

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7636333号
(P7636333)

(45)発行日 令和7年2月26日(2025.2.26)

(24)登録日 令和7年2月17日(2025.2.17)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K 47/54 (2017.01)

A 6 1 K 47/54

A 6 1 P 1/16 (2006.01)

A 6 1 P 1/16

請求項の数 6 (全107頁)

(21)出願番号	特願2021-545555(P2021-545555)	(73)特許権者	307010166
(86)(22)出願日	令和2年9月9日(2020.9.9)		第一三共株式会社
(86)国際出願番号	PCT/JP2020/034022		東京都中央区日本橋本町三丁目5番1号
(87)国際公開番号	WO2021/049504	(74)代理人	100118902
(87)国際公開日	令和3年3月18日(2021.3.18)		弁理士 山本 修
審査請求日	令和5年8月3日(2023.8.3)	(74)代理人	100106208
(31)優先権主張番号	特願2019-164564(P2019-164564)		弁理士 宮前 徹
(32)優先日	令和1年9月10日(2019.9.10)	(74)代理人	100196508
(33)優先権主張国・地域又は機関	日本国(JP)		弁理士 松尾 淳一
		(74)代理人	100188374
			弁理士 一宮 維幸
		(74)代理人	100146581
			弁理士 石橋 公樹
		(72)発明者	小泉 誠
			東京都品川区広町一丁目2番58号 第
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 肝臓送達用GalNAc-オリゴヌクレオチドコンジュゲートおよび製造方法

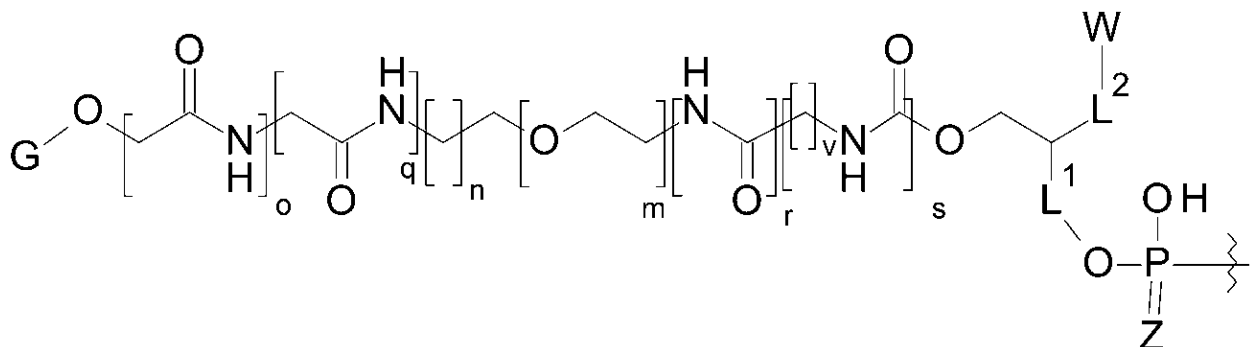
(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

肝実質細胞において薬理効果が期待される核酸配列を有するオリゴヌクレオチド(c.648G>T変異型G6PCのプレmRNAに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドを除く。)

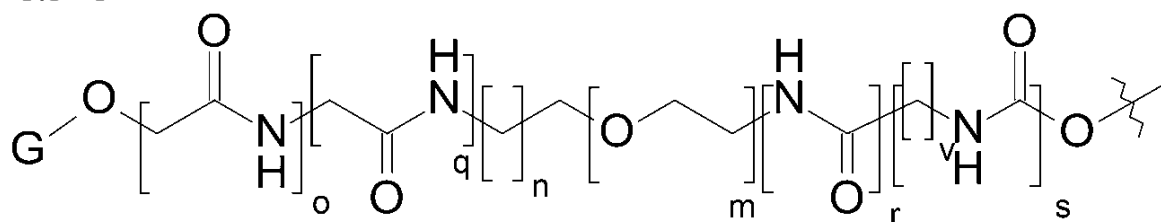
と2分岐GalNAcユニットのコンジュゲートであって、オリゴヌクレオチドの5'末端、または3'末端に下記式の2分岐GalNAcユニットが結合し、生体内で肝実質細胞に特異的に送達されることを特徴とするコンジュゲート又はその製薬上許容される塩。

【化1】



【式中、Wは、式

【化 2】



を表し、Gは5-アセトアミド-2-ヒドロキシメチル-3,4-ジヒドロキシテトラヒドロピラン-6-イル基 (GalNAc) を示し、Zは酸素原子又は硫黄原子を示し、 L^1 及び L^2 は、一方がメチレン基 (CH_2) を示し、他方が原子を挟まないを示し、o、q、r、及びsは互いに独立して0又は1を示し、nは1～15の整数を示し、mは0～5の整数を示し、vは1～7を示す。但し、nが1のときmは0～5の整数であり、nが2～15の整数のときmは0である。] で表される基である。

【請求項 2】

2分岐GalNAcユニットの式中o及びqが0である、請求項1に記載のコンジュゲート又はその製薬上許容される塩。

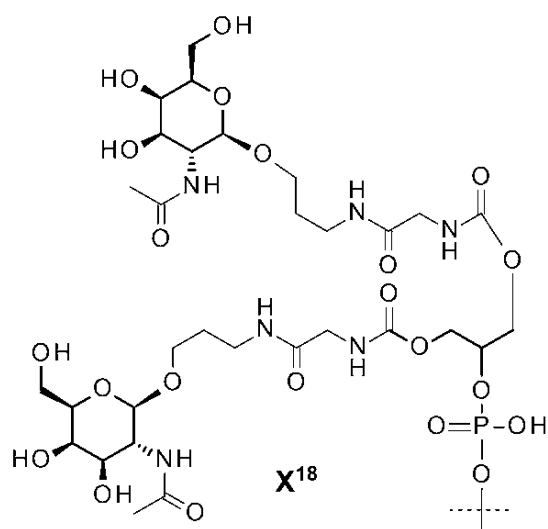
【請求項 3】

2分岐GalNAcユニットが、オリゴヌクレオチドの5'末端に結合している、請求項1または2のコンジュゲート又はその製薬上許容される塩。

【請求項 4】

2分岐GalNAcユニットが、以下のいずれかの式

【化 3】



10

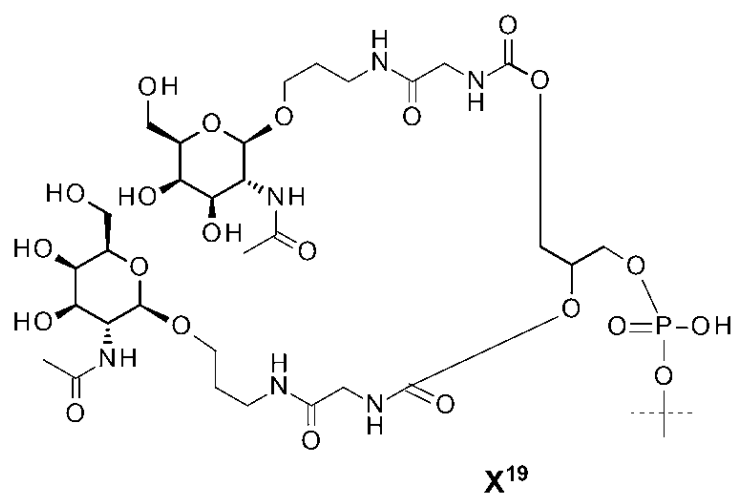
20

30

40

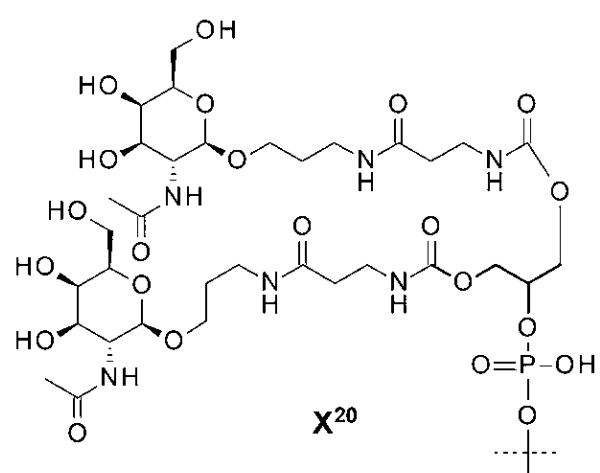
50

【化 4】



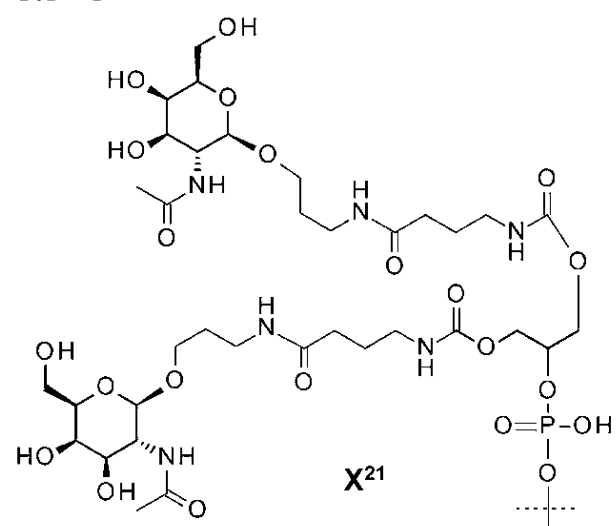
10

【化 5】



20

【化 6】

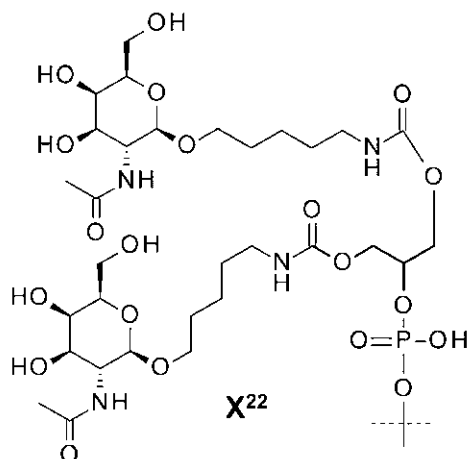


30

40

50

【化 7】



10

で表される基である、請求項 1 に記載のコンジュゲート又はその製薬上許容される塩。

【請求項 5】

オリゴヌクレオチドが、RNA 干渉オリゴヌクレオチドである、請求項 1 ～ 4 のいずれかに記載のコンジュゲート又はその製薬上許容される塩。

【請求項 6】

請求項 1 ～ 5 のいずれかのコンジュゲート又はその製薬上許容される塩を含む、医薬。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、2 分岐型 N-アセチル-D-ガラクトサミン (GalNAc) リガンド-オリゴヌクレオチドコンジュゲート、および、該当コンジュゲート体の製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

アシアロ糖タンパク質受容体 (ASGPR) に結合可能なリガンドとして N-アセチル-D-ガラクトサミン (GalNAc) 等を共有結合で結合した核酸医薬 (アンチセンスや siRNA など) とのコンジュゲート体が、肝臓の肝実質細胞にオリゴヌクレオチドを送達させる方法として報告されている (非特許文献 1 及び特許文献 1 ～ 9)。1 つのオリゴヌクレオチドに 1 乃至 3 個の GalNAc が結合している。また、GalNAc が 2 つ結合している例としては、非特許文献 2 に記載がある。

30

【0003】

オリゴヌクレオチド固相合成後の精製工程で逆相 HPLC を用いる場合、固相合成工程で生じた鎖長が短いオリゴマーの保持時間と、目的のオリゴマーの保持時間が近接する場合が多く、大スケールで高純度精製品を獲得するのは非常に困難である。オリゴヌクレオチドの固相合成では、通常ヌクレオシドの 5'-水酸基が 4,4'-ジメトキシトリチル (DMTr) 基で保護された核酸ユニットが使用されるため合成されるオリゴヌクレオチドの 5' 末端に位置するヌクレオシドの 5'-水酸基は DMTr 基を有することになる。この DMTr 基の高い疎水性を利用した逆相カラム精製 (以後、DMTr-on 逆相カラム精製とも呼ぶ。「DMTr-on」とは、DMTr 基を 5' 末端に導入したオリゴヌクレオチドを用いていることを示す)、及び、DMTr-on を利用したイオン交換カラム精製 (以後、DMTr-on イオン交換カラム精製とも呼ぶ。) の例が、非特許文献 3 及び 4 に記載されている。しかし、通常 GalNAc ユニットはオリゴヌクレオチドの 5' 末端の水酸基に、DMTr 基を脱保護して導入されるため、合成されたコンジュゲートは DMTr 基を保有しない。そのため、GalNAc ユニットがコンジュゲートしていないオリゴヌクレオチドとの分離・精製には、労力と時間が掛かる HPLC で精製せざるを得なかった (非特許文献 5)。これまで、GalNAc ユニットとオリゴヌクレオチドのコンジュゲート体に対する、DMTr-on 逆相カラム精製、または、DMTr-on イオン交換カラム精製方法を活用した例は

40

50

報告されていない。

【0004】

このように、肝実質細胞にオリゴヌクレオチドを効率的に送達でき、かつ大量製造の面から有利な構造を有するGalNAcユニット、及び、そのGalNAcユニットと疾患の治療効果のあるオリゴヌクレオチドとのコンジュゲート体の開発、及び、その効率的な製造方法が望まれている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【文献】国際公開第2009/073809

10

【文献】国際公開第2014/076196

【文献】国際公開第2014/179620

【文献】国際公開第2015/006740

【文献】国際公開第2015/105083

【文献】国際公開第2016/055601

【文献】国際公開第2017/023817

【文献】国際公開第2017/084987

【文献】国際公開第2017/131236

【非特許文献】

【0006】

20

【文献】Methods in Enzymology、1999年、313巻、297～321頁

【文献】Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 26 (2016) 3690-3693

【文献】AKTAdesign Purification - User Manual 18-1124-23 Edition AD

【文献】Organic Process Research & Development 2005, 9, 212-215

【文献】Molecules 2017, 22, 1356.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

GalNAcユニットを利用して合成核酸を肝臓へ送達する研究において従来使用されていたリンカーはリガンド部位と核酸を遠ざけることが重要視され、非常に長い骨格中に長い直鎖アルキルや環構造を有する構造が採用され、更に多くの場合3分岐以上の複雑な構造を有していた。しかし、このような従来型の長鎖アルキルリンカーを採用したコンジュゲート体を濃縮したところ、高濃度溶液ではミセルが形成され、適切な用量調製が困難であるとの課題が、発明者らの研究で新たに見出された。また、従来の方法では、GalNAcユニットが結合したオリゴヌクレオチドのカラム分離の方法が確立されておらず、大量製造が困難であった。

30

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは、上記課題を解決するために、鋭意研究を重ねた結果、本発明のリンカー構造を有する2分岐GalNAcユニットとオリゴヌクレオチドのコンジュゲート体が、肝実質細胞への効率的な送達能を保持したまま、高用量の溶液中でも良好な溶解性を示した。さらに、GalNAcの6位水酸基上に疎水性の高い保護基（例えば、4,4'-ジメトキシトリチル(DMT)基)を有するGalNAcユニットと結合したオリゴヌクレオチドが疎水性樹脂カラムにより良好な効率で精製できることを見出し、本発明を完成するに至った。これにより、該当コンジュゲート体の大量スケールでのイオン交換カラム精製、または、DMT-ron逆相カラム精製が容易になることが期待できる。

40

【0009】

本発明の要旨は以下の通りである。

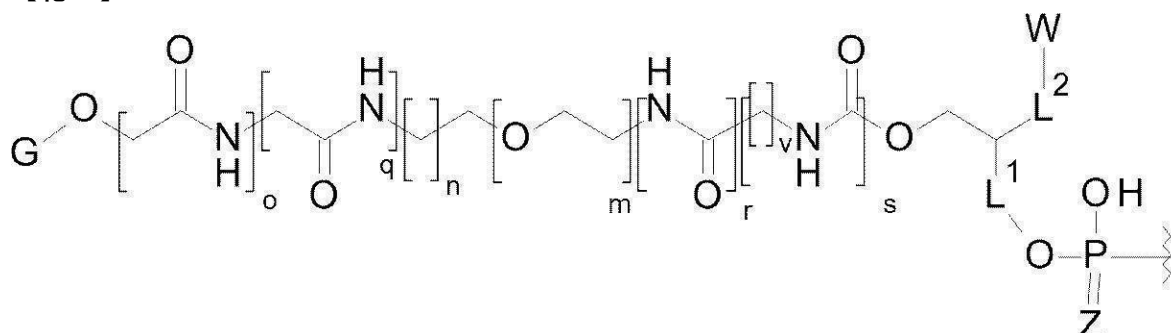
(A1) 肝実質細胞において薬理効果が期待される核酸配列を有するオリゴヌクレオチドと2分岐GalNAcユニットのコンジュゲートであって、オリゴヌクレオチドの5'末端、

50

または3'末端に下記式の2分岐GalNAcユニットが結合し、生体内で肝実質細胞に特異的に送達されることを特徴とするコンジュゲート又はその製薬上許容される塩、

【0010】

【化1】



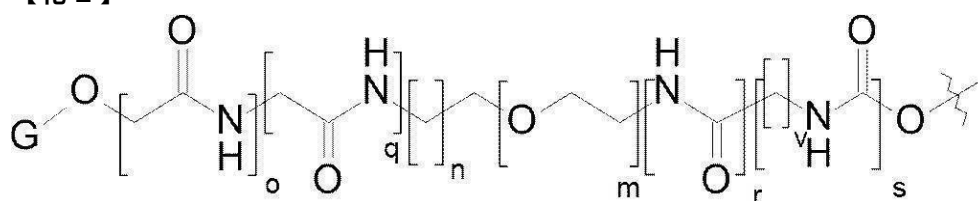
10

【0011】

【式中、Wは、式

【0012】

【化2】



20

【0013】

を表し、Gは5-アセトアミド-2-ヒドロキシメチル-3,4-ジヒドロキシテトラヒドロピラン-6-イル基 (GalNAc) を示し、Zは酸素原子又は硫黄原子を示し、 L^1 及び L^2 は、一方がメチレン基 (CH_2) を示し、他方が原子を挟まないを示し、o、q、r、及びsは互いに独立して0又は1を示し、nは1~15の整数を示し、mは0~5の整数を示し、vは1~7を示す。但し、nが1のときmは0~5の整数であり、nが2~15の整数のときmは0である。】で表される基である。

30

【0014】

(A2) 2分岐GalNAcユニットの式中o及びqが0である、(A1)に記載のコンジュゲート又はその製薬上許容される塩。

【0015】

(A3) 2分岐GalNAcユニットが、オリゴヌクレオチドの5'末端に結合している、(A1) または (A2) のコンジュゲート又はその製薬上許容される塩。

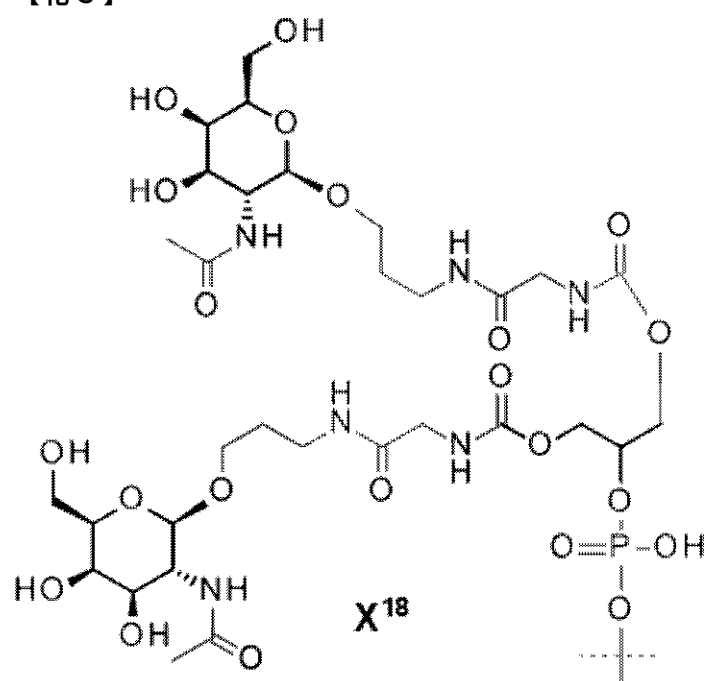
【0016】

(A4) 2分岐GalNAcユニットが、以下のいずれかの式

【0017】

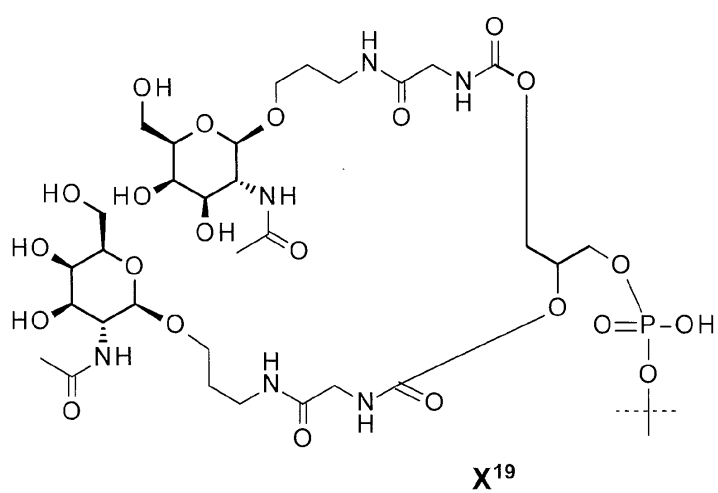
40

【化 3】



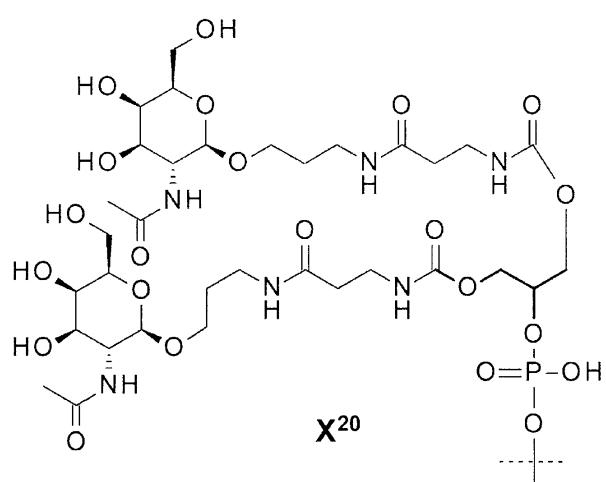
【 0 0 1 8 】

【化 4】



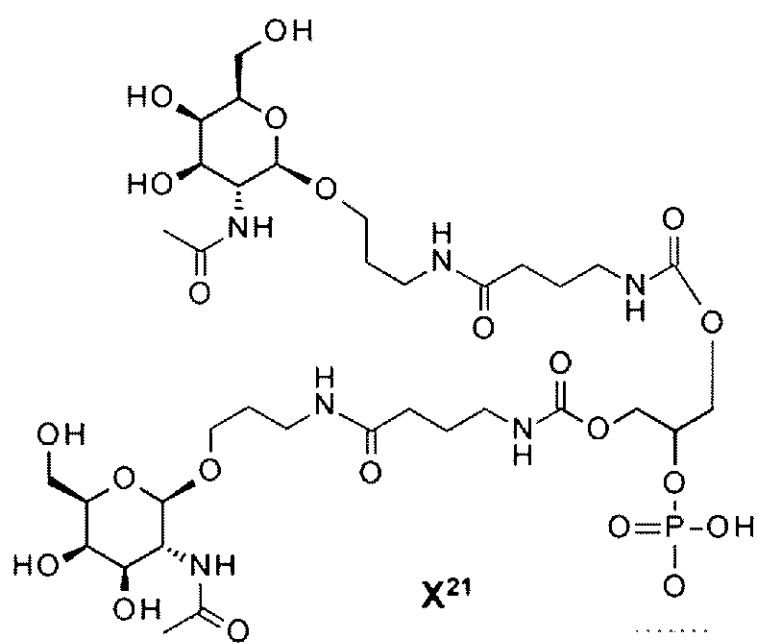
【 0 0 1 9 】

【化 5】



【 0 0 2 0 】

【化 6】



【 0 0 2 1 】

10

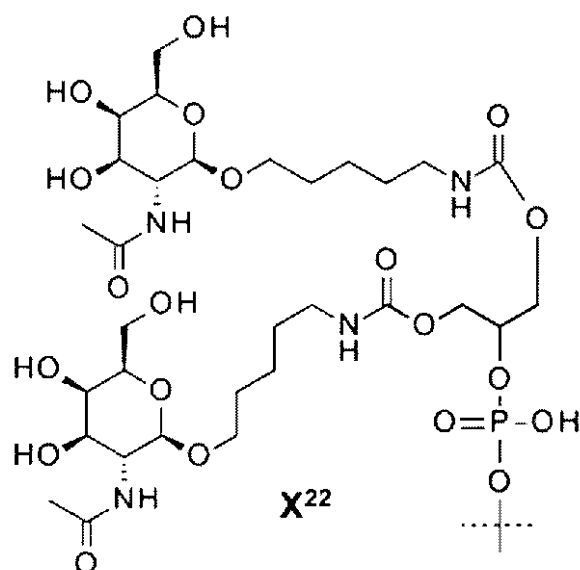
20

30

40

50

【化 7】



【0022】

で表される基である、(A1)に記載のコンジュゲート又はその製薬上許容される塩。

【0023】

(A5) (A1) ~ (A4) のいずれかのコンジュゲート又はその製薬上許容される塩を含む、医薬。

【0024】

また、本発明は、以下の製造方法及び当該製造方法の中間体として用いられる疎水性保護基付加型GalNAcユニットを含む化合物、コンジュゲートなどを提供する。

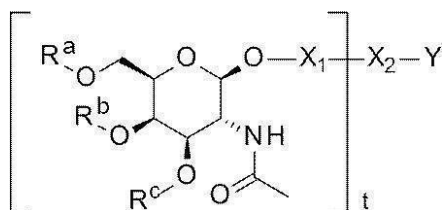
【0025】

(B1) 以下の工程を含むオリゴヌクレオチドとGalNAcユニットのコンジュゲートの製造方法、

a: オリゴヌクレオチドの5'末端または3'末端に下記式で表される疎水性保護基付加型GalNAcユニットーリン酸基を含む構造、

【0026】

【化 8】



【0027】

〔式中、 R^a 、 R^b および R^c の内少なくとも一つは疎水性保護基、それ以外は水素原子または遊離条件で除去される保護基である。 X_1 および X_2 は、それぞれ独立してリンカー構造を示し、 X_1 と X_2 の間で分岐していても良い。 t はリンカー構造中の分岐鎖数であ

り、1～10の整数である。Yはリン酸基またはチオリン酸基を介してオリゴヌクレオチドと結合する結合手を示す。]が結合したコンジュゲートを合成する工程、

b：工程aの産物を含む溶液を疎水性相互作用による吸着性を有する樹脂を充填したカラムに通液し、当該カラムに水性洗浄液を通液する工程、及び、

c：工程b後のカラムからオリゴヌクレオチドを溶出させる工程。

【0028】

(B2) 疎水性保護基が、塩基性条件または酸性条件で除去される保護基、好適には酸性条件で除去される疎水性保護基、より好適には置換されていても良いトリチル基または置換されていても良いシリル基である、(B1)の製造方法。

【0029】

(B3) 疎水性保護基付加型GalNAcユニットーリン酸基を含む構造が、オリゴヌクレオチドの5'末端に位置するヌクレオシドの5位水酸基に結合することを特徴とする(B1)の製造方法。

【0030】

(B4) 疎水性保護基付加型GalNAcユニットーリン酸基を含む構造において、R^aが疎水性保護基であり、R^bおよびR^cが水素原子であり、tが1～3の整数であることを特徴とする、(B1)の製造方法。

【0031】

(B5) 疎水性相互作用による吸着性を有する樹脂が、スチレン-ジビニルベンゼン系吸着樹脂、スチレン-ジビニルベンゼン系修飾型吸着樹脂、メタクリル系吸着樹脂、および、フェノール系吸着樹脂から選択されるいずれかである、(B1)の製造方法。

【0032】

(B6) 疎水性相互作用による吸着性を有する樹脂を充填したカラムが、イオン交換カラムまたは逆相カラムである、(B1)の製造方法。

【0033】

(B7) 工程aが以下の工程を含むことを特徴とする、(B1)の製造方法、

a1：3'末端から5'末端方向にオリゴヌクレオチドを伸長できる支持体を用いて、5'末端に位置するヌクレオシドの5'-水酸基の保護基の脱保護、ヌクレオシドの縮合を繰り返してオリゴヌクレオチド鎖を伸長させ、支持体上で所望のオリゴヌクレオチドを合成する工程；ここで、用いるヌクレオシドの5'-水酸基の保護基以外の保護基は、オリゴヌクレオチド3'末端と支持体との結合の切断条件（以下、「遊離条件」）で脱保護される保護基が選択され、同ヌクレオシドの5'-水酸基の保護基としては遊離条件では脱保護されない保護基が選択される、

a2：支持体上に合成されたオリゴヌクレオチドの5'末端に位置するヌクレオシドの5'-水酸基に疎水性保護基付加型GalNAcユニットを導入する工程：ここで、疎水性保護基は遊離条件では脱保護されないものが選択される、および、

a3：工程a2で得られた支持体を遊離条件の溶液で処理し、疎水性保護基付加型GalNAcユニットとオリゴヌクレオチドのコンジュゲートの溶液を得る工程。

【0034】

(B8) 工程bの後、カラムに吸着したコンジュゲートに対して疎水性保護基の脱保護を施し、その後に工程cを行うことを特徴とする、(B1)の製造方法。

【0035】

(B9) 遊離条件が塩基性であり、疎水性保護基が酸性で除去される保護基である、(B1)の製造方法。

【0036】

(B10) 疎水性保護基付加型GalNAcユニットーリン酸基を含む構造が、以下の式、

【0037】

10

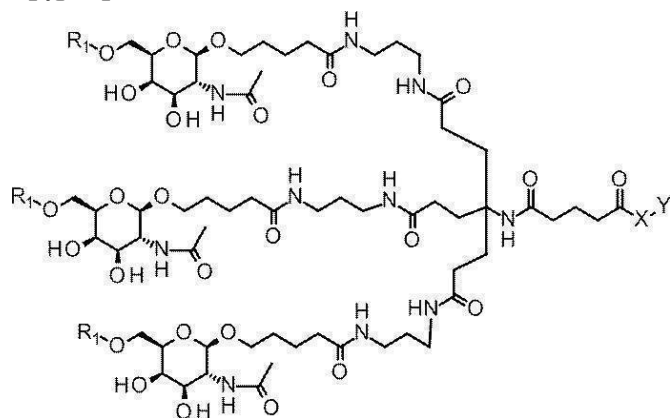
20

30

40

50

【化 9】



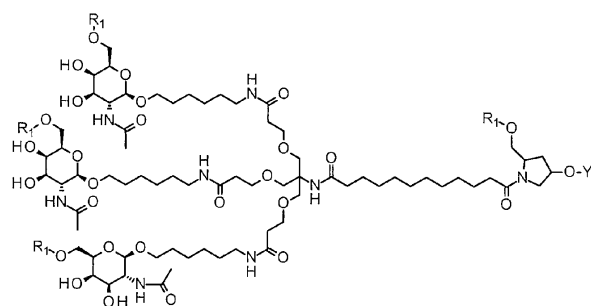
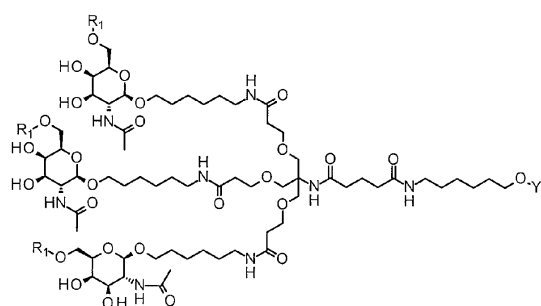
10

【 0 0 3 8】

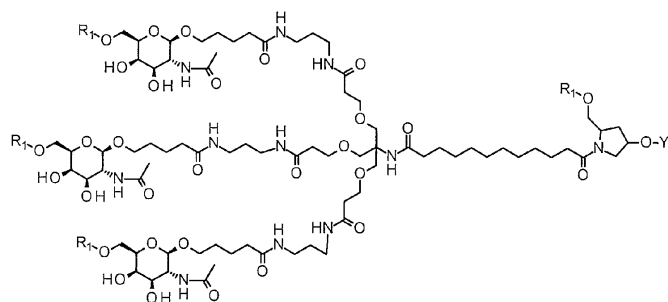
(式中、 R_1 は酸性条件で除去される疎水性保護基を表し、 X はリンカー構造を表し、 Y はリン酸基またはチオリン酸基を介してオリゴヌクレオチドと結合する結合手を表す。以下、同項において同じ。)

【 0 0 3 9】

【化 1 0】



20



30

【 0 0 4 0】

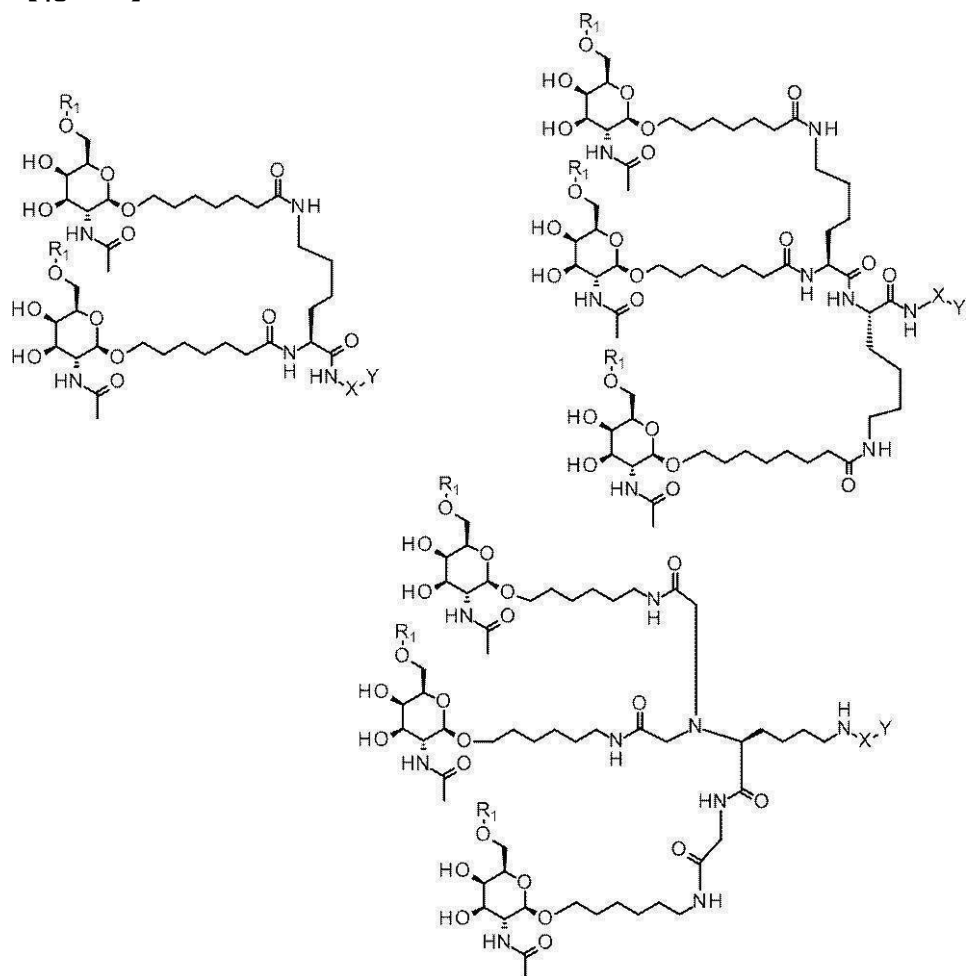
40

50

[illegible]

10

【化 1 2】



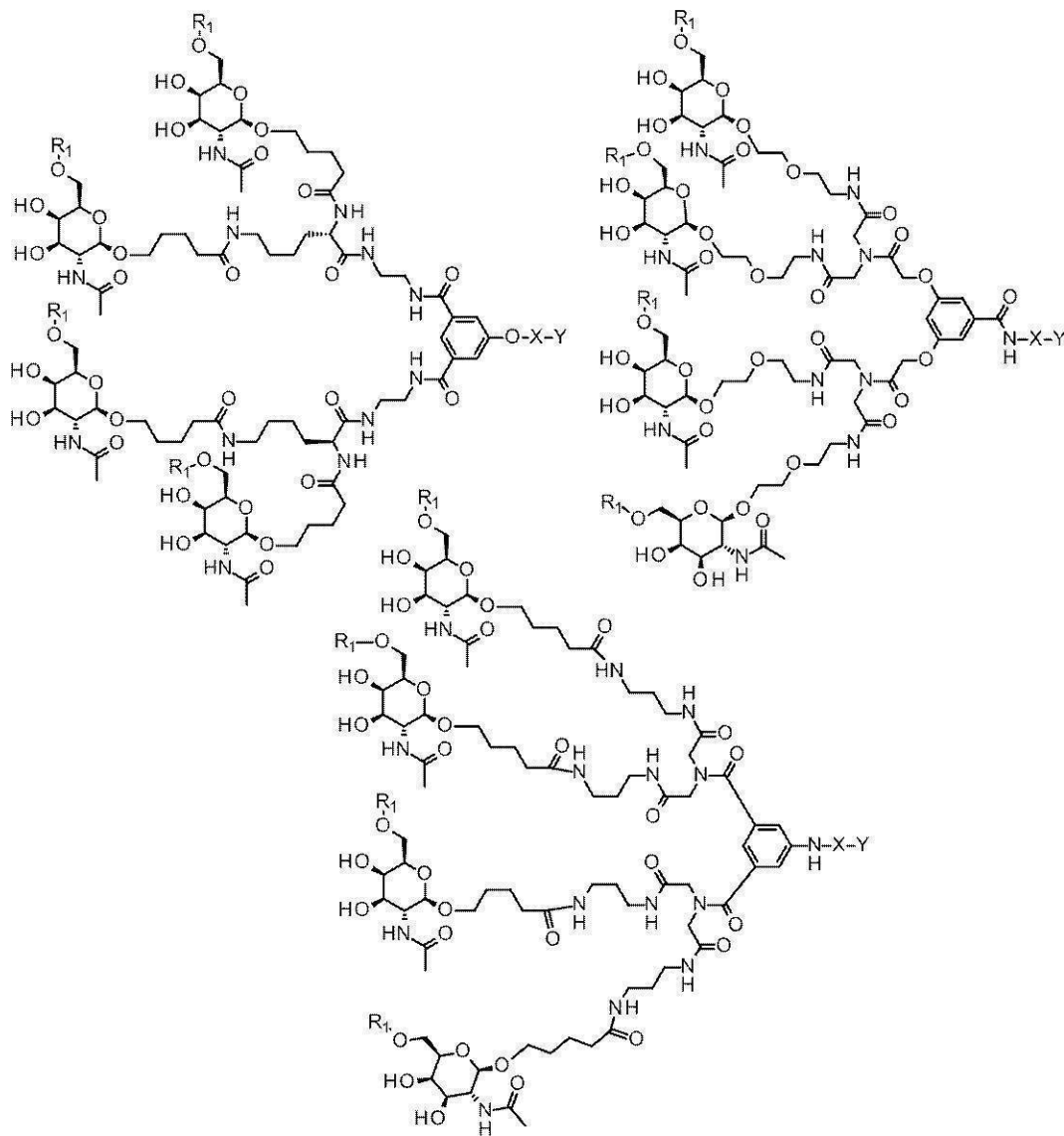
20

30

40

50

【化 1 3】



10

20

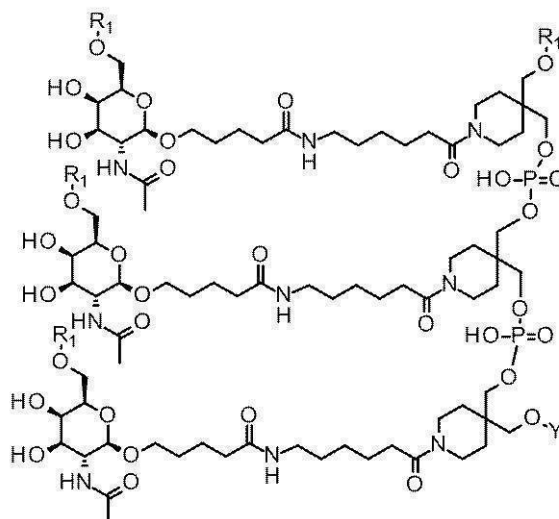
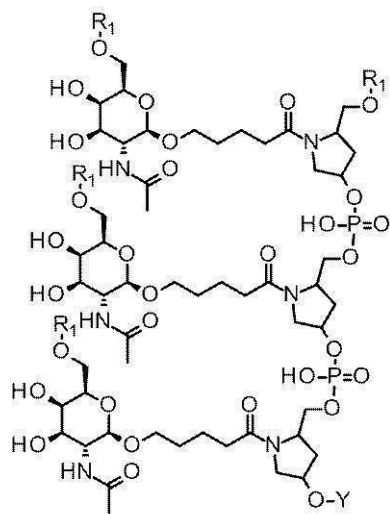
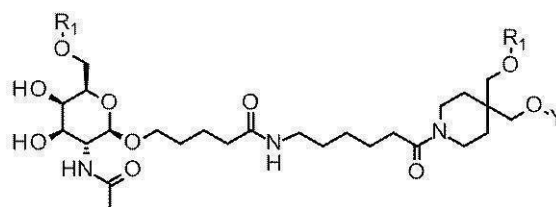
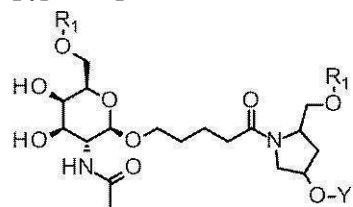
30

【 0 0 4 3】

40

50

【化 1 4】

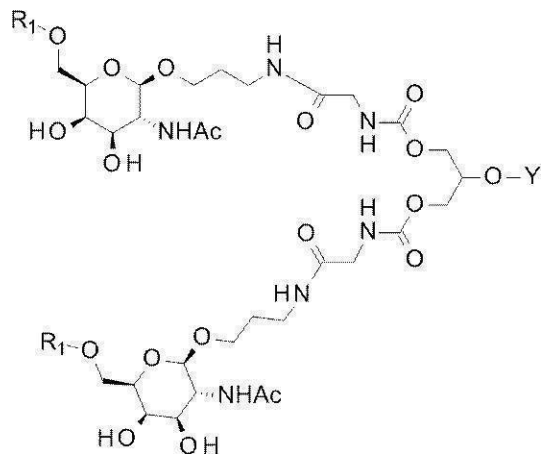


10

20

【 0 0 4 4】

【化 1 5】



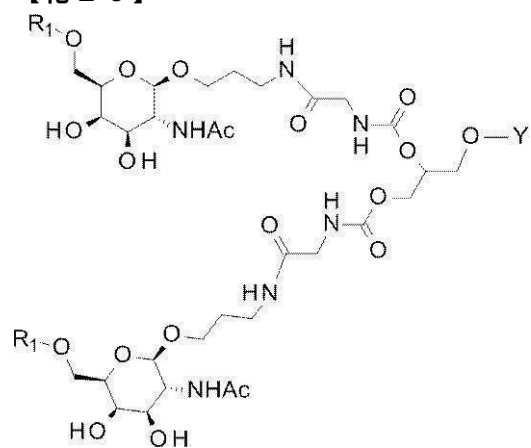
30

【 0 0 4 5】

40

50

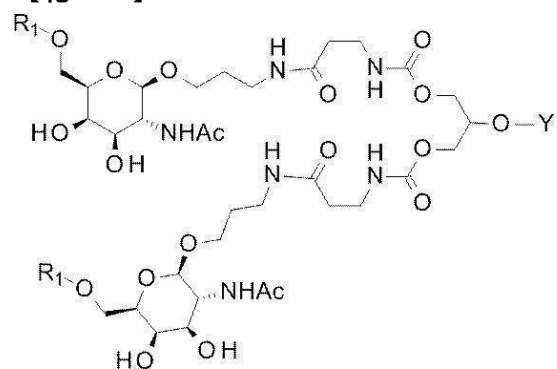
【化 1 6】



10

【 0 0 4 6】

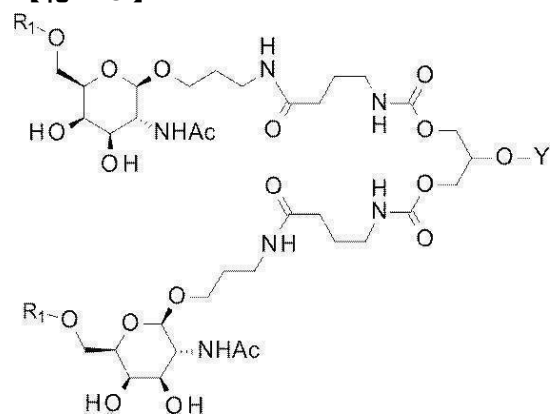
【化 1 7】



20

【 0 0 4 7】

【化 1 8】



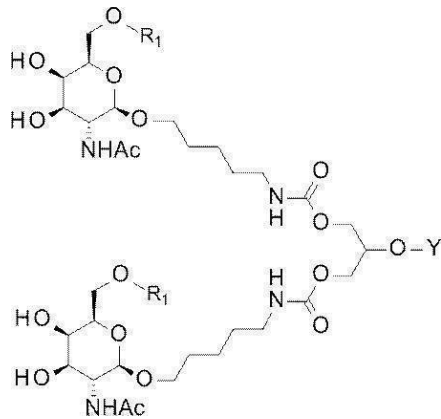
30

【 0 0 4 8】

40

50

【化 19】



10

【0049】

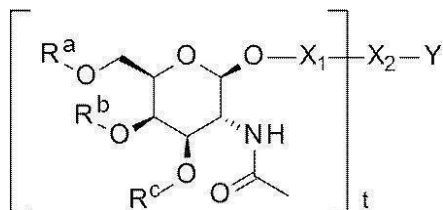
のいずれか一つで表される (B1) の製造方法。

【0050】

(B11) 以下の式

【0051】

【化 20】



20

【0052】

[式中、 R^a 、 R^b および R^c の内少なくとも一つは疎水性保護基、それ以外は遊離条件で除去される保護基である。 X_1 および X_2 は、それぞれ独立してリンカー構造を示し、 X_1 と X_2 の間で分岐していても良い。 t はリンカー構造中の分岐数であり、1～10の整数である。 Y はホスホロアミダイト基（好適には、 $-P(OCH_2CH_2CN)N(CH(CH_3)_2)_2$ または $-P(OCH_3)N(CH(CH_3)_2)_2$ で表される基である。）または、H-ホスホネート基（ $-PH(=O)(OH)$ ）を表す。]で表される化合物またはその塩。

