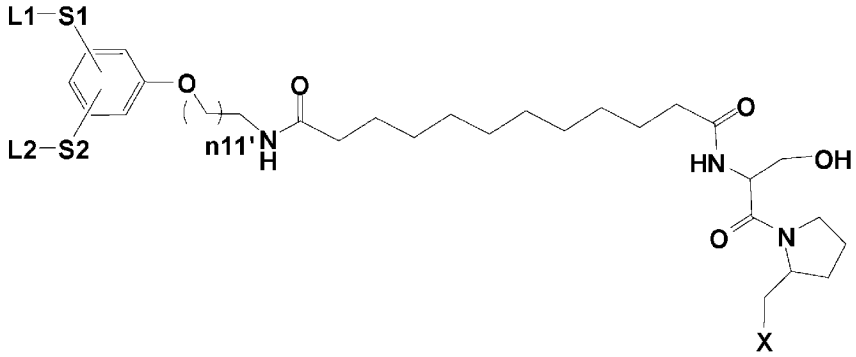
式１２－１０：

[化106]



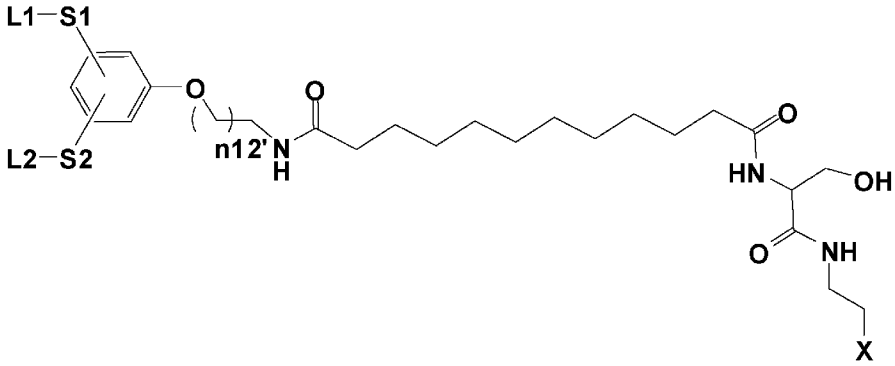
式１２－１１：

[化107]



式１２－１２：

[化108]



式１２－１～１２－１２中、

Ｘ、Ｌ１、Ｌ２、Ｓ１およびＳ２は、それぞれ前記と同義であり、ｎ１’～ｎ１２’はそれぞれ独立して、１～１０の整数である。

[0058] 本発明の核酸複合体は、式１で表される核酸複合体において、式２および式１１の構造を併せて持つ核酸複合体であることが好ましく、該核酸複合体において、式１１の構造であって、式２が、式４－１～式４－９であってもよく、式６－１～式６－９であってもよく、式７－１～式７－９であってもよく、式２が、式４－１～式４－９、式６－１～式６－９、あるいは式７－１～式７－９である場合に、式１１が、式１２－１～式１２－１２であってもよい。本発明の核酸複合体は、式１で表される核酸複合体において、式４－１～式４－９のいずれか１つの構造および式１２－１～式１２－１２のいずれか１つの構造を併せて持つ核酸複合体、式６－１～式６－９のいずれか１つの構造および式１２－１～式１２－１２のいずれか１つの構造を併せて持つ核酸複合体、式７－１～式７－９のいずれか１つの構造および式１２－１～式１２－１２のいずれか１つの構造を併せて持つ核酸複合体であることがより好適である。

[0059] 本発明の核酸複合体は、いずれかの窒素原子上の孤立電子対に、水素イオンが配位した場合に、製薬上許容し得る陰イオンと塩を形成していてもよい。

本発明において、製薬上許容し得る陰イオンとしては、例えば塩化物イオン、臭化物イオン、硝酸イオン、硫酸イオン、リン酸イオン等の無機イオン、酢酸イオン、シュウ酸イオン、マレイン酸イオン、フマル酸イオン、クエン酸イオン、安息香酸イオン、メタンスルホン酸イオン等の有機酸イオン等が挙げられる。

[0060] 本発明の核酸複合体の製造法について説明する。なお、以下に示す製造法において、定義した基が該製造法の条件下で変化するかまたは該製造法を実施するのに不適切な場合、有機合成化学で常用される保護基の導入および除去方法［例えば、プロテクティブ・グループス・イン・オーガニック・シンセシス第３版（Ｐｒｏｔｅｃｔｉｖｅ Ｇｒｏｕｐｓ ｉｎ Ｏｒｇａｎｉ

ｃ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ，ｔｈｉｒｄ ｅｄｉｔｉｏｎ）、グリーン（Ｔ．Ｗ．Ｇｒｅｅｎｅ）著、Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ Ｉｎｃ．（１９９９年）等に記載の方法］等を用いることにより、目的化合物を製造することができる。また、必要に応じて置換基導入等の反応工程の順序を変えることもできる。

式１で表される核酸重合体は、固相合成によっても合成することができる。

[0061] 式１で表される核酸重合体は、核酸複合体として公知のリンカー構造の合成方法を参考にして合成することができる。

式１で表される核酸複合体における、Ｓ１をリンカーとしたＬ１－ベンゼン環ユニットやＳ２をリンカーとしたＬ２－ベンゼン環ユニットの合成は、例えば、式２で表される核酸複合体を例として説明する。

式２で表される核酸複合体におけるＬ１－ベンゼン環ユニットやＬ２－ベンゼン環ユニットは、Ｐ１、Ｐ２、Ｐ３、Ｐ４、Ｐ５、およびＰ６ならびにＴ１およびＴ２により連結している。

Ｐ１、Ｐ２、Ｐ３、Ｐ４、Ｐ５、およびＰ６ならびにＴ１およびＴ２の－ＣＯ－、－ＮＨ－、－Ｏ－、－Ｓ－、－Ｏ－ＣＯ－、－Ｓ－ＣＯ－、－ＮＨ－ＣＯ－、－ＣＯ－Ｏ－、－ＣＯ－Ｓ－または－ＣＯ－ＮＨ－結合は、例えば、第４版実験化学講座１９「有機化合物の合成Ｉ」丸善（１９９２年）、第４版実験化学講座２０「有機化合物の合成ＩＩ」、丸善（１９９２年））等に記載の結合反応の方法を参考にして、式２で表される構造を形成するのに適切な原料を選択することにより適宜合成することができる。

また、ベンゼン環から順次、Ｑ１を部分構造として有する化合物、Ｂ１を部分構造として有する化合物を結合させることで、Ｌ１－ベンゼン環ユニットの部分構造を製造することができる。

Ｌ１とＱ２を部分構造として有する化合物を別途合成し、Ｌ１とＱ２を部分構造として有する化合物をベンゼン環、Ｑ１およびＢ１を部分構造として有するＬ１－ベンゼン環ユニットの部分構造を有する化合物と結合させるこ

とにより、Ｌ１－ベンゼン環ユニット構造を製造することができる。

Ｌ２－ベンゼン環ユニットについても同様に、ベンゼン環から順次、Ｑ３を部分構造として有する化合物、Ｂ２を部分構造として有する化合物を結合させることで、Ｌ２－ベンゼン環ユニットの部分構造を製造することができる。

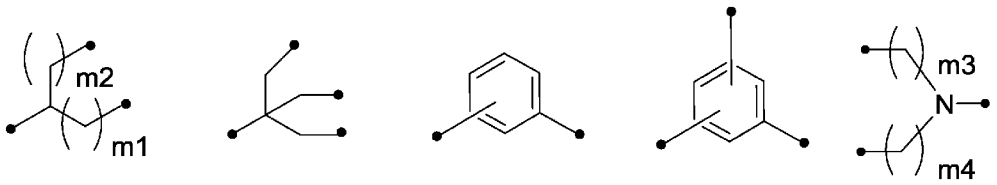
Ｌ２とＱ４を部分構造として有する化合物を別途合成し、Ｌ２とＱ４を部分構造として有する化合物をベンゼン環、Ｑ３およびＢ２を部分構造として有するＬ２－ベンゼン環ユニットの部分構造を有する化合物と結合させることにより、Ｌ２－ベンゼン環ユニット構造を製造することができる。

[0062] Ｑ１を部分構造として有する化合物、Ｑ３を部分構造として有する化合物としては、炭素数１～１０のアルキレンまたは－（CH_2CH_2O）$_n$－CH_2CH_2－の両末端に、水酸基、カルボキシル基、アミノ基、チオール基を有する化合物が挙げられる。

Ｂ１を部分構造として有する化合物、Ｂ２を部分構造として有する化合物としては、下記式２－１で表されるいずれかの構造を有し、各構造における末端の黒丸点において、それぞれ、水酸基、カルボキシル基、アミノ基、またはチオール基を有する化合物が挙げられる。

式２－１：

[化109]



Ｂ１を部分構造として有する化合物、Ｂ２を部分構造として有する化合物の具体例としては、グリコール、グルタミン酸、アスパラギン酸、リジン、Ｔｒｉｓ、イミノ二酢酸、２－アミノ－１，３－プロパンジオール等が挙げられ、グルタミン酸、アスパラギン酸、リジン、イミノ二酢酸が好ましい。

[0063] Ｌ１、Ｑ２およびＢ１を部分構造として有する化合物を合成してから、Ｑ１とベンゼン環を有する化合物と結合することにより、Ｌ１－ベンゼン環ユ

ニット構造を製造してもよい。

Ｌ２、Ｑ４およびＢ２を部分構造として有する化合物を合成してから、Ｑ３とベンゼン環を有する化合物と結合することにより、Ｌ２－ベンゼン環ユニット構造を製造してもよい。

本発明においては、［Ｌ１－Ｔ１－（Ｑ２－Ｐ３）$_{q2}$－］$_{p1}$－Ｂ１－（Ｐ２－Ｑ１）$_{q1}$－Ｐ１－である部分構造と、［Ｌ２－Ｔ２－（Ｑ３－Ｐ６）$_{q4}$－］$_{p2}$－Ｂ２－（Ｐ５－Ｑ３）$_{q3}$－Ｐ２－である部分構造とは同一または異なっていても良いが、同一であることが好ましい。

[0064] 糖リガンドのＬ１－Ｔ１－Ｑ２に相当するユニットとして、例えば、Ｌ３－Ｔ１－Ｑ２－ＣＯＯＨ、Ｌ３－Ｔ１－（Ｑ２－Ｐ３）$_{q2-1}$－Ｑ２－ＮＨ$_2$等が挙げられる。具体的には、Ｌ３－Ｏ－炭素数１～１２のアルキレン－ＣＯＯＨや、Ｌ３－炭素数１～１２のアルキレン－ＣＯ－ＮＨ－炭素数２～１２のアルキレン－ＮＨ$_2$等が挙げられる。

Ｌ３は、脱保護することにより、Ｌ１となる糖リガンド誘導体であれば特に限定されない。糖リガンドの置換基としては、糖質化学の分野で汎用される置換基であれば特に限定されないが、Ａｃ基が好ましい。

[0065] Ｓ１をリンカーとしたＬ１－ベンゼン環ユニットやＳ２をリンカーとしたＬ２－ベンゼン環ユニットの合成は、具体的には実施例に記載の方法を参考にして、アルキレン鎖の炭素数を適宜増減し、また、末端アミノ基や末端カルボキシル基を、－ＣＯ－、－ＮＨ－、－Ｏ－、－Ｓ－、－Ｏ－ＣＯ－、－Ｓ－ＣＯ－、－ＮＨ－ＣＯ－、－ＣＯ－Ｏ－、－ＣＯ－Ｓ－または－ＣＯ－ＮＨ－結合を形成し得る基に変換した化合物を用いることにより、合成することができる。また、Ｌ１の糖リガンドについても、実施例においては、マンノースまたはＮ－アセチルガラクトサミンを例示しているが、他の糖リガンドに変更して実施することができる。

[0066] 式１で表される核酸複合体における、Ｓ３をリンカーとしたＸ－ベンゼン環ユニットの合成は、例えば、式１１で表される核酸複合体を例として説明する。

式１１で表される核酸複合体におけるＸ－ベンゼン環ユニットは、オリゴヌクレオチドの結合以外に、Ｐ７およびＰ８により表される結合を有する。

Ｐ７およびＰ８の－ＣＯ－、－ＮＨ－、－Ｏ－、－Ｓ－、－Ｏ－ＣＯ－、－Ｓ－ＣＯ－、－ＮＨ－ＣＯ－、－ＣＯ－Ｏ－、－ＣＯ－Ｓ－または－ＣＯ－ＮＨ－結合は、例えば、第４版実験化学講座１９「有機化合物の合成Ｉ」丸善（１９９２年）、第４版実験化学講座２０「有機化合物の合成ＩＩ」、丸善（１９９２年））に記載の結合反応の方法を参考にして、式１１で表される構造を形成するのに適切な原料を選択することにより適宜合成することができる。

また、ベンゼン環から順次、Ｑ５を部分構造として有する化合物、Ｂ３を部分構造として有する化合物を結合させることで、Ｘ－ベンゼン環ユニットの部分構造を製造することができる。

[0067] ＸとＱ７を部分構造として有する化合物や、ＸとＱ６を部分構造として有する化合物を別途合成し、ＸとＱ７を部分構造として有する化合物やＸとＱ６を部分構造として有する化合物をベンゼン環およびＱ５を部分構造として有するＸ－ベンゼン環ユニットの部分構造を有する化合物と結合させて、Ｂ３部分を構築することにより、Ｘ－ベンゼン環ユニット構造を製造することができる。

具体的には、ベンゼン環およびＱ５を部分構造として有するＸ－ベンゼン環ユニットの部分構造を有する化合物の末端にアジド基を有する場合を例にとると、実施例に開示するような末端結合性官能基化したオリゴヌクレオチドを反応させることにより、環化付加させて、トリアゾール環を形成させて、Ｂ３部分を構築することにより、Ｘ－ベンゼン環ユニット構造を製造することができる。

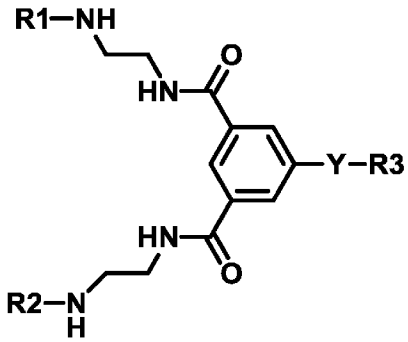
[0068] Ｑ５を部分構造として有する化合物、Ｑ６を部分構造として有する化合物、Ｑ７を部分構造として有する化合物としては、炭素数１～１０のアルキレンまたは－（$CH_2CH_2O)_{n8}$－CH_2CH_2－の両末端に、水酸基、カルボキシル基、アミノ基、チオール基を有する化合物が挙げられる。

[0069] Ｌ１－ベンゼン環ユニット構造、Ｌ２－ベンゼン環ユニット構造と、Ｘ－ベンゼン環ユニット構造とは、それぞれ順次製造していくことができるが、Ｌ１－ベンゼン環ユニット構造およびＬ２－ベンゼン環ユニット構造を合成してから、Ｘ－ベンゼン環ユニット構造を結合させることが好ましい。特に、オリゴヌクレオチド部分を有するＸについては、糖リガンド複合体合成の最終工程近くで化合物内に導入することが好ましい。

[0070] 本発明においては、下記式８～式１０で表される化合物が合成中間体として得られる。

式８：

[化110]



（式８中、

Ｒ１およびＲ２は、それぞれ独立して、水素原子、ｔ－ブトキシカルボニル基（Ｂｏｃ基）、ベンジルオキシカルボニル基（Ｚ基）、９－フルオレニルメチルオキシカルボニル基（Ｆｍｏｃ基）、－ＣＯ－Ｒ４、または－ＣＯ－Ｂ４－［（Ｐ９－Ｑ８）$_{q7}$－Ｔ３－Ｌ３］$_{p3}$であり、

Ｐ９およびＴ３は、それぞれ独立して、存在しないか、または、－ＣＯ－、－ＮＨ－、－Ｏ－、－Ｓ－、－Ｏ－ＣＯ－、－Ｓ－ＣＯ－、－ＮＨ－ＣＯ－、－ＣＯ－Ｏ－、－ＣＯ－Ｓ－もしくは－ＣＯ－ＮＨ－であり、

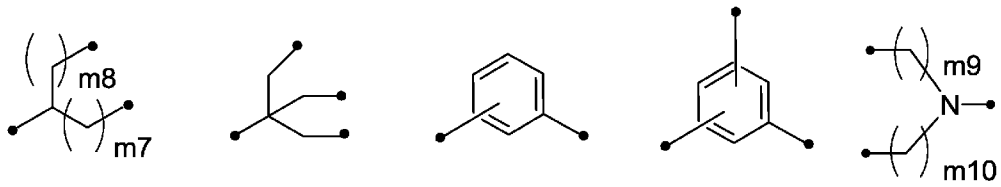
Ｑ８は、存在しないか、または、置換もしくは無置換の炭素数１～１２のアルキレンまたは－（ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｏ）$_{n1}$－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－であり、ｎ１は０～９９の整数であり、

Ｂ４は、それぞれ独立して、結合手であるか、または、下記式８－１で表

されるいずれかの構造であり、各構造における末端の黒丸点は、それぞれ、カルボニル基またはＰ９との結合点であり、ｍ７、ｍ８、ｍ９およびｍ１０は、それぞれ独立して、０～１０の整数であり、

式８－１：

[化111]



ｐ３は、１、２または３の整数であり、

ｑ７は、０～１０の整数であり、

Ｌ３は、糖リガンドであり、

Ｙは－Ｏ－（CH_2）$_{m11}$－ＮＨ－および－ＮＨ－ＣＯ－（CH_2）$_{m12}$－ＮＨ－であり、ｍ１１およびｍ１２は、それぞれ独立して、１～１０の整数であり、

Ｒ３は、水素原子、ｔ－ブトキシカルボニル基、ベンジルオキシカルボニル基、９－フルオレニルメチルオキシカルボニル基、－ＣＯ－Ｒ４、－ＣＯ－（CH_2CH_2O）$_{n2}$－CH_2CH_2－N_3、または－ＣＯ－Ｑ９－Ｂ５－（Ｑ１０－Ｐ１０）$_{q8}$－Ｘ１あり、ｎ２は０～９９の整数であり、

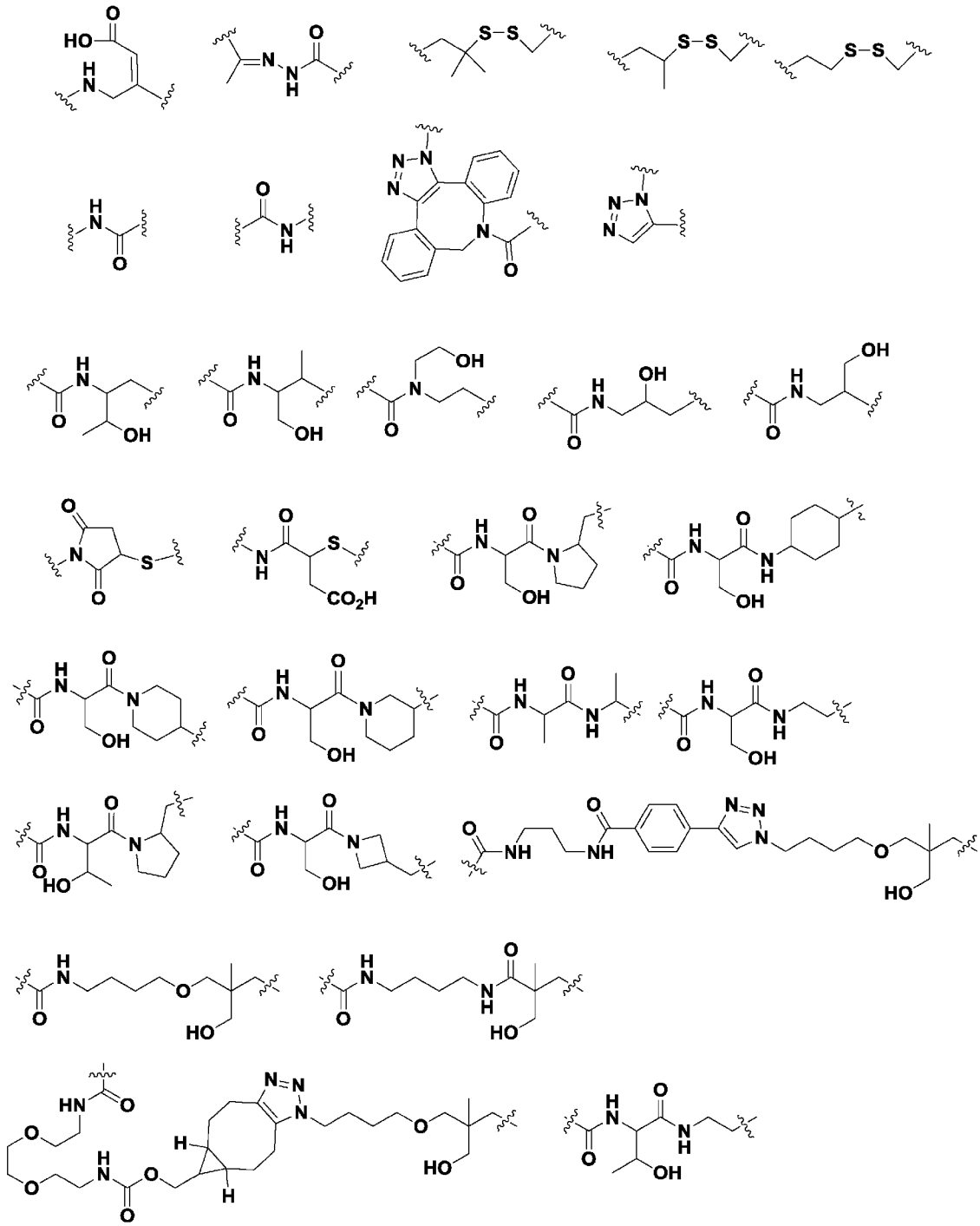
Ｐ１０は、存在しないか、または、－ＣＯ－、－ＮＨ－、－Ｏ－、－Ｓ－、－Ｏ－ＣＯ－、－Ｓ－ＣＯ－、－ＮＨ－ＣＯ－、－ＣＯ－Ｏ－、－ＣＯ－Ｓ－もしくは－ＣＯ－ＮＨ－であり、

Ｑ９およびＱ１０は、それぞれ独立して、存在しないか、または、置換もしくは無置換の炭素数１～１２のアルキレンまたは－（CH_2CH_2O）$_{n3}$－CH_2CH_2－であり、ｎ３は０～９９の整数であり、

Ｂ５は、下記式８－２で表されるいずれかの構造であり、破線において、それぞれ、Ｑ９およびＱ１０との結合手を意味し、

式８－２：

[化112]



ｑ８は、０～１０の整数であり、

Ｘ１は、水素原子または固相担体であり、

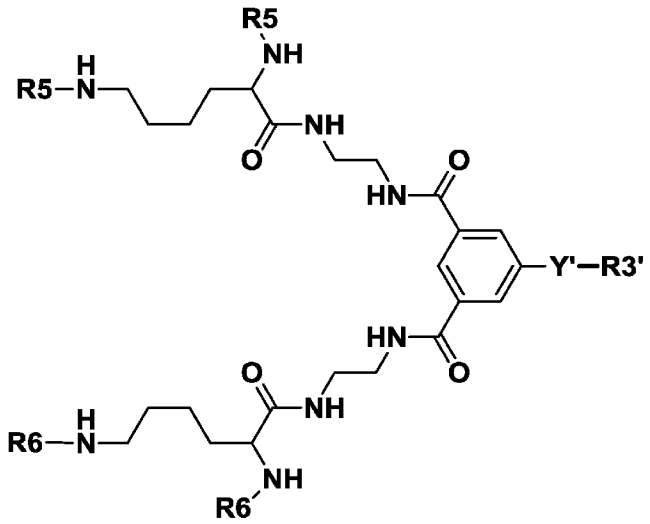
Ｒ４は、ｔ－ブトキシカルボニル基、ベンジルオキシカルボニル基、９－フルオレニルメチルオキシカルボニル基で置換もしくは無置換のアミノ基、カルボキシ基、マレイミド基、およびアラルキルオキシカルボニル基からな

る群から選択される１または２個の置換基で置換された炭素数２～１０のアルキル基である。）

[0071] 本発明においては、下記式９で表される化合物が合成中間体として得られる。

式９：

[化113]



（式９中、

Ｒ５およびＲ６は、それぞれ独立して、水素原子、ｔ－ブトキシカルボニル基、ベンジルオキシカルボニル基、９－フルオレニルメチルオキシカルボニル基、－ＣＯ－Ｒ４’、または－ＣＯ－Ｑ１１－（Ｐ１１－Ｑ１１’）$_{q9}$－Ｔ４－Ｌ４であり、

Ｐ１１およびＴ４は、それぞれ独立して、存在しないか、または、－ＣＯ－、－ＮＨ－、－Ｏ－、－Ｓ－、－Ｏ－ＣＯ－、－Ｓ－ＣＯ－、－ＮＨ－ＣＯ－、－ＣＯ－Ｏ－、－ＣＯ－Ｓ－もしくは－ＣＯ－ＮＨ－であり、

Ｑ１１およびＱ１１’は、存在しないか、または、置換もしくは無置換の炭素数１～１２のアルキレンまたは－（ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｏ）$_{n4}$－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－であり、ｎ４は０～９９の整数であり、

ｑ９は、０～１０の整数であり、

Ｌ４は、糖リガンドであり、

Ｙ’は－Ｏ－（ＣＨ$_2$）$_{m11'}$－ＮＨ－および－ＮＨ－ＣＯ－（ＣＨ$_2$）$_{m12'}$

－ＮＨ－であり、ｍ１１’およびｍ１２’は、それぞれ独立して、１～１０の整数であり、

Ｒ３’は、水素原子、ｔ－ブトキシカルボニル基、ベンジルオキシカルボニル基、９－フルオレニルメチルオキシカルボニル基、－ＣＯ－Ｒ４’、－ＣＯ－（CH_2CH_2O）$_{n2'}$－CH_2CH_2－N_3、または－ＣＯ－Ｑ９’－Ｂ５’－（Ｑ１０’－Ｐ１０’）$_{q8'}$－Ｘ１’であり、ｎ２’は０～９９の整数であり、

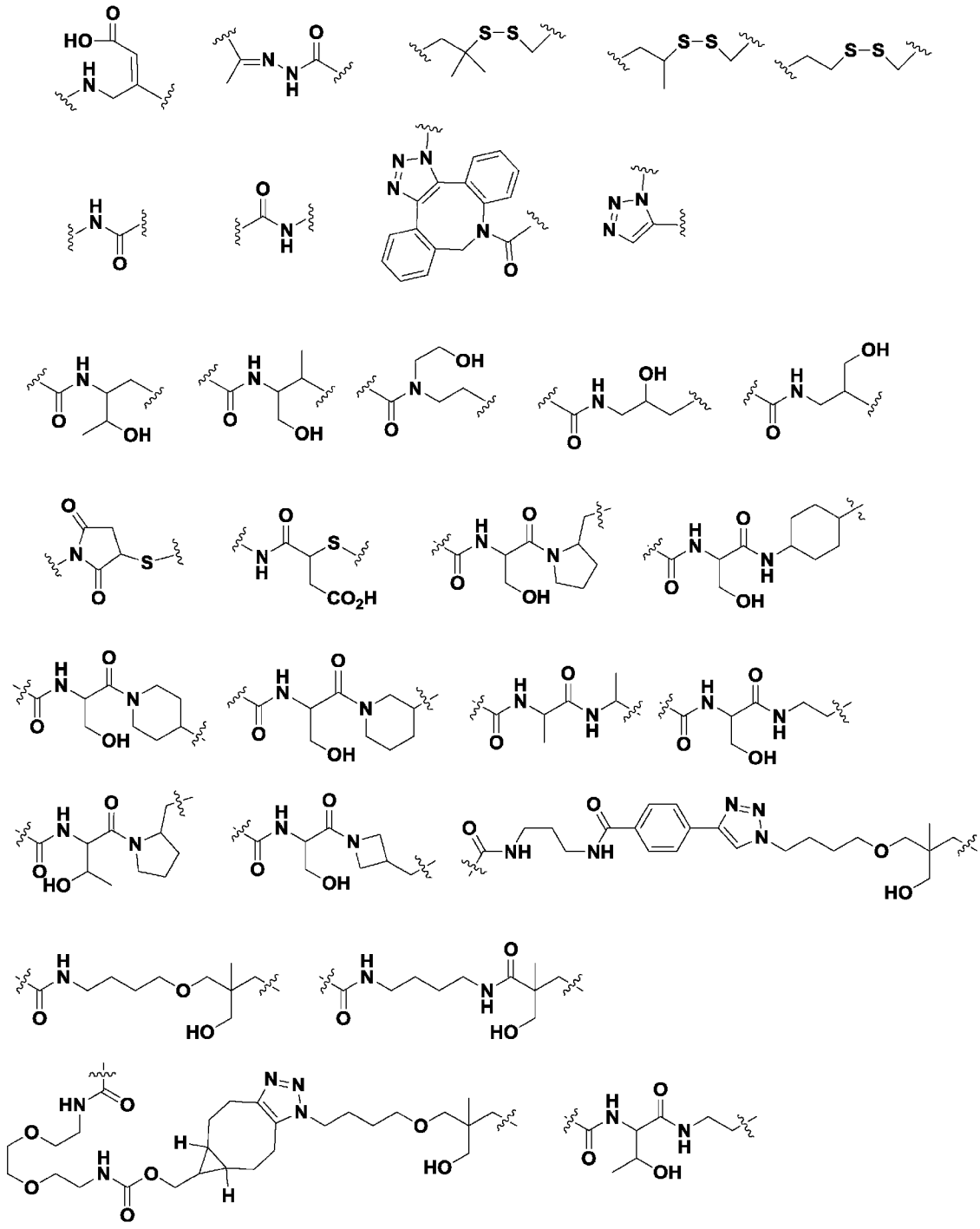
Ｐ１０’は、存在しないか、または、－ＣＯ－、－ＮＨ－、－Ｏ－、－Ｓ－、－Ｏ－ＣＯ－、－Ｓ－ＣＯ－、－ＮＨ－ＣＯ－、－ＣＯ－Ｏ－、－ＣＯ－Ｓ－もしくは－ＣＯ－ＮＨ－であり、

Ｑ９’およびＱ１０’は、それぞれ独立して、存在しないか、または、置換もしくは無置換の炭素数１～１２のアルキレンまたは－（CH_2CH_2O）$_{n3'}$－CH_2CH_2－であり、ｎ３’は０～９９の整数であり、

Ｂ５’は、下記式９－１で表されるいずれかの構造であり、破線において、それぞれ、Ｑ９’およびＱ１０’との結合手を意味し、

式９－１：

[化114]



ｑ８’は、０～１０の整数であり、

Ｘ１’は、水素原子または固相担体であり、

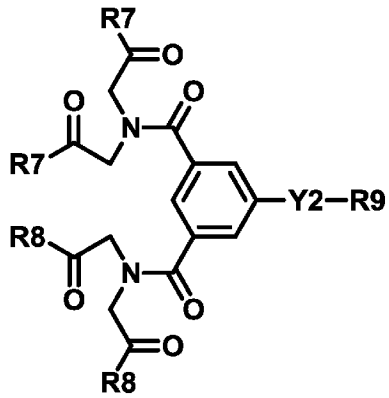
Ｒ４’は、ｔ－ブトキシカルボニル基、ベンジルオキシカルボニル基、９－フルオレニルメチルオキシカルボニル基で置換もしくは無置換のアミノ基、カルボキシ基、マレイミド基、およびアラルキルオキシカルボニル基からな

る群から選択される１または２個の置換基で置換された炭素数２～１０のアルキル基である。）

[0072] 本発明においては、下記式１０で表される化合物が合成中間体として得られる。

式１０：

[化115]



式１０中、

Ｒ７およびＲ８は、それぞれ独立して、ヒドロキシ基、ｔ－ブトキシ基、ベンジルオキシ基、－ＮＨ－Ｒ１０、または－ＮＨ－Ｑ１２－（Ｐ１２－Ｑ１２’）$_{q10}$－Ｔ４－Ｌ４であり、

Ｐ１２およびＴ４は、それぞれ独立して、存在しないか、または、－ＣＯ－、－ＮＨ－、－Ｏ－、－Ｓ－、－Ｏ－ＣＯ－、－Ｓ－ＣＯ－、－ＮＨ－ＣＯ－、－ＣＯ－Ｏ－、－ＣＯ－Ｓ－もしくは－ＣＯ－ＮＨ－であり、

Ｑ１２およびＱ１２’は、存在しないか、または、置換もしくは無置換の炭素数１～１２のアルキレンまたは－（CH_2CH_2O）ｎ2－CH_2CH_2－であり、ｎ2は０～９９の整数であり、

Ｌ４は、糖リガンドであり、

Ｙ２は－Ｏ－（CH_2）$_{m9}$－ＮＨ－および－ＮＨ－ＣＯ－（CH_2）$_{m10}$－ＮＨ－であり、ｍ９、ｍ１０は、それぞれ独立して、１～１０の整数であり、

ｑ１０は、０～１０の整数であり、

Ｒ９は、水素原子、ｔ－ブトキシカルボニル基、ベンジルオキシカルボニ

ル基、９－フルオレニルメチルオキシカルボニル基、－ＣＯ－Ｒ１０、－ＣＯ－（CH_2CH_2O）$_{n6}$－CH_2CH_2－N_3、または－ＣＯ－Ｑ１３－Ｂ６－（Ｑ１４－Ｐ１３）$_{q11}$－Ｘ２であり、ｎ６は０～９９の整数であり、

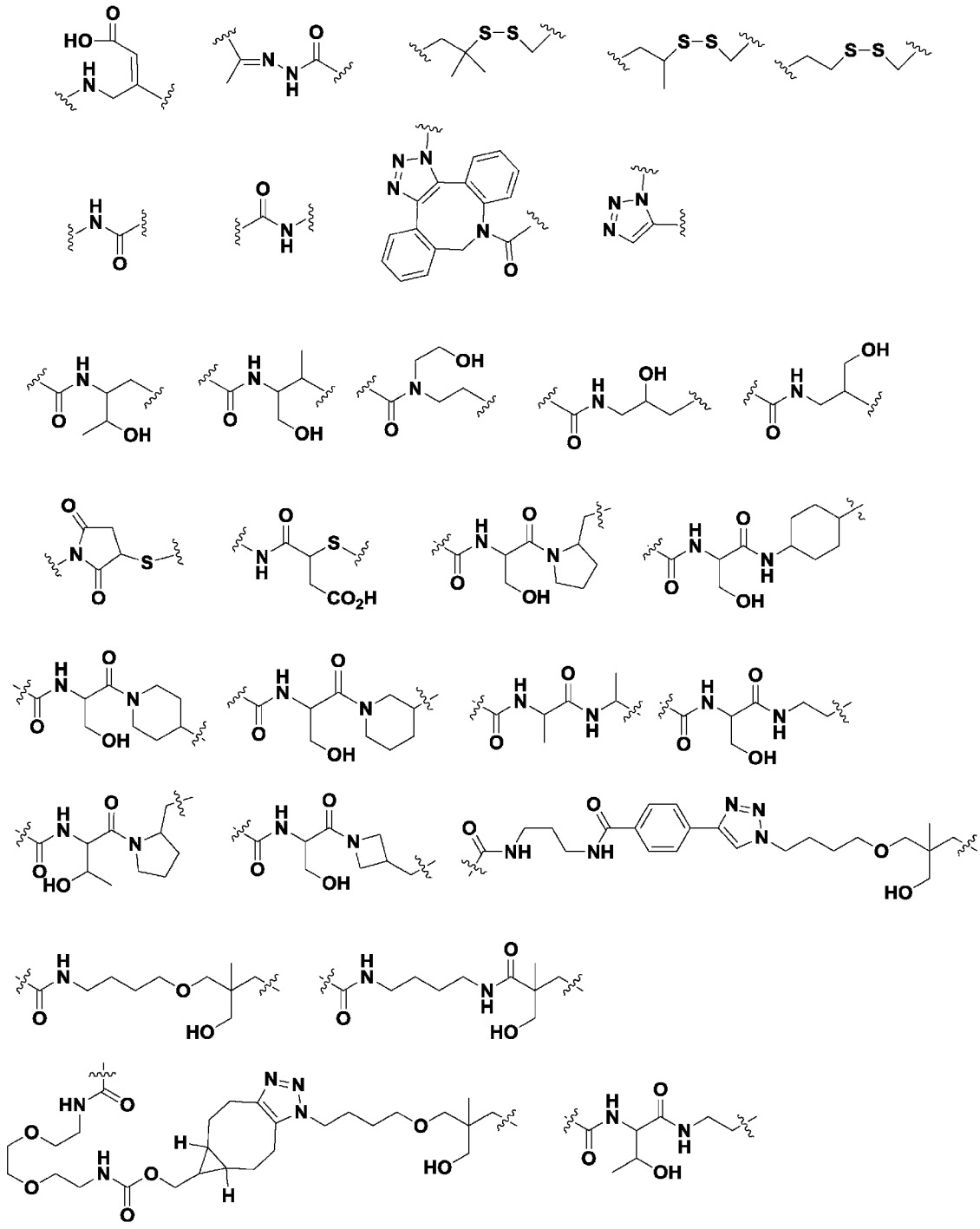
Ｐ１３は、存在しないか、または、－ＣＯ－、－ＮＨ－、－Ｏ－、－Ｓ－、－Ｏ－ＣＯ－、－Ｓ－ＣＯ－、－ＮＨ－ＣＯ－、－ＣＯ－Ｏ－、－ＣＯ－Ｓ－もしくは－ＣＯ－ＮＨ－であり、

Ｑ１３およびＱ１４は、それぞれ独立して、存在しないか、または、置換もしくは無置換の炭素数１～１２のアルキレンまたは－（CH_2CH_2O）$_{n7}$－CH_2CH_2－であり、ｎ７は０～９９の整数であり、

Ｂ６は、下記式１０－１で表されるいずれかの構造であり、破線において、それぞれ、Ｑ１３およびＱ１４との結合手を意味し、

式１０－１：

[化116]



ｑ１１は、０～１０の整数であり、

Ｘ２は、水素原子または固相担体であり、

Ｒ１０は、ｔ－ブトキシカルボニル基、ベンジルオキシカルボニル基、９－フルオレニルメチルオキシカルボニル基で置換もしくは無置換のアミノ基、カルボキシ基、マレイミド基、およびアラルキルオキシカルボニル基から

なる群から選択される１または２個の置換基で置換された炭素数２～１０のアルキル基である。）

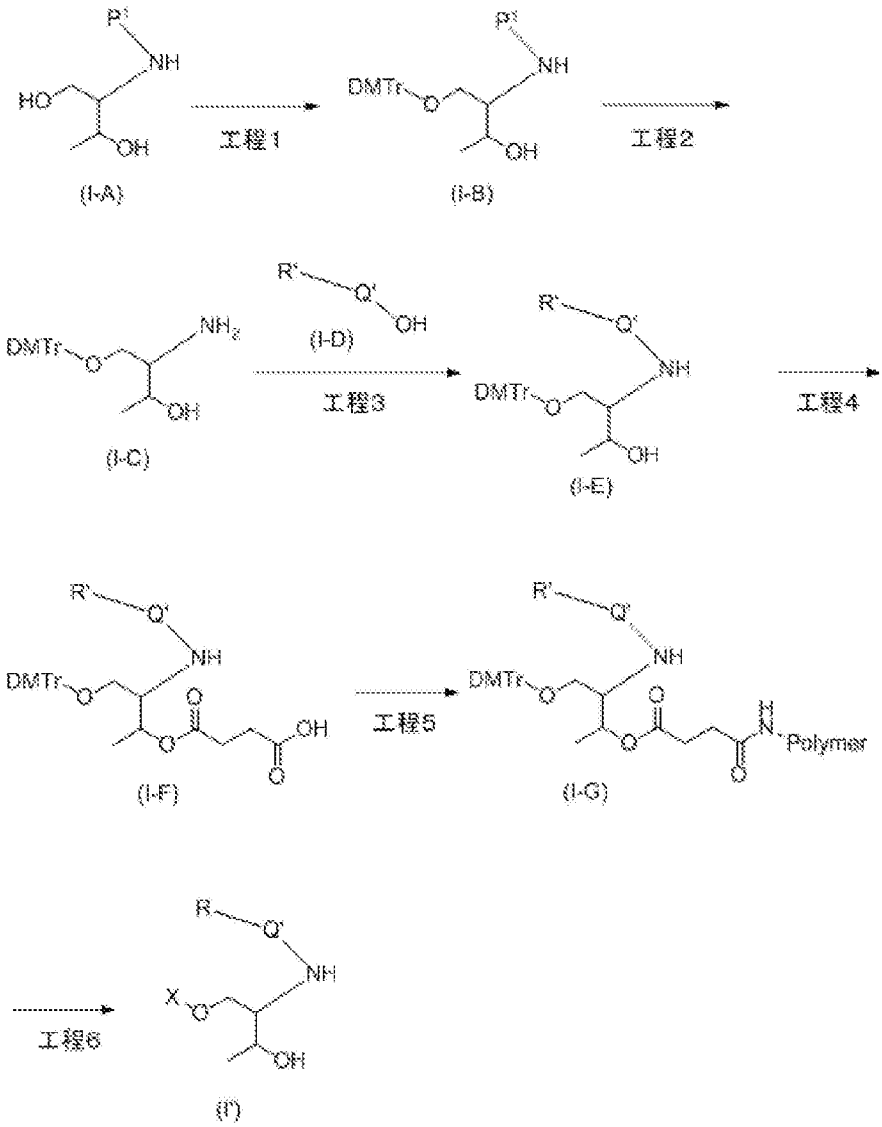
[0073] 以下、本発明に関連して、製造方法を一例として示す。なお、以下の製造方法１～製造方法１７に関する記載において、本発明の核酸誘導体等における式１～式１２で表される化合物とで、基を表す記号として同一の記号が用いられているものがあるが、両者は切り離して理解されるものであり、製造方法１～製造方法１２に対して記載される基の説明により、本発明が限定的に解釈されるものではない。また、本発明における核酸誘導体に関し、オリゴヌクレオチドを表すＸを、製造方法１～製造方法１７では、－Ｏ－Ｘとして記載する。

製造方法１

本発明における核酸誘導体は、式（Ｉ’）で表される部分構造を有する化合物の製造方法として、その製造方法を例示することができる。

[0074]

[化117]



（式中、Ｐ１はＦｍｏｃ等の塩基により脱保護可能な保護基であり、ＤＭＴｒはｐ，ｐ’－ジメトキシトリチル基を表し、Ｒは糖リガンド-テザーユニットを表し、Ｒ’は、Ｒ中の糖リガンドの各水酸基がアセチル基等の塩基で脱保護可能な保護基で保護された基を表し、Ｐｏｌｙｍｅｒは固相担体を表し、Ｑ’は－ＣＯ－である。）

[0075] 工程１

化合物（Ｉ－Ｂ）は、化合物（Ｉ－Ａ）とｐ，ｐ’－ジメトキシトリチルクロリドを、ピリジン等の溶媒中、必要に応じて共溶媒の存在下、０℃と１００℃の間の温度で、５分間～１００時間反応させることにより製造するこ

とができる。

共溶媒としては、例えばメタノール、エタノール、ジクロロメタン、クロロホルム、１，２－ジクロロエタン、トルエン、酢酸エチル、アセトニトリル、ジエチルエーテル、テトラヒドロフラン、１，２－ジメトキシエタン、ジオキサン、Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）、Ｎ，Ｎ－ジメチルアセトアミド、Ｎ－メチルピロリドン、ピリジン、水等があげられ、これらは単独でまたは混合して用いられる。

[0076] 工程２

化合物（Ｉ－Ｃ）は、化合物（Ｉ－Ｂ）を、無溶媒でまたは溶媒中、１～１０００当量の２級アミン存在下、室温と２００℃の間の温度で、５分間～１００時間反応させることにより製造することができる。

溶媒としては、例えばメタノール、エタノール、ジクロロメタン、クロロホルム、１，２－ジクロロエタン、トルエン、酢酸エチル、アセトニトリル、ジエチルエーテル、テトラヒドロフラン、１，２－ジメトキシエタン、ジオキサン、Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）、Ｎ，Ｎ－ジメチルアセトアミド、Ｎ－メチルピロリドン、ピリジン、水等があげられ、これらは単独でまたは混合して用いられる。

２級アミンとしては、例えばジエチルアミン、ピペリジン等が挙げられる。

[0077] 工程３

化合物（１－Ｅ）は、化合物（Ｉ－Ｃ）と化合物（Ｉ－Ｄ）を、無溶媒でまたは溶媒中、１～３０当量の塩基、縮合剤および必要に応じて０．０１～３０当量の添加剤の存在下、室温と２００　℃の間の温度で、５分間～１００時間反応させることにより製造することができる。

溶媒としては、工程２で例示したものが挙げられる。

塩基としては、例えば炭酸セシウム、炭酸カリウム、水酸化カリウム、水酸化ナトリウム、ナトリウムメトキシド、カリウム　ｔｅｒｔ－ブトキシド、トリエチルアミン、ジイソプロピルエチルアミン、Ｎ－メチルモルホリン

、ピリジン、１，８－ジアザビシクロ［５．４．０］－７－ウンデセン（ＤＢＵ）、Ｎ，Ｎ－ジメチル－４－アミノピリジン（ＤＭＡＰ）等が挙げられる。

縮合剤としては、例えば１，３－ジシクロヘキサンカルボジイミド（DCC）、１－エチル－３－（３－ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド・塩酸塩（ＥＤＣ）、カルボニルジイミダゾール、ベンゾトリアゾール－１－イルオキシトリス（ジメチルアミノ）ホスホニウムヘキサフルホロホスファート、（ベンゾトリアゾール－１－イルオキシ）トリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスファート、Ｏ－（７－アザベンゾトリアゾール－１－イル）－Ｎ，Ｎ，Ｎ’，Ｎ’－テトラメチルウロニウム　ヘキサフルオロホスファート（ＨＡＴＵ）、Ｏ－（ベンゾトリアゾール－１－イル）－Ｎ，Ｎ，Ｎ’，Ｎ’－テトラメチルウロニウム　ヘキサフルオロホスファート（ＨＢＴＵ）、ヨウ化　２－クロロ－１－メチルピリジニウム等が挙げられる。

添加剤としては、例えば１－ヒドロキシベンゾトリアゾール（ＨＯＢｔ）、４－ジメチルアミノピリジン（ＤＭＡＰ）等が挙げられる。

化合物（Ｉ－Ｄ）は、公知の方法（例えば、Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｓｏｃｉｅｔｙ，　１３６，　１６９５８，　（２０１４）を参照）もしくはそれに準じた方法で得ることができる。

[0078] 工程４

化合物（Ｉ－Ｆ）は、化合物（Ｉ－Ｅ）とコハク酸無水物を、溶媒中、１～３０当量の塩基存在下、室温と２００℃の間の温度で、５分間～１００時間反応させることにより製造することができる。

[0079] 溶媒としては、工程２で例示したものが挙げられる。

[0080] 塩基としては、工程３で例示したものが挙げられる。

[0081] 工程５

化合物（Ｉ－Ｇ）は、化合物（Ｉ－Ｆ）と末端がアミノ化された固相担体とを、無溶媒でまたは溶媒中、１～３０当量の塩基、縮合剤および必要に応

じて０．０１～３０当量の添加剤の存在下、室温と２００℃の間の温度で、５分間～１００時間反応した後、無水酢酸／ピリジン溶液と室温と２００℃の間の温度で５分間～１００時間反応させることにより製造することができる。

溶媒としては、工程２で例示したものが挙げられる。

塩基、縮合剤および添加剤としては、それぞれ工程３で例示したものが挙げられる。

アミノ化された固相担体としては、例えば長鎖アルキルアミン細孔性ガラス（ＬＣＡＡ－ＣＰＧ）等　があげられ、これらは市販品として得ることができる。

[0082] 工程６

式（Ｉ’）で表される糖リガンド－テザー－ブランチャーユニットを有する核酸複合体は、化合物（Ｉ－Ｇ）を用い、公知のオリゴヌクレオチド化学合成法で対応するヌクレオチド鎖を伸長した後に、固相からの脱離、保護基の脱保護および精製を行うことで製造することができる。

[0083] 公知のオリゴヌクレオチド化学合成法としては、ホスホロアミダイト法、ホスホロチオエート法、ホスホトリエステル法、ＣＥＭ法　（Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，　３５，　３２８７　（２００７）を参照）等をあげることができ、例えば、ＡＢＩ３９００ハイスループット核酸合成機（アプライドバイオシステムズ社製）により合成することができる。

[0084] 固相からの脱離、脱保護は、オリゴヌクレオチド化学合成後、溶媒または無溶媒中、－８０　℃から２００　℃の間の温度で、１０秒間から７２時間塩基で処理することにより製造することができる。

[0085] 塩基としては、例えばアンモニア、メチルアミン、ジメチルアミン、エチルアミン、ジエチルアミン、イソプロピルアミン、ジイソプロピルアミン、ピペリジン、トリエチルアミン、エチレンジアミン、１，８－ジアザビシクロ［５．４．０］－７－ウンデセン（ＤＢＵ）、炭酸カリウム等が挙げられ

る。

[0086] 溶媒としては、水、メタノール、エタノール、ＴＨＦ等が挙げられる。

[0087] オリゴヌクレオチドの精製は、Ｃ１８逆相カラムあるいは陰イオン交換カラム、好ましくは前述２つの手法を組み合わせにより可能である。精製後の核酸複合体純度は、９０％以上、好ましくは９５％以上とするのが望ましい。

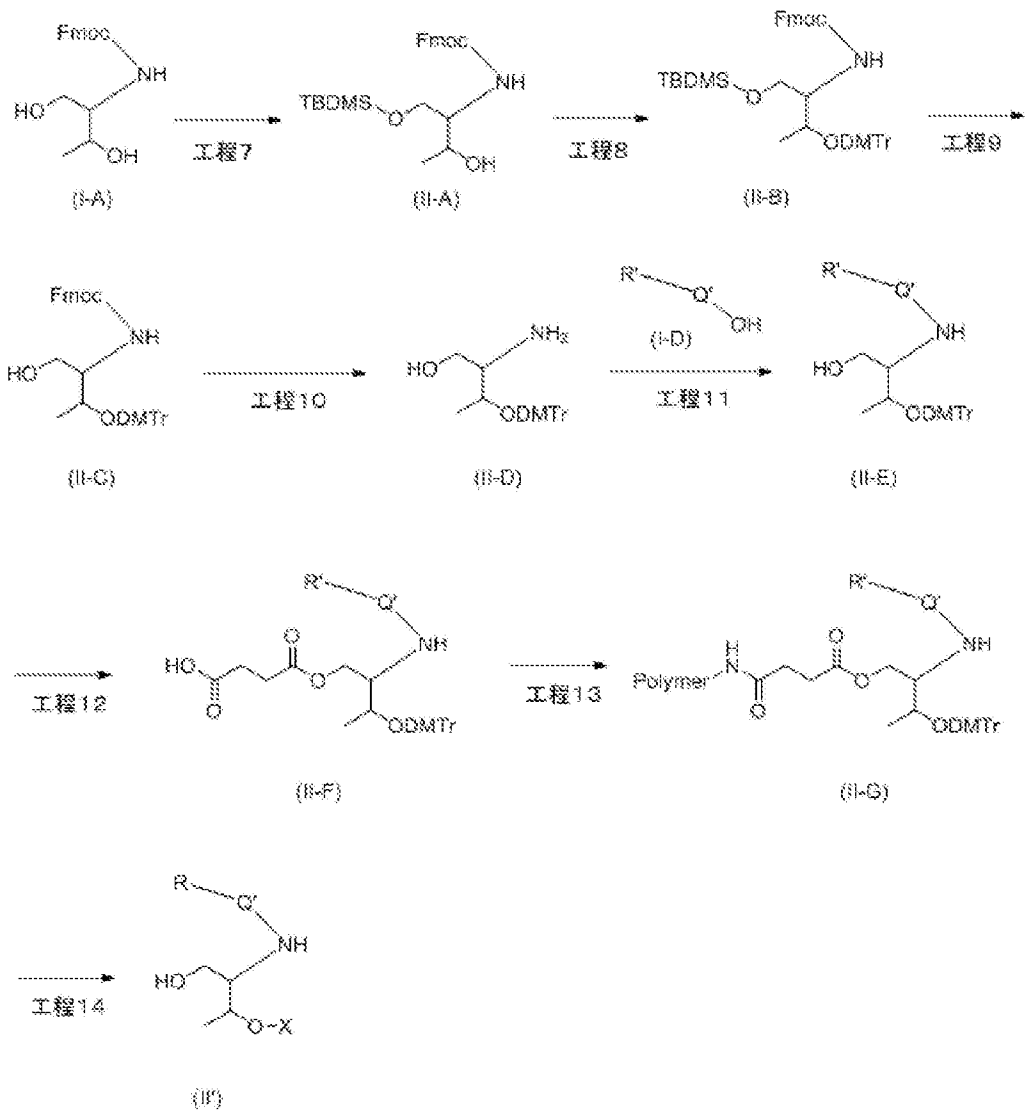
[0088] また、上記工程３において、必要により、化合物（Ｉ－Ｄ）を二つのユニットに分割し、２段階に分けて化合物（Ｉ－Ｃ）と縮合することで行うこともできる。具体的には、例えばＲ－Ｑ’がＲ－ＮＨ－ＣＯ－Ｑ４’－ＣＯ－である場合（Ｑ４’は置換もしくは無置換の炭素数１～１２のアルキレンである）、工程３において、化合物（Ｉ－Ｃ）と、CH_3CH_2－Ｏ－ＣＯ－Ｑ４’－ＣＯ－ＯＨ（Ｑ４’は前記と同義）とを、工程３と同様の方法で縮合させ、得られた化合物のエチルエステルをエタノールや水等の溶媒中、水酸化リチウム等の塩基で加水分解した後に、さらにＲ’－NH_2（Ｒ’は前記と同義）と縮合させることで目的とする化合物を得ることができる。なお、CH_3CH_2－Ｏ－ＣＯ－Ｑ４’－ＣＯ－ＯＨ（Ｑ４’は前記と同義）およびＲ’－NH_2（Ｒ’は前記と同義）は、公知の方法（例えば、Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｓｏｃｉｅｔｙ，１３６，１６９５８（２０１４）を参照）もしくはそれに準じた方法で得ることができる。ここで、Ｑ４’において、置換もしくは無置換の炭素数１～１２のアルキレンにおける置換基およびアルキレン部分は上記と同様である。

[0089] Ｑが－ＣＯ－である場合を例示して示しているが、Ｑが－ＣＯ－でない場合の化合物についても、Ｑの構造を適宜変更することにより、上記と同様の方法、公知の方法またはこれらを組み合わせ、適宜反応条件を変更することにより調製することができる。

[0090] 製造方法２

本発明における核酸誘導体は、式（ＩＩ’）で表される部分構造を有する化合物の製造方法として、その製造方法を例示することができる。

[0091] [化118]



（式中、ＤＭＴｒ、Ｒ、Ｒ’、Ｘ、Ｑ’、およびＰｏｌｙｍｅｒは前記と同義。ＴＢＤＭＳはｔ－ブチルジメチルシリル基、Ｆｍｏｃは９－フルオレニルメチルオキシカルボニル基を表す）

[0092] 工程７

化合物（ＩＩ－Ａ）は、化合物（Ｉ－Ａ）、ｔ－ブチルジメチルシリルクロリドおよびジメチルアミノピリジンをＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）等の溶媒中、好ましくは２等量の塩基の存在下、０℃～１００℃の間の温度で、５分間～１００時間反応させることにより製造することができる。

塩基としては、製造方法１の工程３で例示したものが挙げられる。

[0093] 工程８

化合物（ＩＩ－Ｂ）は、化合物（ＩＩ－Ａ）を用い、製造方法１の工程１と同様の条件にて製造することができる。

[0094] 工程９

化合物（ＩＩ－Ｃ）は、化合物（ＩＩ－Ｂ）とフッ化ｎ－テトラブチルアンモニウム（ＴＢＡＦ）を、溶媒中、室温と２００℃の間の温度で、５分間～１００時間反応させることにより製造することができる。

溶媒としては、工程２で例示したものが挙げられる。

[0095] 工程１０

化合物（ＩＩ－Ｄ）は、化合物（ＩＩ－Ｃ）を用い、製造方法１の工程２と同様の条件にて製造することができる。

[0096] 工程１１

化合物（ＩＩ－Ｅ）は、化合物（ＩＩ－Ｄ）および化合物（Ｉ－Ｄ）を用い、製造方法１の工程３と同様の条件にて製造することができる。

[0097] 工程１２～１４

化合物（ＩＩ’）は、化合物（ＩＩ－Ｅ）を用い、製造方法１の工程４～工程６と同様の条件にて製造することができる。

[0098] また、上記工程１１において、必要により、化合物（Ｉ－Ｄ）を二つのユニットに分割し、２段階に分けて化合物（ＩＩ－Ｃ）と縮合することで行うこともできる。具体的には、例えばＲ－Ｑ’が－ＮＨ－ＣＯ－Ｑ４’－ＣＯ－である場合（Ｑ４’は置換もしくは無置換の炭素数１～１２のアルキレン）、工程１１において、化合物（ＩＩ－Ｃ）と、CH_3CH_2－Ｏ－ＣＯ－Ｑ４’－ＣＯ－ＯＨ（Ｑ４’は前記と同義）とを、工程１１と同様の方法で縮合させ、得られた化合物のエチルエステルをエタノールや水等の溶媒中、水酸化リチウム等の塩基で加水分解した後に、さらにＲ’－NH_2（Ｒ’は前記と同義）と縮合させることで目的とする化合物を得ることができる。なお、CH_3CH_2－Ｏ－ＣＯ－Ｑ４’－ＣＯ－ＯＨ（Ｑ４’は前記と同義）および

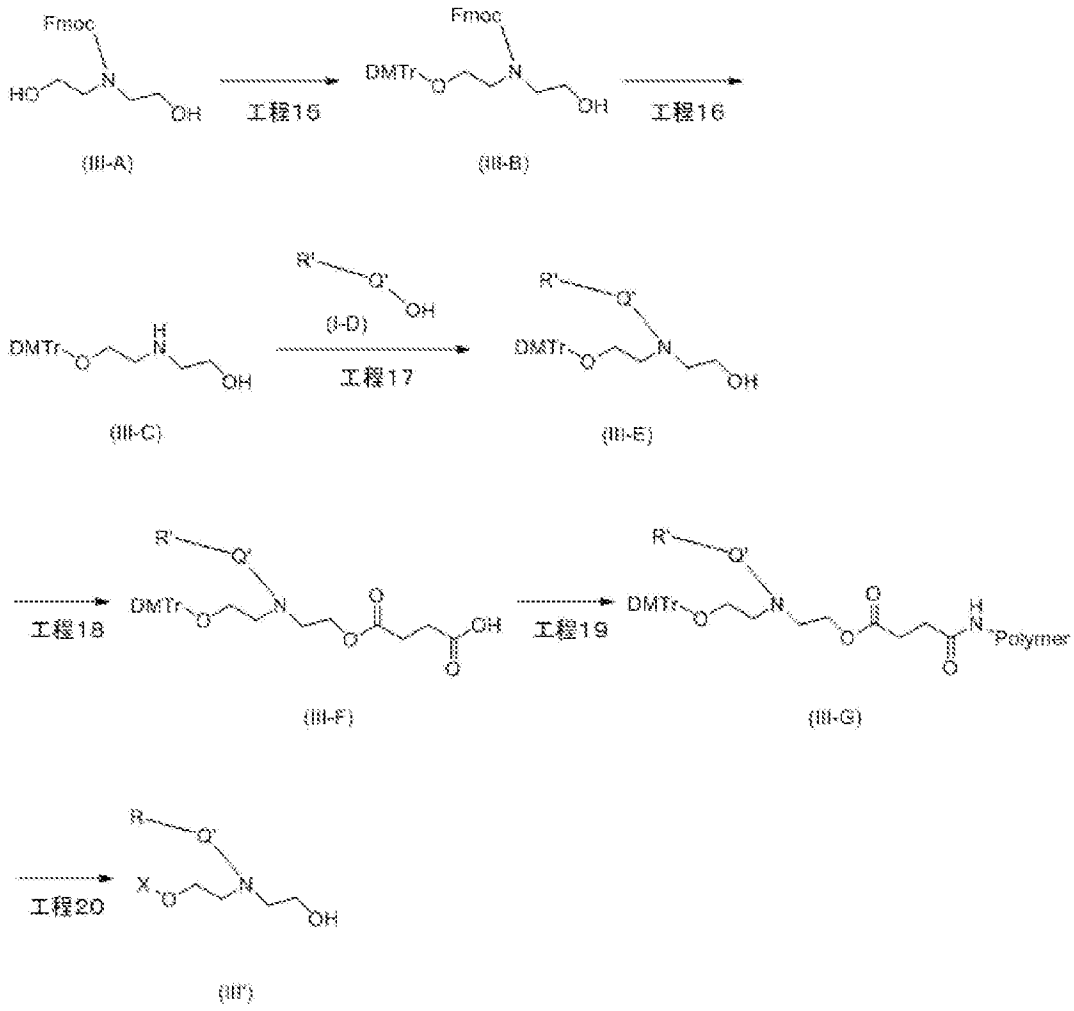
R’－NH_2（R’は前記と同義）は、公知の方法（例えば、Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｓｏｃｉｅｔｙ，１３６，１６９５８（２０１４）を参照）もしくはそれに準じた方法で得ることができる。

[0099] Ｑが－ＣＯ－である場合を例示して示しているが、Ｑが－ＣＯ－でない場合の化合物についても、Ｑの構造を適宜変更することにより、上記と同様の方法、公知の方法またはこれらを組み合わせ、適宜反応条件を変更することにより調製することができる。

[0100] 製造方法３

本発明における核酸誘導体は、式（ＩＩＩ’）で表される部分構造を有する化合物の製造方法として、その製造方法を例示することができる。

[0101] [化119]



（式中、ＤＭＴｒ、Ｆｍｏｃ、Ｒ、Ｒ’、Ｑ’、ＸおよびＰｏｌｙｍｅｒは前記と同義である。）

[0102] 化合物（ＩＩＩ’）は、化合物（ＩＩＩ－Ａ）を用い、製造方法１の工程１から工程６と同様の条件にて製造する事ができる。なお、化合物（ＩＩＩ－Ａ）は市販品として得ることができる。

[0103] 工程１５

化合物（ＩＩＩ－Ｂ）は、化合物（ＩＩＩ－Ａ）を用い、製造法１の工程１と同様の条件にて製造することができる。

化合物（ＩＩＩ－Ａ）は市販品として購入することができる。

[0104] 工程１６

化合物（ＩＩＩ－Ｃ）は、化合物（ＩＩＩ－Ｂ）を用い、製造法１の工程２と同様の条件にて製造することができる。

[0105] 工程１７

化合物（ＩＩＩ－Ｅ）は、化合物（ＩＩＩ－Ｃ）を用い、製造法１の工程３と同様の条件にて製造することができる。

[0106] 工程１８～２０

化合物（ＩＩＩ’）は、化合物（ＩＩＩ－Ｅ）を用い、製造方法１の工程４～工程６と同様の条件にて製造することができる。

[0107] また、上記工程１７において、必要により、化合物（Ｉ－Ｄ）を二つのユニットに分割し、２段階に分けて化合物（ＩＩＩ－Ｃ）と縮合することで行うこともできる。具体的には、例えばＲ－Ｑ’が－ＮＨ－ＣＯ－Ｑ４’－ＣＯ－である場合（Ｑ４’は置換もしくは無置換の炭素数１～１２のアルキレン）、工程１７において、化合物（ＩＩＩ－Ｃ）と、CH_3CH_2－Ｏ－ＣＯ－Ｑ４’－ＣＯ－ＯＨ（Ｑ４’は前記と同義）とを、工程１７と同様の方法で縮合させ、得られた化合物のエチルエステルをエタノールや水等の溶媒中、水酸化リチウム等の塩基で加水分解した後に、さらにＲ’－NH_2（Ｒ’は前記と同義）と縮合させることで目的とする化合物を得ることができる。なお、CH_3CH_2－Ｏ－ＣＯ－Ｑ４’－ＣＯ－ＯＨ（Ｑ４’は前記と同義）お

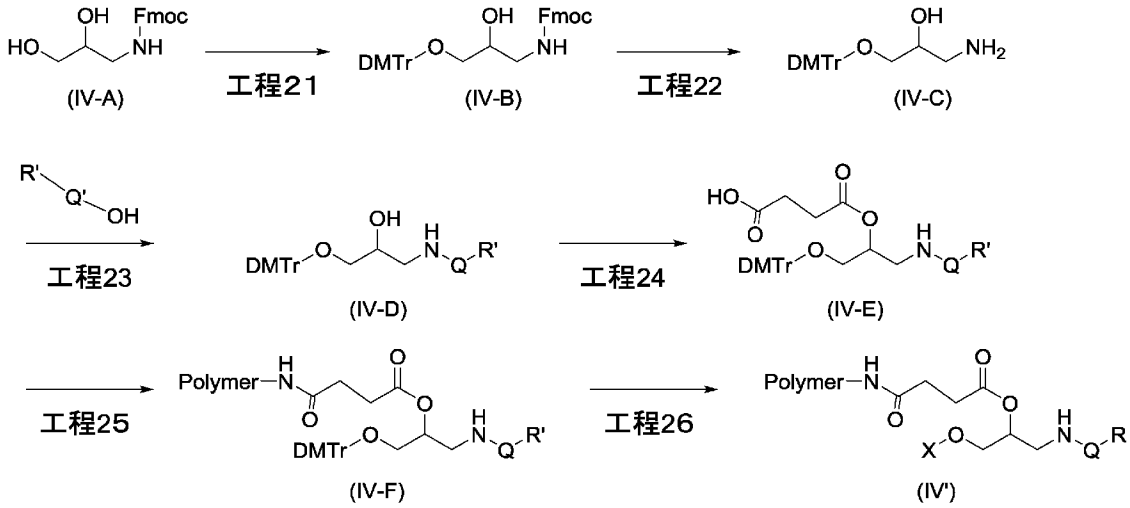
よびR’－NH_2（R’は前記と同義）は、公知の方法（例えば、Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｓｏｃｉｅｔｙ，１３６，１６９５８（２０１４）を参照）もしくはそれに準じた方法で得ることができる。

[0108] Ｑが－ＣＯ－である場合を例示して示しているが、Ｑが－ＣＯ－でない場合の化合物についても、Ｑの構造を適宜変更することにより、上記と同様の方法、公知の方法またはこれらを組み合わせ、適宜反応条件を変更することにより調製することができる。

[0109] 製造方法４

本発明における核酸誘導体は、式（ＩＶ’）で表される部分構造を有する化合物の製造方法として、その製造方法を例示することができる。

[0110] [化120]



（式中、ＤＭＴｒ、Ｆｍｏｃ、Ｒ、Ｒ’、Ｑ’、ＸおよびＰｏｌｙｍｅｒは前記と同義である。）

[0111] 化合物（ＩＶ’）は、化合物（ＩＶ－Ａ）を用い、製造方法１の工程１から工程６と同様の条件にて製造する事ができる。なお、化合物（ＩＶ－Ａ）は市販品として得ることができる。

[0112] また、上記工程２３において、必要により、化合物（Ｉ－Ｄ）を二つのユニットに分割し、２段階に分けて化合物（ＩＶ－Ｃ）と縮合することで行うこともできる。具体的には、例えばＲ’－Ｑ’が－ＮＨ－ＣＯ－Ｑ４’－Ｃ

Ｏ－である場合（Ｑ４’は置換もしくは無置換の炭素数１～１２のアルキレンである）、工程２３において、化合物（ＩＶ－Ｃ）と、CH_3CH_2－Ｏ－ＣＯ－Ｑ４’－ＣＯ－ＯＨ（Ｑ４’は前記と同義）とを、工程２３と同様の方法で縮合させ、得られた化合物のエチルエステルをエタノールや水等の溶媒中、水酸化リチウム等の塩基で加水分解した後に、さらにＲ’－NH_2（Ｒ’は前記と同義）と縮合させることで目的とする化合物を得ることができる。なお、CH_3CH_2－Ｏ－ＣＯ－Ｑ４’－ＣＯ－ＯＨ（Ｑ４’は前記と同義）およびＲ’－ＮＨ２（Ｒ’は前記と同義）は、公知の方法（例えば、Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｓｏｃｉｅｔｙ，１３６，１６９５８（２０１４）を参照）もしくはそれに準じた方法で得ることができる。

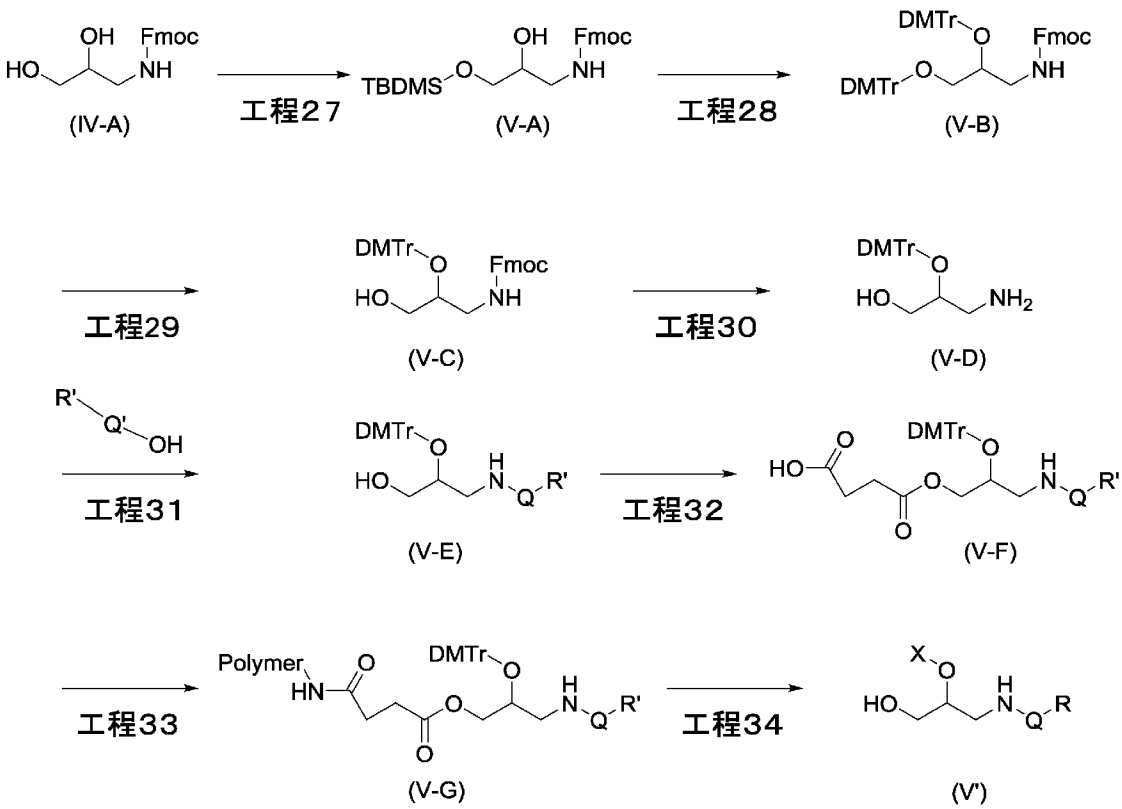
[0113] Ｑが－ＣＯ－である場合を例示して示しているが、Ｑが－ＣＯ－でない場合の化合物についても、Ｑの構造を適宜変更することにより、上記と同様の方法、公知の方法またはこれらを組み合わせ、適宜反応条件を変更することにより調製することができる。

[0114] 製造方法５

本発明における核酸誘導体は、式（Ｖ’）で表される部分構造を有する化合物の製造方法として、その製造方法を例示することができる。

[0115]

[化121]



（式中、ＤＭＴｒ、Ｒ、Ｒ’、Ｘ、Ｑ’、ＴＢＤＭＳ、ＦｍｏｃおよびＰｏｌｙｍｅｒは前記と同義。）

[0116] 化合物（Ｖ’）は、化合物（ＩＶ－Ａ）を用い、製造方法２の工程１から工程７と同様の条件にて製造する事ができる。なお、化合物（ＩＶ－Ａ）は市販品として得ることができる。

[0117] また、上記工程３１において、必要により、化合物（Ｉ－Ｄ）を二つのユニットに分割し、２段階に分けて化合物（Ｖ－Ｄ）と縮合することで行うこともできる。具体的には、例えばＲ’－Ｑ’が－ＮＨ－ＣＯ－Ｑ４’－ＣＯ－である場合（Ｑ４’は置換もしくは無置換の炭素数１～１２のアルキレンである）、工程３１において、化合物（Ｖ－Ｄ）と、CH_3CH_2－Ｏ－ＣＯ－Ｑ４’－ＣＯ－ＯＨ（Ｑ４’は前記と同義）とを、工程３１と同様の方法で縮合させ、得られた化合物のエチルエステルをエタノールや水等の溶媒中、水酸化リチウム等の塩基で加水分解した後に、さらにＲ’－NH_2（Ｒ’は前記と同義）と縮合させることで目的とする化合物を得ることができる。な