30

【0053】

(B12) R^a が酸性条件で除去される疎水性保護基であり、 R^b および R^c がアセチル基であり、 Y がホスホロアミダイト基またはH-ホスホネート基であり、 t が1～3の整数である (B11) の化合物またはその塩。

【0054】

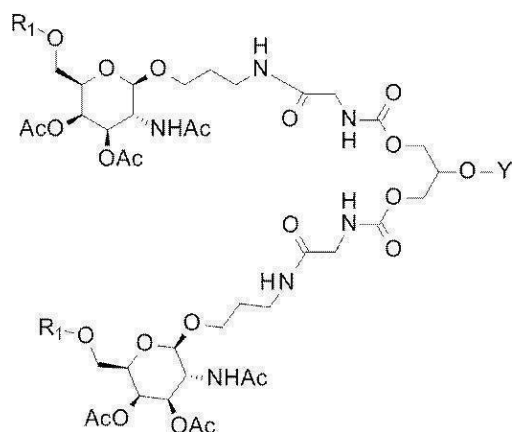
(B13) 以下の式

【0055】

40

50

【化 2 1】



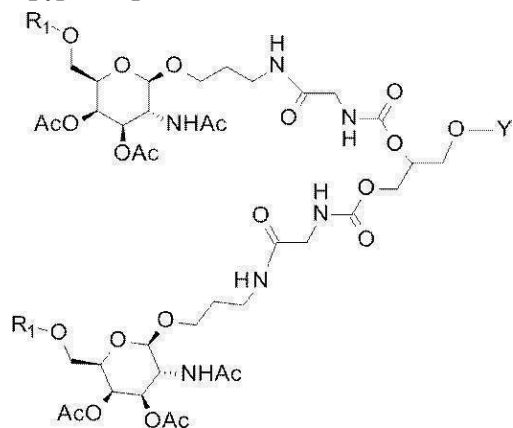
10

【 0 0 5 6】

【式中、 R_1 は酸性条件で除去される疎水性保護基であり、 Y はホスホロアミダイト基またはH-ホスホネート基を表す。以下同項において同じ。】

【 0 0 5 7】

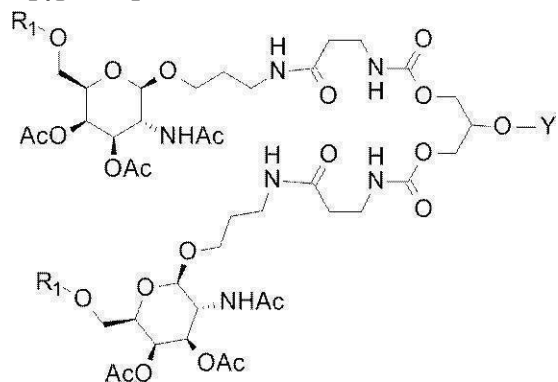
【化 2 2】



20

【 0 0 5 8】

【化 2 3】

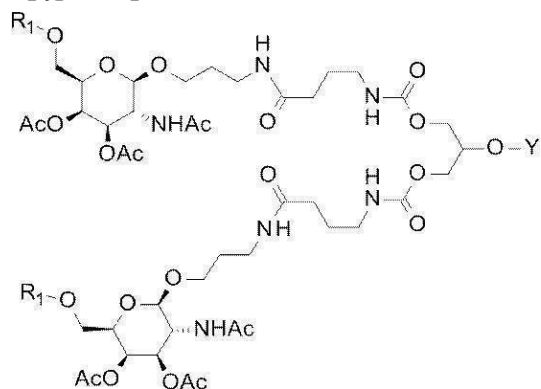


40

【 0 0 5 9】

50

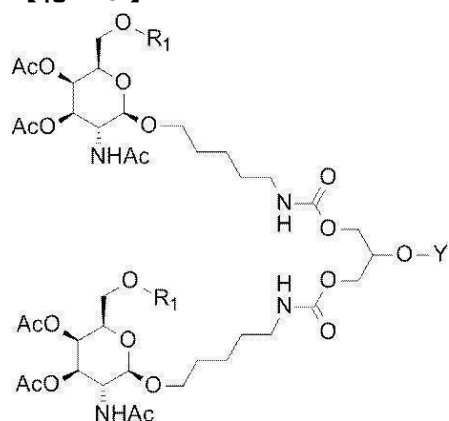
【化 2 4】



10

【 0 0 6 0】

【化 2 5】



20

【 0 0 6 1】

のいずれか一つで表される（B 1 1）または（B 1 2）の化合物またはその塩。

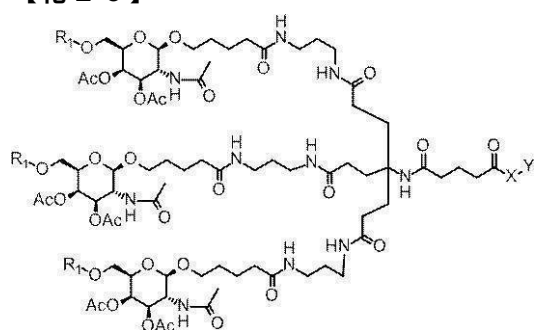
【 0 0 6 2】

（B 1 4）以下の式

30

【 0 0 6 3】

【化 2 6】



40

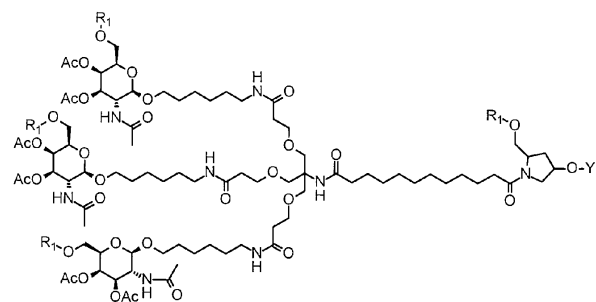
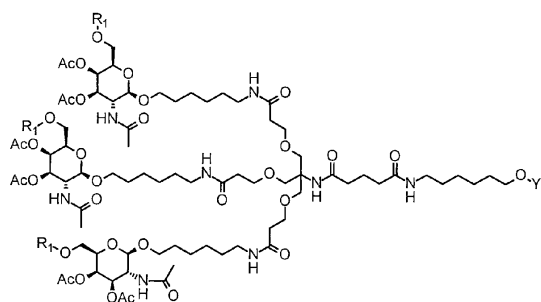
【 0 0 6 4】

【式中、R₁は酸性条件で除去される疎水性保護基を表し、Xはリンカー構造を表し、Yはホスホロアミダイト基またはH-ホスホネート基を表す。以下、同項において同じ。】

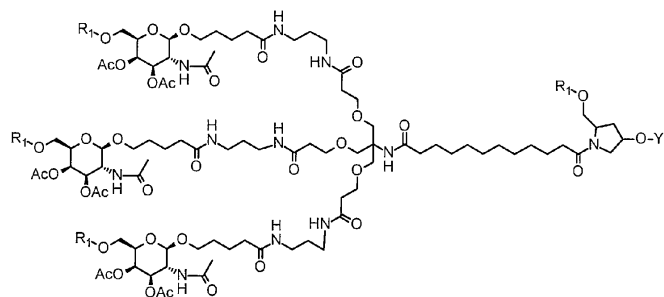
【 0 0 6 5】

50

【化 2 7】

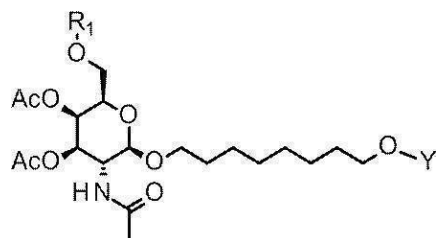


10



【 0 0 6 6】

【化 2 8】



20

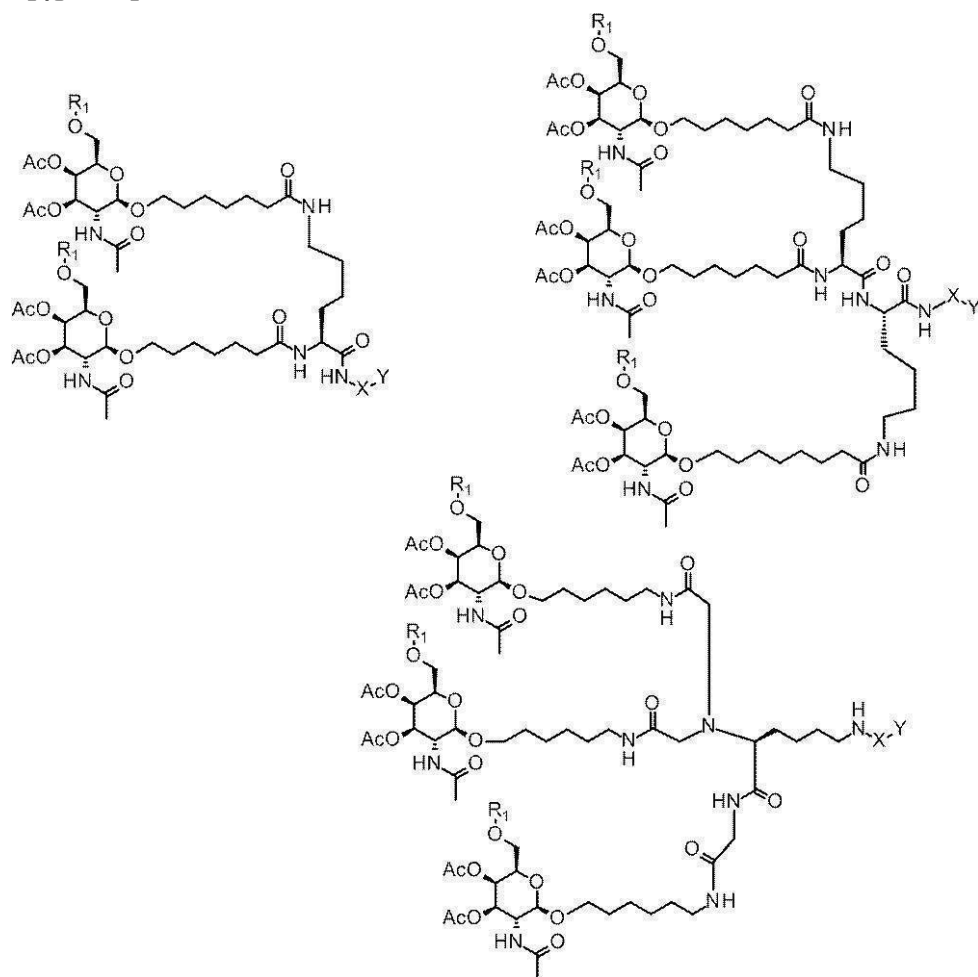
【 0 0 6 7】

30

40

50

【化 2 9】



【 0 0 6 8】

10

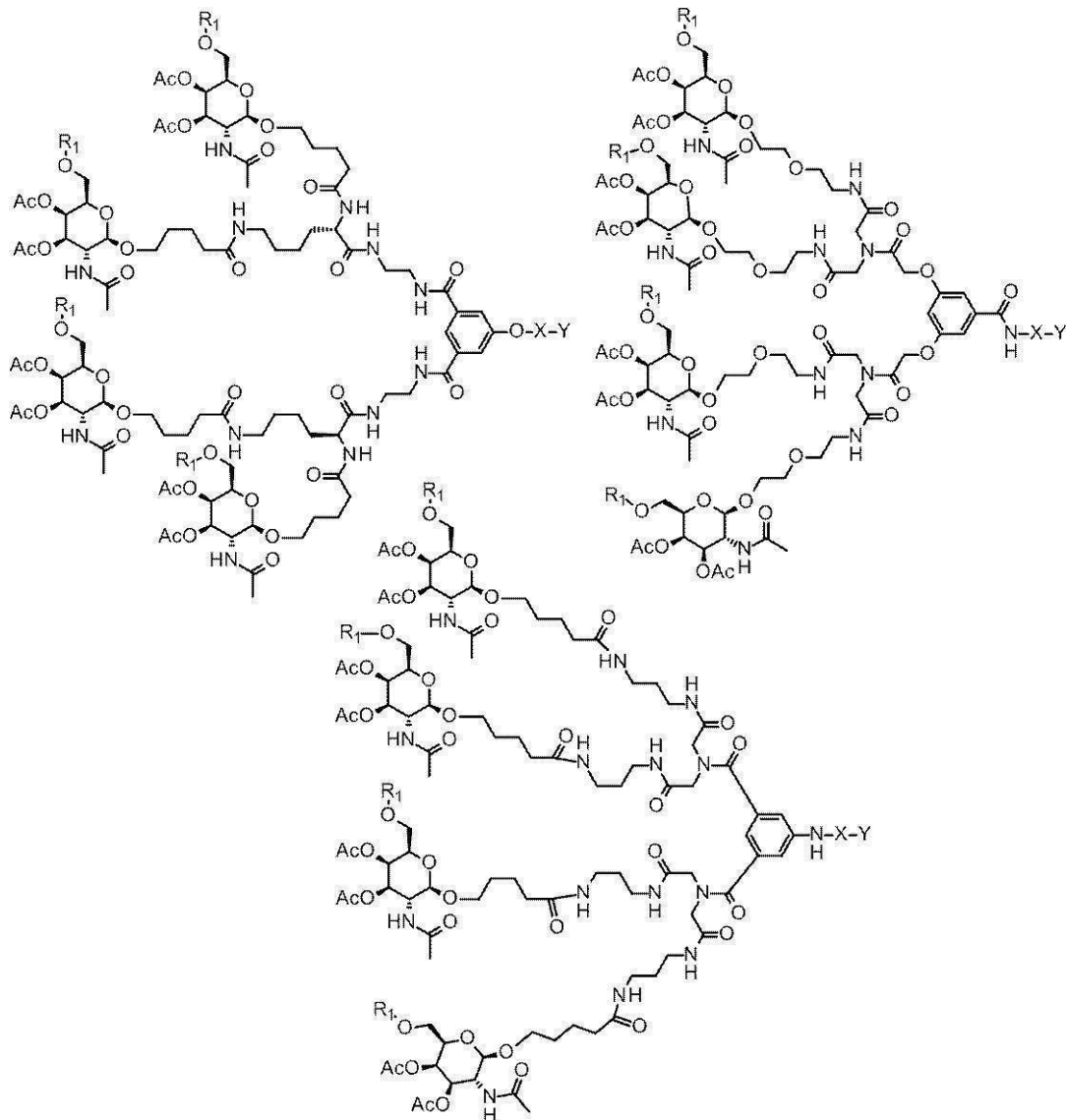
20

30

40

50

【化 3 0】



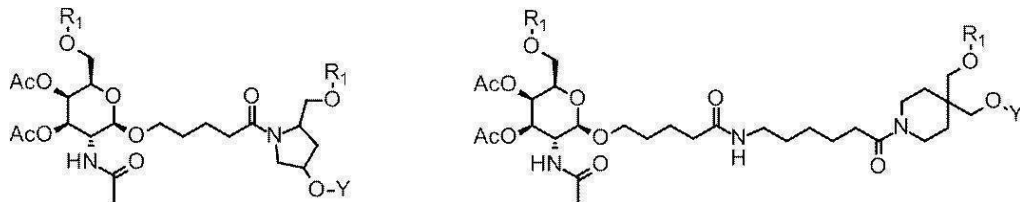
10

20

30

【 0 0 6 9】

【化 3 1】



【 0 0 7 0】

のいずれか一つで表される (B 1 1) または (B 1 2) の化合物またはその塩。

【 0 0 7 1】

(B 1 5) 疎水性保護基が、置換されていても良いトリチル基であり、ホスホロアミダイト基が $-P(OCH_2CH_2CN)N(CH(CH_3)_2)_2$ 、または、 $-P(OCH_3)N(CH(CH_3)_2)_2$ である、(B 1 1) ~ (B 1 4) のいずれか一つの化合物またはその塩。

【 0 0 7 2】

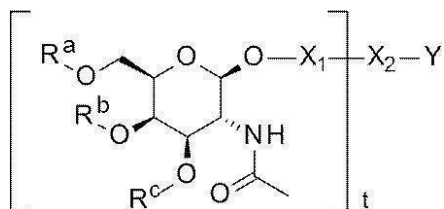
(B 1 6) オリゴヌクレオチドの 5' 末端または 3' 末端に下記式で表される疎水性保護基付加型 GalNAc ユニットーリン酸基を含む構造、

【 0 0 7 3】

40

50

【化 3 2】



【 0 0 7 4】

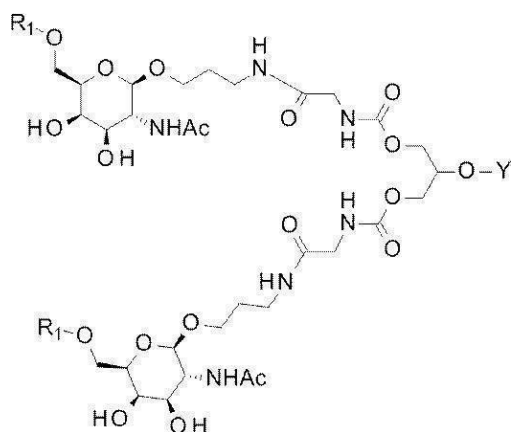
〔式中、 R^a 、 R^b および R^c の内少なくとも一つは疎水性保護基、それ以外は水素原子または遊離条件で除去される保護基である。 X_1 および X_2 は、それぞれ独立してリンカー構造を示し、 X_1 と X_2 の間で分岐していても良い。 t はリンカー構造中の分岐鎖数であり、1～10の整数である。 Y はリン酸基またはチオリン酸基を介してオリゴヌクレオチドと結合する結合手を示す。〕が結合したコンジュゲートまたはその塩。

【 0 0 7 5】

(B 1 7) 疎水性保護基付加型GalNAcユニットーリン酸基を含む構造が、以下の式、

【 0 0 7 6】

【化 3 3】

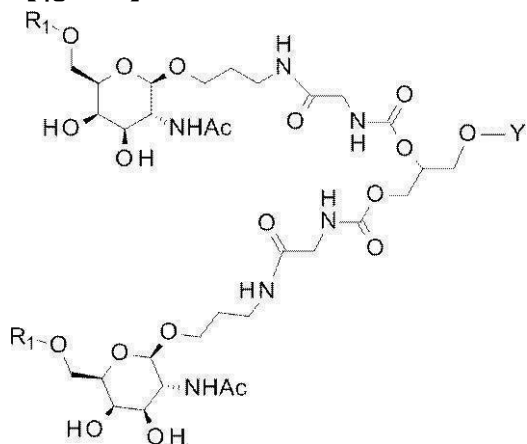


【 0 0 7 7】

〔式中、 R_1 は酸性条件で除去される疎水性保護基を表し、 Y はリン酸基またはチオリン酸基を介してオリゴヌクレオチドと結合する結合手を表す。以下、同項において同じ。〕

【 0 0 7 8】

【化 3 4】



【 0 0 7 9】

10

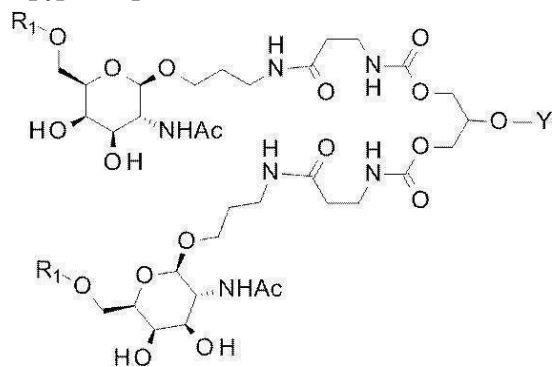
20

30

40

50

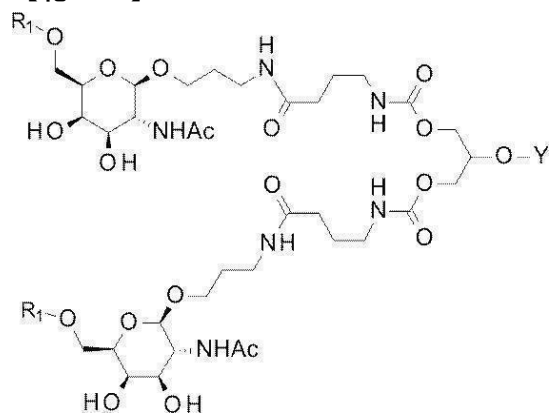
【化 3 5】



10

【 0 0 8 0】

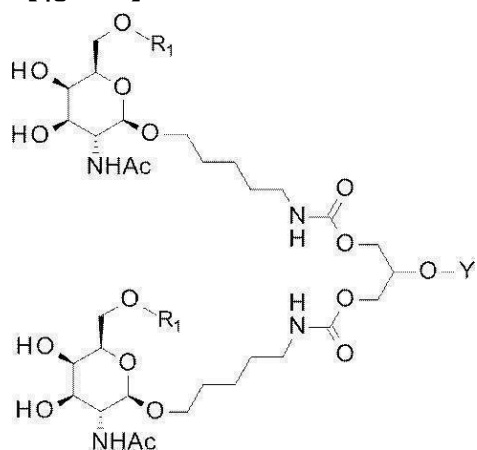
【化 3 6】



20

【 0 0 8 1】

【化 3 7】



30

【 0 0 8 2】

のいずれか一つで表される (B 1 6) のコンジュゲートまたはその塩。

40

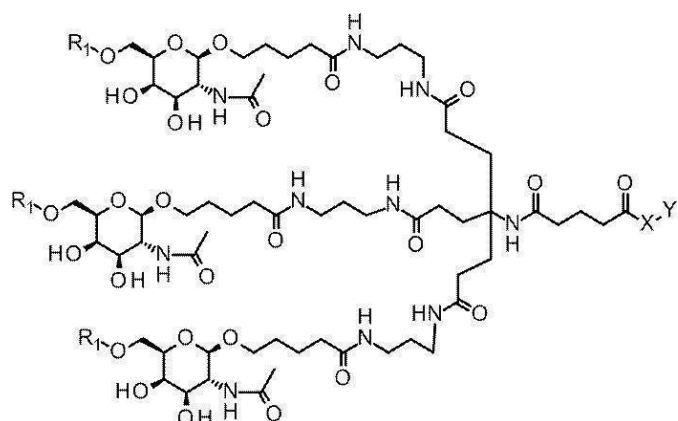
【 0 0 8 3】

(B 1 8) 疎水性保護基付加型GalNAcユニットーリン酸基を含む構造が、以下の式、

【 0 0 8 4】

50

【化 3 8】



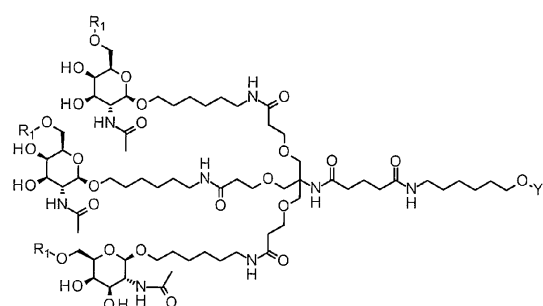
10

【 0 0 8 5】

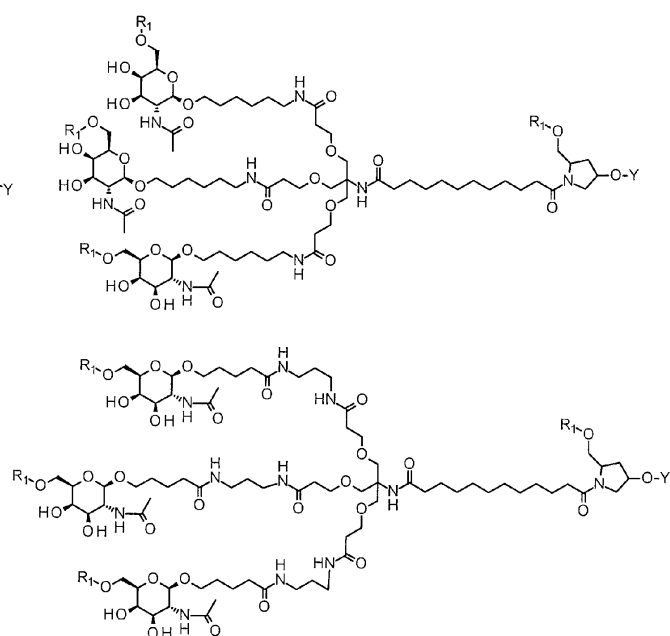
〔式中、 R_1 は酸性条件で除去される疎水性保護基を表し、 X はリンカー構造を表し、 Y はリン酸基またはチオリン酸基を介してオリゴヌクレオチドと結合する結合手を表す。以下、同項において同じ。〕

【 0 0 8 6】

【化 3 9】



20



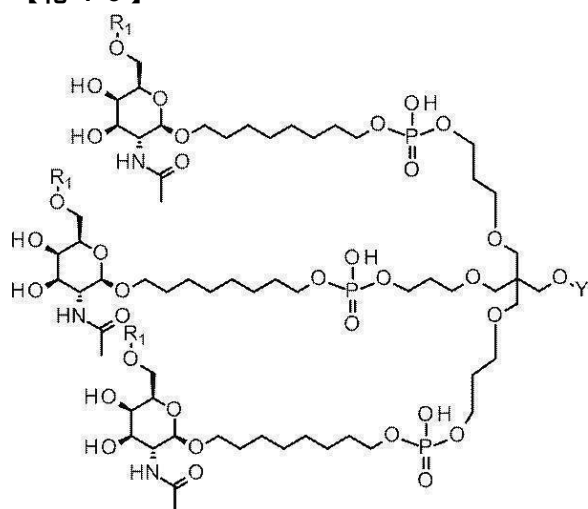
30

【 0 0 8 7】

40

50

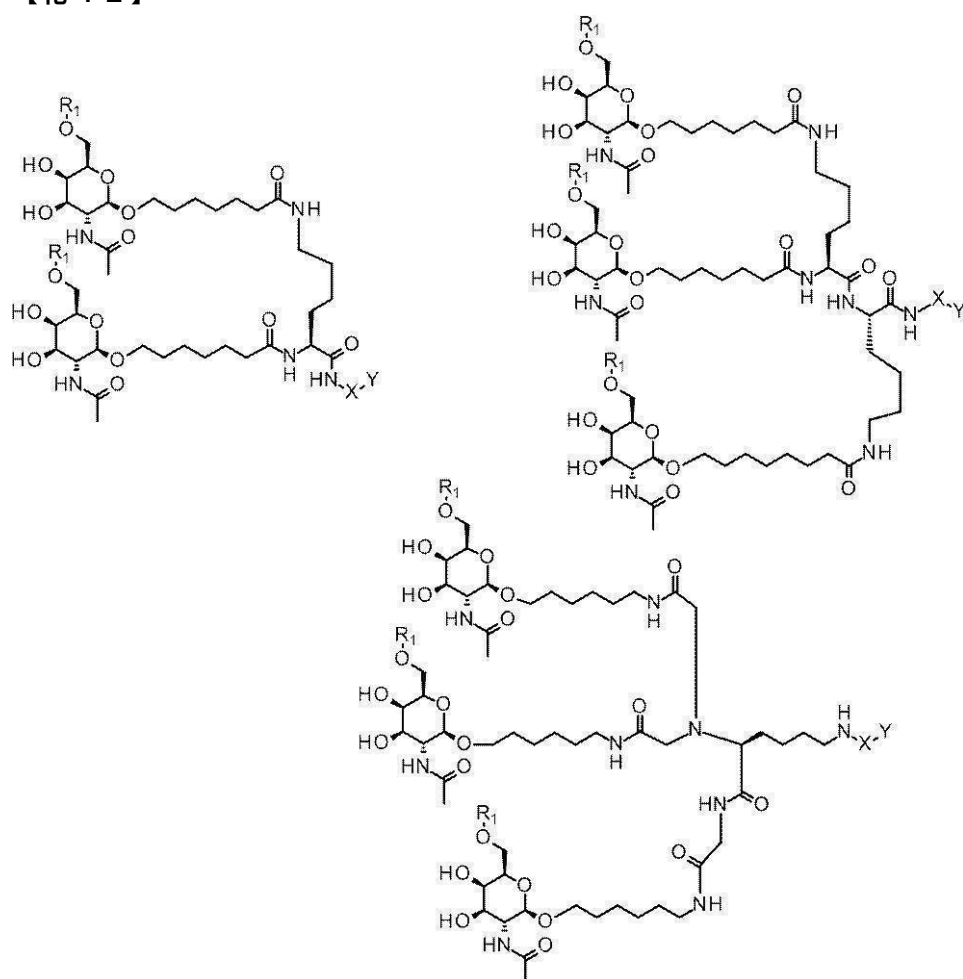
【化 4 0】



10

【 0 0 8 8】

【化 4 1】



20

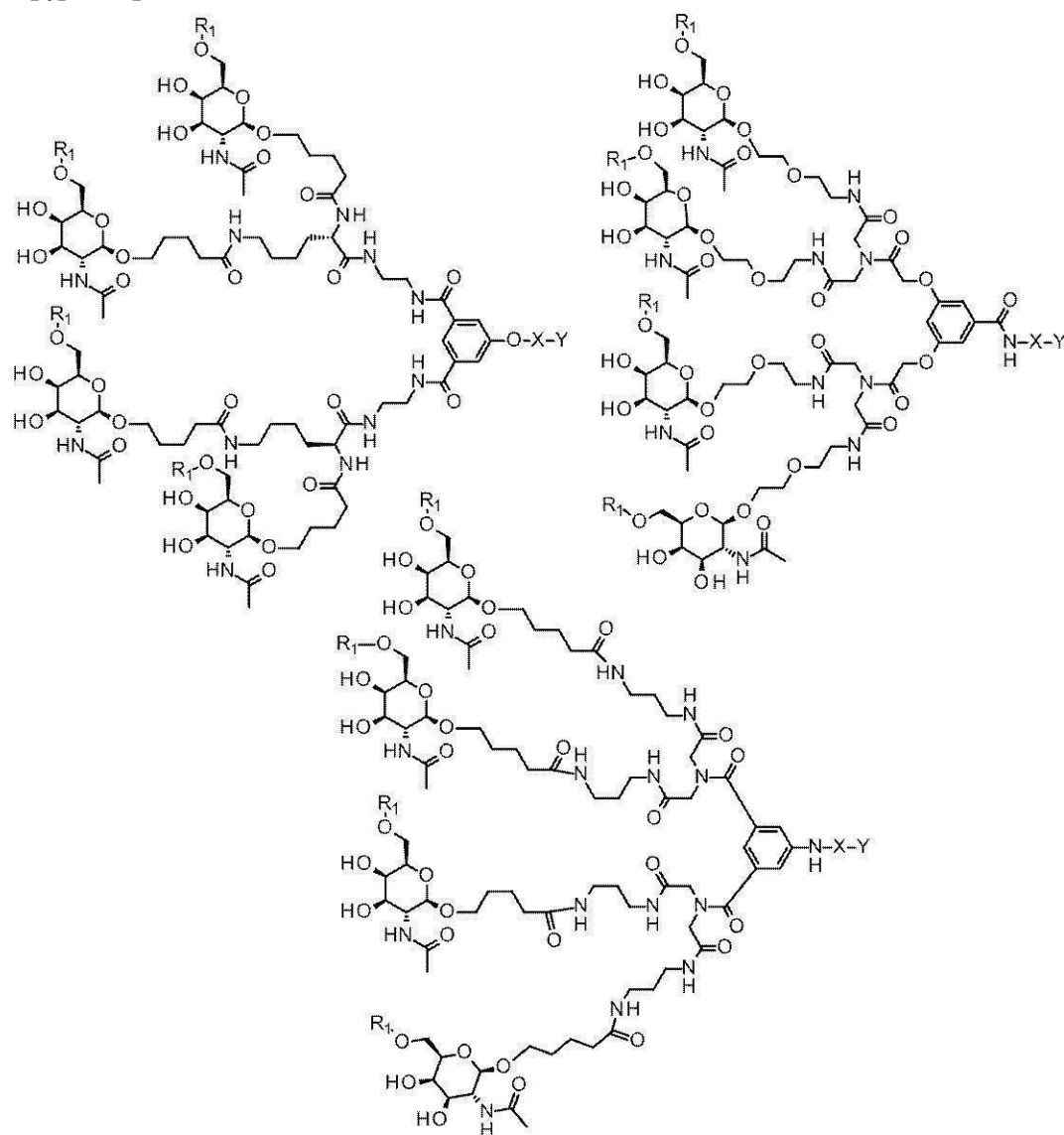
30

40

【 0 0 8 9】

50

【化 4 2】



【0090】

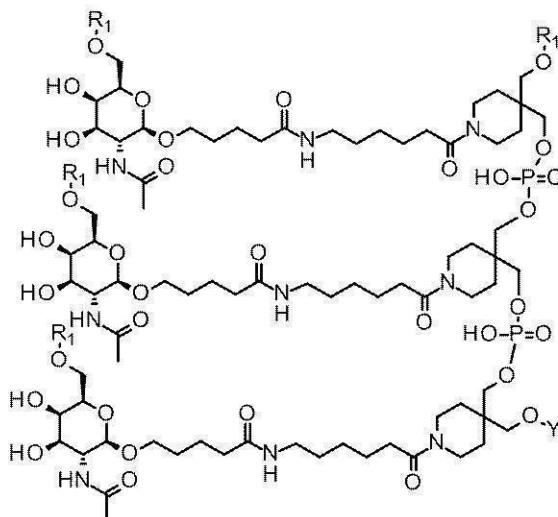
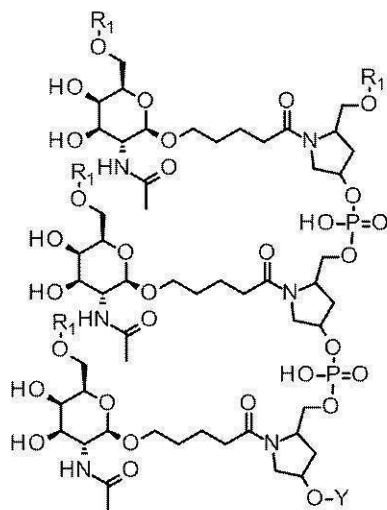
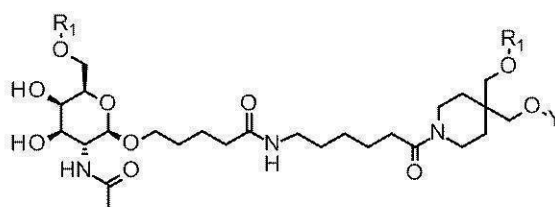
10

20

30

40

50

O=C1NC(=O)O[C@@H](O[C@@H]2[C@H](O)[C@H](O)[C@H](O)[C@H]2OR1)OCC(=O)N3CC[C@H](OY)C3

20

のいずれか一つで表される (B 16) のコンジュゲートまたはその塩。

(B19) 疎水性保護基が置換されていても良いトリチル基であり、Yがリン酸ジエステル結合またはリン酸チオエート結合を介してオリゴヌクレオチドの5'末端に位置するヌクレオチドの5'-水酸基と結合する結合手を表す、(B16)～(B18)のいずれかのコンジュゲートまたはその塩。

30

【 0 0 9 3 】

本発明のコンジュゲートは、多様なオリゴヌクレオチドに対して、肝臓への適切な送達と、高い水溶性を実現した。また、GalNAcユニットとオリゴヌクレオチドのコンジュゲートのDMTr-onカラム精製方法が確立されたことで、大スケールで製造することが可能となった。これにより、薬理効果を高めるための用量の増加や長期間持続製剤に適用するための高濃度薬液の調製が可能となり、多様なニーズに応じた核酸医薬の製品設計が可能となる。

【 0 0 9 4 】

40

【図1】実施例8～14の化合物をヘテロノックインマウスへ投与した際の、肝臓中のG6PC mRNAの異常スプライシングの是正効果を示す図。ヘテロノックインマウス肝臓中の異常スプライシングが是正されたG6PC mRNA量をqRT-PCRで相対定量評価（アクチンのmRNA量で補正）している。Y軸は正常G6PC mRNAの発現量について、saline投与群を1とした場合の各投与群における相対値である（RQ: Relative Quantification；mpk: mg/kg）。

【図2】実施例15～23の化合物をヘテロノックインマウスへ投与した際の、肝臓中のG6PC mRNAの異常スプライシングの是正効果を示す図。ヘテロノックインマウス肝臓中の異常スプライシングが是正されたG6PC mRNA量をqRT-PCRで定量評価（アクチンのmRNA量で補正）している。Y軸は図1と同じ。RQ: Relative Quantification; mpk: mg

50

/kg

【図3】ApoB-ASO（白抜きカラム）及びApoB-ASOコンジュゲート（塗りつぶしカラム）をヒト初代培養肝細胞に添加した際の、細胞中のApoB mRNAの分解効果を示す図。細胞中のApoB mRNA量をqRT-PCRで相対定量評価（アクチンのmRNA量で補正）している。Y軸は無処置のヒト初代培養肝細胞中のApoB mRNA量を100%とした場合の各添加群における相対値（%）である。

【図4】DMTr-onイオン交換カラム精製時の各工程とクロマトチャートの相関図。

【図5】GalNAcの水酸基にDMTr基を有するコンジュゲートのDMTr-onイオン交換カラム精製時のクロマトグラム（検出波長260nm）

【図6】オリゴヌクレオチドの近くにDMTr基を有するコンジュゲートのDMTr-onイオン交換カラム精製時のクロマトグラム（検出波長260nm）。

【発明を実施するための形態】

【0095】

以下、本発明の実施の形態についてより詳細に説明する。

本明細書において、「コンジュゲート」とは、GalNAcユニットがオリゴヌクレオチドの5'末端および／または3'末端に結合した化合物を意味する。

【0096】

本明細書において、「GalNAcユニット」とは、肝臓の肝実質細胞上のアシアロ糖タンパク質受容体（ASGPR）に結合可能なN-アセチル-D-ガラクトサミン（GalNAc）を含む部分構造を意味する。GalNAcユニットには、直鎖または分岐したリンカー構造とオリゴヌクレオチドとの結合のためのリン酸基またはチオリン酸基を含む。このような結合のためのリン酸基またはチオリン酸基を一つ含む構造単位を、「GalNAcユニット」と呼ぶ場合がある。一つのGalNAcユニットに含まれるGalNAcの数には制限が無く、特に明示されない限り、公知のもの及び本明細書に開示されたものなどが採用できる。ASGPRへの結合能が維持される限り、GalNAcの構造が修飾されていても良い。また、製造過程においてGalNAcに保護基が導入されたものなどをも含む。

本明細書において、2分岐GalNAcユニットとは、特別言及がない限り、上記（A1）の式で表されるGalNAcユニットを意味する。

【0097】

本明細書において、「オリゴヌクレオチド」とは、1本の鎖長が100塩基以下の合成可能な核酸をいい、1本鎖であっても、2本鎖であっても良い。採用される核酸は、後述の通り、DNA、RNA、天然核酸、修飾核酸などを目的に応じて使い分けることができ、1本のオリゴヌクレオチド中にこれらが混在していても良い。

【0098】

本明細書において、「遊離条件」とはオリゴヌクレオチドの合成過程において、支持体とオリゴヌクレオチドの結合を切断し、オリゴヌクレオチドを支持体から遊離させる際に採用される処理条件を意味する。一般的な固相合成における遊離条件は塩基性である。

【0099】

本発明において「疎水性保護基」とは、水酸基の保護基として利用でき、疎水性が高い構造を有し、且つ、遊離条件で除去されない保護基である。例えば、遊離条件が塩基性の場合、酸性条件で除去される保護基が好ましく、遊離条件が酸性の場合、塩基性で除去される保護基が好ましい。

【0100】

本明細書において、「ホスホロアミダイト基」とは、 $-P(OR)N(CH(CH_3)_2)_2$ （ここでRはC1-C3アルキル基またはシアノ-C1-C3アルキレン基）で表される核酸合成におけるアミダイト試薬に採用される官能基である。好適には、 $-P(OC_6H_5)N(CH(CH_3)_2)_2$ 、 $-P(OC_6H_5)N(CH(CH_3)_2)_2$ などが挙げられるがこれらに限定されない。

【0101】

本明細書において、「H-ホスホネート基」とは、 $-PH(=O)(OH)$ または、その塩で

10

20

30

40

50

表される核酸合成に採用される官能基である。H-ホスホネート基を持つ化合物は、 $-PH(=O)(O^-)$ に対して、塩を形成しうる。そのような塩としては、ナトリウム塩、カリウム塩、リチウム塩のようなアルカリ金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩のようなアルカリ土類金属塩、アルミニウム塩、鉄塩、亜鉛塩、銅塩、ニッケル塩、コバルト塩などの金属塩；アンモニウム塩のような無機塩、 α -オクチルアミン塩、ジベンジルアミン塩、モルホリン塩、グルコサミン塩、フェニルグリシンアルキルエステル塩、エチレンジアミン塩、N-メチルグルカミン塩、グアニジン塩、ジエチルアミン塩、トリエチルアミン塩、ジシクロヘキシルアミン塩、N, N'-ジベンジルエチレンジアミン塩、クロロプロカイン塩、プロカイン塩、ジエタノールアミン塩、N-ベンジル-フェネチルアミン塩、ピペラジン塩、テトラメチルアンモニウム塩、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン塩のような有機塩などのアミン塩；弗化水素酸塩、塩酸塩、臭化水素酸塩、沃化水素酸塩のようなハロゲン化水素酸塩、硝酸塩、過塩素酸塩、硫酸塩、磷酸塩などの無機酸塩；メタンスルホン酸塩、トリフルオロメタンスルホン酸塩、エタンスルホン酸塩のような低級アルカンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩のようなアリールスルホン酸塩、酢酸塩、りんご酸塩、フマル酸塩、コハク酸塩、クエン酸塩、酒石酸塩、蔞酸塩、マレイン酸塩などの有機酸塩；グリシン塩、リジン塩、アルギニン塩、オルニチン塩、グルタミン酸塩、アスパラギン酸塩のようなアミノ酸塩などを挙げることができ、好ましくは、有機塩であり、より好ましくは、トリエチルアミン塩である。これらの塩は、公知の方法で製造することができる。

【0102】

本明細書において、ヌクレオチド同士の結合またはヌクレオチドとコンジュゲートの構造において、「リン酸基を介した結合」、「リン酸基を含む構造」などの用語は、2つの構造単位がリン酸ジエステル結合やその修飾形（例えば、ホスホロチオエート結合）などの、核酸合成において一般的に使用される結合様式で結合していること、そのような結合様式を含む構造を意味する。

【0103】

<1. オリゴヌクレオチド>

本明細書において、「核酸」、「オリゴヌクレオチド」又は「ポリヌクレオチド」という用語は、少なくとも二個のデオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチドを、一本鎖、二本鎖又は三本鎖いずれかの形で含有するポリマーを指す。

【0104】

特に指示がない限り、具体的核酸配列は、暗黙のうちにその保存的に修飾された変異物（例えば縮重コドン置換物）、対立遺伝子、オルトログ、SNP及び相補的配列、ならびに明示的に指示された配列も包含する。

【0105】

1-1. 核酸の種類

本発明の核酸には当業者に知られているいかなる形態をも含む。そのような核酸の形態の具体例としては1本鎖DNA、1本鎖RNA、DNAとRNAが混合した1本鎖オリゴヌクレオチドを挙げることができる。他の形態の核酸の具体例としては、2本鎖DNA、2本鎖RNA、DNA-RNAのハイブリッドポリヌクレオチド、DNAとRNAが混合した2種のオリゴヌクレオチドからなる、2本鎖ポリヌクレオチドを挙げることができる。

【0106】

本発明の核酸を構成するヌクレオシド又はヌクレオチドは天然型ものに加え化学修飾された修飾ヌクレオシド又は修飾ヌクレオチドも含まれる。修飾ヌクレオシド／ヌクレオチドとしては、例えば、糖修飾ヌクレオシド／ヌクレオチド、核酸塩基修飾ヌクレオシド／ヌクレオチド、骨格修飾ヌクレオシド／ヌクレオチド、又はそれらの組み合わせが挙げられる（例えば、Nucleic Acid Research, 1997, Vol.25, No.22, 4429-4443参照）。

【0107】

本明細書において、「天然型のヌクレオシド」とは、2'-デオキシアデノシン、2'-

デオキシグアノシン、2'-デオキシシチジン、2'-デオキシ-5-メチルシチジン、チミジン等の2'-デオキシヌクレオシド、アデノシン、グアノシン、シチジン、5-メチルシチジン、ウリジン等のリボヌクレオシドをいう。また、「オリゴヌクレオチド」とは、ヌクレオシドの糖部分がリン酸とエステルを形成している化合物から構成されるオリゴヌクレオチドのことをいう。本明細書においては、オリゴヌクレオチドとポリヌクレオチドとは同一の意味で用いている。

【0108】

本明細書においては2'-デオキシアデノシンを A^t 、2'-デオキシグアノシンを G^t 、2'-デオキシシチジンを C^t 、2'-デオキシ-5-メチルシチジンを $5meC^t$ 、チミジンを T^t 、2'-デオキシウリジンを U^t 、アデノシンを A^r 、グアノシンを G^r 、シチジンを C^r 、5-メチルシチジンを $5meC^r$ 、ウリジンを U^r と表すこともある。また、本明細書中においては、2'-デオキシアデノシンヌクレオチドを AP 、2'-デオキシグアノシンヌクレオチドを GP 、2'-デオキシシチジンヌクレオチドを CP 、2'-デオキシ-5-メチルシチジンヌクレオチドを $5meCP$ 、チミジンヌクレオチドを TP 、2'-デオキシウリジンヌクレオチドを UP 、アデノシンヌクレオチドを A^rP 、グアノシンヌクレオチドを G^rP 、シチジンヌクレオチドを C^rP 、5-メチルシチジンヌクレオチドを $5meC^rP$ 、ウラシルヌクレオチドを U^rP と表すこともある。

【0109】

本明細書においてはヌクレオチドのリン酸エステルの代わりにホスホロチオエートエステルとなっているホスホロチオエートエステルについて、 AP に対応するものとして A^s 、 GP に対応するものとして G^s 、 CP に対応するものとして C^s 、 $5meCP$ に対応するものとして $5meC^s$ 、 TP に対応するものとして T^s 、 UP に対応するものとして U^s 、 A^rP に対応するものとして A^rs 、 G^rP に対応するものとして G^rs 、 C^rP に対応するものとして C^rs 、 $5meC^rP$ に対応するものとして $5meC^rs$ 、 U^rP に対応するものとして U^rs と表すこともある。

【0110】

本明細書における、「糖修飾ヌクレオシド」とは、ヌクレオシドの糖部分が修飾されているヌクレオシドをいう。糖修飾ヌクレオシドとしては、例えば、2'-O-メチルヌクレオシド、2'-O、4'-C-エチレンヌクレオシド(ENA)、2'-O、4'-C-メチレンヌクレオチド(BNA/LNA)が挙げられる。

【0111】

このうち、2'-O-メチル修飾の例としては、2'-O-メチルヌクレオシド及び2'-O-メチルヌクレオチドがあり、 A^r に対応するものとして Am^1t 、 G^r に対応するものとして Gm^1t 、 C^r に対応するものとして Cm^1t 、 $5meC^r$ に対応するものとして $5meCm^1t$ 、 U^r に対応するものとして Um^1t 、 A^rP に対応するものとして Am^1P 、 G^rP に対応するものとして Gm^1P 、 C^rP に対応するものとして Cm^1P 、 $5meC^rP$ に対応するものとして $5meCm^1P$ 、 U^rP に対応するものとして Um^1P 、 A^rs に対応するものとして Am^1s 、 G^rs に対応するものとして Gm^1s 、 C^rs に対応するものとして Cm^1s 、 $5meC^rs$ に対応するものとして $5meCm^1s$ 、 U^rs に対応するものとして Um^1s と表すこともある。

【0112】

本明細書に添付する配列表において、各配列の<223>の項目中で“cm”は2'-O-メチルシチジン(2'-O-Methylcytidine)を示し、“um”は2'-O-メチルウリジン(2'-O-Methyluridine)を示し、“gm”は2'-O-メチルグアノシン(2'-O-Methylguanosine)を示す。

【0113】

本明細書において2'-O、4'-C-エチレンヌクレオチド ユニット及び「ENAユニット」とは上記の各ヌクレオシド、各ヌクレオチドにおいてENAを有するものをいい、 A^t に対応するものとして A^{2t} 、 AP に対応するものとして A^{e2P} 、 A^s に対しては A^{e2s} 、 G^t に対応するものとして G^{2t} 、 GP に対応するものとして G^{e2P} 、 G^s に対し

ては G^{e2s} 、 $5meC^t$ に対応するものとして C^{2t} 、 $5meC^p$ に対応するものとして C^{e2p} 、 $5meC^s$ に対しては C^{e2s} 、 T^t に対応するものとして T^{2t} 、 T^p に対応するものとして T^{e2p} 、 T^s に対しては T^{e2s} というように ENA ユニットを有するヌクレオシド及びヌクレオチドを表わすこともある。

【0114】

本明細書において $2'-O$ 、 $4'-C$ —メチレンヌクレオチド ユニット及び「 $2'$ 、 $4'$ —BNA/LNA ユニット」とは上記の各ヌクレオシド、各ヌクレオチドにおいて $2'$ 、 $4'$ —BNA/LNA を有するものをいい、 A^t に対応するものとして A^{1t} 、 A^p に対応するものとして A^{e1p} 、 A^s に対しては A^{e1s} 、 G^t に対応するものとして G^{1t} 、 G^p に対応するものとして G^{e1p} 、 G^s に対しては G^{e1s} 、 $5meC^t$ に対応するものとして C^{1t} 、 $5meC^p$ に対応するものとして C^{e1p} 、 $5meC^s$ に対しては C^{e1s} 、 T^t に対応するものとして T^{1t} 、 T^p に対応するものとして T^{e1p} 、 T^s に対しては T^{e1s} というように $2'$ 、 $4'$ —BNA/LNA ユニットを有するヌクレオシド及びヌクレオチドを表わすこともある。

【0115】

1-2. 標的遺伝子

本明細書において、「標的遺伝子」とは、これを導入する細胞、組織、あるいは個体（以下これを「被導入体」と称することがある。）において RNA であれば特に制限されず、タンパク質に翻訳される mRNA であってもタンパク質に翻訳されないノンコーディング RNA であってもよい。ノンコーディング RNA としては、機能性 RNA、例えば、mRNA の非翻訳領域、tRNA、rRNA、mRNA 型 ncRNA (mRNA-like non-coding RNA)、長鎖 ncRNA (long non-coding RNA)、snRNA (small nuclear RNA)、snoRNA (small nucleolar RNA)、miRNA (microRNA) 等が挙げられる。具体的には、導入する被導入体に内在性のものでも、遺伝子導入等の手法によって導入される外来性のものでもよい。また、染色体上に存在する遺伝子でも、染色体外のものでもよい。外来性の遺伝子としては、例えば、被導入体に感染可能なウイルス、バクテリア、真菌又は原生動物由来のものが挙げられるがこれらに制限されない。遺伝子の機能については既知のものでも未知のものでもよい。

【0116】

そのような標的遺伝子の例としては、肝臓における特定の疾患を有する患者において特異的に肝臓で発現が上昇している及び／又は特異的に変異している遺伝子を挙げることができる。疾患としては、例えば、循環器疾患（例えば、高血圧症、心肥大、狭心症、動脈硬化症、高コレステロール血症等）、癌（例えば、肝臓癌、等）、呼吸器疾患（例えば、肺炎、気管支炎、喘息、慢性閉塞性肺疾患、肺線維症等）、糖尿病、糖尿病網膜症、糖尿病性腎症、貧血（例えば、慢性疾患に伴う貧血、鉄不応性鉄欠乏性貧血等）、加齢性黄斑変性症、免疫系疾患（例えば、自己免疫疾患、免疫不全、白血病等）、肝臓・胆のう疾患（例えば、非アルコール性脂肪性肝炎、肝硬変、肝炎、肝不全、胆汁うっ滞症、結石等）、消化管疾患（例えば、潰瘍、腸炎、吸収不良等）、感染症、肥満、線維症（例えば、肝線維症等）を挙げることができる。

【0117】

これらの疾患の原因遺伝子としては、例えば、kinesin spindle protein (KSP)、vascular endothelial growth factor (VEGF)、transthyretin (TTR)、proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9)、polo-like kinase 1 (PLK-1)、ApoB-100、ribonucleotide reductase M2 subunit (RRM2)、clusterin、heat shock protein 27 (Hsp27)、survivin、eukaryotic initiation factor-4E (eIF-4E)、alpha subunit of the interleukin 4 recepto

r (IL-4R- α)、Factor XI、Factor VII、N-ras、H-ras、K-ras、bcl-2、bcl-xL、Her-1、Her-2、Her-3、Her-4、MDR-1、ヒト β -カテニン遺伝子、DDX3 (DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3, X-linked)、Myeloid Cell Leukemia Sequence 1 (MCL1) 遺伝子、PKR (Eif2ak2)、Hsp47 (Serpinh1)、Hepcidin、活性化プロテインC (APC)、signal transducer and activator of transcription (STAT3)、Collagen, type I, α 1 (Col1A1)、ApoC-III、angiopoietin-like 3 protein (ANGPTL3)、growth hormone receptor (GHR)、prekallikrein (PKK)、transmembrane protease, serine 6 (TMPRSS6)、lipoprotein(a)、glucagon receptors、or diacylglycerol acyltransferase 2 (DGAT2)、angiotensinogen、complement factor B (FB)、aminolevulinic acid synthase 1 (ALAS1)、antithrombin (AT)、Primary Hyperoxaluria Type 1 (PH1)、C5 component of the complement、 α -1 antitrypsin (AAT)、hepatitis B virus (HBV) genomeを挙げることが出来るがこれらに限定されない。

【0118】

1-3. 2本鎖オリゴヌクレオチド

本発明の核酸が標的遺伝子に対してRNA干渉作用を有する核酸である場合には、核酸のRNA干渉作用を有する限りにおいてその構造及び化学修飾に制限は無いが、例えば、siRNA (例えば、WO2002/044321、Current Opinion in Chemical Biology 570-579、参照)、RNAと2'-OMeRNAを交互に結合したオリゴヌクレオチドからなるAtuRNAi (例えばWO2004/015107参照)、以下の3-4-1の項で説明する、DNAと2'-OMeRNAが交互に結合したオリゴヌクレオチドにおいてセンス鎖とアンチセンス鎖が異なる種類の核酸がワトソン-クリック塩基対で2本鎖を形成している2本鎖オリゴヌクレオチド (例えば、WO2010/001909参照)、以下の3-4-2の項で説明する、オリゴヌクレオチドの末端が修飾された核酸 (例えば、WO2010/052715参照)、及び、以下の3-4-3の項で説明する、アンチセンス鎖ポリヌクレオチドの5'末端とセンス鎖オリゴヌクレオチドの3'末端の各々がリンカーを介して結合し1本鎖となり、さらに分子内でワトソン-クリック塩基対を形成して2本鎖構造を有する1本鎖オリゴヌクレオチド (例えば、WO2012/074038参照)等を挙げることができる。

【0119】

本明細書中において、「標的遺伝子と同一のヌクレオチド配列からなる」とは、標的遺伝子の少なくとも一部のヌクレオチド配列と同一の配列からなることをいうが、完全に同一の配列に加え、標的遺伝子に対するRNA干渉作用及び／又は遺伝子発現抑制作用を有する限りにおいて、実質的に同一な配列も含む。「標的遺伝子と相補的なヌクレオチド配列からなる」とは、標的遺伝子の少なくとも一部のヌクレオチド配列と相補的な配列からなることをいうが、完全に相補的な配列に加え、標的遺伝子に対するRNA干渉作用及び／又は遺伝子発現抑制作用を有する限りにおいて、実質的に同一な配列も含む。また、標的遺伝子にSNPs等が知られている場合、それらの変異を有する配列も同一のヌクレオチド配列に含まれる。本明細書中において、標的遺伝子と相補的なヌクレオチド配列を含み標的遺伝子に対してRNA干渉作用及び／又は遺伝子発現抑制作用を有するポリヌクレオチドを標的遺伝子に対するオリゴヌクレオチドという。

【0120】

本発明の核酸のヌクレオチド配列は、標的遺伝子に対するRNA干渉作用及び／又は遺伝子発現抑制作用を有する限りにおいて特に制限されないが、例えば、コンピュータソフトウェア (例えば、GENETYX (登録商標): GENETYX CORPORATION製等。)を用いて標的遺伝子に対するRNA干渉作用を有すると予想された配列に基づいてセンス鎖及びアンチセンス鎖の配列を決定することによって決定することもでき

るし、更に選択された配列に基づいて作製したオリゴヌクレオチドのRNA干渉作用及び／又は遺伝子発現抑制作用を確認することによって決定することもできる。

【0121】

RNA干渉作用を有する2本鎖オリゴヌクレオチドのセンス鎖及びアンチセンス鎖の鎖長は、RNA干渉作用及び／又は遺伝子発現抑制作用を有する限り、10ヌクレオチドから標的遺伝子のオープンリーディングフレーム（ORF）の全長までのいかなる長さ、好ましくは、18ヌクレオチドから、標的遺伝子のオープンリーディングフレーム（ORF）の全長までのいかなる長さ、更に好ましくは10から100ヌクレオチドであり、更に好ましくは15～30ヌクレオチドである。

【0122】

RNA干渉作用を有する2本鎖オリゴヌクレオチドとして、DNAと2'-OMe RNAが交互に結合したオリゴヌクレオチドにおいてセンス鎖とアンチセンス鎖が異なる種類の核酸でワトソン・クリック結合をしている2本鎖オリゴヌクレオチド（WO2010/001909）を用いる場合には、センス鎖としては、18～21の鎖長のものが好ましく、18～19の鎖長のものが更に好ましい。アンチセンス鎖としては、19～21の鎖長のものが好ましく、21鎖長のものが更に好ましい。またその全体が2本鎖構造である必要はなく5'及び／又は3'末端が一部突出したものも含み、その突出末端は1～5ヌクレオチド、好ましくは1～3ヌクレオチド、さらに好ましくは2ヌクレオチドである。また、最も好ましい例としては、アンチセンス鎖のオリゴヌクレオチドの3'末端が2ヌクレオチド突出している（オーバーハング構造）構造を有し、18塩基対を形成しているポリヌクレオチドが挙げられる。

【0123】

1-3-1. DNAと2'-OMe RNAが交互に結合したオリゴヌクレオチド

本発明の核酸脂質粒子に含まれる核酸の一例としては、DNAと2'-OMe RNAが交互に結合したオリゴヌクレオチドにおいてセンス鎖とアンチセンス鎖が異なる種類の核酸でワトソン・クリック結合をしている2本鎖オリゴヌクレオチドを挙げることができる。

【0124】

そのような2本鎖オリゴヌクレオチドの具体例としては、例えば、WO2010/001909、WO2010/001909などに記載された2本鎖オリゴヌクレオチドが挙げられる。

【0125】

1-3-2. 修飾2本鎖オリゴヌクレオチド

核酸脂質粒子に含まれる核酸としてRNA干渉作用を有する核酸を用いる場合には、RNA干渉作用を有する限りにおいて、オリゴヌクレオチドの末端が修飾された核酸もその一例として挙げることができる。例えば、siRNA、A tuRNA i、DNAと2'-OMe RNAが交互に結合したオリゴヌクレオチドにおいてセンス鎖とアンチセンス鎖が異なる種類の核酸でワトソン・クリック結合をしている2本鎖オリゴヌクレオチド（例えば、WO2010/001909参照）等のRNA干渉作用を有する2本鎖オリゴヌクレオチドにおいて、アンチセンス鎖の5'末端のリン酸基が5'アリアルリン酸基に修飾されている2本鎖オリゴヌクレオチド（例えば、WO2010/052715参照）を挙げることができる。

【0126】

そのような修飾2本鎖オリゴヌクレオチドの具体例としては、例えば、WO2010/052715、WO2015/005253に記載された修飾2本鎖オリゴヌクレオチドが挙げられる。

【0127】

1-4. 1本鎖オリゴヌクレオチド

1-4-1. RNA干渉1本鎖ヌクレオチド

本発明に用いられる核酸としては、RNA干渉作用を有する限りにおいて、標的遺伝子に対するセンス鎖オリゴヌクレオチド、及び該センス鎖オリゴヌクレオチドに相補的な塩基

10

20

30

40

50

配列を有するアンチセンス鎖オリゴヌクレオチドを有するオリゴヌクレオチドであって、該アンチセンス鎖オリゴヌクレオチドの5'末端と該センス鎖オリゴヌクレオチドの3'末端の各々において、リン酸ジエステル構造を形成したリンカーによって結合された1本鎖構造を有するオリゴヌクレオチドも含まれる（例えば、WO 2 0 1 2 / 0 7 4 0 3 8 参照）。

【0128】

そのような化合物の具体例としては、例えば、WO 2 0 1 2 / 0 7 4 0 3 8、WO 2 0 1 5 / 0 0 5 2 5 3に記載のものを挙げることができる。

【0129】

1-4-2. アンチセンスヌクレオチド

アンチセンスヌクレオチドは、遺伝子の変異に起因する疾患の治療において、当該変異遺伝子の発現を正常化又は抑制することによって治療可能な疾患の治療を目的に適用される。遺伝子発現を抑制する場合、標的遺伝子のmRNAの一部に対して相補的な配列を有し、その配列の中ほどの核酸がDNAであるヌクレオチドが用いられる。このような発現抑制用アンチセンスヌクレオチドは、標的遺伝子のmRNAと2本鎖を形成する。形成された二本鎖体中のRNA/DNA二本鎖構造は、生体内のRNase Hにより特異的に分解されるため、標的遺伝子のmRNAが特異的に破壊され、その結果表劇遺伝子の発現が抑制される。

【0130】

遺伝子発現を正常化することを目的としたアンチセンスヌクレオチドとしては、異常スプライシングを抑制するもの、遺伝子上の変異箇所を正常な配列に回復するものなどがある。遺伝子上の変異を正常な配列へ回復させる場合、アンチセンスヌクレオチドの3'側には、標的遺伝子のセンス鎖における変異箇所の5'側領域に対するアンチセンス配列を有し、その5'側にヌクレアーゼが会合するヘアピン構造（2箇所の互いに相補的な配列が中間のリンカー／ループ配列でつながった配列）を構成する配列を有する。このようなヌクレオチドによって、3'側のアンチセンス領域が標的遺伝子（mRNA又はゲノムDNAのセンス鎖）の変異箇所へヌクレアーゼを導くガイドRNAとして機能する。この現象はCRISPR-Casシステムとして知られるゲノム編集技術と類似しており、様々な遺伝子編集に適用できることが広く知られている。

【0131】

遺伝子変異により異常なスプライシングが発生するメカニズムは、プレmRNAから成熟mRNAへのスプライシング過程において、変異によって、正常のプレmRNAでは結合しない箇所をスプライシング因子が誤って認識し、結合することによって、異常なスプライシングを受けたmRNAが発現することで、標的遺伝子から発現するタンパク質に機能不良又は発現不良が生じる。この、変異プレmRNA上のスプライシング因子が誤認識する領域にアンチセンスヌクレオチドが結合すると、スプライシング因子が当該領域を認識できず、異常なスプライシングが抑制される。このような遺伝子変異による異常スプライシングに起因する疾患としては、下記に詳述する糖原病1a型のG6PC遺伝子におけるc.648G>T変異に起因する異常スプライシングを抑制するアンチセンスオリゴヌクレオチド、その他公知の様々な疾患治療用のアンチセンスオリゴヌクレオチドが挙げられる。

【0132】

本発明は、糖原病Ia型患者のうち、c.648G>T変異を有したG6PC遺伝子をmRNAレベルで修復し、正常なG6PCタンパク質を発現させることができるオリゴヌクレオチド又はその製薬上許容される塩を提供する。本発明のオリゴヌクレオチドは、c.648G>T変異を有するG6PC遺伝子のcDNAに相補的なヌクレオチド配列からなる塩基数15～30のオリゴヌクレオチドであって、c.648G>T変異を有するG6PC遺伝子のエクソン5の5'末端から82番目乃至92番目のいずれかの部位を含む領域に相補的な配列からなる。

【0133】

本発明において、糖原病Ia型患者のうち、c.648G>T変異をする患者を対象にすることができる。c.648G>T変異のホモ接合の患者のみならず、c.648G>T変異と他の変異

10

20

30

40

50

の複合ヘテロ接合の患者も対象にすることができる。

【0134】

G6PC遺伝子のc.648G>T変異は、Homo sapiens glucose-6-phosphatase catalytic subunit (G6PC), transcript variant 1, mRNA (NCBI-GenBank accession No. NM_000151.3)のヌクレオチド番号728のGからTへの変異である。エクソン5の5'末端から86番目に位置する。本発明のオリゴヌクレオチドは、c.648G>T変異を有するG6PC遺伝子のエクソン5の5'末端から86番目乃至92番目のいずれかの部位を含む領域に相補的な配列からなるとよく、92番目の部位を含む領域に相補的な配列からなることが好ましい。

【0135】

c.648G>T変異を有するG6PC遺伝子のcDNAに相補的なヌクレオチド配列からなる塩基数15～30のオリゴヌクレオチドであって、c.648G>T変異を有するG6PC遺伝子のエクソン5の5'末端から82番目乃至92番目のいずれかの部位を含む領域に相補的な配列からなる前記オリゴヌクレオチドとしては、配列番号1～32、40～42、44～48のいずれかの配列（但し、配列中のt又はTは、u又はUであってもよく、u又はUは、t又はTであってもよい）の全部又は一部を含むものを例示することができる。本発明において「配列の一部」とは、通常、当該配列全体の80%以上であり、好適には、85%であり、さらに好適には、90%であり、最も好適には、94%である。本発明のオリゴヌクレオチドの塩基数は、15～30が適当であり、15～21が好ましく、15～18がより好ましい。

【0136】

本発明のオリゴヌクレオチドを構成するヌクレオチドは、天然型DNA、天然型RNA、DNA/RNAのキメラ、これらの修飾体のいずれであってもよいが、少なくとも1つが修飾ヌクレオチドであることが好ましい。

【0137】

本発明における修飾ヌクレオチドとしては、糖が修飾されたもの（例えば、D-リボフラノースが2'-O-アルキル化されたもの、D-リボフラノースが2'-O, 4'-C-アルキレン化されたもの、D-リボフラノースが2',4'-架橋されたもの）、リン酸ジエステル結合が修飾（例えば、チオエート化）されたもの、塩基が修飾されたもの、それらを組み合わせたものなどを例示することができる。アンチセンスオリゴヌクレオチドを構成する少なくとも1個のD-リボフラノースが2'-O-アルキル化されたものや2'-O,4'-C-アルキレン化されたものは、RNAに対する結合力が高いこと、ヌクレアーゼに対する耐性が高いことから、天然型のヌクレオチド（すなわち、オリゴDNA、オリゴRNA）より高い治療効果が期待できる。また、オリゴヌクレオチドを構成する少なくとも1個のリン酸ジエステル結合がチオエート化されたものも、ヌクレアーゼに対する耐性が高いことから、天然型のヌクレオチド（すなわち、オリゴDNA、オリゴRNA）より高い治療効果が期待できる。上記のような修飾された糖と修飾されたリン酸ジエステル結合の両者を含むオリゴヌクレオチドは、ヌクレアーゼに対する耐性がより高いことから、さらに高い治療効果が期待できる。

【0138】

本発明のオリゴヌクレオチドについて、糖の修飾の例としては、D-リボフラノースの2'-O-アルキル化（例えば、2'-O-メチル化、2'-O-アミノエチル化、2'-O-プロピル化、2'-O-アリル化、2'-O-メトキシエチル化、2'-O-ブチル化、2'-O-ペンチル化、2'-O-プロパルギル化など）、D-リボフラノースの2'-O,4'-C-アルキレン化（例えば、2'-O,4'-C-エチレン化、2'-O,4'-C-メチレン化、2'-O,4'-C-プロピレン化、2'-O,4'-C-テトラメチレン化、2'-O,4'-C-ペンタメチレン化など）、D-リボフラノースの2'-デオキシ-2'-C,4'-C-メチレンオキシメチレン化、S-cEt (2',4'-constrained ethyl)、AmNA (Amide-bridged nucleic acid)、3'-デオキシ-3'-アミノ-2'-デオキシ-D-リボフラノース、3'-デオキシ-3'-アミノ-2'-デオキシ-2'-フルオロ-D-リボフラノースなどを挙げることができる。

【0139】

本発明のオリゴヌクレオチドについて、糖の2',4'-架橋修飾の例としては、D-リボフラ

10

20

30

40

50

ノースの2'-O,4'-C-アルキレン化（例えば、2'-O,4'-C-エチレン化、2'-O,4'-C-メチレン化、2'-O,4'-C-プロピレン化、2'-O,4'-C-テトラメチレン化、2'-O,4'-C-ペンタメチレン化など）、D-リボフラノースの2'-デオキシ-2'-C,4'-C-メチレンオキシメチレン化、S-cEt（2',4'-constrained ethyl）、AmNAなどを挙げることができる。

【0140】

本発明のオリゴヌクレオチドについて、リン酸ジエステル結合の修飾の例としては、ホスホロチオエート結合、メチルホスホネート結合、メチルチオホスホネート結合、ホスホロジチオエート結合、ホスホロアミデート結合などを挙げることができる。

【0141】

本発明において、塩基の修飾の例としては、シトシンの5-メチル化、5-フルオロ化、5-ブロモ化、5-ヨード化、N4-メチル化、チミンの5-デメチル化（ウラシル）、5-フルオロ化、5-ブロモ化、5-ヨード化、アデニンのN6-メチル化、8-ブロモ化、グアニンのN2-メチル化、8-ブロモ化などを挙げることができる。

【0142】

本発明のオリゴヌクレオチドは、市販の合成機（例えば、パーキンエルマー社のホスホロアミダイト法によるモデル392）などを用いて、文献（Nucleic Acids Research, 12, 4539 (1984)）に記載の方法に準じて合成することができる。その際に用いられるヌクレオシド ホスホロアミダイト試薬は、天然型のヌクレオシド及び2'-O-メチルヌクレオシド（すなわち、2'-O-メチルグアノシン、2'-O-メチルアデノシン、2'-O-メチルシチジン、2'-O-メチルウリジン）については、市販の試薬を用いることができる。アルキル基の炭素数が2～6個の2'-O-アルキルグアノシン、アデノシン、シチジンおよびウリジンについては、以下の通りである。

【0143】

2'-O-アミノエチルグアノシン、アデノシン、シチジン、ウリジンは、文献（Blommers et al. Biochemistry (1998), 37, 17714-17725.）に従って合成できる。

【0144】

2'-O-プロピルグアノシン、アデノシン、シチジン、ウリジンは、文献（Lesnik, E.A. et al. Biochemistry (1993), 32, 7832-7838.）に従って合成できる。

【0145】

2'-O-アリルグアノシン、アデノシン、シチジン、ウリジンは、市販の試薬を用いることができる。

【0146】

2'-O-メトキシエチルグアノシン、アデノシン、シチジン、ウリジンは、特許（US6261840）または、文献（Martin, P. Helv. Chim. Acta. (1995) 78, 486-504.）に従って合成できる。

【0147】

2'-O-ブチルグアノシン、アデノシン、シチジン、ウリジンは、文献（Lesnik, E.A. et al. Biochemistry (1993), 32, 7832-7838.）に従って合成できる。

【0148】

2'-O-ペンチルグアノシン、アデノシン、シチジン、ウリジンは、文献（Lesnik, E.A. et al. Biochemistry (1993), 32, 7832-7838.）に従って合成できる。

【0149】

2'-O-プロパルギルグアノシン、アデノシン、シチジン、ウリジンは、市販の試薬を用いることができる。

【0150】

2'-O, 4'-C-メチレングアノシン、アデノシン、シチジン、5-メチルシチジンおよびチミジンについては、W099/14226に記載の方法に従って、アルキレン基の炭素数が2～5個の2'-O, 4'-C-アルキレングアノシン、アデノシン、シチジン、5-メチルシチジンおよびチミジンについては、W000/47599に記載の方法に従って製造することができる。

【0151】

10

20

30

40

50

D-リボフラノースの2'-デオキシ-2'-C,4'-C-メチレンオキシメチレン化されたヌクレオシドは、文献 (Wang,G. et al. Tetrahedron (1999), 55, 7707-7724)に従って合成できる。

【0152】

S-cEt (constrained ethyl) は、文献 (Seth,P.P. et al. J.Org.Chem (2010), 75, 1569-1581.)に従って合成できる。

【0153】

AmNAは、文献 (Yahara,A. et al. ChemBioChem (2012), 13, 2513-2516.) または、WO2014/109384に従って合成できる。

【0154】

本発明において、核酸塩基配列は、アデニンを(A)又は(a)、グアニンを(G)又は(g)、シトシンを(C)又は(c)、チミンを(T)又は(t)、及び、ウラシルを(U)又は(u)とそれぞれ記載することができる。シトシンの代わりに、5-メチルシトシンを使うことができる。核酸塩基のうち、ウラシル(U)又は(u)とチミン(T)又は(t)は、互換性がある。ウラシル(U)又は(u)とチミン(T)又は(t)のどちらも、相補鎖のアデニン(A)又は(a)との塩基対形成に使うことができる。

【0155】

ヌクレオシド ホスホロアミダイト試薬をカップリング後、硫黄、テトラエチルチウラムジスルフィド (TETD、アプライドバイオシステム社)、Beaucage試薬 (Glen Research社)、または、キサンタンヒドリドなどの試薬を反応させることにより、ホスホロチオエート結合を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドを合成することができる (Tetrahedron Letters, 32, 3005 (1991), J. Am. Chem. Soc. 112, 1253 (1990), PCT/WO98/54198)。

【0156】

合成機で用いるコントロールド ポア グラス (CPG) としては、2'-O-メチルヌクレオシドの結合したものは、市販のものを利用することができる。また、2'-O,4'-C-メチレングアノシン、アデノシン、5-メチルシチジンおよびチミジンについては、WO99/14226に記載の方法に従って、アルキレン基の炭素数が2~5個の2'-O, 4'-C-アルキレングアノシン、アデノシン、5-メチルシチジンおよびチミジンについては、WO00/47599に記載の方法に従って製造したヌクレオシドを文献 (Oligonucleotide Synthesis, Edited by M.J.Gait, Oxford University Press, 1984)に従って、CPGに結合することができる。修飾されたCPG (特開平7-87982の実施例12bに記載) を用いることにより、3'末端に2-ヒドロキシエチルリン酸基が結合したオリゴヌクレオチドを合成できる。また、3'-amino-Modifier C3 CPG, 3'-amino-Modifier C7 CPG, Glyceryl CPG, (Glen Research), 3'-spacer C3 SynBase CPG 1000, 3'-spacer C9 SynBase CPG 1000 (link technologies) を使えば、3'末端にヒドロキシアシルリン酸基、または、アミノアシルリン酸基が結合したオリゴヌクレオチドを合成できる。

【0157】

<2. GalNAcユニット>

本発明のコンジュゲートにおいて、オリゴヌクレオチドはGalNAcがリンカー及びリン酸基を介して結合していてもよい。

【0158】

本発明におけるGalNAcユニットとは、GalNAcが結合したリンカーが結合したリン酸基であり、更に、1個の結合手を有してよい。GalNAcユニットのリン酸基は、オリゴヌクレオチドの5'末端及び／又は3'末端と結合することができ、好適には、オリゴヌクレオチドの5'末端に結合する。GalNAcユニットが結合手を有する場合、当該結合手は、水酸基、GalNAc、GalNAcが結合したリンカー、他のGalNAcユニットのリン酸基、又は、オリゴヌクレオチドの3'末端のリン酸基と結合することができる。1個のGalNAcユニットに含有されるGalNAcの数としては2個である。

【0159】

コンジュゲートにおいて、1個のGalNAcユニットがオリゴヌクレオチドに結合してもよく、複数のGalNAcユニットが連続して結合して、オリゴヌクレオチドに結合してもよい。1つのオリゴヌクレオチドに結合するGalNAcユニットの数としては、好適には、1乃至7個であり、より好適には、1乃至5個であり、特に好適には、1乃至3個であり、最適個数は1個である。

【0160】

本発明で、2つのGalNAcユニットをオリゴヌクレオチドの5'末端に導入する場合には、Symmetric Doubler Phosphoramidite (1,3-bis-[5-(4,4'-dimethoxytrityloxy)pentylamido]propyl-2-[(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)]-phosphoramidite, Glen Research)などをオリゴヌクレオチド合成時に用い、3つのGalNAcユニットをオリゴヌクレオチドの5'末端に導入する場合には、Treble Phosphoramidite (Tris-2,2,2-[3-(4,4'-dimethoxytrityloxy)propyloxymethyl]ethyl-[(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)]-phosphoramidite, Glen Research), または、Long Treble Phosphoramidite (Tris-2,2,2-[3-(4,4'-dimethoxytrityloxy)propyloxymethyl]methylenoxypropyl-[(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)]-phosphoramidite, Glen Research)などをオリゴヌクレオチド合成時に用いることで合成できる。4つのGalNAcユニットをオリゴヌクレオチドの5'末端に導入する場合には、Symmetric Doubler Phosphoramiditeなどをオリゴヌクレオチド合成時に2回カップリングして用いることで、合成できる。5つのGalNAcユニットをオリゴヌクレオチドの5'末端に導入する場合には、Symmetric Doubler Phosphoramidite、及び、Treble Phosphoramidite または、Long Treble Phosphoramiditeをオリゴヌクレオチド合成時に1回ずつカップリングして用いることで、合成することができる。5つ以上のGalNAcユニットをオリゴヌクレオチドの5'末端に導入する場合には、Symmetric Doubler Phosphoramidite、Treble Phosphoramidite または、Long Treble Phosphoramiditeを適宜組み合わせ、合成することができる。

【0161】

本発明で、GalNAcユニットをオリゴヌクレオチドの3'末端に導入する場合には、Asymmetric Doubler (Lev) Phosphoramidite (1-[5-(4,4'-dimethoxytrityloxy)pentylamido]-3-[5-levulinyloxypentylamido]-propyl-2-[(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)]-phosphoramidite, Glen Research)などをオリゴヌクレオチド合成時に用いることで合成できる。具体的には、市販のUnylinker Support (例えば、Glen UnySupport 1000, Glen Research)にAsymmetric Doubler (Lev) Phosphoramiditeをカップリングし、DMTr基を除去後、目的のオリゴヌクレオチドの鎖伸長を行う。目的の鎖長に達成した後に、Asymmetric Doubler (Lev) Phosphoramidite試薬に添付されたプロトコールに従って、levulinyl基をヒトラジン等の試薬を用いて脱保護し、GalNAcユニットをカップリングすることでオリゴヌクレオチドの3'末端に導入することができる。

【0162】

本発明では、GalNAcユニットと結合するオリゴヌクレオチドの5'末端及び／又は3'末端に、薬効を発現するオリゴヌクレオチドとは異なる塩基配列であって、リン酸ジエステル結合からなり、生体内で切断されうる付加的なオリゴヌクレオチド配列を有してよい。切断されうるオリゴヌクレオチドの鎖長としては、1乃至6ヌクレオチドが好適であり、さらに好適には、1乃至3ヌクレオチドである。切断されうるオリゴヌクレオチドは、切断されうるものであれば、特に限定はないが、すべてがDNAからなる天然型オリゴデオキシヌクレオチド、及び、すべてがRNAからなる天然型オリゴヌクレオチドなどをあげることができる。塩基配列としては、切断されうる配列であれば、特に限定はないが、5'-TCATCA-3'、5'-CATCA-3'、5'-ATCA-3'、5'-TCA-3'、5'-CA-3'、5'-A-3'などを挙げることができる。

【0163】

一つの態様において、本発明における2分岐GalNAcユニットは、下記式

【0164】

10

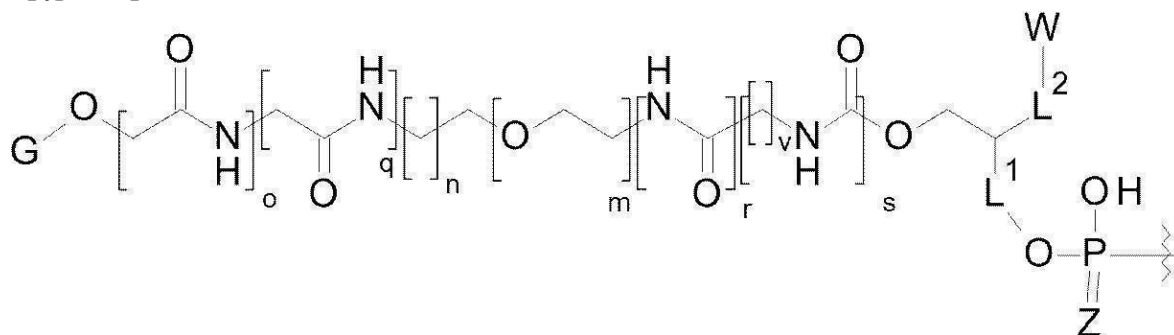
20

30

40

50

【化 4 4】



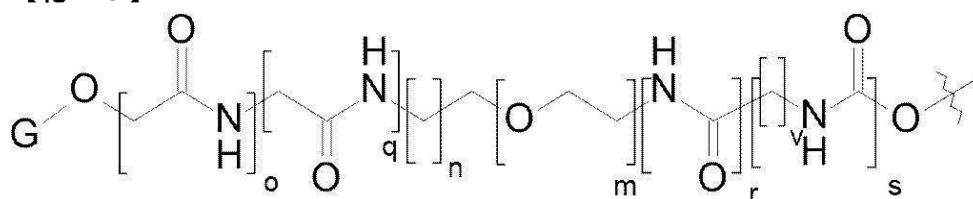
10

【 0 1 6 5】

【式中、Wは、式

【 0 1 6 6】

【化 4 5】



20

【 0 1 6 7】

で表される基であり、Gは5-アセトアミド-2-ヒドロキシメチル-3,4-ジヒドロキシテトラヒドロピラン-6-イル基 (GalNAc) を示し、Zは酸素原子又は硫黄原子を示し、 L^1 及び L^2 は、一方がメチレン基 (CH_2) を示し、他方が原子を挟まないを示し、 o 、 q 、 r 及び s は互いに独立して0又は1を示し、 n は1～15の整数を示し、 m は0～5の整数を示し、 v は1～7を示す。但し、 n が1のとき m は0～5の整数であり、 n が2～15の整数のとき m は0である。】で表される基であり、好適には、 o および q が0である。

【 0 1 6 8】

上記式において、 L^1 及び L^2 は、好適には L^2 がメチレン基 (CH_2) を示し、 L^1 は原子を挟まない。 n は好適には1～10の整数、より好適には2～7の整数を示し、更に好適には2～4の整数である。 m は好適には0～3の整数である。 v は好適には1～5の整数である。より好適には、上記式において、 s が1であり、 n が2～7の整数であり、 m が0、1または2であり、 v が1～5の整数である基であり、更に好適には、上記式において、 s が1であり、 n が2または3であり、 m が0であり、 v が1～3の整数である基である。

30

【 0 1 6 9】

本発明の好適な2分岐GalNAcユニットは、リン酸基から3原子以内に、それぞれにグリセロール構造を有する2分岐構造を有し、それぞれの分岐鎖の末端にそれぞれGalNAcを有し、分岐点からGalNAcまでのリンカー構造はほぼ同一であり、GalNAc部とリン酸基部をつなぐリンカー骨格は15原子以下の長さで、ヘテロ原子の含有率が高く、且つ、連続するアルキル鎖長がC5以下であることにより、水に対して良好な溶解性を示す。

40

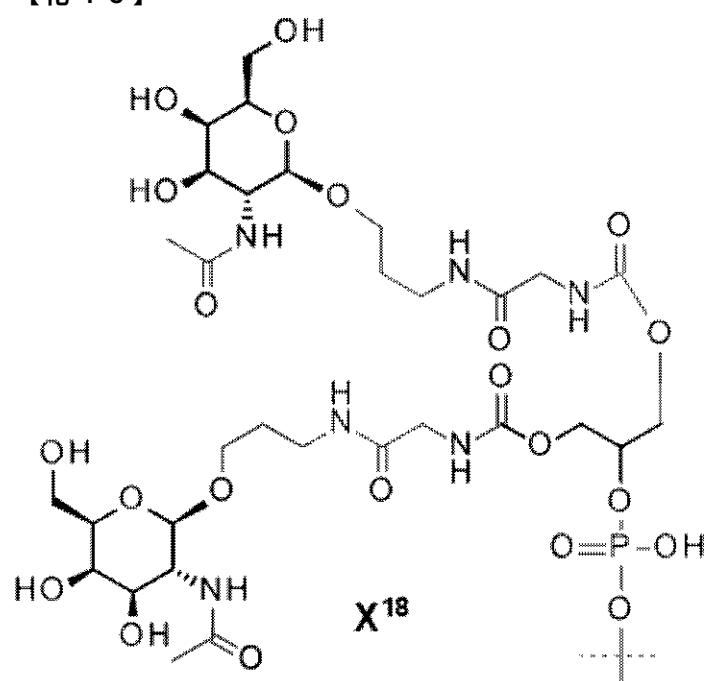
【 0 1 7 0】

本発明の2分岐GalNAcユニットの具体例としては、以下の式で表される基を挙げることができる。

【 0 1 7 1】

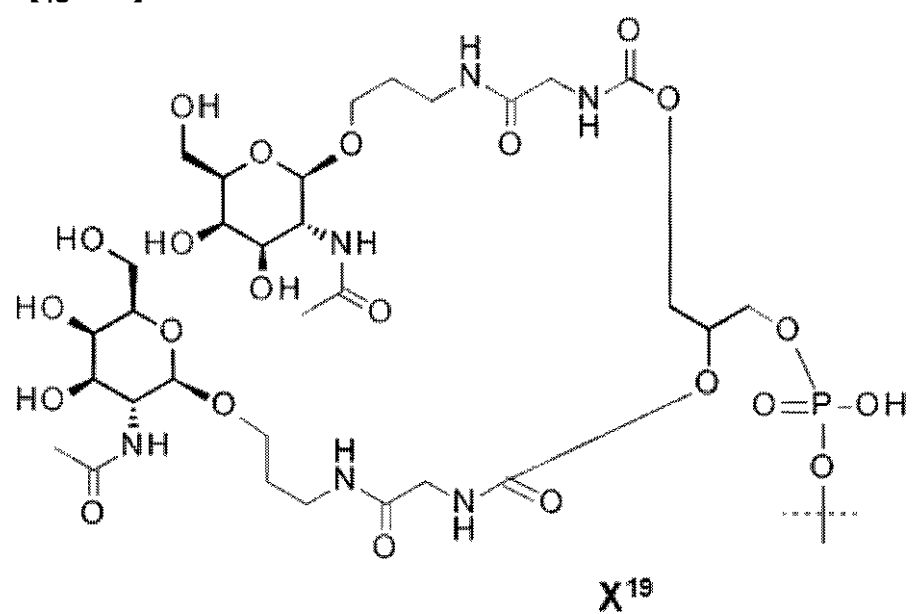
50

【化 4 6】



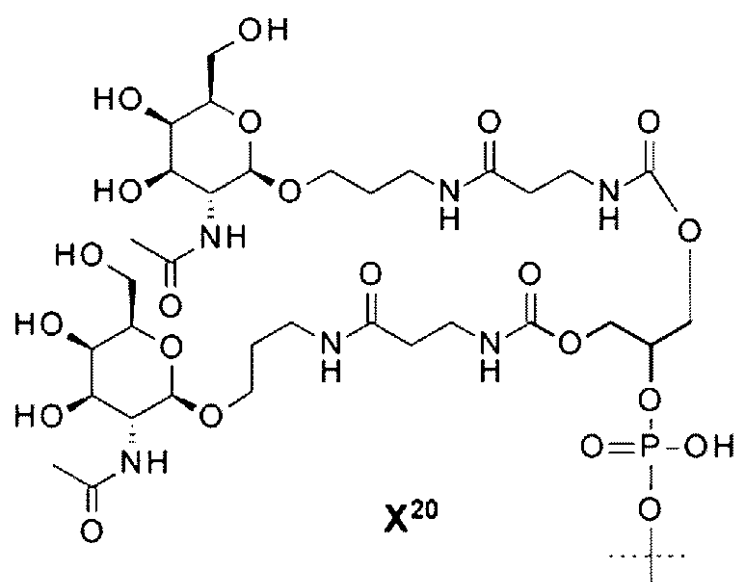
【 0 1 7 2】

【化 4 7】



【 0 1 7 3】

【化 4 8】

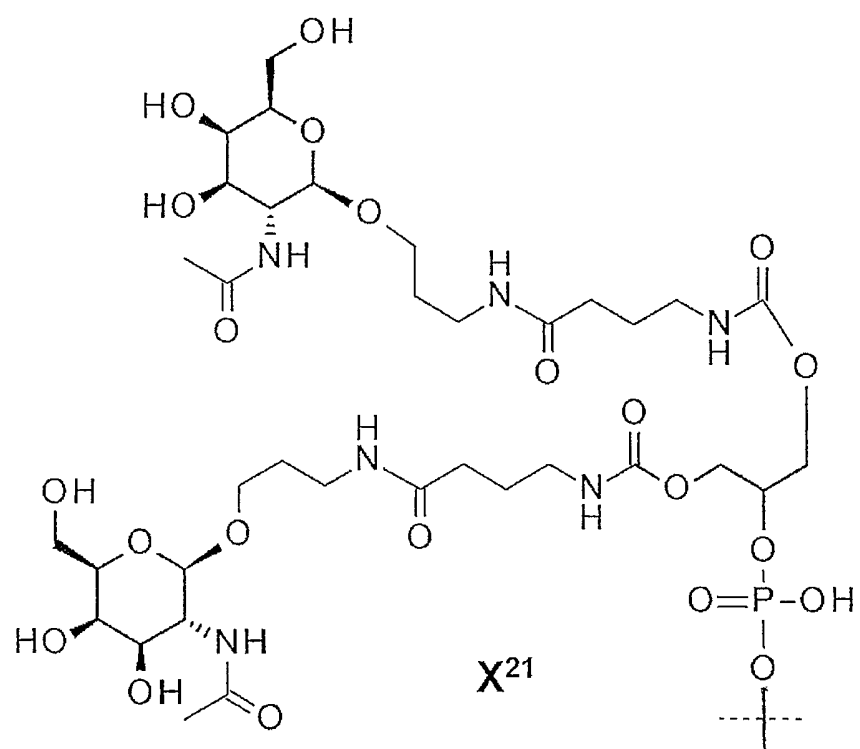


10

20

【 0 1 7 4】

【化 4 9】



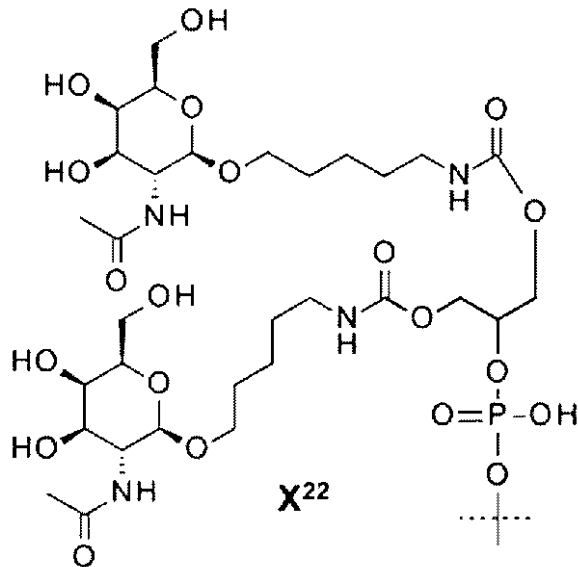
30

40

【 0 1 7 5】

50

【化 5 0】



【0176】

＜3. コンジュゲートの製造方法＞

本発明のGalNAcユニットが結合したオリゴヌクレオチドは、GalNAcユニットに含まれるホスホロアミダイト体をヌクレオシドのホスホロアミダイト試薬と同様に用いることにより、市販の合成機（例えば、パーキンエルマー社のホスホロアミダイト法によるモデル392）などを用いて、文献（Nucleic Acids Research, 12, 4539 (1984)）に記載の方法に準じて合成することができる。