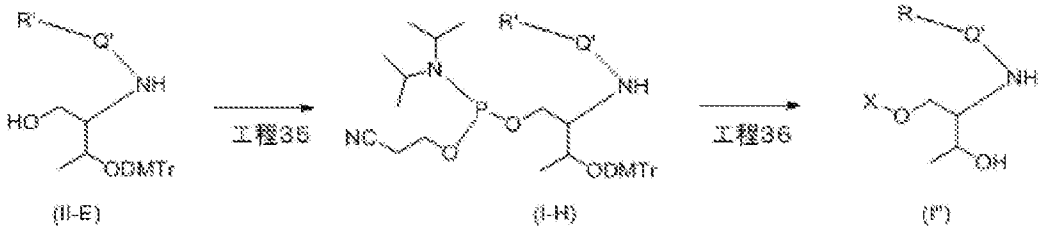
お、CH_3CH_2－Ｏ－ＣＯ－Ｑ４’－ＣＯ－ＯＨ（Ｑ４’は前記と同義）およびＲ’－NH_2（Ｒ’は前記と同義）は、公知の方法（例えば、Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｓｏｃｉｅｔｙ，１３６，１６９５８（２０１４）を参照）もしくはそれに準じた方法で得ることができる。

[0118] Ｑが－ＣＯ－である場合を例示して示しているが、Ｑが－ＣＯ－でない場合の化合物についても、Ｑ－ＯＨの構造を適宜変更することにより、上記と同様の方法、公知の方法またはこれらを組み合わせ、適宜反応条件を変更することにより調製することができる。

[0119] 製造方法６

オリゴヌクレオチドの５’末端に糖リガンド－テザー－ブランチャーユニットが結合した、本発明の核酸複合体の製造方法を以下に例示する。

[0120] [化122]



（式中、Ｒ、Ｒ’、Ｑ’、ＤＭＴｒおよびＸは前記と同義である）

[0121] 工程３５

化合物（Ｉ－Ｈ）は、化合物（ＩＩ－Ｅ）と２－シアノエチル－Ｎ，Ｎ，Ｎ’，Ｎ’－テトライソプロピルホスホジアミダイトを、無溶媒でまたは溶媒中、塩基および反応促進剤共存下、室温と２００℃の間の温度で、５分間～１００時間反応させることにより製造することができる。

溶媒としては、製造方法１の工程２で例示したものが挙げられる。

塩基としては、製造方法１の工程３で例示したものが挙げられる。

反応促進剤としては、例えば、１Ｈ－テトラゾール、４，５－ジシアノイミダゾール、５－エチルチオテトラゾール、５－ベンジルチオテトラゾール等があげられ、市販品として購入できる。

[0122] 工程３６

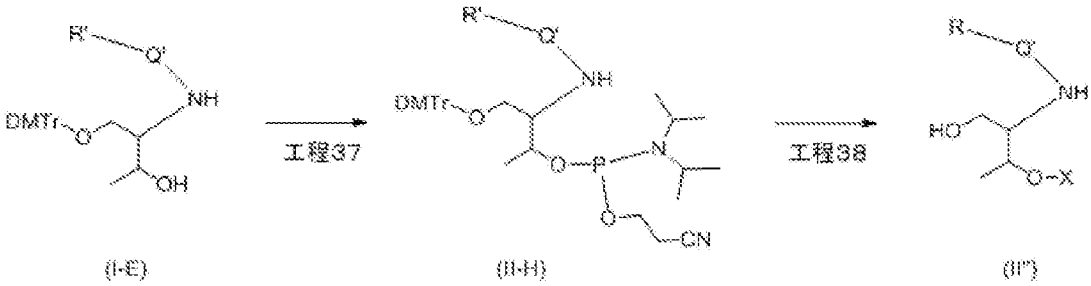
オリゴヌクレオチド鎖を伸長し、最後に化合物（Ｉ－Ｈ）を用い、オリゴヌクレオチドの５’末端を糖リガンド－テザー－ブランチャーユニットで修飾した後、固相からの脱離、保護基の脱保護および精製を行うことにより、化合物(I’’)を製造することができる。ここで、固相からの脱離、保護基の脱保護および精製は、それぞれ製造方法１の工程７と同様にして製造できる。

[0123] 製造方法７

オリゴヌクレオチドの５’末端に糖リガンド－テザー－ブランチャーユニットが結合した、本発明の核酸複合体の製造方法を以下に例示する。

[0124] 製造方法６の工程３５および３６と同様の条件にて製造することができる。

[化123]



(I-E) (II-H) (II")

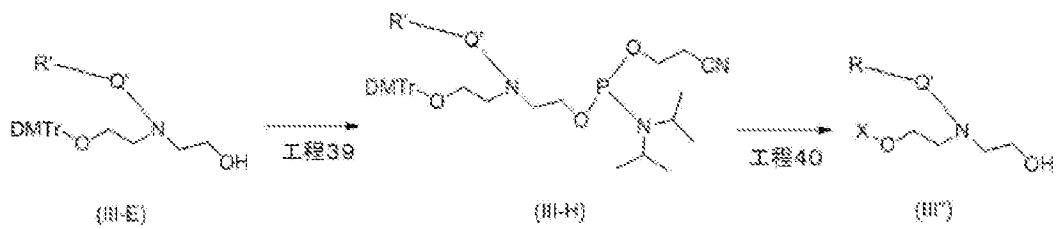
（式中、Ｒ、Ｒ’、Ｑ’、ＤＭＴｒおよびＸは前記と同義である）

[0125] 製造方法８

オリゴヌクレオチドの５’末端に糖リガンド－テザー－ブランチャーユニットが結合した、本発明の核酸複合体の製造方法を以下に例示する。

[0126] 製造方法６の工程３５および３６と同様の条件にて製造することができる。

[化124]



(III-E) (III-H) (III")

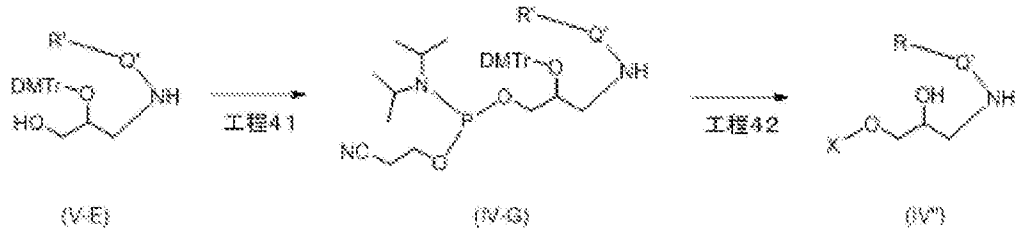
（式中、Ｒ、Ｒ’、Ｑ’、ＤＭＴｒおよびＸは前記と同義である）

[0127] 製造方法９

オリゴヌクレオチドの５’末端に糖リガンド－テザー－ブランチャーユニットが結合した、本発明の核酸複合体の製造方法を以下に例示する。

[0128] 製造方法６の工程３５および３６と同様の条件にて製造することができる。

[0129] [化125]



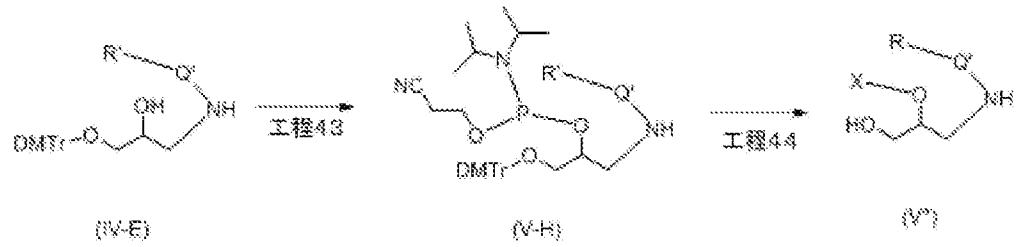
（式中、Ｒ、Ｒ’、Ｑ’、ＤＭＴｒおよびＸは前記と同義である）

[0130] 製造方法１０

オリゴヌクレオチドの５’末端に糖リガンド－テザー－ブランチャーユニットが結合した、本発明の核酸複合体の製造方法を以下に例示する。

[0131] 製造方法６の工程３５および３６と同様の条件にて製造することができる。

[0132] [化126]



（式中、Ｒ、Ｒ’、Ｑ’、ＤＭＴｒおよびＸは前記と同義である）

[0133] 製造方法１１

二本鎖核酸を構成するセンス鎖の３末端’または５’末端に糖リガンド－テザー－ブランチャーユニットを有するセンス鎖と、二本鎖核酸を構成するアンチセンス鎖とを、水または適当な緩衝液にそれぞれ溶解し、混合することにより二本鎖核酸を有する核酸複合体を得ることができる。

緩衝液としては、例えば酢酸緩衝液、トリス緩衝液、クエン酸緩衝液、リン酸緩衝液、水等が挙げられ、これらを単独または混合して用いられる。

[0134] センス鎖とアンチセンス鎖の混合比としては、センス鎖１当量に対してアンチセンス鎖が０．５～２当量が好ましく、０．９～１．１当量がより好ましく、０．９５当量～１．０５当量がさらに好ましい。

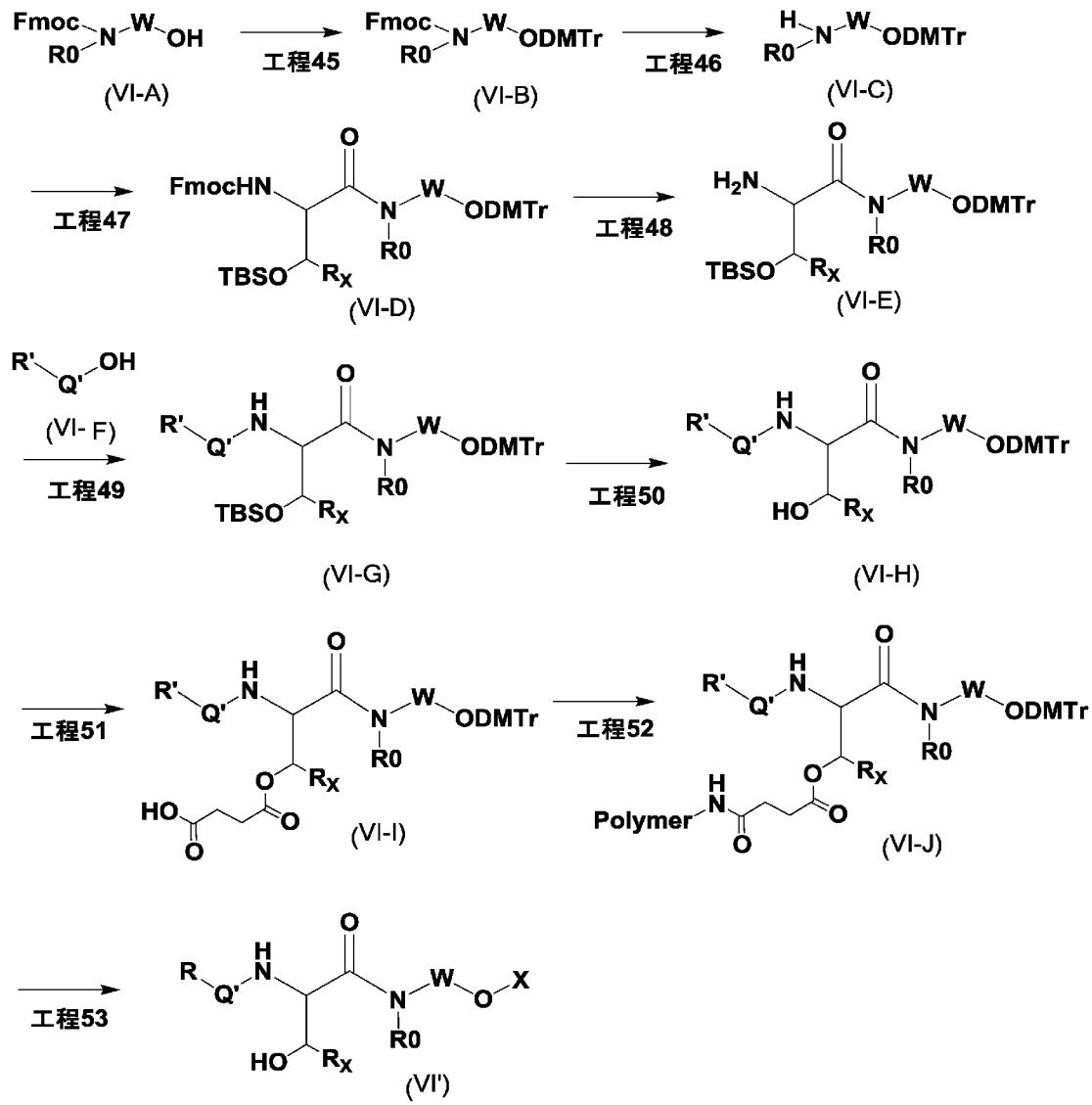
[0135] また、該センス鎖と該アンチセンス鎖を混合後、適宜アニーリング処理を行ってもよい。アニーリング処理は、センス鎖とアンチセンス鎖の混合物を、好ましくは５０～１００℃、より好ましくは６０～１００℃、さらに好ましくは８０～１００℃に加熱した後に、室温まで徐冷することにより行うことができる。

[0136] アンチセンス鎖は、上記の公知オリゴヌクレオチド合成法に準じて得ることができる。

[0137] 製造方法１２

本発明における核酸誘導体は、式（ＶＩ’）で表される部分構造を有する化合物の製造方法として、その製造方法を例示する事ができる。

[化127]



（式中、ＤＭＴｒ、Ｒ、Ｒ’、Ｘ、Ｑ’、Ｐｏｌｙｍｅｒ、ＴＢＳおよびＦｍｏｃは前記と同義であり、Ｒ０およびＲｘは、同一または異なって、水素原子、Ｃ１～Ｃ１０のアルキレンまたはＣ３－Ｃ８のシクロアルキレンを表し、Ｗはｃ１～Ｃ１０のアルキレン、Ｃ３－Ｃ８のシクロアルキレンであるか、Ｒ０と一緒になって、Ｃ４－Ｃ８の含窒素複素環を形成してもよい。）

[0138] 工程４５

化合物（ＶＩ－Ｂ）は化合物（ＶＩ－Ａ）を用い、製造方法１の工程１と同様の条件にて製造する事ができる。

化合物（ＶＩ－Ａ）は市販品として、または公知の方法（例えばバイオオ

ーガニック・アンド・メディシナル・ケミストリー・レターズ，第１１巻，３８３－３８６頁）もしくはそれに準じた方法で得る事ができる。

[0139] 工程４６

化合物（ＶＩ－Ｃ）は化合物（ＶＩ－Ｂ）を用い、製造方法１の工程２と同様の条件にて製造する事ができる。

[0140] 工程４７

化合物（ＶＩ－Ｄ）は化合物（ＶＩ－Ｃ）を用い、製造方法１の工程３と同様の条件にて製造する事ができる。

[0141] 工程４８

化合物（ＶＩ－Ｅ）は化合物（ＶＩ－Ｄ）を用い、製造方法１の工程２と同様の条件にて製造する事ができる。

[0142] 工程４９

化合物（ＶＩ－Ｇ）は化合物（ＶＩ－Ｅ）と化合物（ＶＩ－Ｆ）とを用い、製造方法１の工程３と同様の条件にて製造する事ができる。

[0143] 工程５０

化合物（ＶＩ－Ｈ）は化合物（ＶＩ－Ｇ）を用い、製造方法２の工程９と同様の条件にて製造する事ができる。

[0144] 工程５１～５３

化合物（ＶＩ’）は化合物（ＶＩ－Ｈ）、化合物（ＶＩ－Ｉ）および化合物（ＶＩ－Ｊ）を用い、製造方法１の工程４～６と同様の条件にて製造する事ができる。

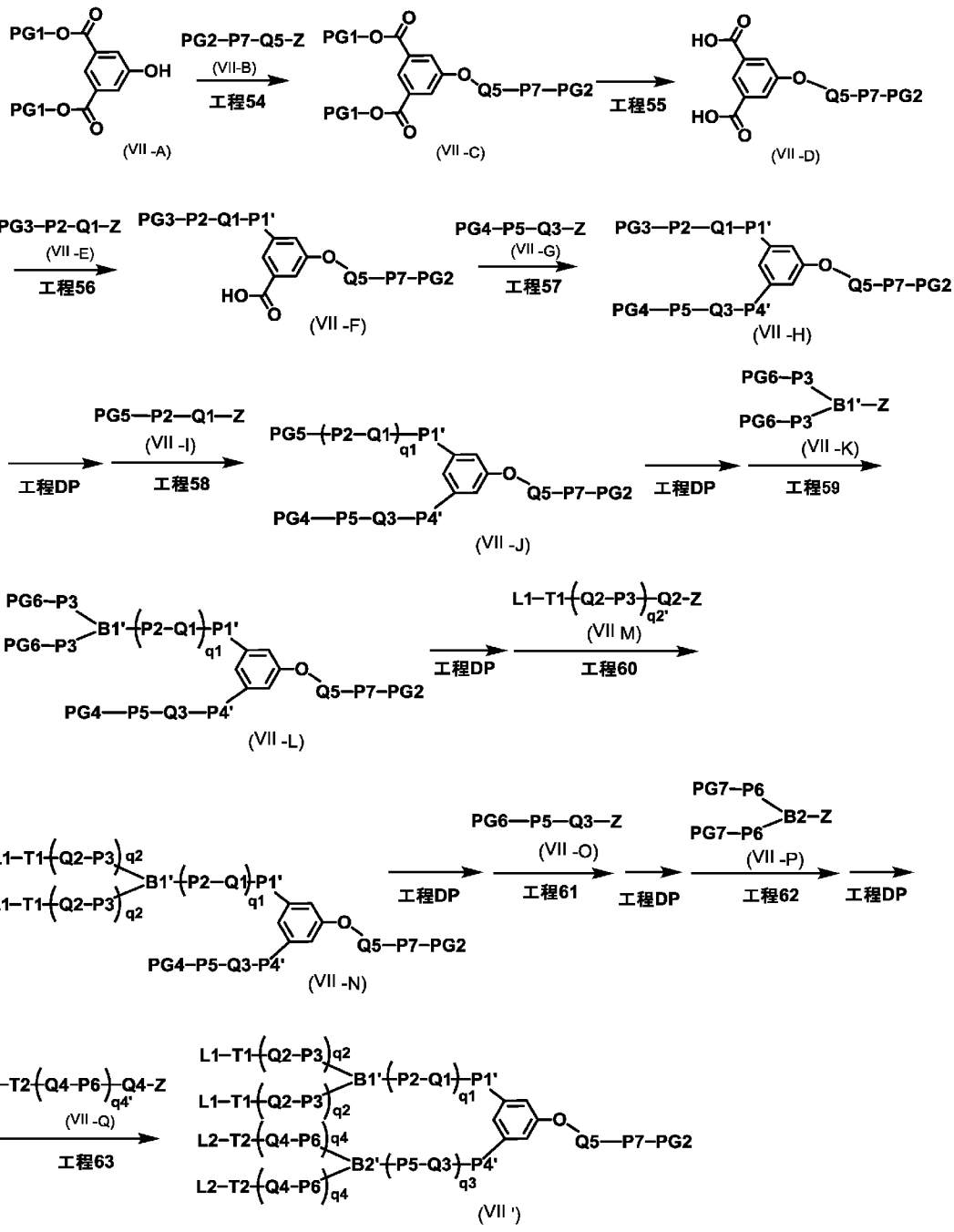
[0145] 工程４５～５３は公知の方法（例えば国際公開第２０１５／１０５０８３号記載の方法）、またはそれに準じた方法でも実施する事ができる。

化合物（ＶＩ－Ｆ）は公知の方法（例えば、ジャーナル・オブ・アメリカン・ケミカル・ソサイエティ（Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｓｏｃｉｅｔｙ），１３６巻，１６９５８頁，２０１４年記載の方法）、またはそれに準じた方法で得る事ができる。

[0146] 製造方法１３

式２においてＰ１およびＰ４が－ＮＨ－ＣＯ－、－Ｏ－ＣＯ－または－Ｓ－ＣＯ－である、糖リガンド－テザー－ユニットは以下の方法で製造することができる。

[化128]

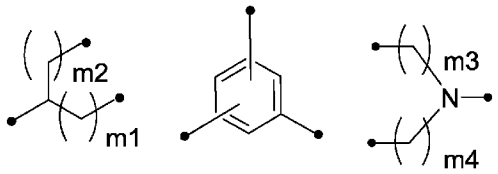


（式中、Ｑ１、Ｑ２、Ｑ３、Ｑ４、Ｑ５、Ｐ２、Ｐ３、Ｐ５、Ｐ６、Ｐ７、Ｔ１、Ｔ２、Ｌ１、Ｌ２、ｑ１、ｑ２、ｑ３およびｑ４はそれぞれ前記と同義であり、ｑ１’はｑ１より１小さい整数を表し、ｑ２’はｑ２より１小さい

整数を表し、Ｐ１’およびＰ４’は、それぞれ独立して、－ＣＯ－Ｏ－、－ＣＯ－ＮＨ－または－ＣＯ－Ｓ－を表し、ＺはＨ、ＯＨ、NH_2、ＳＨ、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子、メタンスルホニルオキシ、p-トルエンスルホニルオキシまたはカルボン酸を表し、Ｂ１’およびＢ２’は下記式の構造体のいずれか１つを表し、ＰＧ１、ＰＧ２、ＰＧ３、ＰＧ４、ＰＧ５、ＰＧ６およびＰＧ７はそれぞれ適切な保護基を表す。）

式：

[化129]



ｍ１、ｍ２、ｍ３またはｍ４はそれぞれ独立して、０～１０の整数を表す。

[0147] 工程５４

化合物（ＶＩＩ－Ｃ）は、化合物（ＶＩＩ－Ａ）と化合物（ＶＩＩ－Ｂ）を、テトロヒドロフラン等の溶媒中、トリフェニルホスフィンポリマー担持体を加え、氷冷下、ジイソプロピルアゾジカルボキシレートトルエン溶液を反応させる事により製造する事ができる。

溶媒としては製造工程１の工程２で例示したものが挙げられる。

化合物（ＶＩＩ－Ａ）は市販品として得る事ができる。

[0148] 工程５５

化合物（ＶＩＩ－Ｄ）は化合物（ＶＩＩ－Ｃ）を用い、メタノール等の溶媒中、氷冷下、塩基の存在下、反応させる事により製造する事ができる。

溶媒としては、製造工程１の工程２で例示したものが挙げられる。

塩基としては、製造工程１の工程３で例示したものが挙げられる。

[0149] 工程５６

化合物（ＶＩＩ－Ｆ）は化合物（ＶＩＩ－Ｄ）および化合物（ＶＩＩ－Ｅ）を用い、製造工程１の工程３と同様の条件で製造する事ができる。

[0150] 工程５７

化合物（ＶＩＩ－Ｈ）は化合物（ＶＩＩ－Ｆ）および化合物（ＶＩＩ－Ｇ）を用い、製造工程１の工程３と同様の条件で製造する事ができる。

[0151] 工程５８

化合物（ＶＩＩ－Ｊ）は化合物（ＶＩＩ－Ｈ）および化合物（ＶＩＩ－Ｉ）を用い、製造工程１の工程３と同様の条件で製造する事ができる。

[0152] 工程５９

化合物（ＶＩＩ－Ｌ）は化合物（ＶＩＩ－Ｊ）および化合物（ＶＩＩ－Ｋ）を用い、製造工程１の工程３と同様の条件で製造する事ができる。

[0153] 工程６０

化合物（ＶＩＩ－Ｎ）は化合物（ＶＩＩ－Ｌ）および化合物（ＶＩＩ－Ｍ）を用い、製造工程１の工程３と同様の条件で製造する事ができる。

[0154] 工程６１～６３

化合物（ＶＩＩ’）は化合物（ＶＩＩ－Ｏ）、化合物（ＶＩＩ－Ｐ）および化合物　（ＶＩＩ－Ｑ）を用い、製造工程１の工程３と同様の条件で製造する事ができる。

工程ＤＰ

有機合成化学で常用される方法［例えば、プロテクティブ・グループス・イン・オーガニック・シンセシス第３版（Ｐｒｏｔｅｃｔｉｖｅ　Ｇｒｏｕｐｓ　ｉｎ　Ｏｒｇａｎｉｃ　Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ，　ｔｈｉｒｄ　ｅｄｉｔｉｏｎ）、グリーン（Ｔ．Ｗ．Ｇｒｅｅｎｅ）著、Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ　Ｉｎｃ．（１９９９年）等に記載の方法等］を適切に用いることで製造することができる。

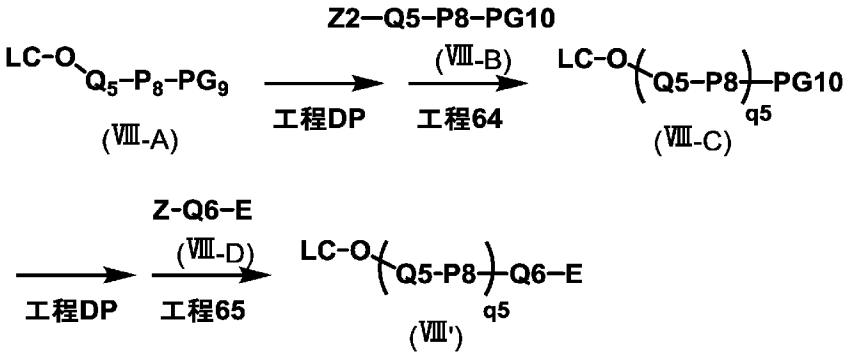
化合物（ＶＩＩ－Ｂ）、化合物（ＶＩＩ－Ｅ）、化合物（ＶＩＩ－Ｇ）、化合物（ＶＩＩ－Ｉ）、化合物（ＶＩＩ－Ｋ）、化合物（ＶＩＩ－Ｍ）、化合物（ＶＩＩ－Ｏ）、化合物（ＶＩＩ－Ｐ）および化合物（ＶＩＩ－Ｑ）は市販品として、または「実験化学講座第４版　有機合成、ｐ．　２５８、丸善（１９９２年）」、「Ｍａｒｃｈ’ｓ　Ａｄｖａｎｃｅｄ　Ｏｒｇａｎｉｃ　Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ：　Ｒｅａｃｔｉｏｎｓ，　Ｍｅｃｈａｎｉｓｍｓ

，　ａｎｄ　Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ，　７ｔｈ　Ｅｄｉｔｉｏｎ」に記載の方法を組み合わせる事、もしくはそれに準じた方法で得る事ができる。

[0155]　製造方法１４

式４においてＰ７が－Ｏ－である、ユニットは以下の方法で製造することができる。

[化130]



（式中、Ｑ５、Ｑ６、Ｐ８、ｑ５はそれぞれ前記と同義であり、Ｚ２はＨ、ＯＨ、NH_2またはＳＨを表し、ＰＧ９およびＰＧ１０はそれぞれ適切な保護基を表し、ＬＣは糖リガンド－テザーユニットを表し、Ｅはカルボン酸またはマレイミドを表す。）

[0156] 工程６４

化合物（ＶＩＩＩ－Ｃ）は化合物（ＶＩＩＩ－Ａ）および化合物（ＶＩＩＩ－Ｂ）を用い、製造工程１の工程３と同様の条件で製造する事ができる。

化合物（ＶＩＩＩ－Ｂ）は市販品として、または「実験化学講座第４版有機合成、ｐ．　２５８、丸善（１９９２年）」、「Ｍａｒｃｈ’ｓ　Ａｄｖａｎｃｅｄ　Ｏｒｇａｎｉｃ　Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ：　Ｒｅａｃｔｉｏｎｓ，　Ｍｅｃｈａｎｉｓｍｓ，　ａｎｄ　Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ，　７ｔｈ　Ｅｄｉｔｉｏｎ」に記載の方法を組み合わせる事、もしくはそれに準じた方法で得る事ができる。

[0157] 工程６５

化合物（ＶＩＩＩ’）は化合物（ＶＩＩＩ－Ｃ）および化合物（ＶＩＩＩ－Ｄ）を用い、製造工程１の工程３と同様の条件で製造する事ができる。

化合物（ＶＩＩＩ－Ｄ）は市販品として、または「実験化学講座第４版有機合成、ｐ．　２５８、丸善（１９９２年）」、「Ｍａｒｃｈ’ｓ　Ａｄｖａｎｃｅｄ　Ｏｒｇａｎｉｃ　Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ：　Ｒｅａｃｔｉｏｎｓ，　Ｍｅｃｈａｎｉｓｍｓ，　ａｎｄ　Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ，　７ｔｈ　Ｅｄｉｔｉｏｎ」に記載の方法を組み合わせる事、もしくはそれに準じた方法で得る事ができる。

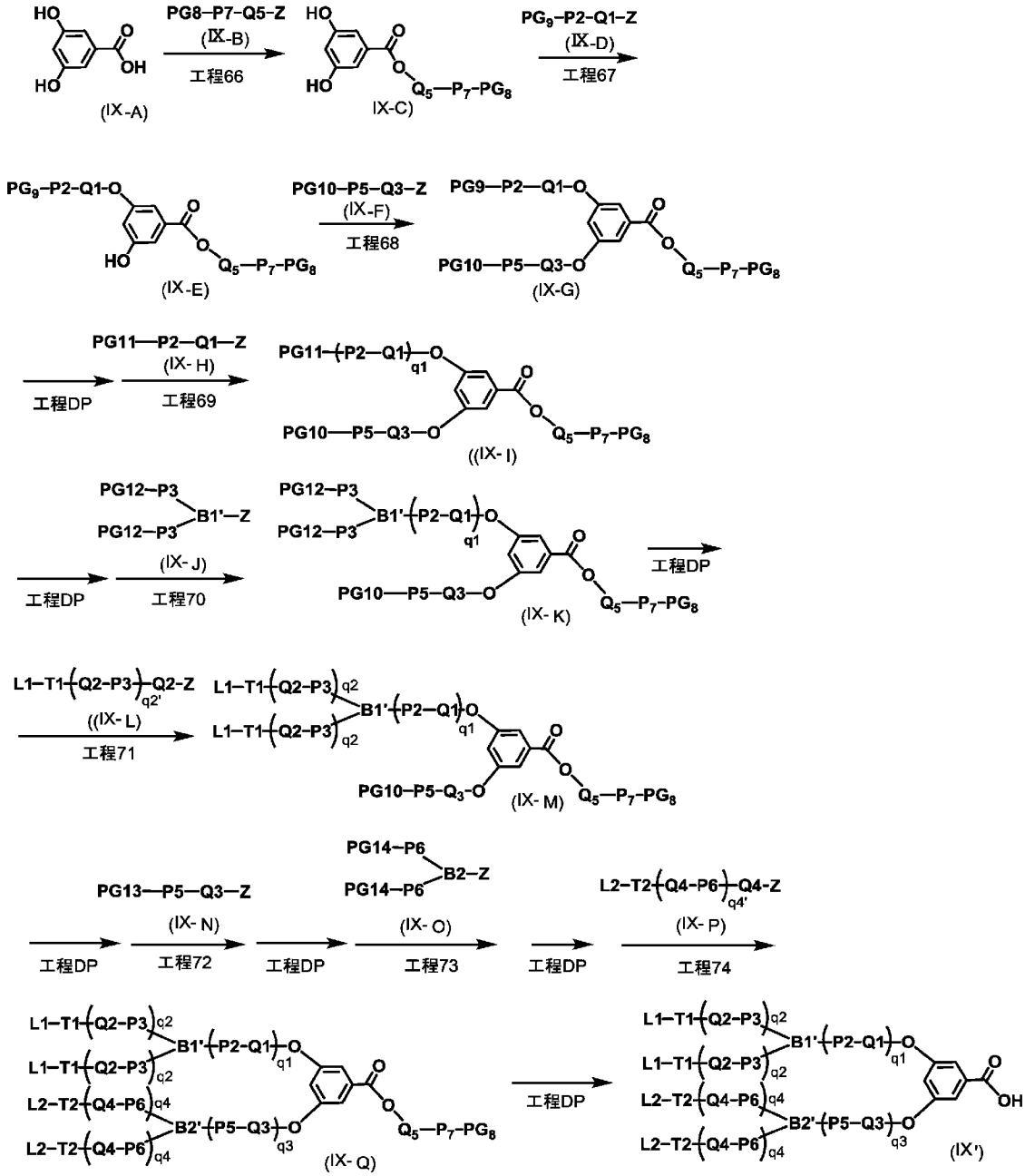
[0158] 工程ＤＰ

有機合成化学で常用される方法［例えば、プロテクティブ・グループス・イン・オーガニック・シンセシス第３版（Ｐｒｏｔｅｃｔｉｖｅ　Ｇｒｏｕｐｓ　ｉｎ　Ｏｒｇａｎｉｃ　Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ，　ｔｈｉｒｄ　ｅｄｉｔｉｏｎ）、グリーン（Ｔ．Ｗ．Ｇｒｅｅｎｅ）著、Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ　Ｉｎｃ．（１９９９年）等に記載の方法等］を適切に用いることで製造することができる。

[0159] 製造方法１５

式２においてＰ１およびＰ４が－Ｏ－である、糖リガンド－テザーユニットは以下の方法で製造することができる。

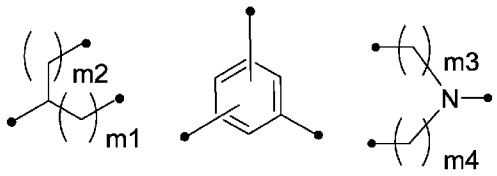
[化131]



（式中、Ｑ１、Ｑ２、Ｑ３、Ｑ４、Ｐ２、Ｐ３、Ｐ５、Ｐ６、Ｔ１、Ｔ２、Ｌ１、Ｌ２、ｑ１、ｑ２、ｑ３、ｑ４、Ｚ、Ｂ１’またはＢ２’はそれぞれ前記と同義であり、ｑ１’はｑ１より１小さい整数を表し、ｑ２’はｑ２より１小さい整数を表し、ＰＧ８、ＰＧ９、ＰＧ１０、ＰＧ１１、ＰＧ１２、ＰＧ１３およびＰＧ１４はそれぞれ適切な保護基を表す）

式：

[化132]



ｍ１、ｍ２、ｍ３およびｍ４は前記と同義である。

[0160] 工程６６

化合物（ＩＸ－Ｃ）は化合物（ＩＸ－Ａ）と化合物（ＩＸ－Ｂ）をＮ，Ｎ’－ジメチルホルムアミドな等の溶媒に溶解し、炭酸水素カリウム等の塩基を加えて、室温～２００℃にて５分間～１００時間反応させる事により製造する事ができる。

溶媒としては、製造工程１の工程２に例示したものが挙げられる。

塩基としては、製造工程１の工程３で例示したものが挙げられる。

[0161] 工程６７

化合物（ＩＸ－Ｅ）は化合物化合物（ＩＸ－Ｃ）と化合物（ＩＸ－Ｄ）をＮ，　Ｎ’－ジメチルホルムアミド等の溶媒に溶解し、炭酸水素カリウム等の塩基を加えて、室温～２００℃で５分間～１００時間反応させる事により製造する事ができる。

溶媒としては、製造工程１の工程２で例示したものが挙げられる。

塩基としては、製造工程１の工程３で例示したものが挙げられる。

化合物（ＩＸ－Ａ）は市販品として得る事ができる。

[0162] 工程６８

化合物（ＩＸ－Ｇ）は化合物（ＩＸ－Ｅ）および化合物（ＩＸ－Ｆ）を用い、製造工程１の工程３と同様の条件で製造する事ができる。

[0163] 工程６９

化合物（ＩＸ－Ｉ）は化合物（ＩＸ－Ｇ）および化合物（ＩＸ－Ｈ）を用い、製造工程１の工程３と同様の条件で製造する事ができる。

[0164] 工程７０

化合物（ＩＸ－Ｋ）は化合物（ＩＸ－Ｉ）および化合物（ＩＸ－Ｊ）を用

い、製造工程１の工程３と同様の条件で製造する事ができる。

[0165] 工程７１

化合物（ＩＸ－Ｍ）は化合物（ＩＸ－Ｋ）および化合物（ＩＸ－Ｌ）を用い、製造工程１の工程３と同様の条件で製造する事ができる。

[0166] 工程７２－７４

化合物（ＩＸ’）は化合物（ＩＸ－Ｍ）、化合物（ＩＸ－Ｎ）、化合物（ＩＸ－Ｏ）および化合物（ＩＸ－Ｐ）を用い、製造工程１の工程３と同様の条件で製造する事ができる。

[0167] 工程ＤＰ

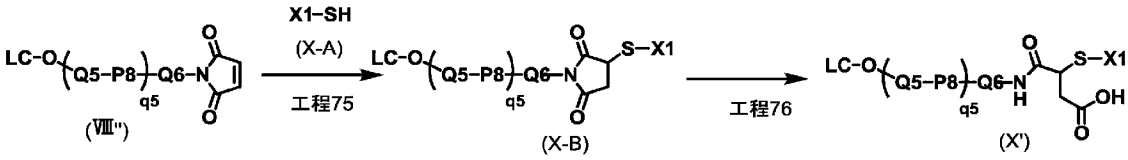
有機合成化学で常用される方法［例えば、プロテクティブ・グループス・イン・オーガニック・シンセシス第３版（Ｐｒｏｔｅｃｔｉｖｅ Ｇｒｏｕｐｓ ｉｎ Ｏｒｇａｎｉｃ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ, ｔｈｉｒｄ ｅｄｉｔｉｏｎ）、グリーン（Ｔ．Ｗ．Ｇｒｅｅｎｅ）著、Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ Ｉｎｃ．（１９９９年）等に記載の方法等］を適切に用いることで製造することができる。

[0168] 化合物（ＩＸ’－Ｂ）、化合物（ＩＸ’－Ｄ）、化合物（ＩＸ’－Ｆ）、化合物（ＩＸ’－Ｈ）、化合物（ＩＸ’－Ｊ）、化合物（ＩＸ’－Ｌ）、化合物（ＩＸ’－Ｎ）、化合物（ＩＸ’－Ｏ）および化合物（ＩＸ’－Ｐ）は市販品として、または「実験化学講座第４版　有機合成、ｐ．　２５８、丸善（１９９２年）」、「Ｍａｒｃｈ’ｓ Ａｄｖａｎｃｅｄ Ｏｒｇａｎｉｃ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ： Ｒｅａｃｔｉｏｎｓ, Ｍｅｃｈａｎｉｓｍｓ, ａｎｄ Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ, ７ｔｈ Ｅｄｉｔｉｏｎ」に記載の方法を組み合わせる事、もしくはそれに準じた方法で得る事ができる。

[0169] 製造方法１６

式１～式７の核酸複合体の製造方法として、以下の方法も用いる事ができる。

[化133]



（式中、ＬＣ、Ｑ５、Ｐ８、Ｑ６、は前記と同義であり、Ｘ１－ＳＨはＳＨで置換されたＣ１～Ｃ１０アルキル基を含む構造を末端に有するオリゴヌクレオチドを表す）

[0170] 工程７５

化合物（Ｘ－Ｂ）は化合物（ＶＩＩＩ’’）と化合物（Ｘ－Ａ）を溶媒中、０℃～１００℃で１０秒間～１００時間反応させる事により製造する事ができる。

溶媒としては水、リン酸緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液、ジメチルスルホキシド等があげられ、これらは単独でまたは混合して用いられる。

化合物（ＶＩＩＩ’）は製造法１４を用いることで、得ることができる。

[0171] 化合物（Ｘ－Ｂ）は公知の方法（例えばバイオコンジュゲート・ケミストリー（Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ　Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ），第２１巻，１８７－２０２頁，２０１０年、またはカレント・プロトコールズ・イン・ヌクレイック・アシッド・ケミストリー（Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄ　Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ），２０１０年，９月；ＣＨＡＰＴＥＲ：Ｕｎｉｔ　４．４１）もしくはそれに準じた方法で得る事もできる。

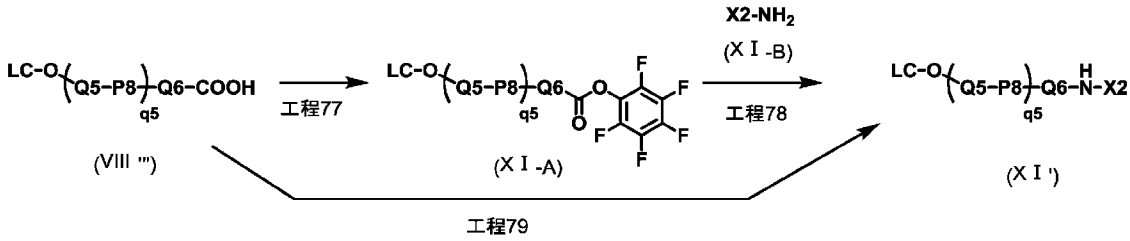
[0172] 工程７６

化合物（Ｘ’）は化合物（Ｘ－Ｂ）を用いて炭酸ナトリウム水溶液またはアンモニア水中等ｐＨ８以上の条件下、室温と２００℃の間の温度で、５分間～１００時間反応させる事により製造する事ができる。

[0173] 製造方法１７

式１～式７の核酸複合体の製造方法として、以下の方法も用いる事ができる。

[化134]



（式中、ＬＣ、Ｑ５、Ｐ８、Ｑ６、は前記と同義であり、Ｘ２－ＮＨ$_2$はＮＨ$_2$で置換されたＣ１－Ｃ１０アルキル基を含む構造を末端に有するオリゴヌクレオチドを表す）

[0174] 工程７７

化合物（ＸＩ－Ａ）は化合物（ＶＩＩＩ’’’）を用いて、公知の方法（例えばバイオコンジュゲート・ケミストリー（Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ），第２６巻，１４５１－１４５５頁，２０１５年に記載の方法）またはそれに準じた方法で得る事ができる。

化合物（ＶＩＩＩ’’’）は製造法１４を用いることで、得ることができる。

[0175] 工程７８

化合物（ＸＩ’）は化合物（ＸＩ－Ｂ）を用いて、公知の方法（例えばバイオコンジュゲート・ケミストリー（Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ），第２６巻，１４５１－１４５５頁，２０１５年に記載の方法）またははそれに準じた方法で得る事ができる。

[0176] 工程７９

また別の方法として、化合物（ＸＩ’）は、公知の方法（例えばバイオコンジュゲートケミストリー（Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ），第２２巻，１７２３－１７２８頁，２０１１年を参照）あるいははそれに準じた方法で、化合物（ＸＩ－Ａ）から直接得る事ができる。

[0177] 本明細書における核酸複合体は、例えば酸付加塩、金属塩、アンモニウム塩、有機アミン付加塩、アミノ酸付加塩等の塩として得ることも可能である。

[0178] 酸付加塩としては、例えば塩酸塩、硫酸塩、リン酸塩等の無機酸塩、酢酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、クエン酸塩、メタンスルホン酸塩等の有機酸塩が挙げられ、金属塩としては、例えばナトリウム塩、カリウム塩等のアルカリ金属塩、マグネシウム塩、カルシウム塩等のアルカリ土類金属塩、アルミニウム塩、亜鉛塩等が挙げられ、アンモニウム塩としては、例えばアンモニウム、テトラメチルアンモニウム等の塩が挙げられ、有機アミン付加塩としては、例えば、モルホリン、ピペリジン等の付加塩が挙げられ、アミノ酸付加塩としては、例えば、リジン、グリシン、フェニルアラニン等の付加塩が挙げられる。

[0179] 本明細書の核酸複合体の塩を調製したい場合には、該複合体が所望の塩の形で得られるときはそのまま精製すればよく、また、遊離の形で得られるときは、該複合体を適当な溶媒に溶解または懸濁し、対応する酸または塩基を加え、単離・精製すればよい。また、該複合体塩を形成する対イオンを異なる対イオンに変換する際には、該複合体塩を適当な溶媒に溶解または懸濁した後、酸、塩基および／または塩（塩化ナトリウム、塩化アンモニウム等の無機塩等）を数当量～大過剰量加えて単離、精製すればよい。

[0180] 本明細書の核酸複合体の中には、幾何異性体、光学異性体等の立体異性体、互変異性体等が存在し得るものもあるが、全ての可能な異性体およびそれらの混合物も本発明に包含される。

[0181] また、本明細書の核酸複合体は、水または各種溶媒との付加物の形で存在することもああり、これらの付加物も本発明に包含される。

[0182] さらに、本発明の核酸複合体は、分子中の一部あるいは全部の原子が質量数の異なる原子（同位体）（例えば、重水素原子等）で置換されたものも包含される。

[0183] 本発明の医薬組成物は、式１で表される核酸複合体を含む。本発明の核酸複合体は、Ｌ１およびＬ２の糖リガンドを有することにより、標的細胞に認識され、細胞内に導入される。

本発明の核酸複合体は、哺乳動物に投与して、生体内において、標的遺伝

子の発現を低下または停止させることで抑制し、標的遺伝子に関連する疾患の治療に用いることができる。

本発明の核酸複合体を治療剤または予防剤として使用する場合、投与経路としては、治療に際し最も効果的な投与経路を使用するのが望ましく、特に限定されるものではないが、例えば、静脈内投与、皮下投与及び筋肉内投与等が挙げられ、好ましくは静脈内投与である。

投与量は、投与対象の病状や年齢、投与経路等によって異なるが、例えば二本鎖のオリゴヌクレオチドに換算した1日投与量が0.1μg～1000 mgとなるように投与すればよく、1日投与量が1～100 mgとなるように投与することがより好ましい。

[0184] 静脈内投与または筋肉内投与に適当な製剤としては、例えば注射剤があげられ、調製した液剤をそのまま例えば注射剤等の形態として用いることも可能であるが、該液剤から例えば濾過、遠心分離等によって溶媒を除去して使用することも、該液剤を凍結乾燥して使用する、および/または例えばマンニトール、ラクトース、トレハロース、マルトースもしくはグリシン等の賦形剤を加えた液剤を凍結乾燥して使用することもできる。

注射剤の場合、液剤または溶媒を除去または凍結乾燥した組成物に、例えば水、酸、アルカリ、種々の緩衝液、生理食塩水またはアミノ酸輸液等を混合して注射剤を調製することが好ましい。また、例えばクエン酸、アスコルビン酸、システインもしくはEDTA等の抗酸化剤、またはグリセリン、ブドウ糖もしくは塩化ナトリウム等の等張化剤等を添加して注射剤を調製することも可能である。また、例えばグリセリン等の凍結保存剤を加えて凍結保存することもできる。

実施例

[0185] 次に、参考例、実施例および試験例により、本発明を具体的に説明する。ただし、本発明はこれら実施例および試験例に限定されるものではない。なお、実施例および参考例に示されたプロトン核磁気共鳴スペクトル(^{1}H NMR)は、270MHz、300MHzまたは400MHzで測定されたものであり、化合物および測定

条件によっては交換性プロトンが明瞭には観測されないことがある。また、シグナルの多重度の表記としては通常用いられるものを用いているが、brとはbroadを意味し、見かけ上幅広いシグナルであることを表す。

UPLC分析は以下の条件を用いた。

移動相A： 0.1%ギ酸含有水溶液、B; アセトニトリル溶液

グラジエント： 移動相Bが10%-90%のリニアグラジエント（3分間）

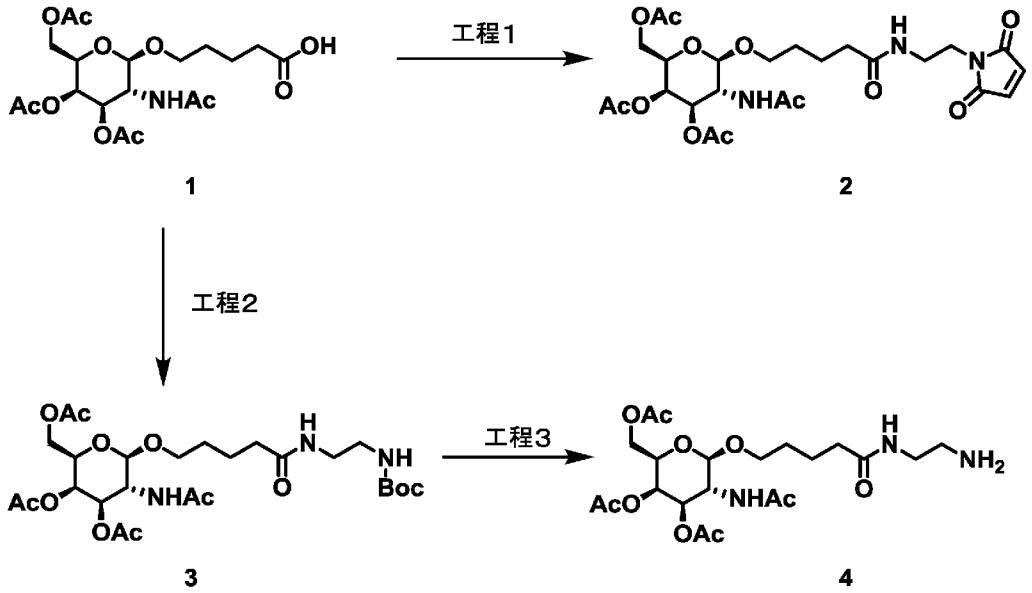
カラム： Waters社製ACQUITY UPLC BEH C18 (1.7 μm、内経 2.1 x 50 mm)

流速： 0.8 mL/min

PDA検出波長： 254 nm（検出範囲190-800 nm）

[0186] 参考例1 糖リガンドユニットの合成

[化135]



[0187] 化合物2の合成

工程１

ジャーナル・オブ・アメリカン・ケミカル・ソサイエティー（Journal of American Chemical Society), 第136巻, 16958-16961頁, 2014年に記載された方法で合成した化合物1 (0.8755 g, 1.9567 mmol)をテトラヒドロフラン（10 mL)に溶解し、1, 3－ジシクロヘキサンカルボジイミド (DCC, 0.4247 g, 2.0584 mmol)とN-ヒドロキシスクシミド (0.2412 g, 2.0958 mmol)を室温にて一晩撹拌した。反応混合物から析出した固体を除き、減圧下、溶媒を留去

した。得られた混合物をN, N'-ジメチルホルムアミド (DMF)に溶解し、2-アミノエチルマレイミド臭酸塩 (0.6479 g, 2.5491 mmol)とジイソプロピルエチルアミン (1.7 mL, 9.7835 mmol)を加えた後、室温で一晩撹拌した。減圧下、反応液の溶媒を留去し、逆相カラムクロマトグラフィー (水/メタノール=80/20)で溶出させることにより、化合物2 (0.8502 g, 収率76%)を得た。

ESI-MS m/z: 570 $(M + H)^+$;

^{1}H-NMR (DMSO-D_6) δ: 1.45-1.56 (4H, m), 1.78 (3H, s), 1.90 (3H, s), 1.97 (2H, t, J= 7.0 Hz), 2.00 (3H, s), 2.11 (3H, s), 3.18-3.19 (2H, m), 3.38-3.45 (3H, m), 3.64-3.71 (1H, m), 3.85-3.89 (1H, m), 4.01-4.04 (3H, m), 4.48 (1H, d, J= 8.6 Hz), 4.95-4.98 (1H, m), 5.21 (1H, d, J = 3.5 Hz), 6.99 (2H, s), 7.81-7.87 (2H, m).

[0188] 化合物4の合成

工程2

工程1に記載の化合物1 (0.9602 g, 2.1460 mmol)をN,N'-ジメチルホルムアミド (10 mL)に溶解し、N-Boc-エチレンジアミン (シグマアルドリッチ社製, 0.6877 g, 4.292 mmol) 、ジイソプロピルエチルアミン (1.90 mL, 10.87 mmol)、および2-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウム ヘキサフルオロリン酸塩 (和光純薬工業社製, 1.6437 g, 4.3229 mmol)を加えて、室温にて終夜攪拌した。反応液に水を加え、クロロホルムで2回抽出した後、有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。減圧下、溶媒を留去し、化合物3の粗精製物を得た。

ESI-MS m/z: 590 $(M + H)^+$

[0189] 工程3

工程2で合成した化合物3 (1.2654 g, 2.1460 mmol)をジクロロメタン (15 mL)に溶解し、トリフルオロ酢酸 (4 mL)を加えて、室温にて一晩攪拌した。反応液に水を加え、酢酸エチルで抽出した後、有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。減圧下、溶媒を留去し、逆相カラムクロマトグラフィー (水/メタノール=80/20)で溶出させることにより、化合物4

(0.3879 g, 収率37 %)を得た。

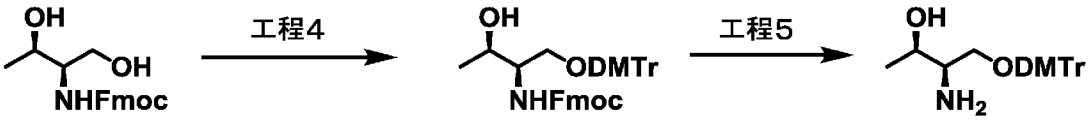
ESI-MS m/z: 490 $(M + H)^+$;

^{1}H-NMR (DMSO-D_6) δ: 1.46-1.52 (4H, m), 1.78 (3H, s), 1.90 (3H, s), 2.00 (3H, s), 2.08 (2H, t, J = 7.4 Hz), 2.11 (3H, s), 2.85 (2H, t, J = 6.3 Hz), 3.27 (2H, dd, J = 12.3, 6.2 Hz), 3.67-3.69 (1H, m), 3.68-3.73 (1H, m), 3.86-3.90 (1H, m), 4.01-4.04 (3H, m), 4.49 (1H, d, J = 8.4 Hz), 4.97 (1H, dd, J = 11.3, 3.4 Hz), 5.22 (1H, d, J = 3.5 Hz), 7.86 (1H, d, J = 9.1 Hz), 7.95-8.02 (1H, m).

[0190] 参考例2　ブランチャーユニットの合成

化合物７の合成

[化136]



5　　6　　7

[0191] 工程4

(9H-フルオレン-9-イル)メチル((2R,3R)-1,3-ジヒドロキシブタン-2-イル)カルバマート (化合物5, Chem-Impex International, Inc社製, 1.50 g, 4.58 mmol)をピリジン (20 mL)に溶解し、氷冷下、4,4'-ジメトキシトリチルクロライド (東京化成工業社製, 1.71 g, 5.04 mmol)を加えた後、室温にて2時間攪拌した。反応液を氷冷し、10%クエン酸水溶液を加え、酢酸エチルで抽出した後、有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。減圧下、溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル=90/10)で精製することにより、化合物6 (1.07 g, 収率37%)を得た。

ESI-MS m/z: 630 $(M + H)^+$

[0192] 工程5

工程4で合成した化合物6 (1.07 g, 1.699 mmol)をN,N-ジメチルホルムアミド (10 mL)に溶解し、室温にてピペリジン (0.336 mL, 3.40 mmol)を加えて3

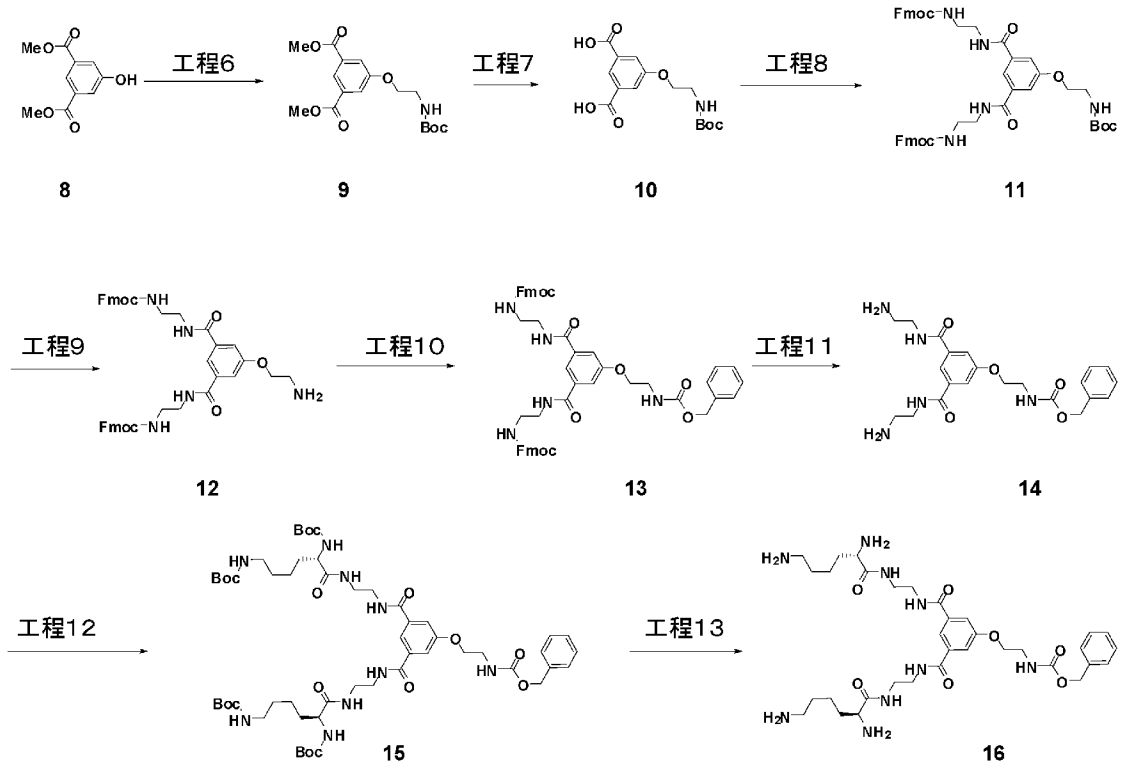
時間攪拌した。反応液に水を加え、酢酸エチルで抽出した後、有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。減圧下、溶媒を留去し、残渣をアミノシリカゲルカラムクロマトグラフィー（クロロホルム/メタノール=90/10)で精製することにより、化合物7（0.59 g，収率85 %)を得た。

ESI-MS m/z: 408 $(M + H)^+$

[0193] 実施例1　テザーユニットの合成1

化合物16の合成

[化137]



[0194] 工程6

5-ヒドロキシイソフタル酸ジメチル(化合物8，和光純薬工業社製，5.0443 g，24 mmol)をテトラヒドロフラン（和光純薬工業社製25 mL)に溶解し、2-(tert-ブトキシカルボニルアミノ)-1-エタノール（東京化成工業社製，4.0343 g，25.03 mmol）、およびトリフェニルホスフィン ポリマー担持体 （シグマアルドリッチ社製，6.61 g，25.2 mmol）を加えた後、氷冷下、40%ジイソプロピルアゾジカルボキシレート(DIAD)トルエン溶液（東京化成工業社製，13.26 mL，25.2 mmol)を加え、室温にて一晩攪拌した。反応液をろ過し、減圧下

、ろ液を留去した後、残渣をアミノシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン/酢酸エチル=95/5～80/20)で精製することにより、化合物9（5.3071 g，収率63%)を得た。

ESI-MS m/z: 254 $(M + H)^+$，脱Boc体として検出

[0195] 工程7

工程6で合成した化合物9（5.3071 g，15.02 mmol)をメタノール（25 mL)に溶解し、氷冷下、2mol/L水酸化ナトリウム水溶液（和光純薬工業社製，13 mL)を加え、室温にて4時間攪拌した。反応液を氷冷し、10%クエン酸水溶液を加え、酢酸エチルで抽出した後、有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。減圧下、溶媒を留去することにより、化合物10を定量的に得た。

ESI-MS m/z: 324 $(M - H)^-$

[0196] 工程8

工程7で合成した化合物10（1.9296 g，5.93 mmol)をN，N'-ジメチルホルムアミド（70 mL)に溶解し、N-1-(9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニル)-エチレンジアミン塩酸塩（3.3493 g，11.86mmol)、ジイソプロピルエチルアミン（5.18 mL，29.7 mmol)、および2-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロリン酸塩（4.5168 g，11.88 mmol)を加えて、室温にて4時間攪拌した。反応液を氷冷し、10%クエン酸水溶液を加え、クロロホルムで抽出した後、有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液および飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。減圧下、溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（クロロホルム/メタノール)で精製することにより、化合物11（3.4407 g，収率68%)を得た。

ESI-MS m/z: 898 $(M + HCOO)^-$

[0197] 工程9

工程8で合成した化合物11（1.6087 g，1.884 mmol)をジクロロメタン（20 mL)に溶解し、氷冷下、トリフルオロ酢酸（5mL，64.9 mmol)を加えて、室温

にて4時間攪拌した。反応液を減圧下、溶媒を留去することにより、化合物12（2.4079 g)を定量的に得た。

ESI-MS m/z: 798$(M + HCOO)^-$

[0198] 工程10

工程9で合成した化合物12（386 mg, 0.512 mmol)をテトラヒドロフラン（10 mL)に溶解し、氷冷下、塩化ベンゾイル（175 mg, 1.024mmol)を加えて、室温にて1時間攪拌した。反応液を減圧下、溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(クロロホルム/メタノール)で精製することにより、化合物13（373 mg, 収率82%)を得た。

ESI-MS m/z: 888$(M + H)^+$

[0199] 工程11

工程10で合成した化合物13（108 mg, 0.122 mmol)をジクロロメタン（5 mL)に溶解し、室温にてジエチルアミン（0.5 mL,4.8 mmol)を加えて1時間攪拌した。減圧下、溶媒を留去することにより、化合物14（54.9 mg)を定量的に得た。

ESI-MS m/z: 444$(M + H)^+$

[0200] 工程12

工程11で合成した化合物14（180 mg, 0.406 mmol)、Nα,Nε-ビス(tert-ブトキシカルボニル)-L-リジン（ノババイオケム社製, 295 mg, 0.852 mmol)、ジイソプロピルエチルアミン（0.354 mL,2.029 mmol)、および2-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロリン酸塩（324 mg, 0.852 mmol)を加えて、室温にて終夜攪拌した。反応液を氷冷し、10%クエン酸水溶液を加え、クロロホルムで抽出した後、有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。減圧下、溶媒を留去し、残渣をアミノシリカゲルカラムクロマトグラフィー（クロロホルム/メタノール)で精製することにより、化合物15（450 mg)を定量的に得た。

ESI-MS m/z: 1101$(M + H)^+$

[0201] 工程13

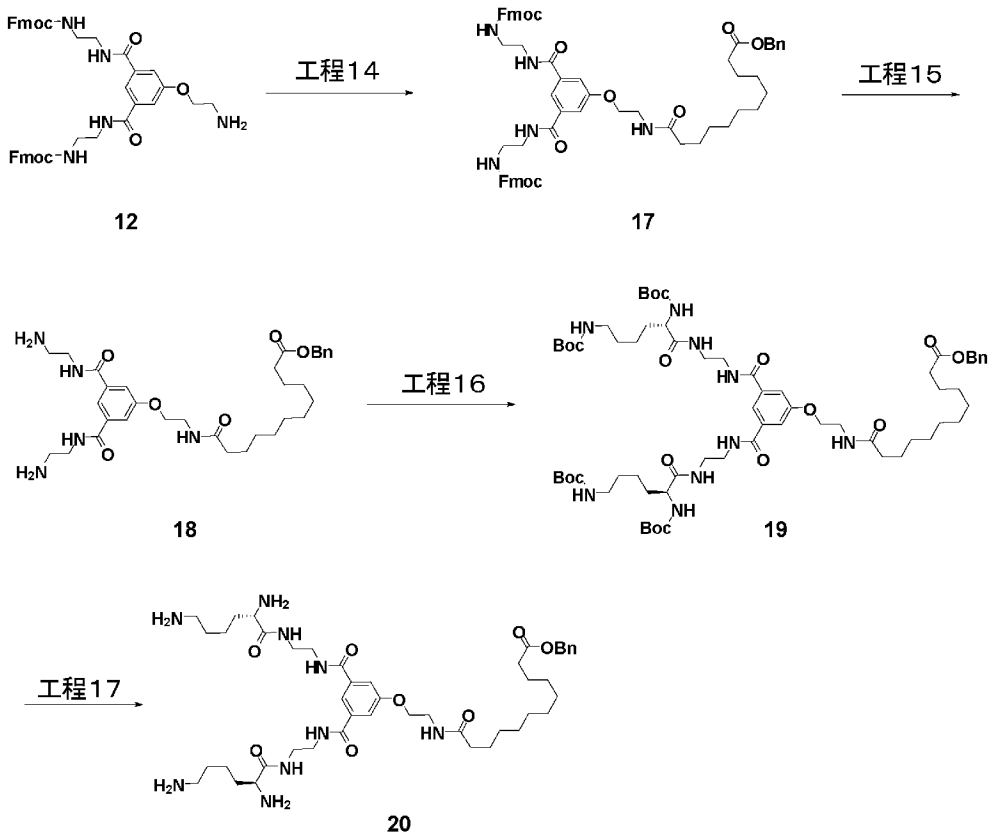
工程12で合成した化合物15 (2.1558 g, 1.9593 mmol)をジクロロメタン (20 mL)に溶解し、氷冷下、トリフルオロ酢酸 (5 mL)を加えて、室温にて4時間攪拌した。反応液を減圧下、溶媒を留去することにより、化合物16を定量的に得た。

ESI-MS m/z: 700(M + H)$^+$

[0202] 実施例2　テザーユニットの合成2

化合物20の合成

[化138]



[0203] 工程14

工程9で合成した化合物12 (0.5716 g, 0.7582 mmol)、バイオコンジュゲート・ケミストリー (Bioconjugate Chemistry), 第22巻, 690-699頁, 2011年に記載された方法で合成したドデカン酸モノベンジルエステル (0.4859 mg, 1.5164 mmol)、ジイソプロピルエチルアミン (0.662 mL, 3.79 mmol)、および2-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロリン酸塩 (0.5766 g, 1.516 mmol)をN,Nジメチルホルムアミド(12

mL)に溶解し、室温にて1時間攪拌した。反応液を氷冷し、飽和クエン酸水溶液を加え、クロロホルムで抽出した後、有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。減圧下、溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（クロロホルム/メタノール)で精製することにより、化合物17（0.88 g，収率84%)を得た。

ESI-MS m/z: 1057(M + H)$^+$

[0204] 工程15

工程14で合成した化合物17（0.7545 g，0.714 mmol)をジクロロメタンテトラヒドロフラン(20 mL)に溶解し、室温にてジエチルアミン（5 mL,47.9 mmol)を加えて終夜攪拌した。減圧下、溶媒を留去することにより、化合物18を定量的に得た。

ESI-MS m/z: 612(M + H)$^+$

[0205] 工程16

工程15で合成した化合物18（0.437 g，0.7143 mmol)、Nα,Nε-ビス(tert-ブトキシカルボニル)-L-リジン（ノババイオケム社製，0.5483 g，1.583 mmol)、ジイソプロピルエチルアミン（0.624 mL，3.57 mmol)、2-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロリン酸塩（0.5703 g，1.5 mmol)を加えて、室温にて2時間攪拌した。反応液に10%クエン酸水溶液を加え、酢酸エチルで抽出した後、有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。減圧下、溶媒を留去することにより、化合物19の粗生成物を得た。

ESI-MS m/z: 1269(M + H)$^+$

[0206] 工程17

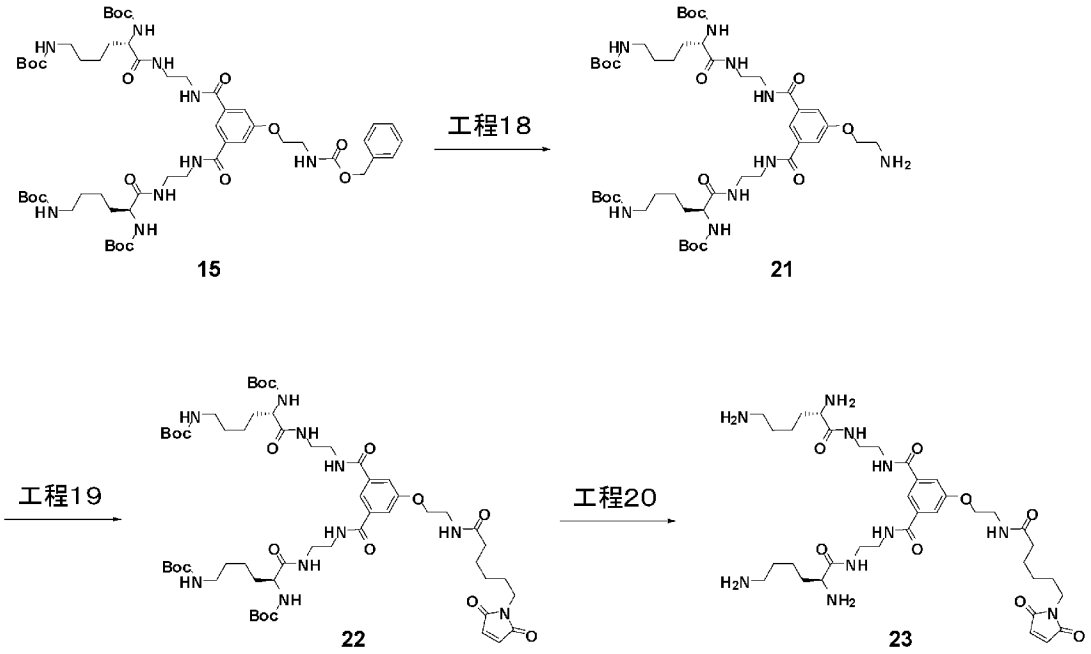
工程16で合成した化合物19（0.906 g，0.7143 mmol)をジクロロメタン（12 mL)に溶解し、氷冷下、トリフルオロ酢酸（3mL，38.9 mmol)を加えて、室温にて4時間攪拌した。反応液を減圧下、溶媒を留去することにより、化合物20の粗生成物を得た。

ESI-MS m/z: 869(M + H)$^+$

[0207] 実施例3　テザーユニットの合成3

化合物23の合成

[化139]



[0208] 工程18

工程12で合成した化合物15 (100 mg, 0.091 mmol)をメタノール (3 mL)に溶解し、酢酸 (2 μL)を添加した後、パラジウム/炭素による接触水素還元を行った。得られた溶液留分を減圧下、溶媒を留去することにより、化合物21を定量的に得た。

ESI-MS m/z: 967 $(M + H)^+$

[0209] 工程19

工程18で合成した化合物21 (50 mg, 0.052 mmol)およびN-(6-マレイミドカプロイルオキシ)スクシミド (48 mg, 0.155 mmol)をテトラヒドロフラン (2 mL)に溶解し、ジイソプロピルエチルアミン (0.045 mL, 0.259 mmol)を加えて、室温にて終夜攪拌した。減圧下、溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(クロロホルム/メタノール)で精製することにより、化合物22 (18 mg, 収率30%)を得た。

ESI-MS m/z: 1160 $(M + H)^+$

[0210] 工程20

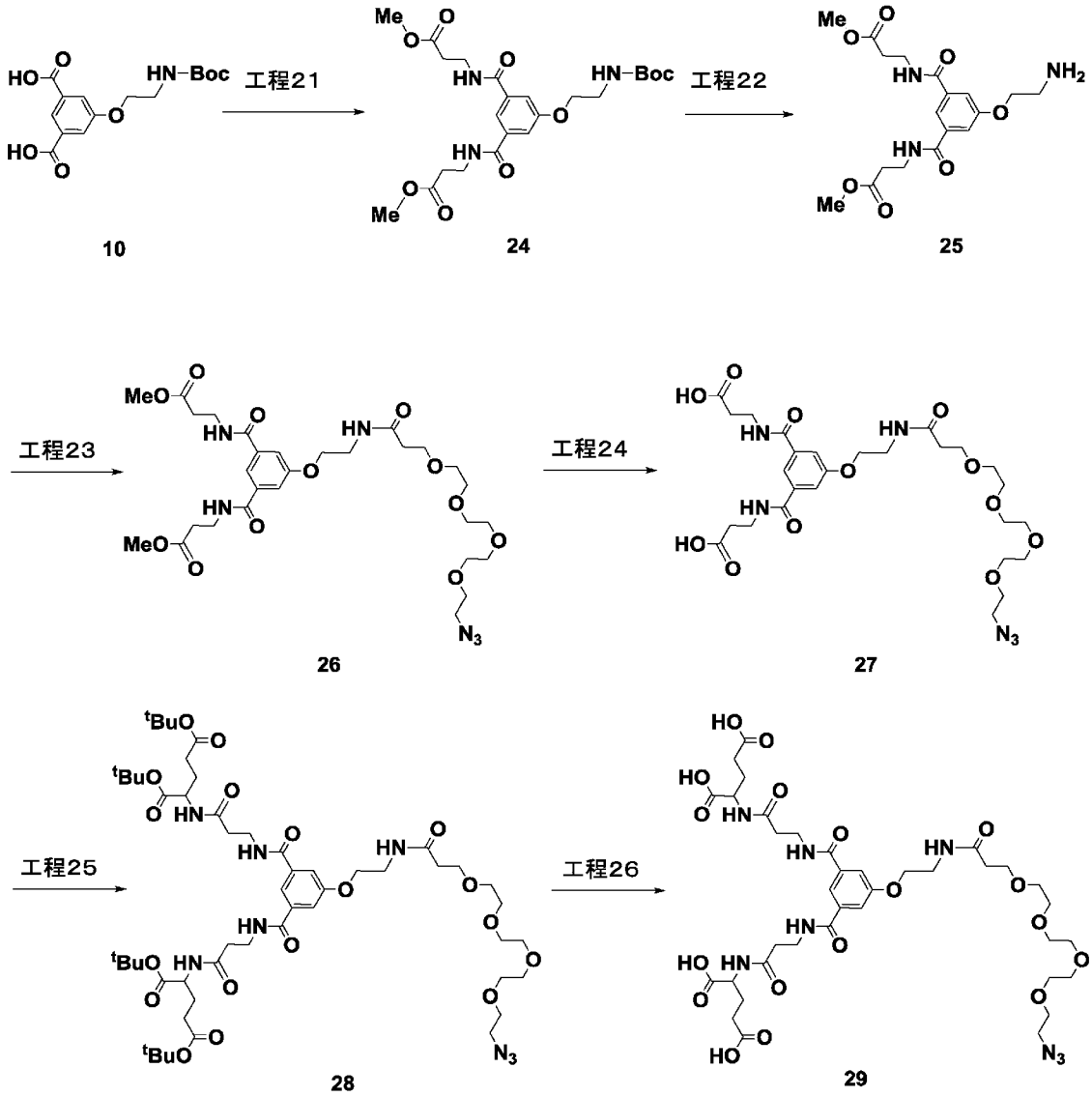
工程19で合成した化合物22（18 mg，0.016 mmol)をジクロロメタン（2 mL）に溶解し、氷冷下、トリフルオロ酢酸（0.2 mL，2.6 mmol)を加えて、室温にて終夜攪拌した。反応液を減圧下、溶媒を留去し、ジエチルエーテルにて晶析した後、化合物23（7.5 mg，収率64%)を白色固体として得た。