【0177】

GalNAcユニット含有ホスホロアミダイトの合成法

本発明のGalNAcユニット含有ホスホロアミダイトあるいはH-ホスホネートは、後述するA法、あるいはB法に従って製造することができる。A法あるいはB法において、各反応終了後、各反応の目的化合物は常法に従って、反応混合物から採取される。例えば、反応混合物を適宜中和し、また、不溶物が存在する場合にはろ過により除去した後、水と酢酸エチルのような混和しない有機溶媒を加え、目的物を含む有機層を分離し、水などで洗浄後、無水硫酸ナトリウムなどで乾燥後、溶剤を留去することによって得られる。得られた化合物は、必要ならば、常法、例えばシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分離・精製することができる。あるいは、再沈殿、再結晶により精製することができる。ただし、 $r = 0$ の場合は、A法、B法の代わりにC法を用いる。

【0178】

〔A法〕

A法は、化合物（3）を利用して、分岐型の化合物（7）および化合物（7'）を製造するための方法である。化合物（1）の立体配置は限定しない。化合物（3）を用いることで、GalNAc部分の6位水酸基の保護基を適宜選択できる。 $r = 0$ の場合は、C法を用いる。

【0179】

10

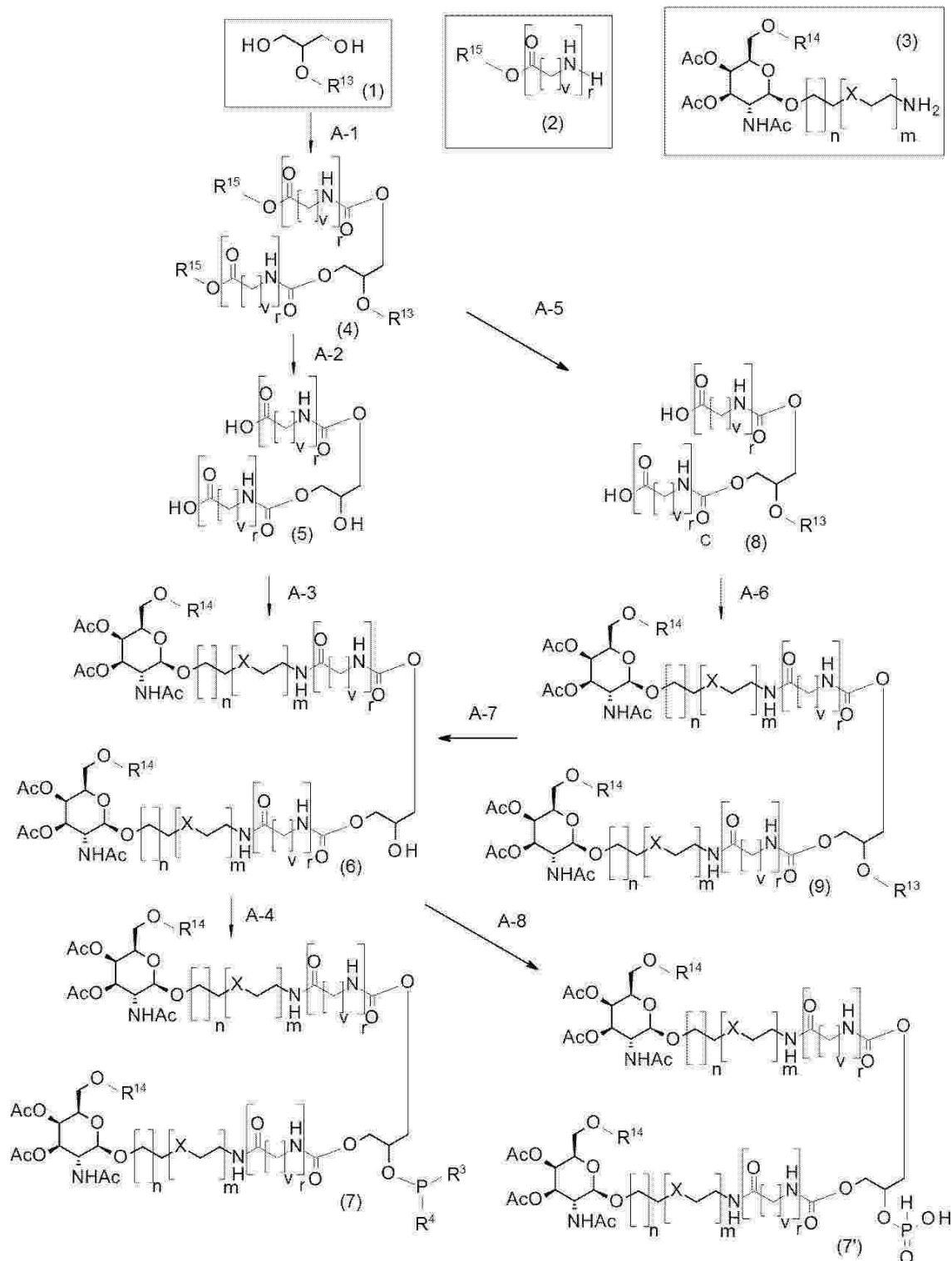
20

30

40

50

【化 5 1】



【 0 1 8 0 】

(式中 R^{13} は水酸基の一般的な保護基であるが、望ましくはベンジル基である。式中 R^{14} は水酸基の一般的な保護基であるが、望ましくはアセチル基、または疎水性保護基（より望ましくは、4,4'-ジメトキシトリチル基）である。式中 R^{15} はカルボニル基の一般的な保護基であるが、望ましくはベンジル基である。式中、 $-\text{P}(\text{R}^3)\text{R}^4$ は、 $[\text{R}^3$ 及び R^4 は、同一又は異なって、水酸基、保護された水酸基、メルカプト基、保護されたメルカプト基、アミノ基、炭素数 1 乃至 4 個のアルコキシ基、炭素数 1 乃至 4 個のアルキルチオ基、炭素数 1 乃至 5 個のシアノアルコキシ基又は炭素数 1 乃至 4 個のアルキル基で置換されたアミノ基を示す]を示す。式中 X は、炭素あるいは酸素である。式中 n は 1 ～ 15 の整数で

あり、 m は0～5の整数である。ただし、 n が1であるとき、 m は0～5の整数であり、 n が2～15の整数であるとき、 m は0である。式中 r は独立して、0か1である。式中 v は、1～7である。

【0181】

工程A-1は、カルバメート化する工程であり、不活性溶媒中、活性化剤、塩基の存在下、化合物(1)を活性エステルへと変換後、化合物(2)と反応させ、カルバメート化する。

【0182】

上記反応に使用される不活性溶媒としては、例えば、炭化水素類、芳香族炭化水素類、ハロゲン化炭化水素類、エーテル類などが挙げられ、好ましくは、ジクロロメタンである。

【0183】

上記反応に使用される活性化剤としては、活性化エステルを形成するものであれば特に限定されないが、例えば、炭酸ビス(ペンタフルオロフェニル)、炭酸ビス(4-ニトロフェニル)、4-ニトロフェニルクロロホルメートなどが挙げられる。好ましくは、4-ニトロフェニルクロロホルメートである。

【0184】

上記反応に使用される塩基としては、例えば、トリエチルアミン、 N,N -ジイソプロピルエチルアミン、ピリジン、4-ジメチルアミノピリジンなどが挙げられ、好ましくは、活性エステルを調製する際はピリジンを用い、続いてアミンと反応させる際は N,N -ジイソプロピルエチルアミンを追加する。

【0185】

反応温度は、活性化剤、塩基、不活性溶媒などにより異なるが、通常、 -20°C から還流温度である。好ましくは、 10°C から 30°C である。

【0186】

反応時間は、活性化剤、塩基、不活性溶媒、反応温度などにより異なるが、通常、15分から24時間、好ましくは1時間から4時間である。

【0187】

工程A-2は、保護基である R^{13} 及び R^{15} を除去する工程である。保護基の除去はその種類によって異なるが、一般に有機合成化学の技術において周知の方法、例えば、T.H.Green, P.G.Wuts, Protective Groups in organic Synthesis, Third Edition, 1999年, John Wiley & Sons, Inc.などに記載された方法のような常法に従って行うことができる。

【0188】

工程A-3は、不活性溶媒中、縮合剤、塩基の存在下、化合物(3)とアミド縮合する工程である。

【0189】

上記反応に使用される不活性溶媒は、使用する縮合剤の種類により適宜選ぶことができる。例えば、水、アルコール類、非プロトン性極性溶媒などが挙げられ、好ましくは、ジクロロメタン又は N,N -ジメチルホルムアミドである。

【0190】

上記反応に使用される塩基としては、例えば、トリエチルアミン、 N,N -ジイソプロピルエチルアミン、ピリジン、4-ジメチルアミノピリジンなどが挙げられ、好ましくは、 N,N -ジイソプロピルエチルアミンである。

【0191】

上記反応に使用される縮合剤としては、例えば、カルボジイミド系縮合剤のWSC(1-[3-(ジメチルアミノ)プロピル]-3-エチルカルボジイミド)、DIC(N,N' -ジイソプロピルカルボジイミド)、イミダゾール系縮合剤のCDI(N,N' -カルボニルジイミダゾール)、トリアジン系縮合剤のDMT-MM(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 n 水和物)、ウロニウム系縮合剤のHATU(0-(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リン酸

10

20

30

40

50

塩)、TSTU (O-(N-スクシンイミジル)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウム テトラフルオロホウ酸塩)、ホスホニウム系縮合剤のPyBOP (1H-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 ヘキサフルオロリン酸塩)などが挙げられ、好ましくは、WSC又はHATUである。また、必要に応じて、添加剤のHOAt (1-ヒドロキシ-7-アザベンゾトリアゾール)、HOBt (1-ヒドロキシベンゾトリアゾール)、Oxyma (エチル (ヒドロキシイミノ) シアノアセタート)を加えてもよい。

【0192】

反応温度は、縮合剤、塩基、溶媒などにより異なるが、通常、-20℃から還流温度である。好ましくは、10℃から30℃である。

【0193】

反応時間は、縮合剤、塩基、溶媒、反応温度などにより異なるが、通常、15分から72時間、好ましくは1時間から24時間である。

【0194】

工程A-4は、化合物(7)を製造する工程であり、不活性溶媒中、2-シアノエチルジイソプロピルクロロホスホロアミジトと塩基の存在下、化合物(6)の二級水酸基に-P(R³)R⁴を導入する。

【0195】

上記反応に使用される不活性溶媒としては、例えば、炭化水素類、芳香族炭化水素類、ハロゲン化炭化水素類、エーテル類、アセトニトリルなどが挙げられ、好ましくは、ジクロロメタンである。

【0196】

上記反応に使用される塩基としては、例えば、トリエチルアミン、N,N-ジイソプロピルエチルアミン、ピリジン、4-ジメチルアミノピリジンなどが挙げられ、好ましくは、N,N-ジイソプロピルエチルアミンである。

【0197】

反応温度は、塩基、不活性溶媒などにより異なるが、通常、-20℃から還流温度である。好ましくは、10℃から30℃である。

【0198】

反応時間は、塩基、不活性溶媒、反応温度などにより異なるが、通常、15分から24時間、好ましくは1時間から4時間である。

【0199】

工程A-5は、化合物(7)から化合物(8)を合成する工程で、保護基であるR¹⁵のみを除去する。保護基の除去はその種類によって異なるが、一般に有機合成化学の技術において周知の方法、例えば、T.H.Greene, P.G.Wuts, Protective Groups in organic Synthesis, Third Edition, 1999年, John Wiley & Sons, Inc.などに記載された方法のような常法に従って行うことができる。

【0200】

工程A-6は、化合物(8)をアミド化する工程である。前述の工程A-3と同様に行うことができる。

【0201】

工程A-7は、保護基であるR¹³を除去する工程である。保護基の除去はその種類によって異なるが、一般に有機合成化学の技術において周知の方法、例えば、T.H.Greene, P.G.Wuts, Protective Groups in organic Synthesis, Third Edition, 1999年, John Wiley & Sons, Inc.などに記載された方法のような常法に従って行うことができる。

【0202】

工程A-8は、化合物(6)からH-ホスホネート体である化合物(7')を合成する工程である。化合物(6)に、不活性溶剤中で、ホスホロアミダイト化の試薬の代わりに、例えばあらかじめ文献(B.C.Freohler, P.G.Ng and M.D.Matteucci, Nucleic Acids Res., 14 5399(1986))に従って三塩化リンと1, 2, 4-トリアゾールから調製したトリスー(1, 2, 4-トリアゾリル)ホスファイトを反応させた後、水を加えて反応を止め、後処

10

20

30

40

50

理をすることによって、H-ホスホネート体を得ることができる。用いられる溶媒としては反応を阻害しないものであれば特に限定はないが好適には塩化メチレンのようなハロゲン化炭化水素である。反応温度は $-20^{\circ}\sim 100^{\circ}\text{C}$ まで特に限定はないが通常は室温で実施する。反応時間は用いる溶媒、反応時間によって異なるが塩化メチレン中室温で反応させた場合は30分である。

【0203】

〔B法〕

B法は、化合物(3)を利用して、分岐型の化合物(14)および化合物(14')を製造するための方法である。化合物(10)の立体配置は限定しない。化合物(3)を用いることで、GalNAc部分の6位水酸基の保護基を適宜選択できる。 $r=0$ の場合は、C法を用いる。

【0204】

10

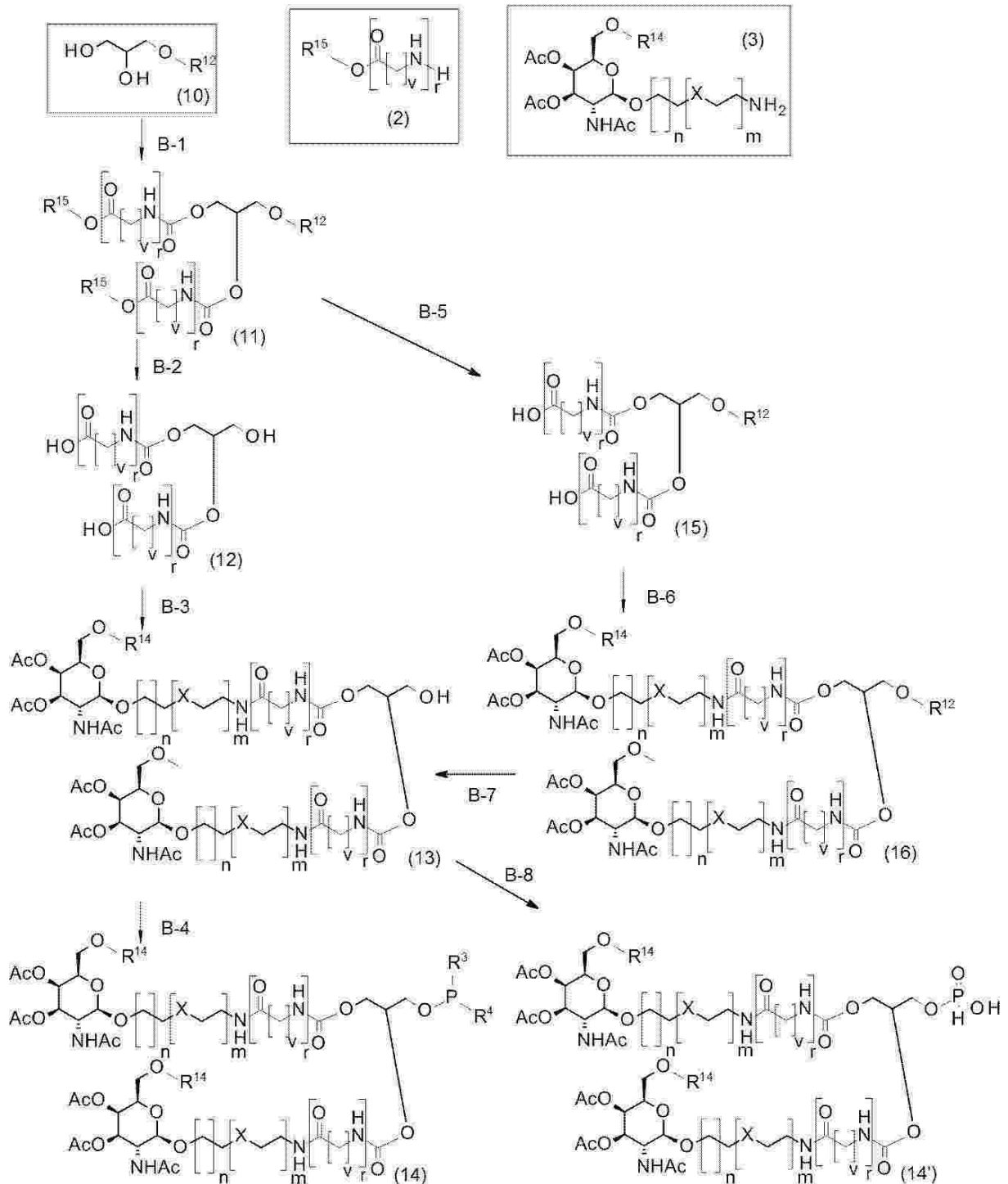
20

30

40

50

【化 5 2】



【 0 2 0 5 】

R^{12} は水酸基の一般的な保護基であるが、望ましくはベンジル基である。式中 R^3 、 R^4 、 X 、 n 、 m 、 r 、 v 、 R^{14} 及び R^{15} は、前記と同意義を示す。

【 0 2 0 6 】

工程B-1は、化合物(10)をカルバメート化する工程であり、前述の工程A-1と同様に行うことができる。

【 0 2 0 7 】

工程B-2は、保護基である R^{12} 及び R^{15} を除去する工程である。前述の工程A-2と同様に行うことができる。

【 0 2 0 8 】

工程B-3は、化合物(12)をアミド化する工程であり、前述の工程A-3と同様に

行うことができる。

【0209】

工程B-4は、化合物(13)の水酸基に $-P(R^3)R^4$ を導入する工程であり、前述の工程A-3と同様に行うことができる。

【0210】

工程B-5は、化合物(11)から化合物(15)を合成する工程で、保護基である R^{15} のみを除去する。前述の工程A-5と同様に行うことができる。

【0211】

工程B-6は、化合物(15)をアミド化する工程である。前述の工程A-6と同様に行うことができる。

【0212】

工程B-7は、保護基である R^{12} を除去する工程である。前述の工程A-7と同様に行うことができる。

【0213】

工程B-8は、化合物(13)から化合物(14')を合成する工程である。前述の工程A-8と同様に行うことができる。

【0214】

[C法]

C法は、化合物(3)を利用して、分岐型の化合物(19)あるいは化合物(22)、および化合物(19')あるいは化合物(22')を製造するための方法である。化合物(1)及び化合物(10)の立体配置は限定しない。化合物(3)を用いることで、GalNAc部分の6位水酸基の保護基を適宜選択できる。

【0215】

10

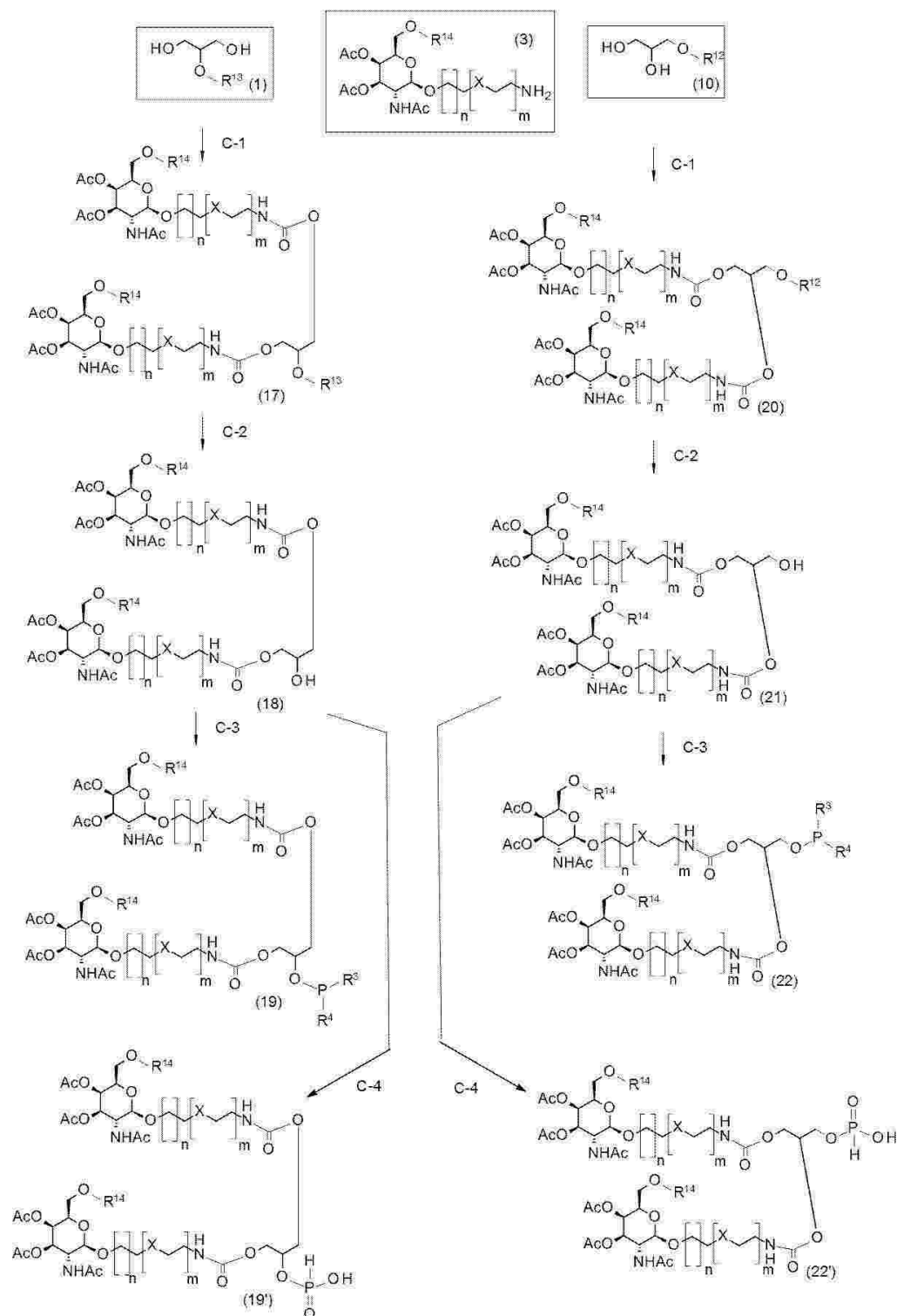
20

30

40

50

【化 5 3】



【 0 2 1 6 】

式中 R³、R⁴、X、n、m、r、R¹²、R¹³及び R¹⁴は、前記と同意義を示す。

【 0 2 1 7 】

工程 C-1 は、化合物 (1) あるいは化合物 (10) をカルバメート化する工程であり、化合物 (2) の代わりに化合物 (3) を用いて、前述の工程 A-1 と同様に行うことができる。

【 0 2 1 8 】

工程 C-2 は、保護基である R¹² あるいは R¹³ を除去する工程である。保護基の除去はその種類によって異なるが、一般に有機合成化学の技術において周知の方法、例えば、T.

10

20

30

40

50

H. Greene, P. G. Wuts, Protective Groups in organic Synthesis. Third Edition, 1999年, John Wiley & Sons, Inc.などに記載された方法のような常法に従って行うことができる。

【0219】

工程C-3は、化合物(19)あるいは化合物(22)の水酸基に $-P(R^3)R^4$ を導入する工程であり、前述の工程A-3と同様に行うことができる。

【0220】

工程C-4は、化合物(18)から化合物(19')を、あるいは化合物(21)から化合物(22')を合成する工程である。前述の工程A-8と同様に行うことができる。

【0221】

<4. 疎水性保護基を用いた製造方法>

本発明は、GalNAc部位の3位、4位、6位のいずれか一つ以上の水酸基上に疎水性が高い保護基が導入されたGalNAcユニットを合成オリゴヌクレオチドの5'末端または3'末端に結合させ、疎水性相互作用による吸着性を有する樹脂に吸着させることにより不純物と分離することで、GalNAcユニットとオリゴヌクレオチドのコンジュゲートを製造する方法及び当該製造方法に中間体として用いる疎水性保護基付加型GalNAcを含む結合用化合物(ホスホロアミダイト、H-ホスホネート)、コンジュゲートなどを提供する。

【0222】

本発明の製造方法は、以下の工程を含む。

a: オリゴヌクレオチドの5'末端または3'末端に疎水性保護基付加型GalNAcユニットーリン酸基を含む構造が結合したコンジュゲートを合成する工程、

b: 工程aの産物を含む溶液を疎水性相互作用による吸着性を有する樹脂を充填したカラムに通液し、当該カラムに水性洗浄液を通液する工程、及び、

c: 工程b後のカラムからオリゴヌクレオチドを溶出させる工程。

【0223】

本製造方法において、疎水性保護基としては、前記定義に合致する限り、様々なものが採用できる。通常の核酸合成では、アンモニア水などの塩基性処理でオリゴヌクレオチドを支持体から遊離させるため、酸性条件処理で除去される保護基、例えば、置換されていても良いトリチル基、置換されていても良いシリル基などを利用することができる。このような置換されていても良いトリチル基の具体例としては、トリチル基、モノメトキシトリチル基、ジメトキシトリチル基である。また置換されていても良いシリル基の例としては、トリフェニルシリル基、tert-ブチルジメチルシリル基、tert-ブチルジフェニルシリル基などであり、好ましくは4,4'-ジメトキシトリチル基(DMT r基)である。

【0224】

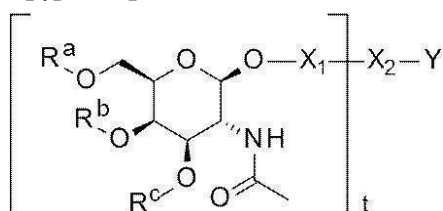
塩基性条件で除去される疎水性保護基としては、様々な種類のエステル基を採用できるが、好ましくは、アセチル基、ベンゾイル基、が例示される。

【0225】

本発明において、「疎水性保護基付加型GalNAcユニットーリン酸基を含む構造」とは、以下の式で表される構造をいう。

【0226】

【化54】



【0227】

上記式中、GalNAc上の水酸基の置換基であるR^a、R^bおよびR^cは、少なくとも一つは疎水性保護基であり、それ以外は水素原子または遊離条件で除去される保護基である。全

10

20

30

40

50

てが疎水性保護基であってもよく、いずれか2つが疎水性保護基であってもよく、いずれか一つのみが疎水性保護基であっても良い。好適には R^a が疎水性保護基（より好適には酸性条件で除去される疎水性保護基であり、更に好適には置換されていても良いトリチル基であり、最も好適にはDMTr基である。）であり、 R^b および R^c は水素原子である。この置換基が、疎水性保護基ではない場合、遊離条件で除去される保護基が結合していても良いが、オリゴヌクレオチドの支持体からの切り出し過程でこれらの保護基は除去され、工程aに用いる段階では水素原子（GalNAc上では水酸基）となる。

【0228】

X_1 および X_2 は、それぞれ独立してリンカー構造を表し、 X_1 と X_2 の間で分岐していても良い。ここで採用されるリンカー構造としては、アルキル鎖、PEG鎖、ペプチド鎖など、多様な骨格を採用することができる。このリンカー構造は途中で分岐することで、複数のGalNAcを含んでいても良い。リンカー構造中の分岐鎖の数（ t ）は、1～10程度であり、好適には1～3である。2以上の分岐鎖を有する場合、分岐点とGalNAcの間のリンカー構造は、同一でも、それぞれ異なっても良い。複数のGalNAcが含まれる場合、それぞれのGalNAcに、少なくとも一つの疎水性保護基が結合する。

【0229】

上記式において、Yはリン酸基またはチオリン酸基を介してオリゴヌクレオチドと結合する結合手を表す。オリゴヌクレオチドの5'末端に結合する場合、当該末端のヌクレオシドの5'-水酸基とリン酸ジエステル結合またはホスホロチオエート結合する。このような結合は、疎水性保護基付加型GalNAcユニットーリン酸基を含む構造のYがホスホロアミダイト構造、または、H-ホスホネート構造である化合物（疎水性保護基付加型GlcNAcユニットアミダイト様化合物）を、オリゴヌクレオチドの固相合成に続けて、ヌクレオシドホスホロアミダイト試薬と同様に用いることで、合成することができる。本発明の2分岐GalNAcユニットに対応する疎水性保護基付加型GalNAcユニットアミダイト様化合物の具体例は、上記（B13）に記載されている。

【0230】

本発明の製造方法は、上記した本発明の2分岐GalNAcユニットに限定されず、公知のGalNAcユニット（例えば、特許文献1～9、非特許文献1、2などに記載したもの）とオリゴヌクレオチドのコンジュゲートの製造にも適用することができる。この場合、疎水性保護基付加型GlcNAcユニットホスホロアミダイト、または、H-ホスホネートとして、公知のGlcNAcユニットに対応した構造の化合物を採用する。これら、公知のGalNAcユニットに対応したアミダイト様化合物としては、例えば、以下の化合物を例示することができる。

【0231】

以下の化合物は、J. Med. Chem. 2016, 59, 2718-2733およびその引用文献などを参考にして製造することができる。

【0232】

For Tris based GalNAc unit

10

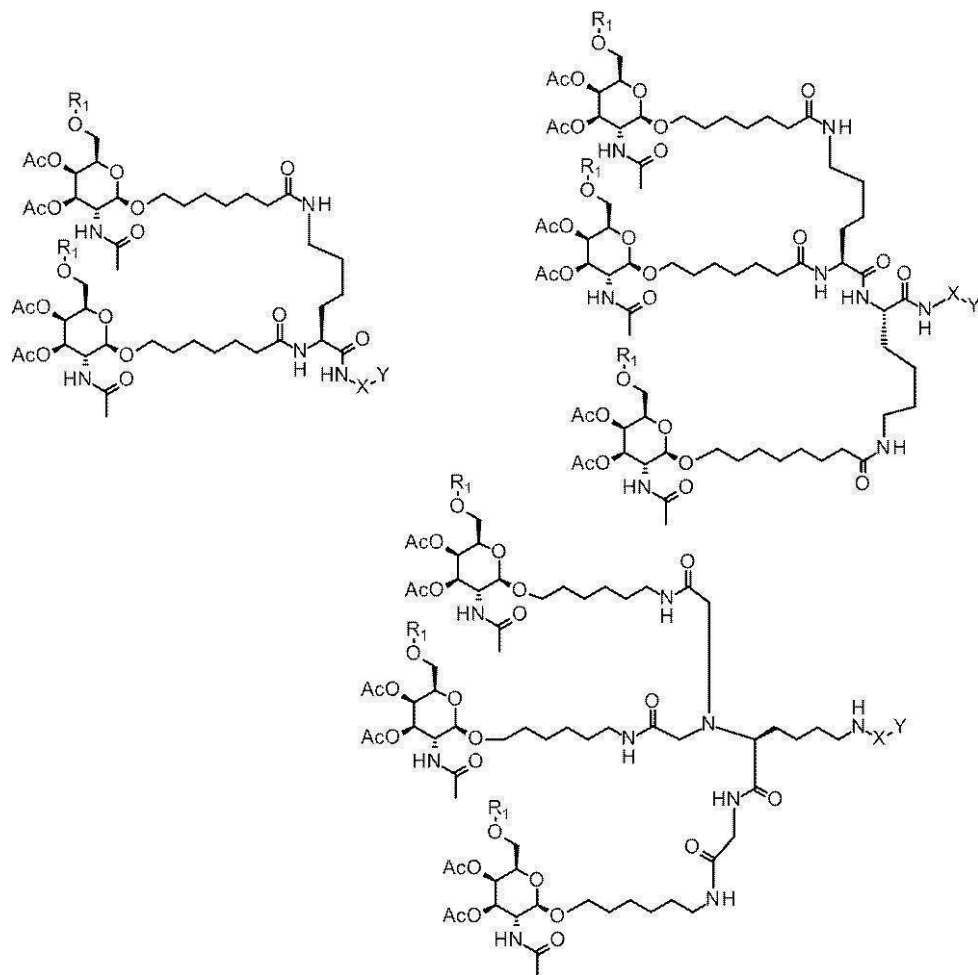
20

30

40

50

【化 5 8】



【 0 2 3 8】

以下の式で表される疎水性保護基付加型GalNAcユニットホスホロアミダイトは、W019027009を参考にして製造することができる。

【 0 2 3 9】

For Aryl based GalNAc unit

【 0 2 4 0】

10

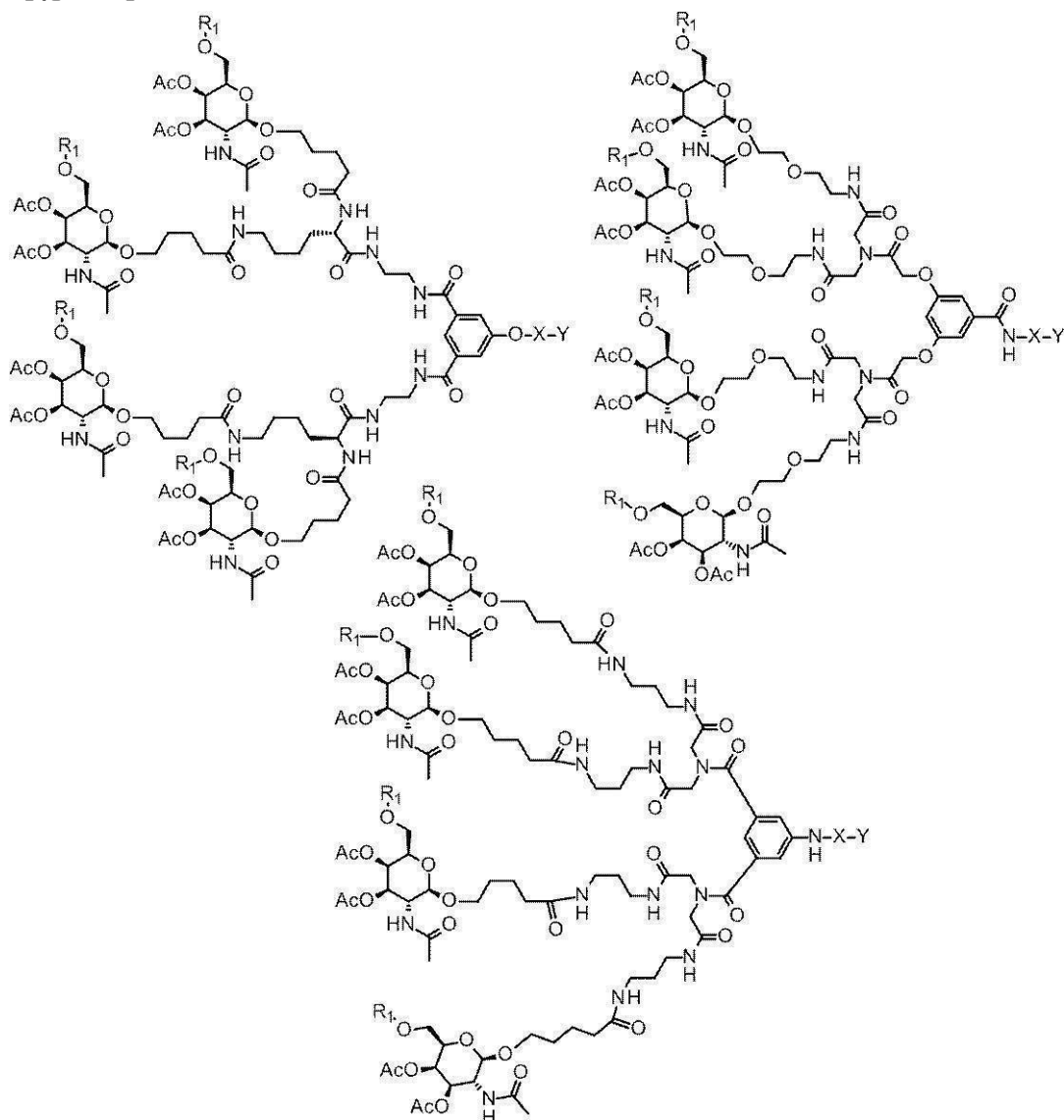
20

30

40

50

【化59】



【0241】

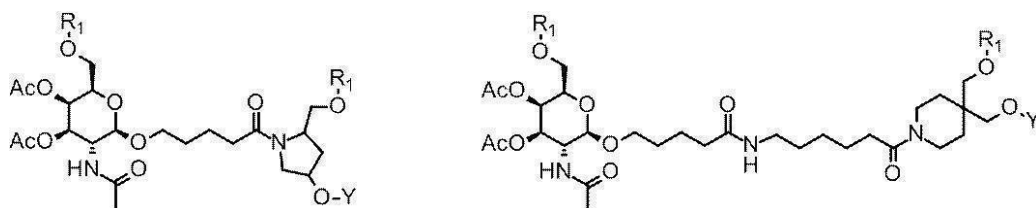
以下の化合物は、J. Med. Chem. 2016, 59, 2718-2733およびその引用文献などを参考にして製造することができる。

【0242】

For Hydroxyprolinol based GalNAc unit / Piperidine based GalNAc unit

【0243】

【化60】



【0244】

上記の公知のGlcNAcユニットに対応したアミダイト様化合物の式中、 R_1 は疎水性保護基を表す。Xはリンカー構造、好適にはC3～C6アルキル直鎖を表す。Yはホスホロアミダイト基、または、H-ホスホネート基を表す。

【0245】

公知のGlcNAcユニットに対応する疎水性保護基付加型GalNAcユニットーホスホロアミ

10

20

30

40

50

ダイトあるいは疎水性保護基付加型GalNAcユニット－H－ホスホネートは、当該GalNAcユニットの合成過程で、上記のA法からC法に記載した化合物（3）に該当するGalNAc誘導体を適宜用いることで、合成可能となる。3位、4位および6位の水酸基のうち少なくとも一つが疎水性保護基で保護されたGalNAc誘導体は、例えば、実施例1の方法を参考にして、様々なものを合成することができる。

【0246】

上記のような疎水性保護基付加型GalNAcユニットアミダイト様化合物を、ヌクレオシドアミダイト試薬と同様に用い、上記の方法に従い、合成されたオリゴヌクレオチドの5'末端または3'末端に導入することによって、疎水性保護基付加型GalNAc－リン酸基を含む構造（上記の式中、Yがリン酸基またはチオリン酸基を介してオリゴヌクレオチドと結合する結合手を示す。）を有するコンジュゲートを合成することができる。このようにして合成されるコンジュゲートの例としては、（B17）および（B18）に記載されたコンジュゲートを挙げることができる。

【0247】

疎水性保護基付加型GalNAcユニット－H－ホスホネート化合物を合成されたオリゴヌクレオチドの5'末端または3'末端に導入する反応に用いられる溶媒としては、反応を阻害しないものであれば特に限定はないが、好適には無水のアセトニトリルが使用される。縮合剤として用いられる試薬としては、カルボン酸やリン酸の酸塩化物が用いられるが好適にはピバロイルクロリドが用いられる。H－ホスホン酸結合をリン酸ジエステル結合に酸化する酸化剤としては、通常、酸化反応に使用されるものであれば特に限定はなく、過マンガン酸カリウム、二酸化マンガンのような酸化マンガン類；四酸化ルテニウムのような酸化ルテニウム類；二酸化セレンのようなセレン化合物；塩化鉄のような鉄化合物；四酸化オスミウムのようなオスミウム化合物；酸化銀のような銀化合物；酢酸水銀のような水銀化合物、酸化鉛、四酸化鉛のような酸化鉛化合物；クロム酸カリウム、クロム酸－硫酸錯体、クロム酸－ピリジン錯体のようなクロム酸化合物、セリウムアンモニウムナイトレイト（CAN）のようなセリウム化合物等の無機金属酸化剤；塩素分子、臭素分子、沃素分子のようなハロゲン分子；過沃素酸ナトリウムのような過沃素酸類；オゾン；過酸化水素水；亜硝酸のような亜硝酸化合物；亜塩素酸カリウム、亜塩素酸ナトリウムのような亜塩素酸化合物；過硫酸カリウム、過硫酸ナトリウムのような過硫酸化合物等の無機酸化剤；DMSO酸化に使用される試薬類（ジメチルスルホキシドとジシクロヘキシルカルボジイミド、オキサリルクロリド、無水酢酸若しくは五酸化燐との錯体又はピリジン－無水酢酸の錯体）；セブチルヒドロパーオキシドのようなパーオキシド類；トリフェニルメチルカチオンのような安定なカチオン類；N－ブロモコハク酸イミドのようなコハク酸イミド類、次亜塩素酸セブチルのような次亜塩素酸化合物；アゾジカルボン酸メチルのようなアゾジカルボン酸化合物；ジメチルジスルフィド、ジフェニルジスルフィド、ジピリジルジスルフィドのようなジスルフィド類とトリフェニルホスフィン；亜硝酸メチルのような亜硝酸エステル類；四臭化メタンのようなテトラハロゲン化炭素、2，3－ジクロロ－5，6－ジシアノー－p－ベンゾキノ（DDQ）のようなキノン化合物等の有機酸化剤を挙げることができるが、好適にはよう素分子である。使用される脱酸剤としては、ピリジン、ジメチルアミノピリジンのような複素環アミン類、トリメチルアミン、トリエチルアミン、ジイソプロピルエチルアミンのような脂肪族アミン類があげられるが、好適には複素環アミン類（特にピリジン）である。ホスホロチオエート結合を形成させる場合は、H－ホスホン酸結合に反応してホスホロチオエート結合を形成することができる試薬であれば特に限定はされないが、硫黄、テトラエチルチウラムジスルフィド、Beaucage試薬、フェニルアセチルジスルフィドなどがあり、好適には、硫黄である。合成されたコンジュゲートは、通常のオリゴヌクレオチドのDMTr－on精製と同様の方法で疎水性保護基を保持したまま支持体から遊離させることができる。

【0248】

このような疎水性保護基付加型GalNAcユニット－リン酸基を含む構造を有するコンジュゲートは、通常のオリゴヌクレオチドのDMTr－on精製と同様の方法で疎水性保護基

10

20

30

40

50

を保持したまま支持体から遊離させることができる。通常は、オリゴヌクレオチドの3'末端と支持体の結合はアンモニア水で切断され、塩基性条件でオリゴヌクレオチドが遊離する。そのため、疎水性保護基としては、塩基性で除去されない保護基、例えば、酸性条件で除去されるものが選択される。一方で、このオリゴヌクレオチドの3'末端と支持体の結合様式として酸性条件で切断される結合様式が採用された場合、オリゴヌクレオチドの遊離条件は酸性となるため、疎水性保護基としては、酸性条件で除去されない保護基、例えば、塩基性条件で除去される保護基が選択される。