ESI-MS m/z: 759 $(M + H)^+$

[0211] 実施例4　テザーユニットの合成4

化合物29の合成

[化140]



[0212] 工程21

工程7で合成した化合物10（0.9372 g，2.8809 mmol)、β-アラニンメチル

エステル塩酸塩（東京化成工業株式会社製，0.8082 g，5.7902 mmol)を用い、実施例1の工程8と同様の方法で化合物24を定量的に得た。

ESI-MS m/z: 495 $(M + H)^+$

[0213] 工程22

工程21で合成した化合物24（0.9622 g，1.952 mmol)を用い、実施例1の工程9と同様の方法で化合物25を定量的に得た。

ESI-MS m/z: 396 $(M + H)^+$

[0214] 工程23

工程22で合成した化合物25（0.1146 g，0.290 mmol)およびN-スクシンイミジル15-アジド-4,7,10,13-テトラオキサペンタデカン酸(N3-PEG4-NHS，東京化成工業株式会社製，0.0750 g，0.1931 mmol)を用い、実施例3の工程19と同様の方法で化合物26を定量的に得た。

ESI-MS m/z: 669 $(M + H)^+$

[0215] 工程24

工程23で合成した化合物26（0.1291 g，0.193 mmol)を用い、実施例1の工程7と同様の方法で化合物27を定量的に得た。

ESI-MS m/z: 641 $(M + H)^+$

[0216] 工程25

工程24で合成した化合物27（0.1252 g，0.193 mmol)およびL-グルタミン酸ジ-tert-ブチルエステル（渡辺化学株式会社製，0.1180 g，0.399 mmol)を用い、実施例1の工程8と同様の方法で化合物28（0.0521 g，収率24%)を得た。

ESI-MS m/z: 1124 $(M + H)^+$

[0217] 工程26

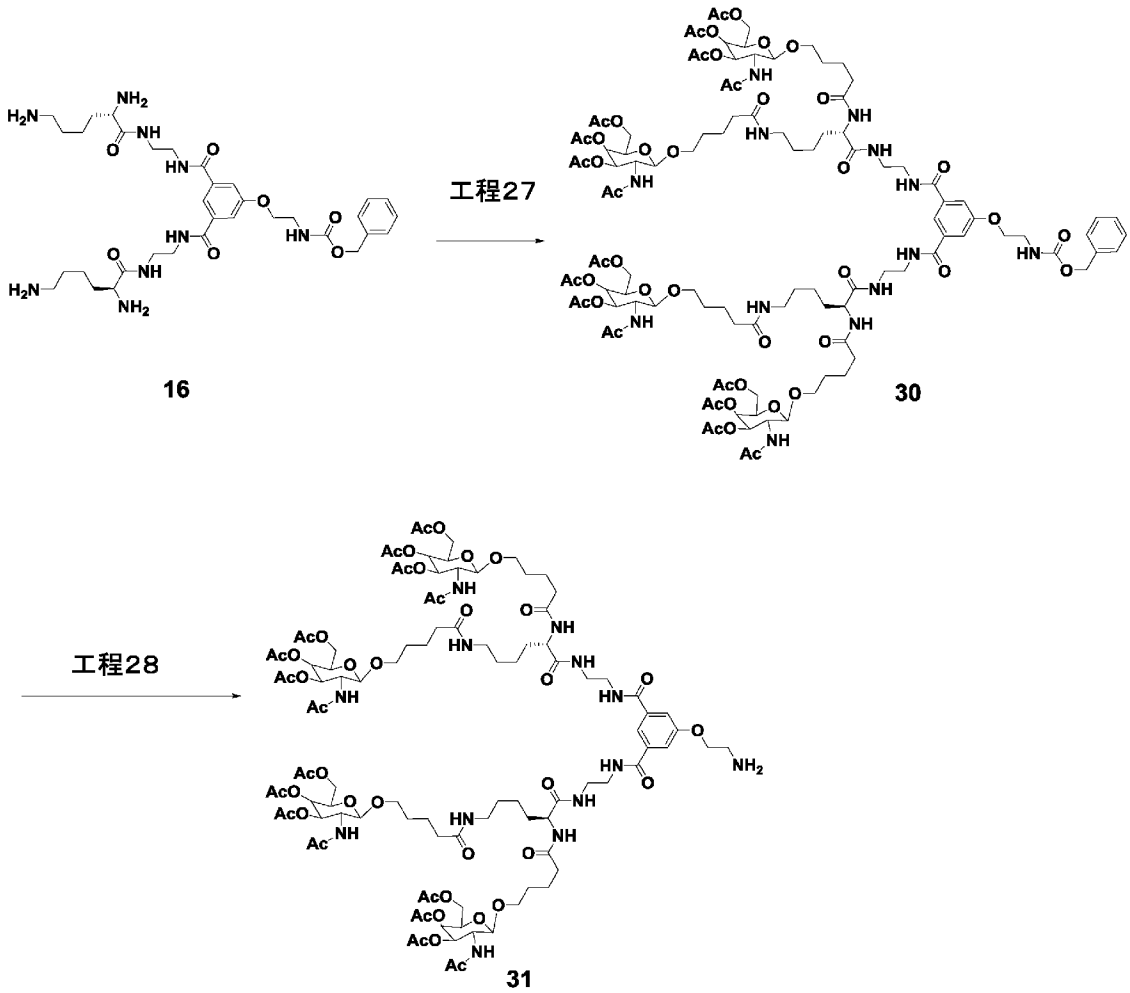
工程25で合成した化合物28（0.0521 g，0.0464 mmol)を用い 、実施例1の工程9と同様の方法で化合物29（36 mg，収率86%)を得た。

ESI-MS m/z: 899 $(M + H)^+$

[0218] 実施例5　糖リガンドーベンゼン環ユニットの合成1

化合物31の合成

[化141]



[0219] 工程27

工程13で合成した化合物16 (0.2586 g, 0.3695 mmol)とジャーナル・オブ・アメリカン・ケミカル・ソサイエティー (Journal of American Chemical Society), 第136巻, 16958-16961頁, 2014年に記載された方法で合成した化合物1 (0.8559 g, 1.7927 mmol)を用い、実施例1の工程8と同様の方法で化合物30 (0.5272 g, 収率61%)を得た。

ESI-MS m/z: 2418 $(M + H)^+$

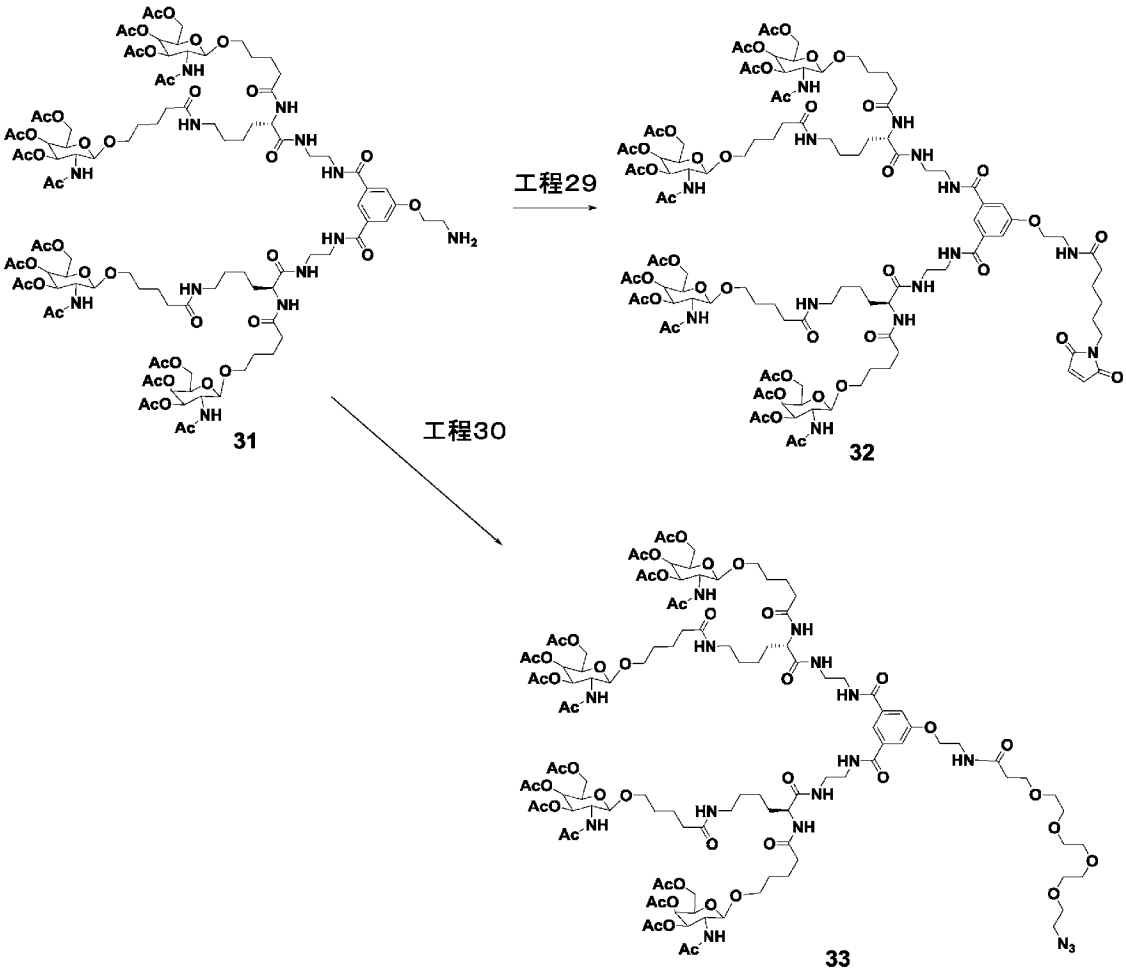
[0220] 工程28

工程27で合成した化合物30 (0.2653 g, 0.1097 mmol)を用い、実施例3の工程21と同様の方法で化合物31 (0.1524 g, 収率61%)を得た。

ESI-MS m/z: 2284 $(M + H)^+$

[0221] 実施例6　糖リガンドーテザーユニットの合成2

[化142]



[0222] 化合物32の合成

工程29

工程28で合成した化合物31 (0.0152 g, 0.006657 mmol)を用い、実施例3の工程19と同様の方法で化合物32 (0.0077 g, 収率47%)を得た。

ESI-MS m/z: 1239$(M + 2H)^{2+}$

^{1}H-NMR (DMSO-D_6) δ: 1.11-1.66 (34H, m), 1.77 (12H, d, J = 1.5 Hz), 1.89 (12H, s), 2.01-2.14 (10H, m), 2.01 (12H, s), 2.10 (12H, s), 2.92-2.99 (4H, m), 3.16-3.54 (14H, m), 3.65-3.74 (4H, m), 3.81-3.91 (4H, m), 3.98-4.08 (14H, m), 4.11-4.24 (4H, m), 4.48 (4H, dd, J = 8.4, 1.8 Hz), 4.93-5.00 (4H, m), 5.21 (4H, d, J = 3.5 Hz), 6.99 (2H, s), 7.52 (

2H, s), 7.66-7.75 (2H, m), 7.78-7.87 (6H, m), 7.91 (1H, br s), 8.01-8.08 (3H, br m), 8.54-8.60 (2H, br m).

[0223] 化合物33の合成

工程30

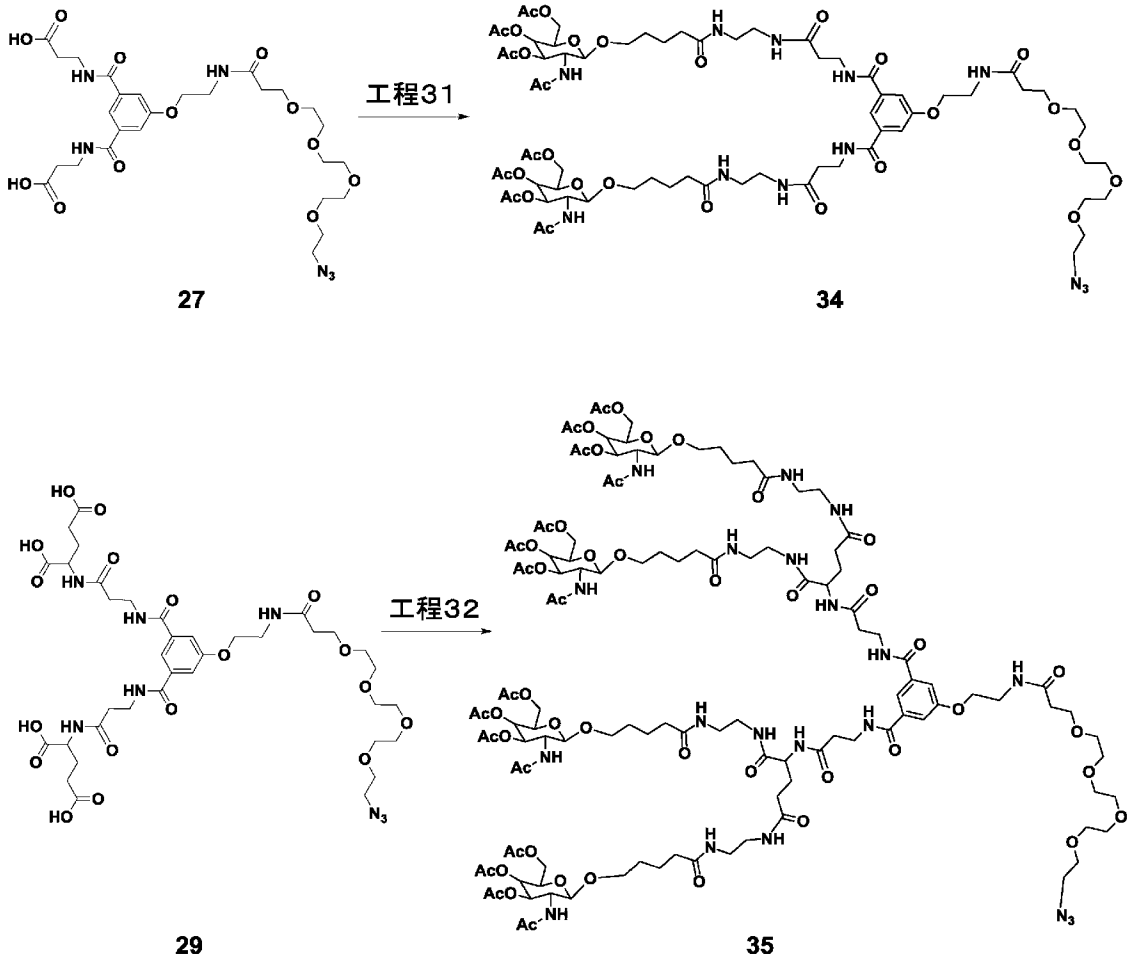
工程28で合成した化合物31 (0.0150 g, 0.00657 mmol)を用い、実施例4の工程23と同様の方法で化合物33 (0.0062 g, 収率37%)を得た。

ESI-MS m/z: 1279$(M + 2H)^{2+}$

^{1}H-NMR (DMSO-D_6) δ: 1.11-1.66 (30H, m), 1.77 (12H, s), 1.89 (12H, s), 2.01-2.14 (8H, m), 2.01 (12H, s), 2.10 (12H, s), 2.33-2.38 (2H, m), 2.92-2.99 (4H, m), 3.16-3.54 (14H, m), 3.58-3.63 (16H, m), 3.65-3.74 (4H, m), 3.81-3.91 (4H, m), 3.98-4.08 (12H, m), 4.11-4.24 (4H, m), 4.48 (4H, dd, J = 8.4, 1.8 Hz), 4.93-5.00 (4H, m), 5.21 (4H, d, J = 3.5 Hz), 7.52 (2H, s), 7.66-7.75 (2H, m), 7.78-7.87 (6H, m), 7.91 (1H, br s), 8.01-8.08 (3H, br m), 8.54-8.60 (2H, br m).

[0224] 実施例7　糖リガンドーテザーユニットの合成3

[化143]



27 34

29 35

[0225] 化合物34の合成

工程31

工程24で合成した化合物27 (0.00436 g, 0.00681 mmol)および参考例1の工程3で合成した化合物4 (0.010 g, 0.020 mmol)を用い、実施例1の工程8と同様の方法で化合物34の粗生成物を得た。

ESI-MS m/z: 1584$(M + H)^+$

[0226] 化合物35の合成

工程32

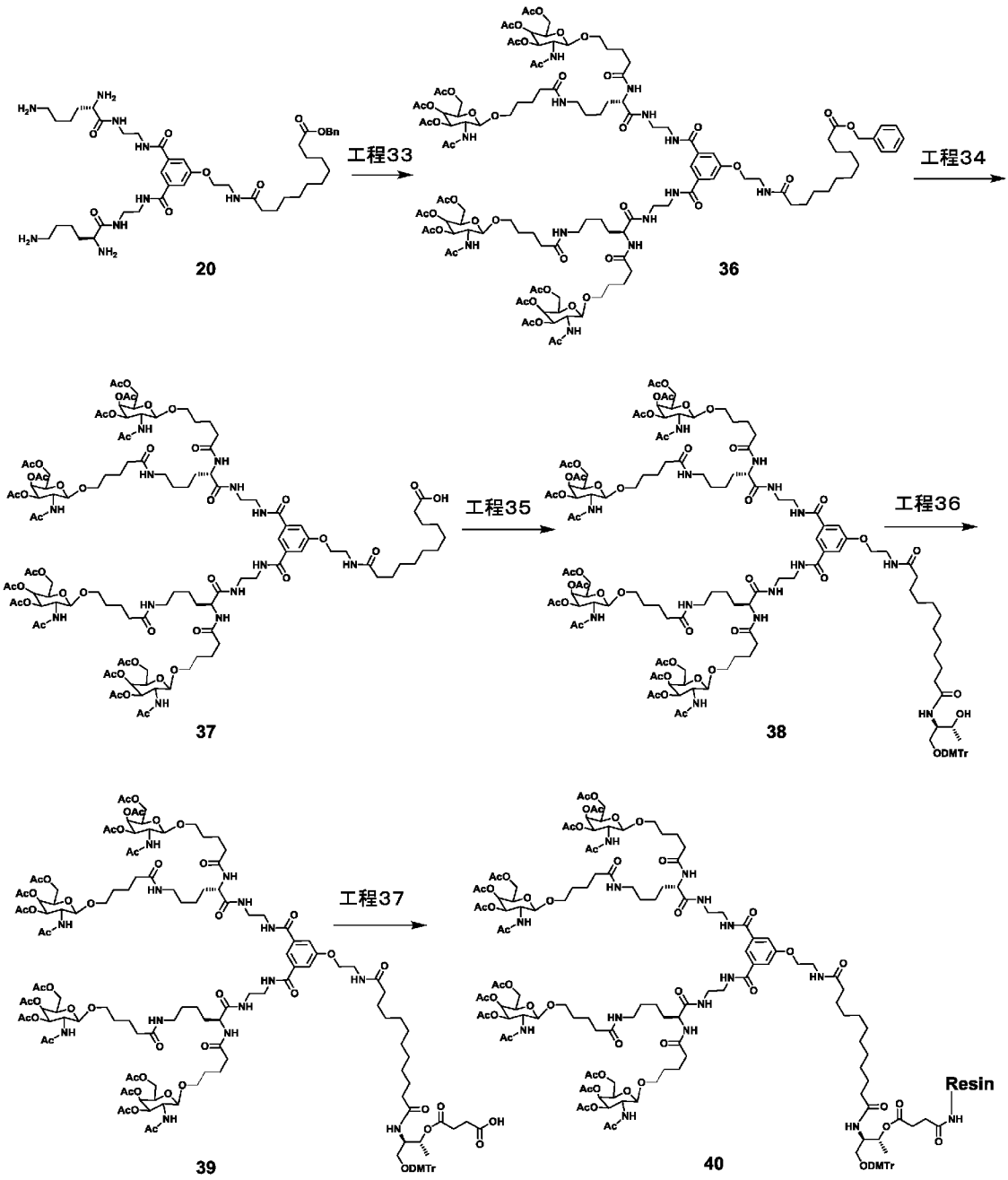
工程26で合成した化合物29 (0.0100 g, 0.01112 mmol)を用い、実施例1の工程8と同様の方法で化合物35 (0.0223 g, 収率72%)を得た。

ESI-MS m/z: 1393$(M + 2H)^{2+}$

[0227] 実施例8　糖リガンドーテザーーブランチャーユニットの合成

化合物40の合成

[化144]



[0228] 工程33

工程17で合成した化合物20 (0.1952 g, 0.225 mmol)とジャーナル・オブ・アメリカン・ケミカル・ソサイエティー (Journal of American Chemical Society), 第136巻, 16958-16961頁、2014年に記載された方法で合成した化合物1(0.4162 g, 0.93 mmol)を用い、実施例１の工程8と同様の方法で化合物36

(334.8 mg, 収率58%)を得た。

ESI-MS m/z: 1294 $(M + 2H)^{2+}$

[0229] 工程34

工程33で合成した化合物36 (0.1459 g, 0.056 mmol)を用い、実施例3の工程18と同様の方法で化合物37 (112 mg, 収率80%)を得た。

ESI-MS m/z: 1249 $(M + 2H)^{2+}$

^{1}H-NMR (DMSO-D_6) δ: 1.11-1.66 (44H, m), 1.77 (12H, d, J = 1.5 Hz), 1.89 (12H, s), 2.01-2.20 (12H, m), 2.01 (12H, s), 2.10 (12H, s), 2.92-2.99 (4H, m), 3.16-3.54 (10H, m), 3.58-3.64 (4H, m), 3.65-3.74 (4H, m), 3.81-3.91 (4H, m), 3.98-4.08 (12H, m), 4.11-4.24 (4H, m), 4.48 (4H, dd, J = 8.4, 1.8 Hz), 4.93-5.00 (4H, m), 5.21 (4H, d, J = 3.5 Hz), 6.99 (2H, s), 7.52 (2H, s), 7.66-7.75 (2H, m), 7.78-7.87 (6H, m), 7.91 (1H, br s), 8.01-8.08 (3H, br m), 8.54-8.60 (2H, br m).

[0230] 工程35

工程34で合成した化合物37 (0.1091 g, 0.044 mmol)および参考例2の工程5で製造した化合物7 (0.0748 g, 0.184 mmol)を用い、実施例1の工程8と同様の方法で化合物38を粗生成物として得た。

ESI-MS m/z: 1292 $(M + 2H)^{2+}$, 脱DMTr体として検出

[0231] 工程36

工程35で合成した化合物38 (0.161 g, 0.05586 mmol)をジクロロメタン (5 mL)に溶解し、コハク酸無水物 (東京化成工業社製, 0.1182 g, 1.181 mmol) 、N,N-ジメチルアミノピリジン (0.0224 g,0.183 mmol)、およびトリエチルアミン(0.55 mL, 3.95 mmol)を加えて、室温にて一晩攪拌した。反応液を氷冷し、水を加え、酢酸エチルで2回抽出した後、有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。減圧下、溶媒を留去することにより、化合物39の粗生成物を得た。

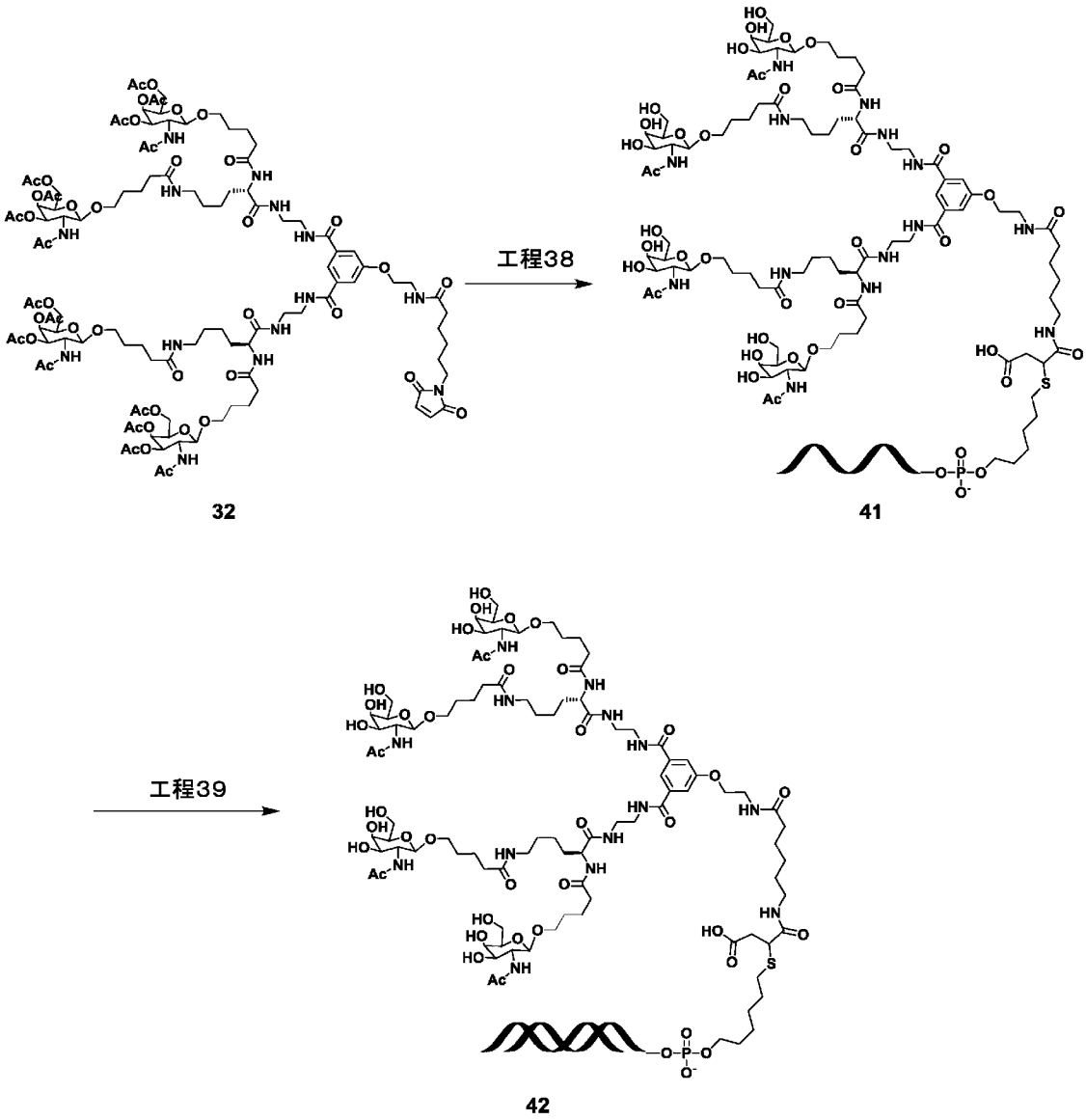
ESI-MS m/z: 1342$(M + 2H)^{2+}$, 脱DMTr体として検出

[0232] 工程37

工程36で合成した化合物39 (0.0816 g, 0.02734 mmol)、O-(ベンゾトリアゾール-1-イル)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウム ヘキサフルオロリン酸塩 (0.0221 g, 0.05827 mmol)、およびジイソプロピルエチルアミン (0.02 mL, 0.1094 mmol) をN,N-ジメチルホルムアミド(4 mL)に溶解し、LCAA-CPG (Chem Gene社製, 0.4882 g)を加え、室温にて終夜攪拌した。混合物を濾別し、ジクロロメタン、10%メタノールジクロロメタン溶液、およびジエチルエーテルで順次洗浄した後、無水酢酸/ピリジン溶液と作用させることにより、化合物40 (49.5 μmol/g, 収率89%) を得た。なお、収率は1%トリフルオロ酢酸/ジクロロメタン溶液を固相担持体に添加し、DMTr基に由来する吸収から計算できる固相担体への導入率より算出した。

[0233] 実施例9 核酸複合体の合成1

[化145]



32 41 42

[0234] 核酸複合体41の合成

工程38

工程29で合成した化合物32と、モレキュールズ（Molecules），第17巻，13825-13843頁，2012年に記載された方法で合成した末端がメルカプト基で修飾されたオリゴヌクレオチドを加えて、室温にて4時間静置した。反応混合物に炭酸ナトリウムを加え、4℃で一晩静置した。陰イオン交換クロマトグラフィー（GE Healthcare，MonoQ 5/50GL，10μm，5.0 mm x 50 mm、A液： 10 mmol/L Tris緩衝液/30%アセトニトリル，B液: 10 mmol/L Tris緩衝液/30%アセトニトリル/1 mol/L NaBrによるグラジエント)あるいは逆相液体クロマトグラ

フィー（ウォーターズ，X BridgeC18，5μm，4.6 mmx250 mm、0.1 mol/L酢酸トリエチルアンモニウム緩衝液，B液:アセトニトリルによるグラジエント)のいずれかの方法で精製することにより、オリゴヌクレオチドが異なる3種類の1本鎖の核酸複合体41を得た。

本実施例により合成した核酸複合体の配列および質量分析結果を第1表に示す。

[0235] 第1表

[表1]

化合物	配列(5'→3')	理論分子量	実測値
ApoBASO	G(L)^5(L)^a^t^t^g^g^t^a^t^T(L)^5(L)^A(L)	-	-
41_3'-ApoBASO	G(L)^5(L)^a^t^t^g^g^t^a^t^T(L)^5(L)^A(L) **41**	6514	6512
41_5'-ApoBASO	**41** G(L)^5(L)^a^t^t^g^g^t^a^t^T(L)^5(L)^A(L)	6514	6511
41_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) **41**	8971	8971

[0236] 表中、nはDNAを、N(M)は2'-O-メチル修飾RNAを、N(F)は2'-フッ素修飾RNAを、N(L)はLNAを、5(L)はLNAmCを、^はホスホロチオエート修飾を、ssはセンス鎖を、asはアンチセンス鎖を、下線が付いた番号は実施例中の化合物番号に相当する修飾基をそれぞれ示す。以下、各表において同様である。

[0237] 核酸複合体42の合成

工程39

工程38で合成した1本鎖の核酸複合体41_3'-AT3-ssRNAは、混合緩衝液（100 mmol/L酢酸カリウム、30 mmol/L 2-[4-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン-1-イル]エタンスルホン酸、HEPES)-KOH(pH 7.4)、2 mmol/L酢酸マグネシウム）にて濃度調整（50 μmol/L）した。前述センス鎖とアンチセンス鎖（50 μmol/L）を各々等量混合し、80 ℃で10分間静置した。アンチセンス鎖配列は、第2表に記載されている通りである。徐々に温度を下げ、37 ℃で1時間静置し、2本鎖の核酸複合体42を得た。

本実施例により合成した核酸複合体の配列を第2表に示す。

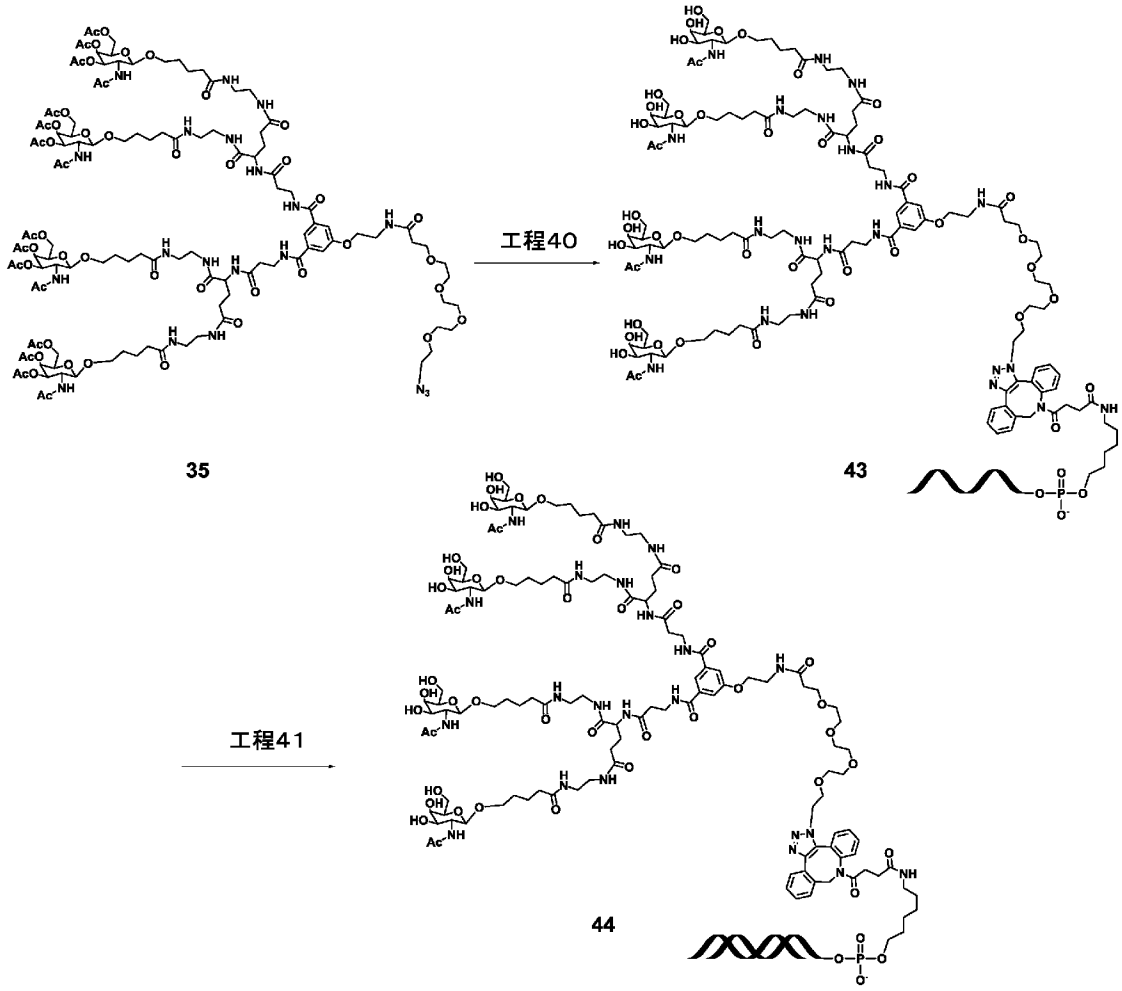
[0238] 第2表

[表2]

化合物	一本鎖名称	配列(5'→3')
42_3'-AT3-siRNA	41_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) **41**
	AT3-asRNA	U(M)^U(F)^G(M)A(F)A(M)G(F)U(M)A(F)A(M)A(F) U(M)G(M)G(M)U(F)G(M)U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)C(M)^A(M)^G(M)

[0239] 実施例10　核酸複合体の合成2

[化146]



[0240] 核酸複合体43の合成

工程40

工程32で合成した化合物35とエーシーエス・ナノ(ACS Nano), 第9巻, 9652-9664頁, 2015年に記載された方法で合成したオリゴヌクレオチドを用い、実施例9の工程38と同様の反応条件、手順にて1本鎖の核酸複合体43を得た。

本実施例により合成した核酸複合体の配列および質量分析結果を第3表に示

す。

[0241] 第3表

[表3]

化合物	配列（5'→3'）	理論分子量	実測値
43_5'-B2M-ssRNA	**43** A(F)G(M)G(F)A(M)C(F)U(M)G(F)G(M)U(F)C(M) U(F)U(F)U(M)C(F)U(M)A(F)U(M)C(F)U(M)^C(F)^U(M)	9529	9528

[0242] 核酸複合体44の合成

工程41

実施例9の工程39と同様の方法で2本鎖の核酸複合体44を得た。

本実施例により合成した核酸複合体の配列を第4表に示す。

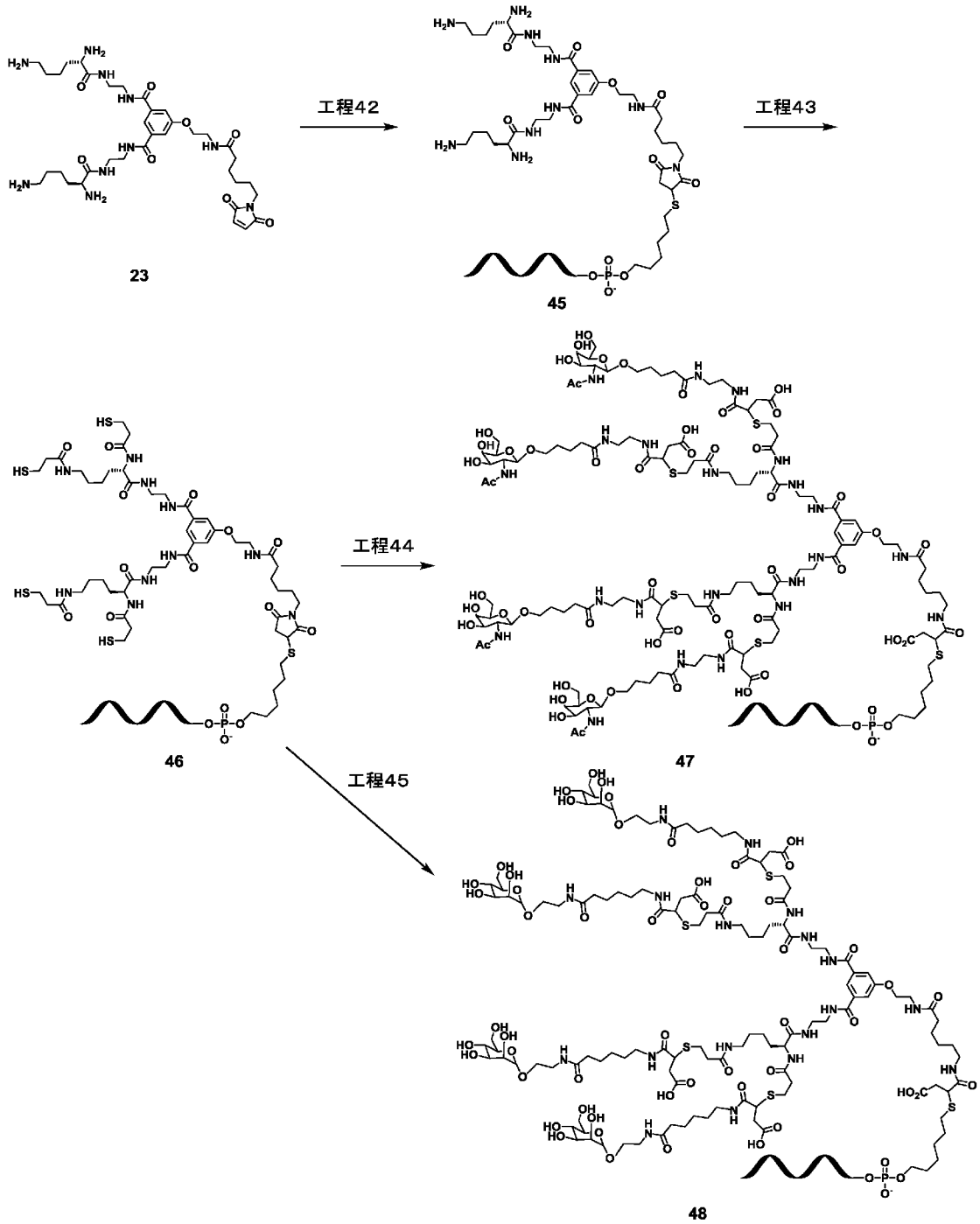
[0243] 第4表

[表4]

化合物	一本鎖名称	配列（5'→3'）
44_3'-B2M-siRNA	43_5'-B2M-ssRNA	**43** A(F)G(M)G(F)A(M)C(F)U(M)G(F)G(M)U(F)C(M) U(F)U(F)U(M)C(F)U(M)A(F)U(M)C(F)U(M)^C(F)^U(M)
	B2M-as-RNA	A(F)^G(M)^A(F)G(M)A(F)U(M)A(F)G(M)A(F)A(M)A(M) G(F)A(M)C(F)C(M)A(F)G(M)U(F)C(M)C(F)U(M)^U(F)^G(M)

[0244] 実施例11　核酸複合体の合成3

[化147]



[0245] 核酸複合体45の合成

工程42

工程20で合成した化合物23 (648 nmol)とモレキュールズ (Molecules), 第17巻, 13825-13843頁, 2012年に記載された方法で合成した末端がメルカプト基で修飾されたオリゴヌクレオチド (216 nmol)を用い、実施例9の工程38と

同様の方法で核酸複合体45を得た。

[0246] 核酸複合体46の合成

工程43

工程42で合成した化合物45（100 nmol)にN-スクシイミジル3-(2-ピリジルジチオ)プロピオナート(6.3 mg, 20 μmol)のジメチルスルホキシド溶液を加え、リン酸緩衝液中で室温、4時間静置した。反応溶液にジチオトレイトール（15.4 mg, 100 μmol)を添加し、室温で一晩静置した。混合物をゲルろ過処理 (Napカラム、GE ヘルスケア社製、溶出溶媒： 20 mmol/L 酢酸/酢酸ナトリウム緩衝液(ｐＨ５．０)) および限外濾過を行うことで核酸複合体46を得た。

[0247] 核酸複合体47の合成

工程44

工程43で合成した化合物46と参考例1の工程1で合成した化合物2を用い、実施例9の工程38と同様の方法で1本鎖の核酸複合体47を得た。

[0248] 核酸複合体48の合成

工程45

工程43で合成した化合物46とバイオコンジュゲート・ケミストリー (Bioconjugate Chemistry), 第14巻, 232-238頁, 2003年に記載された方法で合成したマンノースマレイミド付加体を用い、実施例9の工程38と同様の方法で1本鎖の核酸複合体48を得た。

本実施例により合成した核酸複合体の配列および質量分析結果を第5表に示す。

[0249] 第5表

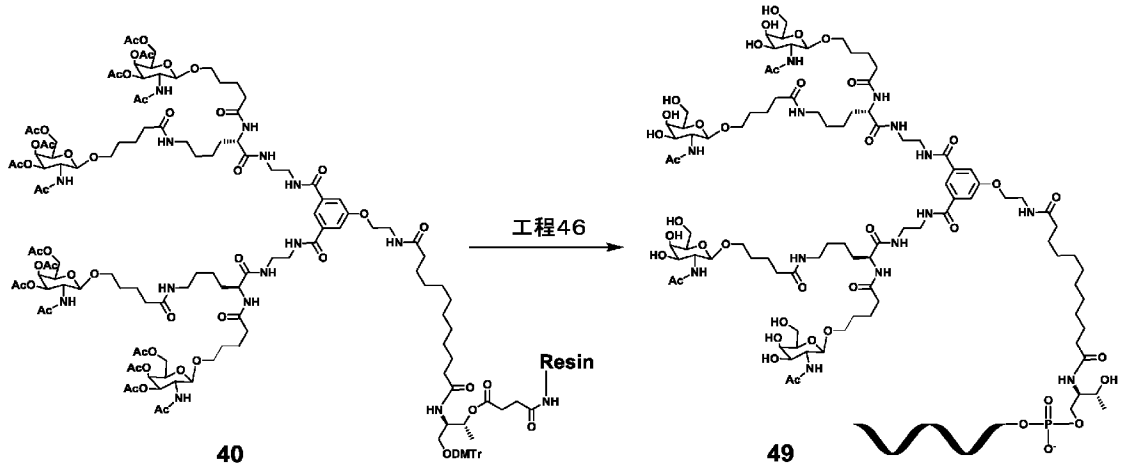
[表5]

化合物	配列(5'→3')	理論分子量	実測値
45_5'-CD45-ASO	**45** C(L)^C(L)^A(L)^A(L)^a^t^g^c^c^a^a^g^A(L)^G(L)^T(L)^T(L)	6479	6479
46_5'-CD45-ASO	**46** C(L)^C(L)^A(L)^A(L)^a^t^g^c^c^a^a^g^A(L)^G(L)^T(L)^T(L)	6832	6832
47_5'-CD45-ASO	**47** C(L)^C(L)^A(L)^A(L)^a^t^g^c^c^a^a^g^A(L)^G(L)^T(L)^T(L)	8695	8696
48_5'-CD45-ASO	**48** C(L)^C(L)^A(L)^A(L)^a^t^g^c^c^a^a^g^A(L)^G(L)^T(L)^T(L)	8587	8585

[0250] 実施例12　核酸複合体の合成4

核酸複合体49の合成

[化148]



[0251] 工程46

アンチセンス鎖の3’末端にGalNAc基を有する、オリゴヌクレオチド複合体の合成 （それぞれG-CH1179-s、G-CH0099-s、およびG-CH1180-sと呼ぶ）を、核酸合成装置（ウルトラ ファスト パラレル シンセサイザー（Ultra Fast Parallel Syntheizer）、シグマ社製、以下UFPS)を用いて、0.2μmolスケールで行った。固相担体には、工程37で合成した化合物40を用いた。ジメトキシトリチルdTホスホアミダイト （SAFC-PROLIGO社)はアセトニトリルにて0.06 mol/Lに調整した。ホスホロアミダイトのアクチベーターとして5-ベンジルチオ-1H-テトラゾール（SAFC-PROLIGO社)、および0.06 mol/L dTホスホアミダイトのアセトニトリル溶液を用いて、時間は各10分間とし縮合反応を行った。反応後、28%アンモニア溶液に浸し、55 ℃で4時間放置した。減圧下濃縮し、1-ブタノールを加えて反応を停止した。逆相液体クロマトグラフィー(資生堂, CAPSELL PAK C18, SG300, 6.0 mm x 75 mm, 5%アセトニトリル/0.1%酢酸トリエチルアンモニウム緩衝液, B液:50%アセトニトリル/水によるグラジエント)を用いて精製することにより、1本鎖の核酸複合体49を得た。

本実施例により合成した核酸複合体の配列および質量分析結果を第6表に示す。

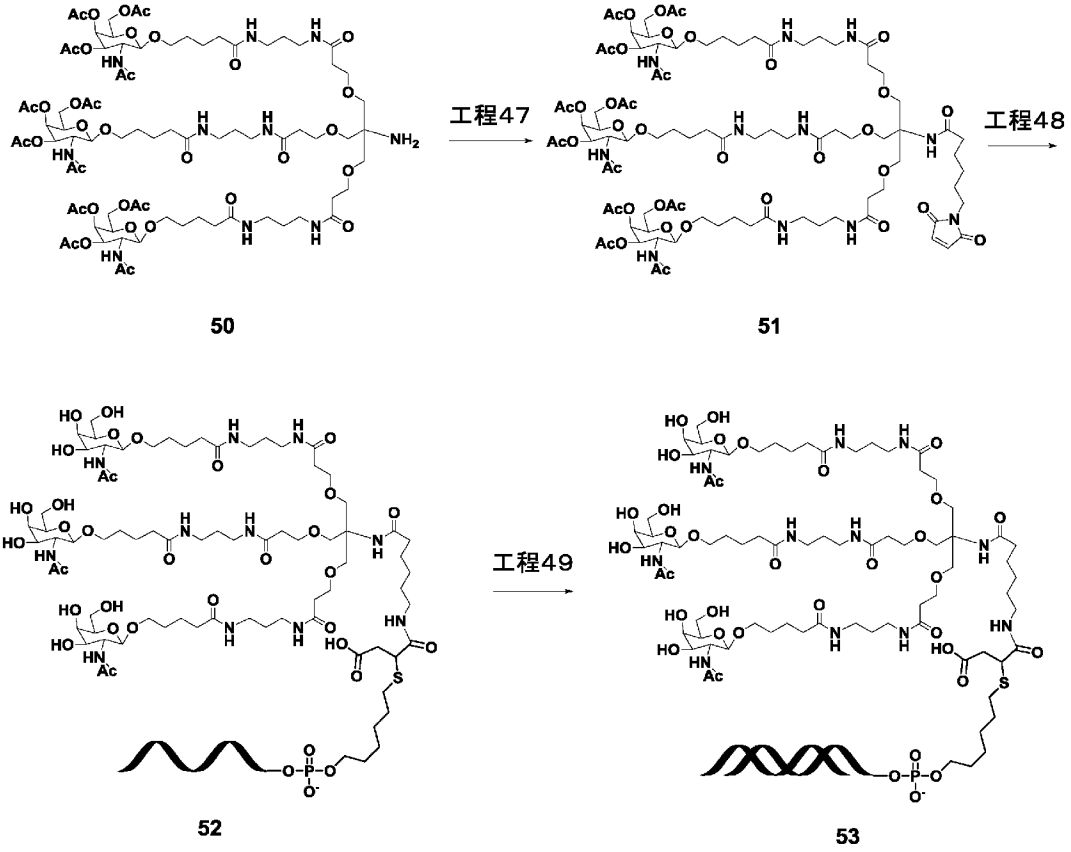
[0252] 第6表

[表6]

化合物	配列(5'→3')	理論分子量	実測値
49_3'-dT10	Ttttttttt **49**	5120	5120

[0253] 比較例1 核酸複合体の合成

[化149]



[0254] 核酸複合体52の合成

工程47

ジャーナル・オブ・アメリカン・ケミカル・ソサイエティー (Journal of American Chemical Society), 第136巻, 16958-16961頁, 2014年に記載された方法で合成した化合物50 (0.0796 g, 0.044 mmol)を用い、実施例6の工程29と同様の方法で化合物51 (0.014 g, 収率19%)を得た。

ESI-MS m/z: 994 $(M + 2H)^{2+}$

[0255] 工程48

工程47で合成した化合物51を用い、実施例9の工程38と同様の方法で、オリゴヌクレオチドが異なる3種類の1本鎖の核酸複合体52を得た。

本実施例により合成した核酸複合体の配列および質量分析結果を第7表に示した。

[0256] 第7表

[表7]

化合物	配列(5'→3')	理論分子量	実測値
52_3'-ApoBASO	G(L)^5(L)^a^t^t^g^g^t^a^t^T(L)^5(L)^A(L) **52**	6148	6147
52_5'-ApoBASO	**52** G(L)^5(L)^a^t^t^g^g^t^a^t^T(L)^5(L)^A(L)	6148	6148
52_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) **52**	8564	8564

[0257] 核酸複合体53の合成

工程49

工程48で合成した化合物52_3'-AT3-ssRNAを用い、実施例9の工程39と同様の方法で2本鎖の核酸複合体53を得た。

本実施例により合成した核酸複合体の配列を第8表に示す。

[0258] 第8表

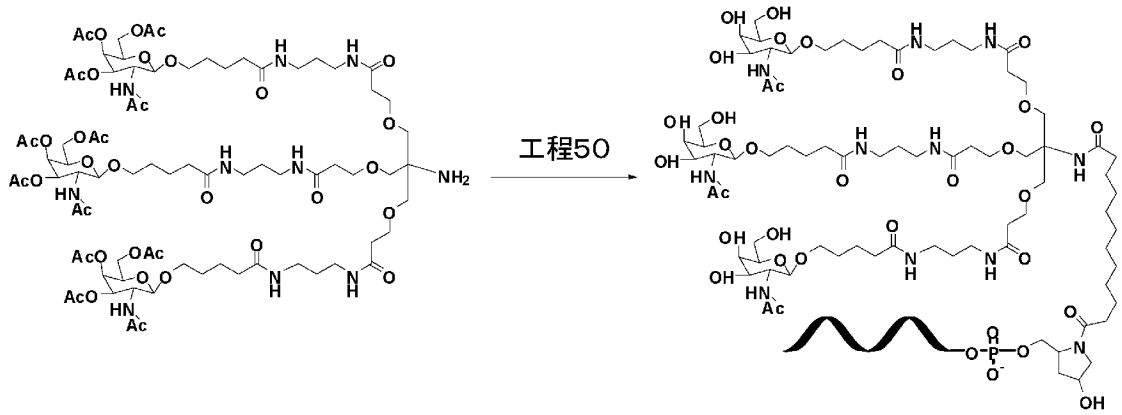
[表8]

化合物	一本鎖名称	配列(5'→3')
53_3'-AT3-siRNA	52_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) **52**
	AT3-asRNA	U(M)^U(F)^G(M)A(F)A(M)G(F)U(M)A(F)A(M)A(F) U(M)G(M)G(M)U(F)G(M)U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)C(M)^A(M)^G(M)

[0259] 比較例2　核酸複合体の合成

核酸複合体54の合成

[化150]



50 54

ジャーナル・オブ・アメリカン・ケミカル・ソサイエティー（Journal of American Chemical Society), 第136巻, 16958-16961頁, 2014年に記載された方法で、ApoBASO（第1表を参照）を有する1本鎖の核酸複合体54を得た。

[0260] 試験例1　核酸複合体のマウス初代肝細胞に対するin vitro活性

実施例9、比較例1および比較例2で合成した各核酸複合体のうち、ApoBASO(被検物1)、核酸複合体54(被検物2)、52_3’-ApoBASO(被検物3)、52_5’-ApoBASO(被検物4)、41_3’-ApoBASO(被検物5)、41_5’-ApoBASO(被検物6)について、それぞれ以下の方法により、シーディーワン(CD-1)由来マウス初代肝細胞（ライフテクノロジー社製、カタログ番号MSCP10)に導入した。

最終濃度が30, 10または3 nmol/Lとなるように、オプティメム（Opti-MEM、ギブコ(GIBCO)社、31985)で希釈した各核酸複合体を、96ウェルの培養プレートに、20μLずつ分注した後、プライマリヘパトサイトゾウイングアンドプレーティングサプリメント（Primary Hepatocyte Thawing and Plating Supplements ）（ライフテクノロジー社製、カタログ番号CM3000)を含むウィリアムズイーメディウム（William’s E Medium)（ライフテクノロジー社製、カタログ番号A12176-01)に懸濁させたマウス初代肝細胞を、細胞数12500/80μL/ウェルとなるように播種し、37℃、5%CO_2条件下で6時間培養したのちに、培養上清を注意深く除去し、プライマリヘパトサイトメンテナンスサプリメント　(Primary Hepatocyte Maintenance Supplements)（ライフテクノロジー社製、カタログ番号CM4000)を含むウィリアムズイーメディウムを添加した。また陰性対照の群として何も処理しない細胞を播種した。

各製剤を導入した細胞を37℃の5%CO_2インキュベーター内で18時間培養し、氷冷したリン酸緩衝化生理食塩水で洗浄し、スーパープレップセルリシスアンドアールティーキットフォーキューピーシーアール（東洋紡社製、カタログ番号SCQ-201)を用いて、製品に添付された説明書に記載された方法に従い、全RNAの回収と、得られた全RNAを鋳型とする逆転写反応によるcDNAの作製を行った。

得られたcDNAを鋳型とし、タックマン（登録商標)ジーンエクスプレッショ

ンアッセイズプローブ（アプライドバイオシステムズ社製)をプローブとして、クオントスタジオ12ケーフレックスリアルタイムピーシーアールシステム(ABI社製)を用い、添付された使用説明書に記載された方法に従ってPCR反応させることにより、Apolipoprotein B（別名Apolipoprotein-B100/Apolipoprotein-B48、以下apobと表す)遺伝子および構成的発現遺伝子であるグリセルアルデヒド3-リン酸脱水素酵素（D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase、以下gapdhと表す)遺伝子をPCR反応させてmRNA増幅量をそれぞれ測定し、gapdhのmRNA増幅量を内部対照として、apobのmRNAの準定量値を算出した。同様に測定した陰性対照におけるapobのmRNAの準定量値を1として、apobのmRNAの準定量値から、apobのmRNAの発現率を求めた。得られたapobのmRNAの発現率の結果を、陰性対照のapob mRNA発現率に対する抑制率として第9表および第10表に示す。なお、各表は、それぞれ独立した試験の結果を示している。

[0261] 第9表

[表9]

被検物	被検物1			被検物2		
用量 [nmol/L]	30	10	3	30	10	3
apob mRNA量 [抑制率%]	20.89	1.46	7.22	98.65	85.96	47.78
被検物	被検物3			被検物4		
用量 [nmol/L]	30	10	3	30	10	3
apob mRNA量 [抑制率%]	98.46	71.13	37.32	99.99	97.23	73.02

[0262] 第10表

[表10]

被検物	被検物1			被検物2		
用量 [nmol/L]	30	10	3	30	10	3
apob mRNA量 [抑制率%]	34.28	12.17	4.67	96.85	89.07	65.24
被検物	被検物5			被検物6		
用量 [nmol/L]	30	10	3	30	10	
apob mRNA量 [抑制率%]	98.55	94.13	74.47	99.16	98.22	

[0263] 第9表および第10表から明らかなように、本発明の核酸複合体は、マウス初

代肝細胞に導入後のapob遺伝子のmRNAの発現を抑制した。

[0264] 試験例2　核酸複合体のマウスにおけるin vivo活性

実施例9、比較例1及び比較例2で合成した各核酸複合体のうち、ApoBASO(被検物1)、核酸複合体54（被検物2)、52_3’-ApoBASO(被検物3)、52_5’-ApoBASO(被検物4)、41_3’-ApoBASO(被検物5)、41_5’-ApoBASO(被検物6)について、それぞれ以下の方法によりin vivo評価試験を実施した。なお、各核酸複合体は、試験に合わせてリン酸緩衝化生理食塩水（DPBS）（ナカライテスク社製)で希釈して用いた。マウス（BALB/cA、日本クレアより入手)を馴化飼育後、各核酸複合体を0.75 mg/kgまたは0.25 mg/kgずつマウスに皮下注投与した。また、コントロール群としてはDPBSのみをマウスに皮下注投与した。投与から3日後に浅側頭静脈より血清を採取した。その後に動物を安楽死させ、肝臓を採取し液体窒素で凍結保存した。肝臓凍結サンプルをトリゾール（登録商標)アールエヌエーアイソレーションリージェンツ（ライフテクノロジーズ社(Life Technologies)社製、カタログ番号15596026)およびアールエヌエーイージーミニキット（キアゲン(QIAGEN)社製、カタログ番号74106)を用い、製品に添付された説明書に記載された方法に従い、全RNAの回収を行った。さらにトランスクリプターファーストストランドシーディーエヌエーシンセシスキット（ロシュ社(Roche社)製、カタログ番号04897030001)を用いて、製品に添付された説明書に記載された方法に従い、得られた全RNAを鋳型とする逆転写反応によるcDNAの作製を行った。

得られたcDNAを鋳型とし、タックマン(登録商標)ジーンエクスプレッションアッセイズプローブ（アプライドバイオシステムズ社製)をプローブとして、クオントスタジオ12ケーフレックスリアルタイムピーシーアールシステム(ABI社製)を用い、添付された使用説明書に記載された方法に従ってPCR反応させることにより、apob遺伝子およびgapdh遺伝子をPCR反応させてmRNA増幅量をそれぞれ測定し、gapdhのmRNA増幅量を内部対照として、apobのmRNAの準定量値を算出した。同様に測定したコントロール群におけるapobのmRNAの準定量値を1として、apobのmRNAの準定量値から、apobのmRNAの発現率を求めた。

また、血清中の総コレステロール濃度を、ラボアッセイコレステロール（和光純薬工業社製、カタログ番号294-65801)を用い添付された使用説明書に記載された方法に従って測定した。得られたapobのmRNAの発現抑制率および血清中総コレステロール濃度を第11表および第12表に示す。

[0265] 第11表

[表11]

被検物	被検物1	被検物2	被検物3	被検物4	コントロール
用量 [mg/kg]	0.75	0.75	0.75	0.75	-
肝臓中apob mRNA量 [抑制率%]	56.46	94.07	90.21	97.74	-
血清中総コレステロール濃度 [mg/dL]	83.36	45.37	48.98	41.70	116.06

[0266] 第12表

[表12]

被検物	被検物1		被検物2		コントロール
用量 [mg/kg]	0.75	0.25	0.75	0.25	-
肝臓中apob mRNA量 [抑制率%]	75.28	24.23	95.78	74.39	-
血清中総コレステロール濃度 [mg/dL]	95.68	100.35	46.45	102.85	98.53
被検物	被検物5		被検物6		
用量 [mg/kg]	0.75	0.25	0.75	0.25	
肝臓中apob mRNA量 [抑制率%]	98.12	82.10	99.27	96.05	
血清中総コレステロール濃度 [mg/dL]	34.61	61.55	25.24	39.65	

[0267] 第11表および第12表から明らかなように、本発明の核酸複合体（被検物5および6）は、生体内において、apob遺伝子の発現を低下させ、血中の総コレステロール濃度を減少させた。

[0268] 試験例3 核酸複合体のマウス初代肝細胞に対するin vitro活性

実施例9および比較例1で得られた各核酸複合体のうち、53_3’-AT3-siRNA(被検物7)、42_3’-AT3-siRNA(被検物8)について、それぞれ以下の方法により、シーディーワン(CD-1)由来マウス初代肝細胞（ライフテクノロジー社製、カタログ番号MSCP10)に導入した。

最終濃度が300, 100または30 nmol/Lとなるように、オプティメム（Opti-M

EM、ギブコ(GIBCO)社、31985)で希釈した各核酸複合体を、96ウェルの培養プレートに、20μLずつ分注した後、プライマリヘパトサイトゾウイングアンドプレーティングサプリメント(Primary Hepatocyte Thawing and Plating Supplements)(ライフテクノロジー社製、カタログ番号CM3000)を含むウィリアムズイーメディウム(William's E Medium)(ライフテクノロジー社製、カタログ番号A12176-01)に懸濁させたマウス初代肝細胞を、細胞数12500/80μL/ウェルとなるように播種し、37℃、5%CO_2条件下で6時間培養したのちに、培養上清を注意深く除去し、プライマリヘパトサイトメンテナンスサプリメント (Primary Hepatocyte Maintenance Supplements) (ライフテクノロジー社製、カタログ番号CM4000)を含むウィリアムズイーメディウムを添加した。また陰性対照の群として何も処理しない細胞を播種した。

各製剤を導入した細胞を37℃の5%CO_2インキュベーター内で18時間培養し、氷冷したリン酸緩衝化生理食塩水で洗浄し、スーパープレップセルリシスアンドアールティーキットフォーキューピーシーアール(東洋紡社製、カタログ番号SCQ-201)を用いて、製品に添付された説明書に記載された方法に従い、全RNAの回収と、得られた全RNAを鋳型とする逆転写反応によるcDNAの作製とを行った。

得られたcDNAを鋳型とし、タックマン(登録商標)ジーンエクスプレッションアッセイズプローブ(アプライドバイオシステムズ社製)をプローブとして、クオントスタジオ12ケーフレックスリアルタイムピーシーアールシステム(ABI社製)を用い、添付された使用説明書に記載された方法に従ってPCR反応させることにより、Serpin peptidase inhibitor, clade C (antithrombin), member 1 (別名antithrombin III、以下AT3と表す)遺伝子および構成的発現遺伝子であるグリセルアルデヒド3-リン酸脱水素酵素 (D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase、以下gapdhと表す)遺伝子をPCR反応させてmRNA増幅量をそれぞれ測定し、gapdhのmRNA増幅量を内部対照として、AT3のmRNAの準定量値を算出した。同様に測定した陰性対照におけるAT3のmRNAの準定量値を1として、AT3のmRNAの準定量値から、AT3のmRNAの発現率を求めた。得られ

たAT3のmRNAの発現率の結果を、陰性対照のAT3 mRNA発現率に対する抑制率として第13表に示す。

[0269] 第13表

[表13]

被検物	被検物7			被検物8		
用量 [nmol/L]	300	100	30	300	100	30
AT3 mRNA量 [抑制率%]	11.906	3.0612	-6.657	94.428	92.451	88.378

[0270] 第13表から明らかなように、本発明の核酸複合体（被検物8）は、マウス初代肝細胞に導入後のAT3遺伝子のmRNAの発現を抑制した。

[0271] 試験例4 核酸複合体のマウスにおけるin vivo活性

実施例9および比較例1で得られた各核酸複合体のうち、53_3’-AT3-siRNA(被検物7)、42_3’-AT3-siRNA(被検物8)について、それぞれ以下の方法によりin vivo評価試験を実施した。なお、各核酸複合体は、試験に合わせてリン酸緩衝化生理食塩水(DPBS)(ナカライテスク社製)で希釈して用いた。マウス(BALB/cA、日本クレアより入手)を馴化飼育後、各核酸複合体を1.5 mg/kgまたは0.5 mg/kgずつマウスに皮下注投与した。また、コントロール群としてはPBSのみをマウスに皮下注投与した。投与から3日後にイソフルラン麻酔下で後大静脈後部静脈より採血した。採血した血液を3.2 Mクエン酸ナトリウムおよび5 mmol/L D-グルコースを含む抗凝固液と体積比9:1で混合し、遠心後の上清を回収することで血漿を得た。動物は採血後に安楽死させ、肝臓を採取し液体窒素で凍結保存した。肝臓凍結サンプルをトリゾール(登録商標)アールエヌエーアイソレーションリージェンツ（ライフテクノロジーズ社(Life Technologies)社製、カタログ番号15596026)およびアールエヌエーイージーミニキット(キアゲン(QIAGEN)社製、カタログ番号74106)を用い、製品に添付された説明書に記載された方法に従い、全RNAの回収を行った。さらにトランスクリプターファーストストランドシーディーエヌエーシンセシスキット（ロシュ社(Roche社)製、カタログ番号04897030001)を用いて、製品に添付された説明書に記載された方法に従い、得られた全RNAを鋳型とする逆転写反応によるcD

NAの作製を行った。

得られたcDNAを鋳型とし、タックマン(登録商標)ジーンエクスプレッションアッセイズプローブ(アプライドバイオシステムズ社製)をプローブとして、クオントスタジオ12ケーフレックスリアルタイムピーシーアールシステム(ABI社製)を用い、添付された使用説明書に記載された方法に従ってPCR反応させることにより、AT3遺伝子およびgapdh遺伝子をPCR反応させてmRNA増幅量をそれぞれ測定し、AT3のmRNA増幅量を内部対照として、AT3のmRNAの準定量値を算出した。同様に測定したコントロール群におけるAT3のmRNAの準定量値を1として、AT3のmRNAの準定量値から、AT3のmRNAの発現率を求めた。また、血漿中のAT3タンパク質濃度を、アンチトロンビンスリーマウスエライザキット(アブカム社製、カタログ番号ab108800)を用い添付された使用説明書に記載された方法に従って測定した。得られたAT3のmRNAの発現抑制率および血漿中AT3タンパク質濃度を第14表に示す。

[0272] 第14表

[表14]

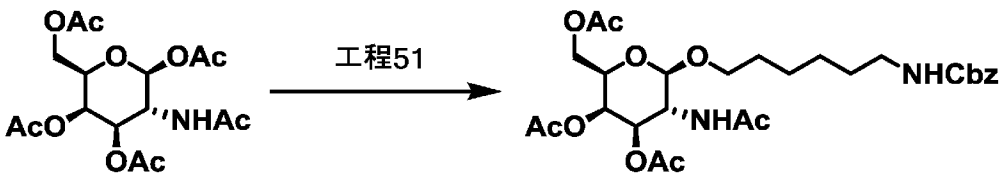
被検物	コントロール	被検物7		被検物8	
用量 [mg/kg]	-	1.5	0.5	1.5	0.5
肝臓中AT3 mRNA量 [抑制率%]	-	-13.90	2.63	47.76	31.37
血漿中AT3タンパク質濃度 [μg/mL]	287.32	263.03	287.42	147.54	235.68

[0273] 第14表から明らかなように、本発明の核酸複合体（被検物8）は、生体内において、AT3遺伝子の発現を低下させ、血中のAT3タンパク質濃度を減少させた。

[0274] 参考例3 糖リガンドユニットの合成

化合物56の合成

[化151]



55 56

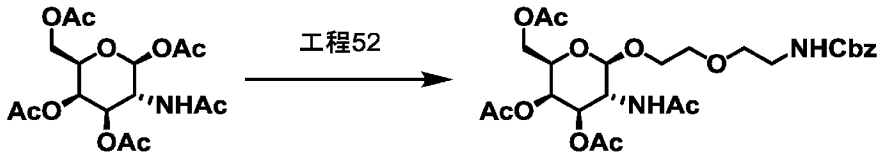
[0275] 工程51

化合物55（1.200 g, 3.640 mmol）から、ジャーナル・オブ・メディシナル・ケミストリー（Journal of Medicinal Chemistry）, 第59巻, 2718-2733頁, 2016年に記載された方法で化合物56（1.050 g, 収率50%）を合成した。

ESI-MS m/z: 582 $(M + H)^+$

[0276] 化合物57の合成

[化152]



55 57

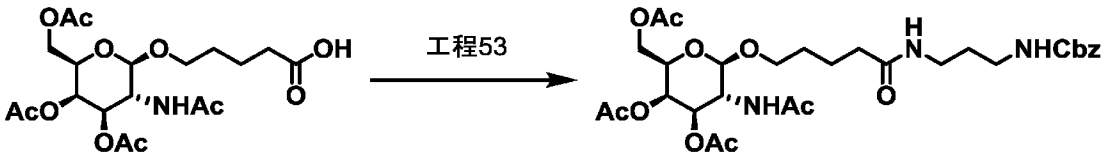
[0277] 工程52

化合物55（4.000g, 10.27 mmol）をジクロロメタン（60 mL）に溶解し、ベンジル-2-(2-ヒドロキシエトキシ)エチルカーバメイト（2.700 g, 11.30 mmol）、およびトリフルオロメタンスルホン酸（0.1360 mL, 1.541 mmol）を加えて、還流条件下で終夜攪拌した。反応液に10 wt% 炭酸カリウム水溶液を加え、ジクロロメタンと分液した後、有機相を水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧下、溶媒を留去し、2-メチルテトラヒドロフランへと置換濃縮した。残渣をヘプタンに滴下し、得られた結晶をろ過することにより、化合物57（5.130 g, 収率88%）を得た。

ESI-MS m/z: 570 $(M + H)^+$

[0278] 化合物58の合成

[化153]



1 58

[0279] 工程53

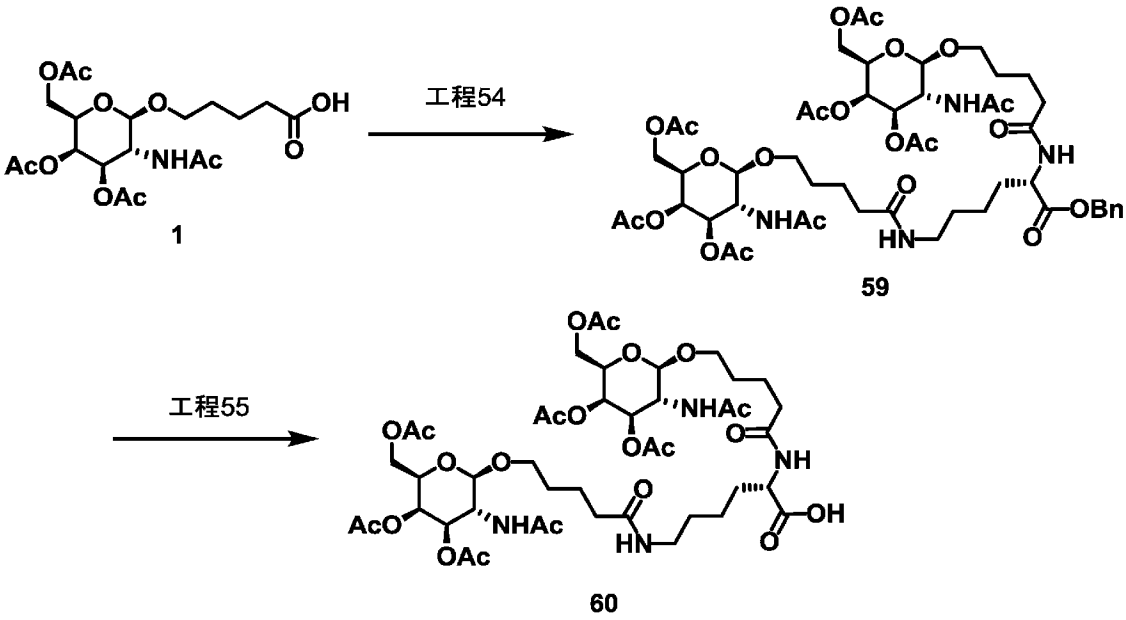
工程1に記載の化合物1（898.0 mg, 2.007 mmol）をジクロロメタン（15 mL

）に溶解し、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール一水和物（338.0 mg, 2.208 mmol）、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（343 mg, 2.208 mmol）、およびN-1-Z-1, 3-ジアミノプロパン塩酸塩（0.4910 mL, 2.208 mmol）を加え、室温で3時間攪拌した。反応液に水を加え、ジクロロメタンで分液した後、有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧下、溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（クロロホルム/メタノール=90/10）で精製することにより、化合物58（873.0 mg, 収率68%）を得た。

ESI-MS m/z: 639 $(M + H)^+$

[0280] 化合物60の合成

[化154]



[0281] 工程54

工程1に記載の化合物1（3.00 g, 6.70 mmol)をジクロロメタン（60 mL)に溶解し、室温にてL-リジンベンジルエステル二p-トルエンスルホン酸塩（1.75 g, 3.02 mmol)、トリエチルアミン(0.935 mL, 6.70 mmol), 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（1.29 g, 6.70 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール１水和物（103 mg, 0.670 mmol)を加えて2.5時間撹拌した。反応液を水と飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄し、無水

硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧下、溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（クロロホルム/メタノール=90/10)で精製することにより、化合物59を定量的に得た。

ESI-MS m/z: 1096 $(M + H)^+$

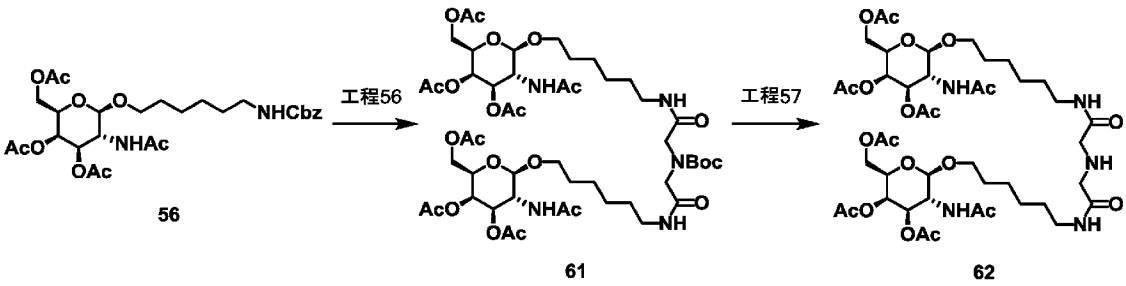
[0282] 工程55

工程54で合成した化合物59 (2.30 g, 2.10 mmol)をテトラヒドロフラン (46 mL)に溶解し、室温にて10%パラジウムカーボン粉末（含水品, 54.29%; 424 mg)を加え、水素雰囲気下で終夜撹拌した。反応液をろ過し、減圧下、溶媒を留去することにより、化合物60を定量的に得た。

ESI-MS m/z: 1006 $(M + H)^+$

[0283] 化合物62の合成

[化155]



[0284] 工程56

イミノ二酢酸（東京化成工業社製, 1.5 g, 6.43 mmol,)を塩化メチレン(30 mL)に溶解し、ペンタフルオロトリフルオロ酢酸(東京化成工業社製, 2.75 mL, 16.08 mmol)、トリエチルアミン(4.48 mL, 32.2 mmol)を加えて4時間撹拌した。反応液に10%クエン酸水溶液を加え、クロロホルムで抽出した後、有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。そこに、工程51で合成した化合物56(2 g, 3.45 mmol)を酢酸エチル(10 mL)とアセトニトリル(10 mL)との混合液に溶解し、パラジウム/炭素による接触水素還元を行った。得られた溶液部分を減圧下、溶媒を留去する事により、化合物61の粗製生物を得た。

ESI-MS m/z: 1091$(M+H)^+$

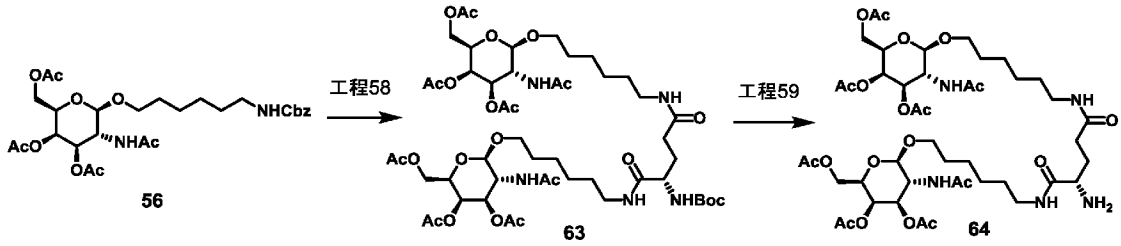
[0285] 工程57

工程56で合成した化合物61(1.5 g,1.37 mmol)を用い、参考例1の工程3と同様の方法で化合物62を定量的に得た。

ESI-MS m/z: 990(M+H)+

[0286] 化合物64の合成

[化156]



[0287] 工程58

N-(t-ブトキシカルボニル)-L-グルタミン酸（東京化成工業社製)を用いて、工程51で合成した化合物56(1.855 g, 3.19 mmol)を用い、参考例3の工程56と同様の方法で化合物63の粗精製物を得た。

ESI-MS m/z: 1105(M+H)+

[0288] 工程59

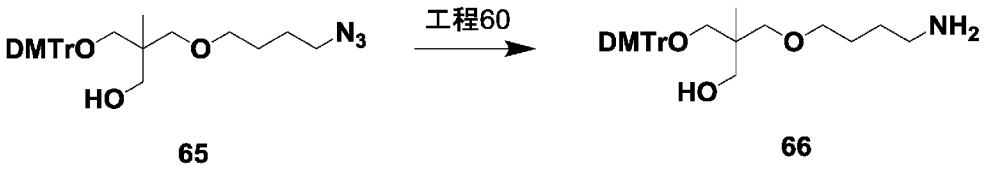
工程58で合成した化合物63(1.421 g, 1.2866 mmol)を用い、参考例1の工程3と同様の方法で化合物64を定量的に得た。

ESI-MS m/z: 1004(M+H)+

[0289] 参考例4　ブランチャーユニットの合成

化合物66の合成

[化157]



[0290] 工程60

ジャーナル・オブ・オーガニック・ケミストリー（Journal of Organic Chemistry），第74巻，6837-6842頁，2009年に記載された方法で合成した化合

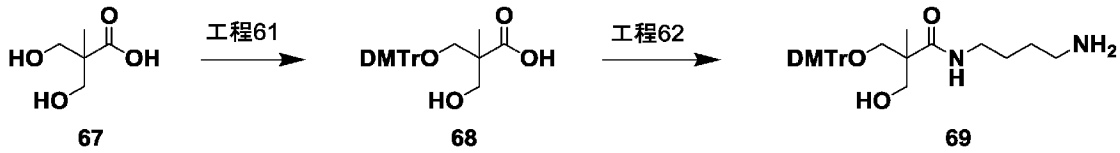
物65（90 mg, 0.173 mmol）をテトラヒドロフラン（1 mL）に溶解し、トリフェニルホスフィン、ポリマー担持（シグマアルドリッチ社製, 63 mg, 0.189 mmol）を加えて、加熱環流下3時間撹拌した。反応液をろ過し、減圧下、溶媒を留去することにより、化合物66（70 mg, 収率82%)を得た。

ESI-MS m/z: 516 $(M+Na)^+$

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 0.89 (3H, s), 1.42-1.48 (2H, m), 1.52-1.61 (2H, m), 1.85 (1H, br s), 2.68 (2H, t, J= 7.2 Hz), 3.06-3.07 (2H, m), 3.39-3.44 (3H, m), 3.51-3.55 (3H, m), 3.78 (6H, s), 6.80-6.85 (4H, m), 7.17-7.23 (1H, m), 7.27-7.33 (6H, m), 7.41-7.43 (2H, m).

[0291] 化合物69の合成

[化158]



67 68 69

[0292] 工程61

化合物67（東京化成工業社製, 0.500 g, 3.73 mmoL)を用いて参考例2の工程4と同様の方法で化合物68の粗生成物（1.5 g）を得た。

ESI-MS m/z: 435 $(M-H)^-$

[0293] 工程62

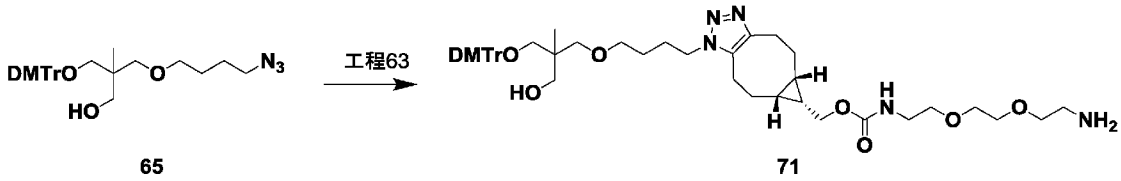
工程61で合成した化合物68の粗生成物(1.5 g）と1,4-Diaminobutane（東京化成工業社製, 3.29 g, 37.3 mmol)を用いて実施例1の工程8と同様の方法で化合物69（0.18 g, 2 段階収率10%)を得た。

ESI-MS m/z: 551 $(M+HCOO)^-$

^{1}H-NMR (400 MHz, MeOD): δ 1.09 (3H, s), 1.45-1.52 (4H, m), 2.80 (2H, t, J = 7.2 Hz), 2.91 (2H, s), 3.05 (1H, d, J = 8.8 Hz), 3.12-3.16 (4H, m), 3.24 (1H, s), 3.43 (1H, d, J = 10.8 Hz), 3.62-3.66 (7H, m), 6.71-6.76 (4H, m), 7.05-7.11 (1H, m), 7.12-7.20 (6H, m), 7.28-7.32 (2H, m).

[0294] 化合物71の合成

[化159]



65 71

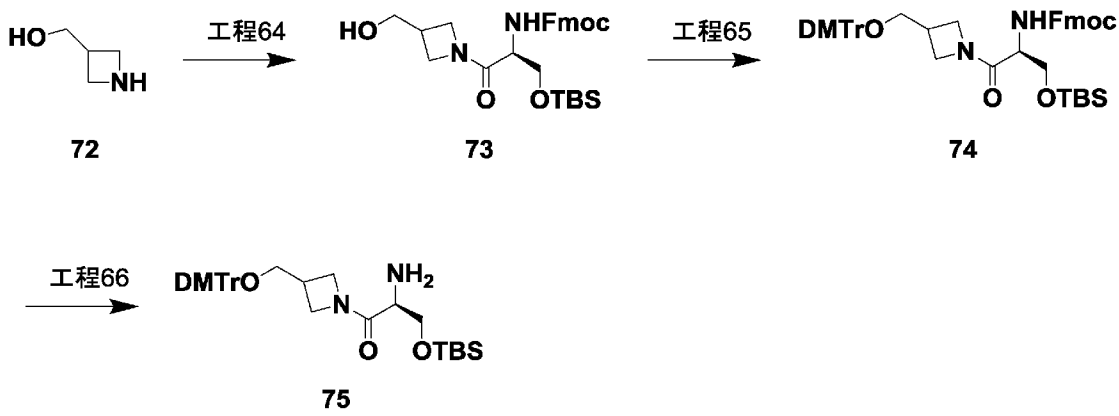
[0295] 工程63

ジャーナル・オブ・オーガニック・ケミストリー（Journal of Organic Chemistry），第74巻，6837-6842頁，2009年に記載された方法で合成した化合物65（110 mg，0.212 mmol）をテトラヒドロフラン（2 mL）に溶解し、N-(1R,8S,9s)-Bicyclo[6.1.0]non-4-yn-9-ylmethyloxycarbonyl-1,8-diamino-3,6-dioxaoctane（東京化成工業社製，72 mg，0.222 mmol）を加えて、室温にて1時間撹拌した。反応液に水を加え、クロロホルムで抽出した後、有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。減圧下、溶媒を留去し、残渣をアミノシリカゲルカラムクロマトグラフィー（クロロホルム/メタノール=90/10)で精製することにより、化合物71（160 mg，収率90 %)を得た。ESI-MS m/z: 845 $(M+H)^+$

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 0.88 (3H, s), 0.91-1.09 (3H, m), 1.20-1.25 (1H, m), 1.52-1.59 (4H, m), 1.80-1.85 (2H, m), 2.19-2.25 (4H, m), 2.59-2.68 (1H, m), 2.84-2.90 (4H, m), 3.02-3.11 (3H, m), 3.35-3.44 (5H, m), 3.49-3.53 (5H, m), 3.54-3.58 (2H, m), 3.62 (5H, s), 3.78 (6H, s), 4.13 (2H, d, J = 6.4 Hz), 4.21 (2H, t, J = 7.2 Hz), 6.79-6.84 (4H, m), 7.18-7.21 (1H, m), 7.24-7.27 (2H, m), 7.28-7.32 (4H, m), 7.39-7.44 (2H, m).

[0296] 化合物75の合成

[化160]



72 73 74 75

[0297] 工程64

化合物72(AstaTech社製, 100 mg, 1.148 mmol)およびFmoc-Ser(tBuMe2Si)-OH (渡辺化学工業社製, 532 mg, 1.205 mmol)を用いて実施例1の工程8と同様の方法で化合物73(410 mg, 収率70%)を得た。

ESI-MS m/z: 511 $(M+H)^+$

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 0.06 (6H, s), 0.90 (9H, s), 2.76-2.85 (1H, m), 3.65-3.86 (5H, m), 4.02-4.23 (3H, m), 4.32-4.40 (4H, m), 5.55 (1H, d, J = 8.0 Hz), 7.31 (2H, t, J = 7.6 Hz), 7.40 (2H, t, J= 7.6 Hz), 7.59 (2H, d, J = 7.6 Hz), 7.76 (2H, d, J = 7.6 Hz).

[0298] 工程65

工程64で合成した化合物73(410 mg, 0.803 mmol)を用いて参考例2の工程4と同様の方法で化合物74の粗生成物(680 mg)を得た。

ESI-MS m/z: 814 $(M+H)^+$

[0299] 工程66

工程65で合成した化合物74の粗生成物(680 mg)を用いて参考例2の工程5と同様の方法で化合物75(330 mg, 2段階収率70%)を得た。

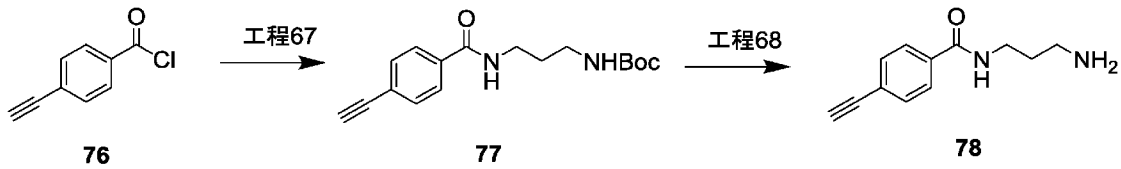
ESI-MS m/z: 519 $(M+H)^+$

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 0.02-0.09 (6H, m), 0.89 (9H, d, J = 28.8 Hz), 2.84-2.94 (1H, m), 3.24-3.30 (2H, m), 3.46 (1H, t, J = 7.2 Hz), 3.52-3.68 (2H, m), 3.75-3.80 (1H, m), 3.82 (6H, d, J= 2.4 Hz), 3.89-3.9

6 (1H, m), 4.05-4.17 (1H, m), 4.27-4.37 (1H, m), 6.82-6.89 (4H, m), 7.22-7.27 (1H, m), 7.29-7.34 (6H, m), 7.41-7.45 (2H, m).

[0300] 化合物78の合成

[化161]



76 77 78

[0301] 工程67

N-(Tert-ブトキシカルボニル)-1,3-ジアミノプロパン（東京化成工業社製，1.788 g, 10.26 mmol）をジクロロメタン（22.8 mL）に溶解し、トリエチルアミン（1.907 mL, 13.68 mmol)を加え、室温で15分撹拌した。反応液に、オーガニックレター（Organic Letter），第16巻，6318-6321頁，2014年に記載された方法で合成した化合物76（1.126 g, 6.84 mmol）のジクロロメタン溶液（5 mL)を滴下し、室温で2時間撹拌した。反応液に水を加え、クロロホルムで抽出した後、有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。減圧下、溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘプタン/酢酸エチル＝35/65）で精製することにより、化合物77（1.65 g，収率80%）を得た。

ESI-MS m/z: 303 $(M+H)^+$

[0302] 工程68

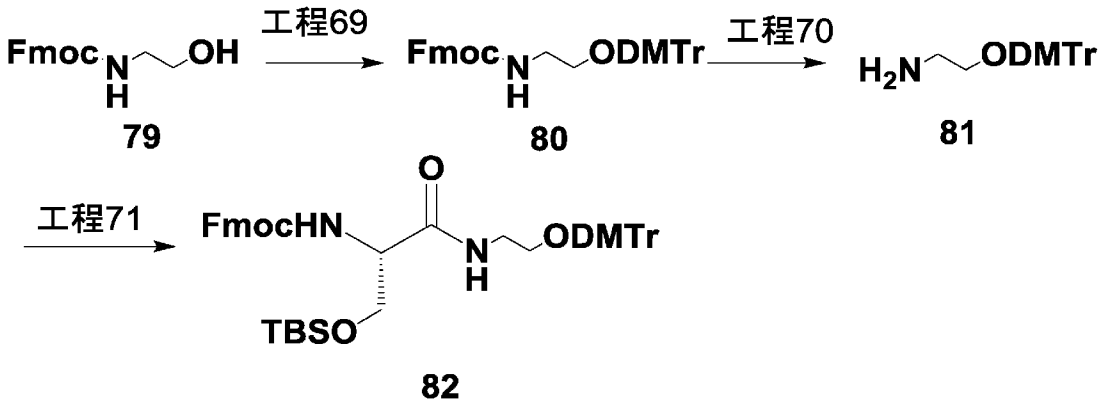
工程67で合成した化合物77(1.65 g, 5.46 mmol)を用いて参考例1の工程3と同様の方法で化合物78(1.10 g, 収率100%)を得た。

ESI-MS m/z: 203 $(M+H)^+$

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 1.74 (2H, dt, J = 12.0, 6.0 Hz), 2.95 (2H, t, J = 6.0 Hz), 3.18 (1H, s), 3.60 (2H, td, J= 6.0, 5.2 Hz), 7.54 (2H, dt, J = 8.4, 1.8 Hz), 7.76 (2H, dt, J = 8.4, 1.8 Hz), 7.97 (1H, br s).

[0303] 化合物82の合成

[化162]



[0304] 工程69

化合物79（東京化成社製，1.2 g，4.24mmol)を用いて参考例2の工程4と同様の方法で化合物79の粗製生物を得た。

ESI-MS m/z: 608(M+Na)+

[0305] 工程70

工程69で合成した化合物80の粗生成物を用いて参考例2の工程5もしくは実施例1の工程11に記載された方法で化合物81（1.34 g，2段階収率52%）を得た。

ESI-MS m/z: 386(M+Na)+

1H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 3.34 (2H, t, J = 6.4 Hz), 3.47 (2H, t, J = 6.4 Hz), 3.79 (6H, s), 6.78-6.84 (4H, m), 7.17-7.21 (1H, m), 7.27-7.35 (6H, m), 7.42-7.46 (2H, m).

[0306] 工程71

工程70で合成した化合物81(1.15 g,3.16 mmol)およびFmoc-Ser(tBuMe2Si)-OH(渡辺化学工業社製，1.677 g，3.8 mmol)を用いて実施例1の工程8と同様の方法で化合物82(560 mg，収率31%)を得た。

1H-NMR (400 MHz, CDCl3) δ: 0.00-0.07 (6H, m), 0.83-0.89 (9H, m), 3.18-3.26 (2H, m), 3.39-3.46 (2H, m), 3.61-3.68 (1H, m), 3.76 (6H, s), 3.89 (1H, dd, J = 10.0, 4.0 Hz), 4.03 (1H, dd, J = 10.0, 4.0 Hz), 4.15-4.20 (1H, m), 4.22-4.28 (1H, m), 4.32-4.40 (2H, m), 5.65-5.88 (1H, m

), 6.76-6.85 (4H, m), 7.16-7.23 (1H, m), 7.25-7.34 (8H, m), 7.36-7.44 (4H, m), 7.50-7.64 (2H, m), 7.72-7.79 (2H, m).

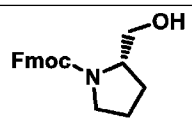
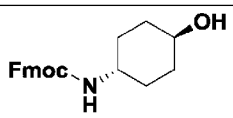
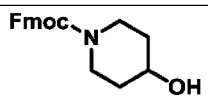
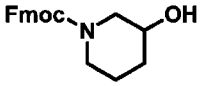
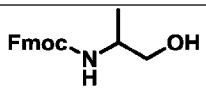
[0307] 化合物88-94の合成

第15表に記載された化合物およびFmoc-Ser(tBuMe$_2$Si)-OH , Fmoc-Thr(tBuMe$_2$Si)-OHを用いて、工程69～71と同様の方法により第16表に記載した化合物を得た。

本実施例により合成した化合物のNMR分析データを第17表に示す。

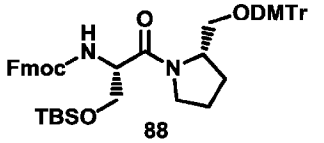
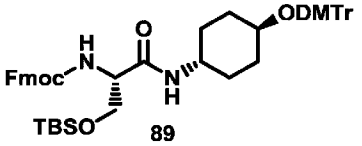
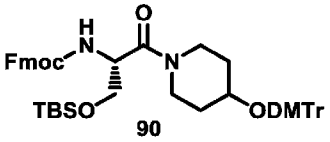
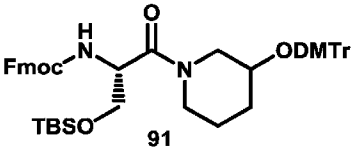
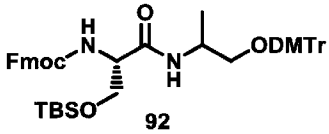
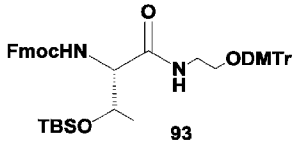
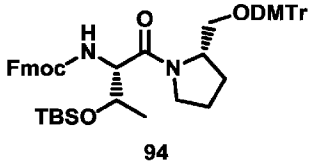
[0308] 第15表

[表15]

 83	 84	 85
 86	 87	

[0309] 第16表

[表16]

 88	 89	 90
 91	 92	 93
 94		

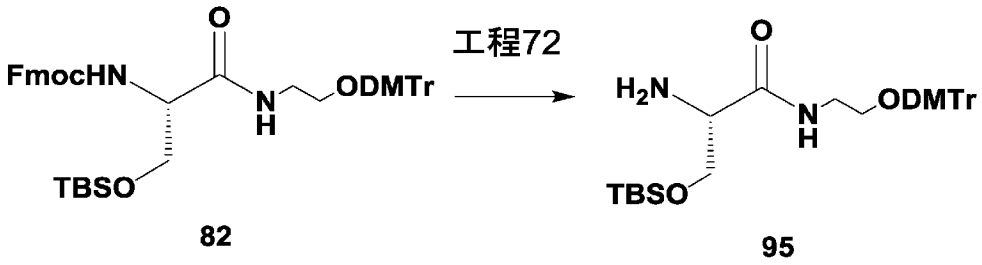
[0310] 第17表

[表17]

化合物	NMR
88	^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ0.07-0.03 (6H, m) , 0.89-0.87 (9H, m H) , 2.04-1.65 (4H, m) , 3.86-3.58 (11H, m) , 4.37-4.18 (4H, m) , 4.69-4.68 (1H, m) , 5.67-5.65 (1H, m) , 6.84-6.80 (4H, m) , 7.18-7.16 (3H, m) , 7.33-7.25 (7H, m) , 7.42-7.38 (3H, m) , 7.60-7.58 (2H, m) , 7.78-7.75 (2H, m).
89	^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ0.11-0.05 (6H, m) , 0.91-0.87 (9H, m) , 1.43-1.19 (4H, m) , 2.00-1.80 (3H, m) , 3.74-3.36 (2H, m) , 3.81-3.75 (6H, m) , 4.41-3.96 (5H, m) , 5.71-5.64 (1H, m) , 6.37-6.36 (1H, m) , 6.84-6.80 (4H, m) , 7.20-7.16 (2H, m) , 7.42-7.25 (10H, m) , 7.59-7.48 (3H, m) , 7.78-7.75 (2H, m).
90	^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ0.08-0.03 (6H, m) , 0.98-0.81 (9H, m) , 1.20-1.07 (2H, m) , 1.39-1.30 (2H, m) , 1.42-1.40 (1H, m) , 1.71-1.50 (2H, m) , 3.36-3.14 (1H, m) , 3.73-3.60 (3H, m) , 3.80-3.77 (6H, m) , 4.33-4.18 (1H, m) , 4.35-4.34 (2H, m) , 4.78-4.77 (1H, m) , 5.75-5.74 (1H, m) , 6.83-6.81 (4H, m) , 7.35-7.26 (5H, m) , 7.39-7.37 (6H, m) , 7.50-7.48 (2H, m) , 7.61-7.57 (2H, m) , 7.77-7.74 (2H, m)
91	^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ0.04-0.00 (6H, m) , 0.87-0.80 (9H, m) , 1.47-1.11 (3H, m) , 1.92-1.61 (1H, m) , 4.83-2.99 (16H, m) , 5.88-5.72 (1H, m) , 6.89-6.82 (4H, m) , 7.21-7.14 (1H, m) , 7.49-7.28 (12H, m) , 7.62-7.59 (2H, m) , 7.77-7.75 (2H, m)
92	^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ0.01-0.05 (6H, m) , 0.66-0.92 (9H, m) , 1.11-1.12 (3H, m) , 3.02-3.06 (1H, m) , 3.55-3.62 (1H, m) , 3.69-3.75 (6H, m) , 3.91-4.35 (6H, m) , 5.62 (1H, s) , 6.74-6.78 (4H, m) , 7.10-7.12 (2H, m) , 7.14-7.27 (7H, m) , 7.30-7.36 (4H, m) , 7.43-7.53(2H, m) , 7.68-7.71 (2H, m).
93	^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ0.14-0.08 (6H, m) , 1.10-0.87 (9H, m) , 1.56-1.55 (3H, m) , 3.48-3.41 (2H, m) , 3.81-3.73 (7H, m) , 4.25-4.14 (2H, m) , 4.45-4.39 (3H, m) , 5.77-5.76 (1H, m) , 6.84-6.79 (4H, m) , 7.18-7.16 (3H, m) , 7.42-7.26 (10H, m) , 7.61-7.56 (2H, m) , 7.78-7.74 (2H, m).
94	^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ-0.10-0.00 (6H, m) , 0.81-0.72 (9H, m) , 1.12-1.11 (3H, m) , 1.47-1.54 (1H, m) , 1.83-1.77 (3H, m) , 3.71-3.47 (9H, m) , 4.39-4.00 (6H, m) , 5.55-5.53 (1H, m) , 6.74-6.71 (4H, m) , 7.08-7.06 (3H, m) , 7.32-7.16 (10H, m) , 7.52-7.48 (2H, m) , 7.67-7.65 (2H, m).

[0311] 化合物95の合成

[化163]



[0312] 工程72

工程71で合成した化合物82(2.487 g, 3.16 mmol)を用いて参考例2の工程5と同様の方法で化合物95を得た(1.2 g, 収率67%)。

ESI-MS m/z: 587(M+Na)$^+$

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ -0.01-0.07 (6H, m), 0.86-0.90 (9H, m), 3.15-

3.21 (2H, m), 3.41-3.48 (3H, m), 3.72 (1H, dd, J= 10.0, 6.4 Hz), 3.79 (6H, s), 3.84 (1H, dd, J = 10.0, 4.8 Hz), 6.79-6.84 (4H, m), 7.18-7.23 (1H, m), 7.27-7.33 (6H, m), 7.40-7.44 (2H, m), 7.72-7.75 (1H, br m).

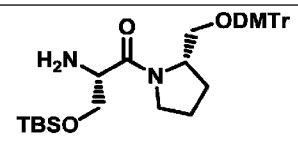
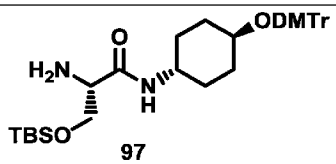
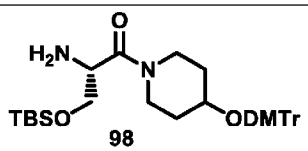
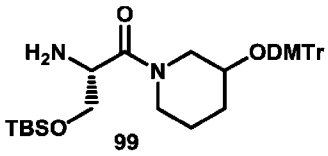
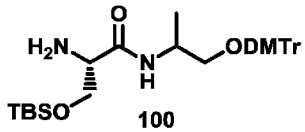
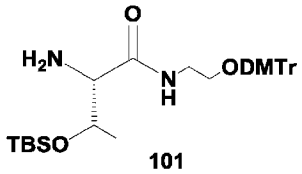
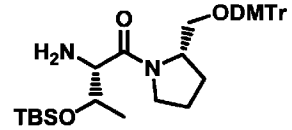
[0313] 化合物96～102の合成

第16表に記載した化合物を用いて工程72と同様の方法により第18表に記載した化合物を得た。

本実施例により合成した化合物の質量分析結果を第19表に示す。

[0314] 第18表

[表18]

 96	 97	 98
 99	 100	 101
 102		

[0315] 第19表

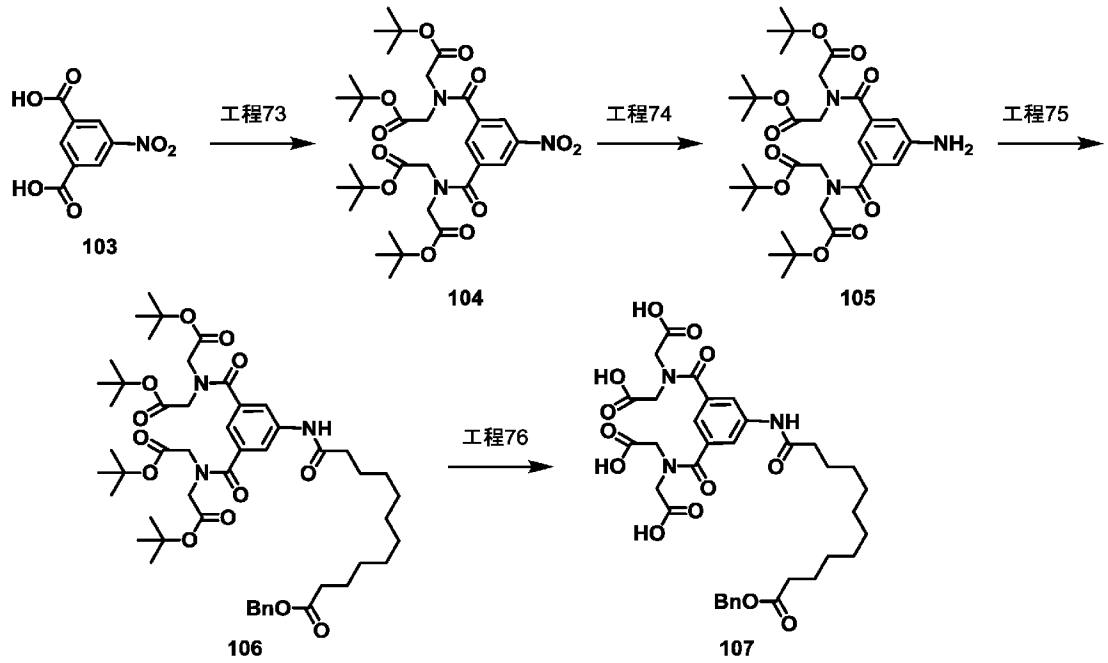
[表19]

化合物	ESI-MS m/z
96	605(M+H)$^+$
97	619(M+H)$^+$
98	303(M+H)$^+$, 脱 DMTr 体として検出
99	649(M+HCOOH)$^-$
100	577(M-H)$^-$
101	623(M+HCOOH)$^-$
102	317(M+H)$^+$, 脱 DMTr 体として検出

[0316] 実施例13　テザーユニットの合成

化合物107の合成

[化164]



[0317] 工程73

化合物103 (2.00 g, 9.47 mmol)をN, N'-ジメチルホルムアミド (40 mL)に溶解し、室温にてイミノ二酢酸ジ-tert-ブチルエステル (5.11 g, 20.84 mmol)、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 (4.00 g, 20.84 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール1水和物 (145 mg, 0.947 mmol)を加えて2時間撹拌した。反応液に水を加え、酢酸エチルで抽出した後、有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液と飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧下、溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘプタン/酢酸エチル=50/50)で精製した。さらにメタノールでスラリー精製することにより、化合物104 (4.07 g, 収率65 %)を得た。

ESI-MS m/z: 664 $(M - H)^-$

[0318] 工程74

工程73で合成した化合物104 (2.66 g, 4.00 mmol)をテトラヒドロフラン (53 mL)に溶解し、室温にて10%パラジウムカーボン粉末 (含水品, 54.29%; 490 mg)を加え、水素雰囲気下で3時間撹拌した。反応液をろ過し、減圧下、溶

媒を留去することにより、化合物105（2.86 g，収率113%)を得た。

ESI-MS m/z: 634 $(M - H)^-$

[0319] 工程75

工程74で合成した化合物105（871.0 mg，1.370 mmol）をN，N’-ジメチルホルムアミド（17 mL）に溶解し、O-(7-アザベンゾトリアゾール-1-イン)-N,N,N’,N’-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロリン酸塩（625.0 mg，1.644 mmol）、ジイソプロピルエチルアミン（0.5730 mL，3.290 mmol）、およびドデカン二酸モノベンジルエステル（527.0 mg，1.644 mmol）を加え、室温で終夜攪拌した。反応液に水を加え、酢酸エチルで抽出した後、有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液および飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧下、溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘプタン/酢酸エチル=60/40）で精製することにより、化合物106（1.030 g，収率80%）を得た。

ESI-MS m/z: 939 $(M + H)^+$

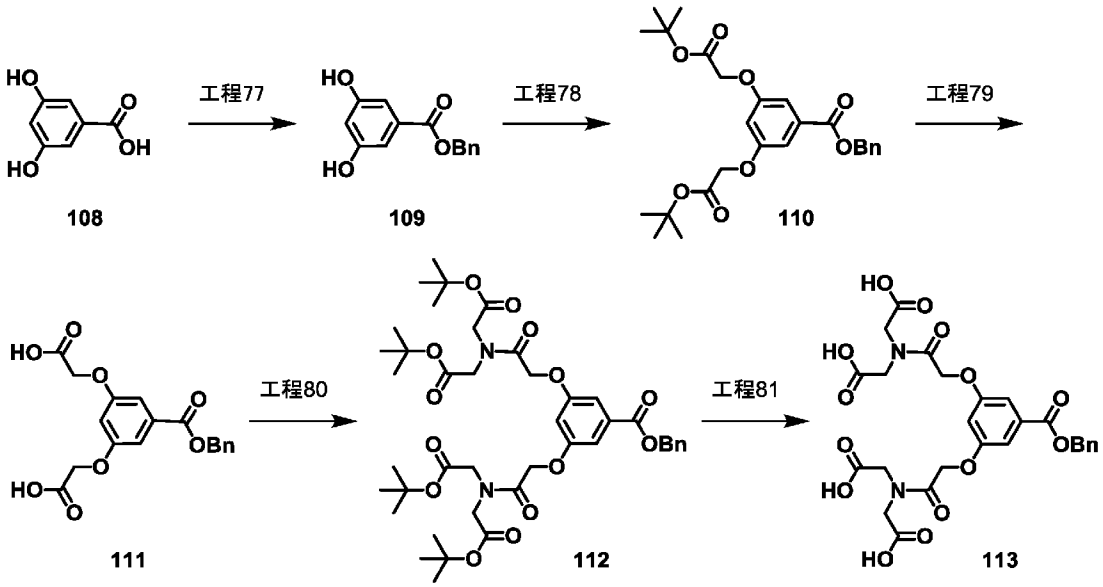
[0320] 工程76

工程75で合成した化合物106（1.030 g，1.098 mmol）をジクロロメタン（10 mL）に溶解し、トリフルオロ酢酸（10.00 mL，130.0 mmol）を加え、室温で1時間攪拌した。減圧下、溶媒を留去し、化合物107の粗生成物を得た。

ESI-MS m/z: 713 $(M - H)^-$

[0321] 化合物113の合成

[化165]



[0322] 工程77

化合物108 (2.000 g, 12.98 mmol) をN, N'-ジメチルホルムアミド (30 mL) に溶解し、炭酸水素カリウム (1.559 g, 15.57 mmol) および塩化ベンジル (2.328 mL, 19.47 mmol) を加えて、室温にて4時間攪拌した。反応液に飽和塩化アンモニウムを加え、ジクロロメタンで抽出した後、有機層を水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧下、溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘプタン/酢酸エチル=50/50) で精製することにより、化合物109 (2.850 g, 収率90%) を得た。

ESI-MS m/z: 243 $(M - H)^-$

[0323] 工程78

工程77で合成した化合物109 (2.500 g, 10.24 mmol) をN, N'-ジメチルホルムアミド (30 mL) に溶解し、炭酸カリウム (5.660 g, 40.90 mmol) およびtert-ブチルブロモ酢酸 (3.300 mL, 22.52 mmol) を加え、90℃で4時間攪拌した。反応液に飽和塩化アンモニウムを加え、ジクロロメタンで抽出した後、有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧下、溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘプタン/酢酸エチル=75/25) で精製することにより、化合物110 (4.300 g, 収率89%) を得た。

ESI-MS m/z: 472 $(M - H)^-$

[0324] 工程79

工程78で合成した化合物110 (1.000 g, 2.116 mmol) をジクロロメタン (10 mL) に溶解し、トリフルオロ酢酸 (10.00 mL, 130.0 mmol) を加え、室温で6時間攪拌した。減圧下、溶媒を留去し、化合物111の粗生成物を得た。

ESI-MS m/z: 359 $(M - H)^-$

[0325] 工程80

工程79で合成した化合物111 (350.0 mg, 0.9710 mmol) をN, N'-ジメチルホルムアミド (7 mL) に溶解し、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール一水和物 (327.0 mg, 2.137 mmol) 、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 (410.0 mg, 2.137 mmol) 、およびイミノジ酢酸ジ-tert-ブチルエステル (524.0 mg, 2.137 mmol) を加え、室温で5時間攪拌した。反応液に水を加え、酢酸エチルで抽出した後、有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液および飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧下、溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘプタン/酢酸エチル=60/40) で精製することにより、化合物112 (617.0 mg, 収率78%) を得た。

ESI-MS m/z: 814 $(M - H)^-$

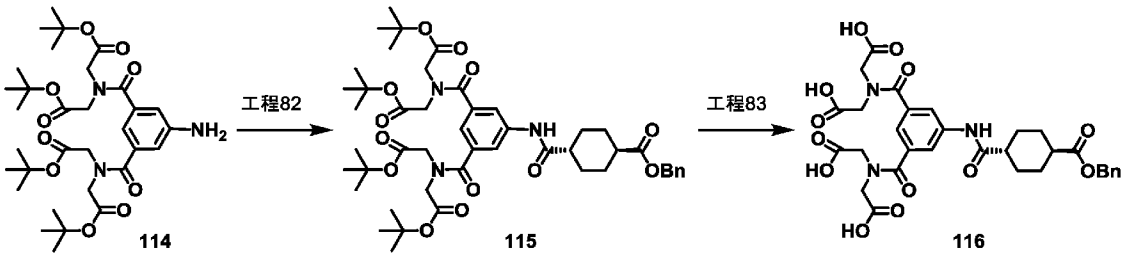
[0326] 工程81

工程80で合成した化合物112 (610.0 mg, 0.7490 mmol) をジクロロメタン (6 mL) に溶解し、トリフルオロ酢酸 (6 mL, 78.00 mmol) を加え、室温で1時間攪拌した。減圧下、溶媒を留去し、化合物113の粗生成物を得た。

ESI-MS m/z: 590 $(M + H)^+$

[0327] 化合物116の合成

[化166]



[0328] 工程82

工程74で合成した化合物114 (474 mg, 0.744 mmol)をN, N'-ジメチルホルムアミド (10 mL)に溶解し、室温にてジャーナル・オブ・メディシナル・ケミストリー (Journal of Medicinal Chemistry), 第54巻, 2433-2446頁, 2011年に記載された方法で合成したtrans-シクロヘキサン-1,4-ジカルボン酸モノベンジルエステル (0.234 mg, 0.893 mmol)、ジイソプロピルエチルアミン (0.312 mL, 1.79 mmol)、O-(7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスファート (339 mg, 0.893 mmol)を加えて6時間撹拌した。反応液に水を加え、酢酸エチルで抽出した後、有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液と飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧下、溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘプタン/酢酸エチル=50/50)で精製することにより、化合物115 (448 mg, 収率68 %)を得た。

ESI-MS m/z: 879 $(M - H)^-$

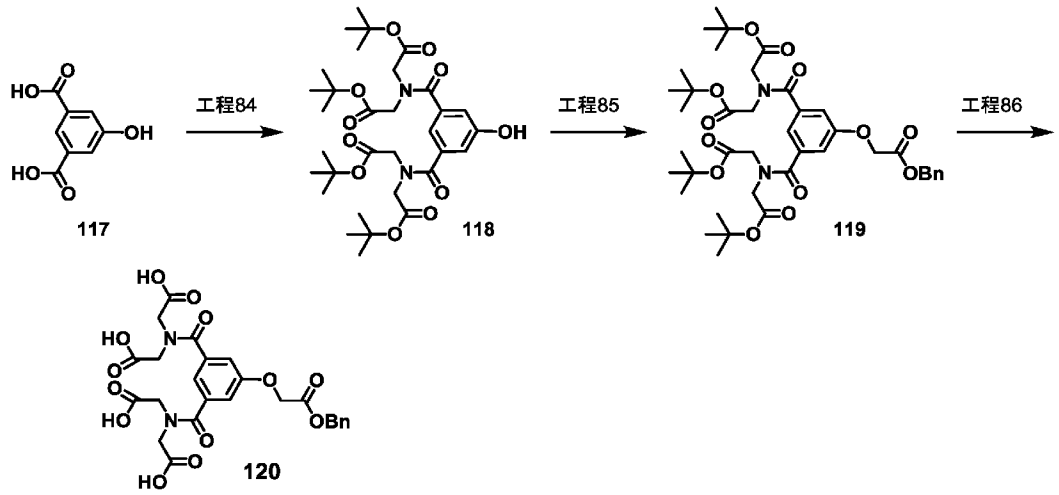
[0329] 工程83

工程82で合成した化合物115 (341 mg, 0.387 mmol)をジクロロメタン (3.4 mL)に溶解し、室温にてトリフルオロ酢酸 (3.4 mL)を加えて終夜撹拌した。反応液を減圧濃縮し、酢酸エチルで共沸し、ヘプタンでスラリー精製することにより、化合物116 (254 mg, 収率100%)を得た。

ESI-MS m/z: 656 $(M + H)^+$

[0330] 化合物120の合成

[化167]



[0331] 工程84

化合物117 (500 mg, 2.75 mmol)をN, N'-ジメチルホルムアミド (10 mL)に溶解し、室温にてイミノジ酢酸ジ-tert-ブチルエステル (1.48 g, 6.04 mmol)、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 (1.16 g, 6.04 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール1水和物 (42.0 mg, 0.275 mmol)を加えて4時間撹拌した。反応液に水を加え、酢酸エチルで抽出した後、有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧下、溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘプタン/酢酸エチル=50/50)で精製することにより、化合物118 (329 mg, 収率19 %)を得た。

ESI-MS m/z: 635 $(M - H)^-$

[0332] 工程85

工程84で合成した化合物118 (323 mg, 0.507 mmol)をN, N'-ジメチルホルムアミド (6.5 mL)に溶解し、室温にて炭酸カリウム (84.0 mg, 0.609 mmol)、ブロモ酢酸ベンジル (139 mg, 0.609 mmol)を加えて3時間撹拌した。反応液に水を加え、酢酸エチルで抽出した後、有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧下、溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘプタン/酢酸エチル=50/50)で精製することにより、化合物119 (313 mg, 収率79 %)を得た。

ESI-MS m/z: 783 $(M - H)^-$

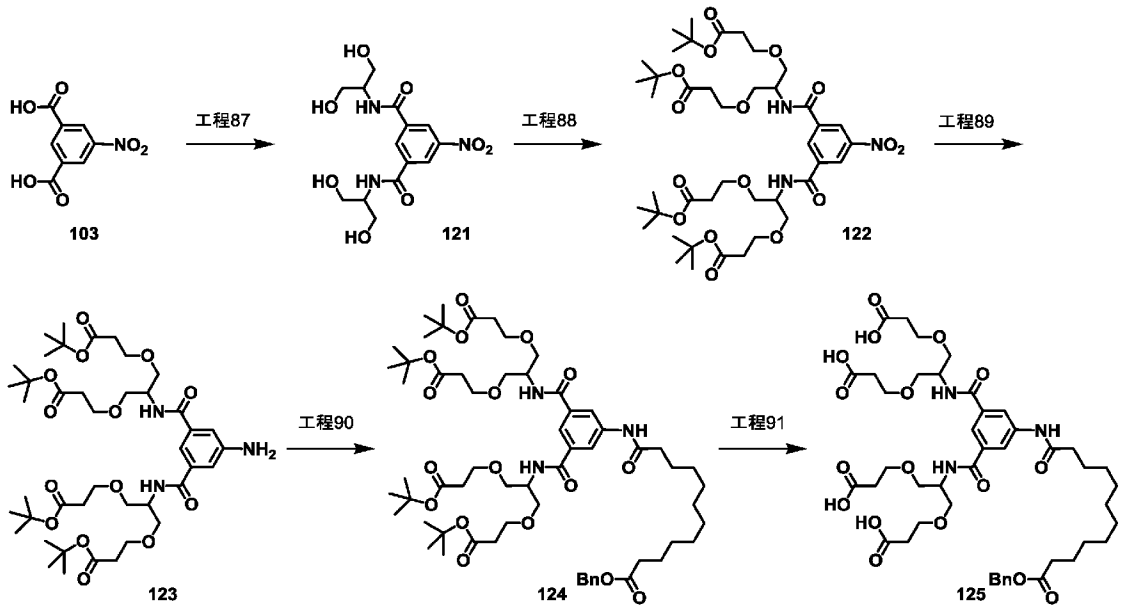
[0333] 工程86

工程85で合成した化合物119 (312 mg, 0.398 mmol)をジクロロメタン (3.1 mL)に溶解し、室温にてトリフルオロ酢酸 (3.1 mL)を加えて終夜撹拌した。反応液を減圧濃縮し、酢酸エチルで共沸することにより、化合物120 (252 mg, 収率113%)を得た。

ESI-MS m/z: 561 $(M + H)^+$

[0334] 化合物125の合成

[化168]



[0335] 工程87

化合物103 (2.00 g, 9.47 mmol)をN, N'-ジメチルホルムアミド (40 mL)に溶解し、室温にて2-アミノ-1,3-プロパンジオール (1.90 g, 20.84 mmol)、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 (4.00 g, 20.84 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール1水和物 (145 mg, 0.947 mmol)を加えて2時間撹拌した。減圧下、溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル/メタノール=70/30)で精製した。さらに酢酸エチルでスラリー精製することにより、化合物121 (2.68 g, 収率79 %)を得た。

ESI-MS m/z: 356 $(M - H)^-$

[0336] 工程88

工程87で合成した化合物121 (500 mg, 1.40 mmol)をアセトニトリル (10 mL)に懸濁し、室温にてアクリル酸tert-ブチルエステル (3.59 g, 28.0 mmol)、ベンジルトリメチルアンモニウムヒドロキシド (40%水溶液; 1.76 mL, 702 mmol)を加えて終夜撹拌した。減圧下、溶媒を留去し、水を加え、酢酸エチルで抽出した後、有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧下、溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘプタン/酢酸エチル=50/50)で精製することにより、化合物122 (300 mg, 収率24 %)を得た。

ESI-MS m/z: 871 $(M + H)^+$

[0337] 工程89

工程88で合成した化合物122 (340 mg, 0391 mmol)をテトラヒドロフラン (6.8 mL)に溶解し、室温にて10%パラジウムカーボン粉末 (含水品, 54.29%; 31.3 mg)を加え、水素雰囲気下で6時間撹拌した。反応液をろ過し、減圧下、溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘプタン/酢酸エチル=30/70)で精製することにより、化合物123 (235 mg, 収率72 %)を得た。

ESI-MS m/z: 841 $(M + H)^+$

[0338] 工程90

工程89で合成した化合物123 (232 mg, 0.276 mmol)をN, N'-ジメチルホルムアミド (4.6 mL)に溶解し、室温にてドデカン酸モノベンジルエステル (0.133 mg, 0.414 mmol)、ジイソプロピルエチルアミン (0.145 mL, 0.829 mmol)、O-(7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスファート (158 mg, 0.414 mmol)を加えて終夜撹拌した。反応液に水を加え、酢酸エチルで抽出した後、有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液と飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧下、溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘプタン/

酢酸エチル=30/70)で精製することにより、化合物124 (274 mg, 収率87 %)を得た。

ESI-MS m/z: 1141 $(M - H)^-$

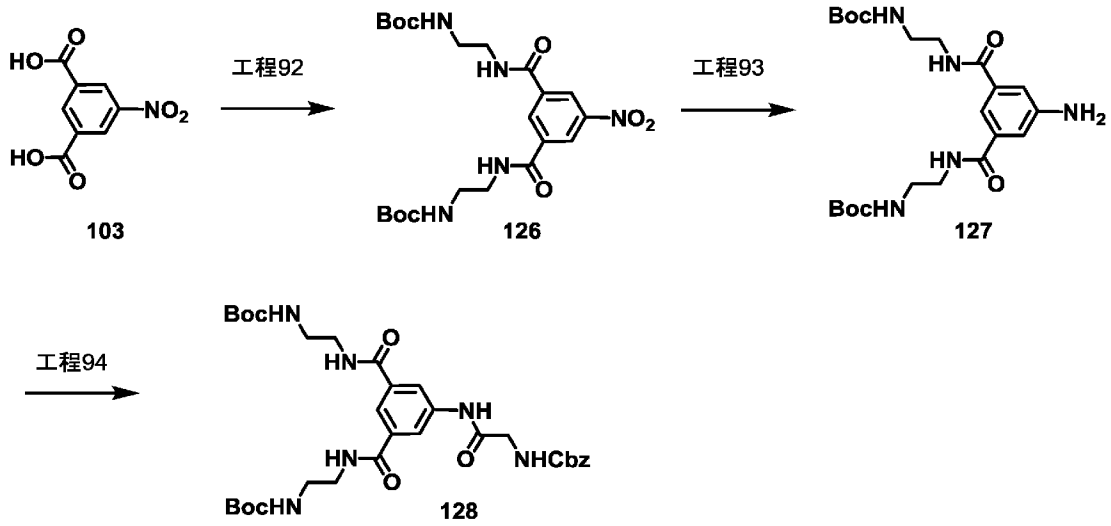
[0339] 工程91

工程90で合成した化合物124 (273 mg, 0.239 mmol)をジクロロメタン (2.7 mL)に溶解し、室温にてトリフルオロ酢酸 (2.7 mL)を加えて終夜撹拌した。反応液を減圧濃縮し、酢酸エチルで共沸することにより、化合物125 (231 mg, 収率105%)を得た。

ESI-MS m/z: 919 $(M + H)^+$

[0340] 化合物128の合成

[化169]



[0341] 工程92

4-ニトロイソフタル酸103 (500 mg, 2.37 mmol)およびN-Boc-エチレンジアミン (808 mg, 5.21 mmol)をN, N'-ジメチルホルムアミド (10 mL)に溶解し、室温にてトリエチルアミン (0.90 mL, 7.11 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール一水和物 (703 mg, 5.21 mmol) および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 (1.36 g, 7.11 mmol) を加えて16時間撹拌した。反応液を後処理し、粗体をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製することにより、化合物126 (650 mg, 収率55 %)を得た。

[0342] 工程93

工程92で合成した化合物126 (500 mg, 1.01 mmol)および亜鉛末 (330 mg, 5.05 mmol)をメタノール (3.5 mL)およびテトラヒドロフラン (3.5 mL)に懸濁し、0℃にて塩化アンモニウム (378 mg, 7.07 mmol)の水溶液を滴下し、室温にて24時間撹拌した。反応液を後処理し、粗体をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製することにより、化合物127 (160 mg, 収率34 %)を得た。

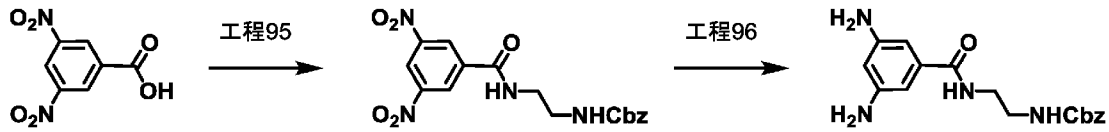
[0343] 工程94

工程93で合成した化合物127 (200 mg, 0.430 mmol)およびN-Cbz-グリシン (90.0 mg, 0.430 mmol)をN, N'-ジメチルホルムアミド (2.0 mL)に溶解し、室温にてジイソプロピルエチルアミン (0.220 mL, 1.29 mmol)、O-(7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスファート (245 mg, 0.645 mmol)を加えて16時間撹拌した。反応液を後処理し、粗体をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製することにより、化合物128 (180 mg, 収率64 %)を得た。

ESI-MS m/z: 657 $(M + H)^+$

[0344] 化合物130の合成

[化170]



128 129 130

[0345] 工程95

3,5-ジニトロ安息香酸128 (500 mg, 2.36 mmol)およびN-Cbz-エチレンジアミン (588 mg, 2.83 mmol)をN, N'-ジメチルホルムアミド (5.0 mL)に溶解し、室温にてトリエチルアミン (0.65 mL, 4.72 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール一水和物 (380 mg, 2.83 mmol) および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 (675 mg, 3.54 mmol) を加えて16時間撹拌した。反応液を後処理し、粗体をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製することにより、化合物129 (445 mg, 収率48 %)を得た。

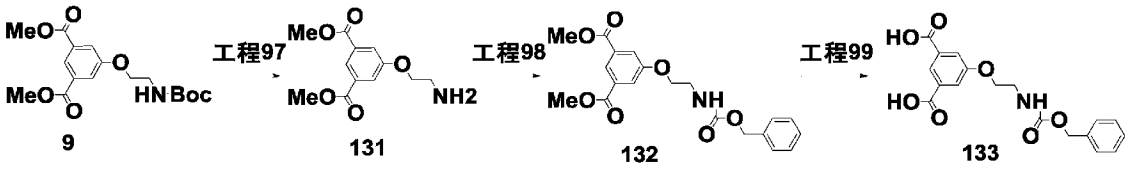
[0346] 工程96

工程95で合成した化合物129 (200 mg, 0.515 mmol)をエタノール (5.0 mL)に溶解し、室温にて塩化スズ(II) (584 mg, 3.09 mmol)および濃塩酸 (0.2 mL)を加え、80℃で16時間撹拌した。反応液を後処理し、化合物130 (180 mg, 収率106%)を得た。

ESI-MS m/z: 329 $(M + H)^+$

[0347] 化合物133の合成

[化171]



[0348] 工程97

実施例1の工程6で合成した化合物9(8.17 g, 23.12 mmol)を用いて実施例1の工程9と同様の方法で化合物131を得た(3.7 g, 収率63%)。

ESI-MS m/z: 254$(M+H)^+$

[0349] 工程98

工程97で得られた化合物131(3.7 g, 14.63 mmol)を用いて実施例1の工程10と同様の方法で化合物132を得た(3.82 g, 収率67%)。

ESI-MS m/z: 432$(M+HCOO)^-$

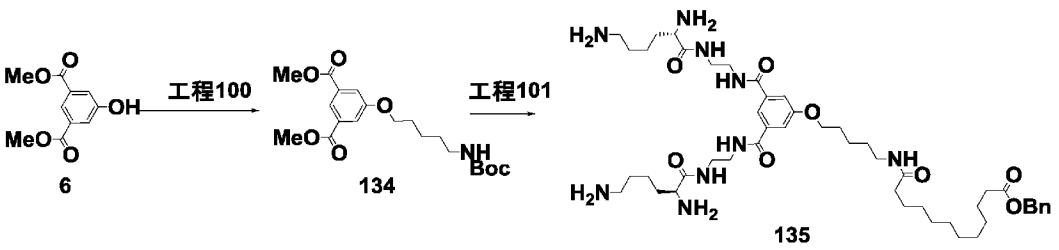
[0350] 工程99

工程98で得られた化合物132(3.82 g, 9.86 mmol)を用いて実施例1の工程7と同様の方法で化合物133を得た(3.08 g, 収率87%)。

ESI-MS m/z: 360$(M+H)^+$

[0351] 化合物135の合成

[化172]



[0352] 工程100

化合物8(2g, 9.53mmol)とert-ブトキシカルボニルアミノ)-1-ペンタノール（東京化成社製,,2g,10mmol)を用い、実施例1の工程6と同様の方法で化合物134を得た(2.40 g, 収率63%)。

ESI-MS m/z: 296(M+H)+, 脱Boc体として検出

[0353] 工程101

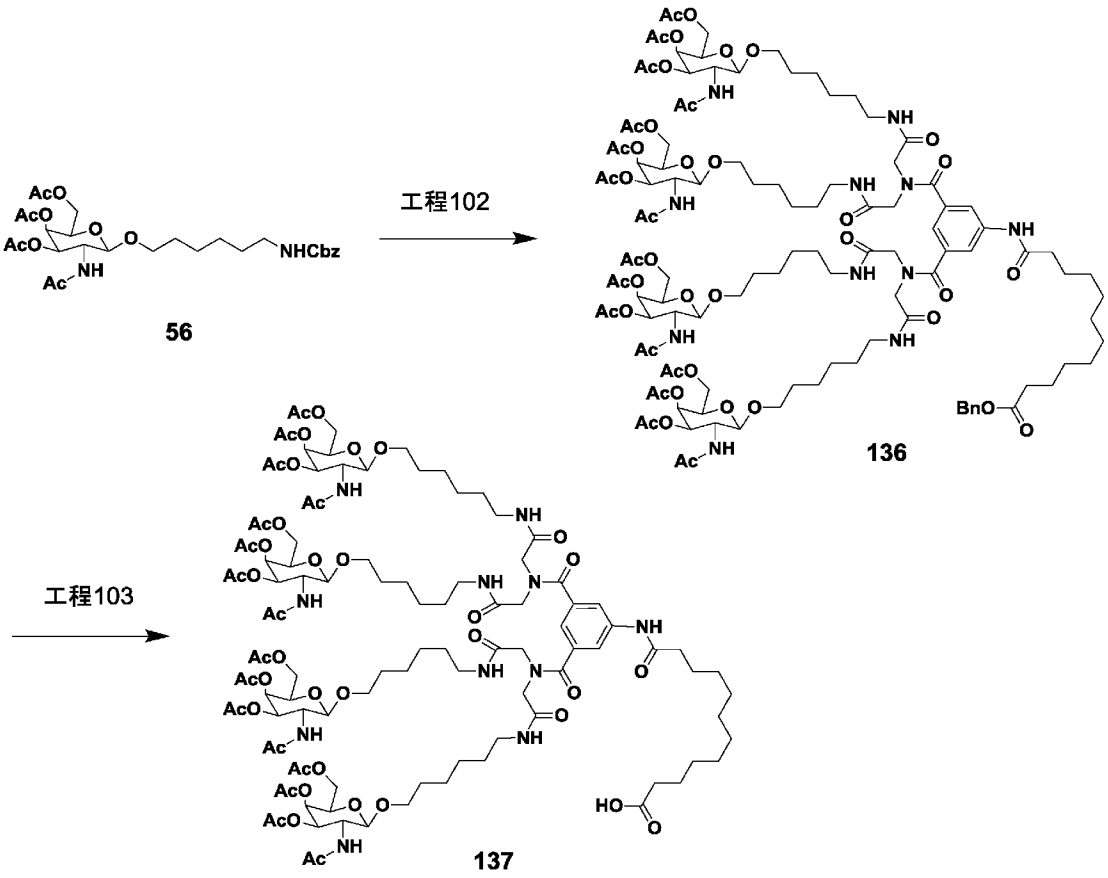
工程100で合成した化合物134を用いて、実施例1の工程7-9, 14-17と同様の方法で化合物135を得た(1.579g,収率21%）。

ESI-MS m/z: 910 (M+H)+

[0354] 実施例14　糖リガンドーテザーユニットの合成

化合物137の合成

[化173]



[0355] 工程102

工程51で合成した化合物56 (1.015 g, 1.748 mmol)をN, N'-ジメチルホル

ムアミド（12 mL)に溶解し、室温にて10%パラジウムカーボン粉末（含水品，54.29%; 187 mg)を加え、水素雰囲気下で6時間撹拌した。反応液をろ過した。ろ液に工程76で合成した化合物107（250.0 mg，0.350 mmol），1-ヒドロキシベンゾトリアゾール一水和物（26.80 mg，0.1750 mmol）、および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（402.0 mg，2.099 mmol）を加え、室温で終夜攪拌した。反応液に水を加え、酢酸エチルで抽出した後、有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液および飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧下、溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（クロロホルム/メタノール=87/13）で精製することにより、化合物136（617.0 mg，収率88%）を得た。

ESI-MS m/z: 1215 $(M + 2H)^{2+}$

[0356] 工程103

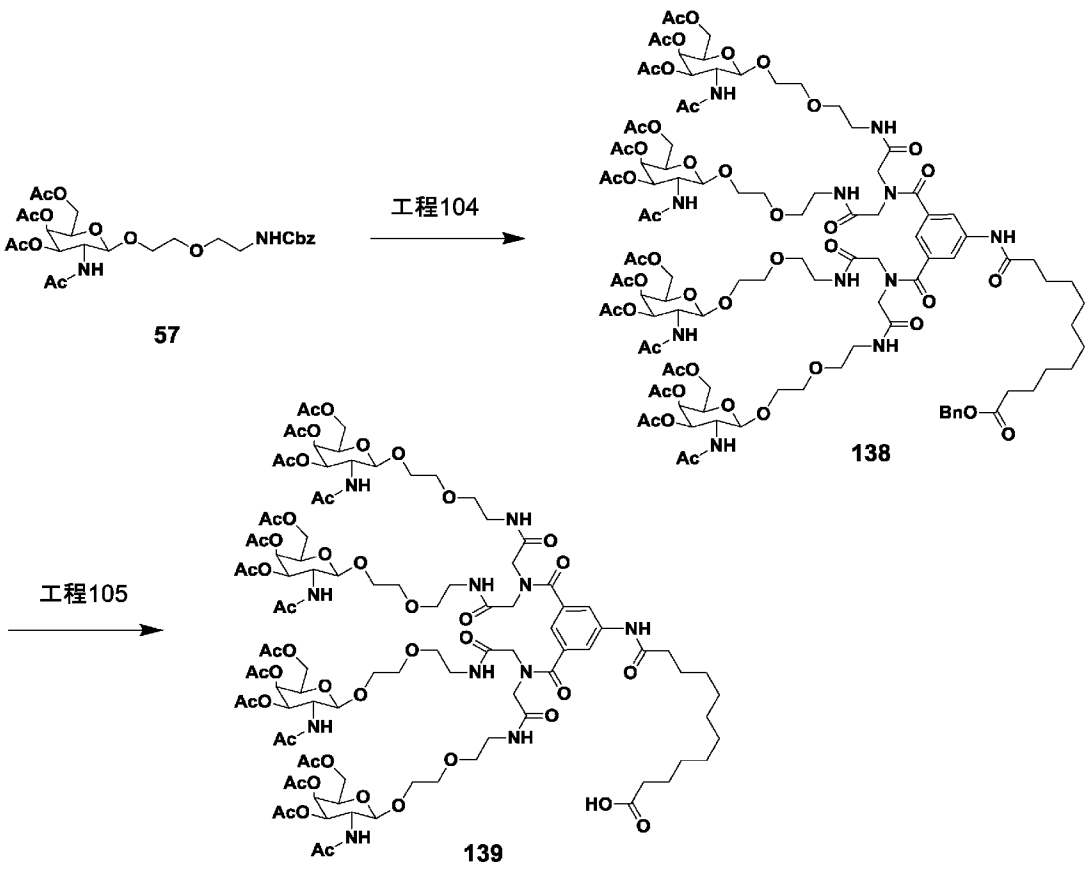
工程102で合成した化合物136（0.7380 g，0.3040 mmol)をテトラヒドロフラン（7 mL)に溶解し、室温にて10%パラジウムカーボン粉末（含水品，54.29%; 135.90 mg)を加え、水素雰囲気下で終夜撹拌した。反応液をろ過し、減圧下、溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（クロロホルム/メタノール=87/13）で精製することにより、化合物137（581 mg，収率82%）を得た。

ESI-MS m/z: 1170 $(M + 2H)^{2+}$

^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d6, δ): 1.12-2.36 (106H, m), 2.91-3.19 (8H, m), 3.23-3.55 (14H, m), 3.60-3.76 (4H, m), 3.78-3.94 (8H, m), 3.95-4.10 (16H, m), 4.47 (4H, d, J = 8.8 Hz), 4.92-5.01 (4H, m), 5.17-5.24 (4H, m), 6.98 (1H, s), 7.64 (2H, s), 7.81-7.95 (4H, m), 8.28-8.38 (2H, m), 8.44-8.56 (2H, m), 10.13 (1H, s).

[0357] 化合物139の合成

[化174]



[0358] 工程104

工程52で合成した化合物57 (500 mg, 0.879 mmol)をN, N'-ジメチルホルムアミド (6.5 mL)に溶解し、室温にて10%パラジウムカーボン粉末 (含水品, 54.29%; 94 mg)を加え、水素雰囲気下で4時間撹拌した。反応液をろ過した。ろ液に工程76で合成した化合物107 (126.0 mg, 0.176 mmol), 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール一水和物 (13.47 mg, 0.088 mmol)、および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 (202.0 mg, 1.055 mmol) を加え、室温で終夜攪拌した。反応液を減圧下、溶媒を留去し、残渣を逆相カラムクロマトグラフィー (水/アセトニトリル) で精製することにより、化合物138 (249.7 mg, 収率60%) を得た。

ESI-MS m/z: 1191 $(M + 2H)^{2+}$

[0359] 工程105

工程104で合成した化合物138 (0.242 g, 0.102 mmol)をテトラヒドロフラ

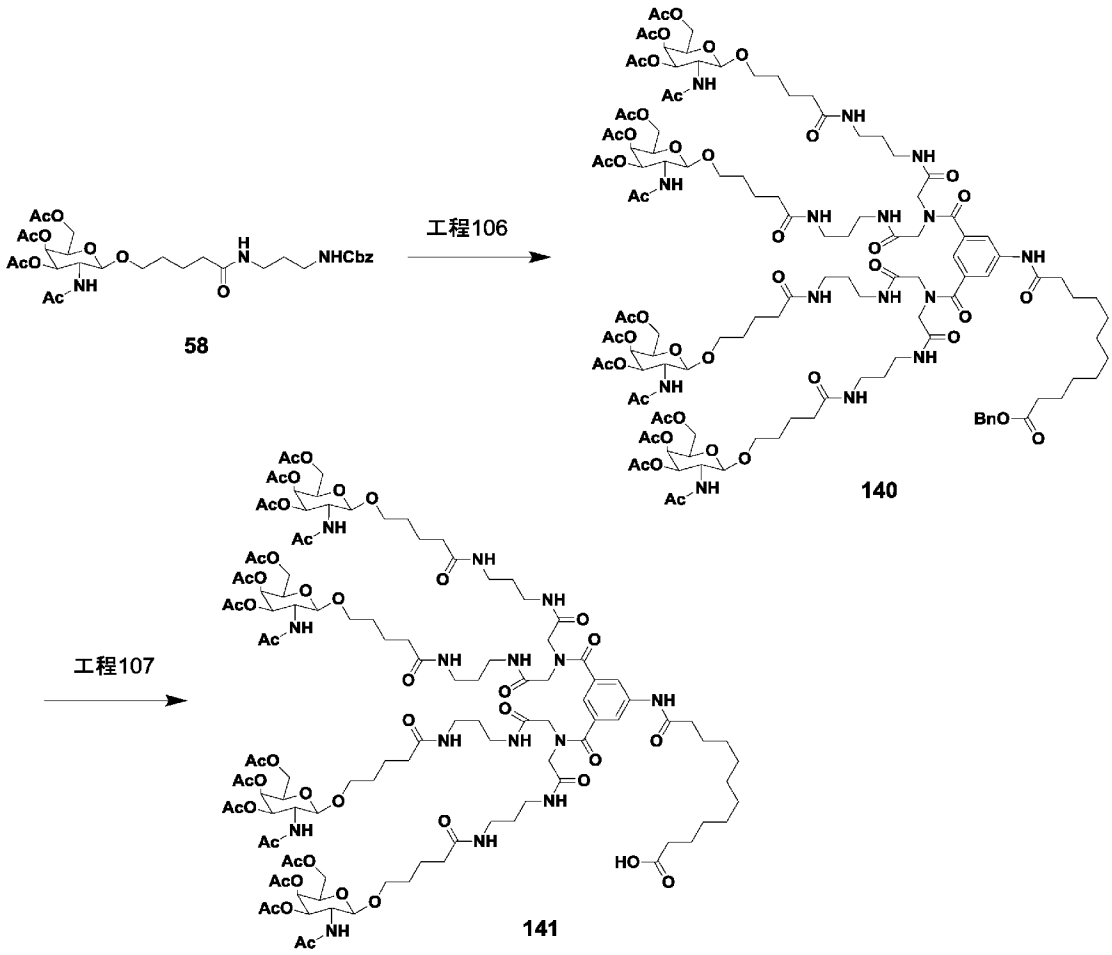
ン（3.6 mL)および水（1.2 mL）に溶解し、室温にて10%パラジウムカーボン粉末（含水品，54.29%；45 mg)を加え、水素雰囲気下で4時間攪拌した。反応液をろ過し、減圧下、溶媒を留去し、化合物139（216 mg，収率93%）を得た。

ESI-MS m/z: 1146 (M + 2H) 2+

1H-NMR (400 MHz, DMSO-d6, δ): 1.15-1.65 (20H, m), 1.68-2.15 (52H, m), 3.13-3.29 (6H, m), 3.40-3.67 (16H, m), 3.71-3.96 (11H, m), 3.98-4.14 (16H, m), 4.55 (4H, t, J = 8.8 Hz), 4.93-5.06 (4H, m), 5.12-5.28 (4H, m), 6.56 (1H, s), 6.98 (1H. s), 7.64 (2H, s), 7.77-7.93 (4H, m), 8.26-8.49 (3H, m), 10.10 (1H, s).

[0360] 化合物141の合成

[化175]



[0361] 工程106

工程53で合成した化合物58（430 mg, 0.674 mmol)をN, N'-ジメチルホルムアミド（6 mL)に溶解し、室温にて10%パラジウムカーボン粉末（含水品, 54.29%; 79 mg)を加え、水素雰囲気下で4時間撹拌した。反応液をろ過した。ろ液に化合物107（105.0 mg, 0.148 mmol），1-ヒドロキシベンゾトリアゾール一水和物（11.31 mg, 0.074 mmol）、および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（170.0.0 mg, 0.887 mmol）を加え、室温で終夜撹拌した。反応液を減圧下、溶媒を留去し、残渣を逆相カラムクロマトグラフィー（水/アセトニトリル）で精製することにより、化合物140（218.1 mg, 収率56%）を得た。

ESI-MS m/z: 1329 $(M + 2H)^{2+}$

[0362] 工程107

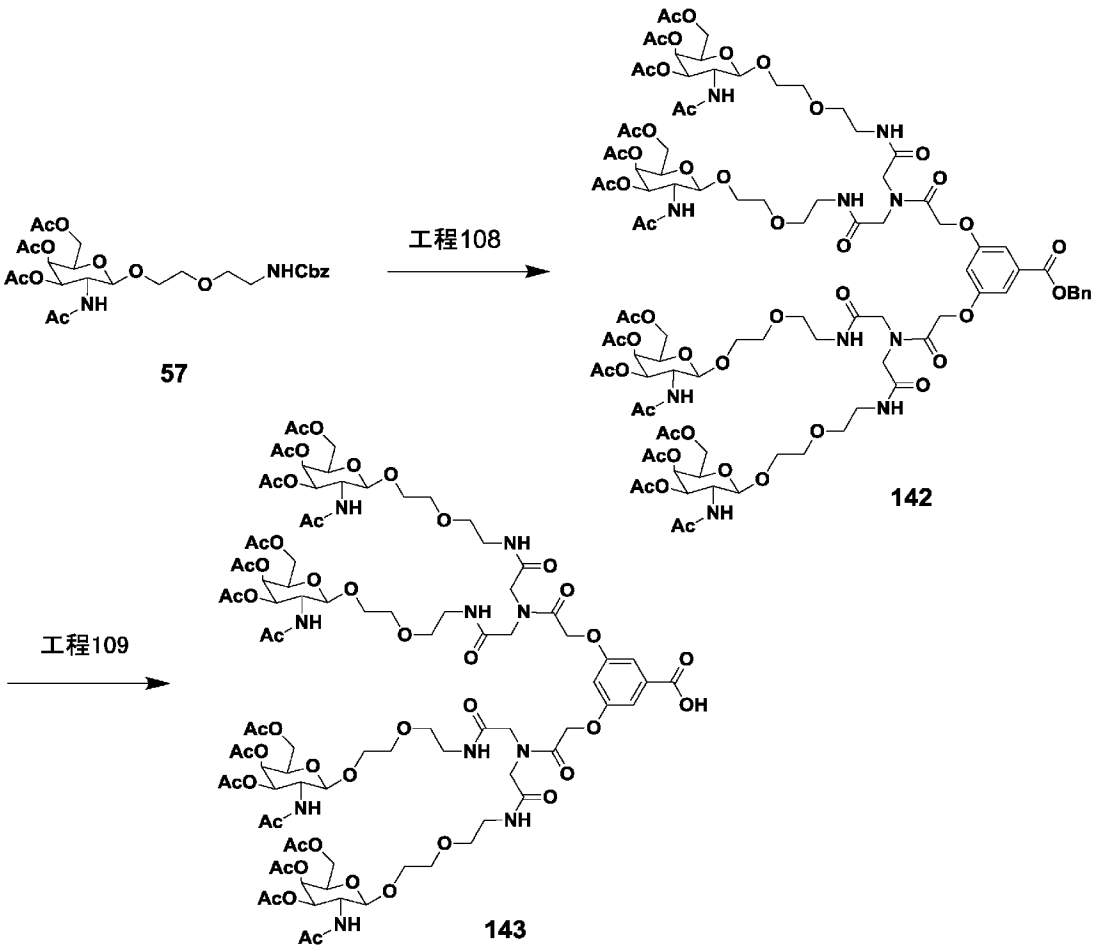
工程106で合成した化合物140（0.210 g, 0.079 mmol)をテトラヒドロフラン（3.1 mL)および水（1.0 mL）に溶解し、室温にて10%パラジウムカーボン粉末（含水品, 54.29%; 39 mg)を加え、水素雰囲気下で4時間撹拌した。反応液をろ過し、減圧下、溶媒を留去し、化合物141（192.7 mg, 収率95%）を得た。

ESI-MS m/z: 1284 (M + 2H) 2+

1H-NMR (400 MHz, DMSO-d6, δ): 1.17-1.65 (42H, m), 1.69-2.13 (61H, m), 2.95-3.17 (16H, m), 3.65-3.77 (3H, m), 3.79-3.94 (6H, m), 3.96-4.10 (16H, m), 4.48 (4H, d, J = 8.4 Hz), 4.96 (4H, dd, J = 2.4, 11.2 Hz), 5.21 (4H, d, J = 3.2 Hz), 7.01 (1H, s), 7.64-7.92 (11H, m), 8.26-8.48 (4H, m), 10.14 (1H, s).