【0249】

このようにして得られた疎水性保護基付加型GalNAcユニットーオリゴヌクレオチドコンジュゲートは、疎水性相互作用による吸着性を有する樹脂を充填したカラムに吸着させた後、水性洗浄液でカラムを洗浄することによって、疎水性保護基を有しない不純物を分離することができる。

10

【0250】

「疎水性相互作用による吸着性を有する樹脂」とは、疎水性の高い成分が基材に使用された樹脂であれば、特に限定無く、様々なものが使用されるが、例えば、スチレン-ジビニルベンゼン系吸着樹脂、スチレン-ジビニルベンゼン系修飾型吸着樹脂、メタクリル系吸着樹脂またはフェノール系吸着樹脂等が挙げられる。

【0251】

疎水性保護基付加型GalNAcユニットーオリゴヌクレオチドコンジュゲートをカラムに吸着させる際に使用する充填液としては、有機溶媒を多く含まない塩基性水溶液が望ましい。例えば、固相合成後にオリゴマーを支持体から切り出すのに利用した濃アンモニア水、あるいはそのアンモニア水を適切な量の溶媒（水、緩衝液など）で希釈した塩基性水溶液が利用できる。

20

【0252】

カラムからの不純物除去に使用される洗浄液としては、疎水性保護基が脱保護せず、樹脂との疎水性相互作用が維持される性質の溶液であれば様々なものが採用できる。このような洗浄液としては、樹脂との疎水性相互作用が維持される程度の低濃度の有機溶媒を含有する水溶液を用いることで、不純物の除去効率が向上する。疎水性保護基がDMTr基である場合の洗浄液としては、具体的には、適量の塩を含んだ水溶液あるいはアセトニトリル含有水溶液などを使用することができる。

30

【0253】

GalNAcに結合した疎水性保護基は、採用された保護基に応じた脱保護条件でコンジュゲートを処理することで、脱保護することができる。一般的なオリゴヌクレオチド合成に続いて本製造方法を適用する場合、DMTr基のような酸性条件で脱保護される疎水性保護基が採用されるため、脱保護は酸性溶液による処理で行われる。

【0254】

脱保護処理は、コンジュゲートが吸着したカラム上で適切に脱保護処理することによって、保護基由来の不純物をカラム上に吸着させたまま、脱保護されたGalNAcーオリゴヌクレオチドコンジュゲートを取得することができる。

【0255】

また、脱保護せずにカラムから溶出した疎水性保護基付加型GalNAcーオリゴヌクレオチドコンジュゲートを脱保護処理し、処理後の溶液を再度同様の疎水性相互作用吸着樹脂カラムに通液することで、保護基由来の不純物と脱保護されたコンジュゲートを分離することができる。

40

【0256】

コンジュゲートを保持したカラムは、採用した樹脂に応じた適切なグラジエント溶出法を利用することにより、高い精製度でGalNAcーオリゴヌクレオチドコンジュゲートを分画することができる。疎水性保護基を脱保護せずにカラムから溶出する場合、有機溶媒含有量を増加させるグラジエント溶出によって、疎水性保護基と吸着樹脂の間の疎水性相互作用を阻害することで、コンジュゲートを溶出させることができる。

50

【0257】

カラムに吸着した状態で脱保護処理を行う場合、脱保護されたコンジュゲートのカラムへの保持様式に応じて適切な溶出条件を適宜選択することができる。

【0258】

疎水性相互作用による吸着性を有するイオン交換カラムを使用する場合は、コンジュゲートがカラムに吸着した状態で脱保護処理し、カラムからのGalNAc-オリゴヌクレオチドコンジュゲートの溶出は、溶出液中の塩濃度を利用して、イオン交換カラムからの溶出に採用される常法に従い溶出・分画することができる。具体的には、カラムにRESOURCE Q (GEヘルスケア製)を使う場合、水酸化ナトリウム/塩化ナトリウム水溶液混合液において塩化ナトリウム含有量を0から2 M (2 mol/L) まで徐々に増やすようなグラジエント溶出液が利用できる。

10

【0259】

逆相カラムを使用する場合、カラムからのGalNAc-オリゴヌクレオチドコンジュゲートの溶出は、適当な有機溶媒を使用して、逆相カラムからの溶出に採用される常法に従い溶出・分画することができる。具体的には、カラムにClarity QSP (Phenomenex製)を使う場合、適切な量のアセトニトリルを含むトリスヒドロキシメチルアミノメタン(Tris)-塩酸緩衝液を利用できる。

【0260】

目的物の検出には、核酸の検出波長である260nmの吸光度が利用される。前記のカラムの通過液について260nmの吸光度を経時的に測定し、溶出工程で検出される画分を回収することで、目的物を取得することができる。

20

【0261】

<5. 医薬>

本発明のコンジュゲートは、含まれるオリゴヌクレオチドが目的とする疾患を治療するための医薬として用いることができる。治療には予防および事後治療のいずれも含まれる。

【0262】

本発明のコンジュゲートは、製薬上許容される塩の形態で用いてもよい。「製薬上許容される塩」とは、オリゴヌクレオチドの塩をいい、そのような塩としては、ナトリウム塩、カリウム塩、リチウム塩のようなアルカリ金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩のようなアルカリ土類金属塩、アルミニウム塩、鉄塩、亜鉛塩、銅塩、ニッケル塩、コバルト塩などの金属塩；アンモニウム塩のような無機塩、 α -オクチルアミン塩、ジベンジルアミン塩、モルホリン塩、グルコサミン塩、フェニルグリシンアルキルエステル塩、エチレンジアミン塩、N-メチルグルカミン塩、グアニジン塩、ジエチルアミン塩、トリエチルアミン塩、ジシクロヘキシルアミン塩、N, N'-ジベンジルエチレンジアミン塩、クロロプロカイン塩、プロカイン塩、ジエタノールアミン塩、N-ベンジル-フェネチルアミン塩、ピペラジン塩、テトラメチルアンモニウム塩、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン塩のような有機塩などのアミン塩；弗化水素酸塩、塩酸塩、臭化水素酸塩、沃化水素酸塩のようなハロゲン化水素酸塩、硝酸塩、過塩素酸塩、硫酸塩、燐酸塩などの無機酸塩；メタンスルホン酸塩、トリフルオロメタンスルホン酸塩、エタンスルホン酸塩のような低級アルカンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩のようなアリールスルホン酸塩、酢酸塩、りんご酸塩、フマル酸塩、コハク酸塩、クエン酸塩、酒石酸塩、蔞酸塩、マレイン酸塩などの有機酸塩；グリシン塩、リジン塩、アルギニン塩、オルニチン塩、グルタミン酸塩、アスパラギン酸塩のようなアミノ酸塩などを挙げることができる。好ましくは、アルカリ金属塩であり、より好ましくは、ナトリウム塩である。これらの塩は、公知の方法で製造することができる。

30

40

【0263】

また、コンジュゲート及びその製薬上許容される塩は、溶媒和物(例えば、水和物)としても存在することがあり、そのような溶媒和物であってもよい。本発明において、このような溶媒和物は、オリゴヌクレオチド若しくはコンジュゲートの塩に含まれるものとして取り扱う。

50

【0264】

本発明のコンジュゲート又はその製薬上許容される塩を医薬品に使用する場合には、それ自体あるいは適宜の製薬上許容される賦形剤、希釈剤などと混合し、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤若しくはシロップ剤などにより経口的に、あるいは、注射剤、坐剤、貼付剤若しくは外用剤などにより非経口的に投与することができる。

【0265】

これらの製剤は、賦形剤（例えば、乳糖、白糖、葡萄糖、マンニトール、ソルビトールのような糖誘導体；トウモロコシデンプン、バイレショデンプン、 α 澱粉、デキストリンのような澱粉誘導体；結晶セルロースのようなセルロース誘導体；アラビアゴム；デキストラン；プルランのような有機系賦形剤；軽質無水珪酸、合成珪酸アルミニウム、珪酸カルシウム、メタ珪酸アルミン酸マグネシウムのような珪酸塩誘導体；燐酸水素カルシウムのような燐酸塩；炭酸カルシウムのような炭酸塩；硫酸カルシウムのような硫酸塩などの無機系賦形剤など）、滑沢剤（例えば、ステアリン酸；ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウムのようなステアリン酸金属塩；タルク；コロイドシリカ；ビーズワックス、ゲイ蠟のようなワックス類；硼酸；アジピン酸；硫酸ナトリウムのような硫酸塩；グリコール；フマル酸；安息香酸ナトリウム；DLロイシン；ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリル硫酸マグネシウムのようなラウリル硫酸塩；無水珪酸、珪酸水和物のような珪酸類；上記澱粉誘導体など）、結合剤（例えば、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、マクロゴール、前記賦形剤と同様の化合物など）、崩壊剤（例えば、低置換度ヒドロキシプロピルセルロース、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースカルシウム、内部架橋カルボキシメチルセルロースナトリウムのようなセルロース誘導体；カルボキシメチルスターチ、カルボキシメチルスターチナトリウム、架橋ポリビニルピロリドンのような化学修飾されたデンプン・セルロース類など）、乳化剤（例えば、ベントナイト、ビーガムのようなコロイド性粘土；水酸化マグネシウム、水酸化アルミニウムのような金属水酸化物；ラウリル硫酸ナトリウム、ステアリン酸カルシウムのような陰イオン界面活性剤；塩化ベンザルコニウムのような陽イオン界面活性剤；ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ショ糖脂肪酸エステルのような非イオン界面活性剤など）、安定剤（メチルパラベン、プロピルパラベンのようなパラオキシ安息香酸エステル類；クロロブタノール、ベンジルアルコール、フェニルエチルアルコールのようなアルコール類；塩化ベンザルコニウム；フェノール、クレゾールのようなフェノール類；チメロサル；デヒドロ酢酸；ソルビン酸など）、矯味矯臭剤（例えば、通常使用される甘味料、酸味料、香料など）、希釈剤などの添加剤を用いて周知の方法で製造される。

【0266】

本発明の治療薬は、 $0.1 \sim 250 \mu\text{moles/mL}$ のオリゴヌクレオチド（アンチセンスオリゴヌクレオチド）を含有するとよく、好ましくは、 $1 \sim 50 \mu\text{moles/mL}$ のオリゴヌクレオチド又はその製薬上許容される塩、 $0.02 \sim 10\% \text{w/v}$ の炭水化物又は多価アルコール及び $0.01 \sim 0.4\% \text{w/v}$ の製薬上許容される界面活性剤を含有させておいてもよい。

【0267】

上記炭水化物としては、単糖類又は二糖類が特に好ましい。これら炭水化物及び多価アルコールの例としては、グルコース、ガラクトース、マンノース、ラクトース、マルトース、マンニトール及びソルビトールが挙げられる。これらは、単独で用いても、併用してもよい。

【0268】

また、本発明における界面活性剤の好ましい例としては、ポリオキシエチレンソルビタンモノ～トリーエステル、アルキルフェニルポリオキシエチレン、ナトリウムタウロコラート、ナトリウムコラート、及び多価アルコールエステルが挙げられる。このうち特に好ましいのは、ポリオキシエチレンソルビタンモノ～トリーエステルであり、ここにおいてエステルとして特に好ましいのは、オレエート、ラウレート、ステアレート及びパルミテートである。これらは単独で用いても、併用してもよい。

【0269】

また、本発明の治療薬は、更に好ましくは、0.03～0.09 Mの製薬上許容される中性塩、例えば、塩化ナトリウム、塩化カリウム及び／又は塩化カルシウムを含有させておいてもよい。

【0270】

また、本発明の治療薬は、更に好ましくは、0.002～0.05 Mの製薬上許容される緩衝剤を含有することができる。好ましい緩衝剤の例としては、クエン酸ナトリウム、ナトリウムグリシネート、リン酸ナトリウム、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンが挙げられる。これらの緩衝剤は、単独で用いても、併用してもよい。

【0271】

さらに、上記の治療薬は、溶液状態で供給してもよい。しかし、ある期間保存する必要がある場合等のために、オリゴヌクレオチドを安定化して治療効果の低下を防止する目的で通常は凍結乾燥しておくことが好ましく、その場合は用時に溶解液（注射用蒸留水など）で再構成（reconstruction）して、即ち投与される液体状態にして用いればよい。従って、本発明の治療薬は、各成分が所定の濃度範囲になるよう溶解液で再構成して使用するための、凍結乾燥された状態のものも包含する。凍結乾燥物の溶解性を促進する目的で、アルブミン、グリシン等のアミノ酸を更に含有させておいてもよい。

【0272】

本発明のコンジュゲートは、国際公開第2015／005253に記載されている脂質などを用いて封入し、国際公開第2015／005253などに記載されているような核酸脂質ナノ粒子あるいはリポソームとして投与してもよい。

【0273】

本発明のコンジュゲート又はその製薬上許容される塩をヒトに投与する場合には、例えば、成人1日あたり約0.01～100 mg/kg（体重）、好ましくは0.1～20 mg/kg（体重）の投与量で、1回または数回に分けて皮下注射、点滴静脈注射、または、静脈注射するとよいが、その投与量や投与回数は、疾患の種類、症状、年齢、投与方法などにより適宜変更しうる。

【実施例】

【0274】

以下、本発明を実施例によって具体的に説明する。なお、これらの実施例は、本発明を説明するためのものであって、本発明の範囲を限定するものではない。核酸自動合成機として、「ABI 392 DNA/RNA Synthesizer」（Applied Biosystems製）「ABI 394 DNA/RNA Synthesizer」（Applied Biosystems製）、AKTA Oligopilot（GE Healthcare製）、nS-8II Synthesizer（Gene Design Inc.）のいずれかを使用し、ホスホロアミダイト法（Nucleic Acids Research, 12, 4539 (1984)）を用い、合成スケールに応じた合成プログラムを使用した。

【0275】

縮合活性化剤として、アクチベーター溶液-3（0.25 mol/L 5-ベンジルチオ-1H-テトラゾール・アセトニトリル溶液、和光純薬工業製、product No. 013-20011）を用いた。

【0276】

キャッピング試薬として、CAP A for AKTA（1-メチルイミダゾール・アセトニトリル溶液、Sigma-Aldrich製、product No. L040050）、Cap B1 for AKTA（無水酢酸・アセトニトリル溶液、Sigma-Aldrich製、product No. L050050）、Cap B2 for AKTA（ピリジン・アセトニトリル溶液、Sigma-Aldrich製、product No. L050150）を用いた。

【0277】

デブロックとして、DCA Deblock（ジクロロ酢酸・トルエン溶液、Sigma-Aldrich製、product No. L023050）、あるいは、デブロック溶液-1（3w/v% トリクロロ酢酸・ジクロロメタン溶液、富士フィルム和光純薬工業、product No.042-28921）を用いた。

【0278】

ホスホロチオエート結合を形成するためのチオ化試薬として、0.2Mになるようにフェニルアセチルジスルフィド (CARBOSYNTH製、product No. FP07495) を、アセトニトリル (脱水、関東化学製、product No. 01837-05)、ピリジン (脱水、関東化学製、product No. 11339-05) 1:1(v/v)溶液を用いて溶解して用いた。

【0279】

酸化剤として、OXDIZER 0.05M(Sigma-Aldrich製、product No. L560250-04)、あるいは、0.02 Mになるようにヨウ素 (関東化学製、product No. 20035-00) を、テトラヒドロフラン (脱水、関東化学製、product No. 40993-05)、ピリジン (脱水、関東化学製、product No. 11339-05)、蒸留水78:20:2(v/v/v)溶液を用いて溶解し、使用した。

10

【0280】

ヌクレオシド ホスホロアミダイト試薬として、2'-O-Meヌクレオシドのホスホロアミダイト (アデノシン体product No. ANP-5751, シチジン体product No. ANP-5752, グアノシン体product No. ANP-5753, ウリジン体product No. ANP-5754) はChemGenes製のものを用いた。

【0281】

非天然型ヌクレオシドのホスホロアミダイトは特開2000-297097の実施例14 (5'-O-ジメトキシトリチル-2'-O,4'-C-エチレン-6-N-ベンゾイルアデノシン-3'-O-(2-シアノエチル N,N-ジイソプロピル)ホスホロアミダイト)、実施例27 (5'-O-ジメトキシトリチル-2'-O,4'-C-エチレン-2-N-イソブチリルグアノシン-3'-O-(2-シアノエチル N,N-ジイソプロピル)ホスホロアミダイト)、実施例22 (5'-O-ジメトキシトリチル-2'-O,4'-C-エチレン-4-N-ベンゾイル-5-メチルシチジン-3'-O-(2-シアノエチル N,N-ジイソプロピル)ホスホロアミダイト)、実施例9 (5'-O-ジメトキシトリチル-2'-O,4'-C-エチレン-5-メチルウリジン-3'-O-(2-シアノエチル N,N-ジイソプロピル)ホスホロアミダイト) の化合物を用いた。

20

【0282】

固相担体として、NittoPhase UnyLinker 100, 10 μ mol (日東電工製)、Primer Support 5G UnyLinker 350, 10 μ mol (GE Healthcare製)、Primer Support 5G UnyLinker 350, 100 μ mol (GE Healthcare製)、あるいは、Glen UnySupport CPG 500, 1 μ mol(GlenResearch製)を合成スケールに合わせて適宜選択した。

30

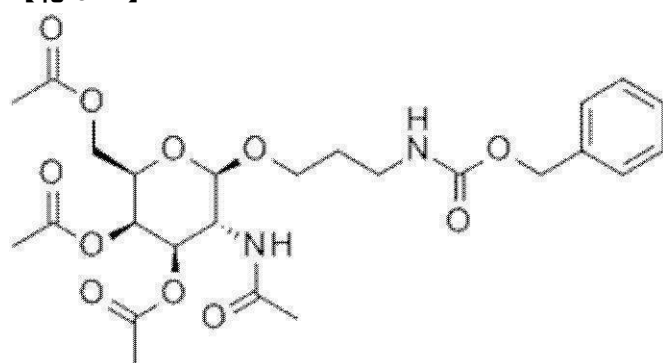
【0283】

(実施例1) 疎水性保護基付加型GalNAcの合成

(1A) [(2R,3R,4R,5R)-5-アセトアミド-3,4-ジアセトキシ-6-[3-(ベンジルオキシカルボニルアミノ)プロポキシ]テトラヒドロピラン-2-イル]メチル アセテートの合成

【0284】

【化61】



40

【0285】

N-(3-ヒドロキシプロピル)カルバミン酸ベンジル(6.4g, 30.8mmol)と、文献既知化合物の[(2R,3R,4R,5R)-5-アセトアミド-3,4,6-トリアセトキシ-テトラヒドロピラン-2-イル]

50

]メチルアセテート(WO2011053614)(10 g, 25.7 mmol)とのジクロロメタン(200ml)懸濁溶液に、トリフルオロメタンスルホン酸(450 μ l, 5.1 mmol)を加え、45度で4時間攪拌した。反応終了後、溶媒を半分ほど減圧留去して濃縮した。有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥、濾過し、溶媒を減圧留去して粗生成物を得た。イソプロピルエーテル(100ml)を加え、3時間攪拌した。得られた固形物をろ過し、目的物1A(11.9 g)を得た。これ以上、精製せずに次の反応に用いた。

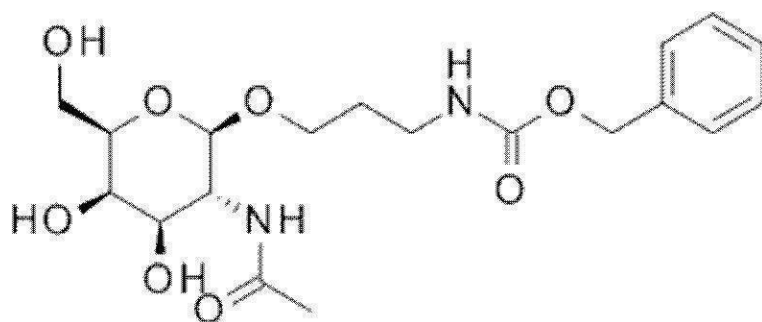
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7.43-7.29 (5H, m), 6.26 (1H, d, $J = 8.5$ Hz), 5.36-5.29 (1H, m), 5.12 (1H, d, $J = 12.1$ Hz), 5.08 (1H, d, $J = 12.1$ Hz), 5.03-4.95 (2H, m), 4.33 (1H, d, $J = 9.1$ Hz), 4.21-4.06 (3H, m), 4.01-3.93 (1H, m), 3.80-3.73 (1H, m), 3.62-3.49 (1H, m), 3.44-3.35 (1H, m), 3.14-3.04 (1H, m), 2.15 (3H, s), 2.05 (3H, s), 2.01 (3H, s), 1.95 (3H, s), 1.88-1.75 (1H, m), 1.69-1.56 (1H, m).
Calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_{11}$: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 539, Found 539.

【0286】

(1B) ベンジル N-[3-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-アセトアミド-4,5-ジヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロピラン-2-イル]オキシプロピル]カルバメート (化合物1B) の合成

【0287】

【化62】



【0288】

工程(1A)で合成した化合物(12.4g, 23mmol)のエチルアルコール(200ml)懸濁溶液に、28%ナトリウムメトキシドメタノール溶液(0.85ml)加え、室温で攪拌した。反応の進行に伴い、一度、クリアな溶液になる。60分間放置すると沈殿物が得られた。沈殿物をろ過し、エチルアルコール、ジイソプロピルエーテルで洗浄した後に、減圧下乾燥した。目的物1Bを含む粗生成物(10g)を固体として得た。これ以上精製せずに次の反応に用いた。

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-D_6) δ : 7.60 (1H, d, $J = 9.1$ Hz), 7.40-7.17 (5H, m), 5.01 (2H, s), 4.62-4.55 (2H, m), 4.49 (1H, d, $J = 4.2$ Hz), 4.20 (1H, d, $J = 8.5$ Hz), 3.76-3.27 (6H, m), 3.08-2.99 (2H, m), 1.81 (3H, s), 1.66-1.56 (2H, m).

Calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_8$: $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 435, Found 435.

【0289】

(1C) N-[(2R,3R,4R,5R,6R)-2-(3-アミノプロポキシ)-4,5-ジヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロピラン-3-イル]アセトアミド 塩酸塩 (化合物1C) の合成

【0290】

10

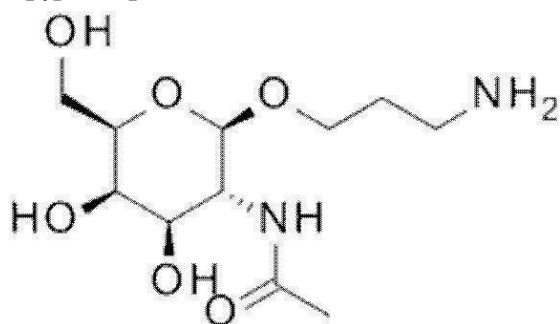
20

30

40

50

【化 6 3】



10

【 0 2 9 1】

工程（1 B）で合成した化合物(22.8g, 55.3mmol)をテトラヒドロフラン（280ml）/ 1N塩酸(61ml)に溶解した。10% パラジウム/炭素(wet)（5.56g）を加え、水素雰囲気下、室温で3.5時間激しく攪拌した。反応終了後、ろ過し、得られた通過液を減圧留去した。適量のエチルアルコールを加えて生じた固形物をろ過し、エチルアルコール、ジエチルエーテルで洗浄後、減圧下乾燥した。目的物 1 C を含む粗生成物(17g)を得た。これ以上精製せずに次の反応に用いた。

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O) δ : 4.27 (1H, d, $J = 8.5$ Hz), 3.90-3.50 (8H, m), 2.93 (2H, t, $J = 7.0$ Hz), 1.89 (3H, s), 1.82-1.75 (2H, m).

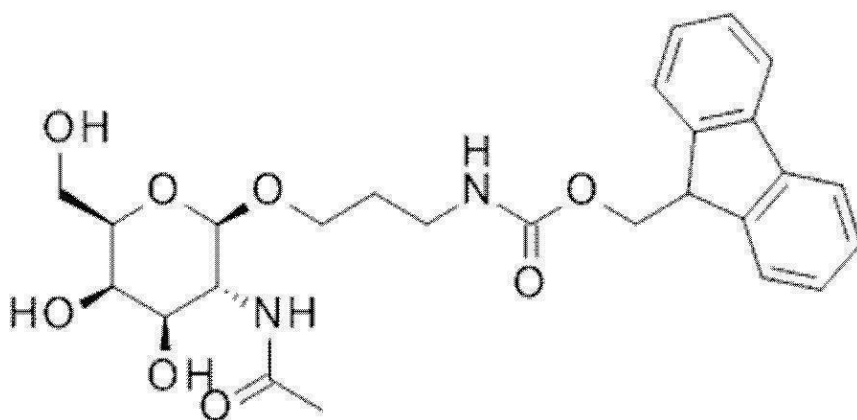
【 0 2 9 2】

20

（1 D）9H-フルオレン-9-イルメチル N-[3-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-アセトアミド-4,5-ジヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロピラン-2-イル]オキシプロピル]カルバメート（化合物 1 D）の合成

【 0 2 9 3】

【化 6 4】



30

【 0 2 9 4】

工程（1 C）で合成した化合物(16.4g, 52.1mmol) をテトラヒドロフラン（200ml）/純水(50ml)に溶解し、N,N-ジイソプロピルエチルアミン（12.7mL, 72.9mmol）を加えた。氷冷下、N-[(9H-フルオレン-9-イルメトキシ)カルボニルオキシ]スクシンイミド(2.1g, 62.5mmol)加え、室温で1.5時間攪拌した。反応終了後、溶媒を減圧留去した。ジエチルエーテル(100ml)を加え、1時間攪拌した。固形物をエチルアルコール、酢酸エチル、ジエチルエーテルで順次洗浄した後に、減圧下乾燥し、目的物 1 D を含む粗生成物(2.9g)を得た。

40

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-D_6) δ : 7.89 (2H, d, $J = 7.3$ Hz), 7.69 (2H, d, $J = 7.3$ Hz), 7.61 (1H, d, $J = 9.1$ Hz), 7.42 (2H, t, $J = 7.3$ Hz), 7.33 (2H, t, $J = 7.3$ Hz), 7.24 (1H, t, $J = 5.7$ Hz), 4.60-4.57 (2H, m), 4.49 (1H, d, $J = 4.2$ Hz), 4.31-4.18 (4H, m), 3.76-3.28 (8H, m), 3.05-2.97 (2H, m), 1.81 (3H, s), 1.62-1.57 (2H, m).

Calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_8$: $[\text{M}+\text{Na}]^+ 523$, Found 523.

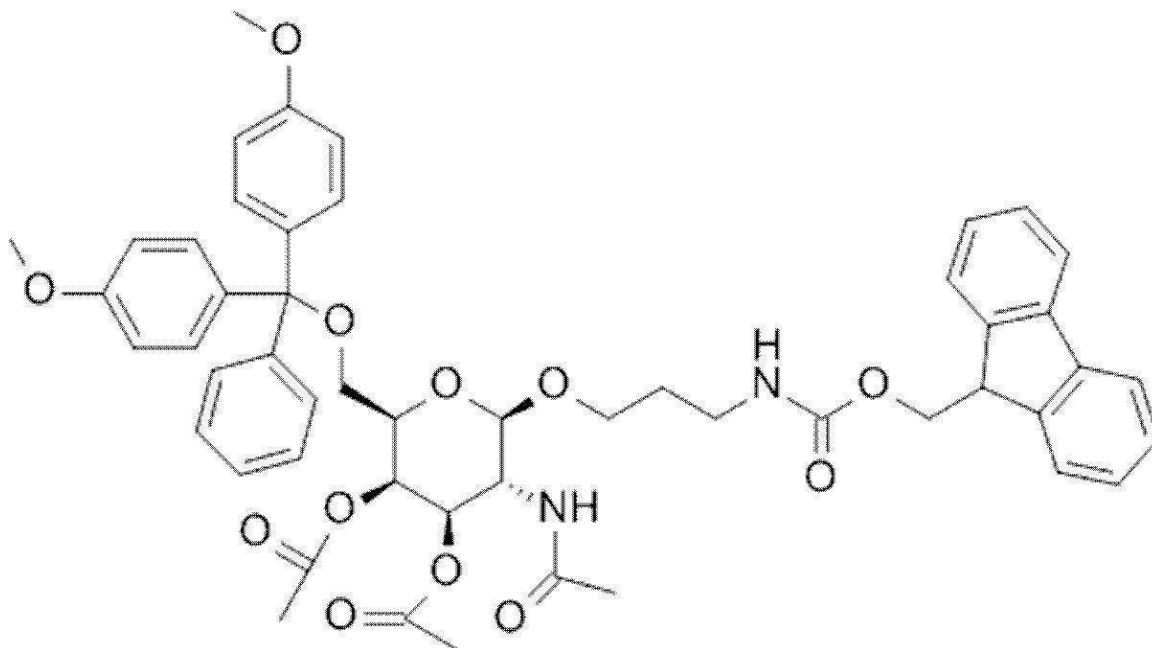
50

【0295】

(1E) [(2R,3R,4R,5R,6R)-5-アセトアミド-4-アセトキシ-2-[[ビス(4-メトキシフェニル)-フェニル-メトキシ]メチル]-6-[3-(9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ)プロポキシ]テトラヒドロピラン-3-イル] アセテート (化合物1E) の合成

【0296】

【化65】



【0297】

工程(1D)で合成した化合物(1.56g, 3.1mmol)のピリジン(20ml)懸濁液に、4,4'-ジメトキシトリチルクロリド(1.27g, 3.7mmol)を加え、室温で30分攪拌した。続いて、無水酢酸(1.18ml, 12.5mmol)を加え、室温で20時間攪拌した。反応終了後、N,N-ジイソプロピルエチルアミン(1.1mL, 6.2mmol)、エチルアルコール(2ml)を加え、溶媒を減圧留去し、粗生成物を得た。これ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=75：25-0：100, v/v、1%トリエチルアミン含有)で精製し、アモルファス状の目的物1E(2.8g, quant.)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7.77 (2H, d, $J = 7.3$ Hz), 7.62 (2H, d, $J = 7.3$ Hz), 7.43-7.18 (13H, m), 6.83-6.79 (4H, m), 6.03 (1H, d, $J = 9.1$ Hz), 5.55 (1H, d, $J = 3.0$ Hz), 5.14-5.03 (2H, m), 4.46-4.43 (3H, m), 4.24-4.04 (2H, m), 3.97-3.91 (1H, m), 3.85-3.82 (1H, m), 3.77 (6H, s), 3.72-3.71 (1H, m), 3.54-3.33 (3H, m), 3.09-3.04 (2H, m), 2.03 (3H, s), 1.89 (6H, s), 1.65-1.56 (2H, m).

Calcd for $\text{C}_{52}\text{H}_{55}\text{NO}_{12}$: $[\text{M}+\text{Na}]^+ 908$, Found 909.

【0298】

(1F) [(2R,3R,4R,5R,6R)-5-アセトアミド-4-アセトキシ-6-(3-アミノプロポキシ)-2-[[ビス(4-メトキシフェニル)-フェニル-メトキシ]メチル]テトラヒドロピラン-3-イル] アセテート (化合物1F) の合成

【0299】

10

20

30

40

50

COC1=CC=C(C=C1)C2(C3=CC=CC=C3OC[C@H]4O[C@@H](COCCN)[C@H](OC(=O)C)[C@@H](OC(=O)C)[C@H]4O)C2C5=CC=C(OC)C=C5O=C(NC(=O)OCC(OCCOC(=O)NCC(=O)OCC1=CC=CC=C1)CC2=CC=CC=C2)OCC3=CC=CC=C3

【0303】

2-ベンジルオキシ-1,3-プロパンジオール(2.5g,14mmol)、クロロギ酸4-ニトロフェニル(5.8g, 29mmol)をテトラヒドロフラン(100ml)に溶解させ、ピリジン(5.0ml,61.8mmol)を加え、室温で20分攪拌した。析出した固体をろ過した後に、テトラヒドロフラン(70ml)を加えた。続いて、グリシンベンジルエステル TFA塩(9.2g,33mmol)とN,N-ジイソプロピルエチルアミン(9.6mL, 55mmol)を加え、室温で終夜攪拌した。反応終了後、溶媒を減圧留去し、粗生成物を得た。これ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=100：0-40：60, v/v)で精製し、ガム状の目的物2A(6.5g、収率84%)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7.37-7.33 (15H, m), 5.48 (2H, t, $J = 5.4$ Hz), 5.18 (4H, s), 4.64 (2H, s), 4.23 (4H, d, $J = 5.4$ Hz), 3.99 (4H, d, $J = 5.4$ Hz), 3.84 (1H, t, $J = 5.4$ Hz).

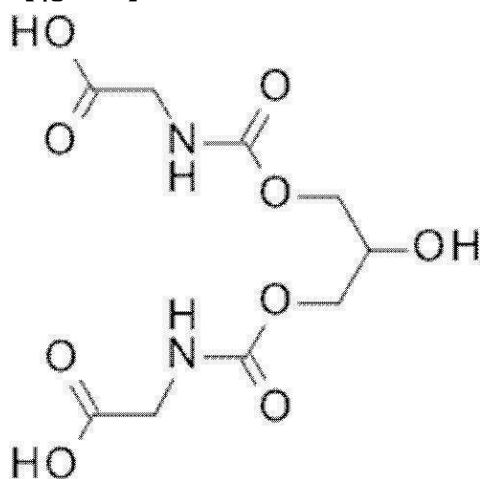
Calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_9$: $[\text{M}+\text{H}]^+ 565$, Found 565, $[\text{M}+\text{Na}]^+ 587$, Found 587

【0304】

(2B) 2-[[3-(カルボキシメチルカルバモイルオキシ)-2-ヒドロキシ-プロポキシ]カルボニルアミノ]酢酸 (化合物2B)の合成

【0305】

【化68】



【0306】

工程(2A)で合成した化合物2A(7.3g, 2.8mmol)のテトラヒドロフラン(200ml)/純水(50ml)に溶解した。20%水酸化パラジウム-活性炭素(約50%含水)(3g)を加え、水素雰囲気下、室温で5時間激しく攪拌した。反応終了後、ろ過し、得られた通過液を減圧留去して目的物2Bを含む粗生成物(3.2g)を得た。これ以上精製せずに次の反応に用いた。

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O) δ : 4.21-4.14 (5H, m), 3.86 (4H, s).

【0307】

(2C) [(2R,3R,4R,5R,6R)-5-アセトアミド-6-[3-[[2-[[3-[[2-[3-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-アセトアミド-4,5-ジアセトキシ-6-[[ビス(4-メトキシフェニル)-フェニル]-メトキシ]メチル]テトラヒドロピラン-2-イル]オキシプロピルアミノ]-2-オキソ-エチル]カルバモイルオキシ]-2-ヒドロキシ-プロポキシ]カルボニルアミノ]アセチル]アミノ]プロポキシ]-4-アセトキシ-2-[[ビス(4-メトキシフェニル)-フェニル-メトキシ]メチル]テトラヒドロピラン-3-イル]アセテート (化合物2C)の合成

【0308】

10

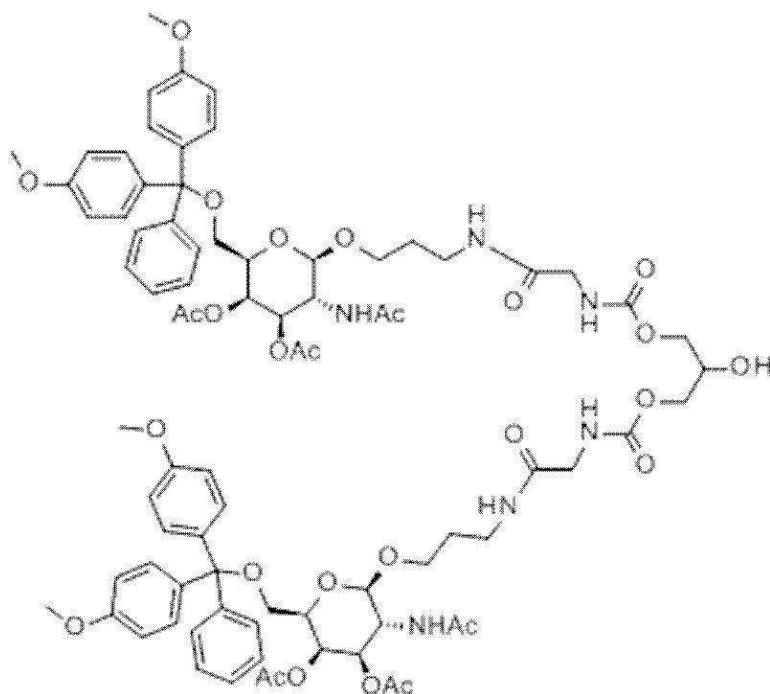
20

30

40

50

【化 6 9】



【 0 3 0 9】

工程（2 B）で合成した化合物 2 B (0.31 g, 1.05 mmol)、工程（1 E）で合成した化合物 1 F (1.47 g, 2.21 mmol)、N,N-ジイソプロピルエチルアミン（0.91 mL, 5.27 mmol）のN,N-ジメチルホルムアミド(9 mL)溶液に、1-[ビス(ジメチルアミノ)メチレン]-1H-1,2,3-トリアゾロ[4,5-b]ピリジニウム3-オキシドヘキサフルオロホスファート(11.3 g, 29.6 mmol)を加え、室温で3時間攪拌した。反応終了後、反応液をジエチルエーテル(計185 mL)に滴下した。上澄みの溶媒を除去した後に得られたゼリー状の粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ジクロロメタン：メタノール＝100：0-15：85, v/v、1%トリエチルアミン含有）で精製し、目的物 2 C (1.05 g、収率63%)を固体として得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 7.39-7.17 (18H, m), 6.83-6.80 (8H, m), 6.70-6.27 (2H, m), 5.56-5.54 (2H, m), 5.10 (2H, d, J = 10.9 Hz), 4.49-3.02 (44H, m), 2.01 (6H, s), 1.96 (6H, s), 1.90 (6H, s), 1.80-1.63 (4H, m).

Calcd for C₈₁H₉₈N₆O₂₇: [M+Na]⁺ 1611, Found 1611

【 0 3 1 0】

(2 D) [(2R,3R,4R,5R,6R)-5-アセトアミド-6-[3-[[2-[[3-[[2-[[3-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-アセトアミド-4,5-ジアセトキシ-6-[[ビス(4-メトキシフェニル)-フェニル-メトキシ]メチル]テトラヒドロピラン-2-イル]オキシプロピルアミノ]-2-オキシ-エチル]カルバモイルオキシ]-2-[2-シアノエトキシ-(ジイソプロピルアミノ)ホスファニル]オキシ-プロポキシ]カルボニルアミノ]アセチル]アミノ]プロポキシ]-4-アセトキシ-2-[[ビス(4-メトキシフェニル)-フェニル-メトキシ]メチル]テトラヒドロピラン-3-イル] アセテート (化合物 2 D) の合成

【 0 3 1 1】

10

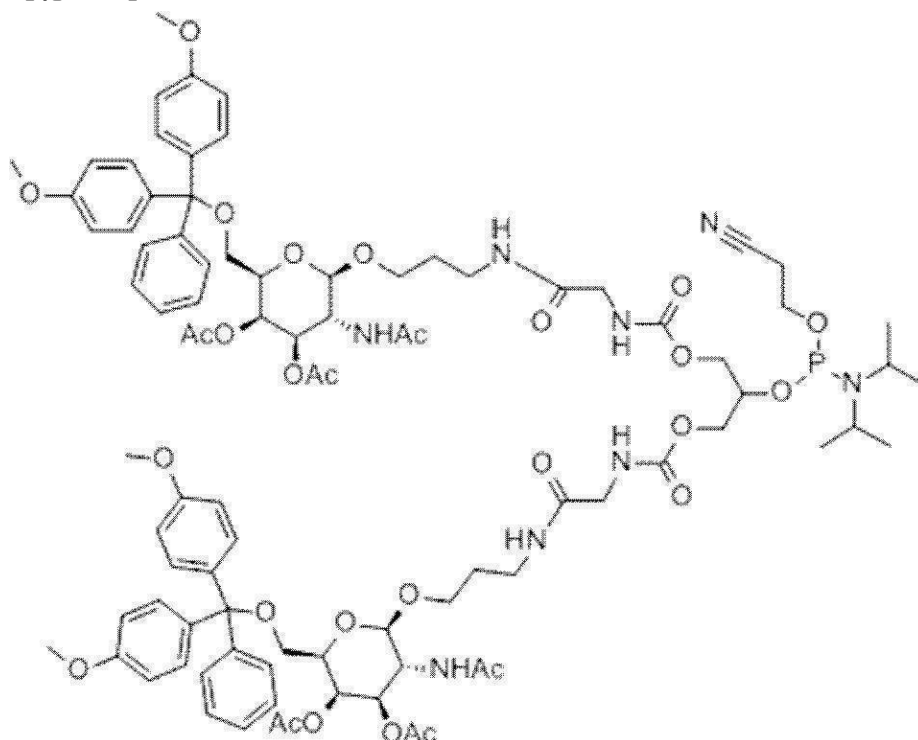
20

30

40

50

【化 70】



【0312】

工程(2C)で合成した化合物2C(0.47g, 0.30 mmol)を適量の酢酸エチル/トルエン(1/1)で共沸した後に、ジクロロメタン(3ml)に溶解した。N,N-ジイソプロピルエチルアミン(210 μ l, 1.18 mmol)、2-シアノエチルジイソプロピルクロロホスホアミジト(79 μ l, 0.36mmol)を加え、室温で1時間攪拌した。更に、2-シアノエチルジイソプロピルクロロホスホアミジト(20 μ l, 0.09mmol)を加え、室温で15分間攪拌した。反応終了後、溶媒を減圧留去し、粗生成物を得た。これ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＝100：0-85：15, v/v、1%トリエチルアミン含有)で精製し、アモルファス状の目的物2D(0.34g、収率64%)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7.39-7.17 (18H, m), 6.87-6.70 (8H, m), 6.29-6.06 (2H, m), 5.55 (2H, d, $J = 3.0$ Hz), 5.11 (2H, d, $J = 10.9$ Hz), 4.47-3.02 (47H, m), 2.63 (2H, t, $J = 6.3$ Hz), 2.02 (6H, s), 1.96 (6H, s), 1.90 (6H, s), 1.80-1.64 (4H, m), 1.17 (12H, d, $J = 6.7$ Hz).

【0313】

(実施例3) GalNAcユニット $\times 1^9$ に対応するアミダイト試薬(疎水性保護基付加型GalNAc-リン酸基を有する化合物)の合成

(3A) ベンジル 2-[[3-ベンジルオキシ-2-[(2-ベンジルオキシ-2-オキソ-エチル)カルバモイルオキシ]プロポキシ]カルボニルアミノ]アセテート (化合物3A)の合成

【0314】

10

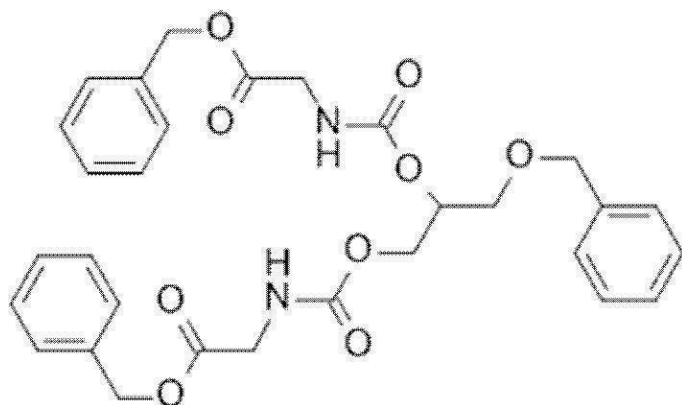
20

30

40

50

【化 7 1】



10

【 0 3 1 5 】

2-ベンジルオキシ-1,3-プロパンジオールの代わりに、(+/-)-3-ベンジルオキシ-1,2-プロパンジオール(1.0g,5.5mmol)を用い、工程(2A)と同様にして、目的物3A(2.8g、収率90%)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7.39-7.30 (15H, m), 5.37-5.35 (2H, m), 5.17-5.12 (5H, m), 4.56-4.51 (2H, m), 4.33-4.30 (2H, m), 4.03-3.94 (4H, m), 3.61 (2H, d, $J = 5.4$ Hz).
Calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_9$: $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 587, Found 587

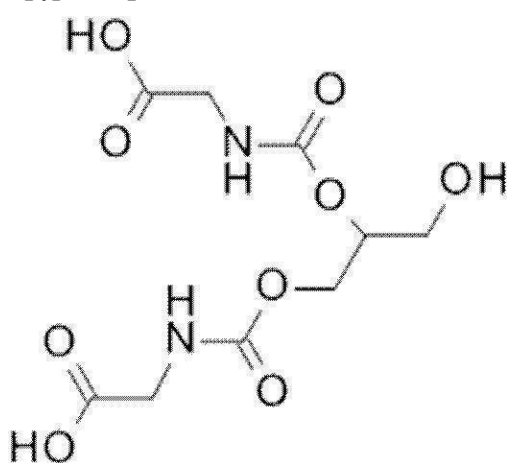
【 0 3 1 6 】

(3B) 2-[[2-(カルボキシメチルカルバモイルオキシ)-3-ヒドロキシ-プロポキシ]カルボニルアミノ]酢酸 (化合物3B)の合成

20

【 0 3 1 7 】

【化 7 2】



30

【 0 3 1 8 】

化合物2Aの代わりに、化合物3A(2.8g,5.0mmol)を用い、工程(2B)と同様にして、目的物3Bを含む粗生成物(1.2g)を得た。

40

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O) δ : 4.32-4.19 (3H, m), 3.94-3.87 (4H, m), 3.81-3.71 (2H, m).

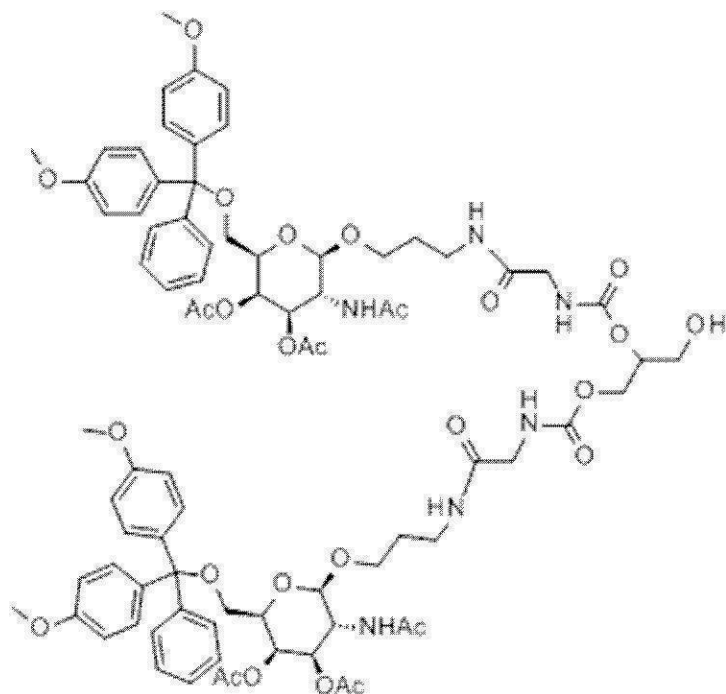
【 0 3 1 9 】

(3C) [(2R,3R,4R,5R,6R)-5-アセトアミド-6-[3-[[2-[[2-[[2-[3-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-アセトアミド-4,5-ジアセトキシ-6-[[ビス(4-メトキシフェニル)-フェニル-メトキシ]メチル]テトラヒドロピラン-2-イル]オキシプロピルアミノ]-2-オキソ-エチル]カルバモイルオキシ]-3-ヒドロキシ-プロポキシ]カルボニルアミノ]アセチル]アミノ]プロポキシ]-4-アセトキシ-2-[[ビス(4-メトキシフェニル)-フェニル-メトキシ]メチル]テトラヒドロピラン-3-イル] アセテート (化合物3C)の合成

【 0 3 2 0 】

50

【化 7 3】



10

20

【 0 3 2 1】

化合物 2 B の代わりに、化合物 3 B (0.31 g, 1.05 mmol) を用い、工程 (2 C) と同様に
して、目的物 3 C (0.74 g、収率 44%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7.40-7.18 (18H, m), 6.81 (8H, dd, $J = 9.1, 3.0$ Hz), 6.70-
6.50 (1H, m), 6.16-6.02 (1H, m), 5.56-5.54 (2H, br), 5.11-5.00 (2H, m), 4.53-
2.99 (44H, m), 2.01 (6H, s), 1.95 (6H, s), 1.88 (6H, s), 1.77-1.68 (4H, m).

Calcd for $\text{C}_{81}\text{H}_{98}\text{N}_6\text{O}_{27}$: $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 1611, Found 1611

【 0 3 2 2】

(3 D) [(2R,3R,4R,5R,6R)-5-アセトアミド-6-[3-[[2-[[2-[[2-[3-[(2R,3R,4R,5R,6R)-
-3-アセトアミド-4,5-ジアセトキシ-6-[[ビス(4-メトキシフェニル)-フェニル-メトキシ]メ
チル]テトラヒドロピラン-2-イル]オキシプロピルアミノ]-2-オキソ-エチル]カルバモイル
オキシ]-3-[2-シアノエトキシ-(ジイソプロピルアミノ)ホスファニル]オキシ-プロポキシ]
カルボニルアミノ]アセチル]アミノ]プロポキシ]-4-アセトキシ-2-[[ビス(4-メトキシフェ
ニル)-フェニル-メトキシ]メチル]テトラヒドロピラン-3-イル] アセテート (化合物 3 D
) の合成

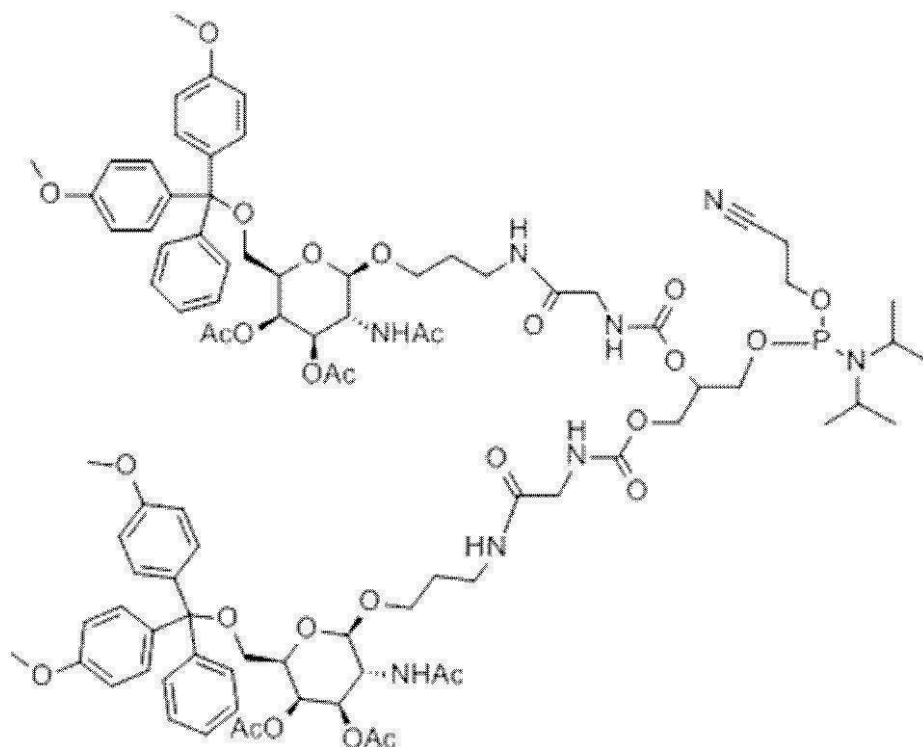
30

【 0 3 2 3】

40

50

【化 7 4】



【 0 3 2 4 】

化合物 2 C の代わりに、化合物 3 C (0.31g, 1.05mmol) を用い、工程 (2 D) と同様に
して、目的物 3 D (0.60g、収率 72%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7.38-7.18 (18H, m), 7.13-6.97 (1H, m), 6.83-6.81 (8H, m),
6.58-6.36 (1H, m), 5.56-5.52 (2H, m), 5.10-5.04 (2H, m), 4.46-2.97 (47H, m),
2.65-2.63 (2H, m), 2.02 (6H, s), 1.95 (3H, s), 1.94 (3H, s), 1.90 (3H, s), 1.
89 (3H, s), 1.77-1.67 (4H, m), 1.20-1.16 (12H, m).

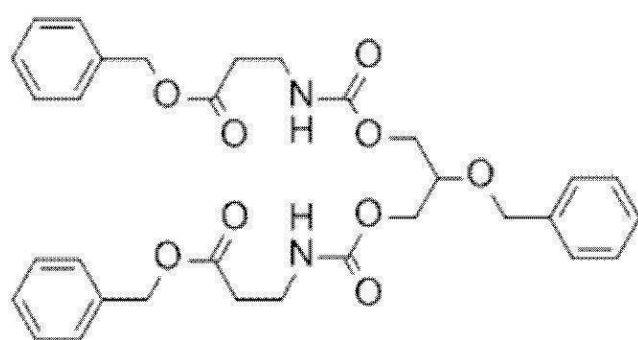
【 0 3 2 5 】

(実施例 4) GalNAc ユニット $\times 2^0$ に対応するアミダイト試薬 (疎水性保護基付加型 GalNAc
-リン酸基を有する化合物) の合成

(4 A) 3-[[2-ベンジルオキシ-3-[(3-ベンジルオキシ-3-オキソ-プロピル)カルバモイル
オキシ]プロポキシ]カルボニルアミノ]プロパン酸ベンジルエステル (化合物 4 A) の合成

【 0 3 2 6 】

【化 7 5】



【 0 3 2 7 】

工程 (2 A) で使用したグリシンベンジルエステル TFA 塩のかわりに、3-アミノプロパン酸
ベンジルエステル TFA 塩 (2.4g, 8.17mmol) を用い、工程 (2 A) と同様に、目的物 4 A
(1.62g、収率 80%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7.39-7.27 (15H, m), 5.21 (2H, br s), 5.14 (4H, s), 4.63 (2

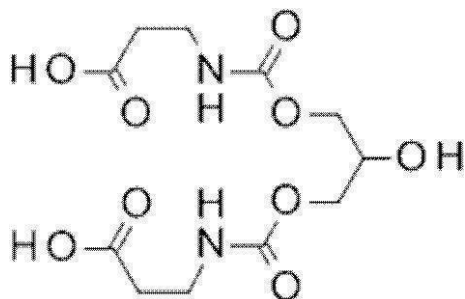
H, s), 4.24-4.10 (4H, m), 3.79-3.74 (1H, m), 3.48-3.44 (4H, m), 2.59 (4H, t, J = 6.0 Hz). Calcd for $C_{32}H_{36}N_2O_9$: $[M+H]^+$ 593, Found 593, $[M+Na]^+$ 615, Found 615

【0328】

(4B) 3-[[3-(2-カルボキシエチルカルバモイルオキシ)-2-ヒドロキシ-プロポキシ]カルボニルアミノ]プロパン酸 (化合物4B) の合成

【0329】

【化76】



10

【0330】

工程(2B)で使用した化合物2Aのかわりに、化合物4A(1.62g, 2.73mmol)を用い、工程(2B)と同様にして、目的物4B(0.89g, quant)を得た。

20

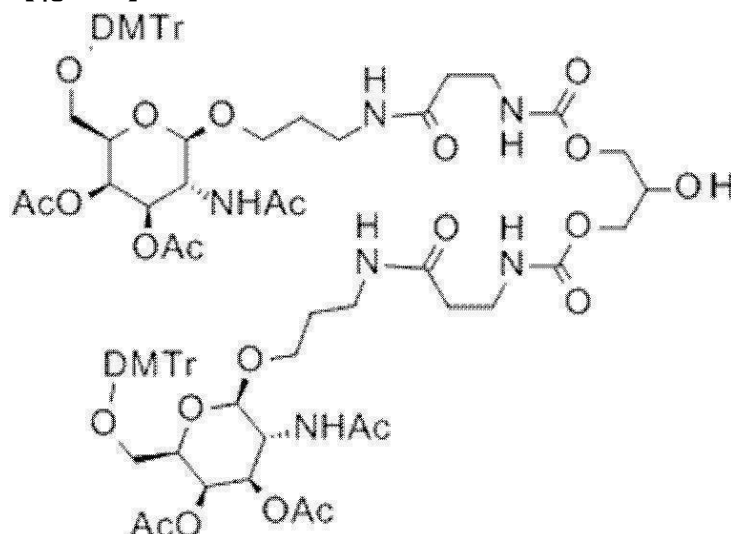
^1H -NMR (D_2O) δ : 4.22-4.04 (5H, m), 3.46-3.32 (4H, m), 2.57 (4H, t, J = 6.7 Hz).

【0331】

(4C) [(2R,3R,4R,5R,6R)-5-アセトアミド-6-[3-[3-[[3-[[3-[[3-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-アセトアミド-4,5-ジアセトキシ-6-[[ビス(4-メトキシフェニル)-フェニル-メトキシ]メチル]テトラヒドロピラン-2-イル]オキシプロピルアミノ]-3-オキソ-プロピル]カルバモイルオキシ]-2-ヒドロキシ-プロポキシ]カルボニルアミノ]プロパノイルアミノ]プロポキシ]-4-アセトキシ-2-[[ビス(4-メトキシフェニル)-フェニル-メトキシ]メチル]テトラヒドロピラン-3-イル]アセテート (化合物4C) の合成

【0332】

【化77】



30

40

【0333】

工程(2C)で使用した化合物2Bのかわりに、化合物4B(300mg, 0.93mmol)を用い、工程(2C)と同様にして、目的物4C(950mg、収率63%)を得た。

^1H -NMR ($CDCl_3$) δ : 7.32-7.24 (18H, m), 6.82-6.80 (8H, m), 6.64-6.61 (1H, br), 6.27-6.24 (1H, br), 5.91-5.88 (1H, br), 5.56 (2H, d, J = 3.0 Hz), 5.10 (2H,

50

d, $J = 11.5$ Hz), 4.46-3.05 (43H, m), 2.47-2.37 (4H, m), 2.02 (6H, s), 1.98 (6H, s), 1.90 (6H, s), 1.78-1.67 (4H, m).

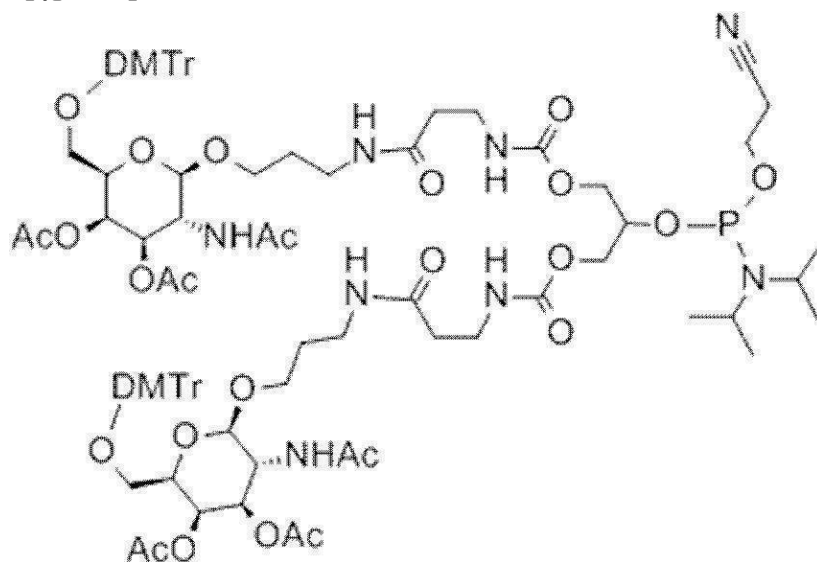
Calcd for $C_{83}H_{102}N_6O_{27}$: $[M+Na]^+$ 1638, Found 1638

【0334】

(4D) [(2R,3R,4R,5R,6R)-5-アセトアミド-6-[3-[3-[3-[3-[3-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-アセトアミド-4,5-ジアセトキシ-6-[[ビス(4-メトキシフェニル)-フェニル-メトキシ]メチル]テトラヒドロピラン-2-イル]オキシプロピルアミノ]-3-オキソ-プロピル]カルバモイルオキシ]-2-[2-シアノエトキシ-(ジイソプロピルアミノ)ホスファニル]オキシ-プロボキシ]カルボニルアミノ]プロパノイルアミノ]プロボキシ]-4-アセトキシ-2-[[ビス(4-メトキシフェニル)-フェニル-メトキシ]メチル]テトラヒドロピラン-3-イル]アセテート (化合物4D) の合成

【0335】

【化78】



【0336】

工程(2D)で使用した化合物2Cのかわりに、化合物4C(945mg,0.58mmol)を用い、工程(2D)と同様にして、目的物4D(638mg、収率60%)を得た。

^1H -NMR ($CDCl_3$) δ : 7.39-7.18 (18H, m), 6.85-6.78 (8H, m), 6.73-6.64 (1H, m), 6.40-6.23 (1H, m), 5.83-5.72 (1H, m), 5.56 (2H, d, $J = 3.0$ Hz), 5.13-5.04 (2H, m), 4.45-4.35 (2H, m), 4.22-3.30 (40H, m), 3.22-3.03 (4H, m), 2.64 (2H, t, $J = 6.0$ Hz), 2.54-2.32 (4H, m), 2.02 (6H, s), 2.00-1.95 (6H, m), 1.90 (6H, s), 1.83-1.59 (4H, m), 1.20-1.10 (12H, m).

【0337】

(実施例5)GalNAcユニットX²¹に対応するアミダイト試薬(疎水性保護基付加型GalNAc-リン酸基を有する化合物)の合成

(5A) 4-[[2-ベンジルオキシ-3-[(4-ベンジルオキシ-4-オキソ-ブチル)カルバモイルオキシ]プロボキシ]カルボニルアミノ]ブタン酸ベンジルエステル(化合物5A)の合成

【0338】

10

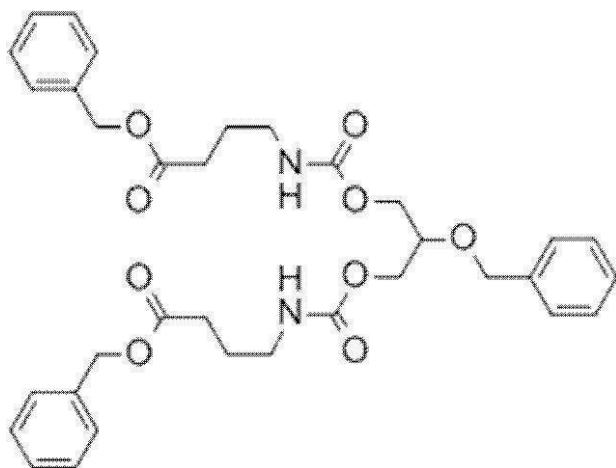
20

30

40

50

【化 7 9】



10

【 0 3 3 9】

工程(2A)で使用したグリシンベンジルエステル TFA塩のかわりに、4-アミノブタン酸ベンジルエステルTFA塩(1.30g,4.21mmol)を用い、工程(2A)と同様にして、目的物5A(0.85g、収率78%)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7.38-7.27 (15H, m), 5.11 (4H, s), 4.80 (2H, br s), 4.63 (2H, s), 4.19-4.15 (4H, m), 3.77-3.75 (1H, m), 3.23-3.18 (4H, m), 2.40 (4H, t, $J = 7.3$ Hz), 1.88-1.81 (4H, m).

20

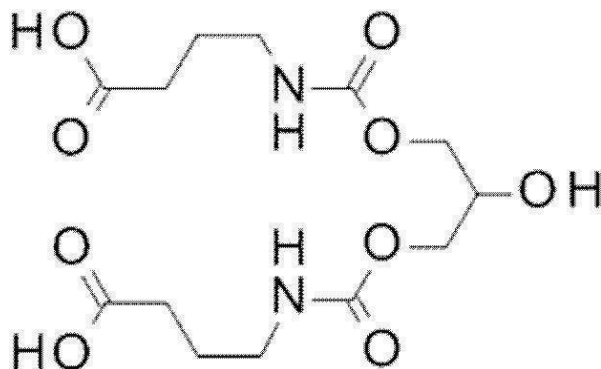
Calcd for $\text{C}_{34}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_9$: $[\text{M}+\text{H}]^+ 621$, Found 622, $[\text{M}+\text{Na}]^+ 643$, Found 644

【 0 3 4 0】

(5B) 4-[[3-(3-カルボキシプロピルカルバモイルオキシ)-2-ヒドロキシ-プロポキシ]カルボニルアミノ]ブタン酸(化合物5B)の合成

【 0 3 4 1】

【化 8 0】



30

【 0 3 4 2】

工程(2B)で使用した化合物2Aのかわりに、化合物5A(0.85g,1.4mmol)を用い、工程(2B)と同様にして、目的物5B(0.49g、quant)を得た。

40

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O) δ : 4.19-4.05 (5H, m), 3.19-3.12 (4H, m), 2.36-2.27 (4H, m), 1.83-1.73 (4H, m).

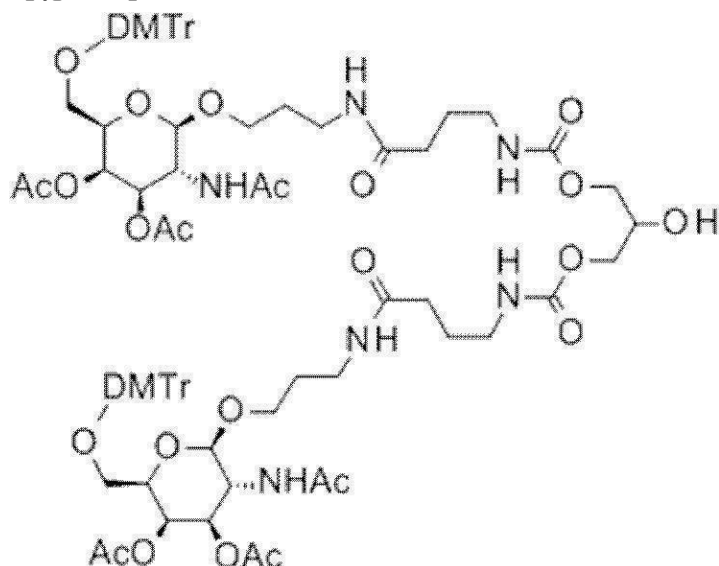
【 0 3 4 3】

(5C) [(2R,3R,4R,5R,6R)-5-アセトアミド-6-[3-[4-[[3-[[4-[3-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-アセトアミド-4,5-ジアセトキシ-6-[[ビス(4-メトキシフェニル)-フェニル-メトキシ]メチル]テトラヒドロピラン-2-イル]オキシプロピルアミノ]-4-オキソ-ブチル]カルバモイルオキシ]-2-ヒドロキシ-プロポキシ]カルボニルアミノ]ブタノイルアミノ]プロポキシ]-4-アセトキシ-2-[[ビス(4-メトキシフェニル)-フェニル-メトキシ]メチル]テトラヒドロピラン-3-イル]アセテート(化合物5C)の合成

【 0 3 4 4】

50

【化 8 1】



10

【 0 3 4 5】

工程(2C)で使用した化合物2Bのかわりに、化合物5B(300mg,0.86mmol)を用い、工程(2C)と同様にして、目的物5C(1.16g、収率82%)を得た。

20

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7.31-7.24 (18H, m), 6.82-6.80 (8H, m), 6.68-6.65 (3H, m), 5.91-5.84 (1H, m), 5.56 (2H, d, $J = 3.0$ Hz), 5.10 (2H, d, $J = 10.9$ Hz), 4.45 (2H, d, $J = 8.5$ Hz), 4.23-3.12 (40H, m), 2.31-2.22 (4H, m), 2.01 (6H, s), 1.98 (6H, s), 1.90 (6H, s), 1.81-1.68 (8H, m).

Calcd for $\text{C}_{85}\text{H}_{106}\text{N}_6\text{O}_{27}$: $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 1666, Found 1667

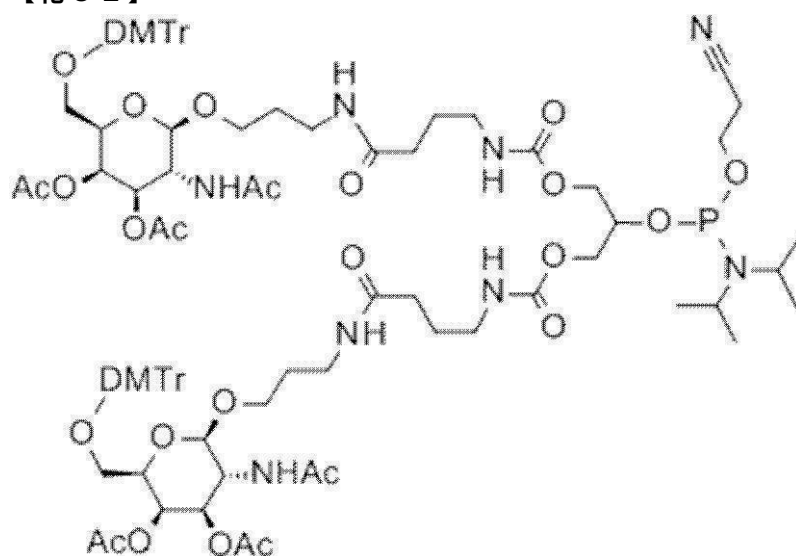
【 0 3 4 6】

(5D) [(2R,3R,4R,5R,6R)-5-アセトアミド-6-[3-[3-[[3-[[3-[3-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-アセトアミド-4,5-ジアセトキシ-6-[[ビス(4-メトキシフェニル)-フェニル-メトキシ]メチル]テトラヒドロピラン-2-イル]オキシプロピルアミノ]-4-オキソ-ブチル]カルバモイルオキシ]-2-[2-シアノエトキシ-(ジイソプロピルアミノ)ホスファニル]オキシ-プロポキシ]カルボニルアミノ]ブタノイルアミノ]プロポキシ]-4-アセトキシ-2-[[ビス(4-メトキシフェニル)-フェニル-メトキシ]メチル]テトラヒドロピラン-3-イル]アセテート(化合物5D)の合成

30

【 0 3 4 7】

【化 8 2】



40

50

【0348】

工程(2D)で使用した化合物2Cのかわりに、化合物5C(1.16g,0.71mmol)を用い、工程(2D)と同様にして、目的物5D(795mg、収率61%)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7.40-7.17 (18H, m), 6.85-6.77 (8H, m), 6.72-5.65 (5H, m), 5.56 (2H, d, $J = 3.0$ Hz), 5.11-5.03 (2H, m), 4.46-4.35 (2H, m), 4.25-3.02 (4H, m), 2.65 (2H, t, $J = 6.0$ Hz), 2.39-2.16 (4H, m), 2.02 (6H, s), 1.99-1.94 (6H, m), 1.90 (6H, s), 1.87-1.59 (8H, m), 1.18 (12H, d, $J = 6.7$ Hz).

【0349】

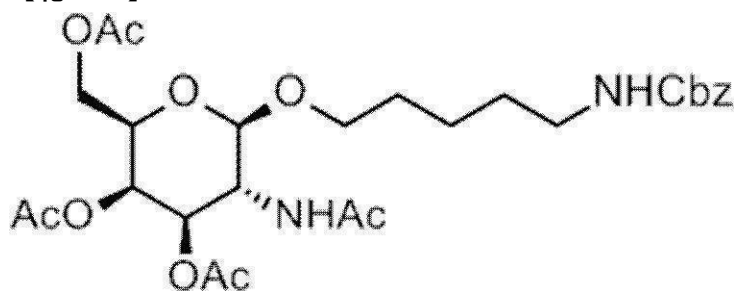
(実施例6) GalNAcユニット $\times 2^2$ に対応するアミダイト試薬の合成

(6A)

酢酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-アセトアミド-3,4-ジアセトキシ-6-[5-(ベンジルオキシカルボニルアミノ)ペントキシ]テトラヒドロピラン-2-イル]メチル(化合物6A)の合成

【0350】

【化83】



【0351】

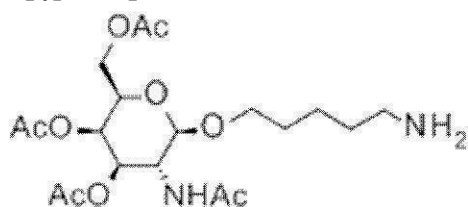
文献既知化合物のN-ベンジルオキシカルボニル-1-ヒドロキシペンチル-5-アミン(J. Am. Chem. Soc.,2006,128,4058-4073.)(8.05g, 33.9mmol)と文献既知化合物の酢酸[(2R,3R,4R,5R)-5-アセトアミド-3,4,6-トリアセトキシ-テトラヒドロピラン-2-イル]メチル(WO2011053614)(12.0g, 30.8mmol)とのジクロロメタン(200mL)懸濁溶液に、トリフルオロメタンスルホン酸(450 μL , 5.23mmol)を加え、45 $^{\circ}\text{C}$ で終夜攪拌した。反応終了後、溶媒を半分ほど減圧留去して濃縮し、酢酸エチル/飽和炭酸水素ナトリウム水溶液の混合溶液に加えた。有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水/りん酸緩衝液(pH7.0)で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥、濾過し、溶媒を減圧留去して粗生成物を得た。これ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=100:0-0:100, v/v)で精製し、アモルファス状の目的物6A(17.0g、収率94%)を得た。 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7.37-7.32 (5H, m), 5.69 (1H, d, $J = 9.1$ Hz), 5.35 (1H, d, $J = 2.4$ Hz), 5.29 (1H, d, $J = 11.5$ Hz), 5.10 (2H, s), 4.94 (1H, br), 4.68 (1H, d, $J = 7.9$ Hz), 4.20-4.09 (2H, m), 3.97-3.86 (3H, m), 3.49-3.44 (1H, m), 3.20-3.17 (2H, m), 2.14 (3H, s), 2.05 (3H, s), 2.01 (3H, s), 1.93 (3H, s), 1.66-1.34 (6H, m). Calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_{11}$: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 567, Found 567.

【0352】

(6B) [(2R,3R,4R,5R,6R)-5-アセトアミド-3,4-ジアセトキシ-6-(5-アミノペントキシ)テトラヒドロピラン-2-イル]メチルアセテート 塩酸塩(化合物6B)の合成

【0353】

【化84】



【0354】

工程 (6 A) で合成した化合物 6 A (3.87 g, 6.83 mmol) をテトラヒドロピラン (32 ml) / 1 N 塩酸 (8 ml) に溶解した。10% パラジウム/炭素 (wet) (2 g) を加え、水素雰囲気下、室温で激しく攪拌した。反応終了後、ろ過し、得られた通過液を減圧留去して目的物 6 B (3.1 g、収率 97%) の粗生成物を得た。これ以上精製せずに次の反応に用いた。

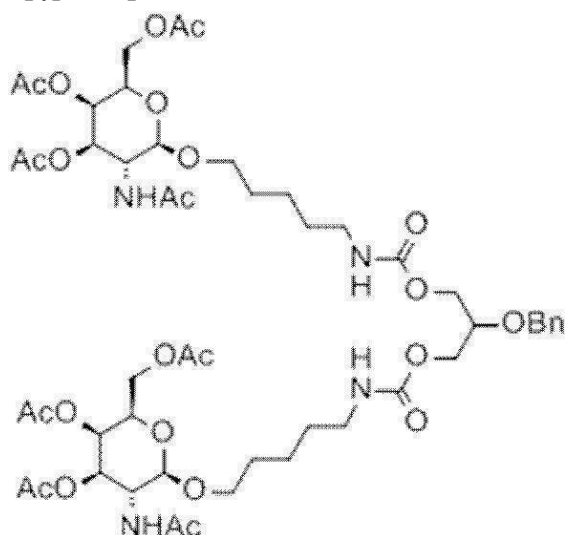
Calcd for $C_{19}H_{32}N_2O_9$: $[M+H]^+$ 433, Found 433.

【0355】

(6 C) [(2R,3R,4R,5R,6R)-5-アセトアミド-6-[5-[[3-[5-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-アセトアミド-4,5-ジアセトキシ-6-(アセトキシメチル)テトラヒドロピラン-2-イル]オキシペンチルカルバモイルオキシ]-2-ベンジルオキシ-プロポキシ]カルバモイルアミノ]ペントキシ]-3,4-ジアセトキシ-テトラヒドロピラン-2-イル]メチル アセテート (化合物 6 C) の合成

【0356】

【化85】



【0357】

2-ベンジルオキシ-1,3-プロパンジオール (600 mg, 3.29 mmol)、クロロギ酸 4-ニトロフェニル (1.39 g, 6.91 mmol) をテトラヒドロフラン (22 ml) に溶解させ、ピリジン (1.1 ml, 13.2 mmol) を加え、室温で 15 分攪拌した。析出した固体をろ過した後に、テトラヒドロフラン (16 ml) を加えた。続いて、工程 (6 B) で合成した化合物 (6 B) (3.09 g, 6.59 mmol) のテトラヒドロフラン (15 ml) / ジクロロメタン (5 ml) 溶液と N,N-ジイソプロピルエチルアミン (3.4 mL, 19.8 mmol) を加え、40 °C で 2 時間攪拌した。反応終了後、溶媒を減圧留去した。ジクロロメタンを加え、有機層を 0.5 N 塩酸、飽和食塩水、0.2 N 水酸化ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥、濾過し、溶媒を減圧留去し、粗生成物を得た。これをシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ジクロロメタン : メタノール = 100 : 0-90 : 10, v/v) で精製し、目的物 6 C をメインに含む混合物 (2.1 g) を得た。

Calcd for $C_{50}H_{74}N_4O_{23}$: $[M+H]^+$ 1099, Found 1099. $[M+Na]^+$ 1121, Found 1121.

【0358】

(6 D) [(2R,3R,4R,5R,6R)-5-アセトアミド-6-[5-[[3-[5-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-アセトアミド-4,5-ジアセトキシ-6-(アセトキシメチル)テトラヒドロピラン-2-イル]オキシペンチルカルバモイルオキシ]-2-ヒドロキシ-プロポキシ]カルボニルアミノ]ペントキシ]-3,4-ジアセトキシ-テトラヒドロピラン-2-イル]メチル アセテート (化合物 6 D) の合成

【0359】

10

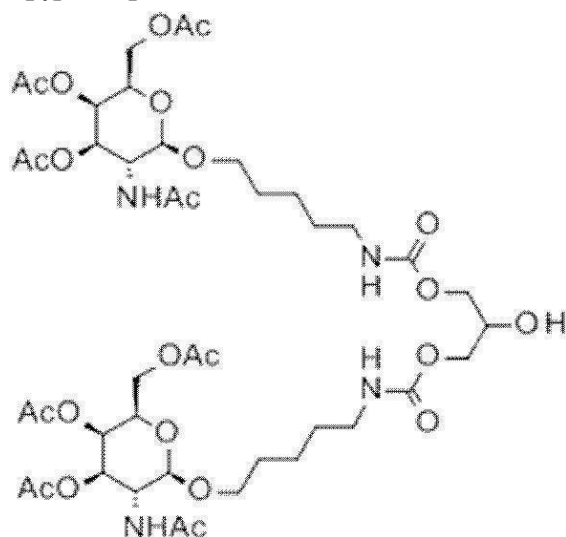
20

30

40

50

【化 8 6】



10

【 0 3 6 0】

工程（6C）で得られた6Cを含む混合物(2.1 g)をテトラヒドロピラン（20ml）/純水（1ml）に溶解した。1N塩酸（0.38ml）、10%パラジウム/炭素(wet)（1g）を加え、水素雰囲気下、室温で激しく攪拌した。反応終了後、ろ過し、得られた通過液を減圧留去して粗生成物を得た。これ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＝100：0-90：15, v/v）で精製し、目的物6D（1.38 g, 収率72%）を固体として得た。

20

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 6.10-5.96 (1H, m), 5.38-4.94 (6H, m), 4.70-4.64 (2H, m), 4.23-3.44 (19H, m), 3.20-3.15 (4H, m), 2.15 (6H, s), 2.05 (6H, s), 2.01 (6H, s), 1.97 (6H, s), 1.67-1.38 (12H, m).

Calcd for $\text{C}_{43}\text{H}_{68}\text{N}_4\text{O}_{23}$: $[\text{M}+\text{H}]^+ 1009$, Found 1009. $[\text{M}+\text{Na}]^+ 1031$, Found 1031.

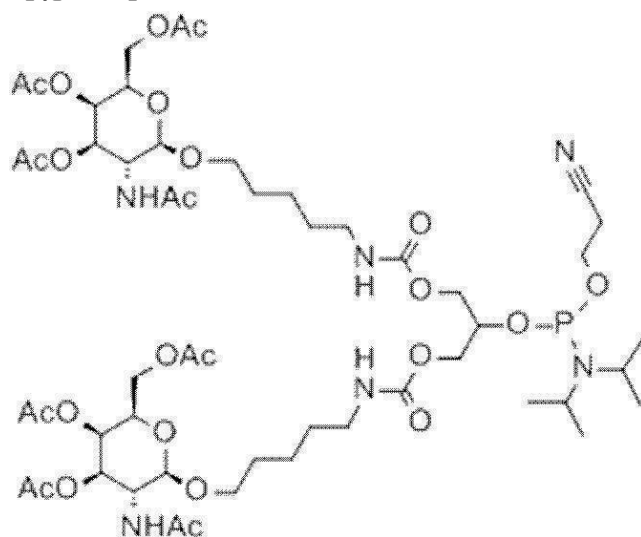
【 0 3 6 1】

（6E）[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-アセトアミド-6-[5-[[3-[5-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-アセトアミド-4,5-ジアセトキシ-6-(アセトキシメチル)テトラヒドロピラン-2-イル]オキシペンチルカルバモイルオキシ]-2-[2-シアノエトキシ-(ジイソプロピルアミノ)ホスファニル]オキシ-プロボキシ]カルバモイルアミノ]ペントキシ]-3,4-ジアセトキシ-テトラヒドロピラン-2-イル]メチル アセテート（化合物6E）の合成

30

【 0 3 6 2】

【化 8 7】



40

50

【0363】

工程(2D)で使用した化合物2Cのかわりに、化合物6D(1.38g, 1.37mmol)を用い、工程(2D)と同様にして、目的物6E(850mg、収率51%)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 5.95-5.89 (1H, m), 5.38-5.26 (4H, m), 5.20-5.16 (1H, m), 5.00-4.95 (1H, m), 4.71-4.68 (2H, m), 4.36-3.44 (22H, m), 3.15 (4H, q, $J = 6.4$ Hz), 2.67 (2H, t, $J = 6.3$ Hz), 2.15 (6H, s), 2.05 (6H, s), 2.01 (6H, s), 1.96 (6H, s), 1.67-1.33 (12H, m), 1.18 (12H, d, $J = 6.7$ Hz).

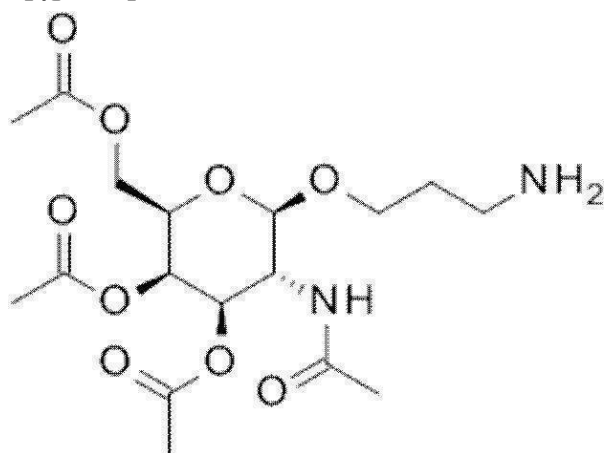
【0364】

(実施例7) GalNAcユニットX²⁰に対応するアミダイト試薬の合成

(7A) [(2R,3R,4R,5R)-5-アセトアミド-3,4-ジアセトキシ-6-(3-アミノプロポキシ)テトラヒドロピラン-2-イル]メチル アセテート 塩酸塩 (化合物7A) の合成

【0365】

【化88】



【0366】

工程(1A)で合成した化合物1A(10 g, 18.6 mmol)をテトラヒドロフラン(200ml)/1N塩酸(20ml)に溶解した。10%パラジウム/炭素(wet)(1g)を加え、水素雰囲気下、室温で1時間激しく攪拌した。反応終了後、ろ過し、得られた通過液を減圧留去して目的物7Aを含む粗生成物(8.97g)を得た。これ以上精製せずに次の反応に用いた。

Calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_9$: $[\text{M}+\text{H}]^+ 405$, Found 405.

【0367】

(7B) [(2R,3R,4R,5R,6R)-5-アセトアミド-6-[3-[3-[3-[3-[3-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-アセトアミド-4,5-ジアセトキシ-6-(アセトキシメチル)テトラヒドロピラン-2-イル]オキシプロピルアミノ]-3-オキソ-プロピル]カルバモイルオキシ]-2-ヒドロキシ-プロポキシ]カルボニルアミノ]プロパノイルアミノ]プロポキシ]-3,4-ジアセトキシ-テトラヒドロピラン-2-イル]メチル アセテート (化合物7B) の合成

【0368】

10

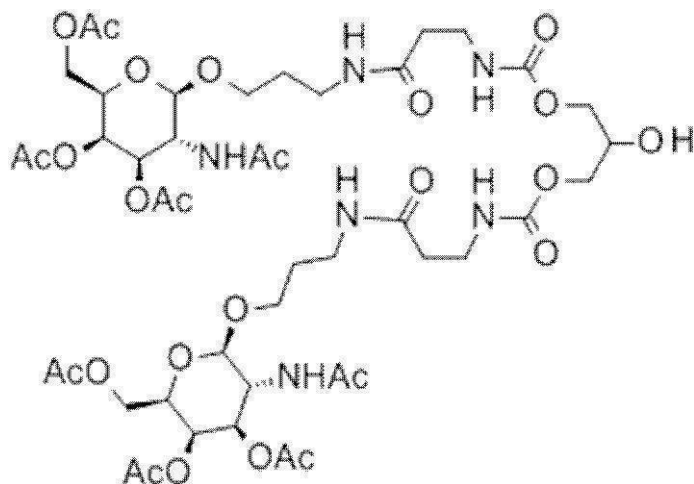
20

30

40

50

【化 8 9】



10

【0369】

工程（4B）で合成した化合物4B（200mg, 0.62mmol）のN,N-ジメチルホルムアミド（2ml）溶液に、O-(N-スクシンイミジル)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムテトラフルオロほう酸塩（411mg, 1.37mmol）、N,N-ジイソプロピルエチルアミン（0.32ml, 1.86mmol）を加え、室温で20分攪拌した。この反応液を工程（37B）で合成した化合物37B（657mg, 1.49mmol）のN,N-ジメチルホルムアミド（2ml）溶液に加えた後に、N,N-ジイソプロピルエチルアミン（0.32ml, 1.86mmol）を加え、室温で60分攪拌した。反応終了後、反応液をジエチルエーテル（計80ml）に滴下した。上澄みの溶媒を除去した後に得られたゼリー状の粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ジクロロメタン：メタノール＝100：0-75：25, v/v）で精製し、アモルファス状の目的物7B（408mg、収率60%）を得た。

20

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 6.76 (2H, br), 6.69-6.63 (2H, m), 5.96 (1H, br), 5.36 (2H, d, $J = 3.0$ Hz), 5.13-5.08 (2H, m), 4.53 (2H, d, $J = 8.5$ Hz), 4.25-3.07 (27H, m), 2.51-2.44 (4H, m), 2.17 (6H, s), 2.06 (6H, s), 2.02 (6H, s), 2.00 (6H, s), 1.86-1.73 (4H, m).

Calcd for $\text{C}_{45}\text{H}_{70}\text{N}_6\text{O}_{25}$: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1095, Found 1096. $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 1117, Found 1117.

30

【0370】

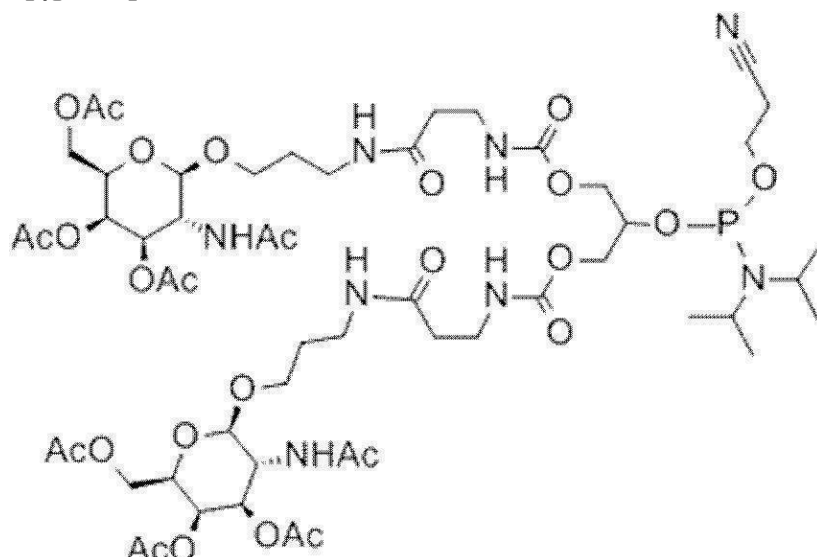
（7C）[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-アセトアミド-6-[3-[3-[[3-[[3-[[3-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-アセトアミド-4,5-ジアセトキシ-6-(アセトキシメチル)テトラヒドロピラン-2-イル]オキシプロピルアミノ]-3-オキソ-プロピル]カルバモイルオキシ]-2-[2-シアノエトキシ-(ジイソプロピルアミノ)ホスファニル]オキシ-プロポキシ]カルボニルアミノ]プロパノイルアミノ]プロポキシ]-3,4-ジアセトキシ-テトラヒドロピラン-2-イル]メチル アセテート（化合物7C）の合成

【0371】

40

50

【化 9 0】



10

【 0 3 7 2】

工程(2D)で使用した化合物2Cのかわりに、化合物7B(1.53g, 1.40mmol)を用い、工程(2D)と同様にして、目的物7C(510mg、収率28%)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 6.60-6.44 (4H, m), 5.76-5.68 (1H, m), 5.36 (2H, d, $J = 3.0$ Hz), 5.09-5.05 (2H, m), 4.50-4.45 (2H, m), 4.26-3.37 (28H, m), 3.17 (2H, br), 2.67 (2H, t, $J = 6.3$ Hz), 2.52-2.42 (4H, m), 2.17 (6H, s), 2.05 (6H, s), 2.02 (6H, s), 1.99 (6H, s), 1.81-1.70 (4H, m), 1.18 (12H, d, $J = 6.7$ Hz).