[0363] 化合物143の合成

[化176]



[0364] 工程108

工程52で合成した化合物57 (450 mg, 0.791 mmol)をN, N'-ジメチルホルムアミド (6 mL)に溶解し、室温にて10%パラジウムカーボン粉末 (含水品, 54.29%; 85 mg)を加え、水素雰囲気下で5時間撹拌した。反応液をろ過した。ろ液に工程81で合成した化合物113 (94 mg, 0.158 mmol), 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール一水和物 (133.0 mg, 0.871 mmol)、および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 (182.0 mg, 0.950 mmol)を加え、室温で終夜攪拌した。反応液を減圧下、溶媒を留去し、残渣を逆相カラムクロマトグラフィー (水/アセトニトリル) で精製することにより、化合物142 (99 mg, 収率28%) を得た。

ESI-MS m/z: 1129 $(M + 2H)^{2+}$

[0365] 工程109

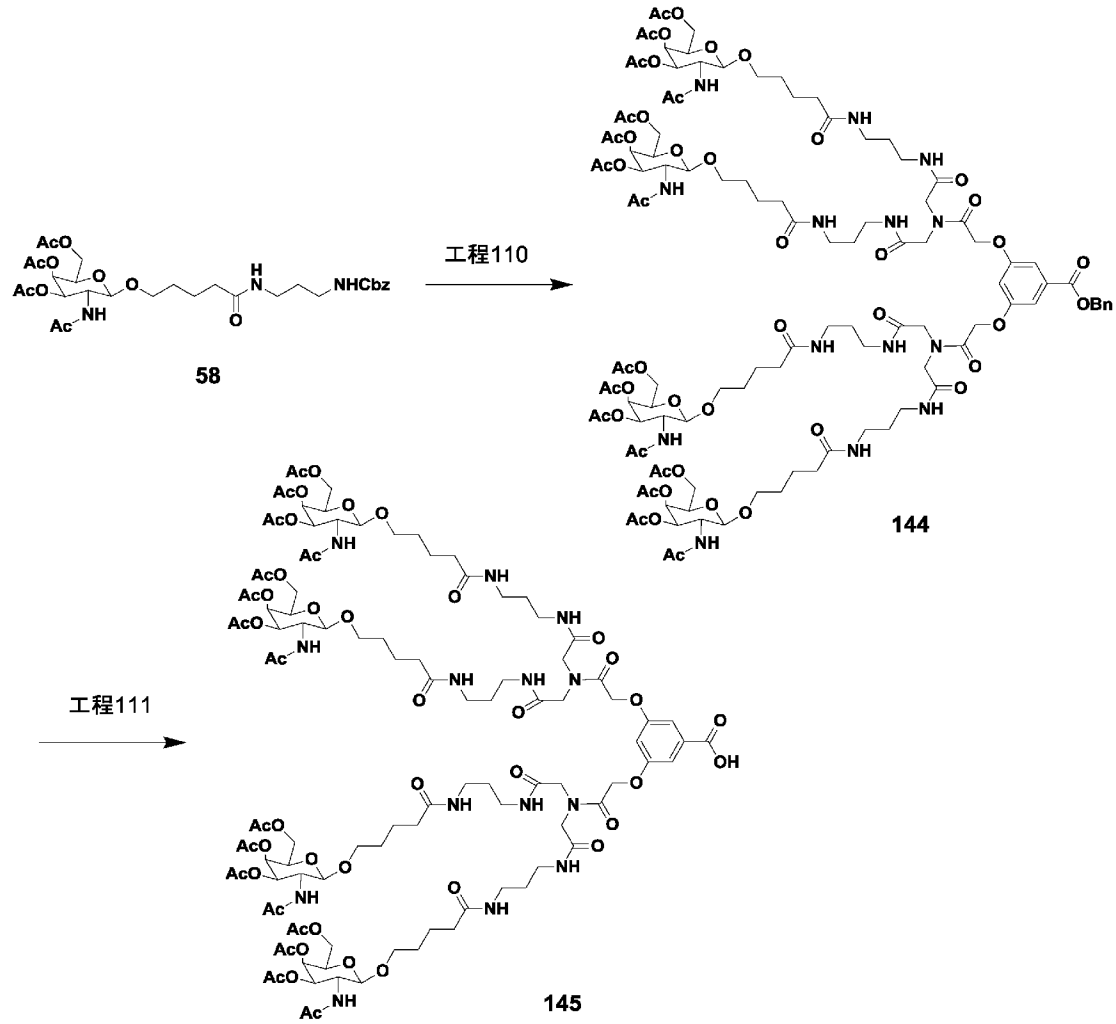
工程108で合成した化合物142（80 mg, 0.035 mmol)をテトラヒドロフラン(1.7 mL)および水（0.85 mL）に溶解し、室温にて10%パラジウムカーボン粉末（含水品, 54.29%; 26 mg)を加え、水素雰囲気下で2時間撹拌した。反応液をろ過し、減圧下、溶媒を留去し、化合物143（57.5 mg, 収率75%）を得た。

ESI-MS m/z: 1084 $(M + 2H)^{2+}$

^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d6, δ): 1.69-2.21 (46H, m), 3.14-3.65 (28H, m), 3.67-4.22 (27H, m), 4.43-4.66 (4H, m), 4.69-4.88 (4H, m), 4.89-5.08 (4H, m), 5.12-5.32 (4H, m), 6.54-6.68 (1H, br), 7.01 (2H, s), 7.78-8.09 (3H, m), 8.13-8.31 (2H, m), 8.58-8.75 (2H, m).

[0366] 化合物145の合成

[化177]



[0367] 工程110

工程53で合成した化合物58（418 mg, 0.655 mmol)をN, N'-ジメチルホルムアミド（6 mL)に溶解し、室温にて10%パラジウムカーボン粉末（含水品, 54.29%; 77 mg)を加え、水素雰囲気下で5時間撹拌した。反応液をろ過した。ろ液に工程81で合成した化合物113（85 mg, 0.144 mmol），1-ヒドロキシベンゾトリアゾール一水和物（121.0 mg, 0.791 mmol）、および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（165.0 mg, 0.863 mmol）を加え、室温で終夜攪拌した。反応液を減圧下、溶媒を留去し、残渣を逆相カラムクロマトグラフィー（水/アセトニトリル）で精製することにより、化合物144（99 mg, 収率28%）を得た。

ESI-MS m/z: 1268 $(M + 2H)^{2+}$

[0368] 工程111

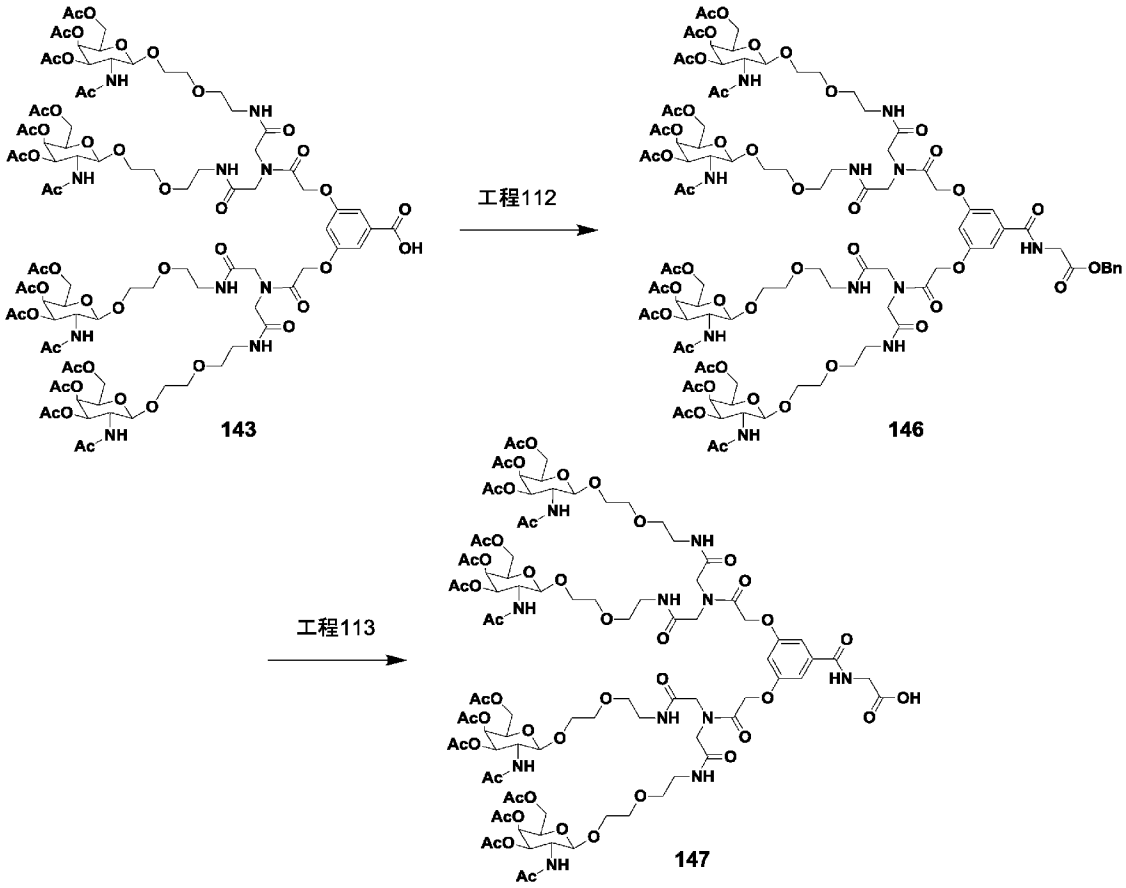
工程110で合成した化合物144（186 mg, 0.073 mmol)をテトラヒドロフラン（2.8 mL)および水（0.93 mL）に溶解し、室温にて10%パラジウムカーボン粉末（含水品, 54.29%; 40 mg)を加え、水素雰囲気下で2時間撹拌した。反応液をろ過し、減圧下、溶媒を留去し、化合物145（156.7 mg, 収率87%）を得た。

ESI-MS m/z: 1222 $(M + 2H)^{2+}$

^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d6, δ): 1.36-1.62 (27H, m), 1.67-2.17 (64H, m), 2.92-3.21 (15H, m), 3.58-3.77 (2H, m), 3.80-3.95 (7H, m), 3.97-4.13 (15H, m), 4.47 (4H, d, J = 8.8 Hz), 4.88-5.02 (7H, m), 5.10-5.24 (3H, m), 6.95-7.00 (1H, m), 7.26-7.31 (2H, m), 7.72-7.88 (8H, m), 8.10-8.20 (2H, m), 8.51-8.60 (2H, m).

[0369] 化合物147の合成

[化178]



[0370] 工程112

工程109で合成した化合物143（171 mg, 0.079 mmol)をN, N'-ジメチルホルムアミド（3.4 mL)に溶解し、グリシンベンジル p-トルエンスルホン酸塩（32.0 mg, 0.095 mmol）、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール一水和物（12.09 mg, 0.079 mmol）、および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（18.16 mg, 0.095 mmol）を加え、室温で終夜攪拌した。反応液を減圧下、溶媒を留去し、残渣を逆相カラムクロマトグラフィー（水/アセトニトリル）で精製することにより、化合物146（55.7 mg, 収率31%）を得た。

ESI-MS m/z: 1158 $(M + 2H)^{2+}$

[0371] 工程113

工程112で合成した化合物146（54 mg, 0.023 mmol)をテトラヒドロフラン(0.83 mL)および水（0.28 mL）に溶解し、室温にて10%パラジウムカーボン粉

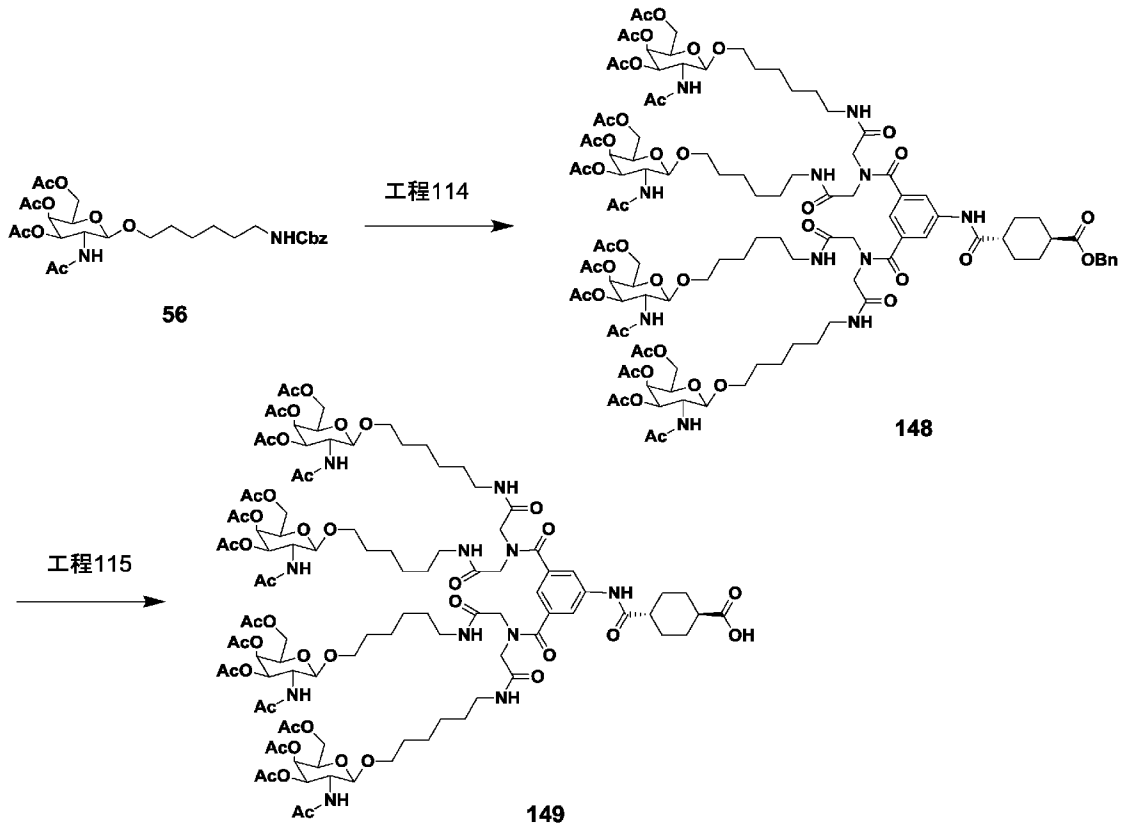
末（含水品，54.29%；18 mg)を加え、水素雰囲気下で2時間撹拌した。反応液をろ過し、減圧下、溶媒を留去し、化合物147（50.1 mg，収率97%）を得た。

ESI-MS m/z: 1112 $(M + 2H)^{2+}$

1H-NMR (400 MHz, DMSO-d6, δ): 0.96-1.06 (3H, m), 1.71-2.20 (54H, m), 3.41-3.64 (15H, m), 3.68-4.20 (32H), 4.55 (4H, d, J = 8.4 Hz), 4.81 (4H, s), 4.94-5.02 (4H, m), 5.17-5.25 (4H, m), 6.63-6.76 (2H, m), 6.93-7.02 (2H, m), 7.84-8.00 (3H, m), 8.17-8.30 (2H, m), 8.58-8.70 (2H, m).

[0372] 化合物149の合成

[化179]



[0373] 工程114

化合物56（500 mg，0.861 mmol)をN，N'-ジメチルホルムアミド（10 mL）に溶解し、室温にて10%パラジウムカーボン粉末（含水品，54.29%；92.1 mg）を加え、水素雰囲気下で2時間撹拌した。アルゴン雰囲気下、室温にて化合物116（113 mg，0.172 mmol)、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（198 mg, 1.03 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール1水和物（13.2 mg, 0.086 mmol)を加えて終夜撹拌した。反応液をセライトでろ過し、減圧下、溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（クロロホルム/メタノール=90/10)で精製し、さらに逆相分取HPLC（アセトニトリル/水)で精製することにより、化合物148（195 mg, 収率48%)を得た。

ESI-MS m/z: 1186 $(M + 2H)^{2+}$

[0374] 工程115

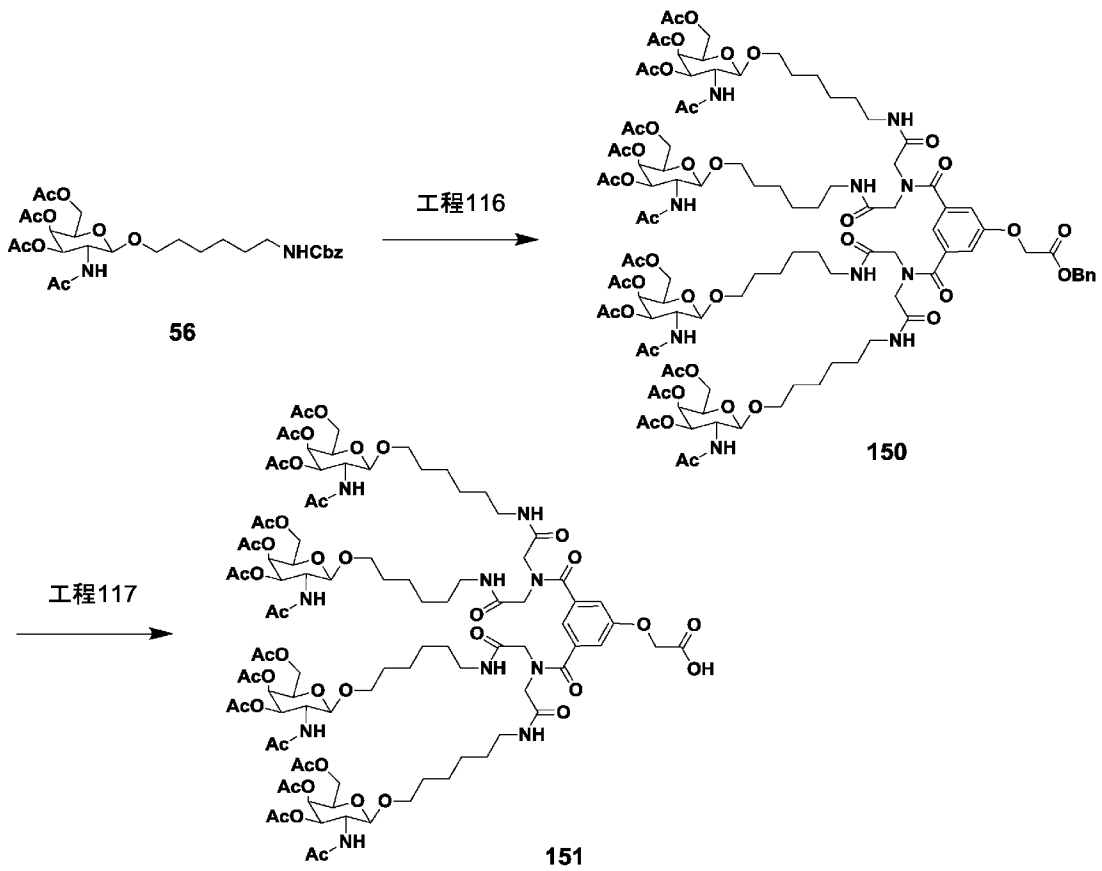
工程114で合成した化合物148（194 mg, 0.082 mmol)をテトラヒドロフラン（2.9 mg)および水（1.0 mL)に溶解し、室温にて10%パラジウムカーボン粉末（含水品, 54.29%; 35.7 mg)を加え、水素雰囲気下で8時間撹拌した。反応液をろ過し、減圧下、溶媒を留去し、化合物149（183 mg, 収率98%）を得た。

ESI-MS m/z: 1141 $(M + 2H)^{2+}$

^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d6, δ): 1.21-1.45 (m, 40H), 1.76-2.18 (m, 50H), 3.00-3.09 (m, 8H), 3.40-4.20 (m, 32H), 4.47 (d, J = 8.5 Hz, 4H), 4.96 (dd, J = 3.1, 11.2 Hz, 4H), 5.21 (d, J = 3.1 Hz, 4H), 6.98 (s, 1H), 7.65 (s, 2H), 7.84 (d, J = 9.0 Hz, 4H), 8.31 (brs, 1H), 8.44 (brs, 1H), 10.11 (s, 1H).

[0375] 化合物151の合成

[化180]



[0376] 工程116

化合物56 (500 mg, 0.861 mmol)をN, N'-ジメチルホルムアミド (10 mL)に溶解し、室温にて10%パラジウムカーボン粉末 (含水品, 54.29%; 92.1 mg)を加え、水素雰囲気下で2時間撹拌した。アルゴン雰囲気下、室温にて化合物120 (97.0 mg, 0.172 mmol)、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 (198 mg, 1.03 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール1水和物 (13.2 mg, 0.086 mmol)を加えて終夜撹拌した。反応液をセライトでろ過し、減圧下、溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルム/メタノール=85/15)で精製し、さらに逆相分取HPLC (アセトニトリル/水)で精製することにより、化合物150 (179 mg, 収率46%)を得た。

ESI-MS m/z: 1138 $(M + 2H)^{2+}$

[0377] 工程117

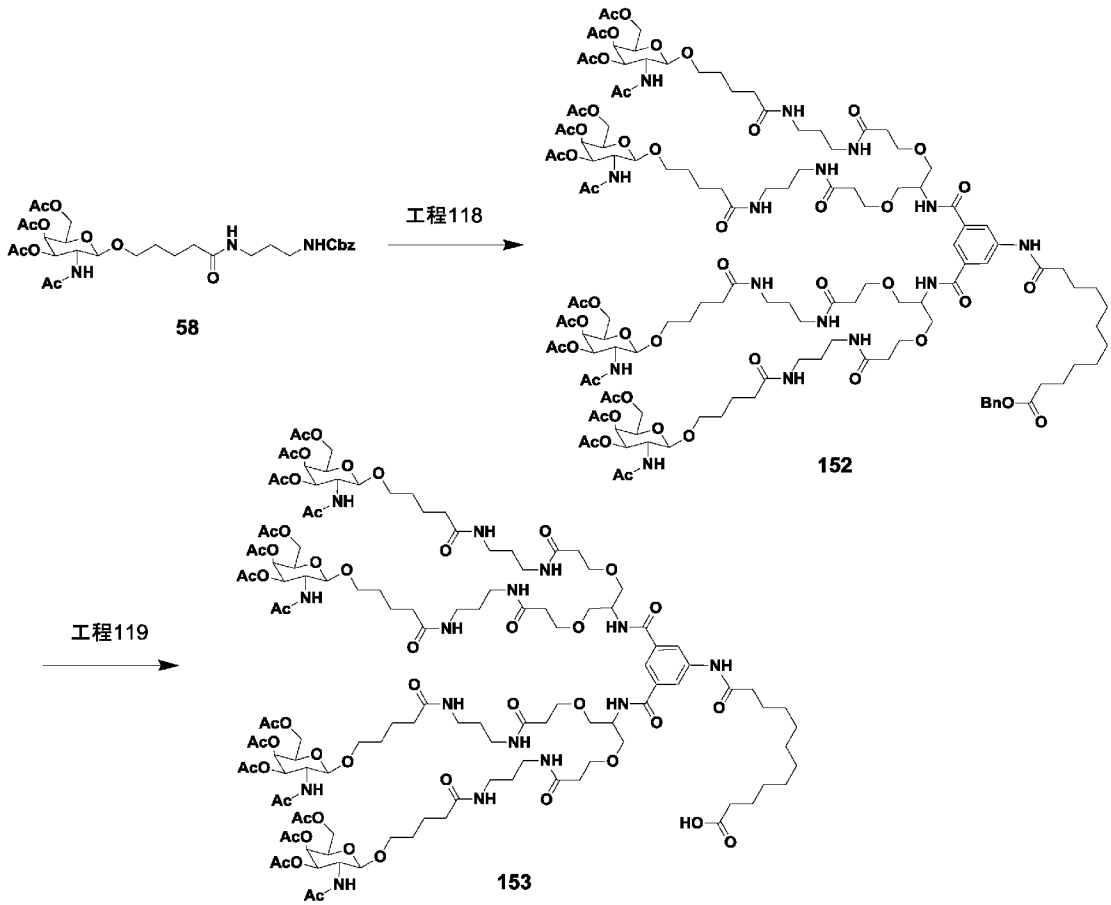
工程116で合成した化合物150（175 mg, 0.077 mmol)をテトラヒドロフラン（2.6 mg)および水（0.9 mL)に溶解し、室温にて10%パラジウムカーボン粉末（含水品, 54.29%; 32.4 mg)を加え、水素雰囲気下で1時間撹拌した。反応液をろ過し、減圧下、溶媒を留去し、化合物151（160 mg, 収率95%）を得た。

ESI-MS m/z: 1093 $(M + 2H)^{2+}$

^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d6, δ): 1.23-1.45 (m, 32H), 1.77 (s, 12H), 1.89 (s, 12H), 1.99 (s, 12H), 2.10 (s, 12H), 3.01-3.11 (m, 8H), 3.69-4.02 (m, 34H), 4.47-4.50 (m, 4H), 4.94-4.98 (m, 4H), 5.21 (d, J = 3.1 Hz, 4H), 6.92 (s, 1H), 6.94 (s, 2H), 7.87 (d, J = 9.4 Hz, 2H), 7.92 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 8.33 (brs, 2H), 8.50 (brs, 2H).

[0378] 化合物153の合成

[化181]



[0379] 工程118

化合物58（500 mg, 0.784 mmol)をN, N'-ジメチルホルムアミド（10 mL）

に溶解し、室温にて10%パラジウムカーボン粉末（含水品，54.29%; 92.1 mg）を加え、水素雰囲気下で2時間撹拌した。アルゴン雰囲気下、室温にて化合物125（144 mg，0.157 mmol)、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（180 mg，0.941 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール1水和物（12.0 mg，0.078 mmol)を加えて終夜撹拌した。反応液をセライトでろ過し、減圧下、溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（クロロホルム/メタノール=80/20)で精製し、さらに逆相分取HPLC（アセトニトリル/水)で精製することにより、化合物152（191 mg，収率43%)を得た。

ESI-MS m/z: 1431 $(M + 2H)^{2+}$

[0380] 工程119

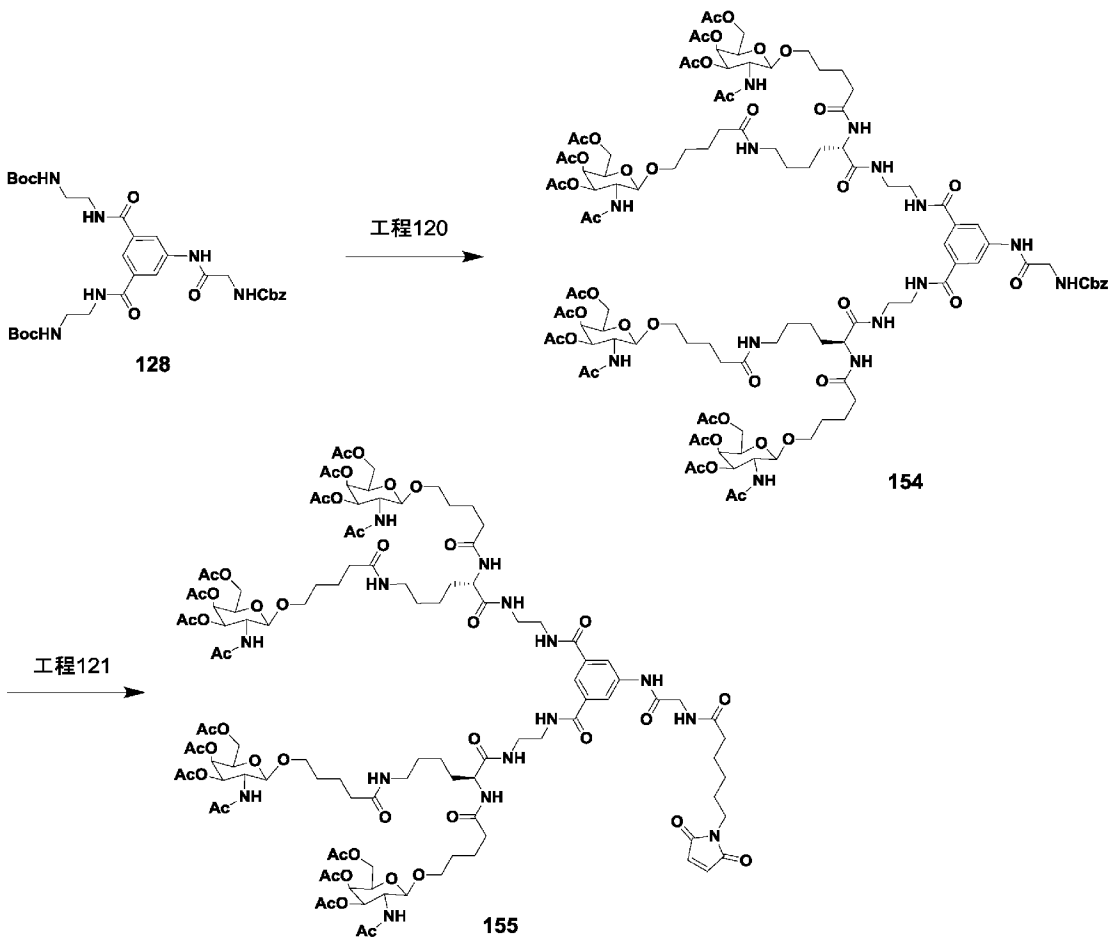
工程118で合成した化合物152（186 mg，0.065 mmol)をテトラヒドロフラン（2.8 mg)および水（0.9 mL)に溶解し、室温にて10%パラジウムカーボン粉末（含水品，54.29%; 34.3 mg)を加え、水素雰囲気下で1時間撹拌した。反応液をろ過し、減圧下、溶媒を留去し、化合物153（174 mg，収率97%）を得た。

ESI-MS m/z: 1386 $(M + 2H)^{2+}$

^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d6, δ):1.25-4.02 (m, 164H), 4.18-4.26 (m, 2H), 4.47 (d, J= 8.1 Hz, 4H), 4.96 (dd, J = 3.1, 11.2 Hz, 4H), 5.21 (d, J = 3.6 Hz, 4H), 7.74-7.91 (m, 13H), 8.18 (s, 2H), 8.36 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 10.27 (brs, 1H).

[0381] 化合物155の合成

[化182]



[0382] 工程120

化合物128 (150 mg, 0.228 mmol)をジクロロメタン (1.5 mL)に溶解し、室温にてトリフルオロ酢酸 (1.5 mL)を加えて4時間撹拌した。反応液を減圧濃縮し、酢酸エチルで共沸するした。残渣をN, N'-ジメチルホルムアミド (3 mL)に溶解し、室温にて化合物7 (574 mg, 0.571 mmol)、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 (109 mg, 0.571 mmol)、トリエチルアミン (0.159 mL, 1.14 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール1水和物(3.50 mg, 0.023 mmol)を加えて終夜撹拌した。反応液を減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルム/メタノール=90/10)で精製し、さらに逆相分取HPLC (アセトニトリル/水)で精製することにより、化合物154 (242 mg, 収率44%)を得た。

ESI-MS m/z: 1216 $(M + 2H)^{2+}$

[0383] 工程121

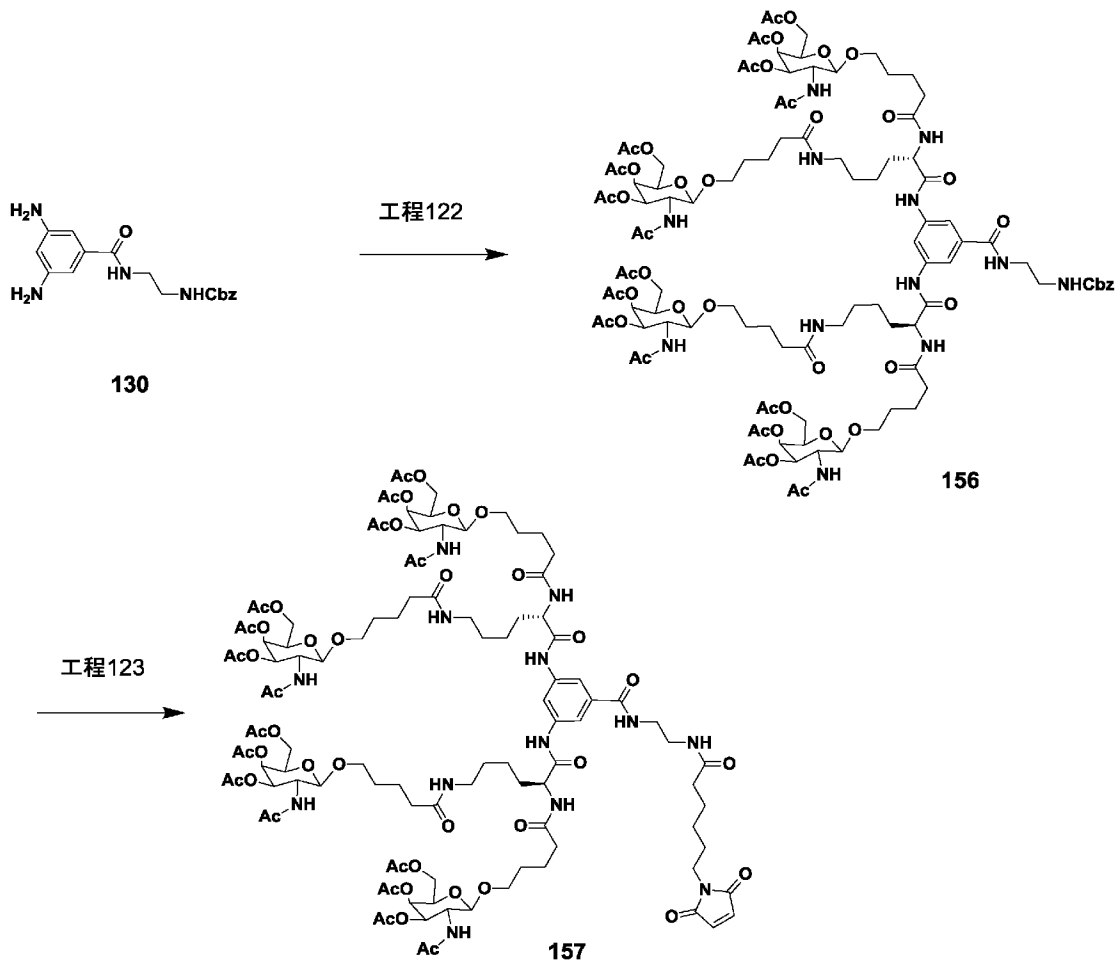
化合物154 (242 mg, 0.100 mmol)を テトラヒドロフラン/水 (4/1; 12 mL)に溶解し、室温にて10%パラジウムカーボン粉末（含水品, 54.29%; 44.6 mg)を加え、水素雰囲気下で2時間撹拌した。アルゴン雰囲気下、室温にて6-マレイミドヘキサン酸 (23.2 mg, 0.110 mmol)、4-(4,6-ジメトキシ-1,3,5-トリアジン-2-イル)-4-メチルモルホリニウムクロリド (55.2 mg, 0.199 mmol)を加えて終夜撹拌した。反応液をセライトでろ過し、減圧下、溶媒を留去し、残渣をHP20レジン（アセトン/水)で精製精製することにより、化合物155 (97.4 mg, 収率39%)を得た。

ESI-MS m/z: 1245 $(M + 2H)^{2+}$

^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d6, δ):1.14-2.16 (100H, m), 2.96-2.98 (4H, m), 3.24-3.41 (18H, m), 3.69-3.73 (4H, m), 3.83-3.91 (6H, m), 4.14-4.16 (2H, m), 4.47 (4H, d, J= 8.6 Hz), 4.96 (4H, dd, J = 3.6, 11.3 Hz), 5.21 (4H, d, J = 3.2 Hz), 7.01 (2H, s), 7.73-7.75 (2H, m), 7.83-7.94 (7H, m), 8.05-8.08 (2H, m), 8.14-8.20 (3H, m), 8.55-8.56 (2H, m), 10.24 (1H, brs).

[0384] 化合物157の合成

[化183]



[0385] 工程122

工程96で合成した化合物130 (75.0 mg, 0.228 mmol)をN, N'-ジメチルホルムアミド (3.0 mL)に溶解し、室温にて工程55で合成した化合物60 (574 mg, 0.571 mmol)、ジイソプロピルエチルアミン (0.199 mL, 1.14 mmol)、O-(7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスファート (217 mg, 0.571 mmol)を加えて終夜撹拌した。減圧下、溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルム/メタノール=90/10)で精製し、さらに逆相分取HPLC (アセトニトリル/水)で精製することにより、化合物156 (202 mg, 収率38%)を得た。

ESI-MS m/z: 1152 $(M + 2H)^{2+}$

[0386] 工程123

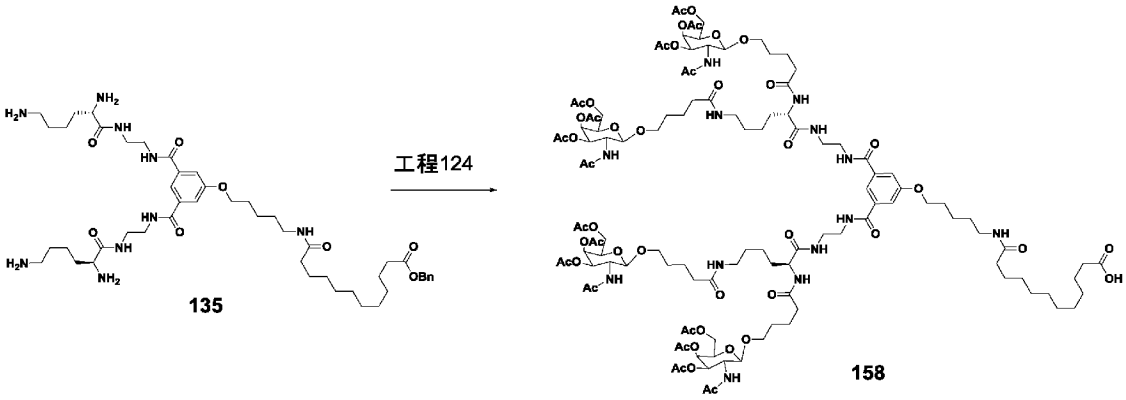
工程122で合成した化合物156 (196 mg, 0.085 mmol)を テトラヒドロフラ

ン/水（4/1; 10 mL)に溶解し、室温にて10%パラジウムカーボン粉末（含水品，54.29%; 36.1 mg)を加え、水素雰囲気下で2時間撹拌した。アルゴン雰囲気下、室温にて6-マレイミドヘキサン酸（19.8 mg, 0.094 mmol)、4-(4,6-ジメトキシ-1,3,5-トリアジン-2-イル)-4-メチルモルホリニウムクロリド（47.0 mg, 0.170 mmol)を加えて終夜撹拌した。反応液をセライトでろ過し、減圧下、溶媒を留去し、残渣をHP20レジン（アセトン/水)で精製精製することにより、化合物157（42.4 mg, 収率21%)を得た。

ESI-MS m/z: 1182 $(M + 2H)^{2+}$

[0387] 化合物158の合成

[化184]



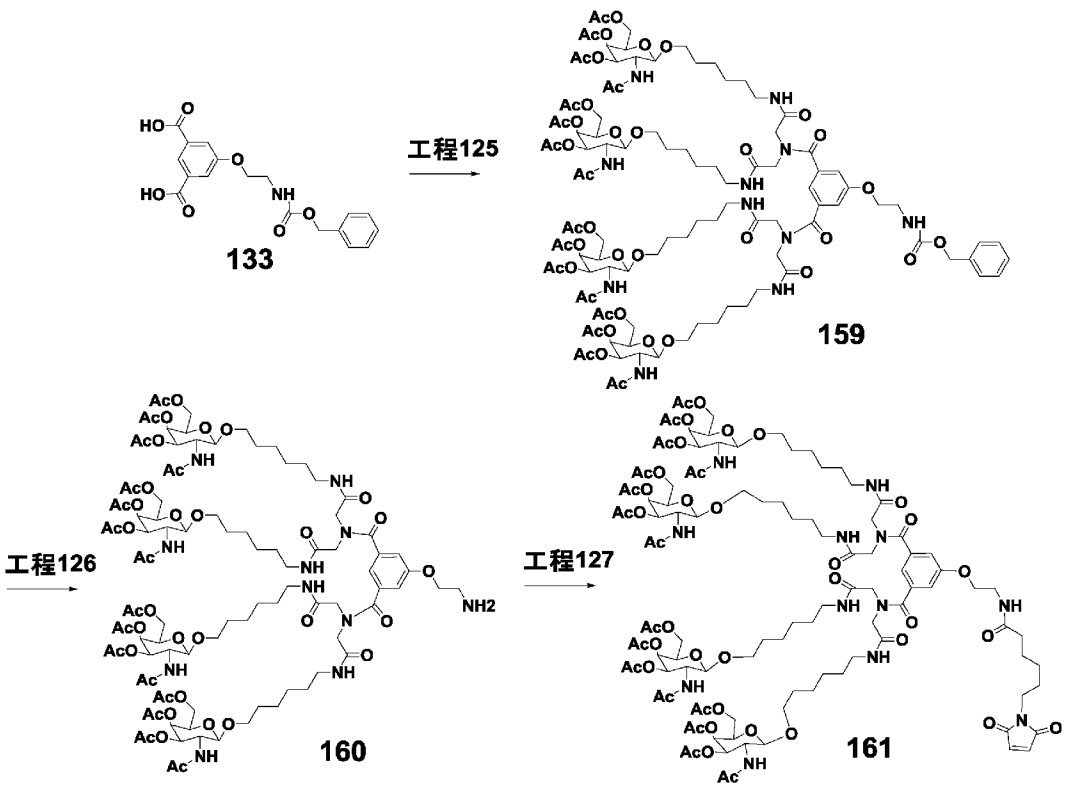
[0388] 工程124

工程101で合成した化合物135を用い、実施例8の工程33および34と同様の方法で化合物158（2.2 g, 収率58%)を得た。

ESI-MS m/z: 2437$(M+H)^+$

[0389] 化合物161の合成

[化185]



[0390] 工程125

実施例13の工程99で合成した化合物133(0.101 g, 0.282 mmol)を用いて、参考例3の工程57で合成した化合物62(0.607 g, 0.613 mmol)を用い、実施例1の工程8と同様の方法によって化合物159 (0.25 g, 収率39%)を得た。

ESI-MS m/z: 2304$(M+H)^+$

[0391] 工程126

工程125で合成した化合物159(0.255 g, 0.111 mmol)を用いて、実施例3の工程18と同様の方法によって化合物160 (0.15 g, 収率63%)を得た。

ESI-MS m/z: 2170$(M+H)^+$

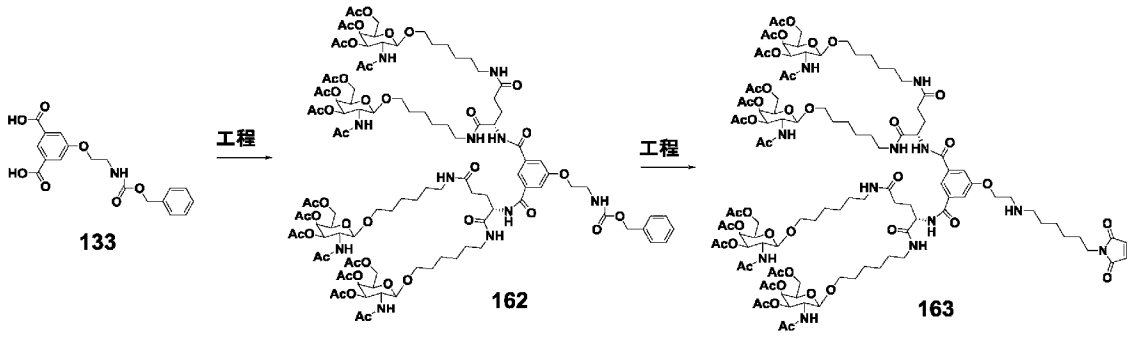
[0392] 工程127

工程126で合成した化合物160(20.8 mg, 9.59 μmol)を用いて、実施例3の工程19と同様の方法によって化合物161 (5.5 mg, 収率24%)を得た。

ESI-MS m/z: 1182$(M+2H)^{2+}$

[0393] 化合物163の合成

[化186]



[0394] 工程128

実施例13の工程99で合成した化合物133(0.099g, 0.277 mmol)を用いて、参考例3の工程59で合成した化合物64(0.618 g, 0.615 mmol)を用い、実施例1の工程8と同様の方法によって化合物162 (0.343 g, 収率53%)を得た。

ESI-MS m/z: 2333(M+H)$^+$

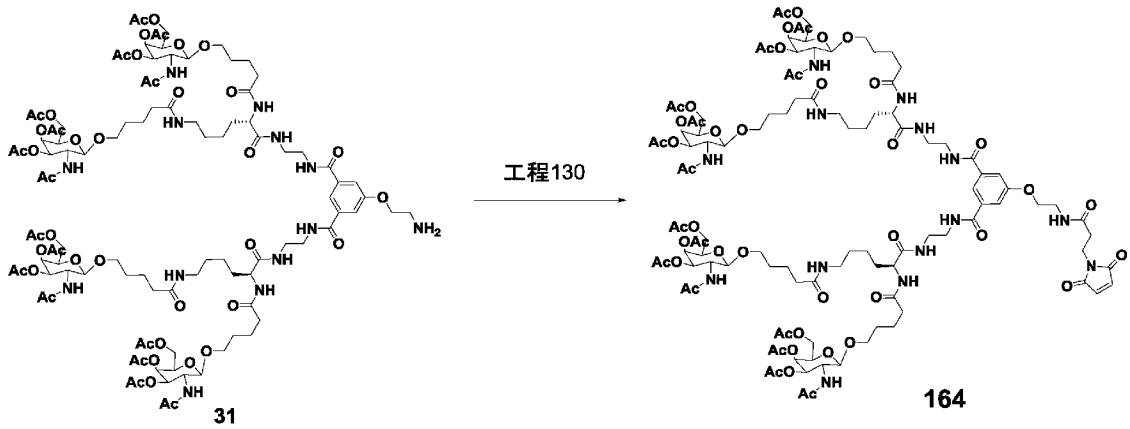
[0395] 工程129

工程128で合成した化合物162を用いて、実施例3の工程18および19と同様の方法で化合物163 (6.9 mg, 収率28%)を得た。

ESI-MS m/z: 2392(M+H)$^+$

[0396] 化合物164の合成

[化187]



[0397] 工程130

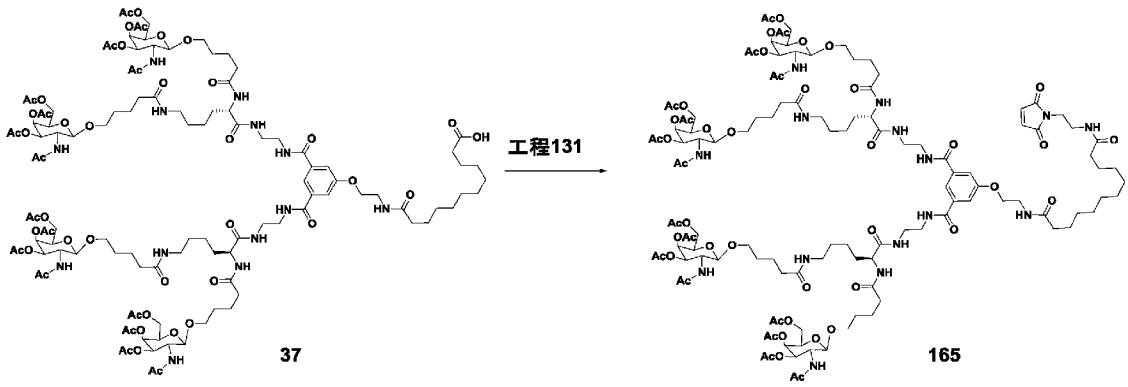
実施例5の工程28で合成した化合物31(0.048 g, 0.021 mmol)と3-マレイミドプロピオン酸 N-スクシンイミジル (東京化成社製, 0.017 g, 0.064 mmol)を用いて実施例5の工程29と同様の方法で化合物164 (0.040 g, 収率78%)を得

た。

ESI-MS m/z: 2480(M+HCOO)$^-$

[0398] 化合物165の合成

[化188]



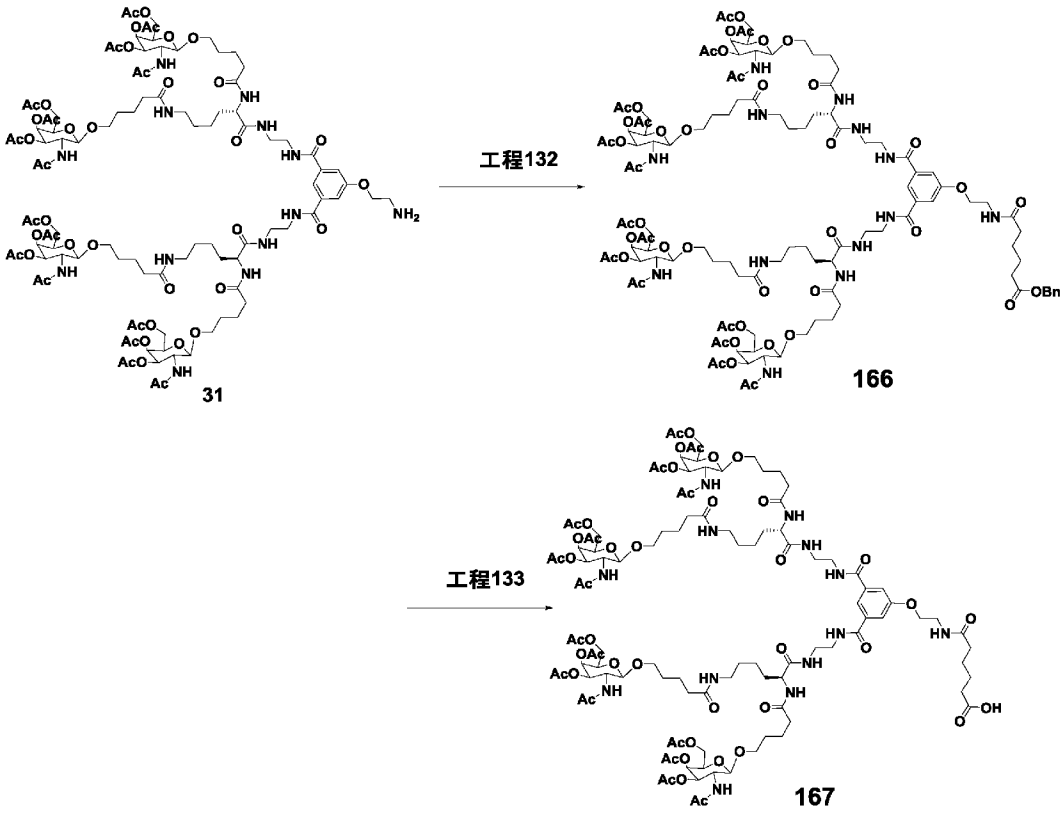
[0399] 工程131

実施例8の工程34で合成した化合物37(23.6 mg, 9.46 μmol)とN-(2-アミノエチル)マレイミド トリフルオロ酢酸塩（シグマアルドリッチ社製, 7.21 mg, 0.028 μmol)を用いて実施例1の工程8と同様の方法で化合物165（9.1 mg, 収率36%)を得た。

ESI-MS m/z: 1310(M+2H)$^{2+}$

[0400] 化合物167の合成

[化189]



[0401] 工程132

実施例5の工程28で合成した化合物31(0.122 g, 0.054 mmol)を用いて実施例2の工程14と同様の方法で合成したヘキサン酸モノベンジルエステルを用い、同工程記載の方法にて化合物166 (0.076 g, 収率56%)を得た。

ESI-MS m/z: 2503$(M+H)^+$

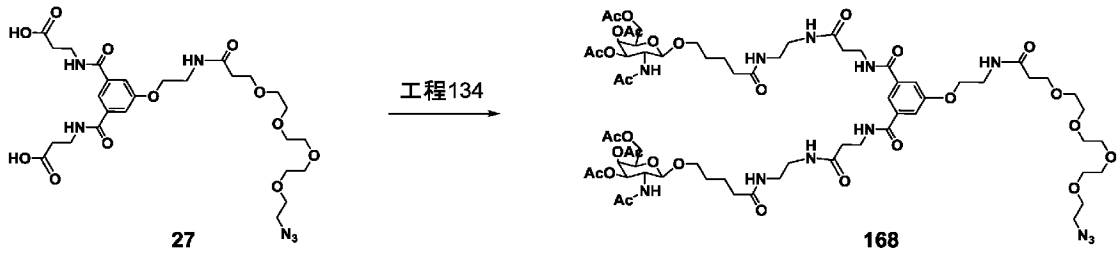
[0402] 工程133

工程132で合成した化合物166(0.076 g, 0.03 mmol)を用いて実施例3の工程18と同様の方法にて化合物167 (0.030 g, 収率40%)を得た。

ESI-MS m/z: 2412$(M+H)^+$

[0403] 化合物168の合成

[化190]



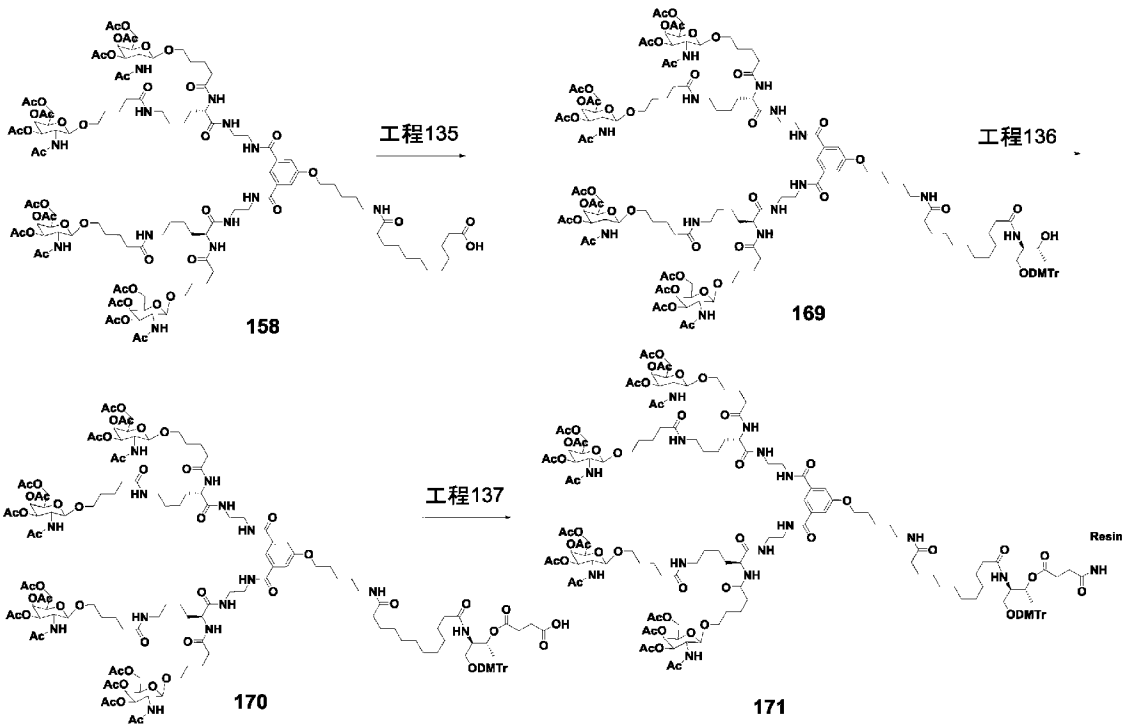
[0404] 工程134

実施例4の工程24で合成した化合物27（4.36 mg，0.006mmol)、参考例1の工程3で合成した化合物4（10 mg，0.02 mmol）を用い、実施例1の工程12と同様の方法で化合物168（7 mg，収率65%)を得た。

ESI-MS m/z: 1581 $(M - H)^-$

[0405] 化合物171の合成

[化191]



[0406] 工程135

工程124で合成した化合物158(0.2011 g，0.079 mmol)を用いて、実施例8の工程35を用いて化合物169を得た(0.129 g，収率55%)。

ESI-MS m/z: 2972 $(M+HCOO)^-$

[0407] 工程136

工程135で合成した化合物169(0.129 g, 0.044 mmol)を用いて、実施例8の工程36を用いて化合物170の粗製生物を得た。

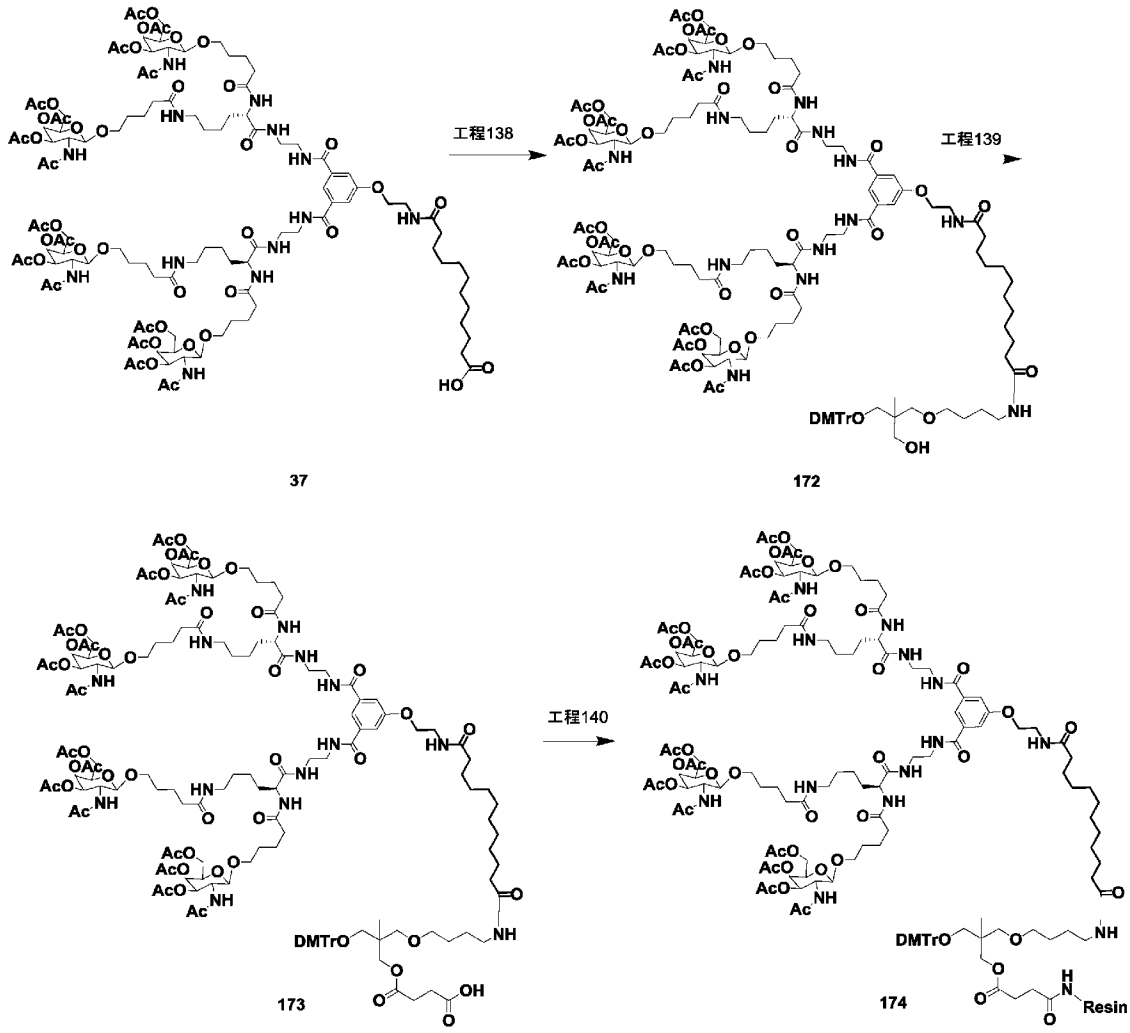
ESI-MS m/z: 1535 $(M+HCOOH-2H)^{2-}$

[0408] 工程137

工程136で合成した化合物170(0.0467 g, 0.013 mmol)を用いて、実施例8の工程37を用いて化合物171を得た(19.4 μmol/g, 収率35%)。

[0409] 化合物174の合成

[化192]



[0410] 工程138

実施例8の工程35で合成した化合物37 (100 mg, 0.040mmol) および参考例4の工程60で合成した化合物66を用い、実施例8の工程35と同様の方法で化合物

172（90 mg，収率76%）を得た。

ESI-MS m/z: 1335 $(M-DMTr+2H)^{2+}$

[0411] 工程139

工程138で合成した化合物172（90 mg，0.030 mmol）を用い、実施例8の工程36と同様の方法で化合物173の粗生成物を得た。

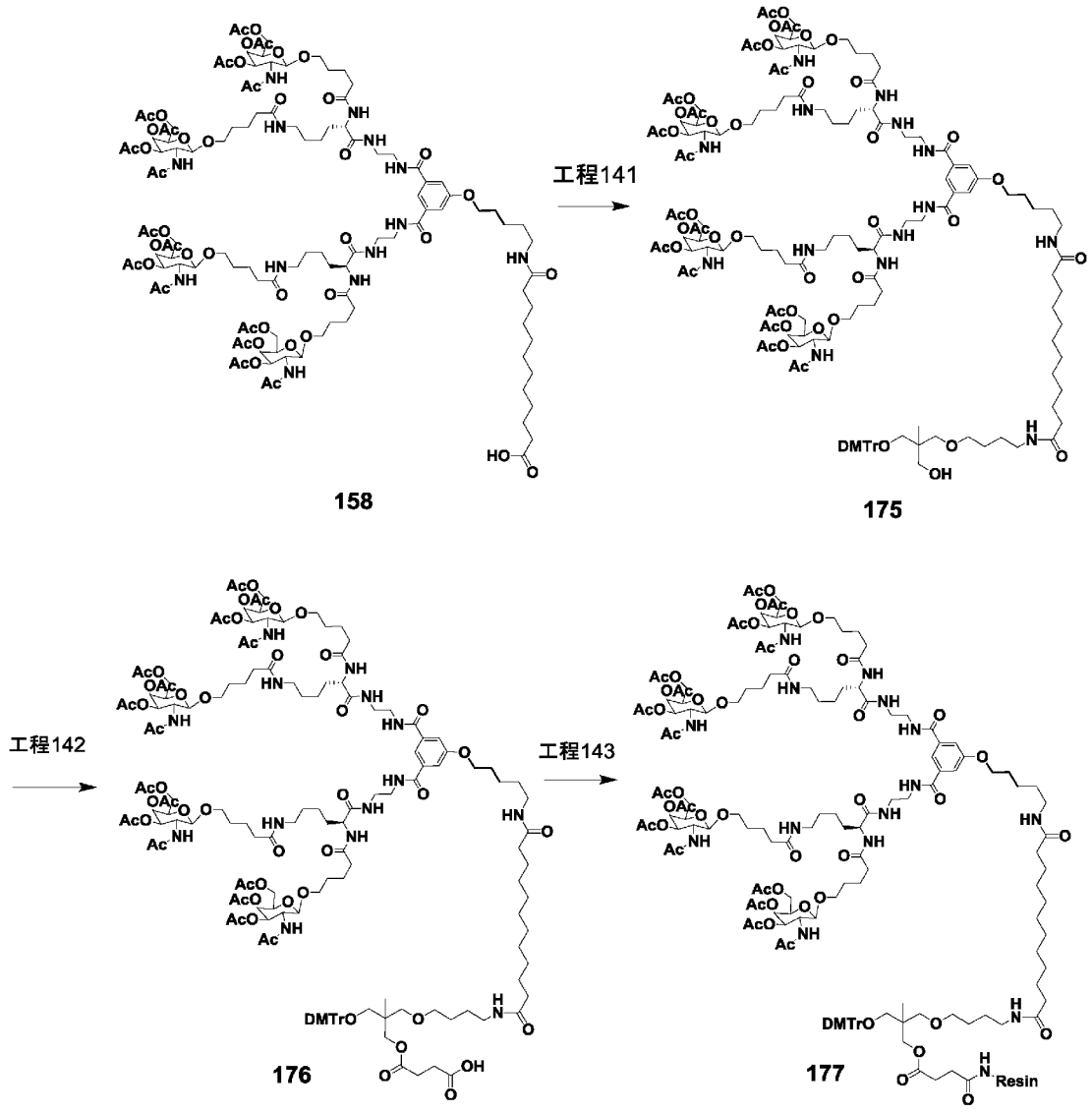
ESI-MS m/z: 1558 $(M+HCOOH-2H)^{2-}$

[0412] 工程140

工程139で合成した化合物173の粗生成物を用い、実施例8の工程37と同様の方法で化合物174（21.5 μmol/g，2段階収率32%）を得た。

[0413] 化合物177の合成

[化193]



[0414] 工程141

実施例14の工程124で合成した化合物158（100 mg, 0.039 mmol）および参考例4の工程60で合成した化合物66を用い、実施例8の工程35と同様の方法で化合物175（90 mg, 収率76%）を得た。

ESI-MS m/z: 1356 $(M+2H)^{2+}$ 脱DMTr体として検出

[0415] 工程142

工程141で合成した化合物175（90 mg, 0.030 mmol）を用い、実施例8の工程36と同様の方法で化合物176の粗生成物を得た。

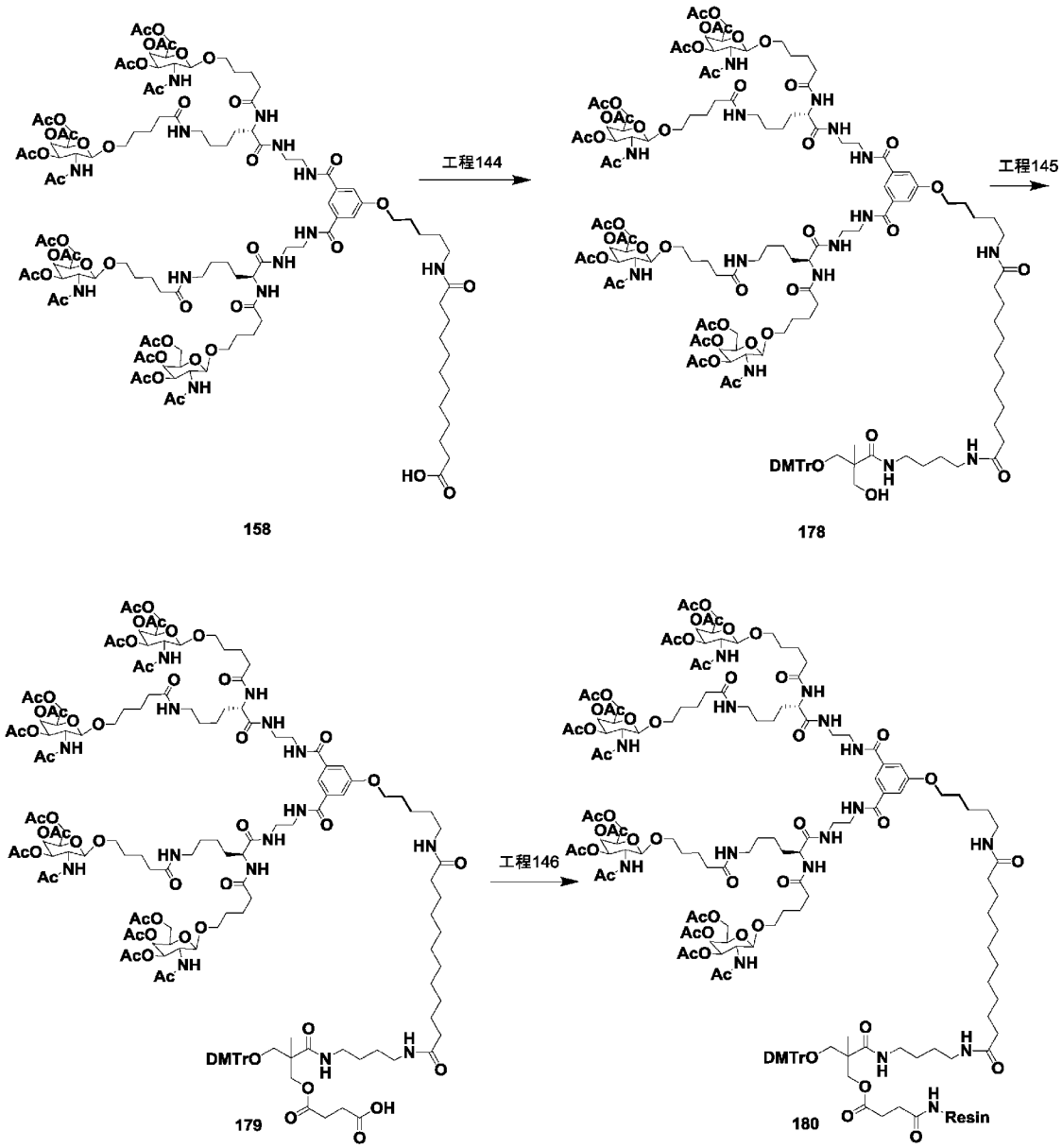
ESI-MS m/z: 1579 $(M+HCOOH-2H)^{2-}$

[0416] 工程143

工程142で合成した化合物176の粗生成物を用い、実施例8の工程37と同様の方法で化合物177（17.0 μmol/g, 2段階収率26%）を得た。

[0417] 化合物180の合成

[化194]



[0418] 工程144

実施例14の工程124で合成した化合物158（100 mg, 0.039 mmol）および参考例4の工程62で合成した化合物69を用い、実施例8の工程35と同様の方法で化合物178（50 mg, 収率42%）を得た。

ESI-MS m/z: 1363 $(M+2H)^{2+}$ 脱DMTr体として検出

[0419] 工程145

工程144で合成した化合物178（50 mg, 0.017 mmol）を用い、実施例8の工程36と同様の方法で化合物179の粗生成物を得た。

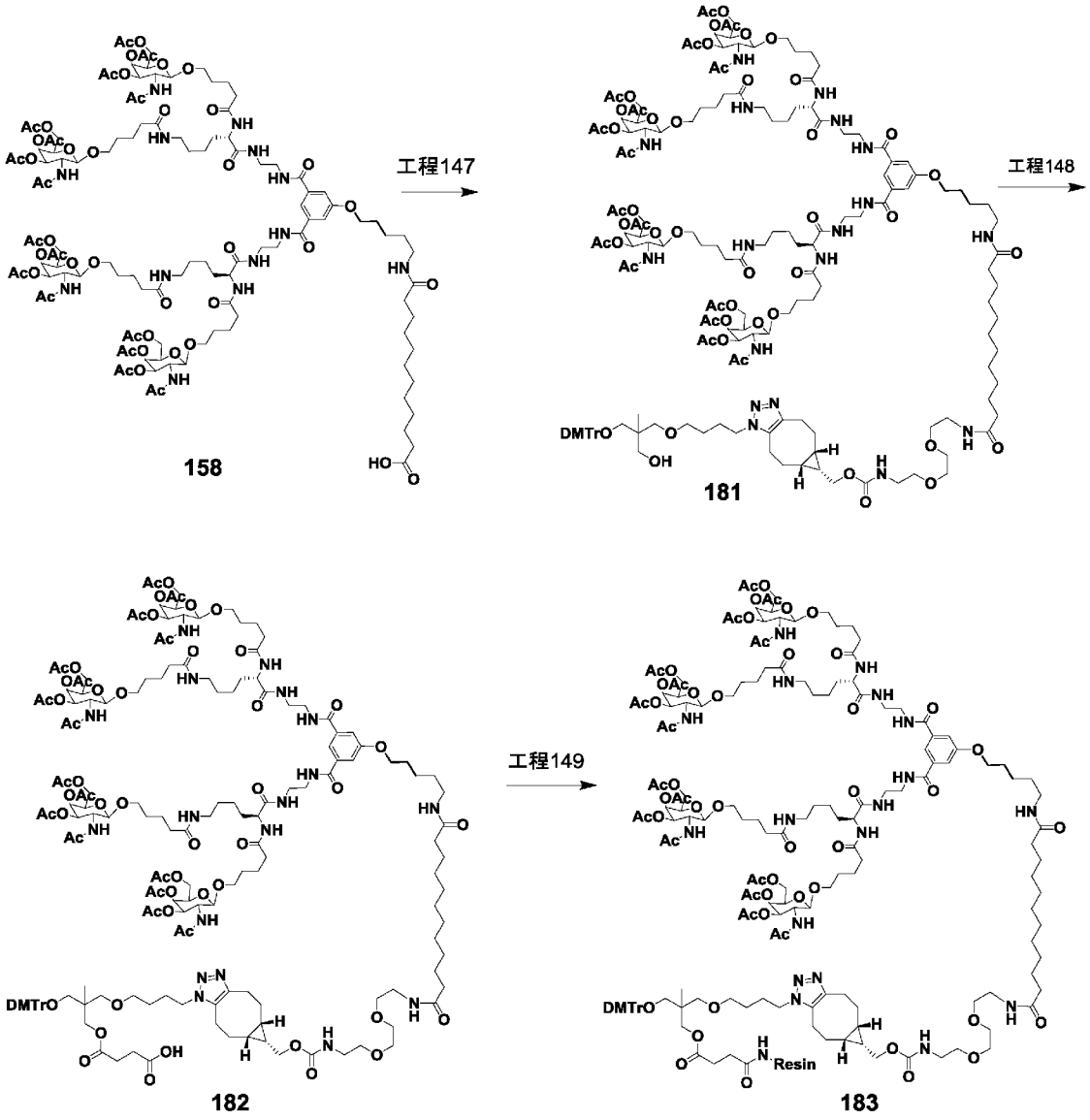
ESI-MS m/z: 1587 $(M+HCOOH-2H)^{2-}$

[0420] 工程146

工程145で合成した化合物179の粗生成物を用い、実施例8の工程37と同様の方法で化合物180（0.5 μmol/g, 2段階収率1%）を得た。

[0421] 化合物183の合成

[化195]