20

【 0 3 7 3】

(実施例8)

X18 - A m1s. A e2s. U m1s. C m1s. C e2s. G m1s. A m1s. T e2s. G m1s. G m1s. C e2s. G m1s. A m1s. A e2s. G m1t. H (配列番号40)

核酸自動合成装置にABI 392 DNA/RNA Synthesizer(Applied Biosystems製)を、固相担体として、NittoPhase UnyLinker 100, 10 μmol (日東電工製)を用い、ホスホアミダイト法(Nucleic Acids Research, 12, 4539 (1984))でオリゴヌクレオチド配列15e_001を合成後、さらにGlcNAcユニットアミダイトとして、実施例2で合成した2D用い、1回縮合した。保護されたオリゴヌクレオチド類縁体を6mLの濃アンモニア水で処理することによってオリゴマーを支持体から切り出すとともに、リン原子上の保護基シアノエチル基と核酸塩基上の保護基をはずした。Clarity QSP (Phenomenex製)を用いて、添付されているプロトコールに従って精製した。

30

本化合物の塩基配列は、Homo sapiens glucose-6-phosphatase catalytic subunit (G6PC), transcript variant 1, mRNA (NCBI-GenBank accession No. NM_000151.3)のヌクレオチド番号728のGからTへ変異している、c.648G>T変異G6PC遺伝子のエクソン5の5'末端から92番目から106番目に相補的な配列である。化合物は負イオンESI質量分析により同定した(実測値: 6247.96)

40

【 0 3 7 4】

(実施例9)

X18 - A m1s. A e2s. U m1s. C m1s. C e2s. G m1s. A e2s. U m1s. G m1s. G m1s. C e2s. G m1s. A m1s. A e2s. G m1t. H (配列番号40)

実施例8で使用した配列の代わりに上記の配列である15e_001.5を用い、実施例8と同様に合成を行った。

本化合物の塩基配列は、Homo sapiens glucose-6-phosphatase catalytic subunit (G6PC), transcript variant 1, mRNA (NCBI-GenBank accession No. NM_000151.3)のヌクレオチド番号728のGからTへ変異している、c.648G>T変異G6PC遺伝子のエクソン5の5'末端から92番目から106番目に相補的な配列である。化合物は負イオンESI

50

質量分析により同定した（実測値：6233.97）

【0375】

（実施例10）

X¹⁸-A^{e2s}.U^{m1s}.C^{m1s}.C^{e2s}.G^{m1s}.A^{e2s}.U^{m1s}.G^{m1s}.G^{m1s}.C^{e2s}.G^{m1s}.A^{m1s}
-A^{e2s}.G^{m1s}.C^{e2t}.H（配列番号44）

実施例8で使用した配列の代わりに上記の配列である15e_005.5を用い、実施例8と同様に合成を行った。

本化合物の塩基配列は、Homo sapiens glucose-6-phosphatase catalytic subunit (G6PC), transcript variant 1, mRNA (NCBI-GenBank accession No. NM_000151.3)のヌクレオチド番号728のGからTへ変異している、c.648G>T変異G6PC遺伝子のエクソン5の5'末端から91番目から105番目に相補的な配列である。化合物は負イオンESI質量分析により同定した（実測値：6235.97）

【0376】

（実施例11）

X¹⁸.U^{m1s}.C^{m1s}.C^{e2s}.G^{m1s}.A^{e2s}.U^{m1s}.G^{m1s}.G^{m1s}.C^{e2s}.G^{m1s}.A^{m1s}.A^{e2s}.
G^{m1s}.C^{e2s}.U^{m1t}.H（配列番号45）

実施例8で使用した配列の代わりに上記の配列である15e_006.5を用い、実施例8と同様に合成を行った。

本化合物の塩基配列は、Homo sapiens glucose-6-phosphatase catalytic subunit (G6PC), transcript variant 1, mRNA (NCBI-GenBank accession No. NM_000151.3)のヌクレオチド番号728のGからTへ変異している、c.648G>T変異G6PC遺伝子のエクソン5の5'末端から90番目から104番目に相補的な配列である。化合物は負イオンESI質量分析により同定した（実測値：6200.94）

【0377】

（実施例12）

X¹⁸-A^{m1s}-A^{m1s}.A^{e2s}.U^{m1s}.C^{m1s}.C^{e2s}.G^{m1s}.A^{e2s}.U^{m1s}.G^{m1s}.G^{m1s}.C^{e2s}.
s.G^{m1s}.A^{m1s}.A^{e2s}.G^{m1t}.H（配列番号42）

実施例8で使用した配列の代わりに上記の配列である16e_001.5を用い、実施例8と同様に合成を行った。

本化合物の塩基配列は、Homo sapiens glucose-6-phosphatase catalytic subunit (G6PC), transcript variant 1, mRNA (NCBI-GenBank accession No. NM_000151.3)のヌクレオチド番号728のGからTへ変異している、c.648G>T変異G6PC遺伝子のエクソン5の5'末端から92番目から107番目に相補的な配列である。化合物は負イオンESI質量分析により同定した

（実測値：6593.02）

【0378】

（実施例13）

X¹⁸-A^{m1s}.A^{e2s}.U^{m1s}.C^{m1s}.C^{e2s}.G^{m1s}.A^{e2s}.U^{m1s}.G^{m1s}.G^{m1s}.C^{e2s}.G^{m1s}
-A^{m1s}.A^{e2s}.G^{m1s}.C^{e2t}.H（配列番号47）

実施例8で使用した配列の代わりに上記の配列である16e_002.5を用い、実施例8と同様に合成を行った。

本化合物の塩基配列は、Homo sapiens glucose-6-phosphatase catalytic subunit (G6PC), transcript variant 1, mRNA (NCBI-GenBank accession No. NM_000151.3)のヌクレオチド番号728のGからTへ変異している、c.648G>T変異G6PC遺伝子のエクソン5の5'末端から91番目から106番目に相補的な配列である。化合物は負イオンESI質量分析により同定した（実測値：6595.01）

【0379】

（実施例14）

X¹⁸.A^{e2s}.U^{m1s}.C^{m1s}.C^{e2s}.G^{m1s}.A^{e2s}.U^{m1s}.G^{m1s}.G^{m1s}.C^{e2s}.G^{m1s}.A^{m1s}.
A^{e2s}.G^{m1s}.C^{e2s}.U^{m1t}.H（配列番号48）

10

20

30

40

50

実施例 8 で使用した配列の代わりに上記の配列である 16e_003.5 を用い、実施例 8 と同様に合成を行った。

本化合物の塩基配列は、Homo sapiens glucose-6-phosphatase catalytic subunit (G6PC), transcript variant 1, mRNA (NCBI-GenBank accession No. NM_000151.3) のヌクレオチド番号 728 の G から T へ変異している、c.648G>T 変異 G6PC 遺伝子のエクソン 5 の 5' 末端から 90 番目から 105 番目に相補的な配列である。化合物は負イオン ESI 質量分析により同定した (実測値: 6571.98)

【0380】

(実施例 15)

X²⁰—A m1s. A e2s. U m1s. C m1s. C e2s. G m1s. A e2s. U m1s. G m1s. G m1s. C e2s. G m1s. A m1s. A e2s. G m1t. H (配列番号 40)

10

GalNAc ユニットアミダイトとして化合物 2D の代わりに実施例 4 で作製した化合物 4D を使用することによって、X¹⁸ の部分を X²⁰ と置き換えて、実施例 8 と同様に合成を行った。使用した配列は上記配列 15e_001.5 である。

本化合物の塩基配列は、Homo sapiens glucose-6-phosphatase catalytic subunit (G6PC), transcript variant 1, mRNA (NCBI-GenBank accession No. NM_000151.3) のヌクレオチド番号 728 の G から T へ変異している、c.648G>T 変異 G6PC 遺伝子のエクソン 5 の 5' 末端から 92 番目から 106 番目に相補的な配列である。化合物は負イオン ESI 質量分析により同定した (実測値: 6261.98)

【0381】

20

(実施例 16)

X²⁰—A e2s. U m1s. C m1s. C e2s. G m1s. A e2s. U m1s. G m1s. G m1s. C e2s. G m1s. A m1s. A e2s. G m1s. C e2t. H (配列番号 44)

配列を上記配列 15e_005.5 として、実施例 15 と同様に合成を行った。

本化合物の塩基配列は、Homo sapiens glucose-6-phosphatase catalytic subunit (G6PC), transcript variant 1, mRNA (NCBI-GenBank accession No. NM_000151.3) のヌクレオチド番号 728 の G から T へ変異している、c.648G>T 変異 G6PC 遺伝子のエクソン 5 の 5' 末端から 91 番目から 105 番目に相補的な配列である。化合物は負イオン ESI 質量分析により同定した (実測値: 6264.00)

【0382】

30

(実施例 17)

X²⁰—A m1s—A m1s. A e2s. U m1s. C m1s. C e2s. G m1s. A e2s. U m1s. G m1s. G m1s. C e2s. G m1s. A m1s. A e2s. G m1t. H (配列番号 42)

配列を上記配列 16e_001.5 として、実施例 15 と同様に合成を行った。

本化合物の塩基配列は、Homo sapiens glucose-6-phosphatase catalytic subunit (G6PC), transcript variant 1, mRNA (NCBI-GenBank accession No. NM_000151.3) のヌクレオチド番号 728 の G から T へ変異している、c.648G>T 変異 G6PC 遺伝子のエクソン 5 の 5' 末端から 92 番目から 107 番目に相補的な配列である。化合物は負イオン ESI 質量分析により同定した (実測値: 6621.04)

【0383】

40

(実施例 18)

X²⁰—A m1s. A e2s. U m1s. C m1s. C e2s. G m1s. A e2s. U m1s. G m1s. G m1s. C e2s. G m1s. A m1s. A e2s. G m1s. C e2t. H (配列番号 47)

配列を上記配列 16e_002.5 として、実施例 15 と同様に合成を行った

本化合物の塩基配列は、Homo sapiens glucose-6-phosphatase catalytic subunit (G6PC), transcript variant 1, mRNA (NCBI-GenBank accession No. NM_000151.3) のヌクレオチド番号 728 の G から T へ変異している、c.648G>T 変異 G6PC 遺伝子のエクソン 5 の 5' 末端から 91 番目から 106 番目に相補的な配列である。化合物は負イオン ESI 質量分析により同定した (実測値: 6623.05)

【0384】

50

(実施例 19)

X²¹—A m1s. A e2s. U m1s. C m1s. C e2s. G m1s. A e2s. U m1s. G m1s. G m1s. C e2s. G m1s. A m1s. A e2s. G m1t. H (配列番号 40)

GalNAcユニットアミダイトとして実施例 5 で合成した化合物 5 D を用いることで、X¹⁸ の部分を X²¹ と置き換えて、実施例 8 と同様に合成を行った。使用した配列は上記配列 15e_001.5 である。

本化合物の塩基配列は、Homo sapiens glucose-6-phosphatase catalytic subunit (G6PC), transcript variant 1, mRNA (NCBI-GenBank accession No. NM_000151.3) のヌクレオチド番号 728 の G から T へ変異している、c.648G>T 変異 G6PC 遺伝子のエクソン 5 の 5' 末端から 92 番目から 106 番目に相補的な配列である。化合物は負イオンESI 質量分析により同定した (実測値: 6290.02)

【0385】

(実施例 20)

X²²—A m1s. A e2s. U m1s. C m1s. C e2s. G m1s. A e2s. U m1s. G m1s. G m1s. C e2s. G m1s. A m1s. A e2s. G m1t. H (配列番号 40)

GalNAcユニットアミダイトとして実施例 6 で合成した化合物 6 D を用いることで、X¹⁸ の部分を X²² と置き換えて、実施例 8 と同様に合成を行った。使用した配列は上記配列 15e_001.5 である。

本化合物の塩基配列は、Homo sapiens glucose-6-phosphatase catalytic subunit (G6PC), transcript variant 1, mRNA (NCBI-GenBank accession No. NM_000151.3) のヌクレオチド番号 728 の G から T へ変異している、c.648G>T 変異 G6PC 遺伝子のエクソン 5 の 5' 末端から 92 番目から 106 番目に相補的な配列である。化合物は負イオンESI 質量分析により同定した (実測値: 6175.96)

【0386】

(実施例 21)

X²²—A e2s. U m1s. C m1s. C e2s. G m1s. A e2s. U m1s. G m1s. G m1s. C e2s. G m1s. A m1s. A e2s. G m1s. C e2t. H (配列番号 44)

配列を上記配列 15e_005.5 として、実施例 20 と同様に合成を行った。

本化合物の塩基配列は、Homo sapiens glucose-6-phosphatase catalytic subunit (G6PC), transcript variant 1, mRNA (NCBI-GenBank accession No. NM_000151.3) のヌクレオチド番号 728 の G から T へ変異している、c.648G>T 変異 G6PC 遺伝子のエクソン 5 の 5' 末端から 91 番目から 105 番目に相補的な配列である。化合物は負イオンESI 質量分析により同定した (実測値: 6177.98)

【0387】

(実施例 22)

X²²—A m1s—A m1s. A e2s. U m1s. C m1s. C e2s. G m1s. A e2s. U m1s. G m1s. G m1s. C e2s. G m1s. A m1s. A e2s. G m1t. H (配列番号 42)

配列を上記配列 16e_001.5 として、実施例 20 と同様に合成を行った。

本化合物の塩基配列は、Homo sapiens glucose-6-phosphatase catalytic subunit (G6PC), transcript variant 1, mRNA (NCBI-GenBank accession No. NM_000151.3) のヌクレオチド番号 728 の G から T へ変異している、c.648G>T 変異 G6PC 遺伝子のエクソン 5 の 5' 末端から 92 番目から 107 番目に相補的な配列である。化合物は負イオンESI 質量分析により同定した (実測値: 6535.03)

【0388】

(実施例 23)

X²²—A m1s. A e2s. U m1s. C m1s. C e2s. G m1s. A e2s. U m1s. G m1s. G m1s. C e2s. G m1s. A m1s. A e2s. G m1s. C e2t. H (配列番号 47)

配列を上記配列 16e_002.5 と置き換えて、実施例 20 と同様に合成を行った。

本化合物の塩基配列は、Homo sapiens glucose-6-phosphatase catalytic subunit (G6PC), transcript variant 1, mRNA (NCBI-GenBank accession No. NM_000151

10

20

30

40

50

.3)のヌクレオチド番号728のGからTへ変異している、c.648G>T変異G6PC遺伝子のエクソン5の5'末端から91番目から106番目に相補的な配列である。化合物は負イオンESI質量分析により同定した(実測値:6537.05)

【0389】

(実施例24)

X²⁰.G^{e2s}.C^{e2s}.A^s.T^s.T^s.G^s.G^s.T^s.A^s.T^s.T^{e2s}.C^{e2s}.A^{e2t}.H (配列番号96)
実施例15で使用した配列の代わりに、human apolipoprotein B (APOB) GenBank accession No. NM_000384.2の核酸配列10177-10189に相補的な上記配列を用い、実施例15と同様にGalNAcユニットとオリゴヌクレオチドのコンジュゲート(ApoB-ASOコンジュゲート)を合成した。また、同方法において、上記配列のオリゴヌクレオチドが合成された段階で合成を終了し、切り出し・回収を行うことで、GalNAcユニットが結合しないオリゴヌクレオチド(ApoB-ASO)を合成した。化合物は負イオンESI質量分析により同定した(実測値:5296.83(ApoB-ASOコンジュゲート)、4392.50(ApoB-ASO))

【0390】

(試験例1) 培養細胞を用いた実施例化合物による異常スプライシングの修復評価

(1-1) 293A細胞(ヒト胎児腎細胞)の培養

以下のようにして、293A細胞(R705-07 invitrogen)の培養を行った。

293A細胞を維持培地(DMEM、10%FBS)にて維持培養した。実験では6 well plateに2x10⁵ cells/well 12 well plateに1x10⁵ cells/wellの密度で細胞を播種し、翌日、後述のように実施例の化合物、及び、プラスミドベクターを同時に導入し、評価に用いた。

【0391】

(1-2) ヒトG6PC全長プラスミドベクター作製

以下のようにして、ヒトG6PC全長プラスミドベクター(pcDNA hG6PC,pcDNA hG6PC(c.648G>T)+Int4)を作製した。

Human Multiple Tissue cDNA Panelを鋳型とし、下記G6PC cDNA Amplified primerを用いてG6PC cDNAを増幅後、さらにG6PC cDNA IF primerで増幅した。増幅した断片をInFusion SystemによりpcDNA3.1のBamHI siteに挿入した(pcDNA hG6PC)。

【0392】

G6PC cDNA Amplified primer:

フォワードプライマー 5'-ATAGCAGAGCAATCACCACCAAGCC-3' (配列番号49)

リバースプライマー 5'-ATTCCACGACGGCAGAATGGATGGC-3' (配列番号50)

G6PC IF primer:

フォワードプライマー 5'-TACCGAGCTCGGATCCACCACCAAGCCTGGAATAACTGC-3' (配列番号51)、

リバースプライマー 5'-CTGGACTAGTGGATCCTGGCATGGTTGTTGACTTTAAAC-3' (配列番号52)

【0393】

Human Genome DNAを鋳型とし、下記G6PC Int4 Amplified primerを用いてG6PC Intron4とExon5を一部含む領域を増幅し、さらにG6PC Intron4をG6PC Int4 IF primerで増幅した。また、STEP1-1作成のpcDNA hG6PCを下記hG6PC vector IF primerを用いて増幅した。なお、InFusion primerにはExon5内のc.648G>T変異を導入した。両断片をInFusion Systemにより連結し、pcDNA hG6PC内にG6PC Intron4配列を挿入した(pcDNA hG6PC(c.648G>T)+Int4)。

【0394】

G6PC Int4 Amplified primer:

フォワードプライマー 5'-TCTGGGCTGTGCAGCTGAATGTCTG-3' (配列番号53)

リバースプライマー 5'-GTAGGGGATGACACTGACGGATGCC-3' (配列番号54)

【0395】

G6PC Int4 IF primer:

10

20

30

40

50

フォワードプライマー 5'-CTGGAGTCCTGTCAGGTATGGGC-3' (配列番号 5 5)
リバープライマー 5'-AGCTGAAAAGGAAGAAGGTAATGAG-3' (配列番号 5 6)
【0396】

hG6PC vector IF primer:

フォワードプライマー 5'-TCTTCCTTTTCAGCTTCGCCATCGG-3' (配列番号 5 7)
リバープライマー 5'-CTGACAGGACTCCAGCAACAAC-3' (配列番号 5 8)
【0397】

(1-3) 実施例の化合物、及び、プラスミドベクターのコトランスフェクション

以下のようにして、実施例の化合物、及び、プラスミドベクターをコトランスフェクションした。

下記A液とB液を作製後、混合した。

6 well plateで実施の場合、1 wellあたり、A液として250 μ L Opti-MEM Medium(gibco)、0.50 μ L プラスミドベクター (1mg/mL)、4.0 μ L (final: 20nM) 実施例で製造した化合物 (12.5 μ M) を準備し、B液として250 μ L Opti-MEM Medium(gibco)、6.0 μ L Lipofectamine2000 (Invitrogen)を準備し、A液とB液を混合した。12 well plateで実施の場合、1 wellあたり、A液として125 μ L Opti-MEM Medium(gibco)、0.25 μ L プラスミドベクター (1mg/mL)、2.0 μ L (final: 20nM) 実施例で製造した化合物 (12.5 μ M) B液として125 μ L Opti-MEM Medium(gibco)、3.0 μ L Lipofectamine 2000(Invitrogen)を準備し、A液とB液を混合した。

上記の混合液を20分間室温でインキュベーション後、継代翌日の細胞に添加した (コトランスフェクション)。添加6時間後に新鮮な維持培地と交換し、上記混合液添加から24時間CO₂インキュベーターでインキュベーションした。

【0398】

(1-4) RT-PCRによるmRNAの評価

[1] RNA抽出 (in vitro)

以下のようにしてRNAの抽出を行った。

コトランスフェクション後24時間インキュベーションした細胞を、cold PBSにて1回洗浄した。RNeasy mini kit もしくはRNeasy 96 kit (Qiagen) の細胞溶解液を、1 wellにつき300 μ Lずつ加え、室温で5分間インキュベーション後回収した。回収液について、DNase処理を含むキットのプロトコールに従いRNA精製を行った。DNase処理にはRNase-Free DNase set (Qiagen 89254)を用いた。精製・溶出したRNAは後述の逆転写反応を行った。

【0399】

[2] 逆転写反応

以下のようにして逆転写反応を行った。

抽出RNAを25~100mg/mLに調整後、High Capacity RNA-to-cDNA kit (Applied biosystems) を用い、1sampleあたり10 μ L Buffer mix、1 μ L Enzyme mix、9 μ L 精製水、+抽出RNAとなるよう混合し逆転写反応を行った (37°C 60min、95°C 5min、4°C Hold)。

逆転写反応産物20 μ Lに対し精製水80 μ Lで5倍希釈し-30°Cにて保存した。

【0400】

[3] qRT-PCR (SYBR Green)

下記のようにqRT PCR Primer (SYBR Green) を設計した。

Repaired hG6PC primer (SYBR) :

フォワードプライマー 5'-TTGTGGTTGGGATTCTGGGC-3' (配列番号 5 9)

リバープライマー 5'-ATGCTGTGGATGTGGCTGAA-3' (配列番号 6 0)

hActin primer (SYBR) :

フォワードプライマー 5'-TGGCACCCAGCACAATGAA-3' (配列番号 6 1)

リバープライマー 5'-CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA-3' (配列番号 6 2)

またPCR反応液を1 wellあたり、5 μ L 2x FAST SYBR Green Master Mix (Applied

10

20

30

40

50

Biosystems)、2 μ L 精製水、1 μ L Primer mix (10 μ M)、2 μ L cDNA (5倍希釈済)を懸濁し、viiia7 (Applied Biosystems) でPCR反応を行った (プログラム: SYBR Green Regents, FAST, include Melt curve))。

【0401】

[4] qRT-PCR (Taqman assay)

下記のようにRepaired hG6PC primer set、Total hG6PC primer set を設計し、20x primer probe mix (primer濃度: 1000nM probe濃度: 250nM) を調整した。hActin primer set、mActin primer setはは原液のままを使用した。

Repaired hG6PC primer set (Taqman) :

フォワードプライマー 5'-GCTGCTCATTTTCCTCATCAAGTT-3' (配列番号 63)

リバースプライマー 5'-TGGATGTGGCTGAAAGTTTCTGTA-3' (配列番号 64)

プローブ 5'-TCCTGTCAGGCATTGC-3' FAM (配列番号 65)

hActin primer set (Taqman) : ABI Hs01060665_g1 FAM

mActin primer set (Taqman) : ABI Mm02619580_g1 FAM

18s primer set (Taqman) : ABI Hs99999901_s1 FAM

また1ウェル辺りに5 μ L 2x Taqman Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems)、2.5 μ L 精製水、0.5 μ L 20x Primer probe mix (10 μ M)、2 μ L cDNA (5倍希釈済)を懸濁しPCR反応液を調整(1 tubeあたり)し、viiia7またはQuantstudio7 (Applied Biosystems社) にてPCR反応を行った (プログラム: Taqman regents, FA

【0402】

(1-5) ヒトG6PC全長プラスミドベクター (pcDNA hG6PC (c.648G) T) + Int4) を用いた実施例のオリゴヌクレオチドによるG6PC mRNAの異常スプライシングの修復評価

ヒトG6PC全長プラスミドベクター (pcDNA hG6PC (c.648G) T) + Int4) とオリゴヌクレオチド (15e_001、15e_002、及び、コントロールとして国際公開第2004/048570の実施例93の化合物) のコトランスフェクションを行い、G6PC (c.648G) T)による異常スプライシングが修復されるかをqRT-PCR(SYBR Green)にて評価した。その結果、15e_001、15e_002の化合物でG6PC mRNAの異常スプライシングの正常化が認められた。

【0403】

(試験例2) モデルマウスを用いた実施例化合物による異常スプライシングの修復評価

(2-1) マウスの作出

ベクターの作成

下記手順に従い、G6PC KI vectorを作製した。

Mouse Genome DNAを鋳型に、下記mG6PC 5' arm Amplified primerを用いて、G6PC 5' arm領域を増幅した。さらにmG6PC 5' arm IF primerで増幅後、pBluescriptII(+/-)のXhoI siteに挿入した (G6PC 5' arm vector)。

mG6PC 5' arm Amplified primer :

フォワードプライマー 5'-GGGAAACATGCATGAAGCCCTGGGC-3' (配列番号 67)

リバースプライマー 5'-TCCCTTGGTACCTCAGGAAGCTGCC-3' (配列番号 68)

mG6PC 5' arm IF primer:

フォワードプライマー 5'-CGGGCCCCCCTCGAAACTAGGCCTGAAGAGATGGC-3' (配列番号 69)

リバースプライマー 5'-TACCGTCGACCTCGAGGGTTGGCCTTGATCCCTCTGCTA-3' (配列番号 70)

【0404】

次にMouse Genome DNAを鋳型に、下記mG6PC 3' arm Amplified primerを用いて、G6PC 3' arm領域を増幅した。さらにmG6PC 3' arm IF primerで増幅後、G6PC 5' arm vectorのNotI saiteに挿入した (G6PC 5'+3' arm vector)。

mG6PC 3' arm Amplified primer :

フォワードプライマー 5'-GGTTGAGTTGATCTTCTACATCTTG-3' (配列番号 71)

リバースプライマー 5'-GCAAGAGAGCCTTCAGGTAGATCCC-3' (配列番号 7 2)

mG6PC 3' arm IF primer:

フォワードプライマー 5'-AGTTCTAGAGCGGCCGCCCATGCAAAGGACTAGGAACAAC-3' (配列番号 7 3)

リバースプライマー 5'-ACCGCGGTGGCGGCCAATGTTGCCTGTCTTCCTCAATC-3' (配列番号 7 4)

【0405】

先述のpcDNA hG6PC (c.648G>T) + Int4を鋳型とし、下記hG6PC + Int4 IF primerを用いてhG6PC (c.648G>T)+Intron4を増幅した。また、G6PC 5'+3' arm vectorを鋳型とし、下記Arm vector IF Primerを用いて増幅した。両断片をInFusion Systemを用いて連結しG6PC KI vectorを作成した。

hG6PC + Int4 IF primer:

フォワードプライマー 5'-GGCCAACCCTGGAATAACTGCAAGGGCTCTG-3' (配列番号 7 5)

リバースプライマー 5'-TTGCATGGTTGTTGACTTTAAACACCGAAGA-3' (配列番号 7 6)

Arm vector IF Primer:

フォワードプライマー 5'-TCAACAACCATGCAAAGGACTAGGAACAAC-3' (配列番号 7 7)

リバースプライマー 5'-ATTCCAGGGTTGGCCTTGATCCCTCTGCTA-3' (配列番号 7 8)

pSPgRNA (addgene) のgRNA配列導入領域に、下記KI 5' gRNA、KI 3' gRNA配列を導入しpSPgRNA(KI 5')、pSPgRNA(KI 3')を作製した。

KI 5' gRNA: 5'-GGGATCAAGGCCAACCGGCTGG-3' (配列番号 7 9)

KI 3' gRNA: 5'-TAAAGTCAACCGCCATGCAAAGG-3' (配列番号 8 0)

【0406】

(2-2) マイクロインジェクション

各種ベクターを滅菌蒸留水を用いて、最終濃度がG6PC KI vector 10ng/ μ L、pSPgRNA(KI 5') 5ng/ μ L、pSPgRNA(KI 3') 5ng/ μ L、pSPCas9 (addgene) 5ng/ μ Lとなるように調整した後、MILLEX-GVシリンジフィルター (ミリポア) を通したものをC57BL/6Jマウス受精卵の前核十分膨らむ程度まで (約2pL) インジェクションした。その受精卵をレシピエントC57BL/6Jマウスの卵管に移植し、F0マウスを取得した。

【0407】

(2-3) Genotyping、F1系統化

以下の手順でGenotypingを実施、F1系統化を行った。

F0マウスの尾組織より核酸自動抽出装置 (PI-200 クラボウ) 及び専用キットを用いてゲノムDNAを抽出した。抽出DNAをAmplitaq Gold Master mix (Thermo fisher)を用いて及び下記KI screening primerを用いて増幅した (95°C 10 min、(95°C 30 sec、60°C 30 sec、72°C 30 sec) 35 cycles、72 °C 2 min、4°C Hold)。

KI screening primer:

フォワードプライマー 5'-TACGTCCTCTTCCCCATCTG-3' (配列番号 8 1)、

リバースプライマー 5'-CTGACAGGACTCCAGCAACA-3' (配列番号 8 2)

上記PCR産物についてゲル電気泳動を実施し、433bp付近にバンドを認めた個体のゲノムDNAをテンプレートとし、PrimeSTAR GXL (takara) および下記KI genotyping primerを用いて増幅した (98°C 2 min、(95°C 15 sec、68°C 5 min) 38 cycles、68 °C 7 min、15°C Hold)。

KI genotyping primer (5'):

フォワードプライマー 5'-TTCCTTCCAAAGCAGGGACTCTCTATGT-3' (配列番号 8 3 同じ(1))

リバースプライマー 5'-CTTGCAGAAGGACAAGACGTAGAAGACC-3' (配列番号 8 4 同じ(2))

KI genotyping primer (3'):

フォワードプライマー 5'-GAGTCTATATTGAGGGCAGGCTGGAGTC-3' (配列番号 8 5)、

10

20

30

40

50

リバースプライマー 5'-TAGTCTGCCTGCTCACTCAACCTCTCCT-3' (配列番号 8 6)

上記PCR産物についてゲル電気泳動を実施した。KI genotyping primer (5')をおよび KI genotyping primer (3')のいずれでも期待された配列長 (4705bp、4026bp) に増幅を認めた個体のゲノムDNAのKI genotyping primer (5')を用いたPCR産物をGentetic analyzer (Lifetechnology) および下記KI sequence primerを用いてダイレクトシーケンスを行った。期待した配列のKIが確認できたものをKI陽性F0とした。

KI sequence primer (5') : 5'-GAGTCTATATTGAGGGCAGGCTGGAGTC-3' (配列番号 8 7)

KI陽性F0とC57BL/6Jを交配しF1を取得した。F1の耳介組織よりDNeasy 96 Blood & Tissue Kit(Qiagen)を用いてゲノムDNAを抽出し、PrimeSTAR GXL (takara) および 10
先述KI genotyping primer (5')を用いて増幅した (98℃ 2 min、(95℃ 15 sec、68℃ 5 min) 38 cycles、68 °C 7 min、15°C Hold)。

上記PCR産物についてゲル電気泳動を実施し、期待された配列長 (4705b) に増幅を認めた個体をKI陽性F1とした。KI陽性F1の中から選別した1ラインを繁殖しhG6PC (c.648 G> T) + Int4 KI系統とした。

【0408】

(2-4) hG6PC (c.648G> T) + Int4系統のgenotyping

耳介組織よりDNeasy 96 Blood & Tissue Kit(Qiagen)を用いてゲノムDNAを抽出し、KOD FX (TOYOBO) および下記KI genotyping primer、mG6PC WT primer を用いてmultiplex増幅した (98℃ 2 min、(95℃ 15 sec、68℃ 5.5 min) 32 cycles、6 20
8 °C 5 min、4°C Hold)。

KI genotyping primer (5') :

フォワードプライマー 5'-TTCCTTCCAAAGCAGGGACTCTCTATGT-3' (配列番号 8 3 同
じ(1))

リバースプライマー 5'-CTTGCAGAAGGACAAGACGTAGAAGACC-3' (配列番号 8 4 同
じ(2))

mG6PC WT primer :

フォワードプライマー 5'-TAAATTTGACCAATGAGCACTGGAGGTC-3' (配列番号 8 8)

リバースプライマー 5'-AAAATCATGTGTATGCGTGCCTTTCCTA-3' (配列番号 8 9) ' 30

上記PCR産物についてゲル電気泳動を実施し、4705b 近傍の増幅をKI アレル、2536 bp近傍の増幅をmG6PC WT アレルとし、産子のgenotyping (WT、Ht、Homo) を判別した。

【0409】

(2-5) マウスの採材

以下のようにしてマウスの採材を行った。

採材の前日の夕方に糞食を避けるための床網を設置した上で、絶食を開始した。翌日、麻酔導入下で開腹し、十分に脱血後、肝臓、腎臓を摘出した。各臓器はice cold PBSで洗浄後、適切な大きさにトリミングし、予めホモジナイズビーズ (ニッカトー) を入れたチューブに保存した。各臓器は液体窒素にて瞬間冷却した後-80℃で保管した。

【0410】 40

(2-6) qRTPCRによるmRNAの評価

[1] RNA抽出 (in vivo)

以下のようにしてRNAの抽出を行った。

組織保存チューブあたり、RNeasy mini kit もしくはQiacube system (Qiagen) の細胞溶解液を600 μLずつ加え、tissue lyserII (Qiagen)にて25kHz 2minでホモジナイズをした。氷冷下で10分間インキュベーション後、8000G、10分間、室温で遠心し上清を回収した。上清について、DNase処理を含む各キットのプロトコールに従いRNA精製を行った。DNase処理にはRNase-Free DNase set (Qiagen)を用いた。精製・溶出したRNAは先述の逆転写反応を行い、先述のqRT-PCR (Taqman assay) に従い修復G6PC mRNA の定量を行った。 50

【0411】

(2-7) hG6PC (c.648G) T + Int4 Ht KIマウスを用いた実施例化合物による異常スプライシングの修復評価

hG6PC (c.648G) T + Int4 Ht KIマウスに対して実施例8～14の化合物を大塚生食注に溶解し、30mg/kgとなるように皮下投与を実施した。投与7日後に一晩絶食条件下でマウスの肝臓組織の採取し、G6PC (c.648G) Tによる異常スプライシングが修復されるかqRT-PCR(Taqman)にて評価したところ、図1に示したように、実施例8～14の化合物でhG6PC (c.648G) T + Int4 Ht KIマウスの肝臓においてmRNAの異常スプライシングの正常化が認められた。

また、実施例15～23の化合物について同様に評価したところ、図2に示したように、実施例15～23の化合物でhG6PC (c.648G) T + Int4 Ht KIマウスの肝臓においてmRNAの異常スプライシングの正常化が認められた。

10

【0412】

(試験例3) ApoB Knock down試験を利用したGalNAcユニットコンジュゲートによる肝臓細胞へのオリゴヌクレオチド送達性能評価

(3-1) ヒト初代肝細胞の培養

以下のようにして、ヒト初代肝細胞の培養を行った。

変法ランフォード培地 (日水製薬) に、FBS (Gibco) を10%となるように添加して、接着培地を調製した。ヒト凍結初代肝細胞 (Gibco、Hu8105) を液体窒素タンクから取り出し、37℃で融解後、ただちにCHRM (Invitrogen) に注ぎ入れ、やさしく混和した後に、室温で遠心 (100 g, 10分) した。アスピレーターで上清を除去した後に、37℃に加温した接着培地を添加して細胞懸濁液を調製した。生細胞数を自動カウンター (BioRAD) でカウントした後に、コラーゲンコート24 wellプレートに細胞を播種した (播種生細胞数: $1.4 \sim 2.1 \times 10^5$ cells/well)。CO₂インキュベーターで4～5時間培養した後に、顕微鏡で細胞が接着していることを確認し、後述の化合物添加実験を行った。

20

【0413】

(3-2) 実施例化合物の添加

以下のようにして、ヒト初代肝細胞に実施例化合物の添加を行った。

10%FBS含有の変法ランフォード培地にGalNAc誘導体が結合していない参考例45の化合物、または、GalNAc誘導体が結合している実施例208の化合物を添加して、目的濃度 (以下に記載する、ApoB mRNA発現評価 (1) では100 nM、ApoB mRNA発現評価 (2) では10 nMおよび100 nM) の化合物含有培地を調製した。24 wellプレートで培養されたヒト初代肝細胞のそれぞれのウェルの培地を吸引除去した後に、化合物含有培地を0.5 mLずつ添加して、インキュベーションを開始した。72時間後に、後述するRNA抽出実験を行った。

30

【0414】

(3-3) qRT-PCRによるmRNAの評価

[1] RNA抽出 (in vitro)

以下のようにしてRNAの抽出を行った。

インキュベーション後のヒト初代肝細胞の各ウェルの化合物含有培地を吸引除去した後に、氷冷したPBS (0.5 mL) で洗浄した。RNeasy Mini QIAcube Kit (Qiagen) のRLT bufferに1/100量の2-Mercaptoethanol添加したものを細胞溶解液とし、1 wellにつき400 μ Lずつ細胞溶解液加え、室温で5分間インキュベーション後回収した。回収液350 μ Lから、QIAcubeを用いRNeasy Mini - Animal tissues and cells - DNase digestのプロトコルでRNA精製を行った。DNase処理にはRNase-Free DNase set (Qiagen) を用いた。精製・溶出したRNAは後述の逆転写反応を行った。

40

【0415】

[2] 逆転写反応

以下のようにして逆転写反応を行った。

抽出RNAを25～100 mg/mLに調整後、High Capacity RNA-to-cDNA kit (Applied

50

biosystems) を用い、1sampleあたり10 μ L Buffer mix、1 μ L Enzyme mix、9 μ L 精製水、+抽出RNAとなるよう混合し逆転写反応を行った (37°C 60min、95°C 5min、4°C Hold)。逆転写反応産物20 μ Lに対し精製水80 μ Lで5倍希釈し-30°Cにて保存、もしくは以下のqRT-PCR評価に供した。

【0416】

[3] qRT-PCR (Taqman assay)

以下のApoB primer probe set(x20), Actinb primer probe set(x20)を使用した。

ApoB primer probe set(x20) (Taqman): ABI Hs00181142_m1 FAM

Actinb primer probe set(x20) (Taqman): ABI Hs01060665_g1 FAM

また1ウェル辺りに5 μ L 2x Taqman Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems)、2.5 μ L精製水、0.5 μ L 20x Primer probe mix (10 μ M)、2 μ L cDNA (5倍希釈済)を懸濁しPCR反応液を調整(1 tubeあたり)し、Quantstudio7 (Applied Biosystems社)にてPCR反応を行った (95°C 20sec, (95°C 1sec, 60°C 20sec) 40 cycles, 4°C Hold)。Actinbを内在性コントロールとし、ApoB mRNAの発現量を相対評価した。

【0417】

(3-4) ヒト肝培養細胞を用いた実施例化合物によるApoB mRNA 発現抑制評価 (2)

ヒト初代肝細胞の播種と同時に10 nMおよび100 nMに調整した実施例24で合成した化合物を添加し、72時間培養後の細胞のApoB mRNAの発現をqRT-PCR (Taqman assay) で評価した。化合物無添加の4 wellのApoB mRNAの発現の平均を100%とした時、図3に示したように、10 nMを用いた場合、ApoB-ASOは4.4%の発現抑制を示し、ApoB-ASOコンジュゲートは30.3%の発現抑制を示した。100 nMを用いた場合、ApoB-ASOは41.2%の発現抑制を示し、ApoB-ASOコンジュゲートは68.6%の発現抑制を示した。このことは、GalNAc誘導体が結合している化合物は、GalNAc誘導体が結合していない化合物よりも強く発現を抑制できることを示している。

【0418】

(実施例25) GalNAc部位の6位水酸基上に4,4'-ジメトキシトリチル基を有するGalNAcユニットと結合したオリゴヌクレオチドのDMT r-onイオン交換カラム精製 (1) オリゴマーの合成と混合液の調製

実施例16に記載した化合物の合成を行った。ただし、核酸自動合成装置にAKTA Oligopilot (GE Healthcare製)を用い、固相担体としてPrimer Support 5G Unylinker 350, 390 μ mol (GE Healthcare製)を用い、スケールに適した合成プログラムを用いた。合成終了後、目的のオリゴヌクレオチド配列を有し、GalNAc部位の6位水酸基が4,4'-ジメトキシトリチル基保護されたコンジュゲートとオリゴヌクレオチド類縁体の混合物が得られた。得られた混合物を2分割し、それぞれ25mLの濃アンモニア水で処理することによってオリゴヌクレオチドを支持体から切り出すとともに、リン原子上の保護基シアノエチル基と核酸塩基上の保護基をはずし、フィルター付きチューブを用いてろ過することで、目的のコンジュゲートを含むオリゴヌクレオチドの混合液(25mL)(2本)を得た。精製装置にAKTA pure150(GEヘルスケア製)を用い、充填剤SOURCE 15Q (96mL) (GEヘルスケア製)をカラムFineLINE Pilot(35mm x 100mm)(GEヘルスケア製)に充填して、以下の方法で、上記オリゴヌクレオチド混合物を2回に分けて精製した。UV検出波長を(260nm、280nm、350nm)に設定し、以下の3つの工程を一つの精製プログラムとして使用した。これらの工程中、カラム通過液の検出は長260nmおよび350nmの吸収を検出したクロマトグラムを図5に示す。

【0419】

(i) DMT r-onオリゴヌクレオチドのカラムへの吸着工程

流速を40ml/minに設定し、バッファーA1(10mM 水酸化ナトリウム水溶液)を1CV流した。流速を10ml/minに変更し、オリゴヌクレオチド混合物(25mL)をカラム上部へ添加し、バッファーA1(10mM 水酸化ナトリウム水溶液)を170mL分流した。続いて、流速を40ml/minに設定し、バッファーA1(10mM 水酸化ナトリウム水溶液)を1CV流した。続いて、バッファーA1(10mM 水酸化ナトリウム水溶液): バッファーB1(10mM

10

20

30

40

50

水酸化ナトリウム/2 M塩化ナトリウム水溶液)(35 : 65)を6 CV流すことで、 X^{20} が結合していないオリゴヌクレオチドや不純物を洗い流した。最後に、バッファーA1(10 mM 水酸化ナトリウム水溶液)を2 CV流した。

【0420】

(ii) カラム上での脱DMTr化工程

流速を40ml/minに設定し、バッファーA2(0.4% トリフルオロ酢酸水溶液)を1 CV流した。続いて、流速を20ml/minに変更し、6.25 CV流すことで、カラム充填剤上に吸着された X^{20} が結合したオリゴヌクレオチドの脱DMTr化を行った。

【0421】

(iii) 目的物の溶出工程

流速を40ml/minに設定し、バッファーA1(10mM 水酸化ナトリウム水溶液)を3 CV流して、平衡化した。バッファーA1(10mM 水酸化ナトリウム水溶液)：バッファーB1(10mM 水酸化ナトリウム/2 M塩化ナトリウム水溶液)(75 : 25)から(25 : 75)のグラジェント(15 CV)後、バッファーB1(10mM 水酸化ナトリウム/2 M塩化ナトリウム水溶液)を2 CV流し、脱DMTr化されたオリゴヌクレオチドを分画した(分画量を48mLとした)。

【0422】

溶出中にUV検出(260nm)されたフラクションについて、微量分光光度計Xpose(Trinean製)を用いて確認し、フラクション溶液(1回目：432ml、2回目：480ml)を得た(図5)。

カラムを一度使用した後、次の精製をする前に、30%イソプロピルアルコール含有2 M塩化ナトリウム水溶液を用いて洗浄した。

【0423】

(2) 濃縮、透析、凍結乾燥

フラクション溶液(1回目：432ml、2回目：480ml)を1つにまとめ、適量の酢酸を加えて、pH7.5-8.0に調製した。その後、Xampler ultrafiltration cartridge3K, 140cm² (GEヘルスケア)を装着したKR2i TFFシステム(レプリジェン)用いて濃縮後、大塚蒸留水で透析した後に凍結乾燥した。表記目的物の凍結乾燥粉末(計1.14g)を得た。

【0424】

(比較例1) オリゴヌクレオチド付近にDMTr期を導入したコンジュゲートのDMTr-onイオン交換カラム精製

実施例25に対する比較のため、以下に示す X^{13} で構成されるGalNAcコンジュゲートをDMTr-onイオン交換カラム精製した。 X^{13} に含まれるGalNAc上の3位水酸基、4位水酸基、6位水酸基の保護基をアセチル基に統一できる。これにより、合成工程で保護基の区別が不要なため、GalNAcユニット部分の合成が容易となる。更に、固相合成工程ではオリゴヌクレオチド5'末端側とのカップリング回数を調整することで、簡便にGalNAc数を増減できる。しかしながら、オリゴマーの固相合成終了後に、4,4'-ジメトキシトリチル基を一つしか残すことができない。

【0425】

[比較例1-1] X^{13} に対応したGalNAcユニットアミダイト(化合物Ref1F)の合成(Ref1A) 9H-フルオレン-9-イルメチル N-[2-[2-[(2R)-3-ベンジルオキシ-2-ヒドロキシ-プロポキシ]エトキシ]エチル]カーバメート(化合物Ref1A)の合成

【0426】

10

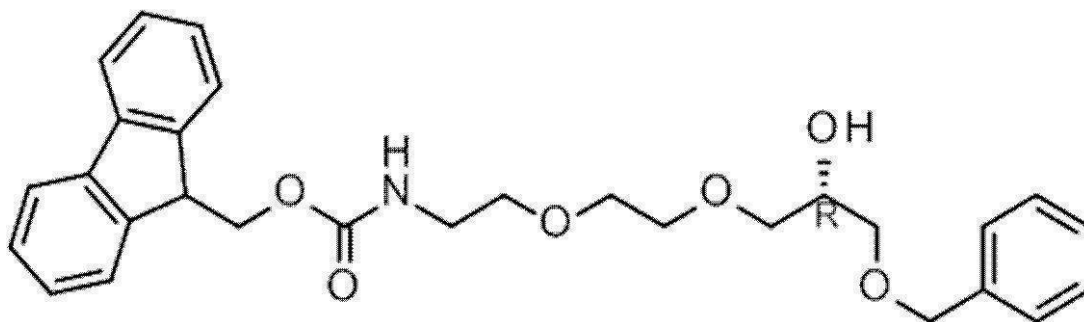
20

30

40

50

【化 9 1】



【0 4 2 7】

文献既知化合物の9H-フルオレン-9-イルメチルN-[2-(2-ヒドロキシエトキシ)エチル]カーバメート(Bioconjugate Chemistry, 2000, 11, 755-761)(3.11g, 10mmol)とベンジル(S)-(+)-グリシジルエーテル(0.8g, 5mmol)をジクロロメタン(30mL)に溶解させ、三フッ化ホウ素-ジエチルエーテル錯体(0.1mL, 1mmol)を加え、室温で16時間攪拌した。反応終了後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えた。有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥、濾過し、溶媒を減圧留去して粗生成物を得た。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=80：20-0：100, v/v)で精製し、油状の目的物 R e f 1 A (0.74g、収率30%)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7.76 (2H, d, $J = 7.9$ Hz), 7.60 (2H, d, $J = 7.3$ Hz), 7.42-7.37 (2H, m), 7.35-7.27 (7H, m), 5.40 (1H, s), 4.53 (2H, s), 4.39 (2H, d, $J = 6.7$ Hz), 4.25-4.19 (1H, m), 4.04-3.97 (1H, m), 3.69-3.35 (12H, m).