[0422] 工程147

実施例14の工程124で合成した化合物158（100 mg, 0.039 mmol）および参考例4の工程63で合成した化合物71を用い、実施例8の工程35と同様の方法で化合物181（40 mg, 収率30%）を得た。

ESI-MS m/z: 1532 $(M+2H)^{2+}$ 脱DMTr体として検出

[0423] 工程148

工程147で合成した化合物181（40 mg, 0.012 mmol）を用い、実施例8の工程36と同様の方法で化合物182の粗生成物を得た。

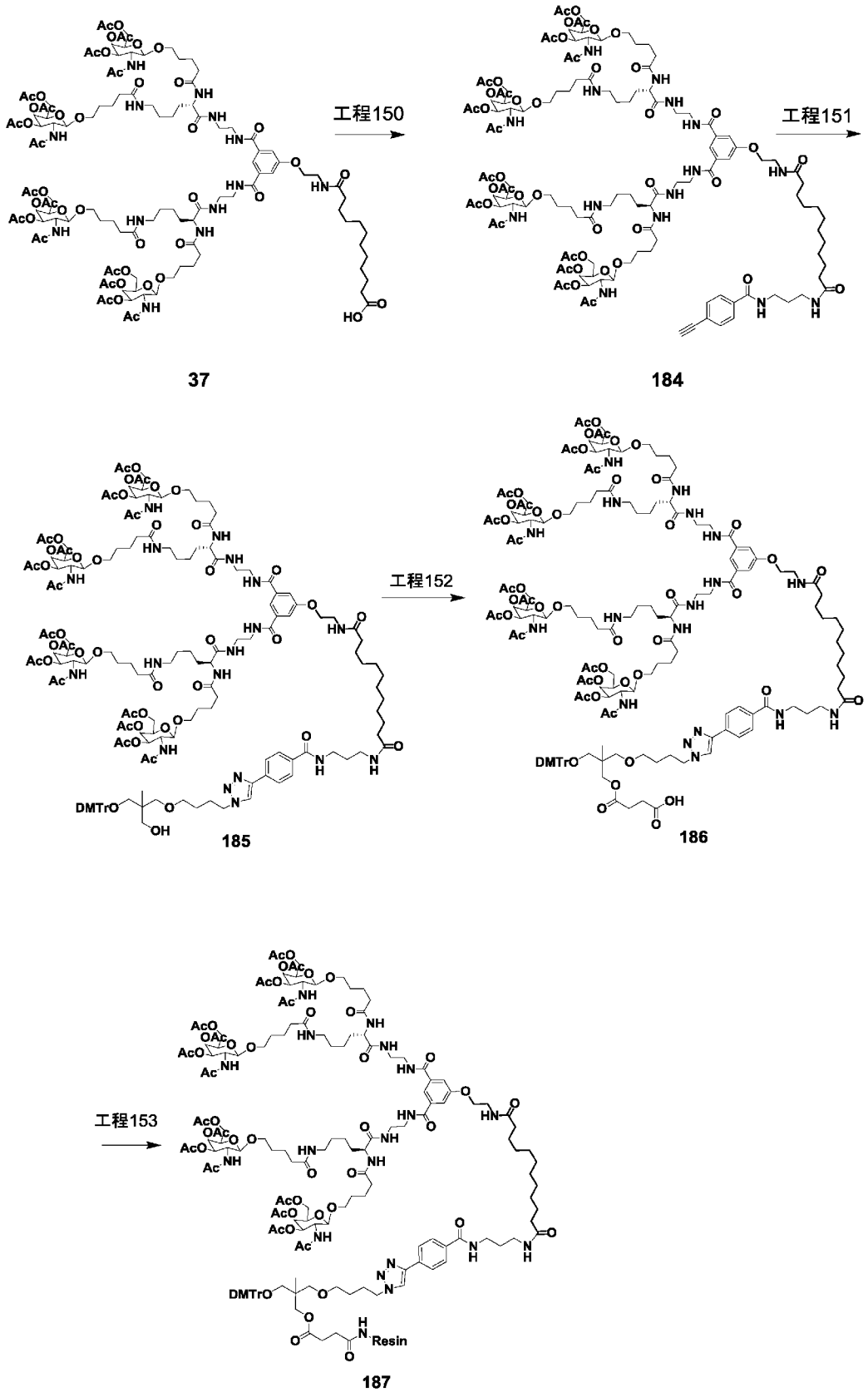
ESI-MS m/z: 1582 $(M+2H)^{2+}$ 脱DMTr体として検出

[0424] 工程149

工程148で合成した化合物182の粗生成物を用い、実施例8の工程37と同様の方法で化合物183（0.2 μmol/g, 2段階収率1%）を得た。

[0425] 化合物187の合成

[化196]



[0426] 工程150

実施例8の工程34で合成した化合物158（70 mg, 0.028 mmol）および参考例4の工程68で合成した化合物78を用い、実施例8の工程35と同様の方法で化合物184（58 mg, 収率77%）を得た。

ESI-MS m/z: 1341 $(M+2H)^{2+}$

[0427] 工程151

工程150で合成した化合物184（58 mg, 0.022 mmol）をメタノール（0.15 mL）に溶解し、ジャーナルオブオーガニックケミストリー（Journal of Organic Chemistry）, 第74巻, 6837-6842頁, 2009年に記載された方法で合成した化合物65（16.9 mg, 0.032 mmol)、1 mol /L SODIUM L-ASCORBATE水溶液（0.022 mL, 0.022 mmol)、20 mmol/L 硫酸銅(ＩＩ)水溶液（0.011 mL, 0.22 μmol)、及び10 mmol/L Tris(2-benzimidazolylmethyl)amine / DMSO溶液（0.022 mL, 0.22μmol)を加え、室温にて3時間撹拌した。反応液をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(クロロホルム／メタノール=80/20）にて精製し、化合物185（7 mg, 収率10%）を得た。

ESI-MS m/z: 1450 $(M+2H)^{2+}$ 脱DMTr体として検出

[0428] 工程152

工程151で合成した化合物185（10 mg, 3.13 μmol）を用い、実施例8の工程36と同様の方法で化合物186の粗生成物を得た。

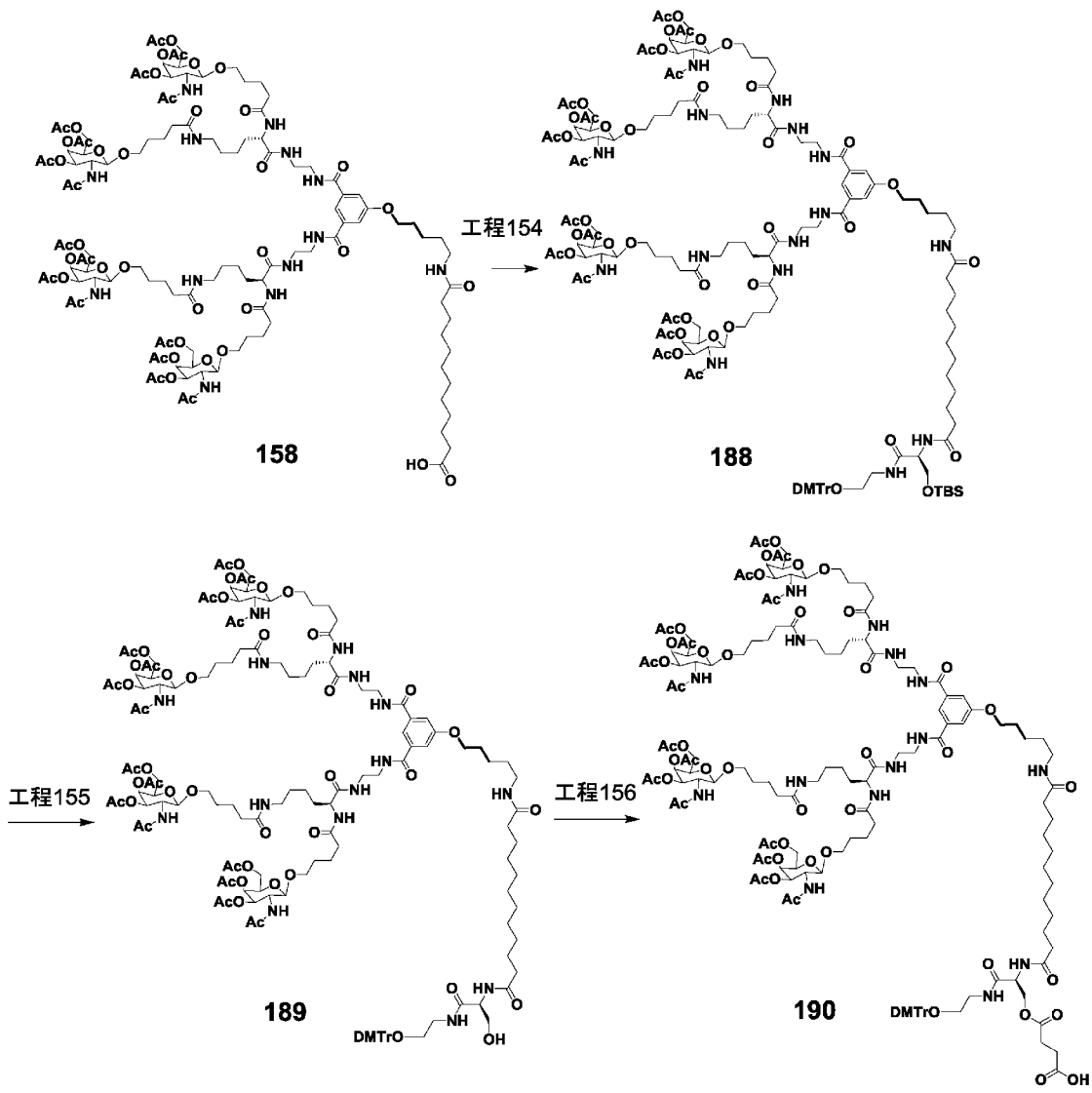
ESI-MS m/z: 1500 $(M+2H)^{2+}$ 脱DMTr体として検出

[0429] 工程153

工程152で合成した化合物186の粗生成物を用い、実施例8の工程37と同様の方法で化合物187（8.4 μmol/g,収率27%）を得た。

[0430] 化合物190の合成

[化197]



[0431] 工程154

実施例14の工程124で合成した化合物158(74.1 mg, 0.029 mmol)と実施例4の工程72で合成した化合物95(15 mg, 0.027 mmol)を用いて、実施例1の工程8と同様の方法、またはバイオコンジュゲートケミストリー, 第26巻,1451-1455頁, 2015年に記載の方法にて化合物188の粗製生物を得た。

ESI-MS m/z: 1392(M +H)$^+$, 脱DMTr体として検出

[0432] 工程155

工程154で合成した化合物188(0.083 g, 0.027 mmol)を用いて、特許文献WO2015105083に記載の方法により化合物189の粗製生物を得た。

ESI-MS m/z: 2669$(M+H)^+$, 脱DMTr体として検出

[0433] 工程156

工程155で合成した化合物189(0.08 g, 0.027 mmol)を用いて、実施例8の工程36と同様の方法で化合物190の粗製生物を得た。

ESI-MS m/z: 1556$(M+HOOH-2H)^{2-}$

^{1}H-NMR (400 MHz, MeOD) : δ 1.45-1.86 (48H, m), 1.93 (12H, s), 1.94 (12H, s), 2.02 (12H, s), 2.13 (12H, s), 2.16-2.28 (17H, m), 2.48 (4H, s), 3.10-3.16 (6H, m), 3.36-3.56 (19H, m), 3.77 (6H, s), 3.80-3.89 (6H, m), 3.98-4.35 (30H, m), 4.53-4.59 (4H, m), 4.66-4.72 (1H, m), 5.04-5.10 (4H, m), 5.31-5.36 (4H, m), 6.81-6.88 (4H, m), 7.17-7.23 (1H, m), 7.26-7.32 (6H, m), 7.38-7.44 (2H, m), 7.54 (2H, br s), 7.90 (1H, br s).

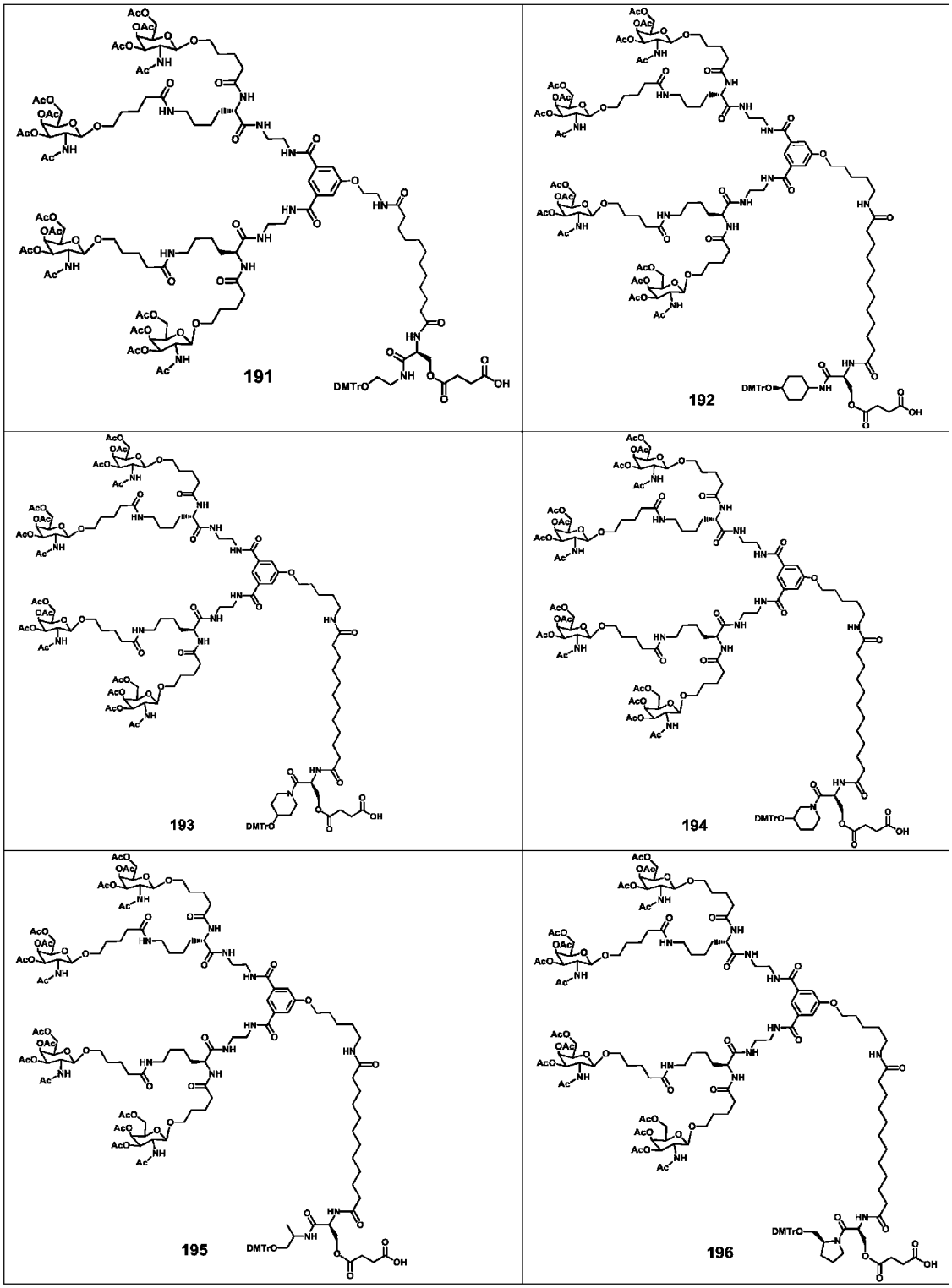
[0434] 化合物191～199の合成

実施例8の工程34で合成した化合物37または実施例14の工程124で合成した化合物158と第18表記載の構造、または参考例4の工程66で合成した化合物75を用い、工程154,155と同様の方法にて第20表および第21表に記載した化合物を得た。

本実施例により合成した化合物の質量分析結果を第22表に示す。

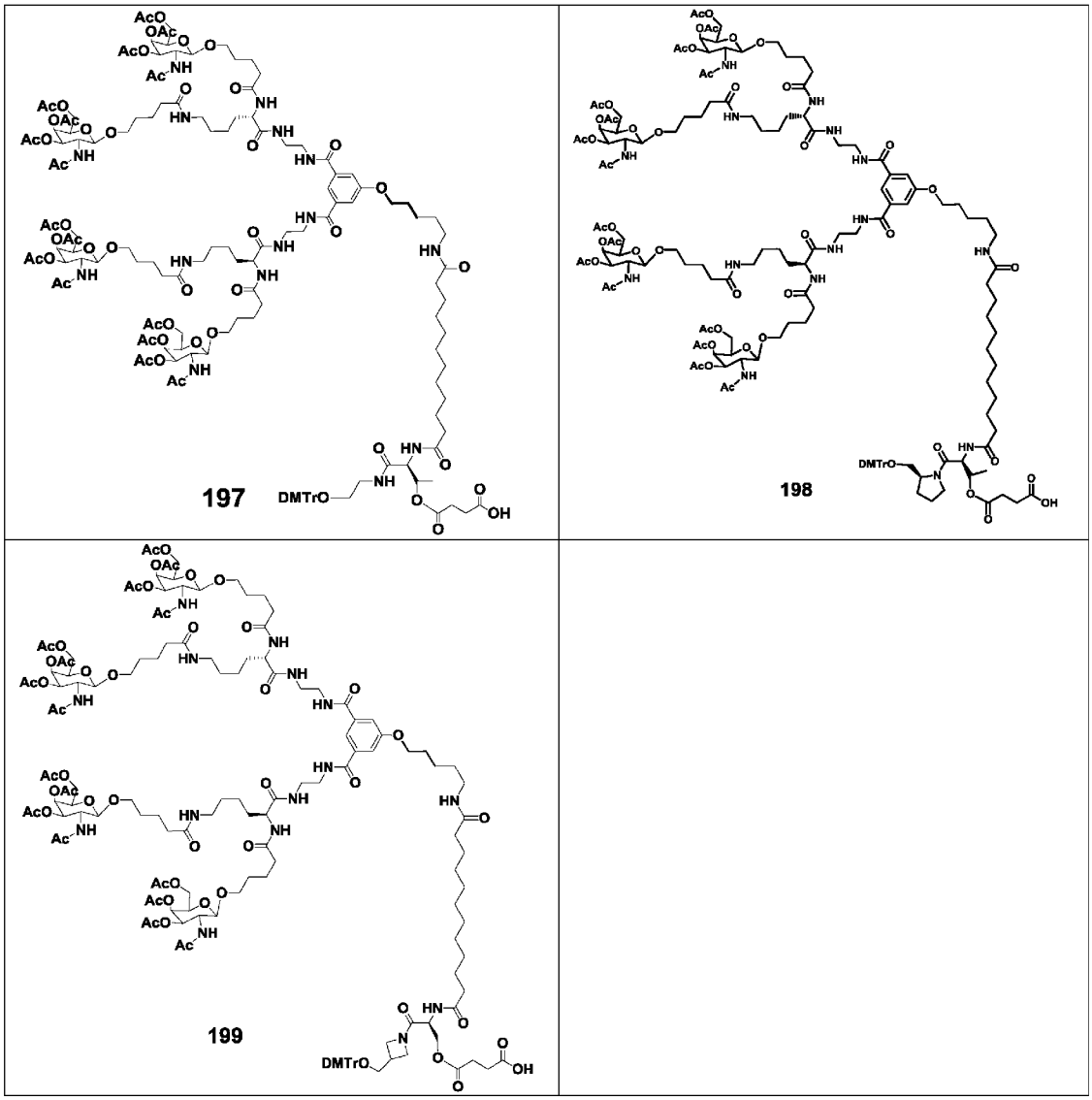
[0435] 第20表

[表20]



[0436] 第21表

[表21]



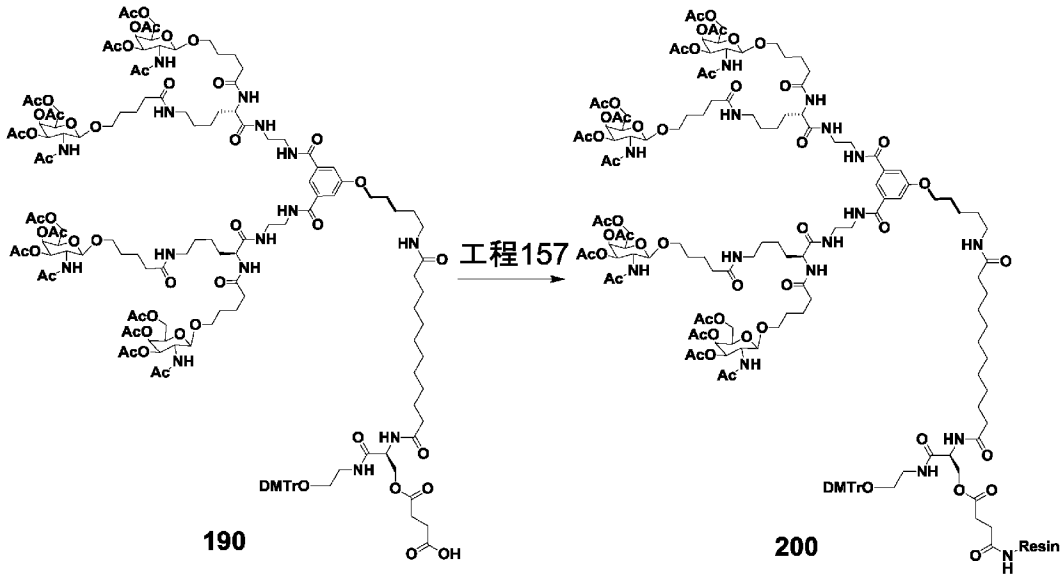
[0437] 第22表

[表22]

化合物	ESI-MS m/z
191	1537(M+HCOOH)$^{2-}$
192	1584(M+HCOOH)$^{2-}$
193	1577(M+HCOOH)$^{2-}$
194	1577(M+HCOOH)$^{2-}$
195	1564(M+HCOOH)$^{2-}$
196	1578(M+HCOOH)$^{2-}$
197	1564(M+HCOOH)$^{2-}$
198	1584(M+HCOOH)$^{2-}$
199	1570(M+2HCOOH)$^{2-}$

[0438] 化合物200の合成

[化198]



[0439] 工程157

工程156で合成した化合物190(g, mmol)を用いて、実施例8の工程37と同様の方法で化合物200を得た(10.0 μmol/g)。

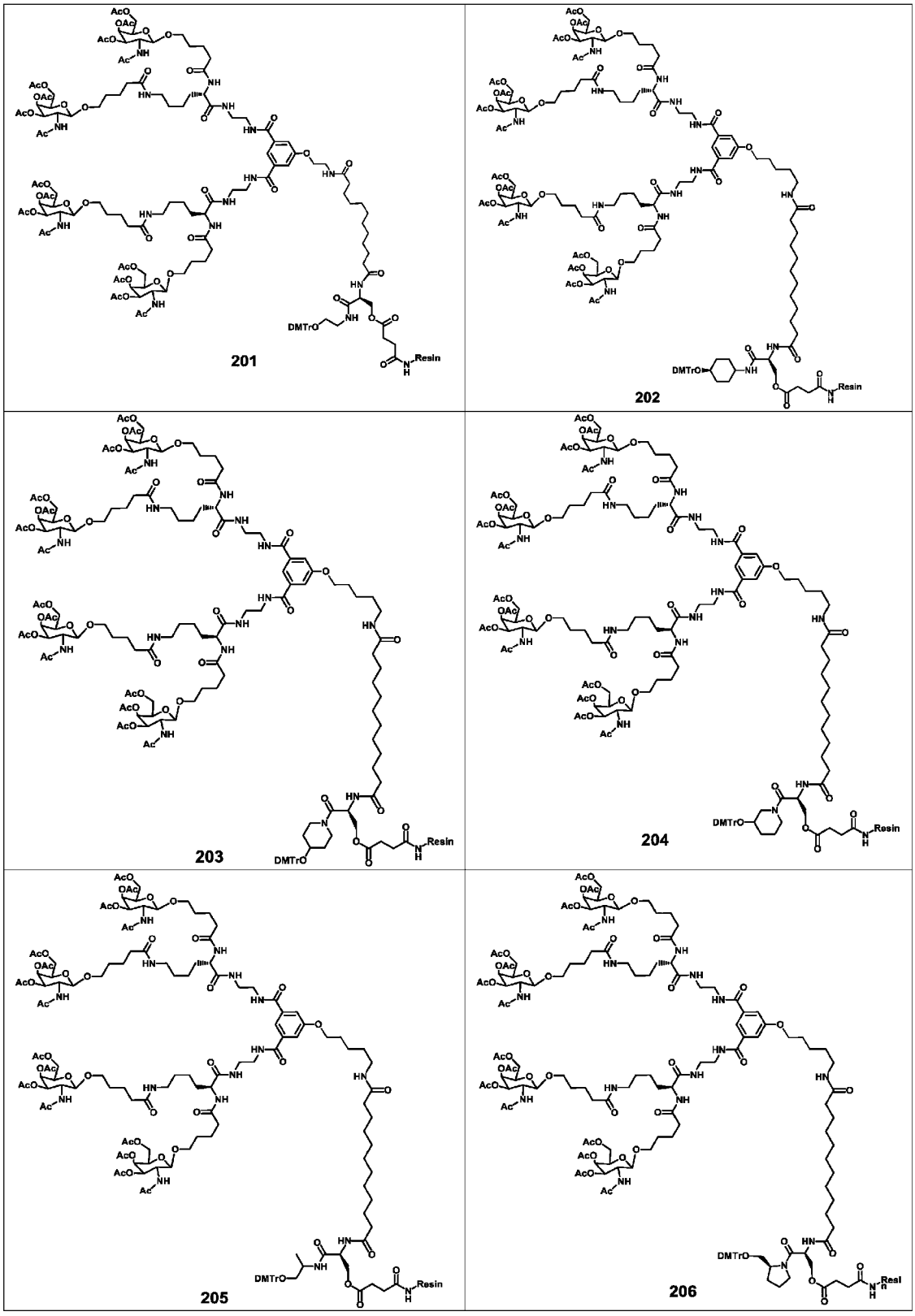
[0440] 化合物201～209の合成

第20表および第21表に記載した化合物を用いて、工程157と同様の方法で第23表および第24表記載の化合物を得た。

本実施例により合成した化合物の担持量を第25表に示す。

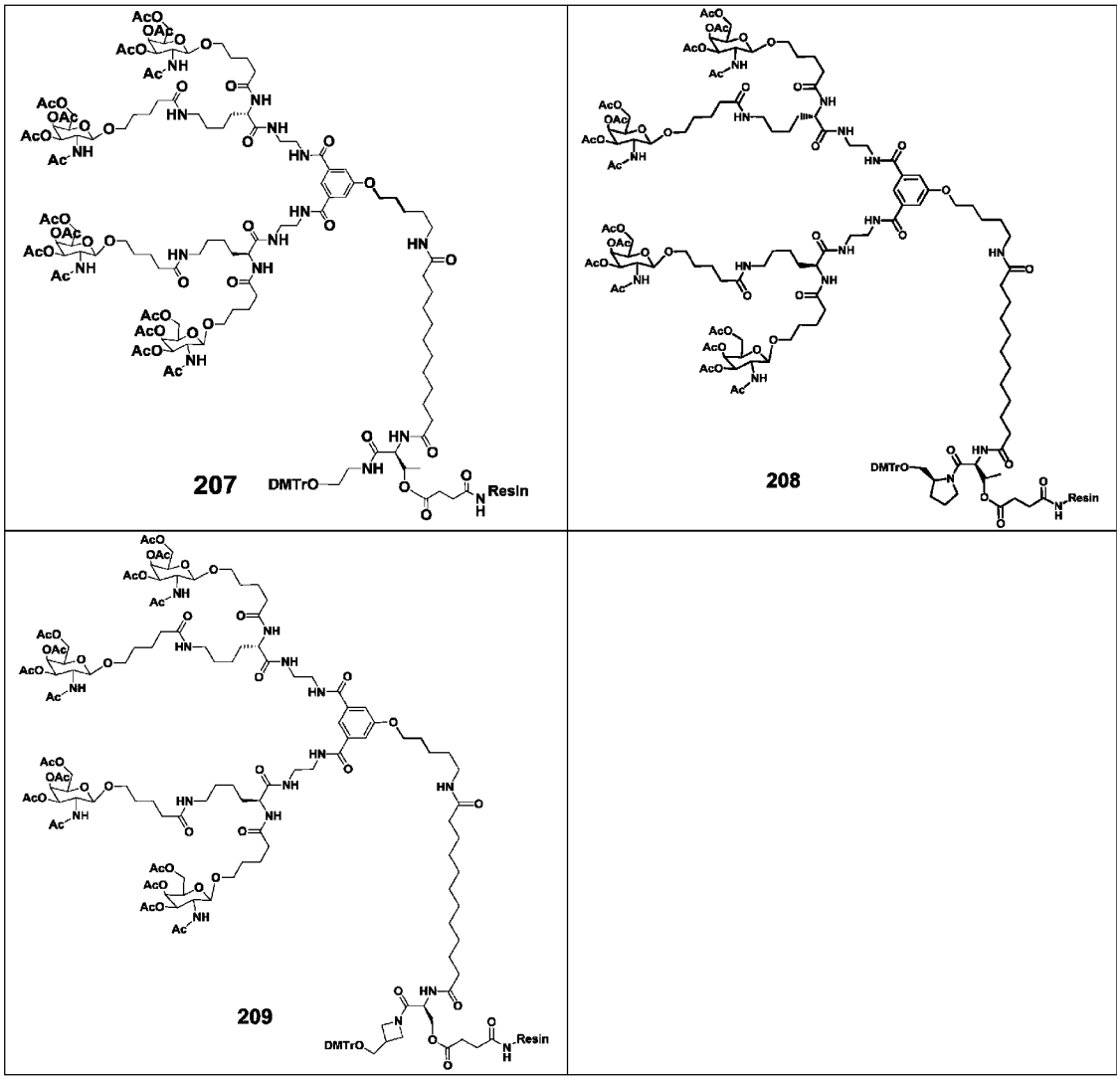
[0441] 第23表

[表23]



[0442] 第24表

[表24]



[0443] 第25表

[表25]

化合物	担持量(μmol/g)
201	2.6
202	23.1
203	22.2
204	32.7
205	30.5
206	18.1
207	20.4
208	12.7
209	2.2

[0444] 実施例15　核酸複合体の合成

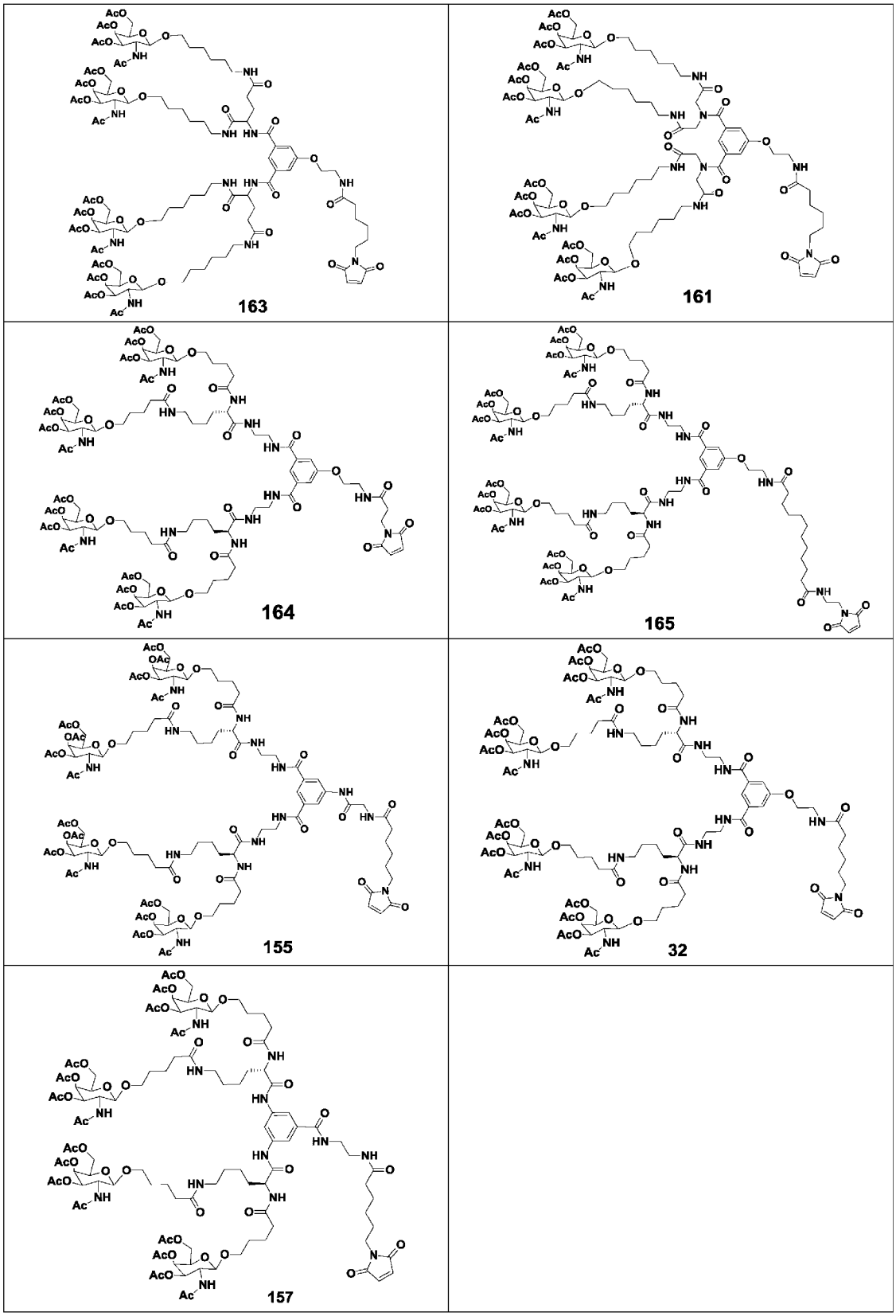
核酸複合体210～218の合成

実施例9の工程38と同様の方法で第26表記載の化合物を用いて第27表および第28表記載の一本鎖の核酸複合体を得た。

本実施例により合成した核酸複合体の配列および質量分析結果を第29表に示す。

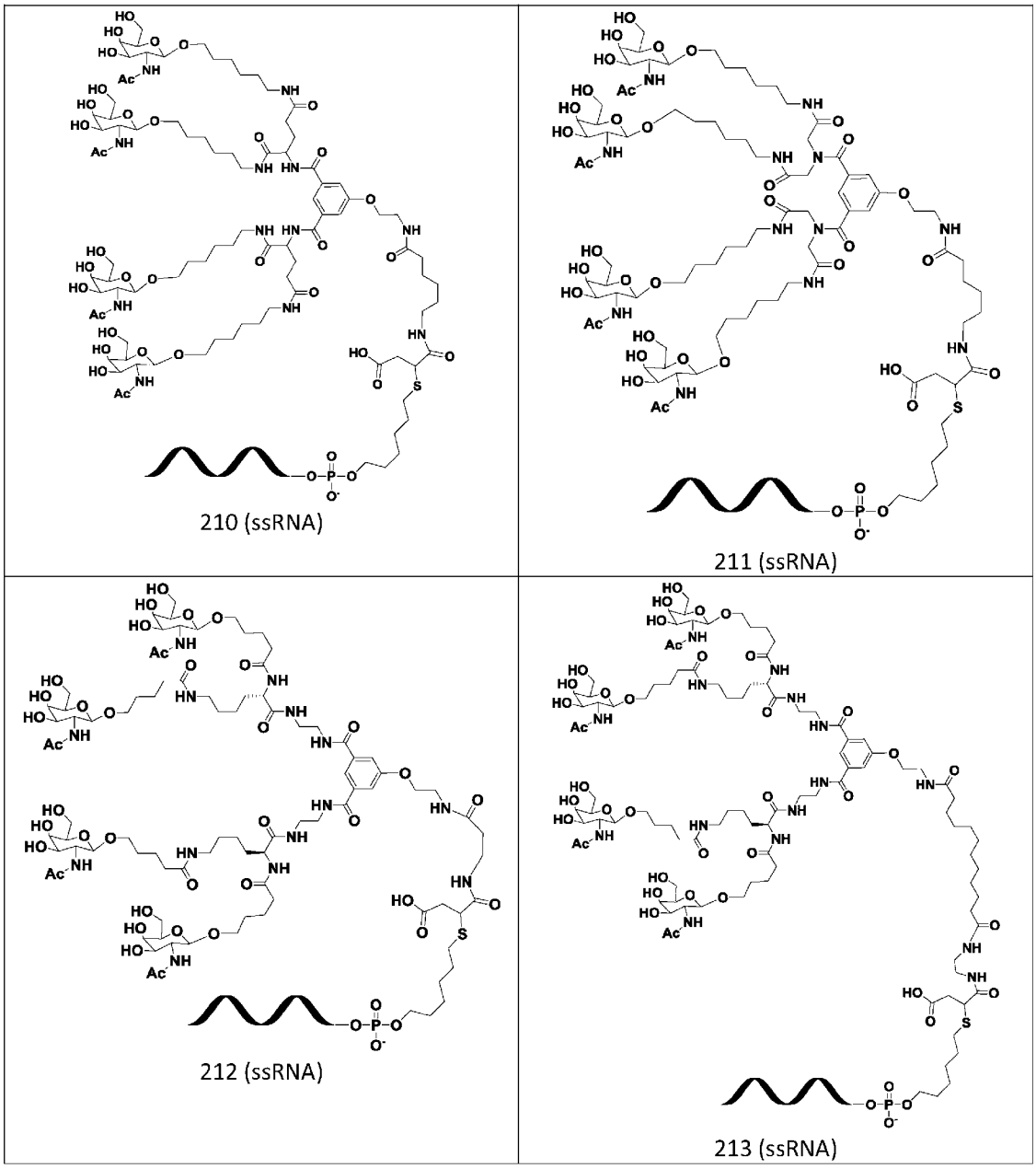
[0445] 第26表

[表26]



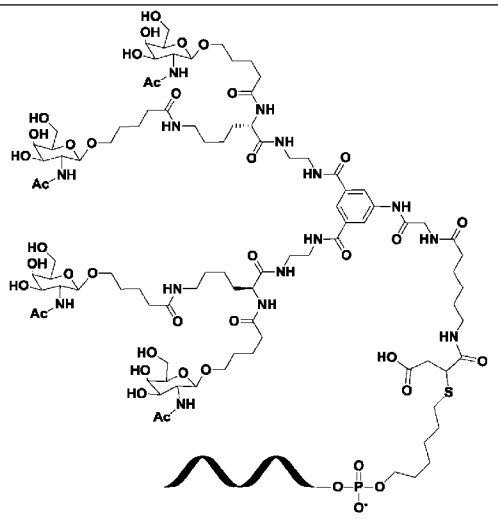
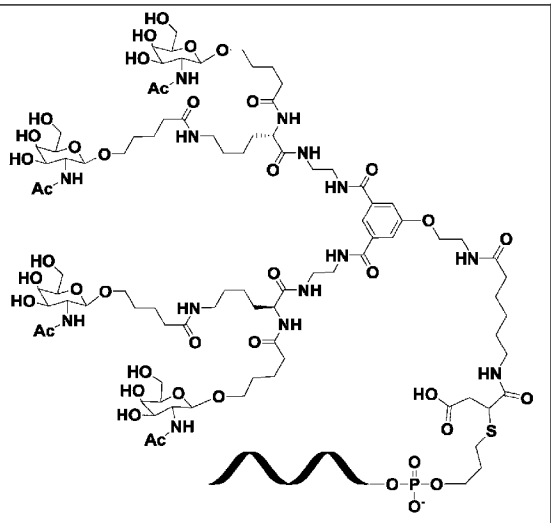
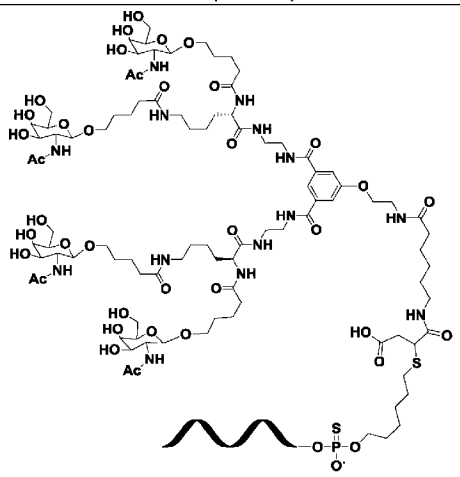
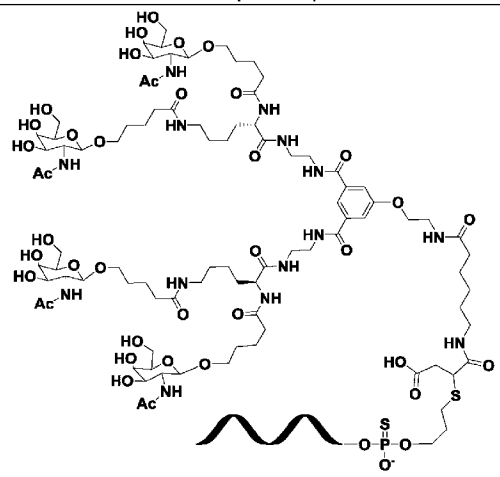
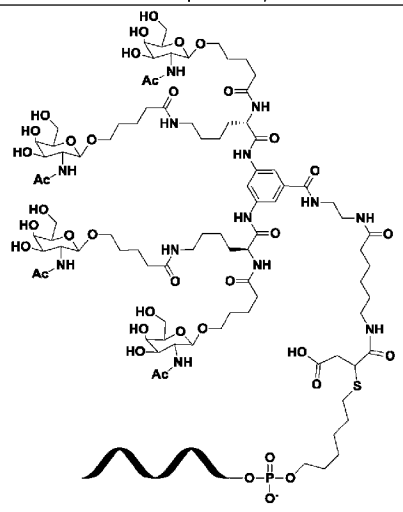
[0446] 第27表

[表27]



[0447] 第28表

[表28]

 214 (ssRNA)	 215 (ssRNA)
 216 (ssRNA)	 217 (ssRNA)
 218 (ssRNA)	

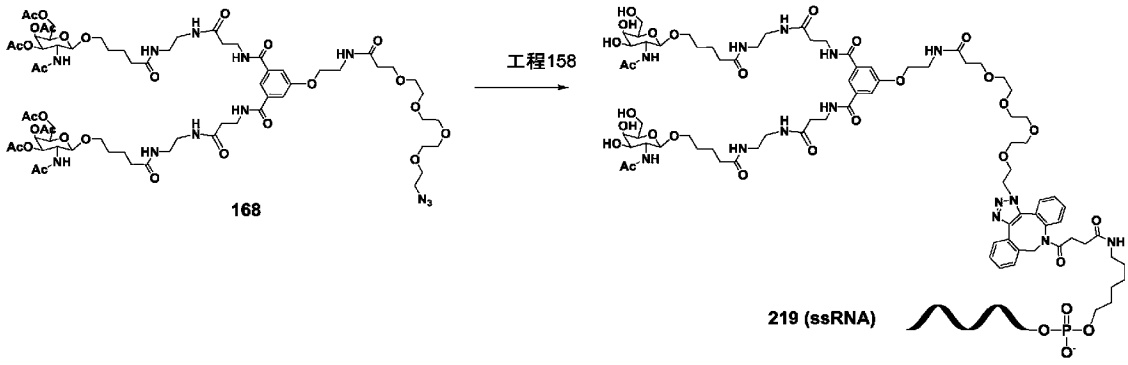
[0448] 第29表

[表29]

化合物	配列(5'→3')	理論分子量	実測値
210_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) **210**	8885	8886
211_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) **211**	8857	8857
212_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) **212**	8929	8928
213_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) **213**	9112	9110
214_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) **214**	8983	8982
215_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) **215**	8929	8929
216_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) **216**	8988	8985
217_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) **217**	8946	8943
218_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) **218**	8854	8854

[0449] 核酸複合体219の合成

[化199]



[0450] 工程158

工程134で合成した化合物168を用いて実施例10の工程40と同様の方法で第30表記載の一本鎖の核酸複合体219を得た。

本実施例により合成した核酸複合体の配列および質量分析結果を第30表に示す。

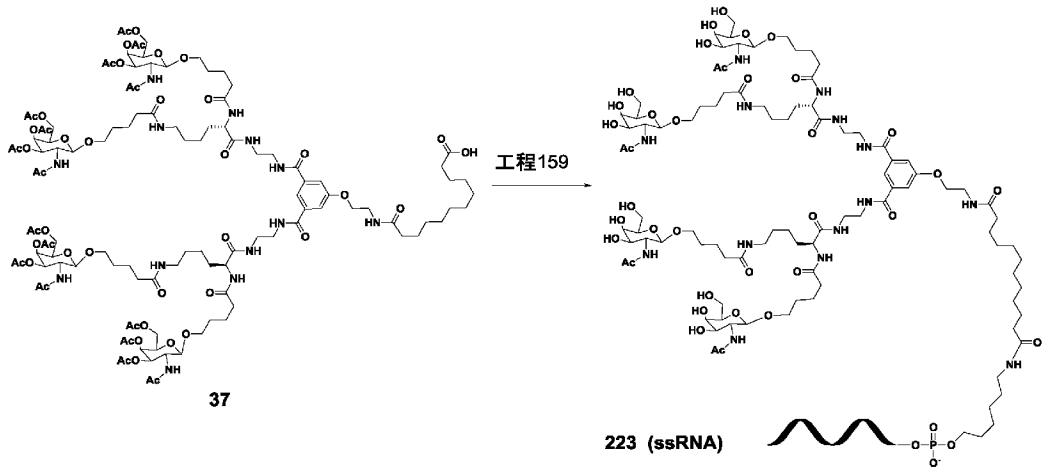
[0451] 第30表

[表30]

化合物	配列(5'→3')	理論分子量	実測値
219_5'-B2M-ssRNA	**219** A(F)G(M)G(F)A(M)C(F)U(M)G(F)G(M)U(F)C(M) U(F)U(F)U(M)C(F)U(M)A(F)U(M)C(F)U(M)^C(F)^U(M)	9529	9528

[0452] 核酸複合体223の合成

[化200]



工程159

実施例8の工程34で合成した化合物37とモレキュールズ(Molecules)、第17巻、13825-13843頁、2012年に記載された方法で合成した末端がアミノ基で修飾されたオリゴヌクレオチドを加えて、バイオコンジュゲートケミストリー, 第22巻,1723-1728頁, 2011年もしくはバイオコンジュゲートケミストリー, 第26巻,1451-1455頁, 2015年に記載の方法にて反応させた。実施例9の工程38中に記載した方法で精製することにより、一本鎖の核酸複合体223を得た。

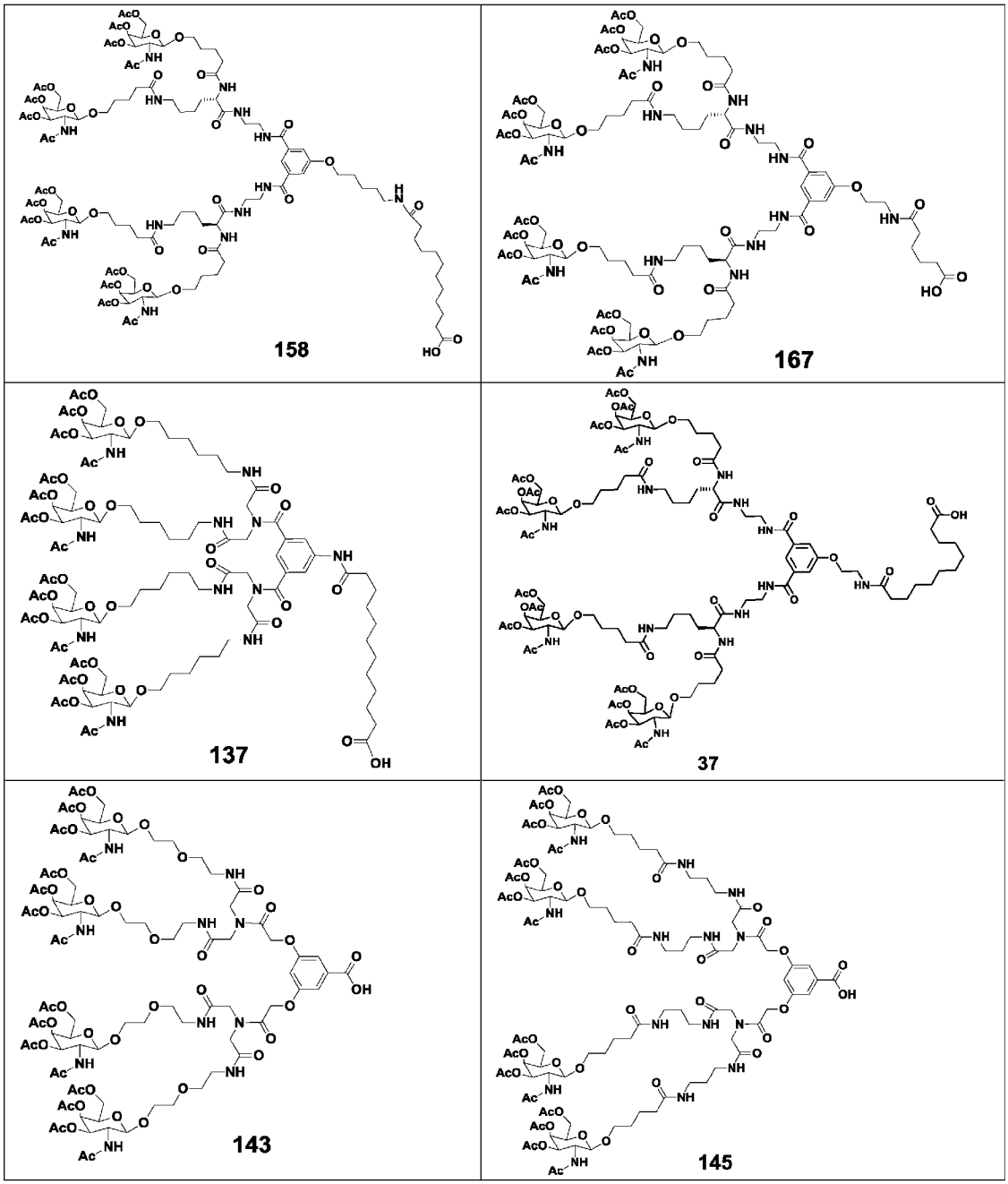
[0453] 核酸複合体220～233の合成

実施例15の工程159と同様の方法で第31表および第32表記載の化合物を用いて第33表～第35表記載の一本鎖の核酸複合体を得た。

本実施例により合成した核酸複合体の配列および質量分析結果を第36表に示す。

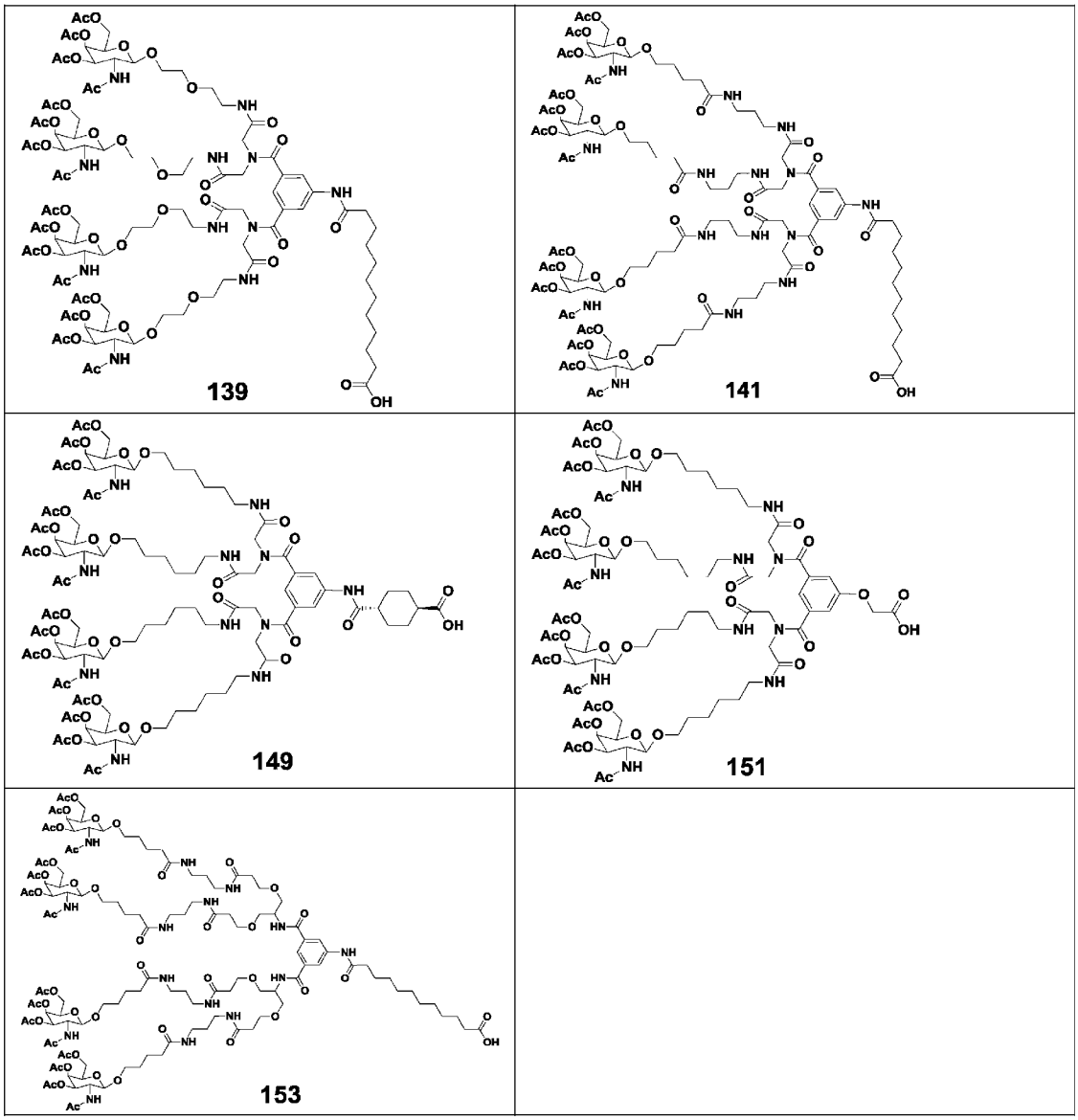
[0454] 第31表

[表31]



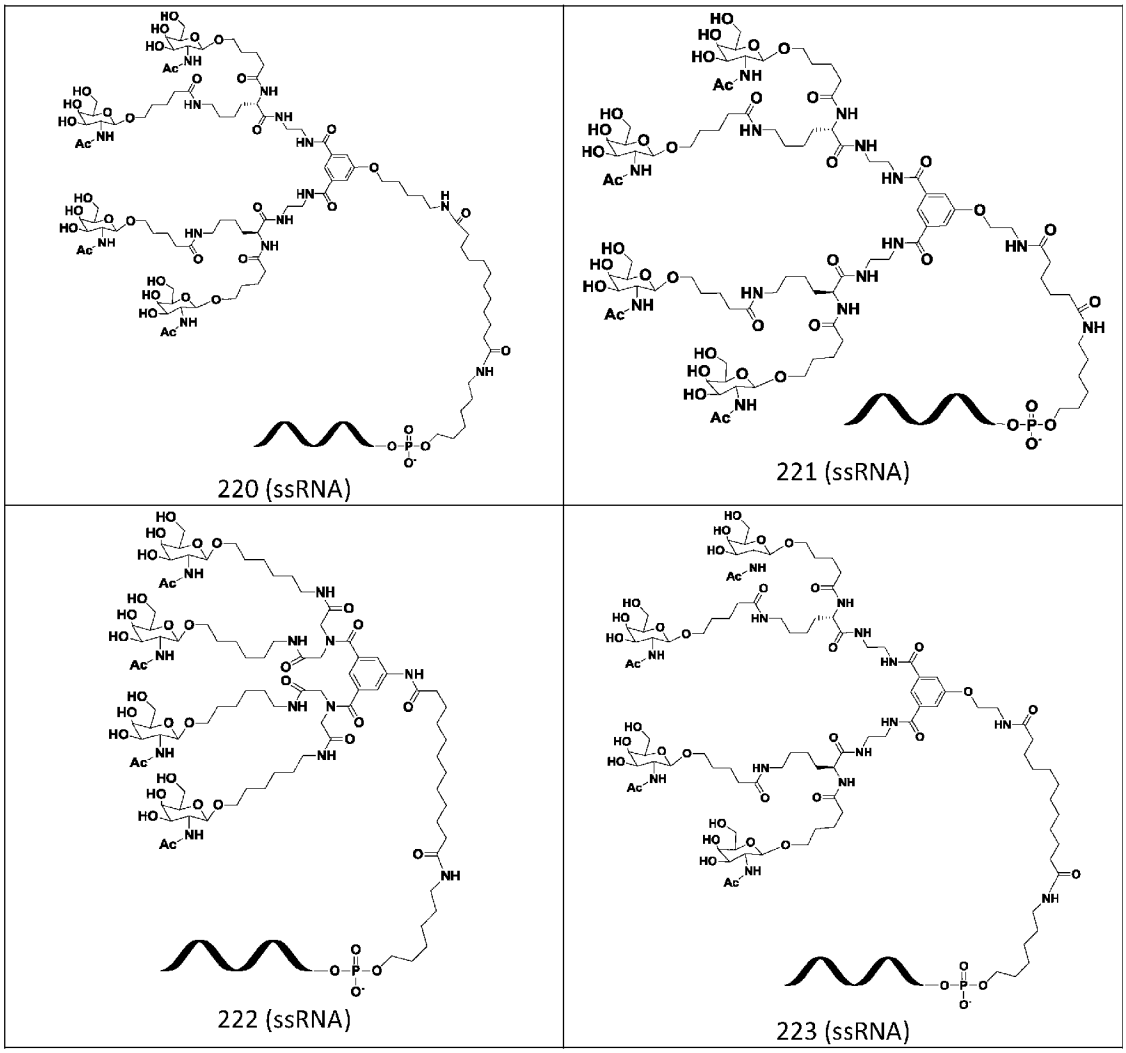
[0455] 第32表

[表32]



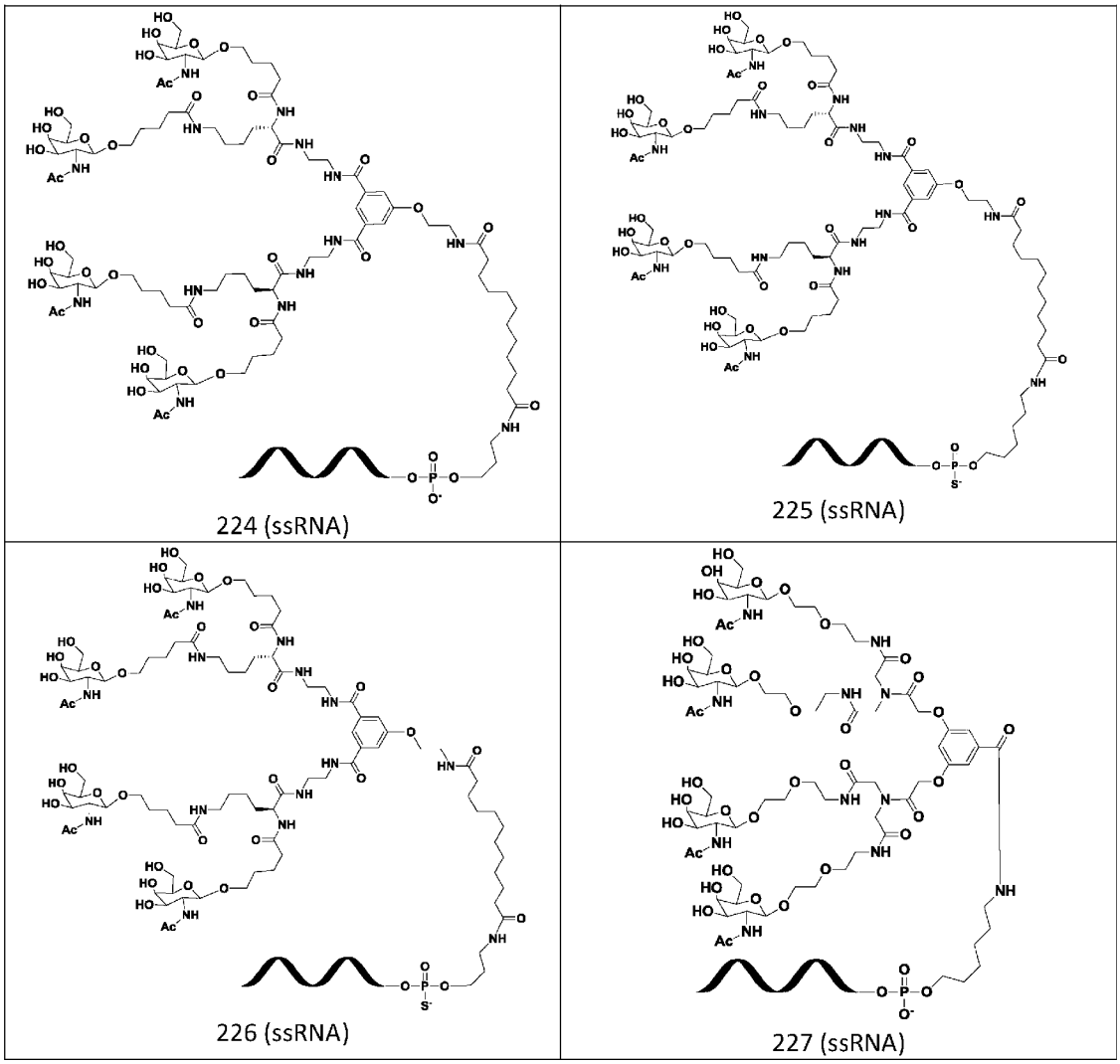
[0456] 第33表

[表33]



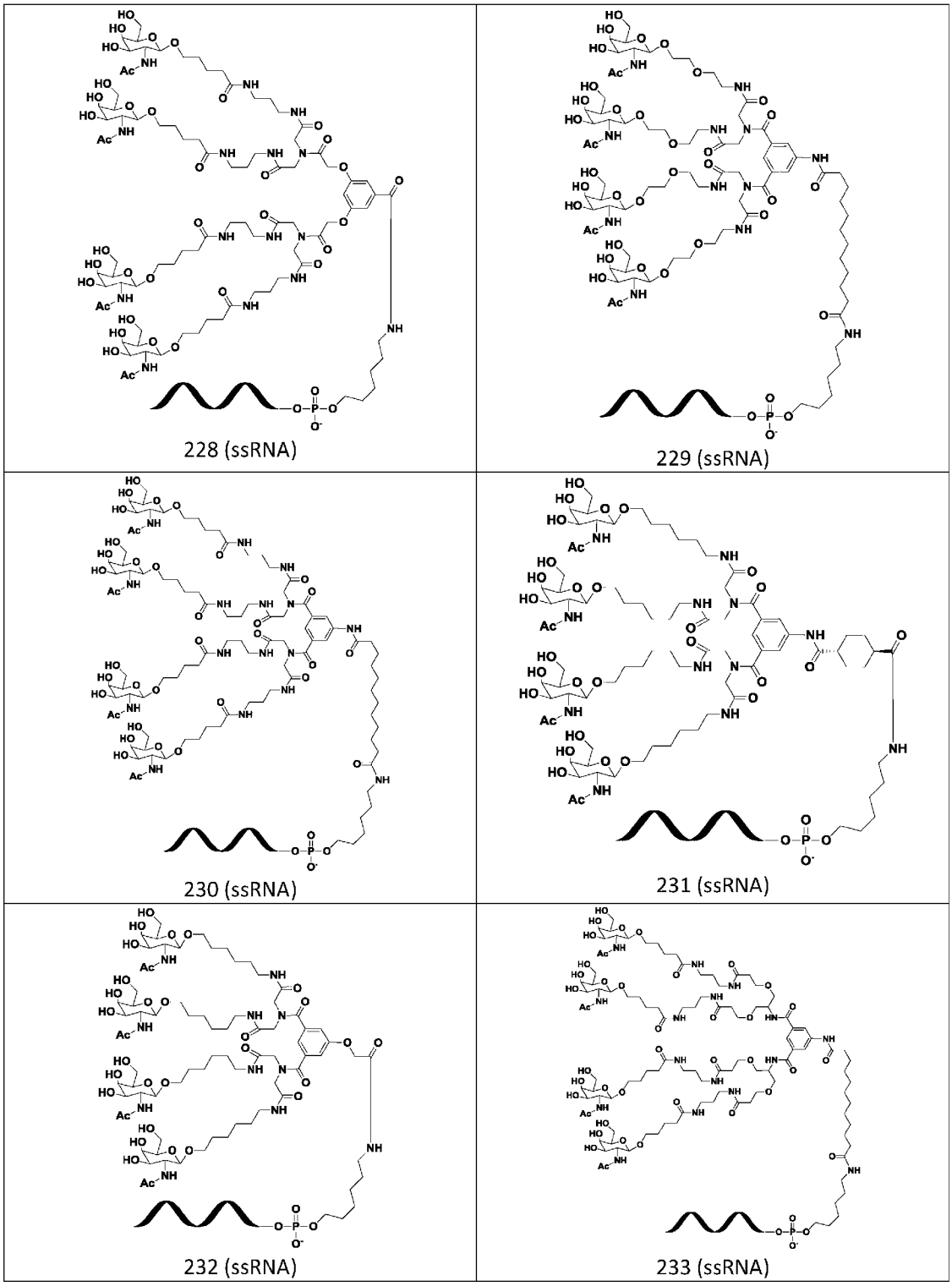
[0457] 第34表

[表34]



[0458] 第35表

[表35]



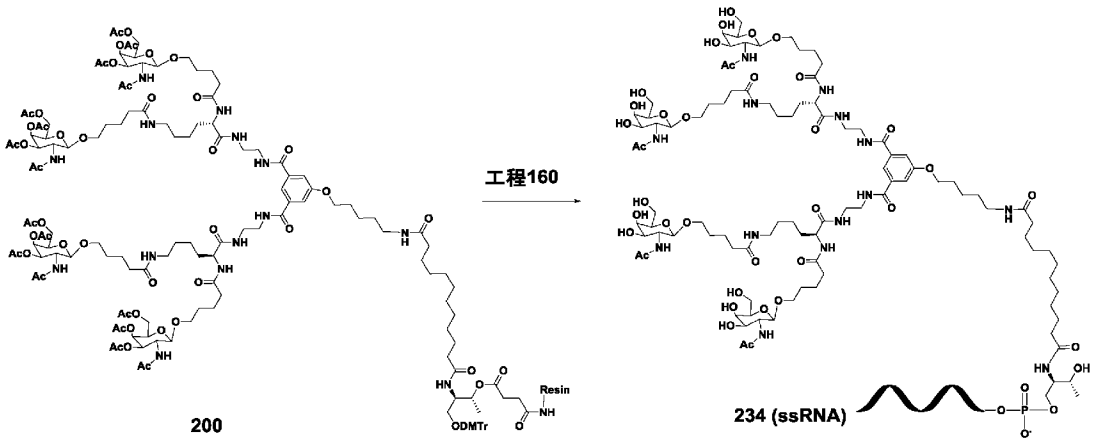
[0459] 第36表

[表36]

化合物	配列(5'→3')	理論分子量	実測値
220_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) **220**	8977	8977
221_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) **221**	8851	8851
222_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) **222**	8778	8778
223_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) **223**	8935	8935
224_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) **224**	8896	8893
225_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) **225**	8954	8951
226_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) **226**	8912	8909
227_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) **227**	8607	8606
228_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) **228**	8883	8882
229_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) **229**	8730	8729
230_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) **230**	9006	9005
231_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) **231**	8719	8719
232_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) **232**	8624	8624
233_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) **233**	9209	9209

[0460] 核酸複合体234の合成

[化201]



[0461] 工程160

実施例14の工程157で合成した化合物200を用いて実施例12の工程46と同様の方法で一本鎖の核酸複合体234を得た。

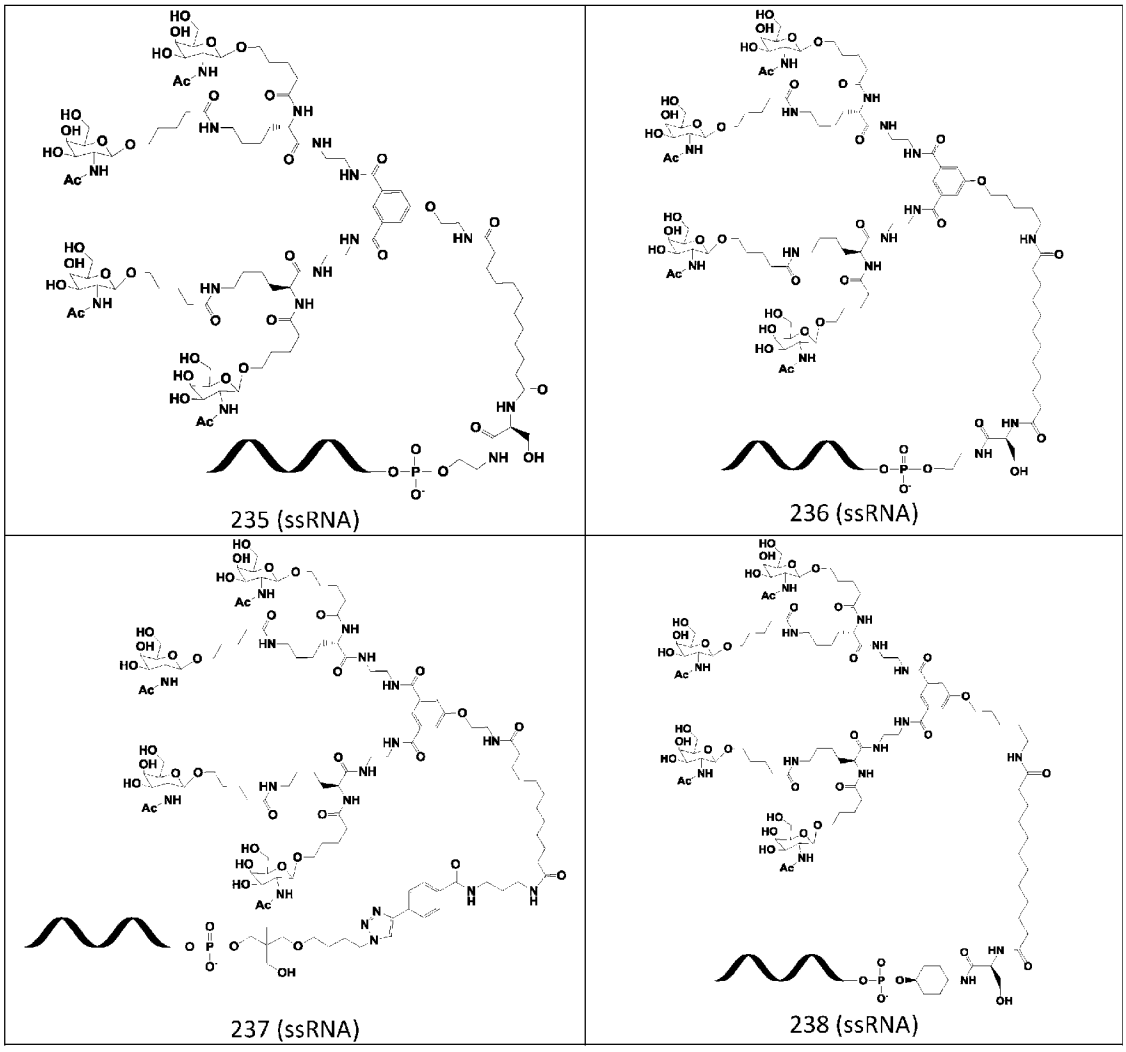
[0462] 核酸複合体235～250の合成

工程160と同様の方法で化合物171, 174, 177, 180, 183, 187, 200および第23表および第24表記載の化合物を用いてそれぞれ対応する第37表～第40表記載の一本鎖の核酸複合体を得た。

本実施例により合成した核酸複合体の配列および質量分析結果を第41表に示す。

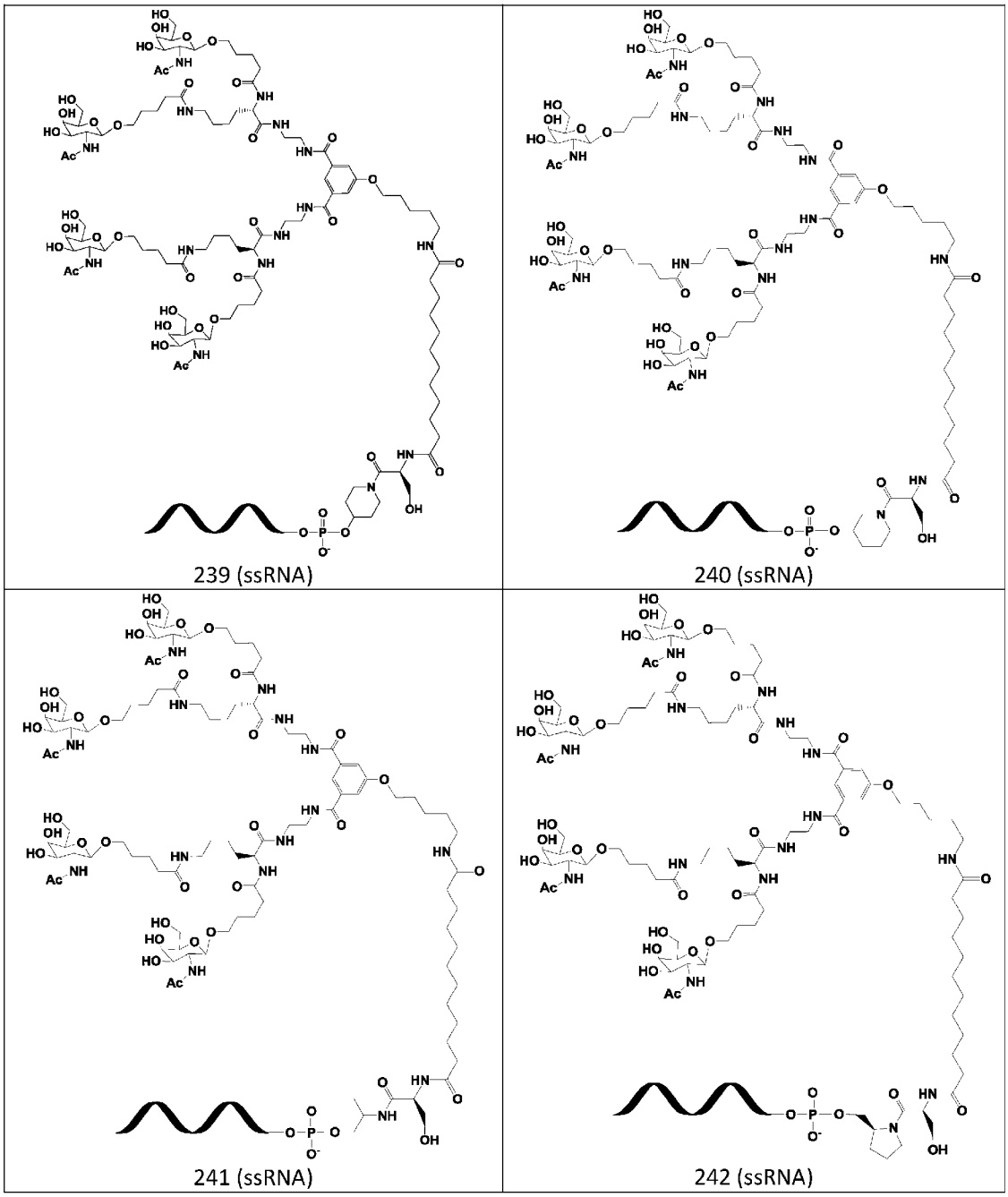
[0463] 第37表

[表37]



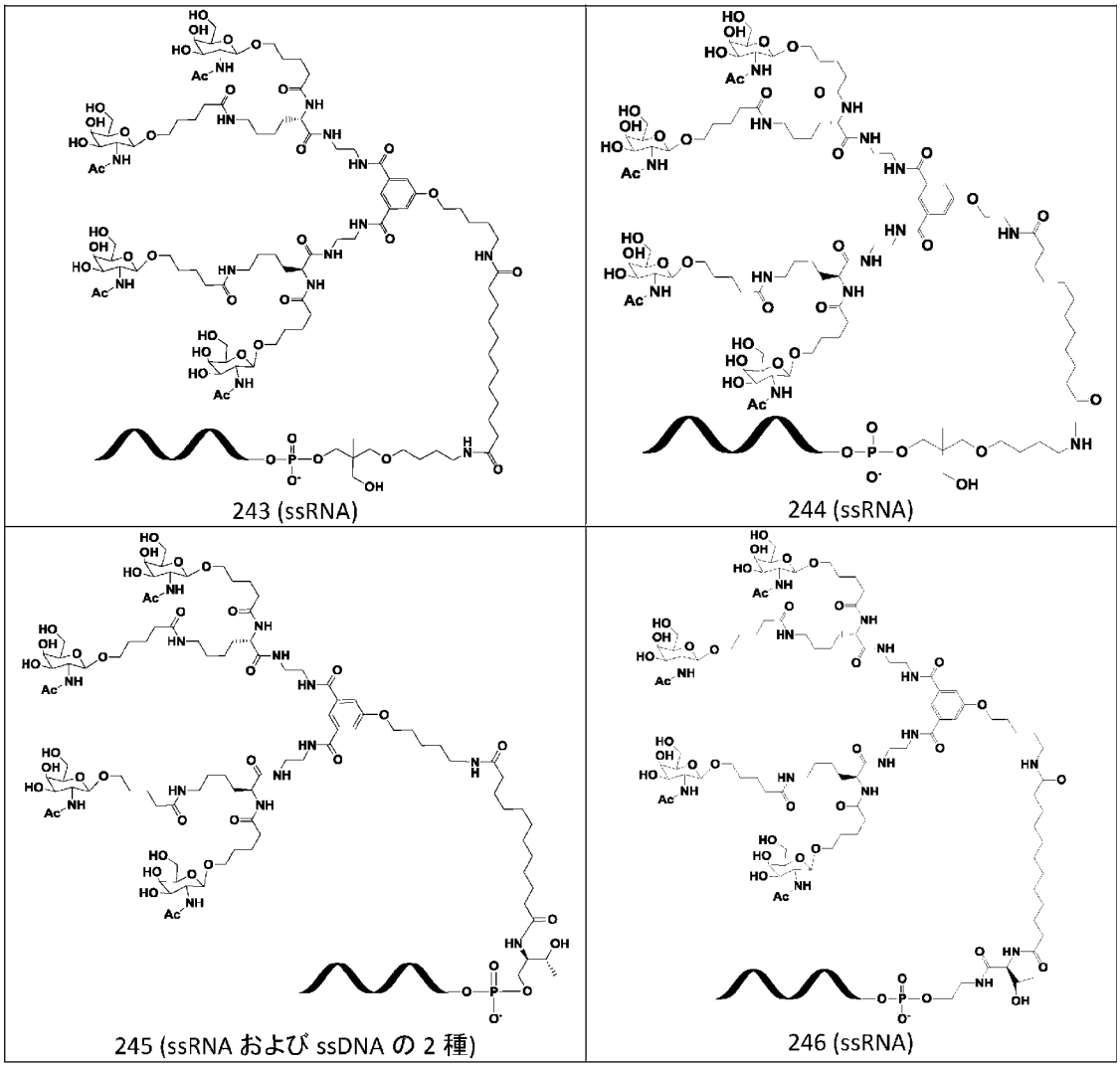
[0464] 第38表

[表38]



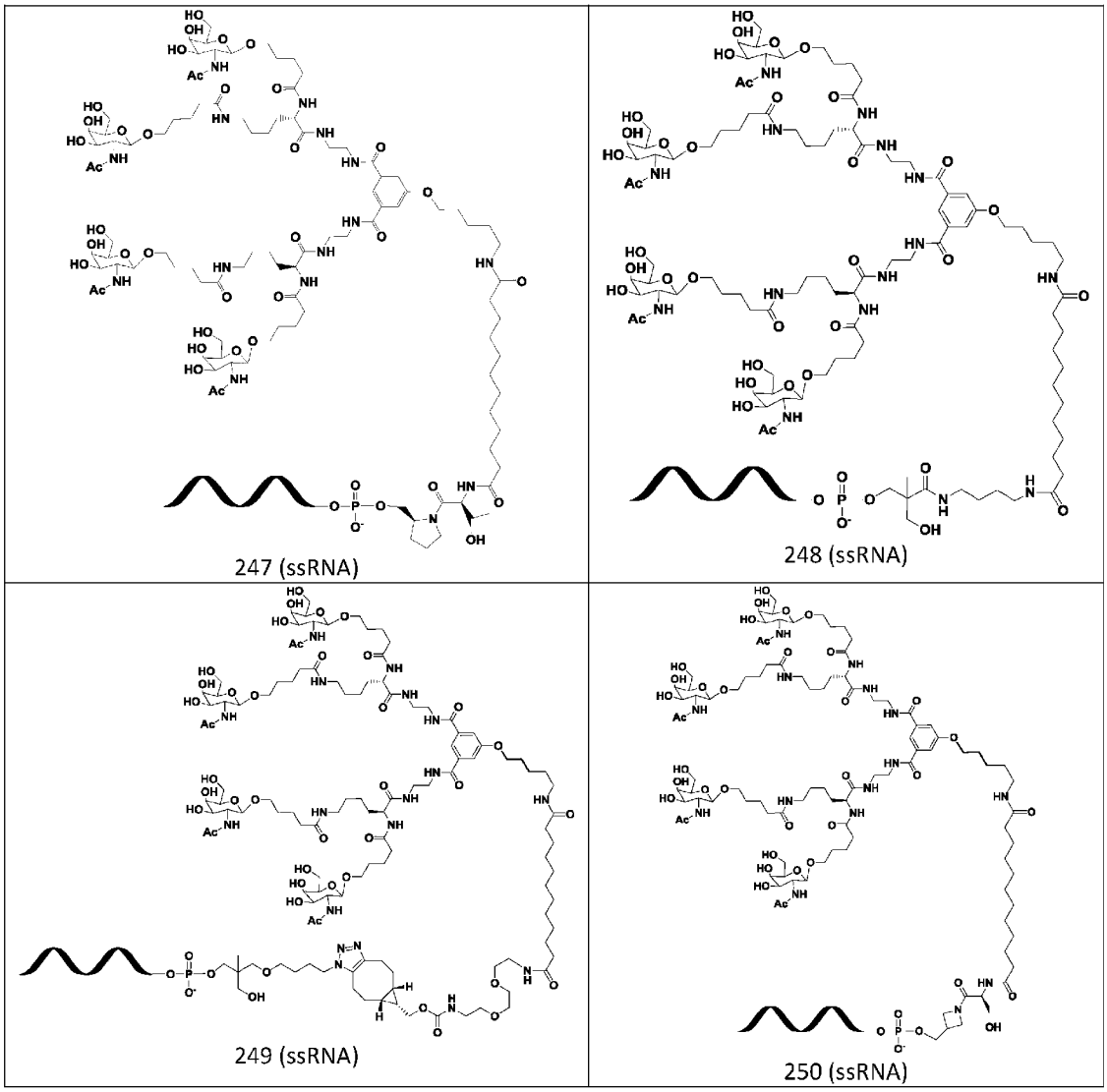
[0465] 第39表

[表39]



[0466] 第40表

[表40]



[0467] 第41表

[表41]

化合物	配列(5'→3')	理論分子量	実測値
235_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) **235**	8967	8966
236_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) **236**	9009	9008
237_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) **237**	9238	9238
238_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) **238**	9063	9063
239_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) **239**	9049	9049
240_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) **240**	9049	9048
241_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) **241**	9023	9022
242_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) **242**	9049	9049
243_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) **243**	9052	9051
244_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) **244**	9010	9009
245_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) **245**	8966	8966
245_3'-dT10	Tttttttttt **245**	5162	5161
246_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) **246**	9024	9023
247_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) **247**	9064	9063
248_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) **248**	9066	9064
249_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) **249**	9403	9403
250_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) **250**	9036	9037

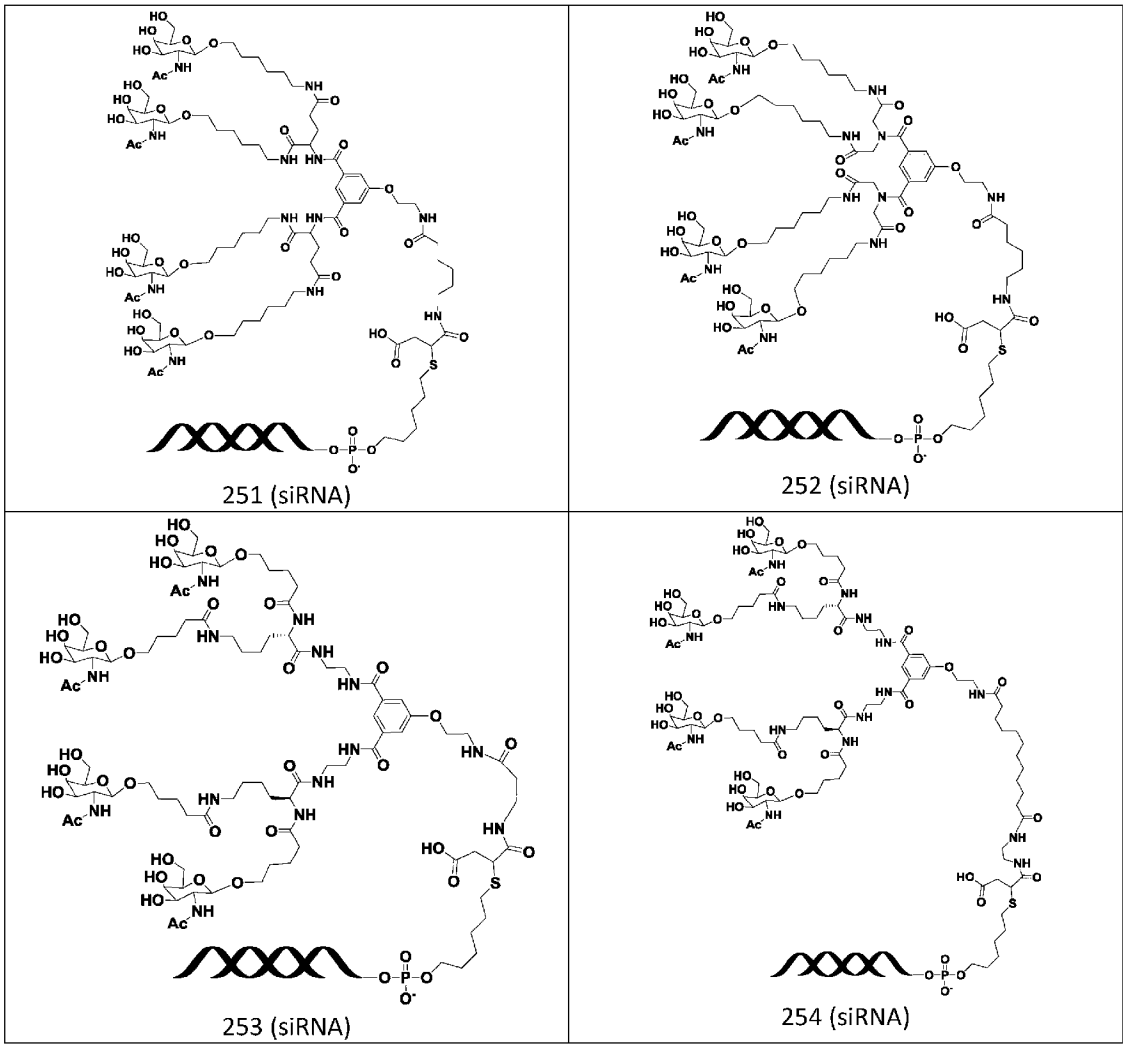
[0468] 核酸複合体251～287の合成

実施例9の工程39と同様の方法で一本鎖の核酸複合体(ssRNA)210～233，235～247を用いて2本鎖の核酸複合体251～287を得た。

本実施例により合成した核酸複合体の配列を第42，43，45，47～54表に示す。

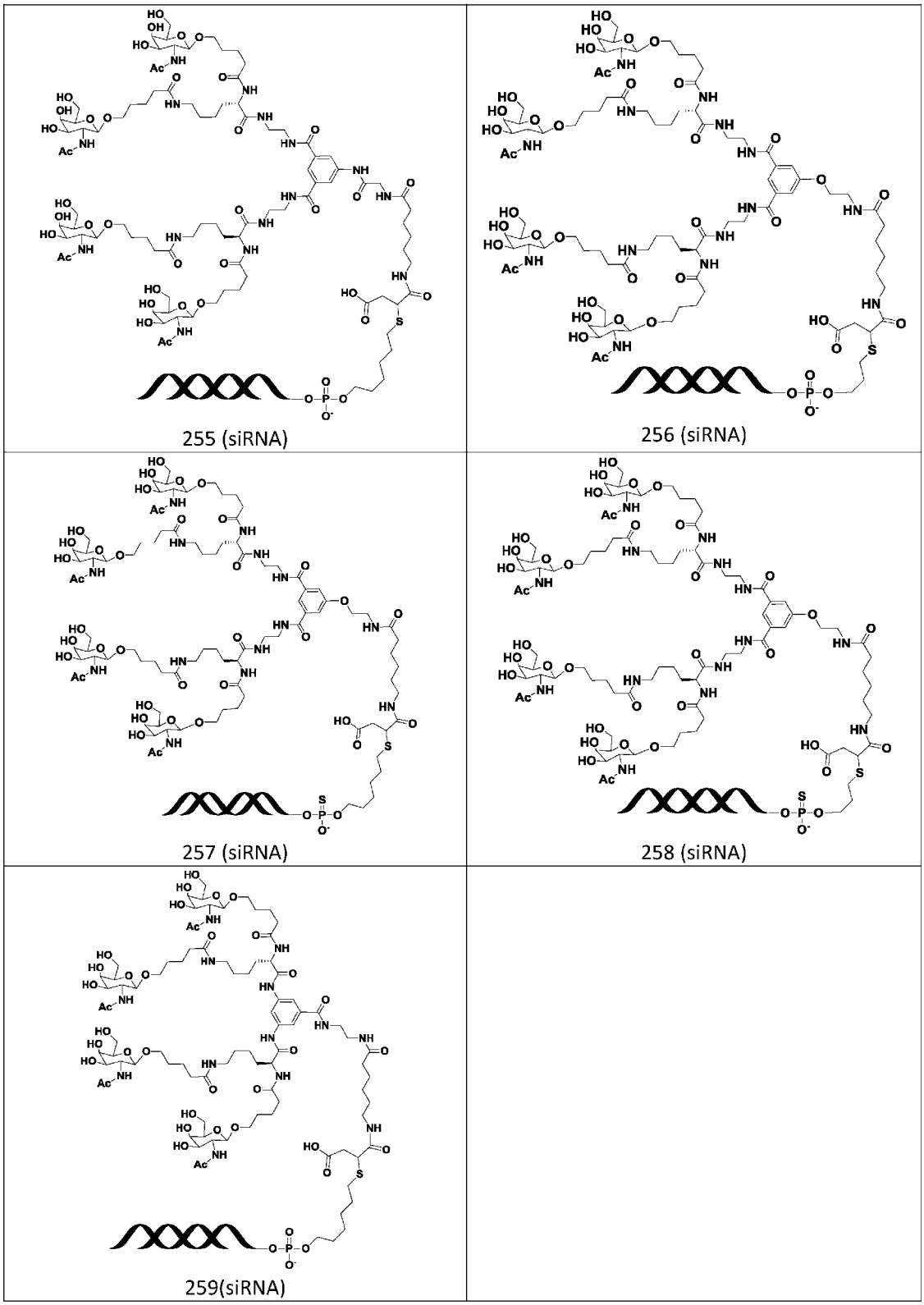
[0469] 第42表

[表42]



[0470] 第43表

[表43]



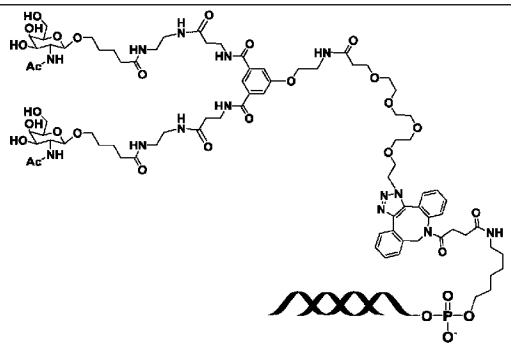
[0471] 第44表

[表44]

化合物	一本鎖名称	配列(5'→3')
251_3'-AT3-siRNA	210_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) **210**
252_3'-AT3-siRNA	211_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) **211**
253_3'-AT3-siRNA	212_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) **212**
254_3'-AT3-siRNA	213_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) **213**
255_3'-AT3-siRNA	214_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) **214**
256_3'-AT3-siRNA	215_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) **215**
257_3'-AT3-siRNA	216_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) **216**
258_3'-AT3-siRNA	217_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) **217**
259_3'-AT3-siRNA	218_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) **218**
-	AT3-asRNA	U(M)^U(F)^G(M)A(F)A(M)G(F)U(M)A(F)A(M)A(F) U(M)G(M)G(M)U(F)G(M)U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)C(M)^A(M)^G(M)

[0472] 第45表

[表45]

 260 (siRNA)	

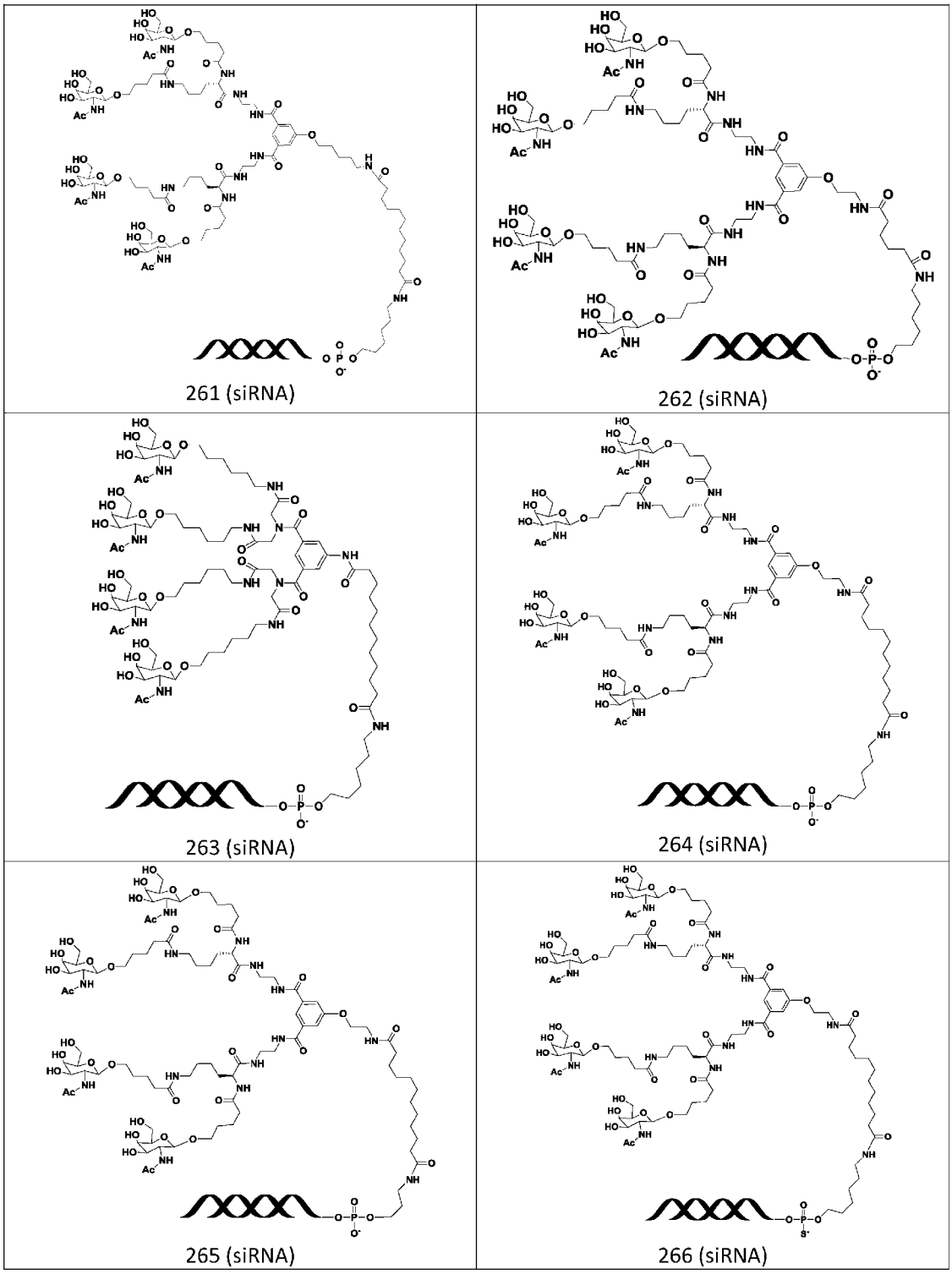
[0473] 第46表

[表46]

化合物	一本鎖名称	配列(5'→3')
260_5'-B2M-siRNA	218_5'-B2M-ssRNA	**219** A(F)G(M)G(F)A(M)C(F)U(M)G(F)G(M)U(F)C(M) U(F)U(F)U(M)C(F)U(M)A(F)U(M)C(F)U(M)^C(F)^U(M)
	B2M-asRNA	A(F)^G(M)^A(F)G(M)A(F)U(M)A(F)G(M)A(F)A(M)A(M) G(F)A(M)C(F)C(M)A(F)G(M)U(F)C(M)C(F)U(M)^U(F)^G(M)

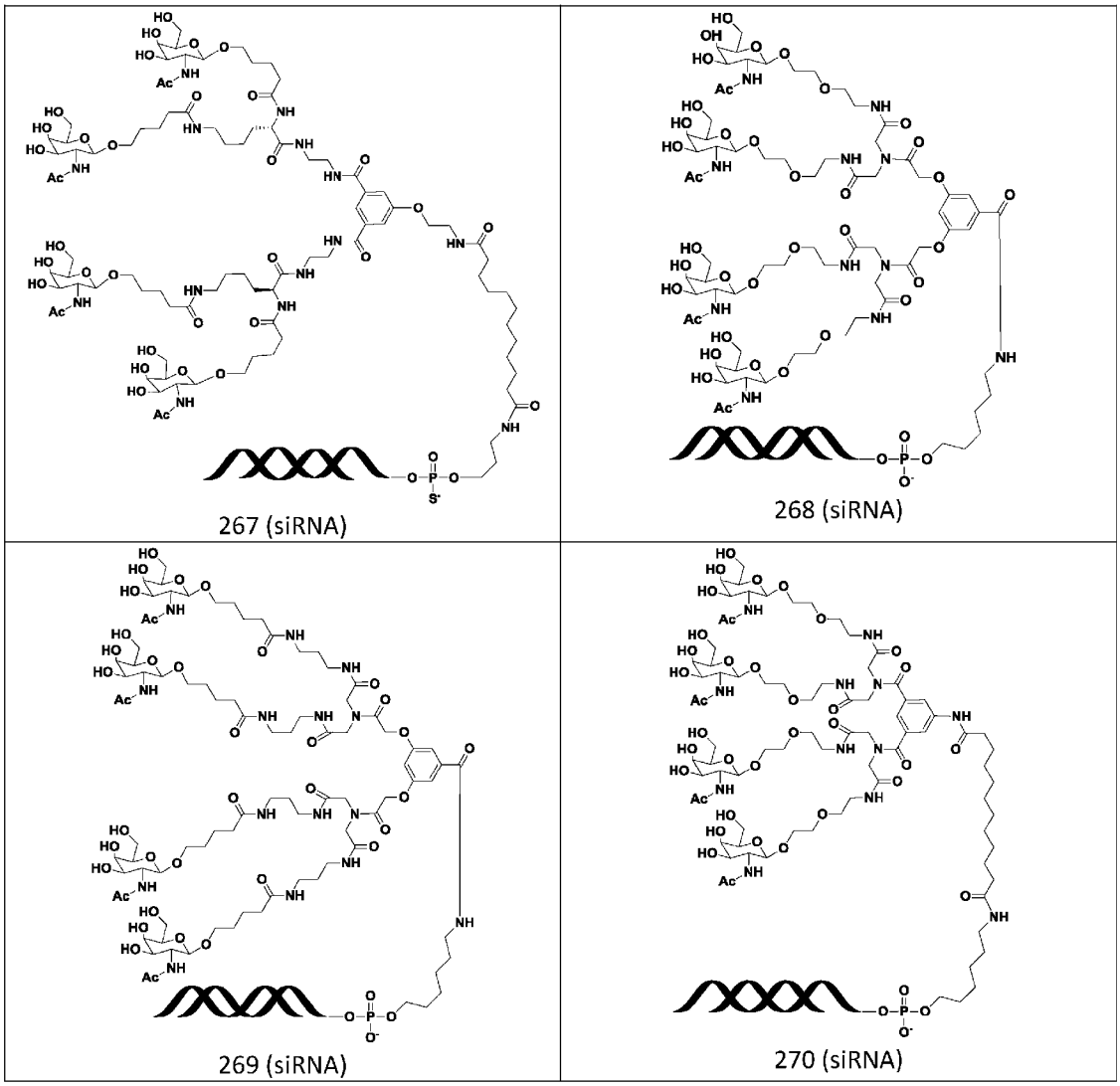
[0474] 第47表

[表47]



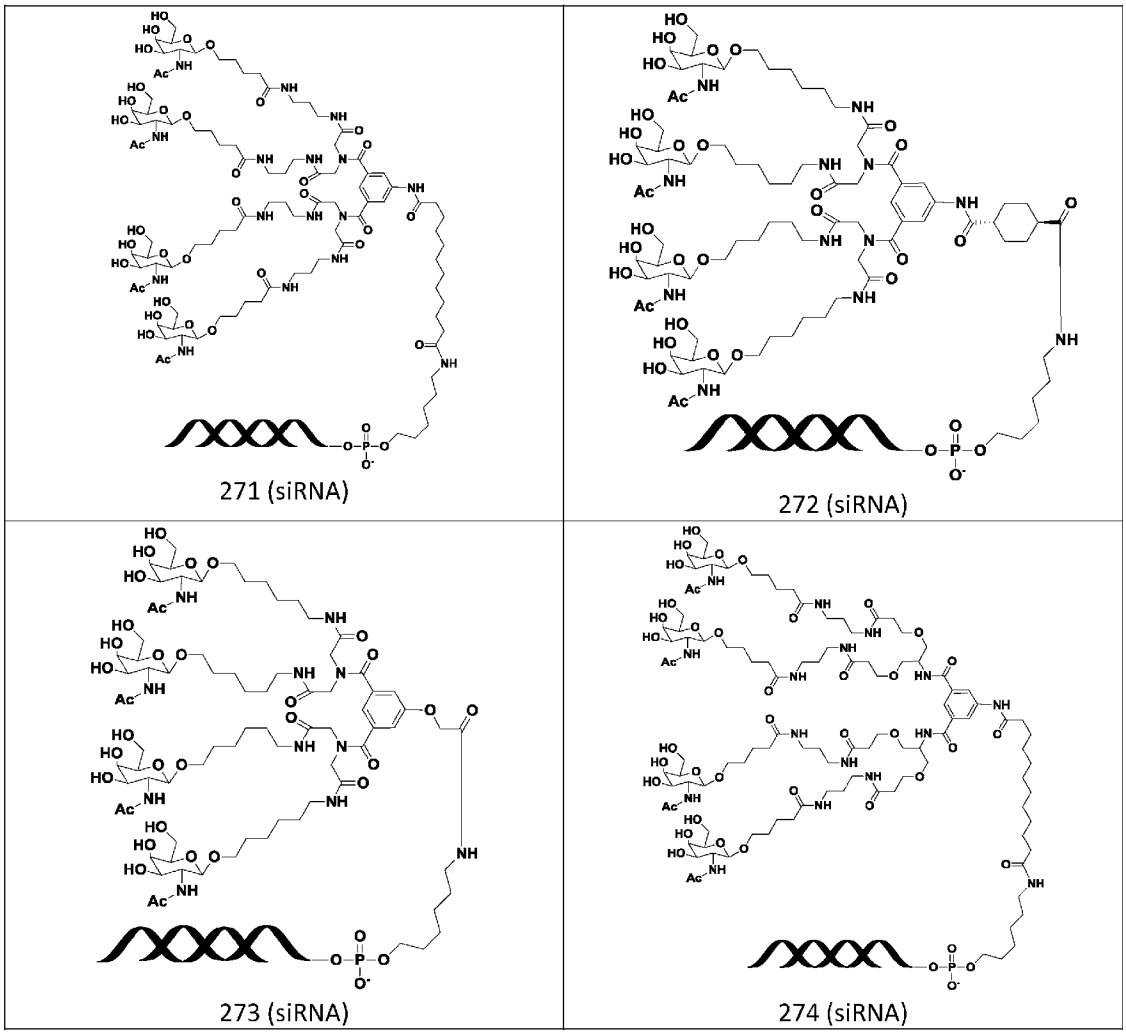
[0475] 第48表

[表48]



[0476] 第49表

[表49]



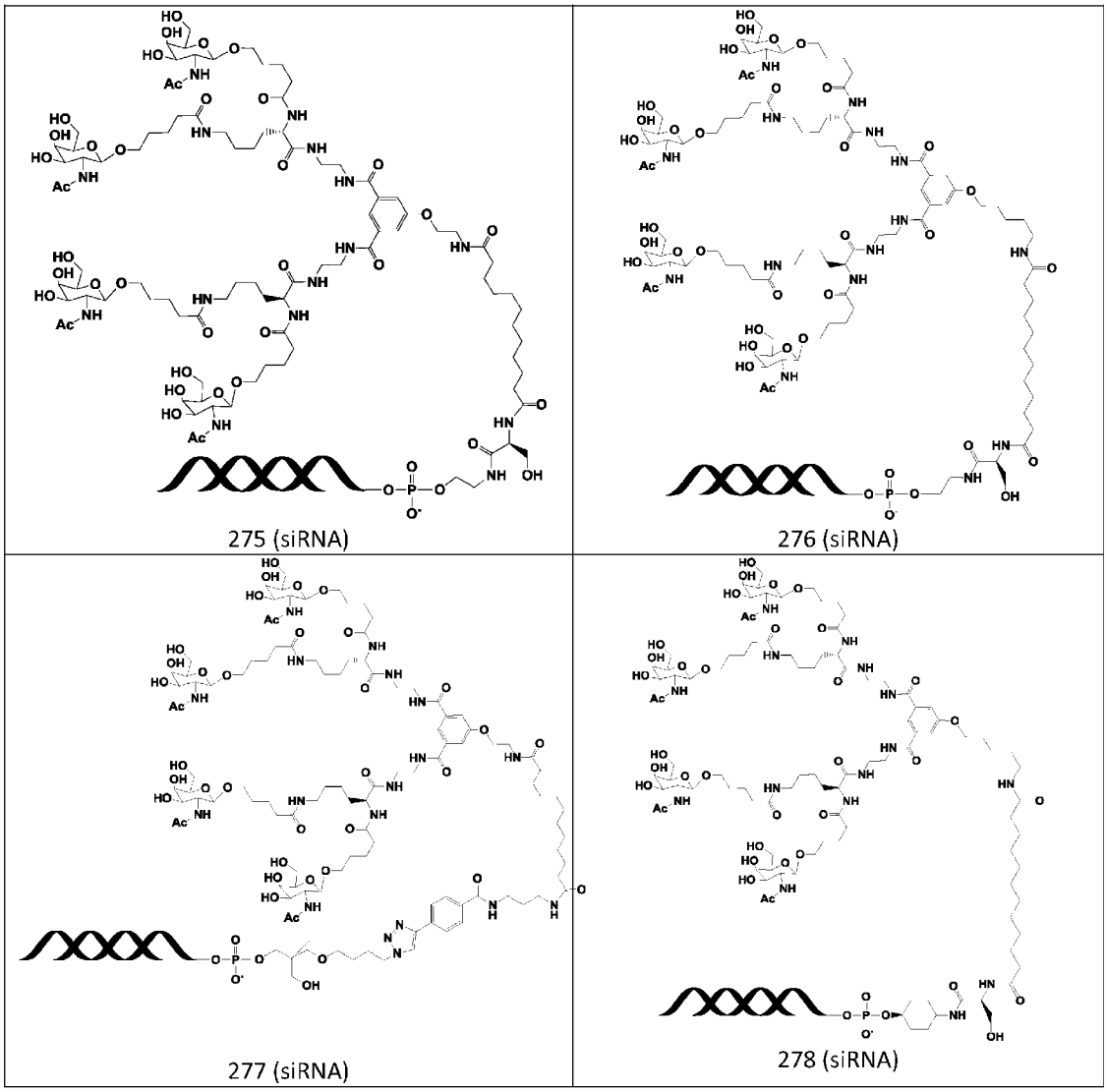
[0477] 第50表

[表50]

化合物	一本鎖名称	配列(5'→3')
261_3'-AT3-siRNA	220_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) **220**
262_3'-AT3-siRNA	221_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) **221**
263_3'-AT3-siRNA	222_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) **222**
264_3'-AT3-siRNA	223_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) **223**
265_3'-AT3-siRNA	224_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) **224**
266_3'-AT3-siRNA	225_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) **225**
267_3'-AT3-siRNA	226_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) **226**
268_3'-AT3-siRNA	227_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) **227**
269_3'-AT3-siRNA	228_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) **228**
270_3'-AT3-siRNA	229_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) **229**
271_3'-AT3-siRNA	230_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) **230**
272_3'-AT3-siRNA	231_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) **231**
273_3'-AT3-siRNA	232_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) **232**
274_3'-AT3-siRNA	233_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) **233**
-	AT3-asRNA	U(M)^U(F)^G(M)A(F)A(M)G(F)U(M)A(F)A(M)A(F) U(M)G(M)G(M)U(F)G(M)U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)C(M)^A(M)^G(M)

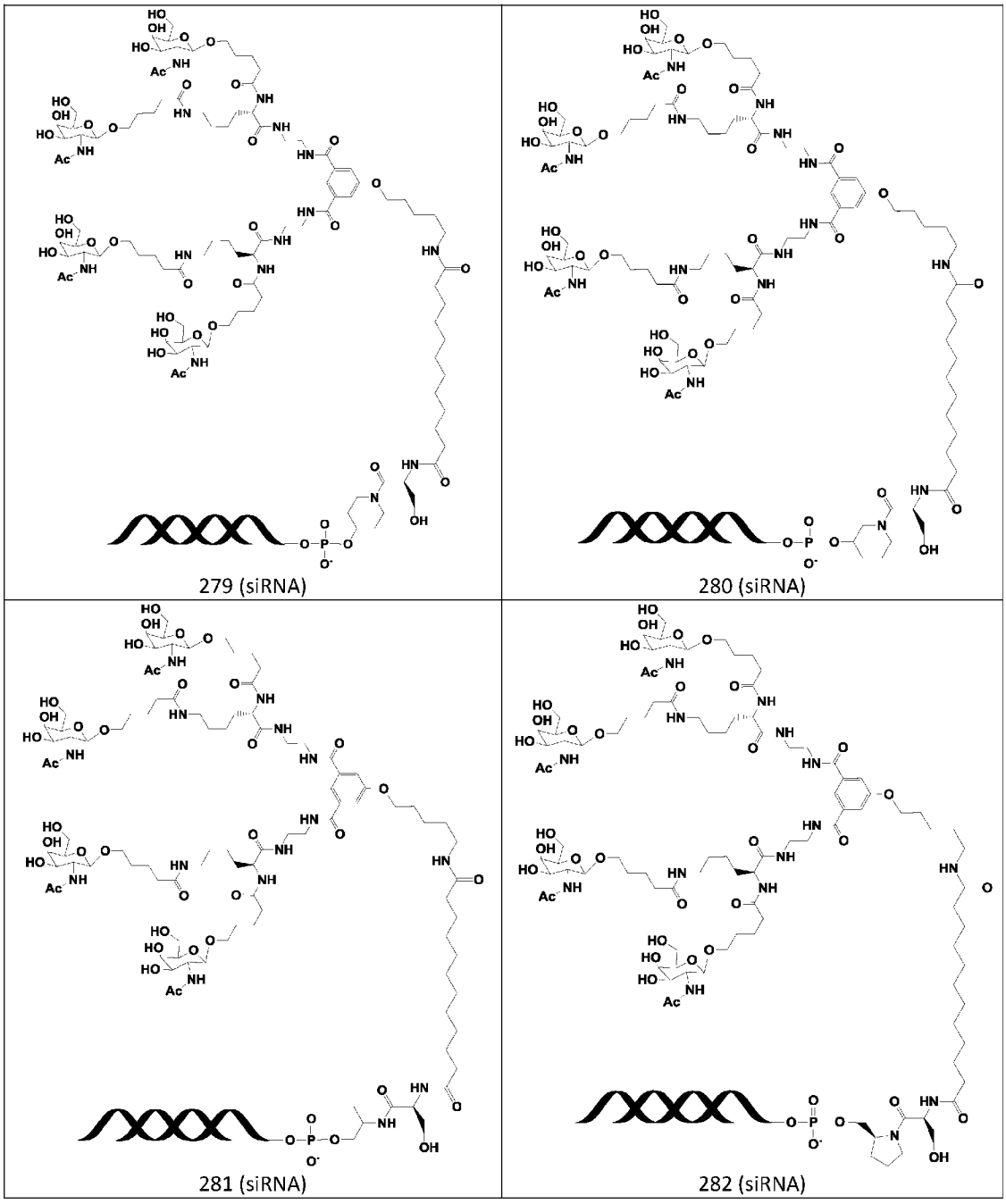
[0478] 第51表

[表51]



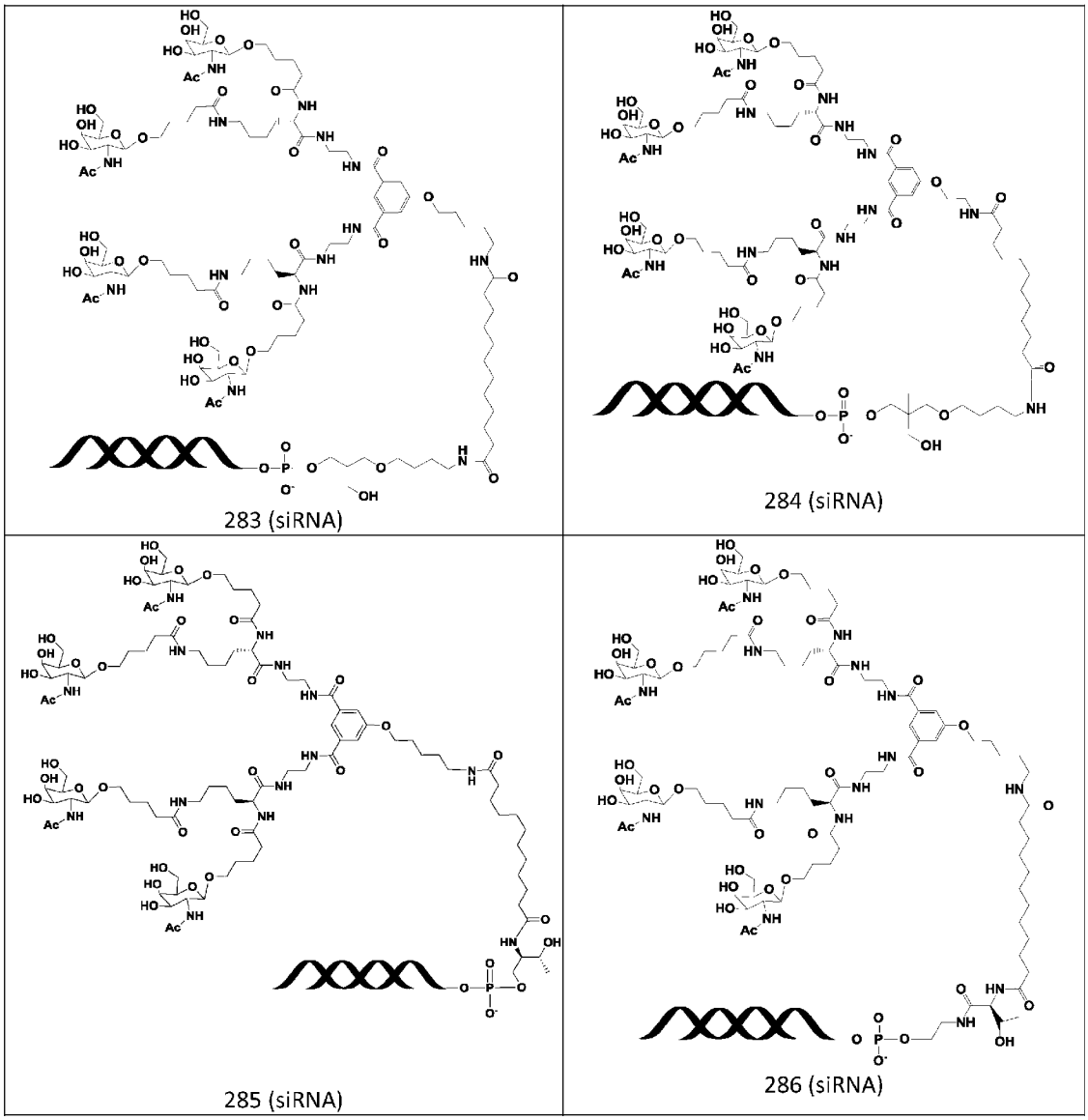
[0479] 第52表

[表52]



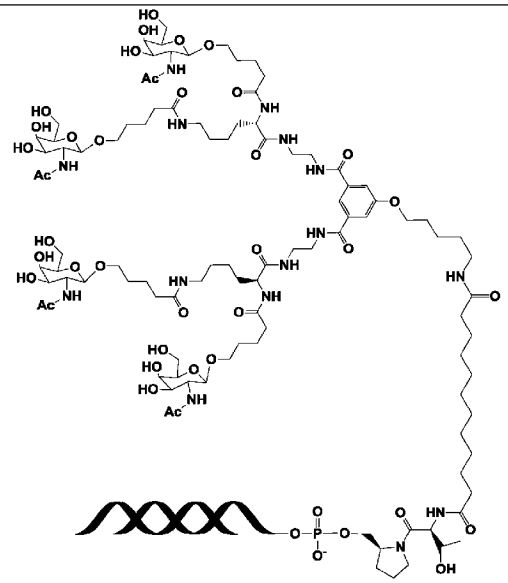
[0480] 第53表

[表53]



[0481] 第54表

[表54]



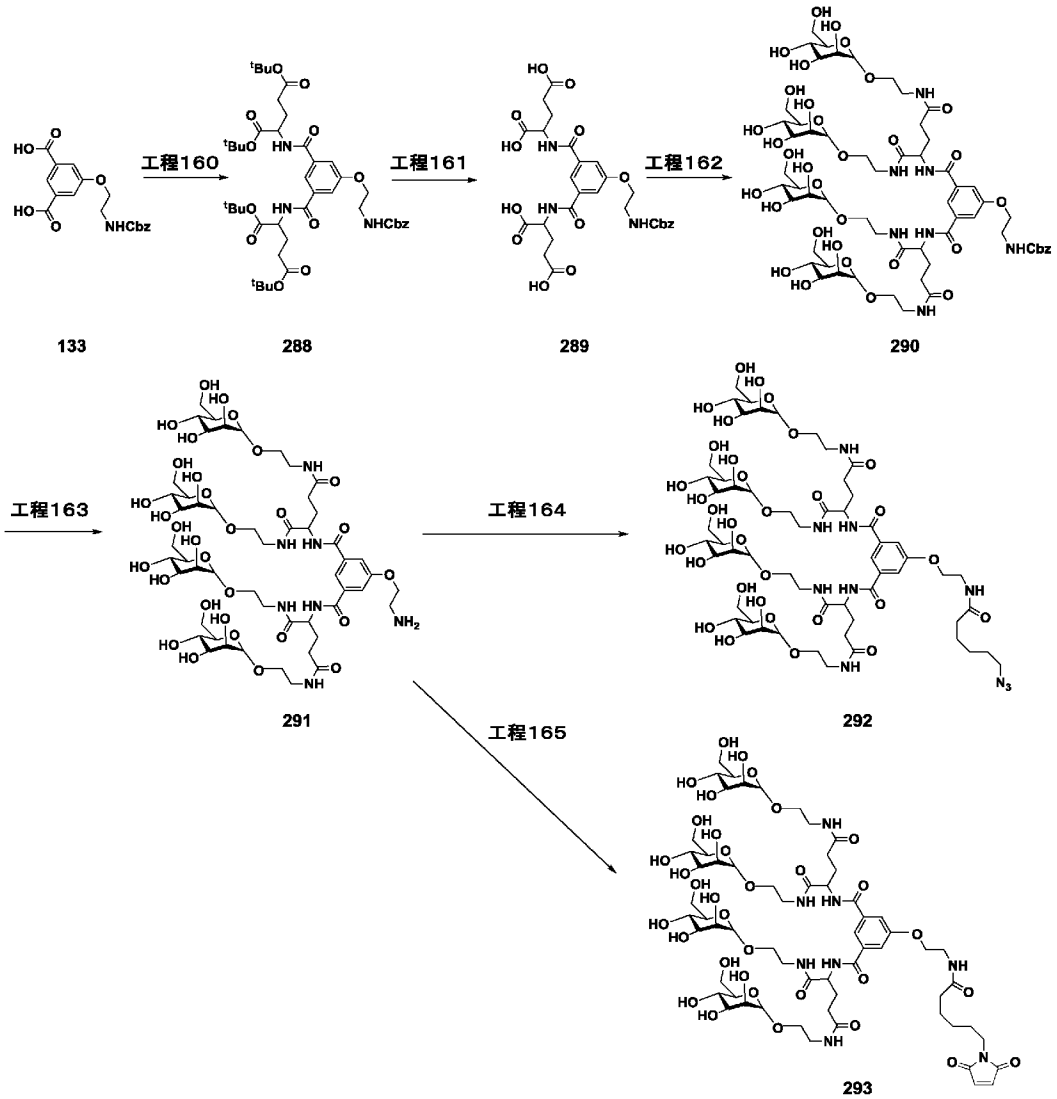
[0482] 第55表

[表55]

化合物	一本鎖名称	配列(5'→3')
275_3'-AT3-siRNA	235_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) **235**
276_3'-AT3-siRNA	236_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) **236**
277_3'-AT3-siRNA	237_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) **237**
278_3'-AT3-siRNA	238_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) **238**
279_3'-AT3-siRNA	239_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) **239**
280_3'-AT3-siRNA	240_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) **240**
281_3'-AT3-siRNA	241_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) **241**
282_3'-AT3-siRNA	242_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) **242**
283_3'-AT3-siRNA	243_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) **243**
284_3'-AT3-siRNA	244_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) **244**
285_3'-AT3-siRNA	245_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) **245**
286_3'-AT3-siRNA	246_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) **246**
287_3'-AT3-siRNA	247_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) **247**

[0483] 実施例16　糖リガンド-テザーユニットの合成

[化202]



[0484] 工程160

実施例13の工程99で合成した化合物133 (0.5 g, 1.365 mmol)を用いて、実施例4の工程25と同様の方法で化合物288を粗生成物として得た。

[0485] 工程161

実施例16の工程160で合成した化合物288(0.296 g, 0.247 mmol)を用いて、実施例4の工程26と同様の方法で化合物289を粗生成物として得た。

[0486] 工程162

実施例16の工程161で合成した化合物289(0.153 g, 0.247 mmol)およびインオーガニック・ケミストリー (Inorganic Chemistry), 第83巻, 1000-1007頁, 2011年に記載された方法で合成した1-(2-アジドエチル)－r－D-マンノピラ

ノシド (0.221g, 0.989 mmol)を用いて、実施例1の工程8と同様の方法で化合物290を得た(0.110 g, 収率31%)。

ESI-MS m/z : 720 (M + H)+

[0487] 工程163

実施例16の工程162で合成した化合物290(0.110 g, 0.077 mmol)を用いて、実施例5の工程28と同様の方法で化合物291を得た(0.077 g, 収率77%)。

ESI-MS m/z : 1305 (M + H)+

[0488] 工程164

実施例16の工程163で合成した化合物291(20 mg, 0.016 mmol)、2, 5-ジオキソピロリジン-1-イル 6-アジドヘキサン酸(10 mg, 0.032 mmol)をテトラヒドロフラン (2 mL)に溶解し、ジイソプロピルエチルアミン (0.027 mL, 0.078 mmol)を加えて、室温にて終夜攪拌した。混合物を逆相高速液体クロマトグラフィー(ウォーターズ, X BridgeC18, 5μm, 4.6 mmx250 mm、0.01%トリフルオロ酢酸水溶液, B液:アセトニトリルによるグラジエント) によって精製し、化合物292を得た(1.7 mg, 収率8%)。

ESI-MS m/z : 1444 (M + H)+

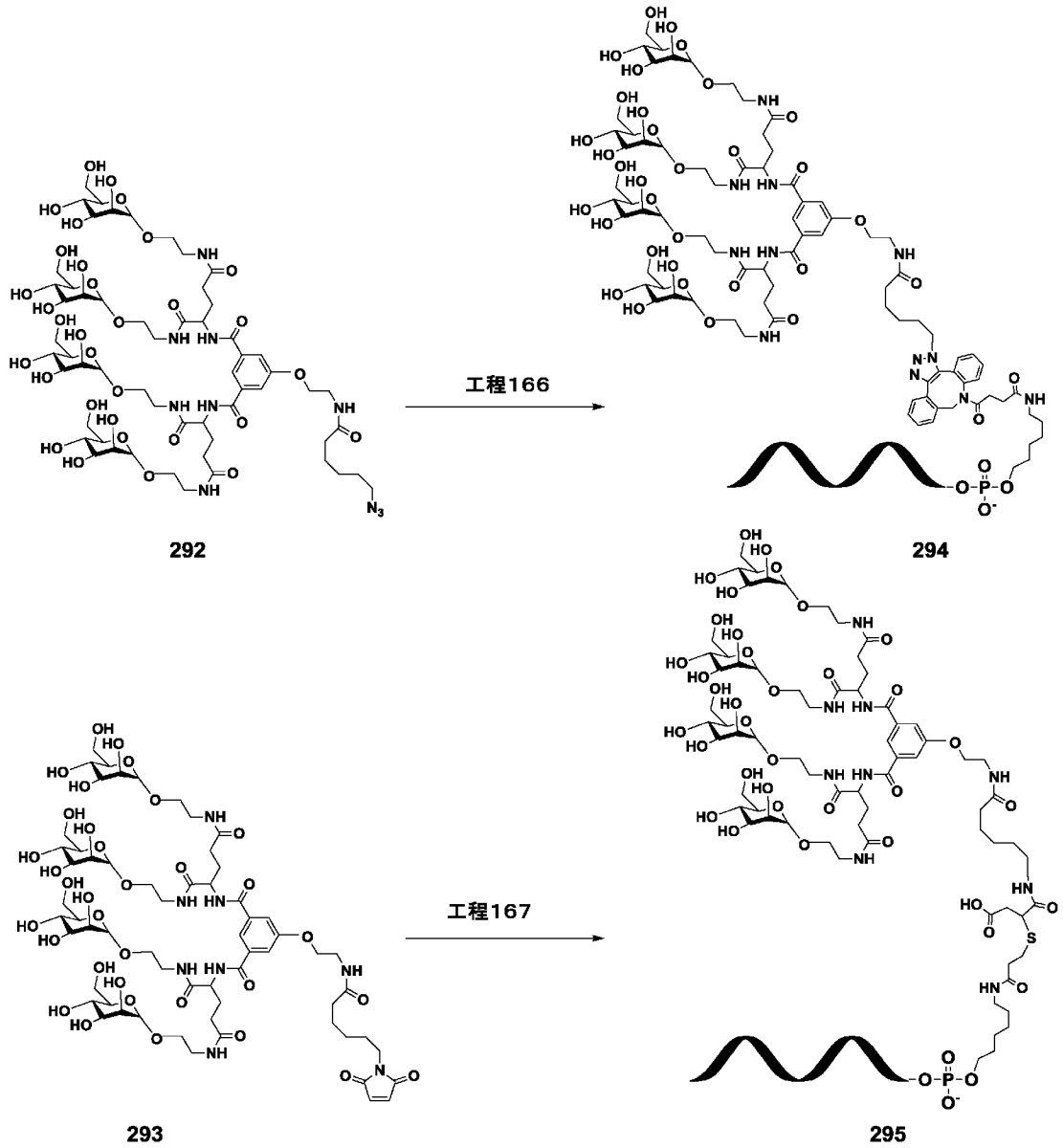
[0489] 工程165

実施例16の工程163で合成した化合物291(20 mg, 0.016 mmol)、N-(6-マレイミドカプロイルオキシ)スクシミド (9.6 mg, 0.031 mmol)をテトラヒドロフラン (2 mL)に溶解し、ジイソプロピルエチルアミン (0.027 mL, 0.078 mmol)を加えて、室温にて終夜攪拌した。混合物を逆相高速液体クロマトグラフィー(ウォーターズ, X BridgeC18, 5μm, 4.6 mmx250 mm、0.01%トリフルオロ酢酸水溶液, B液:アセトニトリルによるグラジエント) によって精製し、化合物293を得た(1.8 mg, 収率8%)。

ESI-MS m/z : 1498 (M + H)+

[0490] 実施例17 核酸複合体の合成

[化203]



292 294

293 295

[0491] 工程166

実施例16の工程164で合成した化合物292を用いて実施例10の工程40と同様の方法で一本鎖の核酸複合体294を得た。

[0492] 工程167

実施例16の工程165で合成した化合物293を用いて実施例9の工程38と同様の方法で一本鎖の核酸複合体295を得た。

[0493] 本実施例により合成した核酸複合体の配列および質量分析結果を第56表に示す。

[0494] 第56表

[表56]

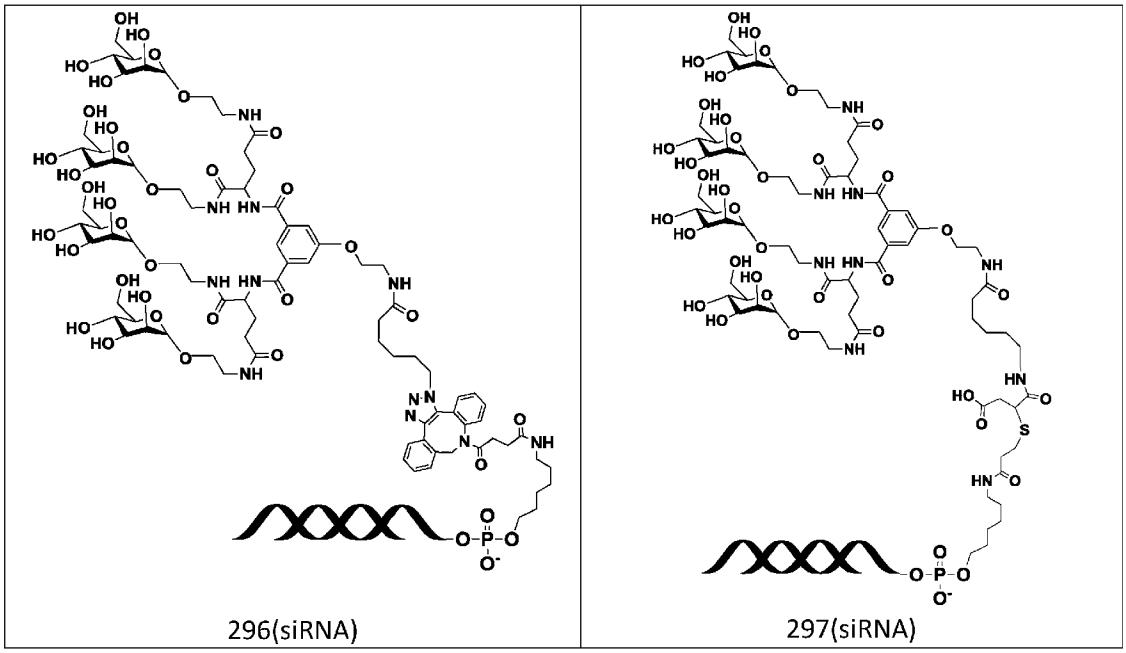
化合物	配列(5'→3')	理論分子量	実測値
294_3'-B2M-ssRNA	A(F)G(M)G(F)A(M)C(F)U(M)G(F)G(M)U(F)C(M) U(F)U(F)U(M)C(F)U(M)A(F)U(M)C(F)U(M)^C(F)^U(M) **294**	8692	8691
295_3'-Hprt1-ssRNA	U(F)C(M)C(F)U(M)A(F)U(M)G(F)A(M)C(F)U(M)G(F)U(M) A(F)G(M)A(F)U(M)U(F)U(M)U(F)A(M)U(F) **295**	8524	8524

[0495] 実施例9の工程39と同様の方法で第56表記載の一本鎖の核酸複合体を用いて第57表記載の2本鎖の核酸複合体を得た。

本実施例により合成した核酸複合体の配列を第58表に示す。

[0496] 第57表

[表57]



296(siRNA) 297(siRNA)

[0497] 第58表

[表58]

化合物	一本鎖名称	配列(5'→3')
296_B2M-siRNA	294_3'-B2M-ssRNA	A(F)G(M)G(F)A(M)C(F)U(M)G(F)G(M)U(F)C(M) U(F)U(F)U(M)C(F)U(M)A(F)U(M)C(F)U(M)^C(F)^U(M) 294
	B2M-as-RNA	A(F)^G(M)^A(F)G(M)A(F)U(M)A(F)G(M)A(F)A(M)A(M) G(F)A(M)C(F)C(M)A(F)G(M)U(F)C(M)C(F)U(M)^U(F)^G(M)
297_Hprt1-siRNA	295_3'-Hprt1-ssRNA	U(F)C(M)C(F)U(M)A(F)U(M)G(F)A(M)C(F)U(M)G(F)U(M) A(F)G(M)A(F)U(M)U(F)U(M)U(F)A(M)U(F) 295
	Hprt1-as-RNA	p-A(M)U(F)A(M)A(F)A(M)A(F)U(M)C(F)U(M)A(F)C(M)A(F) G(M)U(F)C(M)A(F)U(M)A(F)G(M)G(F)A(M)^A(F)^U(M)

[0498] 試験例5核酸複合体のマウス初代肝細胞に対するin vitro活性

実施例および比較例で得られた各核酸複合体のうち、第59表について、それぞれ以下の方法により、シーディーワン(CD-1)由来マウス初代肝細胞（ライフテクノロジー社製、カタログ番号MSCP10)に導入した。

最終濃度が30, 10または3 nmol/Lとなるように、オプティメム（Opti-MEM、ギブコ(GIBCO)社、31985)で希釈した各核酸複合体を、96ウェルの培養プレートに、20μLずつ分注した後、プライマリヘパトサイトゾウイングアンドプレーティングサプリメント(Primary Hepatocyte Thawing and Plating Supplements ）（ライフテクノロジー社製、カタログ番号CM3000)を含むウィリアムズイーメディウム（William’s E Medium）（ライフテクノロジー社製、カタログ番号A12176-01)に懸濁させたマウス初代肝細胞を、細胞数12500/80μL/ウェルとなるように播種し、37℃、5%CO_2条件下で6時間培養したのちに、培養上清を注意深く除去し、プライマリヘパトサイトメンテナンスサプリメント（Primary Hepatocyte Maintenance Supplements）（ライフテクノロジー社製、カタログ番号CM4000)を含むウィリアムズイーメディウムを添加した。また陰性対照の群として何も処理しない細胞を播種した。

各製剤を導入した細胞を37℃の5%CO_2インキュベーター内で18時間培養し、氷冷したリン酸緩衝化生理食塩水で洗浄し、スーパープレップセルリシスアンドアールティーキットフォーキューピーシーアール（東洋紡社製、カタログ番号SCQ-201)を用いて、製品に添付された説明書に記載された方法に従い、全RNAの回収と、得られた全RNAを鋳型とする逆転写反応によるcDNAの作製とを行った。

得られたcDNAを鋳型とし、タックマン（登録商標)ジーンエクスプレッションアッセイズプローブ（アプライドバイオシステムズ社製)をプローブとして、クオントスタジオ12ケーフレックスリアルタイムピーシーアールシステム(ABI社製)を用い、添付された使用説明書に記載された方法に従ってPCR反応させることにより、Serpin peptidase inhibitor, clade C (antithrombin), member 1 (別名antithrombin III、以下AT3と表す)遺伝子および構成的発現遺伝子であるグリセルアルデヒド3-リン酸脱水素酵素（D-glyceraldehyde-3-

phosphate dehydrogenase、以下gapdhと表す)遺伝子をPCR反応させてmRNA増幅量をそれぞれ測定し、gapdhのmRNA増幅量を内部対照として、AT3のmRNAの準定量値を算出した。同様に測定した陰性対照におけるAT3のmRNAの準定量値を1として、AT3のmRNAの準定量値から、AT3のmRNAの発現率を求めた。得られたAT3のmRNAの発現率の結果を、陰性対照のAT3 mRNA発現率に対する抑制率として第60-66表に示す。

[0499] 第59表

[表59]

被検物番号	化合物番号
1	AT3-siRNA
2	53(3'-AT3-siRNA)
3	42(3'-AT3-siRNA)
4	264(3'-AT3-siRNA)
5	261(3'-AT3-siRNA)
6	285(3'-AT3-siRNA)
7	251(3'-AT3-siRNA)
8	252(3'-AT3-siRNA)
9	275(3'-AT3-siRNA)
10	276(3'-AT3-siRNA)
11	277(3'-AT3-siRNA)
12	278(3'-AT3-siRNA)
13	279(3'-AT3-siRNA)
14	280(3'-AT3-siRNA)
15	281(3'-AT3-siRNA)
16	282(3'-AT3-siRNA)
17	283(3'-AT3-siRNA)
18	284(3'-AT3-siRNA)
19	262(3'-AT3-siRNA)
20	263(3'-AT3-siRNA)
21	255(3'-AT3-siRNA)
22	253(3'-AT3-siRNA)
23	254(3'-AT3-siRNA)
24	257(3'-AT3-siRNA)
25	256(3'-AT3-siRNA)
26	258(3'-AT3-siRNA)
27	266(3'-AT3-siRNA)
28	265(3'-AT3-siRNA)
29	267(3'-AT3-siRNA)
30	268(3'-AT3-siRNA)
31	269(3'-AT3-siRNA)
32	270(3'-AT3-siRNA)
33	271(3'-AT3-siRNA)
34	272(3'-AT3-siRNA)
35	273(3'-AT3-siRNA)
36	274(3'-AT3-siRNA)
37	286(3'-AT3-siRNA)
38	287(3'-AT3-siRNA)

[0500] 第60表

[表60]

AT3 mRNA量[抑制率%]			
	用量[nmol/L]		
被検物番号	30	10	3
1	16.24	-7.51	19.07
2	-1.77	-0.39	11.50
3	78.72	64.66	35.07
4	79.29	65.43	36.90
5	73.61	62.53	40.42

[0501] 第61表

[表61]

AT3 mRNA量[抑制率%]			
	用量[nmol/L]		
被検物番号	30	10	3
1	18.78	12.29	3.78
6	89.90	79.76	56.89
7	83.00	76.72	56.30
8	81.80	76.27	55.76

[0502] 第62表

[表62]

AT3 mRNA量[抑制率%]			
	用量[nmol/L]		
被検物番号	30	10	3
1	-4.22	-9.92	-6.34
9	96.88	91.91	73.54
10	96.70	93.00	80.95
11	97.58	95.21	86.62
12	97.13	94.73	82.98
13	97.97	94.97	83.79
14	97.41	93.87	82.14
15	97.38	93.23	79.17

[0503] 第63表

[表63]

AT3 mRNA量[抑制率%]			
	用量[nmol/L]		
被検物番号	30	10	3
1	-4.23	6.14	9.84
16	98.66	97.09	90.01
17	97.26	96.22	83.87
18	97.90	95.52	84.55

[0504] 第64表

[表64]

AT3 mRNA量[抑制率%]			
	用量[nmol/L]		
被検物番号	30	10	3
1	23.69	20.34	14.53
19	86.37	79.19	62.23
20	87.08	74.57	50.87
21	89.22	81.76	56.49
22	92.86	84.12	51.84
23	84.52	76.64	48.04

[0505] 第65表

[表65]

AT3 mRNA量[抑制率%]			
	用量[nmol/L]		
被検物番号	30	10	3
1	-0.23	8.53	2.86
24	96.58	92.42	78.16
25	94.48	89.26	72.88
26	94.47	92.33	71.75
27	96.76	93.45	76.89
28	95.70	92.72	68.85
29	96.84	93.35	78.31
30	94.26	89.68	71.60
31	95.63	91.91	71.05
32	95.65	91.54	72.53
33	94.91	91.84	79.27

[0506] 第66表

[表66]

AT3 mRNA量[抑制率%]			
	用量[nmol/L]		
被検物番号	30	10	3
1	-3.22	10.06	-12.88
34	97.67	96.70	88.26
35	97.18	96.13	89.84
36	96.80	95.47	87.56
37	98.10	96.09	88.26
38	97.55	96.19	88.25

[0507] 第60～第66表から明らかなように、本発明の核酸複合体（被検物番号3～38）は、マウス初代肝細胞に導入後のAT3遺伝子のmRNAの発現を抑制した。

[0508] 試験例6 核酸複合体のマウスにおけるin vivo活性

実施例および比較例で得られた各核酸複合体のうち、第59表について、それぞれ以下の方法によりin vivo評価試験を実施した。なお、各核酸複合体は、試験に合わせてリン酸緩衝化生理食塩水(DPBS)(ナカライテスク社製)で希釈して用いた。マウス(BALB/cA、日本クレアより入手)を馴化飼育後、各核酸複合体を1.5 mg/kgまたは0.5 mg/kgずつマウスに皮下注投与した。また、コントロール群としてはPBSのみをマウスに皮下注投与した。投与から3日後にイソフルラン麻酔下で後大静脈後部静脈より採血した。採血した血液を3.2 Mクエン酸ナトリウムおよび5 mmol/L D-グルコースを含む抗凝固液と体積比9:1で混合し、遠心後の上清を回収することで血漿を得た。動物は採血後に安楽死させ、肝臓を採取し液体窒素で凍結保存した。肝臓凍結サンプルをトリゾール(登録商標)アールエヌエーアイソレーションリージェンツ（ライフテクノロジーズ社(Life Technologies)社製、カタログ番号15596026)およびアールエヌエーイージーミニキット(キアゲン(QIAGEN)社製、カタログ番号74106)を用い、製品に添付された説明書に記載された方法に従い、全RNAの回収を行った。さらにトランスクリプターファーストストランドシーディーエヌエーシンセシスキット（ロシュ社(Roche社)製、カタログ番号04897030001)を用いて、製品に添付された説明書に記載された方法に従い、得られた全RNAを鋳型とする逆転写反応によるcDNAの作製を行った。得られたcDNAを鋳型とし、タ

ックマン(登録商標)ジーンエクスプレッションアッセイズプローブ(アプライドバイオシステムズ社製)をプローブとして、クオントスタジオ12ケーフレックスリアルタイムピーシーアールシステム(ABI社製)を用い、添付された使用説明書に記載された方法に従ってPCR反応させることにより、AT3遺伝子およびgapdh遺伝子をPCR反応させてmRNA増幅量をそれぞれ測定し、AT3のmRNA増幅量を内部対照として、AT3のmRNAの準定量値を算出した。同様に測定したコントロール群におけるAT3のmRNAの準定量値を1として、AT3のmRNAの準定量値から、AT3のmRNAの発現率を求めた。また、血漿中のAT3タンパク質濃度を、アンチトロンビンスリーマウスエライザキット(アブカム社製、カタログ番号ab108800)を用い添付された使用説明書に記載された方法に従って測定した。得られたAT3のmRNAの発現抑制率および血漿中AT3タンパク質濃度を表67-69に示す。

[0509] 第67表

[表67]

	肝臓中AT3 mRNA量[抑制率%]		血漿中AT3タンパク質濃度[μg/mL]	
	用量[mg/kg]		用量[mg/kg]	
被検物番号	1.5	0.5	1.5	0.5
コントロール	-		323.05	
2	-13.30	-15.10	303.47	375.88
3	42.85	14.50	212.26	258.78
4	26.74	19.04	243.16	336.67
5	10.76	1.56	281.52	377.74
6	69.39	33.88	160.10	278.20
7	46.36	23.11	189.61	306.61
8	44.26	27.25	205.49	232.32

[0510] 第68表

[表68]

	肝臓中AT3 mRNA量 [抑制率%]		血漿中AT3タンパク質濃度 [μg/mL]	
	用量[mg/kg]		用量[mg/kg]	
被検物番号	1.5	0.5	1.5	0.5
コントロール	-		406.25	
9	52.36	33.71	207.82	271.94
10	46.36	19.93	189.70	283.51
11	61.22	30.09	161.69	263.98
12	66.19	35.34	153.92	256.08
13	63.52	28.98	175.91	277.52
14	66.26	30.95	147.01	248.54
15	61.97	26.39	153.46	258.51
16	54.95	45.75	175.40	234.00
17	50.93	29.41	149.33	266.16
18	57.82	32.22	180.48	314.41

[0511] 第69表

[表69]

	肝臓中AT3 mRNA量 [抑制率%]		血漿中AT3タンパク質濃度 [μg/mL]	
	用量[mg/kg]		用量[mg/kg]	
被検物番号	1.5	0.5	1.5	0.5
コントロール	-		430.38	
19	50.65	26.74	235.75	294.03
20	33.17	16.66	228.00	334.38
21	42.26	25.95	230.60	298.86
22	44.79	12.90	233.16	297.65
24	76.00	39.22	125.91	258.13
25	65.05	39.20	154.28	242.88
27	77.76	37.94	143.83	255.37
28	46.70	21.10	233.87	312.41
29	73.38	30.03	161.78	237.47
30	68.94	25.92	169.58	222.12
31	55.87	17.95	172.05	273.52
32	55.38	7.30	200.17	286.96
33	53.60	-8.73	207.01	290.95

[0512] 表67～69から明らかなように、本発明の核酸複合体(被検物番号3～22、24、25、27～33)は、生体内において、AT3遺伝子の発現を低下させ、血中のAT3

タンパク質濃度を減少させた。

[0513] 試験例7　核酸複合体のヒト初代肝細胞に対するin vitro活性

実施例15で得られたB2M-siRNA(被検物39)、260_3’-B2M-siRNA(被検物40)について、それぞれ以下の方法により、ヒト初代肝細胞（Biopredic international社製、カタログ番号HEP187)に導入した。

最終濃度が300, 100, 30, 10, 3, 1 nmol/Lとなるように、オプティメム（Opti-MEM、ギブコ(GIBCO)社、カタログ番号31985)で希釈した各核酸複合体を、96ウェルの培養プレートに、20 μLずつ分注した後、Plating medium(Biopredic international社製、カタログ番号LV0304-2)に1.25×10^5cells/mLとなるように懸濁させたヒト初代肝細胞を、細胞数80 μL/ウェルとなるように播種し、37℃、5%CO2条件下で6時間培養したのちに、培養上清を注意深く除去し、Incubation medium(Biopredic international社製、カタログ番号LV0304-2)を添加した。また陰性対照の群として何も処理しない細胞を播種した。

各製剤を導入した細胞を37 ℃の5% CO_2インキュベーター内で18時間培養し、氷冷したリン酸緩衝化生理食塩水で洗浄し、スーパープレップセルリシスアンドアールティーキットフォーキューピーシーアール（東洋紡社製、カタログ番号SCQ-201)を用いて、製品に添付された説明書に記載された方法に従い、全RNAの回収と、得られた全RNAを鋳型とする逆転写反応によるcDNAの作製とを行った。

得られたcDNAを鋳型とし、タックマン（登録商標)ジーンエクスプレッションアッセイズプローブ（アプライドバイオシステムズ社製)をプローブとして、クオントスタジオ12ケーフレックスリアルタイムピーシーアールシステム(ABI社製)を用い、添付された使用説明書に記載された方法に従ってPCR反応させることにより、Beta-2 microglobulin（以下B2Mと表す)遺伝子および構成的発現遺伝子であるグリセルアルデヒド3-リン酸脱水素酵素（D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase、以下gapdhと表す)遺伝子をPCR反応させてmRNA増幅量をそれぞれ測定し、gapdhのmRNA増幅量を内部対照として、B2MのmRNAの準定量値を算出した。同様に測定した陰性対照におけるB2MのmRNAの

準定量値を1として、B2MのmRNAの準定量値から、B2MのmRNAの発現率を求めた。得られたB2MのmRNAの発現率の結果を、陰性対照のB2M mRNA発現率に対する抑制率として表70に示す。

[0514] 第70表

[表70]

被検物	被検物39(B2M-siRNA)					
用量 [nmol/L]	300	100	30	10	3	1
B2M mRNA量 [抑制率%]	37.1	34.1	23.2	20.7	9.9	-6.4
被検物	被検物40(260_3'-B2M-siRNA)					
用量 [nmol/L]	300	100	30	10	3	1
B2M mRNA量 [抑制率%]	89.3	84.0	77.2	61.9	40.0	15.8

[0515] 試験例8　核酸複合体のヒト単球由来マクロファージ細胞に対するmRNAノックダウン活性の評価

10%ウシ胎児血清を含むアールピーエムアイ1640培地（RPMI1640培地，ナカライテスク社製，30264-56)(以下10%FBS RPMI1640培地と記載)及びDNase I溶液（DNase I Solution , StemCell Technology社製，07900)を用い、ヒトCD14陽性単球細胞（Untouched Frozen NPB-CD14+ Monocytes, Allcells社製，PB011F)を添付のプロトコルに従って融解した。

その後、組み換えヒト顆粒球単球コロニー刺激因子（Recombinant Human GM-CSF Protein CF, R&D System社製，215-GM-050/CF）（以下GM-CSFと記載)を最終濃度100 ng/mLとなるように添加し、10^6 cells/mLの密度でマルチプレート（SUMILON社製，MS-8196F5)に播種し、37 ℃、5%CO_2条件下で培養した。

培養開始から6日後に培養上清を除去し、GM-CSF 100 ng/mLを含む10%FBS RPMI1640培地を80uLずつ各ウェルに添加した。

被験サンプルとしては、Beta-2 Microglobulin(以下B2Mと記載)およびHPRT-1を標的とする核酸複合体296_3'-B2M-siRNA（被検物41）、またこれらの核酸複合体にそれぞれ対応するコントロールとしてB2M-siRNA(被検物42)を用いた。被験サンプルの最終濃度は1 μmol/L、0.3 μmol/L、0.1 μmol/Lの3点

を設定し、N=3で実施した。

核酸複合体溶液の希釈については以下の手順で行った。クエン酸緩衝液（20 mM Citrate(pH7), 150 mM NaCl)で調製された核酸溶液をオプティメム（Opti-MEM(R) I Reduced Serum Medium, Life technologies社製, 31985-070)を用いて希釈した。希釈した核酸溶液を20 μLずつ細胞溶液に添加し、陰性対照群には核酸非含有のクエン酸緩衝液/オプティメム混合溶液を20 μL添加し、37 ℃、5%CO_2条件下で4日間培養した。

RNAを含む細胞溶解液の調製にはスーパープレップセルライシスキット（SuperPrep■ Cell Lysis & RT Kit for qPCR, TOYOBO社製, SCQ-101)を用い、同キット付属のアールティーキット（RT Kit for qPCR)を用いてキットに添付された説明書に従って逆転写反応を行い、cDNAを作成した。

このcDNAをPCR反応の鋳型とし、QuantStudio 12K Flex リアルタイムPCRシステム（アプライドバイオシステムズ社製)を用い、タックマンプローブ（Taqman probe)法により下記の通り実施した。B2M遺伝子のノックダウン効果を定量する場合、B2M及び対照としてHPRT-1の遺伝子をPCR反応させてmRNA増幅量をそれぞれ測定し、HPRT-1のmRNA増幅量を内部対照として、B2MのmRNAの準定量値を算出した。

B2M遺伝子の測定にはタックマンプローブHs00187842_m1（アプライドバイオシステムズ社製)を用い、反応試薬にはTaqMan Gene Expression Master Mix（アプライドバイオシステムズ社製, 4369542)を用いて添付のプロトコルに従って実施した。核酸の標的mRNA量は、陰性対照群（核酸未導入群）におけるB2MのmRNA量を1としたときの相対的な割合として算出した。そのmRNA量の相対的な割合を平均±標準偏差で表した結果を表71に示す。

[0516] 第71表

[表71]

被検物	被検物42(B2M-siRNA)			被検物41(296_3'-B2M-siRNA)		
用量 [μmol/L]	1	0.3	0.1	1	0.3	0.1
B2M mRNA量 [抑制率%]	-1.5	-16.5	-0.08	40.9	34.7	29.0

[0517] これらの結果より、本発明の核酸複合体（被検物41）がコントロールであるB2M-siRNA（被検物42）と比較して、ヒト単球由来マクロファージにおいて有意なノックダウン効果を示す事を確認した。

産業上の利用可能性

[0518] 本発明の核酸複合体は、哺乳動物に投与して、生体内において、各種関連疾患を治療するために用いることができる。

配列表フリーテキスト

[0519] 配列番号１は、ApoBASOの塩基配列を示す。

配列番号２は、AT3-ssRNAの塩基配列を示す。

配列番号３は、AT3-asRNAの塩基配列を示す。

配列番号４は、B2M-ssRNAの塩基配列を示す。

配列番号５は、B2M-asRNAの塩基配列を示す。

配列場号６は、CD45ASOの塩基配列を示す。

配列番号７は、3'-dT10の塩基配列を示す。

配列番号８は、Hprt1-ssRNAの塩基配列を示す。

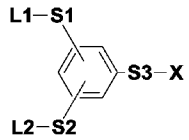
配列番号９は、Hprt1-asRNAの塩基配列を示す。

請求の範囲

[請求項1] 下記式１で表される核酸複合体。

式１：

[化1]



（式１中、

Ｘは、オリゴヌクレオチドであり、

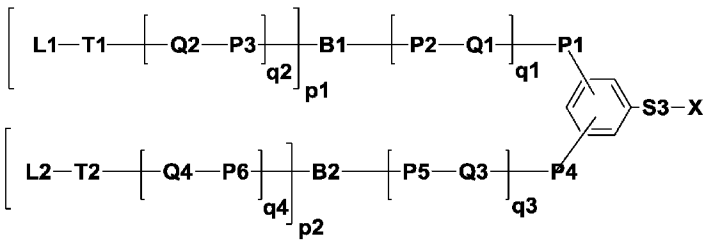
Ｌ１およびＬ２は、それぞれ独立して、糖リガンドであり、

Ｓ１、Ｓ２およびＳ３は、それぞれ独立して、リンカーである。）

[請求項2] 下記式２で表される構造を有する、請求項１に記載の核酸複合体。

式２：

[化2]



（式２中、

Ｘ、Ｌ１、Ｌ２およびＳ３は、それぞれ前記と同義であり、

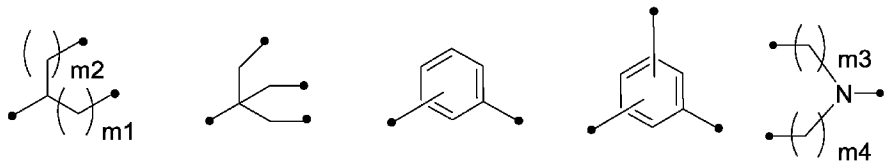
Ｐ１、Ｐ２、Ｐ３、Ｐ４、Ｐ５およびＰ６、ならびにＴ１およびＴ２は、それぞれ独立して、存在しないか、または、－ＣＯ－、－ＮＨ－、－Ｏ－、－Ｓ－、－Ｏ－ＣＯ－、－Ｓ－ＣＯ－、－ＮＨ－ＣＯ－、－ＣＯ－Ｏ－、－ＣＯ－Ｓ－もしくは－ＣＯ－ＮＨ－であり、

Ｑ１、Ｑ２、Ｑ３およびＱ４は、それぞれ独立して、存在しないか、または、置換もしくは無置換の炭素数１～１２のアルキレンまたは－（CH_2CH_2O）$_n$－CH_2CH_2－であり、ｎは０～９９の整数であり、

Ｂ１およびＢ２は、それぞれ独立して、結合手であるか、または、下記式２－１で表されるいずれかの構造であり、各構造における末端の黒丸点は、それぞれ、Ｐ２またはＰ３あるいはＰ５またはＰ６との結合点であり、ｍ１、ｍ２、ｍ３およびｍ４は、それぞれ独立して、０～１０の整数であり、

式２－１：

[化3]



ｐ１およびｐ２は、それぞれ独立して、１、２または３の整数であり、

ｑ１、ｑ２、ｑ３およびｑ４は、それぞれ独立して、０～１０の整数であり、

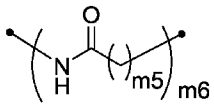
ただし、ｐ１およびｐ２がそれぞれ２または３の整数であるとき、それぞれのＰ３およびＰ６、Ｑ２およびＱ４、Ｔ１およびＴ２ならびにＬ１およびＬ２は、同一または異なっていてもよい。）

[請求項3] Ｐ１およびＰ４が、それぞれ独立して、－ＣＯ－ＮＨ－、－ＮＨ－ＣＯ－または－Ｏ－である請求項２に記載の核酸複合体。

[請求項4] －（Ｐ２－Ｑ１）$_{q1}$－および－（Ｐ５－Ｑ３）$_{q3}$－がそれぞれ独立して、存在しないか、または下記式３－１～式３－３で表されるいずれかの構造である、請求項２および３に記載の核酸複合体。

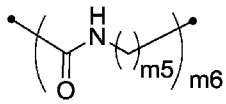
式３－１：

[化4]



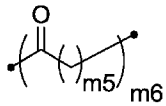
式３－２：

[化5]



式３－３：

[化6]



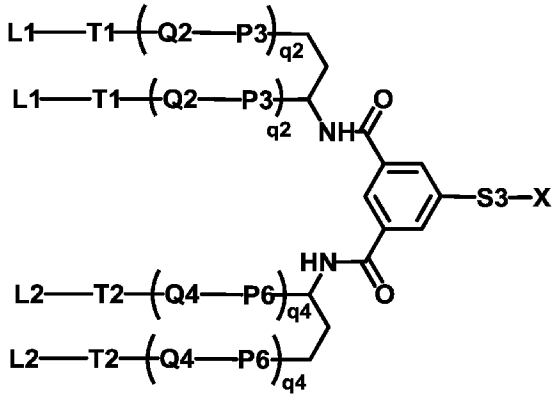
（式３－１～式３－３中、

ｍ５およびｍ６は、それぞれ独立して、０～１０の整数であり、式３－１～式３－３の構造における末端の黒丸点は、それぞれ、Ｂ１またはＢ２あるいはＰ１またはＰ４との結合点である。）

[請求項5] 下記式４－１～式４－９で表されるいずれかの構造を有する、請求項２～４のいずれか一項に記載の核酸複合体。

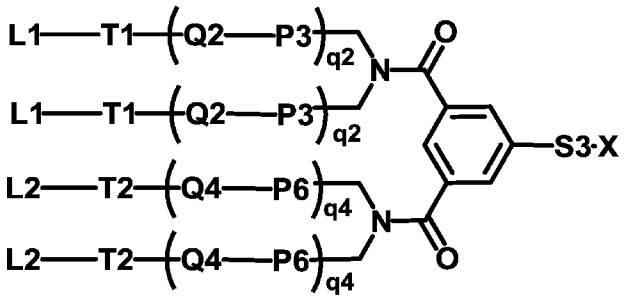
式４－１：

[化7]



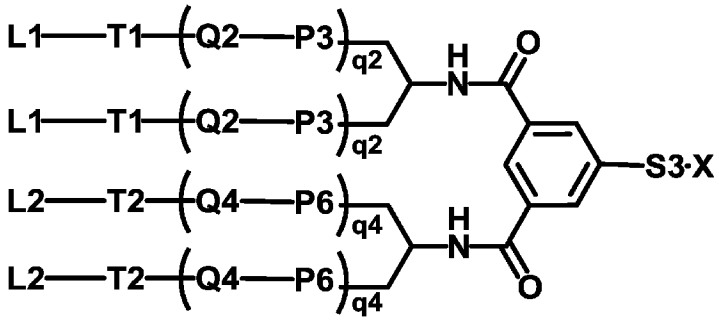
式４－２：

[化8]



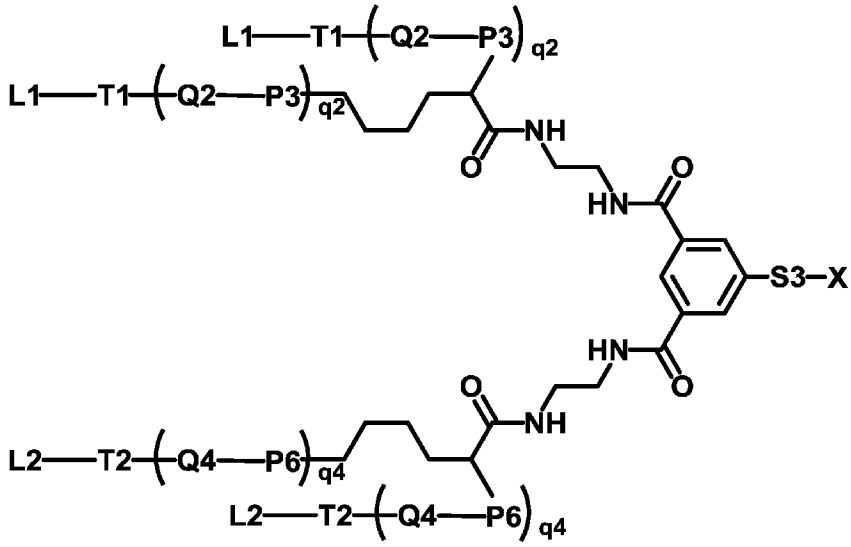
式４－３：

[化9]



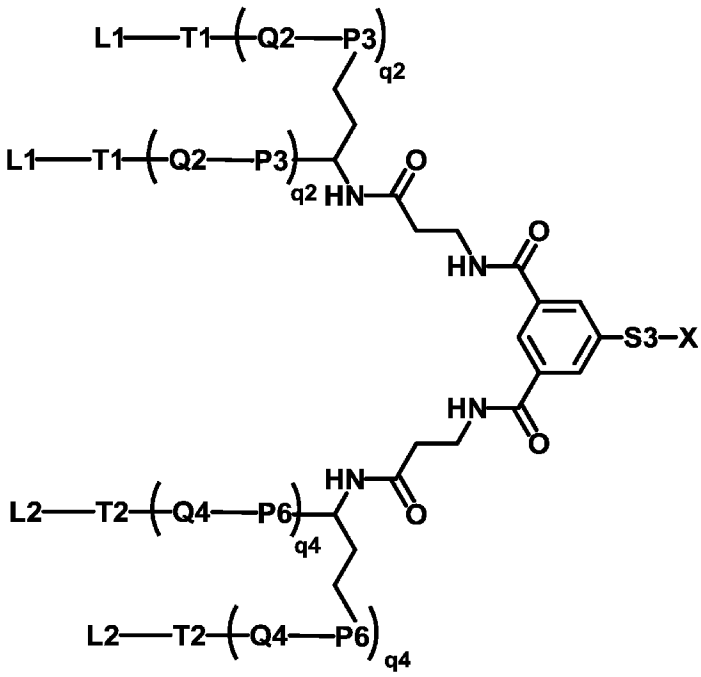
式４－４：

[化10]



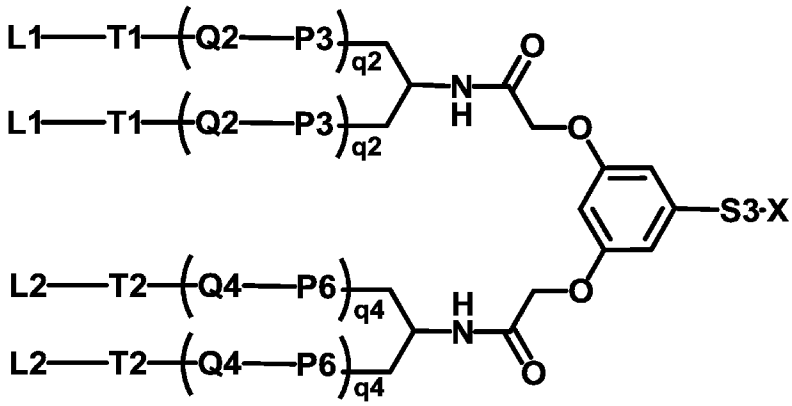
式４－５：

[化11]



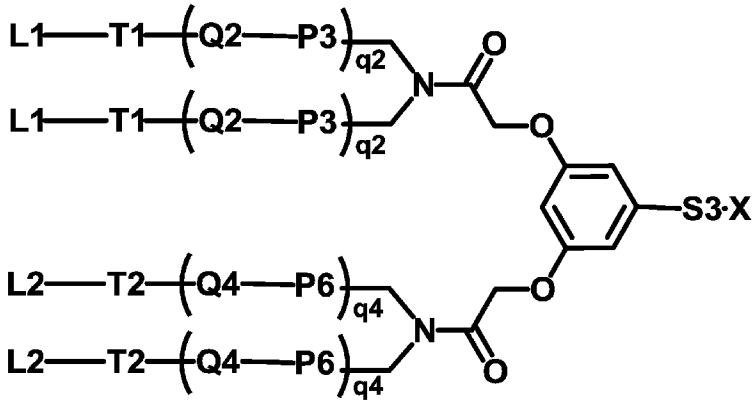
式４－６：

[化12]



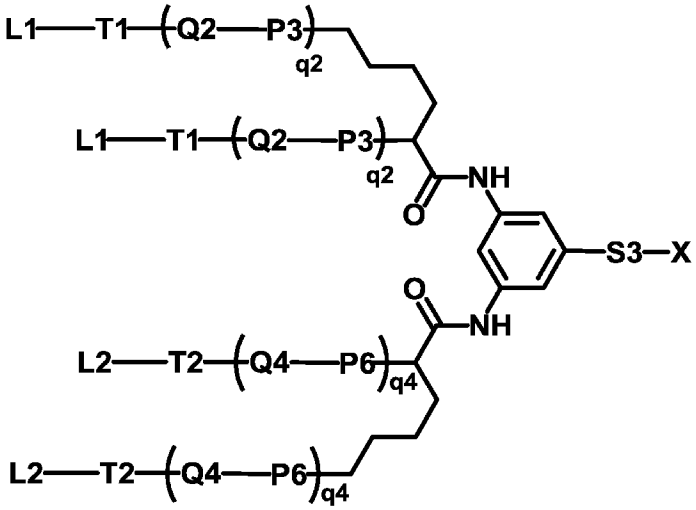
式４－７：

[化13]



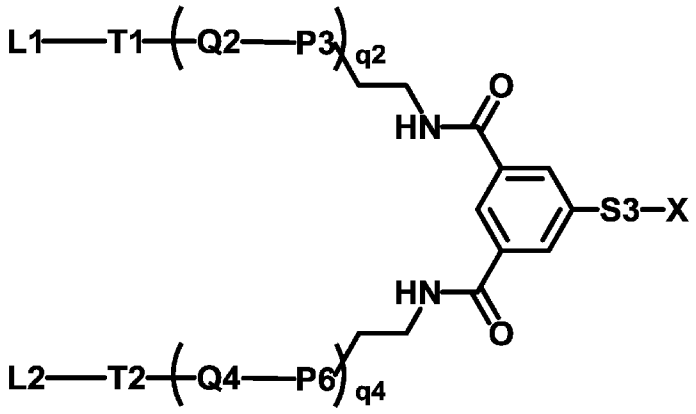
式４－８：

[化14]



式４－９：

[化15]



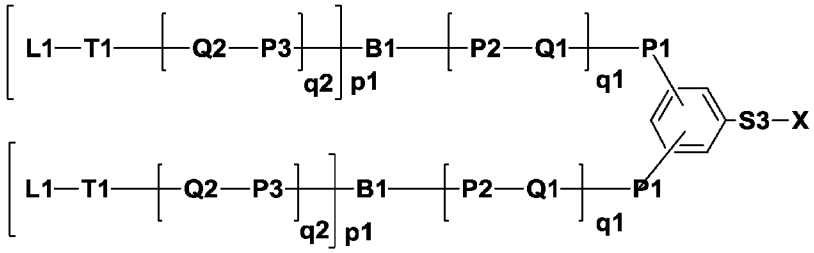
（式４－１～４－９中、

Ｘ、Ｌ１、Ｌ２、Ｓ３、Ｐ３、Ｐ６、Ｔ１、Ｔ２、Ｑ２、Ｑ４、ｑ２およびｑ４はそれぞれ前記と同義である。）

[請求項6] 下記式５で表される構造を有する、請求項１に記載の核酸複合体。

式５：

[化16]



（式５中、

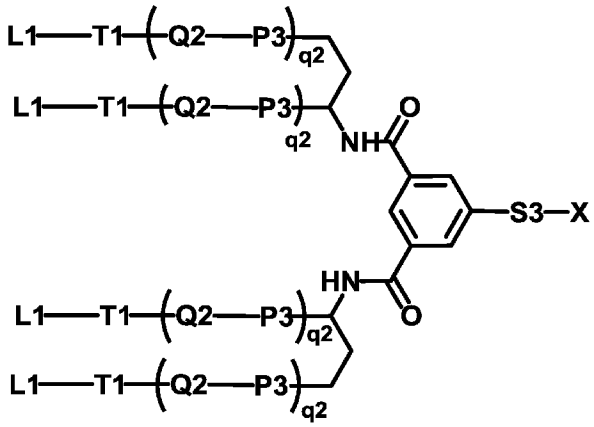
Ｘ、Ｓ３、Ｐ１、Ｐ２、Ｐ３、Ｑ１、Ｑ２、Ｂ１、Ｔ１、Ｌ１、ｐ１、ｑ１およびｑ２はそれぞれ前記と同義である。）

[請求項7] Ｐ１が－ＣＯ－ＮＨ－、－ＮＨ－ＣＯ－または－Ｏ－である請求項６に記載の核酸複合体。

[請求項8] 下記式６－１～式６－９で表されるいずれかの構造を有する、請求項６または７に記載の核酸複合体。

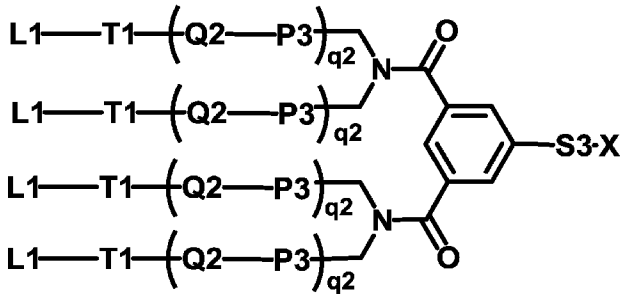
式６－１：

[化17]



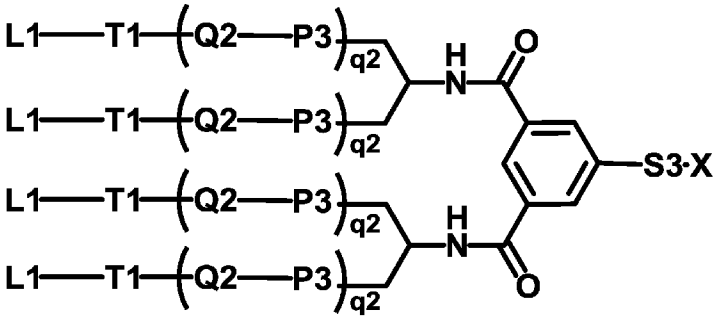
式６－２：

[化18]



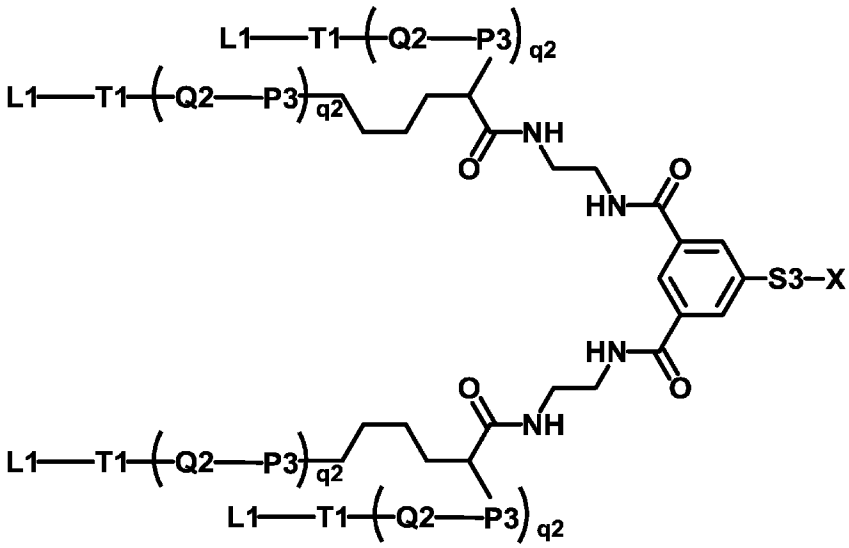
式６－３：

[化19]



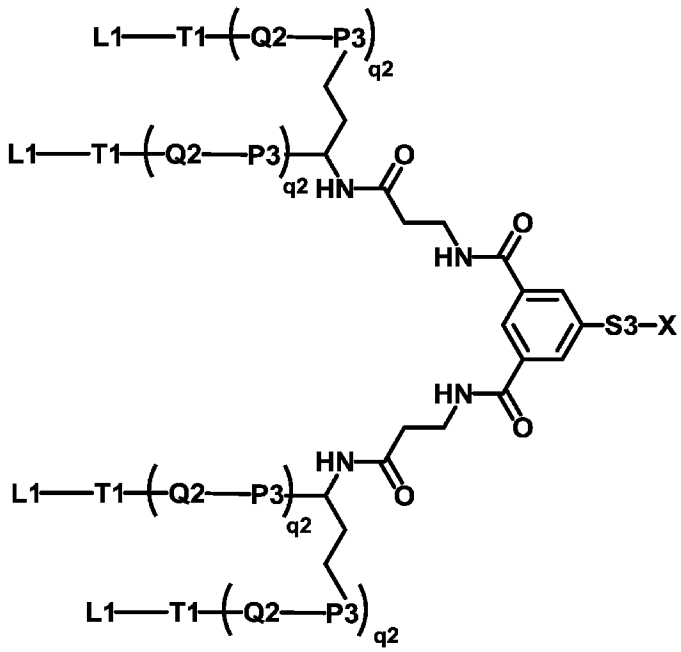
式６－４：

[化20]



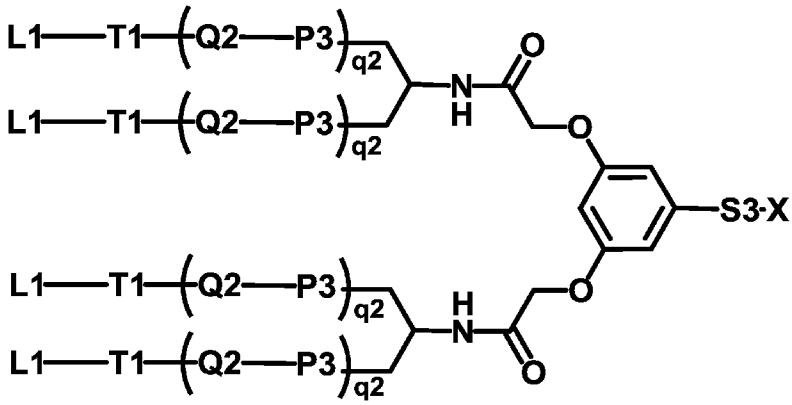
式６－５：

[化21]



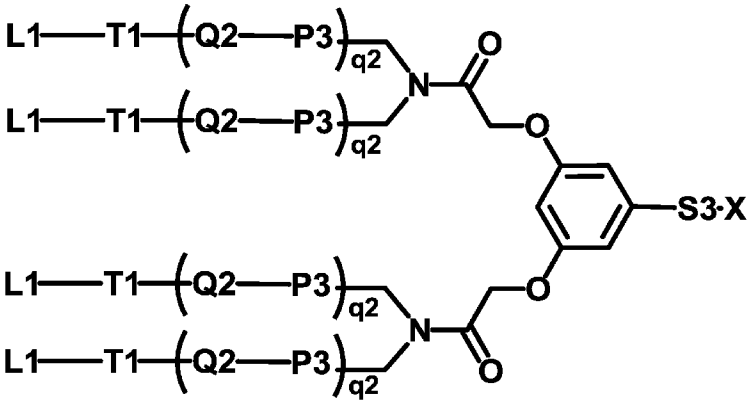
式６－６：

[化22]



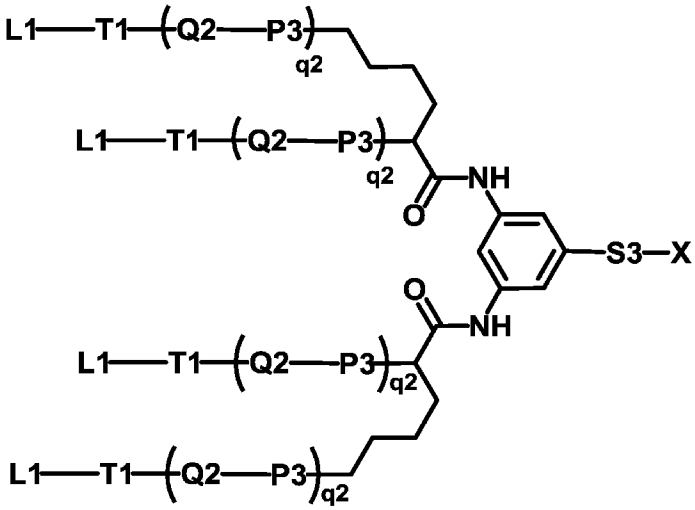
式６－７：

[化23]



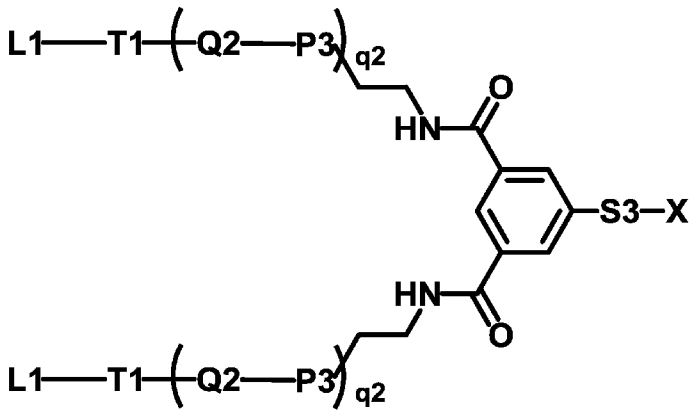
式６－８：

[化24]



式６－９：

[化25]



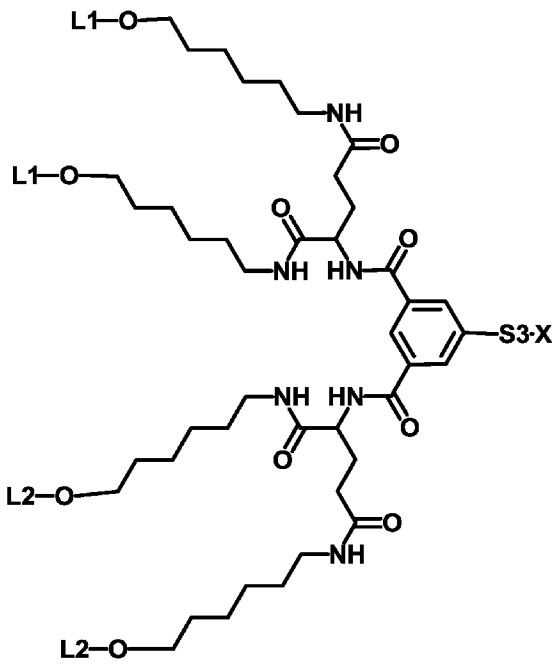
（式６－１～６－９中、

Ｘ、Ｓ３、Ｐ３、Ｑ２、Ｔ1、Ｌ１およびｑ２は、それぞれ前記と同義である。）

[請求項9] 下記式７－１～式７－９で表されるいずれかの構造を有する、請求項２～５に記載の核酸複合体

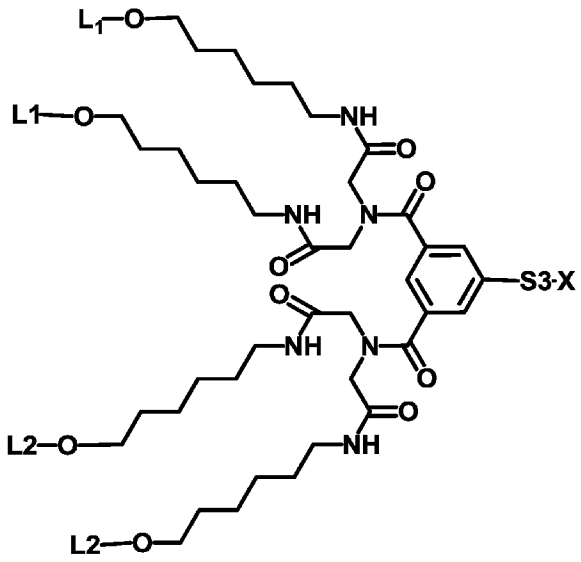
式７－１：

[化26]



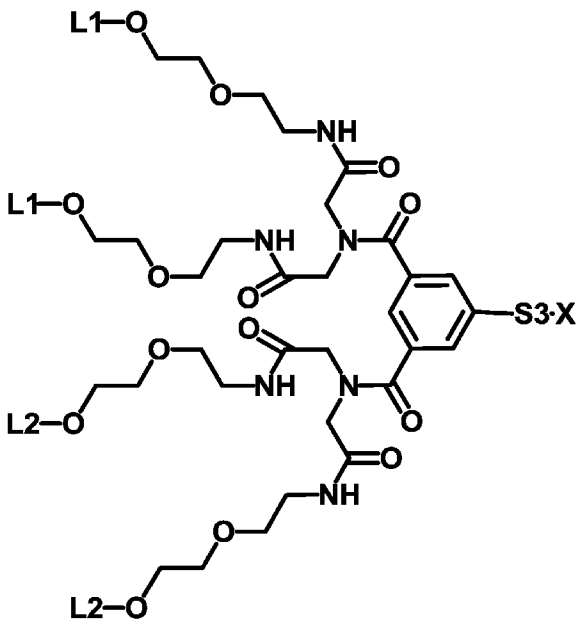
式７－２：

[化27]



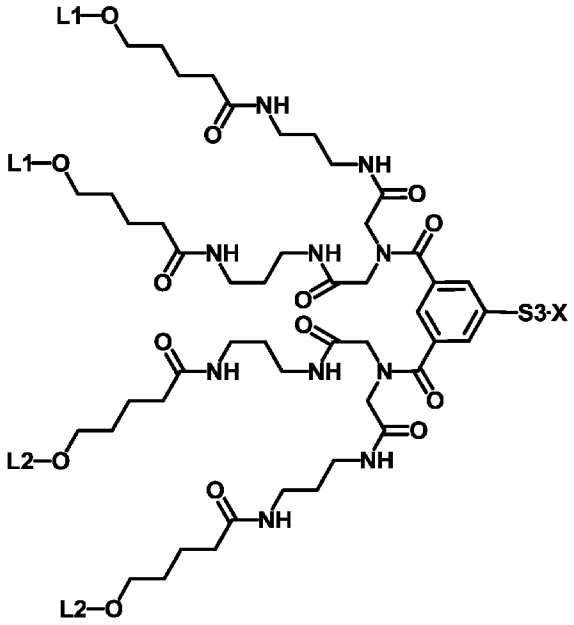
式７－３：

[化28]



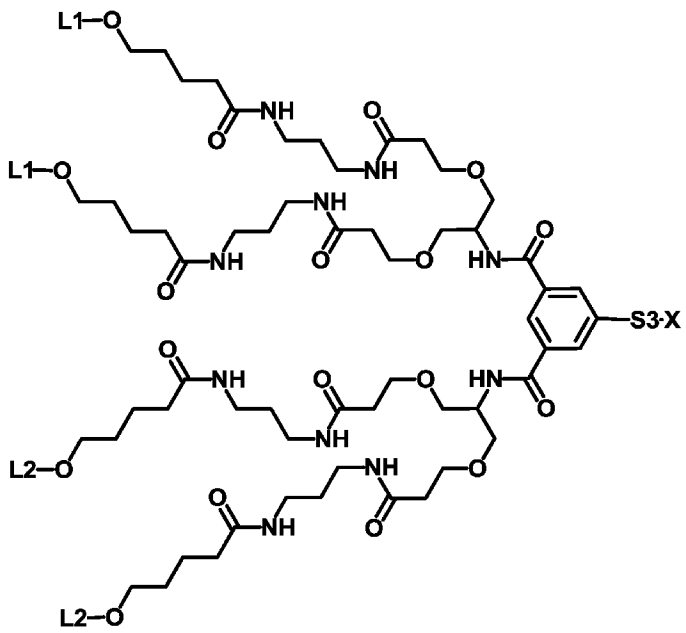
式７－４：

[化29]



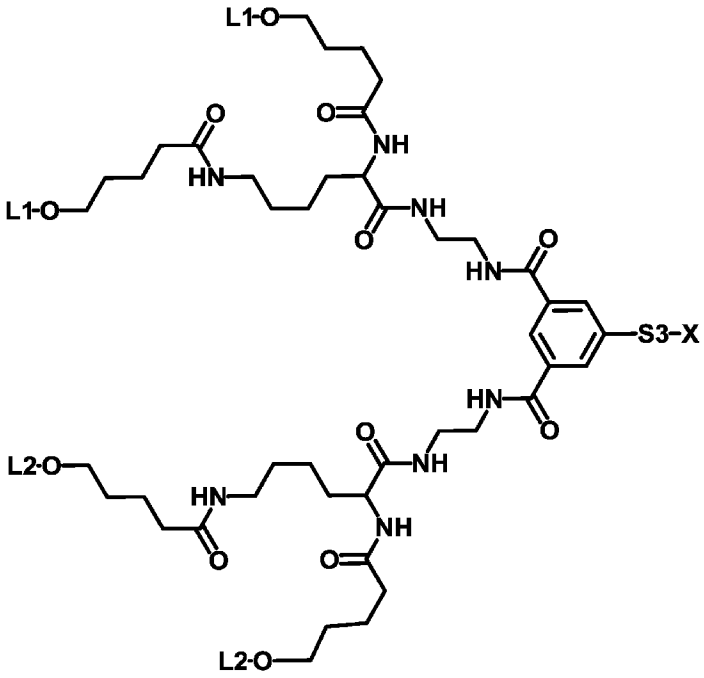
式７－５：

[化30]



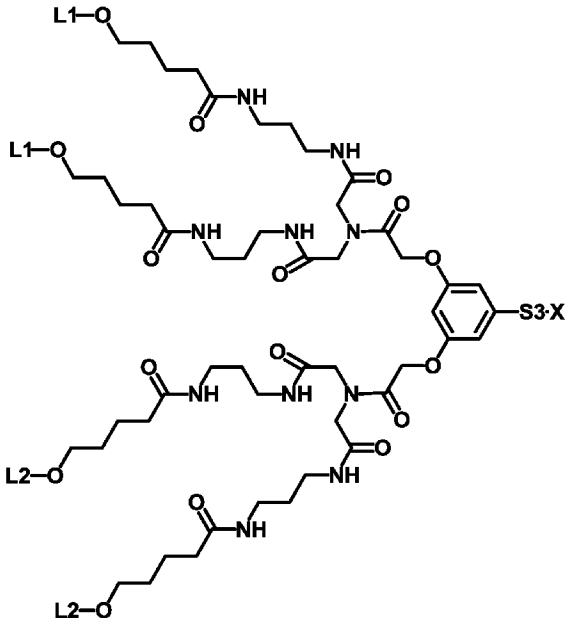
式７－６：

[化31]



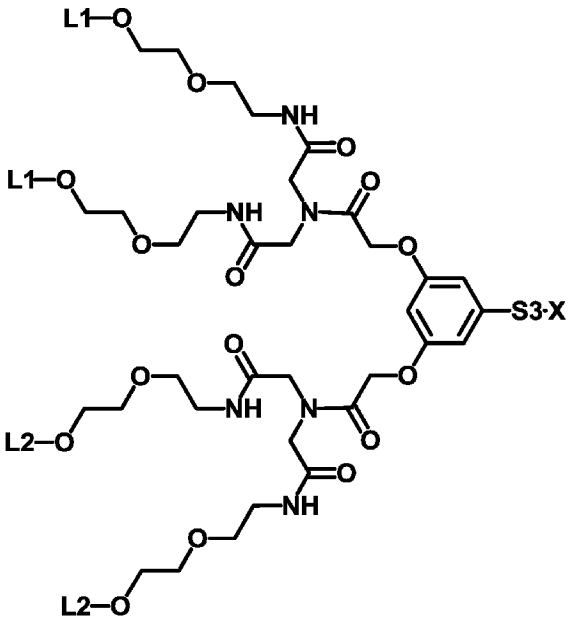
式７－７：

[化32]



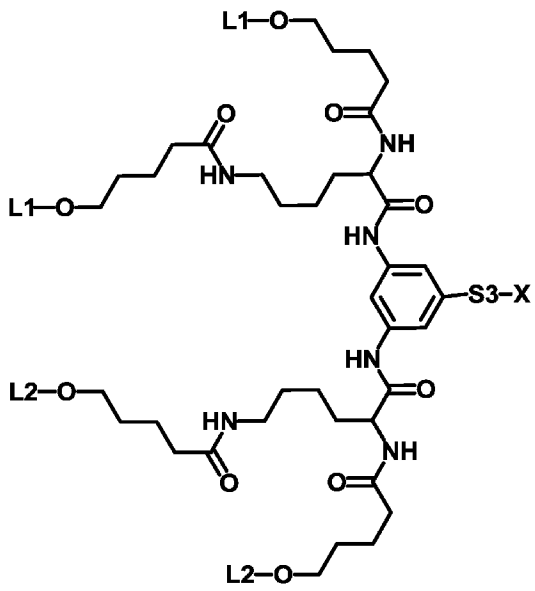
式７－８：

[化33]



式７－９：

[化34]



（式７－１～７－９中、

Ｘ、Ｓ３、Ｌ１およびＬ２は、それぞれ前記と同義である。）

[請求項10] 前記糖リガンドが、マンノースまたはＮ－アセチルガラクトサミンである、請求項１～９のいずれか１項に記載の核酸複合体。

[請求項11] 前記オリゴヌクレオチドが修飾ヌクレオチドを含む、請求項１～１０のいずれか１項に記載の核酸複合体。

[請求項12] 請求項１～１１のいずれか１項に記載の核酸複合体を含む、医薬組成物。

[請求項13] 細胞内に導入するための、請求項１２に記載の医薬組成物。

[請求項14] 前記細胞が肝細胞である、請求項１３に記載の医薬組成物。

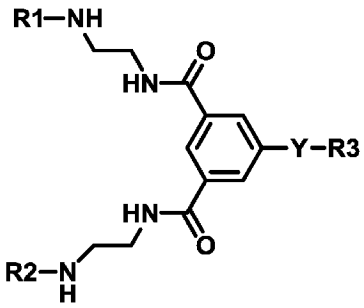
[請求項15] 静脈内投与または皮下投与される、請求項１２～１４のいずれか１項に記載の医薬組成物。

[請求項16] 請求項１～１１のいずれか１項に記載の核酸複合体または請求項１２～１５のいずれか１項に記載の医薬組成物を、それを必要とする患者に投与することを含む、疾患の治療または予防方法。

[請求項17] 下記式８で表される化合物。

式８：

[化35]



（式８中、

Ｒ１およびＲ２は、それぞれ独立して、水素原子、ｔ－ブトキシカルボニル基、ベンジルオキシカルボニル基、９－フルオレニルメチルオキシカルボニル基、－ＣＯ－Ｒ４、または－ＣＯ－Ｂ４－［（Ｐ９－Ｑ８）$_{q7}$－Ｔ３－Ｌ３］$_{p3}$であり、

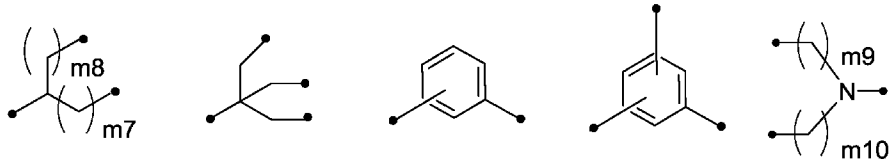
Ｐ９およびＴ３は、それぞれ独立して、存在しないか、または、－ＣＯ－、－ＮＨ－、－Ｏ－、－Ｓ－、－Ｏ－ＣＯ－、－Ｓ－ＣＯ－、－ＮＨ－ＣＯ－、－ＣＯ－Ｏ－、－ＣＯ－Ｓ－もしくは－ＣＯ－ＮＨ－であり、

Ｑ８は、存在しないか、または、置換もしくは無置換の炭素数１～１２のアルキレンまたは－（CH_2CH_2O）$_{n1}$－CH_2CH_2－であり、ｎ１は０～９９の整数であり、

Ｂ４は、それぞれ独立して、結合手であるか、または、下記式８－１で表されるいずれかの構造であり、各構造における末端の黒丸点は、それぞれ、カルボニル基またはＰ９との結合点であり、ｍ７、ｍ８、ｍ９およびｍ１０は、それぞれ独立して、０～１０の整数であり、

式８－１：

[化36]



ｐ３は、１、２または３の整数であり、

ｑ７は、０～１０の整数であり、

Ｌ３は、糖リガンドであり、

Ｙは-Ｏ－（ＣＨ$_2$）$_{m11}$－ＮＨ－および－ＮＨ－ＣＯ－（ＣＨ$_2$）$_{m12}$－ＮＨ－であり、ｍ１１およびｍ１２は、それぞれ独立して、１～１０の整数であり、

Ｒ３は、水素原子、ｔ－ブトキシカルボニル基、ベンジルオキシカルボニル基、９－フルオレニルメチルオキシカルボニル基、－ＣＯ－Ｒ４、－ＣＯ－（ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｏ）$_{n2}$－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－Ｎ$_3$、または－ＣＯ－Ｑ９－Ｂ５－（Ｑ１０－Ｐ１０）$_{q8}$－Ｘ１であり、ｎ２は０～９９の整数であり、

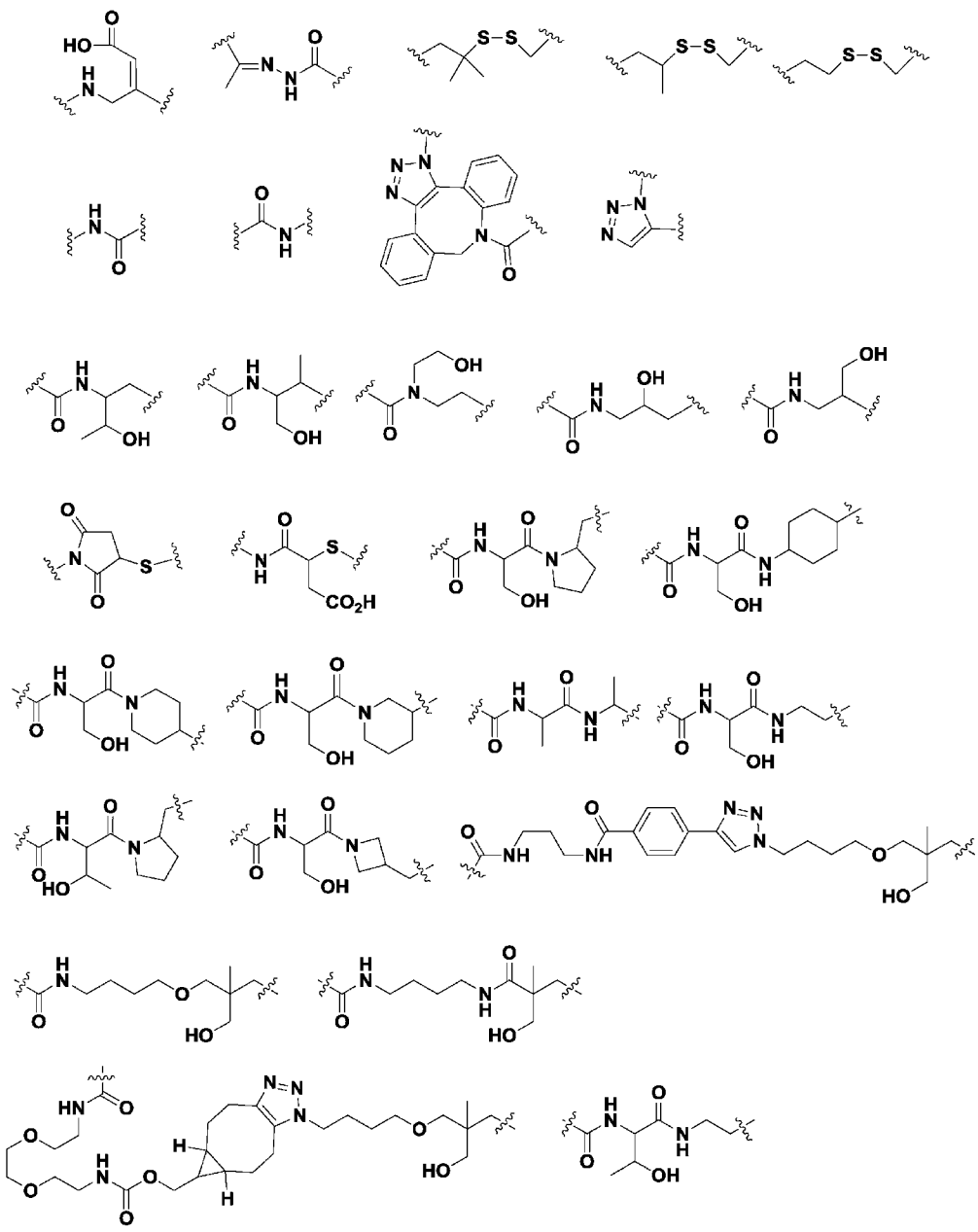
Ｐ１０は、存在しないか、または、－ＣＯ－、－ＮＨ－、－Ｏ－、－Ｓ－、－Ｏ－ＣＯ－、－Ｓ－ＣＯ－、－ＮＨ－ＣＯ－、－ＣＯ－Ｏ－、－ＣＯ－Ｓ－もしくは－ＣＯ－ＮＨ－であり、

Ｑ９およびＱ１０は、それぞれ独立して、存在しないか、または、置換もしくは無置換の炭素数１～１２のアルキレンまたは－（ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｏ）$_{n3}$－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－であり、ｎ３は０～９９の整数であり、

Ｂ５は、下記式８－２で表されるいずれかの構造であり、破線において、それぞれ、Ｑ９およびＱ１０との結合手を意味し、

式８－２：

[化37]



ｑ８は、０～１０の整数であり、

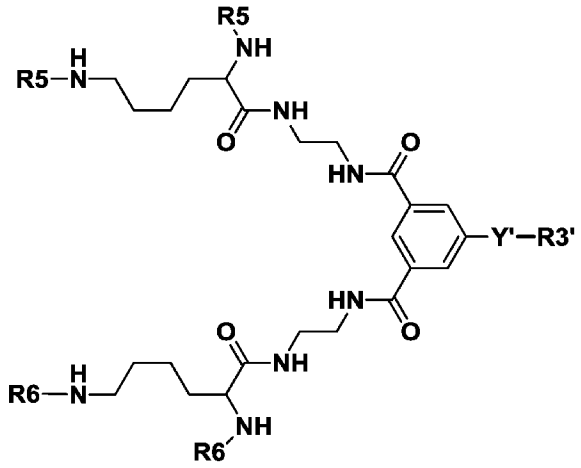
Ｘ１は、水素原子または固相担体であり、

Ｒ４は、ｔ－ブトキシカルボニル基、ベンジルオキシカルボニル基、９－フルオレニルメチルオキシカルボニル基で置換もしくは無置換のアミノ基、カルボキシ基、マレイミド基、およびアラルキルオキシカルボニル基からなる群から選択される１または２個の置換基で置換された炭素数２～１０のアルキル基である。）

[請求項18] 下記式９で表される化合物。

式９：

[化38]



（式９中、

Ｒ５およびＲ６は、それぞれ独立して、水素原子、ｔ－ブトキシカルボニル基、ベンジルオキシカルボニル基、９－フルオレニルメチルオキシカルボニル基、－ＣＯ－Ｒ４’、または－ＣＯ－Ｑ１１－（Ｐ１１－Ｑ１１’）$_{q9}$－Ｔ４－Ｌ４であり、

Ｐ１１およびＴ４は、それぞれ独立して、存在しないか、または、－ＣＯ－、－ＮＨ－、－Ｏ－、－Ｓ－、－Ｏ－ＣＯ－、－Ｓ－ＣＯ－、－ＮＨ－ＣＯ－、－ＣＯ－Ｏ－、－ＣＯ－Ｓ－もしくは－ＣＯ－ＮＨ－であり、

Ｑ１１およびＱ１１’は、存在しないか、または、置換もしくは無置換の炭素数１～１２のアルキレンまたは－（ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｏ）$_{n4}$－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－であり、ｎ４は０～９９の整数であり、

ｑ９は、０～１０の整数であり、

Ｌ４は、糖リガンドであり、

Ｙ’は－Ｏ－（ＣＨ$_2$）$_{m11'}$－ＮＨ－および－ＮＨ－ＣＯ－（ＣＨ$_2$）$_{m12'}$－ＮＨ－であり、ｍ１１’およびｍ１２’は、それぞれ独立して、１～１０の整数であり、

Ｒ３’は、水素原子、ｔ－ブトキシカルボニル基、ベンジルオキシカルボニル基、９－フルオレニルメチルオキシカルボニル基、－ＣＯ－Ｒ４’、－ＣＯ－（CH_2CH_2O）$_{n2'}$－CH_2CH_2－N_3、または－ＣＯ－Ｑ９’－Ｂ５’－（Ｑ１０’－Ｐ１０’）$_{q8'}$－Ｘ１’であり、ｎ２’は０～９９の整数であり、

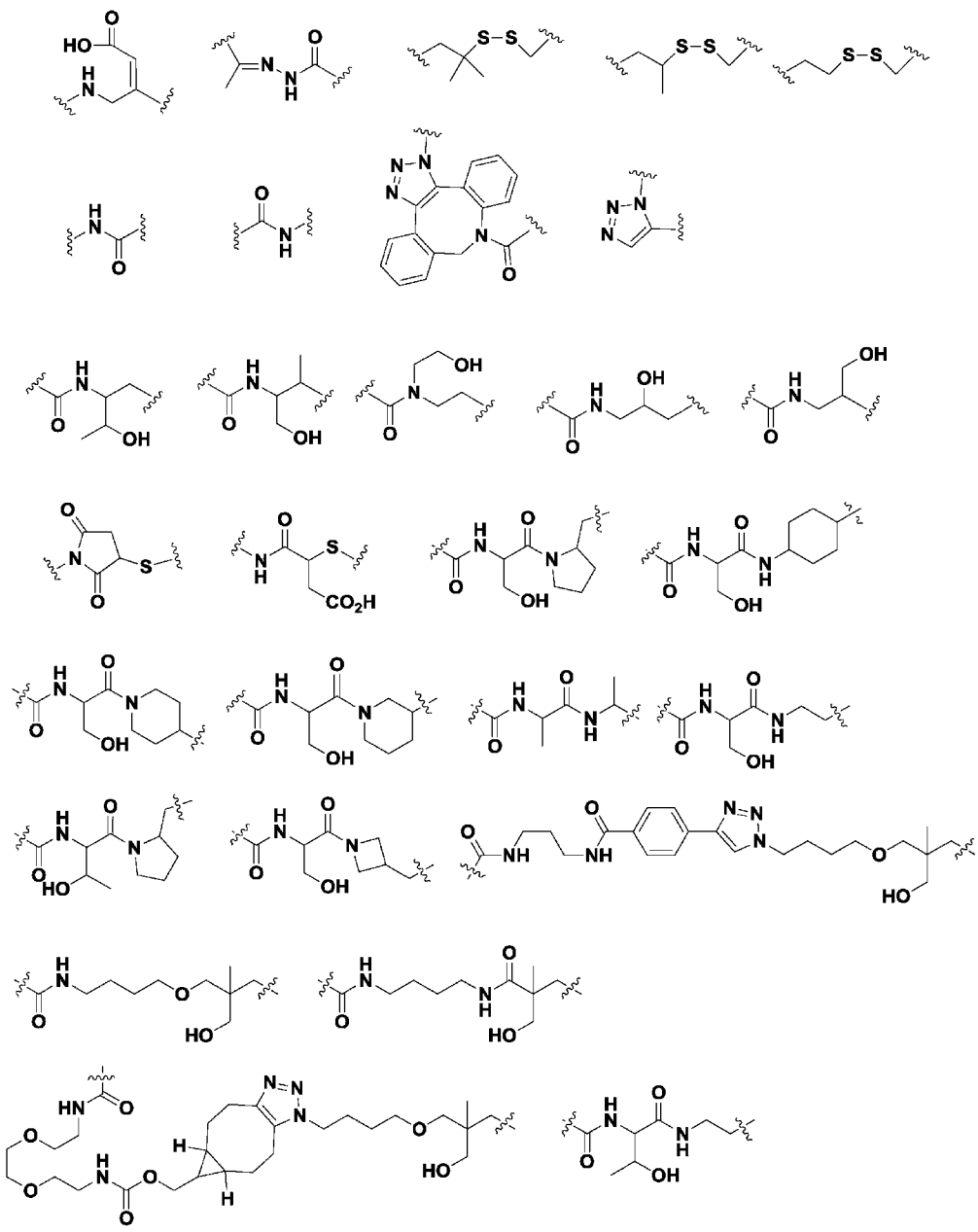
Ｐ１０’は、存在しないか、または、－ＣＯ－、－ＮＨ－、－Ｏ－、－Ｓ－、－Ｏ－ＣＯ－、－Ｓ－ＣＯ－、－ＮＨ－ＣＯ－、－ＣＯ－Ｏ－、－ＣＯ－Ｓ－もしくは－ＣＯ－ＮＨ－であり、

Ｑ９’およびＱ１０’は、それぞれ独立して、存在しないか、または、置換もしくは無置換の炭素数１～１２のアルキレンまたは－（CH_2CH_2O）$_{n3'}$－CH_2CH_2－であり、ｎ３’は０～９９の整数であり、

Ｂ５’は、下記式９－１で表されるいずれかの構造であり、破線において、それぞれ、Ｑ９’およびＱ１０’との結合手を意味し、

式９－１：

[化39]



ｑ８’は、０～１０の整数であり、

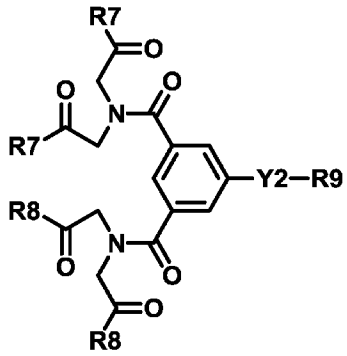
Ｘ１’は、水素原子または固相担体であり、

Ｒ４’は、ｔ－ブトキシカルボニル基、ベンジルオキシカルボニル基、９－フルオレニルメチルオキシカルボニル基で置換もしくは無置換のアミノ基、カルボキシ基、マレイミド基、およびアラルキルオキシカルボニル基からなる群から選択される１または２個の置換基で置換された炭素数２～１０のアルキル基である。）

[請求項19] 下記式１０で表される化合物。

式１０：

[化40]



（式１０中、

Ｒ７およびＲ８は、それぞれ独立して、ヒドロキシ基、ｔ－ブトキシ基、ベンジルオキシ基、－ＮＨ－Ｒ１０、または－ＮＨ－Ｑ１２－（Ｐ１２－Ｑ１２’）$_{q10}$－Ｔ５－Ｌ５であり、

Ｐ１２およびＴ５は、それぞれ独立して、存在しないか、または、－ＣＯ－、－ＮＨ－、－Ｏ－、－Ｓ－、－Ｏ－ＣＯ－、－Ｓ－ＣＯ－、－ＮＨ－ＣＯ－、－ＣＯ－Ｏ－、－ＣＯ－Ｓ－もしくは－ＣＯ－ＮＨ－であり、

Ｑ１２およびＱ１２’は、存在しないか、または、置換もしくは無置換の炭素数１～１２のアルキレンまたは－（ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｏ）$_{n5}$－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－であり、ｎ５は０～９９の整数であり、

Ｌ５は、糖リガンドであり、

Ｙ２は－Ｏ－（ＣＨ$_2$）$_{m13}$－ＮＨ－および－ＮＨ－ＣＯ－（ＣＨ$_2$）$_{m14}$－ＮＨ－であり、ｍ１３およびｍ１４は、それぞれ独立して、１～１０の整数であり、

ｑ１０は、０～１０の整数であり、

Ｒ９は、水素原子、ｔ－ブトキシカルボニル基、ベンジルオキシカルボニル基、９－フルオレニルメチルオキシカルボニル基、－ＣＯ－Ｒ１０、－ＣＯ－（ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｏ）$_{n6}$－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－Ｎ$_3$、または－

ＣＯ－Ｑ１３－Ｂ６－（Ｑ１４－Ｐ１３）$_{q11}$－Ｘ２であり、ｎ６は０～９９の整数であり、

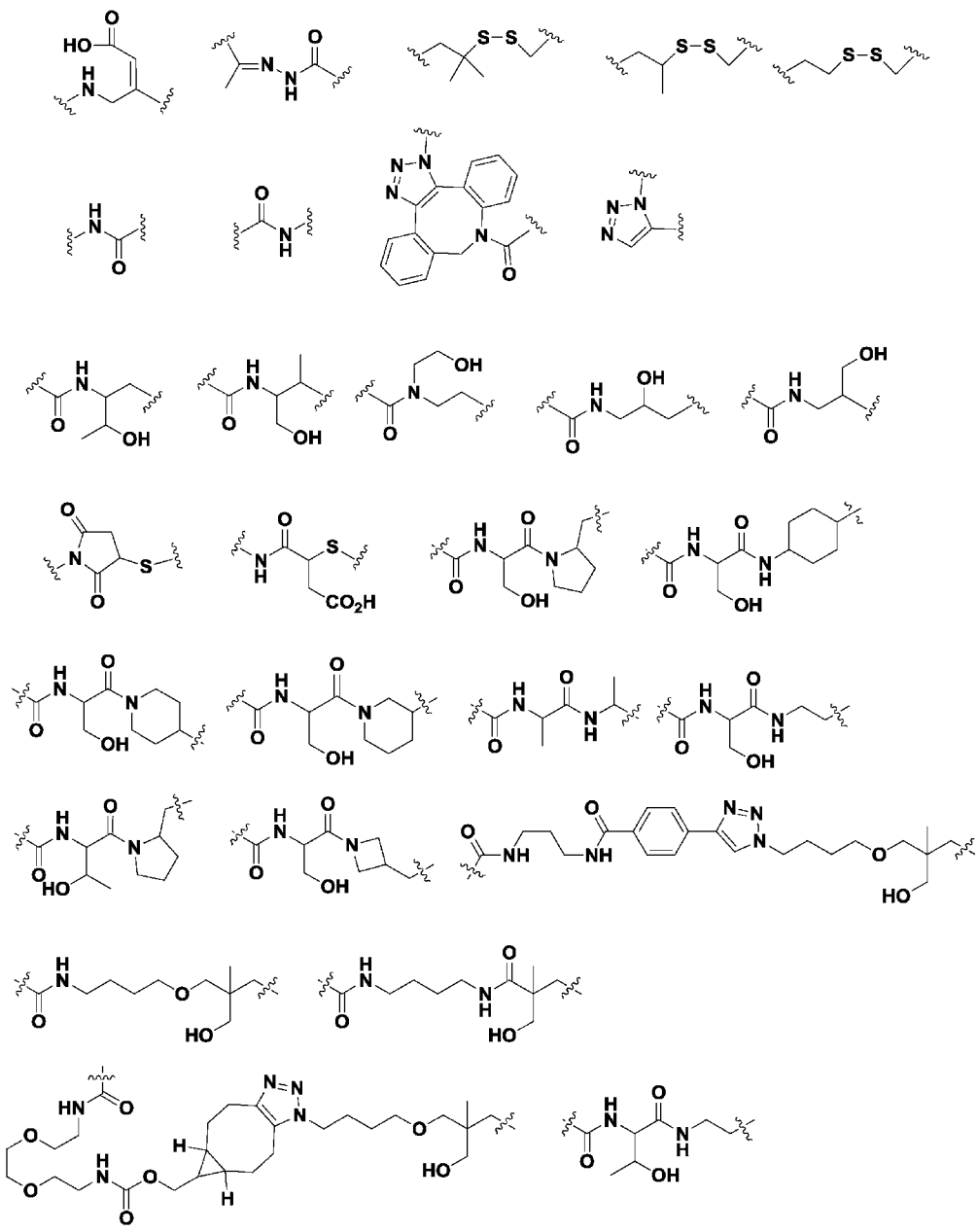
Ｐ１３は、存在しないか、または、－ＣＯ－、－ＮＨ－、－Ｏ－、－Ｓ－、－Ｏ－ＣＯ－、－Ｓ－ＣＯ－、－ＮＨ－ＣＯ－、－ＣＯ－Ｏ－、－ＣＯ－Ｓ－もしくは－ＣＯ－ＮＨ－であり、

Ｑ１３およびＱ１４は、それぞれ独立して、存在しないか、または、置換もしくは無置換の炭素数１～１２のアルキレンまたは－（ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｏ）$_{n7}$－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－であり、ｎ７は０～９９の整数であり、

Ｂ６は、下記式１０－１で表されるいずれかの構造であり、破線において、それぞれ、Ｑ１３およびＱ１４との結合手を意味し、

式１０－１：

[化41]



ｑ１１は、０～１０の整数であり、

Ｘ２は、水素原子または固相担体であり、

Ｒ１０は、ｔ－ブトキシカルボニル基、ベンジルオキシカルボニル基、９－フルオレニルメチルオキシカルボニル基で置換もしくは無置換のアミノ基、カルボキシ基、マレイミド基、およびアラルキルオキシカルボニル基からなる群から選択される１または２個の置換基で置換された炭素数２～１０のアルキル基である。）

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2017/003249

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N15/113(2010.01)i, *A61K31/7088*(2006.01)i, *A61K31/713*(2006.01)i, *A61P43/00*(2006.01)i, *C07C237/10*(2006.01)i, *C07C247/04*(2006.01)i, *C07C271/16*(2006.01)i, *C07H15/04*(2006.01)i
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)
C12N15/113, A61K31/7088, A61K31/713, A61P43/00, C07C237/10, C07C247/04, C07C271/16, C07H15/04

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2017
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2017 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2017

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII),
CAplus/REGISTRY/WPIDS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WO 2014/179629 A2 (ISIS PHARMACEUTICALS, INC.), 06 November 2014 (06.11.2014), claims; particularly, claims 87 to 94, 128 to 129, 148 to 153 & US 2014/0343123 A1 & EP 2992097 A4 & JP 2016-523515 A	1-8,10-16 9,17-19
X A	WO 2014/179627 A2 (ISIS PHARMACEUTICALS, INC.), 06 November 2014 (06.11.2014), claims; particularly, claims 55 to 62, 96 to 97, 116 to 121 & US 2016/0076030 A1 & EP 2992098 A4 & JP 2016-522683 A	1-8,10-16 9,17-19

☒ 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	Date of mailing of the international search report
12 April 2017 (12.04.17)	25 April 2017 (25.04.17)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3,Kasumigaseki,Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915,Japan	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2017/003249

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2014-504295 A (Arrowhead Research Corp.), 20 February 2014 (20.02.2014), claims; examples 7, 20 & US 2012/0157509 A1 claims; examples 7, 20 & WO 2012/083046 A2 & EP 2652134 A2 & CA 2816155 A & CN 103492568 A & KR 10-2013-0132475 A	1-19
A	NAIR Jayaprakash K. et al, "Multivalent N-Acetylgalactosamine-Conjugated siRNA Localizes in Hepatocytes and Elicits Robust RNAi-Mediated Gene Silencing", Journal of the American Chemical Society, 2014, Vol.136, p.16958-16961	1-19
A	JP 2013-521328 A (Universidad de Castilla-La Mancha), 10 June 2013 (10.06.2013), claims; examples & US 2013/0210887 A1 claims; examples & WO 2011/107648 A1 & EP 2543659 A1	1-19

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１７／００３２４９

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N15/113(2010.01)i, A61K31/7088(2006.01)i, A61K31/713(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C07C237/10(2006.01)i, C07C247/04(2006.01)i, C07C271/16(2006.01)i, C07H15/04(2006.01)i

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））

Int.Cl.　C12N15/113, A61K31/7088, A61K31/713, A61P43/00, C07C237/10, C07C247/04, C07C271/16, C07H15/04

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	１９７１－２０１７年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１７年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１７年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAplus/REGISTRY/WPIDS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X A	WO 2014/179629 A2 (ISIS PHARMACEUTICALS, INC.) 2014.11.06, 請求の範囲，特に、請求項87～94，128～129，148～153など， & US 2014/0343123 A1 & EP 2992097 A4 & JP 2016-523515 A	1-8,10-16 9,17-19
X A	WO 2014/179627 A2 (ISIS PHARMACEUTICALS, INC.) 2014.11.06, 請求の範囲，特に、請求項55～62，96～97，116～121など， & US 2016/0076030 A1 & EP 2992098 A4 & JP 2016-522683 A	1-8,10-16 9,17-19

☑　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矛盾するものではなく、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	国際調査報告の発送日
１２．０４．２０１７	２５．０４．２０１７

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
郵便番号１００－８９１５
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｂ　９４５１
坂崎　恵美子
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８

C（続き）．　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	JP 2014-504295 A (アローヘッド　リサーチ　コーポレイション) 2014.02.20, 請求の範囲，実施例７，２０， & US 2012/0157509 A1, claims, example7,20, & WO 2012/083046 A2 & EP 2652134 A2 & CA 2816155 A & CN 103492568 A & KR 10-2013-0132475 A	1-19
A	NAIR Jayaprakash K. et al, “Multivalent N-Acetylgalactosamine-Conjugated siRNA Localizes in Hepatocytes and Elicits Robust RNAi-Mediated Gene Silencing”, Journal of the American Chemical Society, 2014, Vol.136, p.16958-16961	1-19
A	JP 2013-521328 A (ユニヴェルシダード　デ　カスティーリャ　ラ　マンチャ) 2013.06.10, 請求の範囲及び実施例, & US 2013/0210887 A1, claims, examples, & WO 2011/107648 A1 & EP 2543659 A1	1-19