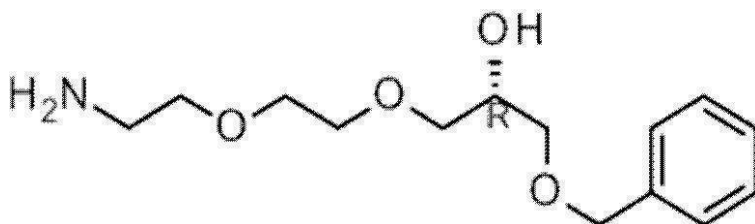
Calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{33}\text{NO}_6$: $[\text{M}+\text{H}]^+ 492$, Found 492.

【0 4 2 8】

(R e f 1 B) (2R)-1-[2-(2-アミノエトキシ)エトキシ]-3-ベンジルオキシ-プロパン-2-オール、トリフルオロ酢酸塩(化合物 R e f 1 B)の合成

【0 4 2 9】

【化 9 2】



【0 4 3 0】

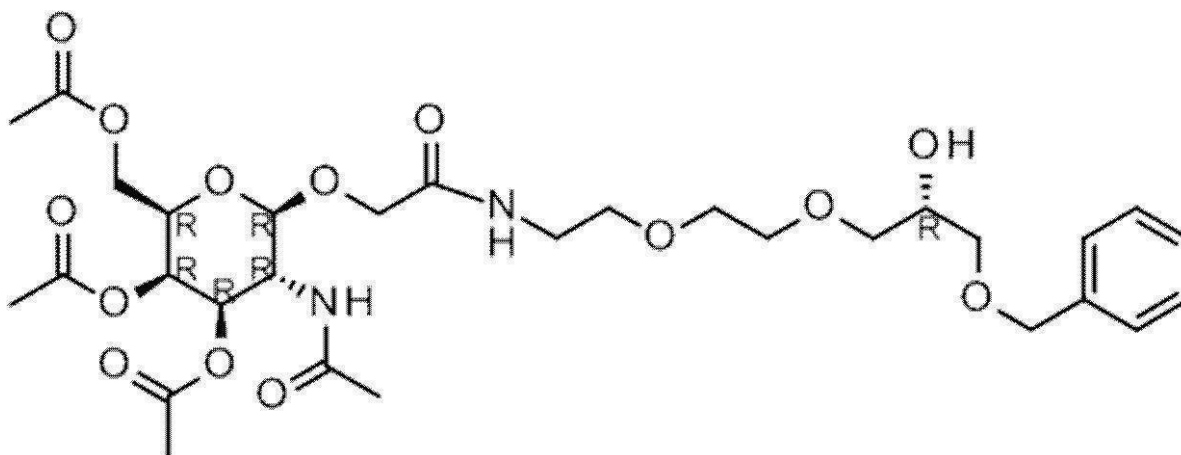
工程(R e f 1 A)で合成した化合物 R e f 1 A (13.8g, 28.1mmol)をエタノール/テトラヒドロフラン(50mL/50mL)に溶解し、1N水酸化ナトリウム水溶液(100mL)を加え、室温で2時間攪拌した。反応終了後、有機溶媒を減圧留去し、1N塩酸(100mL)を加えた。生じた固形物をろ過により除去した。通過液である水層に含まれる副生成物を酢酸エチルで抽出し、減圧留去した後に得られる残渣にアセトニトリルを加え、ろ過した。通過液を減圧留去して粗生成物を得た。0.1%トリフルオロ酢酸水溶液と0.1%トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液を溶離液とした逆相HPLC(GLサイエンス、Inertsil ODS-3)にて分離精製を行い、目的物が含まれるフラクションをまとめ、溶媒を減圧留去し、油状の目的物 R e f 1 B (7.1g、収率66%)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7.38-7.27 (5H, m), 4.55 (2H, s), 4.07-3.99 (1H, m), 3.77-3.48 (10H, m), 2.96-2.88 (2H, m).

【0 4 3 1】

(R e f 1 C) 酢酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-アセトアミド-3,4-ジアセトキシ-6-[2-[2-[2-[(2R)-3-ベンジルオキシ-2-ヒドロキシ-プロポキシ]エトキシ]エチルアミノ]-2-オキソ-エ

【化 9 3】



文献既知化合物の2-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-アセトアミド-4,5-ジアセトキシ-6-(アセトキシメチル)テトラヒドロピラン-2-イル]オキシ酢酸(WO2012037254)(6g, 14.8mmol)、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(3.4g, 17.8mmol)、3H-1,2,3-トリアゾール[4,5-b]ピリジン-3-オール(2.0g, 14.8mmol)、N,N-ジイソプロピルエチルアミン(9.0mL, 51.8mmol)、工程(R e f 1 B)で合成した化合物R e f 1 B(6.7g, 17.5mmol)をジクロロメタン(130mL)に溶解し、室温で4時間攪拌した。反応終了後、有機層を1N塩酸、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥、濾過し、溶媒を減圧留去して粗生成物を得た。溶媒を減圧留去し、粗生成物を得た。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=100：0-90：10, v/v)で精製し、アモルファス状の目的物R e f 1 C(7.9g、収率81%)を得た。

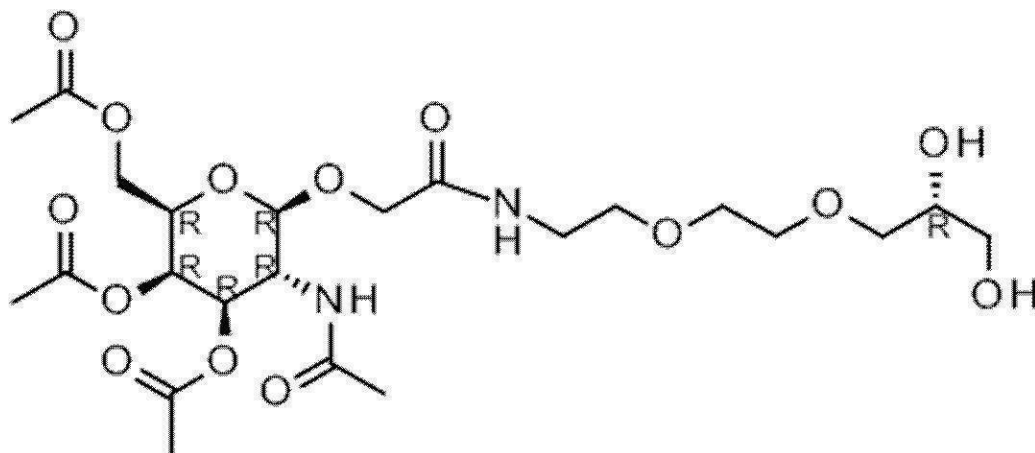
¹H-NMR (CDCl₃) δ: 7.39-7.28 (5H, m), 7.00-6.93 (1H, m), 6.50-6.44 (1H, m), 5.33-5.29 (1H, m), 5.16 (1H, dd, J = 11.5, 3.6 Hz), 4.63-4.53 (3H, m), 4.34 (1H, d, J = 15.1 Hz), 4.22-3.83 (5H, m), 3.73-3.26 (13H, m), 2.15 (3H, s), 2.05 (3H, s), 1.99 (6H, s).

Calcd for $C_{30}H_{44}N_2O_{14}$: $[M+H]^+$ 657, Found 657.

(R e f 1 D) 酢酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-アセトアミド-3,4-ジアセトキシ-6-[2-[2-[2-(2R)-2,3-ジヒドロキシプロポキシ]エトキシ]エチルアミノ]-2-オキソ-エトキシ]テトラヒドロピラン-2-イル]メチル アセテート (化合物 R e f 1 D) の合成

【 0 4 3 5 】

【化 9 4】



10

【0 4 3 6】

工程 (R e f 1 C) で合成した化合物 R e f 1 C (7.9g, 12mmol) をエタノール (80 mL) に溶解した。20%水酸化パラジウム/炭素(wet) (2.0g) を加え、水素雰囲気下、50 °Cで8時間激しく攪拌した。反応終了後、ろ過し、得られた通過液を減圧留去した。アモルファス状の目的物 R e f 1 D (6.7g、収率98%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7.03-6.98 (1H, m), 6.43 (1H, d, $J = 9.1$ Hz), 5.35 (1H, d, $J = 3.3$ Hz), 5.15 (1H, dd, $J = 11.2, 3.3$ Hz), 4.58 (1H, d, $J = 7.9$ Hz), 4.35 (1H, d, $J = 15.7$ Hz), 4.28-3.82 (5H, m), 3.77-3.34 (13H, m), 2.18 (3H, s), 2.06 (3H, s), 2.03 (3H, s), 2.01 (3H, s).

Calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_{14}$: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 568, Found 568.

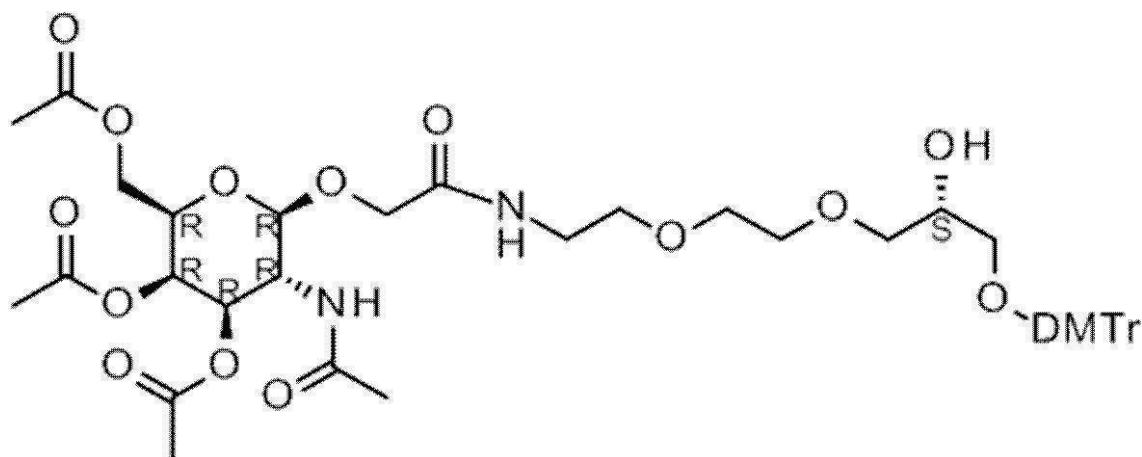
20

【0 4 3 7】

(R e f 1 E) 酢酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-アセトアミド-3,4-ジアセトキシ-6-[2-[2-[2-[(2S)-3-[ビス(4-メトキシフェニル)-フェニル-メトキシ]-2-ヒドロキシ-プロポキシ]エトキシ]エチルアミノ]-2-オキシ-エトキシ]テトラヒドロピラン-2-イル]メチル (化合物 R e f 1 E) の合成

【0 4 3 8】

【化 9 5】



40

【0 4 3 9】

工程 (R e f 1 D) で合成した化合物 R e f 1 D (6.8g, 12mmol) に適量のピリジンを加え、減圧下、共沸した。ピリジン (40mL) に溶解させ、4,4'-ジメトキシトリチルクロリド (4.5g, 13mmol) を加え、室温で2時間攪拌した。反応終了後、溶媒を減圧留去した。適量のトルエンを加え共沸した後、粗生成物を得た。これをシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル：酢酸エチル/メタノール(5/1)=100：0-50：50, v/v、1

50

%トリエチルアミン含有)で精製し、アモルファス状の目的物 R e f 1 E (6.9g、収率66%)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7.42 (2H, d, $J = 7.9$ Hz), 7.33-7.19 (7H, m), 7.01-6.94 (1H, m), 6.83 (4H, d, $J = 9.1$ Hz), 6.37 (1H, d, $J = 8.5$ Hz), 5.33 (1H, d, $J = 3.3$ Hz), 5.15 (1H, dd, $J = 11.2, 3.3$ Hz), 4.58 (1H, d, $J = 7.9$ Hz), 4.32 (1H, d, $J = 15.7$ Hz), 4.22-3.86 (5H, m), 3.79 (6H, s), 3.66-3.12 (13H, m), 2.13 (3H, s), 2.03 (3H, s), 1.97 (3H, s), 1.95 (3H, s).

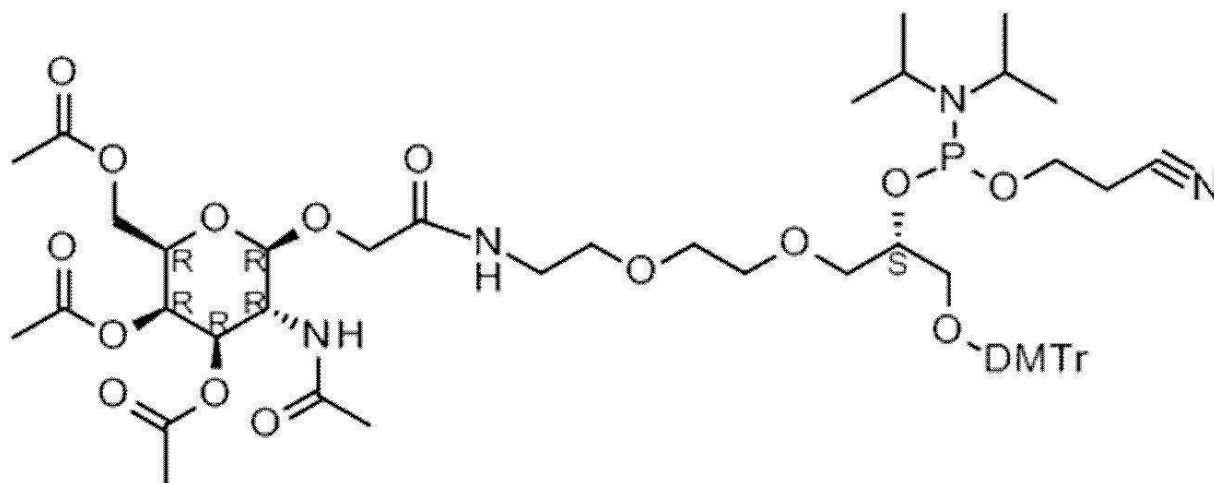
Calcd for $\text{C}_{44}\text{H}_{56}\text{N}_2\text{O}_{16}$: $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 893, Found 892.

【0440】

(R e f 1 F) 酢酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-アセトアミド-3,4-ジアセトキシ-6-[2-[2-[2-[(2S)-3-[ビス(4-メトキシフェニル)-フェニル-メトキシ]-2-[2-シアノエトキシ-(ジイソプロピルアミノ)ホスファニル]オキシ-プロポキシ]エトキシ]エチルアミノ]-2-オキソ-エトキシ]テトラヒドロピラン-2-イル]メチル (化合物 R e f 1 F) の合成

【0441】

【化96】



【0442】

工程 (R e f 1 E) で合成した化合物 R e f 1 E (6.9g, 7.9mmol) を適量のトルエンで共沸した後に、ジクロロメタン (80mL) に溶解した。N,N-ジイソプロピルエチルアミン (5.5mL, 32mmol)、2-シアノエチルジイソプロピルクロロホスホロアミジト (2.1mL, 9.5mmol) を加え、室温で1時間攪拌した。反応終了後、溶媒を減圧留去し、粗生成物を得た。これをシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル:酢酸エチル/メタノール (5/1)=100:0-50:50, v/v、1%トリエチルアミン含有) で精製し、アモルファス状の目的物 R e f 1 F (6.6g、収率78%)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7.47-7.40 (2H, m), 7.35-7.17 (7H, m), 6.98-6.91 (1H, m), 6.85-6.78 (4H, m), 6.05-5.89 (1H, m), 5.37-5.33 (1H, m), 5.17-5.07 (1H, m), 4.59-4.49 (1H, m), 4.37-4.30 (1H, m), 4.23-3.06 (28H, m), 2.69-2.42 (2H, m), 2.15 (3H, s), 2.05 (3H, s), 2.02-1.98 (3H, m), 1.97-1.94 (3H, m), 1.30-1.00 (12H, m).

【0443】

【比較例1-2】X13が導入されたコンジュゲートの合成

$\text{HO-X}^{13}-\text{X}^{13}-\text{X}^{13}-\text{A}^{\text{m1s}}-\text{A}^{\text{e2s}}-\text{U}^{\text{m1s}}-\text{C}^{\text{m1s}}-\text{C}^{\text{e2s}}-\text{G}^{\text{m1s}}-\text{A}^{\text{m1s}}-\text{T}^{\text{e2s}}-\text{G}^{\text{m1s}}-\text{G}^{\text{e2s}}-\text{G}^{\text{m1s}}-\text{A}^{\text{m1s}}-\text{A}^{\text{e2s}}-\text{G}^{\text{m1t}}-\text{H}$ (配列番号40)

GalNAcユニットアミダイトとして化合物 R e f 1 F を用いることにより X^{18} の部分を X^{13} と置き換えて、実施例8と同様に合成を行った。ただし、GalNAcユニットアミダイトの付加反応は3回繰り返し、X13を3つ結合させた。

本化合物の塩基配列は、Homo sapiens glucose-6-phosphatase catalytic subunit (G6PC), transcript variant 1, mRNA (NCBI-GenBank accession No. NM_000151

.3)のヌクレオチド番号728のGからTへ変異している、c.648G>T変異G6PC遺伝子のエクソン5の5'末端から92番目から106番目に相補的な配列である。化合物は負イオンESI質量分析により同定した(実測値:6878.11)。

【0444】

[比較例1-3] 5'末端側に4,4'-ジメトキシトリチル基を有するG a l N A cユニットと結合したオリゴヌクレオチドのDM T r - o nイオン交換カラム精製

(1) オリゴマーの合成と混合液の調製

HO-X13-X13-X13-A m1s-A e2s-U m1s-C m1s-C e2s-G m1s-A m1s-T e2s-G m1s-G m1s-C e2s-G m1s-A m1s-A e2s-G m1t-H (配列番号40)

核酸自動合成装置にAKTA Oligopilot (GE Healthcare製)を用い、固相担体としてPrimer Support 5G Unylinker 350, 390 μmol (GE Healthcare製)を用い、スケールに適した合成プログラムを用いた。

得られた固相担体のうち10 μmolを用いて、ABI 392 DNA/RNA Synthesizer (Applied Biosystems製)でG a l N A cユニットX13を3回縮合した。合成終了後、目的のオリゴヌクレオチド配列を有し、5'末端側に4,4'-ジメトキシトリチル基を有するG a l N A cユニットと結合したオリゴヌクレオチド類縁体の混合物が得られた。6mLの濃アンモニア水で処理することによってオリゴヌクレオチドを支持体から切り出すとともに、リン原子上の保護基シアノエチル基と核酸塩基上の保護基をはずした。

【0445】

精製方法1: Clarity QSP (Phenomenex製) 精製

実施例8と同様に精製すると、表記目的物が得られた。

本化合物の塩基配列は、Homo sapiens glucose-6-phosphatase catalytic subunit (G6PC), transcript variant 1, mRNA (NCBI-GenBank accession No. NM_000151.3)のヌクレオチド番号728のGからTへ変異している、c.648G>T変異G6PC遺伝子のエクソン5の5'末端から92番目から106番目に相補的な配列である。化合物は負イオンESI質量分析により同定した(実測値:6878.11)。

【0446】

精製方法2: DM T r - o nイオン交換カラム精製

オリゴヌクレオチド混合物をDM T r - o nイオン交換カラム精製する前に、10mM 水酸化ナトリウム水溶液に置換した。

【0447】

精製装置にAKTA pure150 (GEヘルスケア製)、精製カラムにRESOURCE Q 6mL (GEヘルスケア製)を用いて、以下の方法で、上記オリゴヌクレオチド混合物を精製した。UV検出波長を(260nm)に設定し、以下の3つの工程の一つの精製プログラムとして使用した。これらの工程中のカラム通過液の検出波長260nmのクロマトグラムを図6に示す。

【0448】

(i) DM T r - o nオリゴヌクレオチドのイオン交換カラムへの吸着工程

流速3ml/minでバッファーA1(10mM 水酸化ナトリウム水溶液)を2CV流した。流速2ml/minでオリゴヌクレオチド混合物(1.5mL、10mM 水酸化ナトリウム水溶液)をカラム上部へ添加し、バッファーA1(10mM 水酸化ナトリウム水溶液)を2.5CV流した。続いて、流速3ml/minでバッファーA1(10mM 水酸化ナトリウム水溶液)を1CV流した後、流速2.4ml/minでバッファーA1(10mM 水酸化ナトリウム水溶液): バッファーB1(10mM 水酸化ナトリウム/2M塩化ナトリウム水溶液)(40:60~25:75を2CV、25:75を4CV)を流した。

【0449】

(ii) イオン交換カラム上での脱DM T r 化工程

流速1.2ml/minでバッファーA2(0.4% トリフルオロ酢酸水溶液)を7CV流した。

【0450】

(iii) 目的物の溶出工程

流速3ml/minでバッファーA1(10mM 水酸化ナトリウム水溶液)を5CV流して平衡化

10

20

30

40

50

した。続いて、流速3ml/minでバッファーA 1 (10mM 水酸化ナトリウム水溶液)：バッファーB 1 (10mM 水酸化ナトリウム/2M塩化ナトリウム水溶液)(30：70)から(0：100)のグラジエント(10CV)後、バッファーB 1 (10mM 水酸化ナトリウム/2M塩化ナトリウム水溶液)を2CV流した。

【0451】

図6の結果、脱保護後の溶出工程で260nmの吸収が検出されなかったことから、DMT-onコンジュゲートは最初の吸着工程でカラムに吸着されず、通過していたことが判明した。そのため、目的物をイオン交換カラム精製することはできなかった。このことから、GalNAcユニットとオリゴヌクレオチドのコンジュゲートをDMT-r-onカラム精製するためには、疎水性保護基がGalNAc上に結合していること、および／または、一つのGalNAcユニットに含まれる疎水性保護基の数がGalNAcの数と同じかそれ以上であること、が重要であると考えられる。

10

【0452】

なお、本明細書において、 A^t 、 G^t 、 $5meC^t$ 、 C^t 、 T^t 、 U^t 、 AP 、 GP 、 $5meCP$ 、 CP 、 TP 、 UP 、 A^s 、 G^s 、 $5meC^s$ 、 C^s 、 T^s 、 U^s 、 $Am1^t$ 、 $Gm1^t$ 、 $Cm1^t$ 、 $5meCm1^t$ 、 $Um1^t$ 、 $Am1^p$ 、 $Gm1^p$ 、 $Cm1^p$ 、 $5meCm1^p$ 、 $Um1^p$ 、 $Am1^s$ 、 $Gm1^s$ 、 $Cm1^s$ 、 $5meCm1^s$ 、 $Um1^s$ 、 A^{2t} 、 G^{2t} 、 C^{2t} 、 T^{2t} 、 Ae^{2p} 、 Ge^{2p} 、 Ce^{2p} 、 Te^{2p} 、 Ae^{2s} 、 Ge^{2s} 、 Ce^{2s} 、 Te^{2s} 、 A^{1t} 、 G^{1t} 、 C^{1t} 、 T^{1t} 、 Ae^{1p} 、 Ge^{1p} 、 Ce^{1p} 、 Te^{1p} 、 Ae^{1s} 、 Ge^{1s} 、 Ce^{1s} 、 Te^{1s} 、 Am^{2t} 、 Gm^{2t} 、 $5meCm^{2t}$ 、 Tm^{2t} 、 Am^{2p} 、 Gm^{2p} 、 $5meCm^{2p}$ 、 Tm^{2p} 、 Am^{2s} 、 Gm^{2s} 、 $5meCm^{2s}$ 、 Tm^{2s} 、 X 、 X^1 、 X^2 、 X^3 、 X^4 、 X^5 、 X^6 、 X^7 、 X^8 、 X^9 、 X^{10} 、 X^{11} 、 X^{12} 、 X^{13} 、 X^{14} 、 X^{15} 、 X^{16} 、 X^{17} 、 X^{18} 、 X^{19} 、 X^{20} 、 X^{21} 、 X^{22} は、下記に示す構造を有する基である。

20

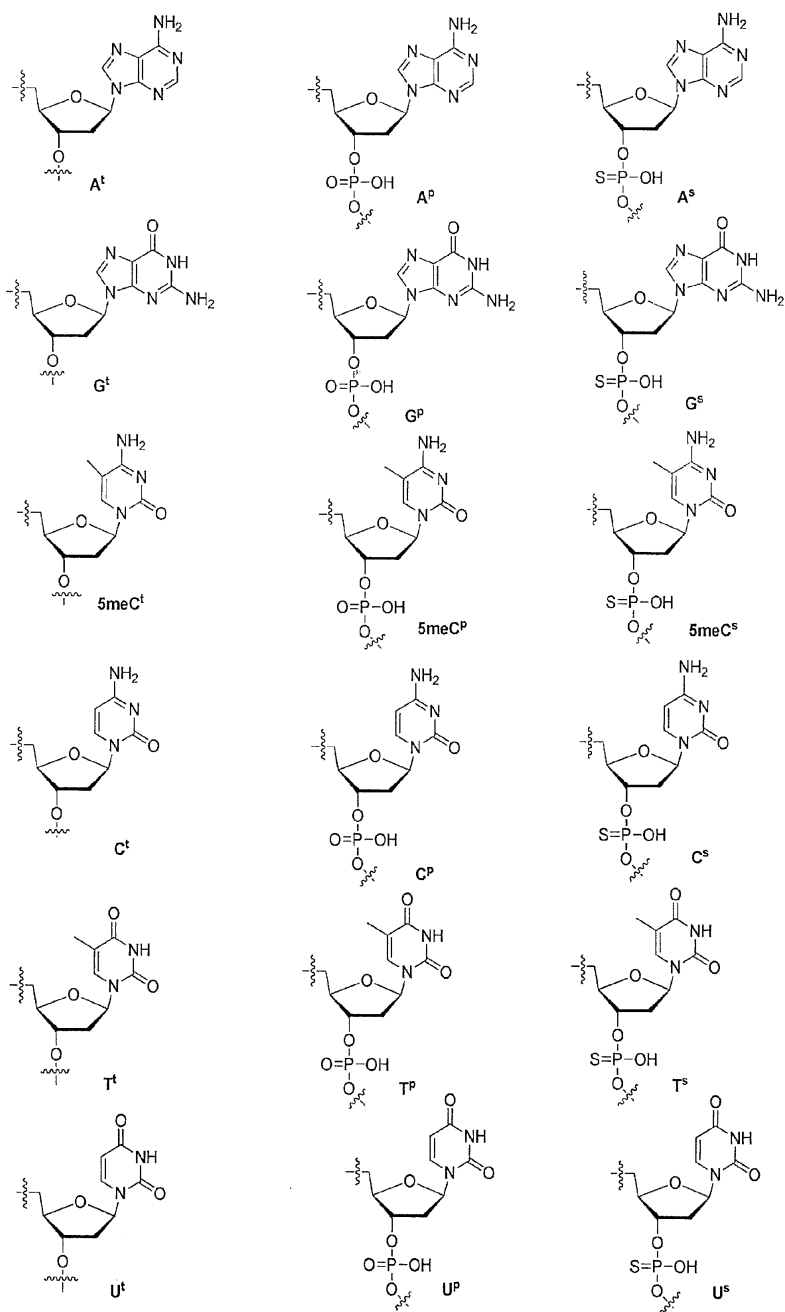
【0453】

30

40

50

【化 9 7】



10

20

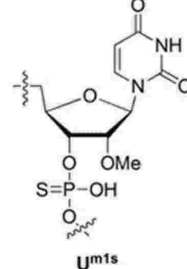
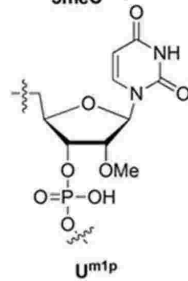
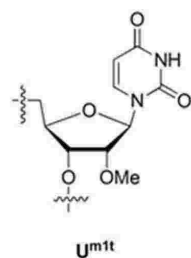
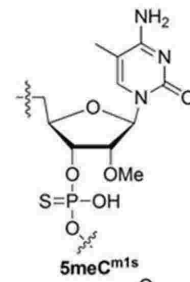
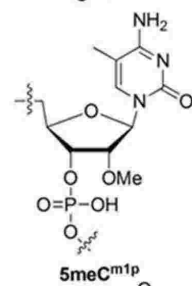
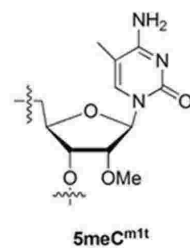
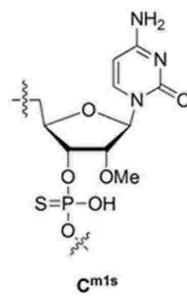
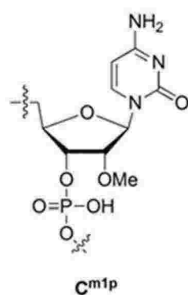
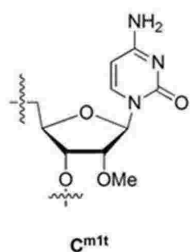
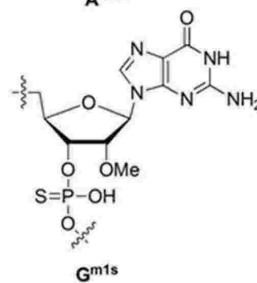
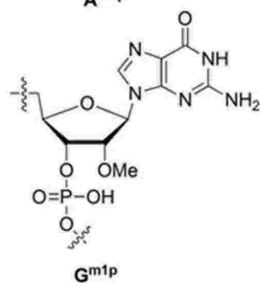
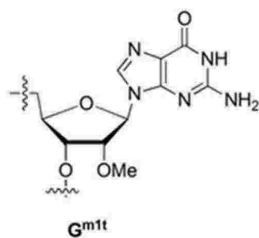
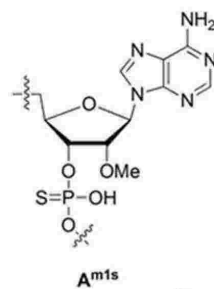
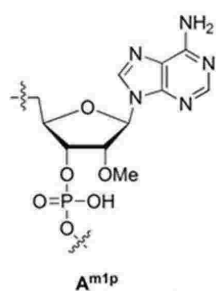
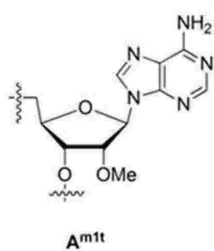
30

40

【 0 4 5 4】

50

【化 9 8】



【 0 4 5 5】

10

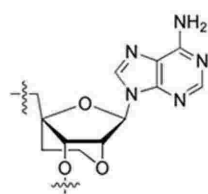
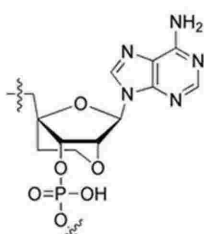
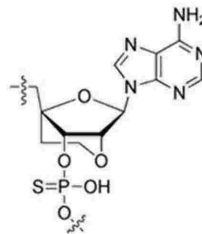
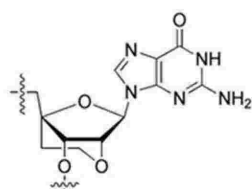
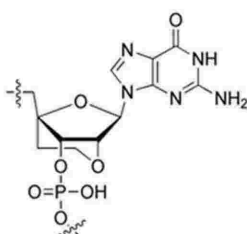
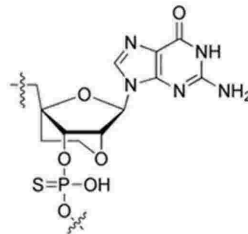
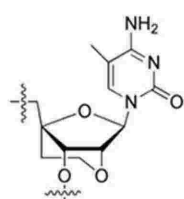
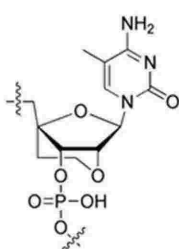
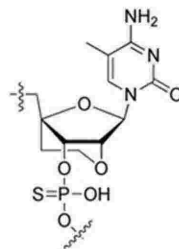
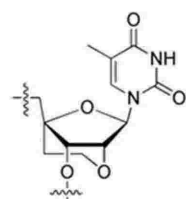
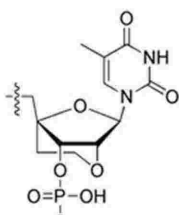
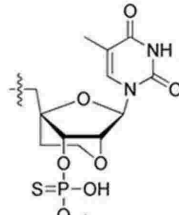
20

30

40

50

【化 9 9】

**A^{2t}****A^{e2p}****A^{e2s}****G^{2t}****G^{e2p}****G^{e2s}****C^{2t}****C^{e2p}****C^{e2s}****T^{2t}****T^{e2p}****T^{e2s}**

【 0 4 5 6】

10

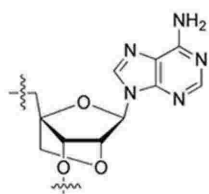
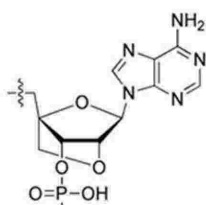
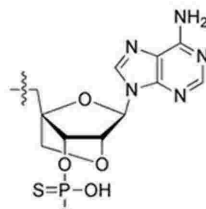
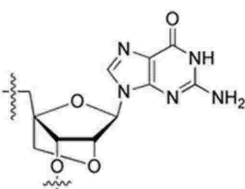
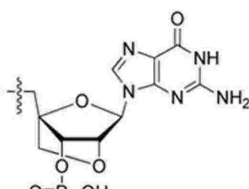
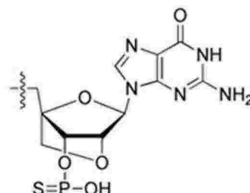
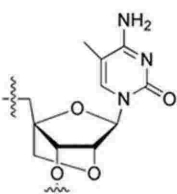
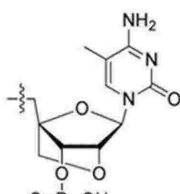
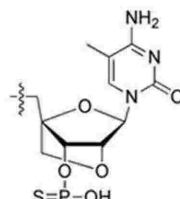
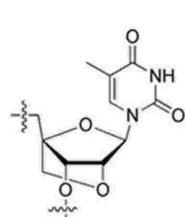
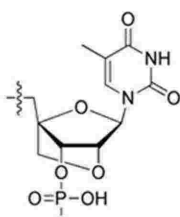
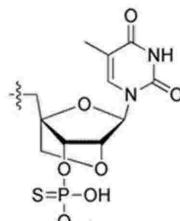
20

30

40

50

【化 1 0 0】

**A^{1t}****A^{e1p}****A^{e1s}****G^{1t}****G^{e1p}****G^{e1s}****C^{1t}****C^{e1p}****C^{e1s}****T^{1t}****T^{e1p}****T^{e1s}**

【 0 4 5 7 】

10

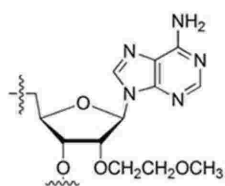
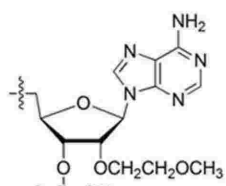
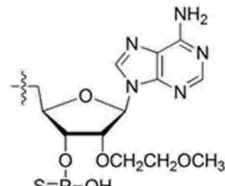
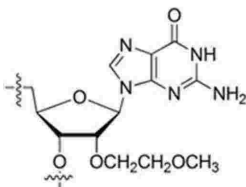
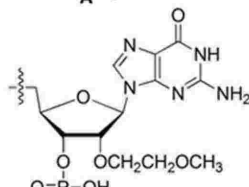
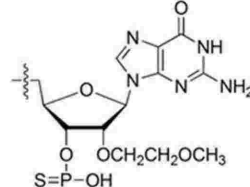
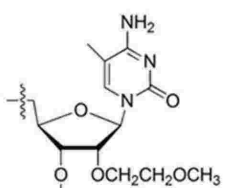
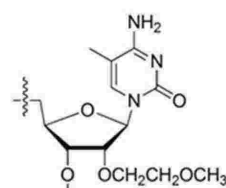
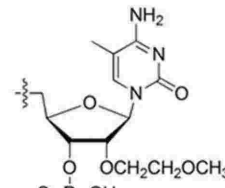
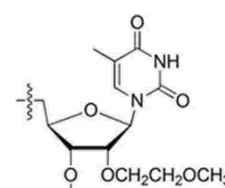
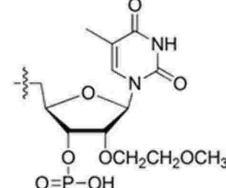
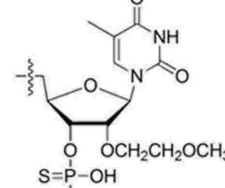
20

30

40

50

【化 1 0 1】

 A^{m2t}  A^{m2p}  A^{m2s}  G^{m2t}  G^{m2p}  G^{m2s}  $5meC^{m2t}$  $5meC^{m2p}$  $5meC^{m2s}$  T^{m2t}  T^{m2p}  T^{m2s}

【 0 4 5 8 】

10

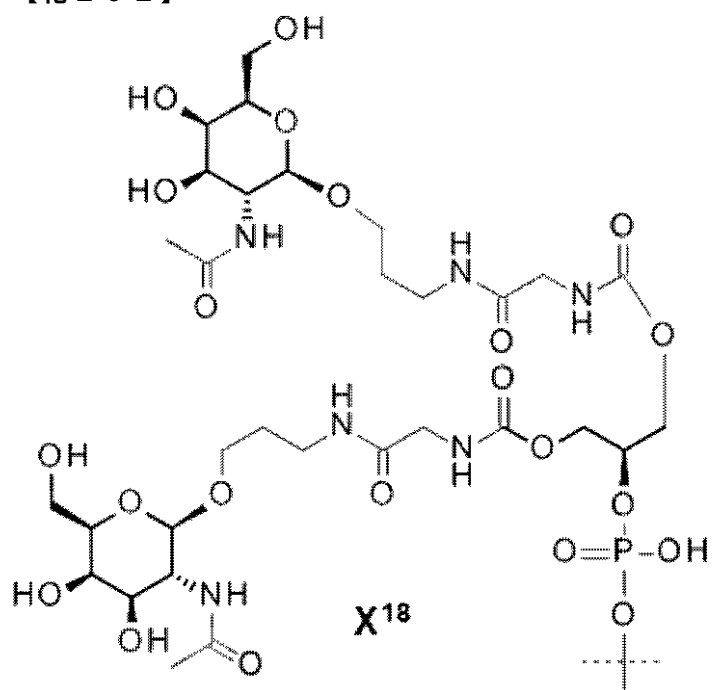
20

30

40

50

【化 1 0 2】

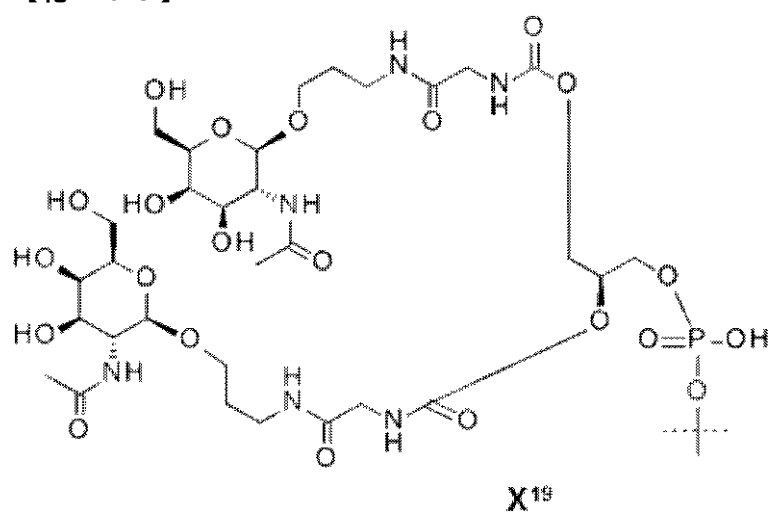


10

20

【 0 4 5 9】

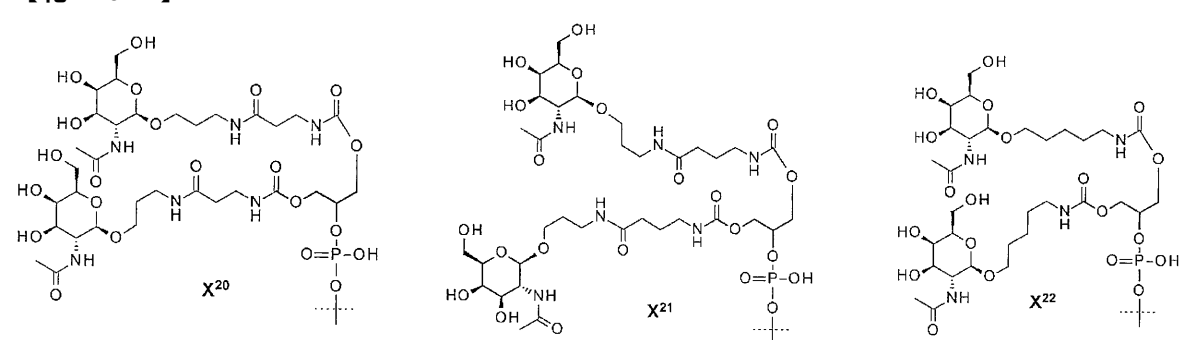
【化 1 0 3】



30

【 0 4 6 0】

【化 1 0 4】



40

【 0 4 6 1】

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書

50

にとり入れるものとする。

【産業上の利用可能性】

【0462】

本発明は、糖原病Ⅰa型の治療に利用できる。

【配列表フリーテキスト】

【0463】

配列番号1～48、93～96：アンチセンスオリゴヌクレオチドの配列を示す。アンチセンスオリゴヌクレオチドを構成するヌクレオチドは、天然型DNA、天然型RNA、DNA/RNAのキメラ、これらの修飾体のいずれであってもよいが、少なくとも1つが修飾ヌクレオチドであることが好ましい。

10

配列番号49～65、67～92：プライマーの配列を示す。

配列番号66：ペプチドの配列を示す。

20

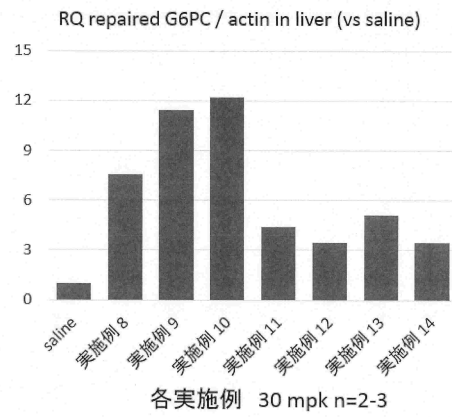
30

40

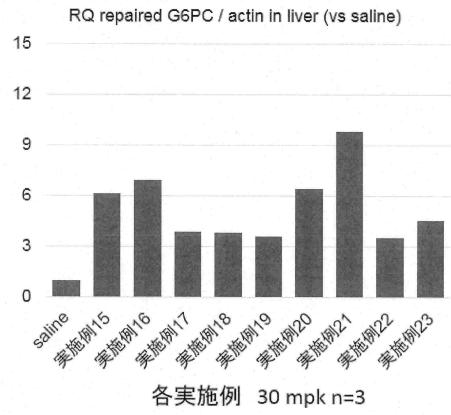
50

【図面】

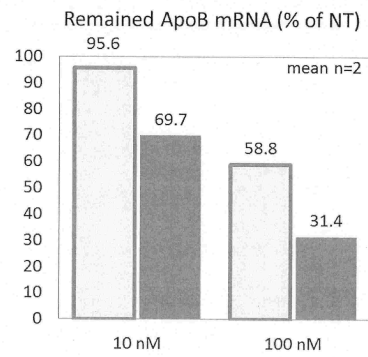
【図 1】



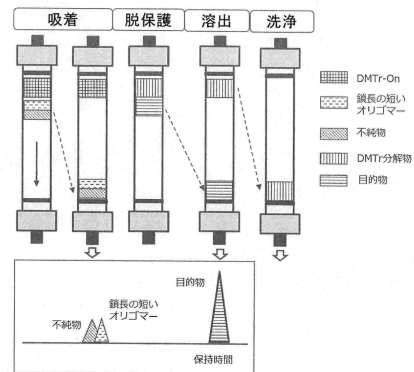
【図 2】



【図 3】



【図 4】



10

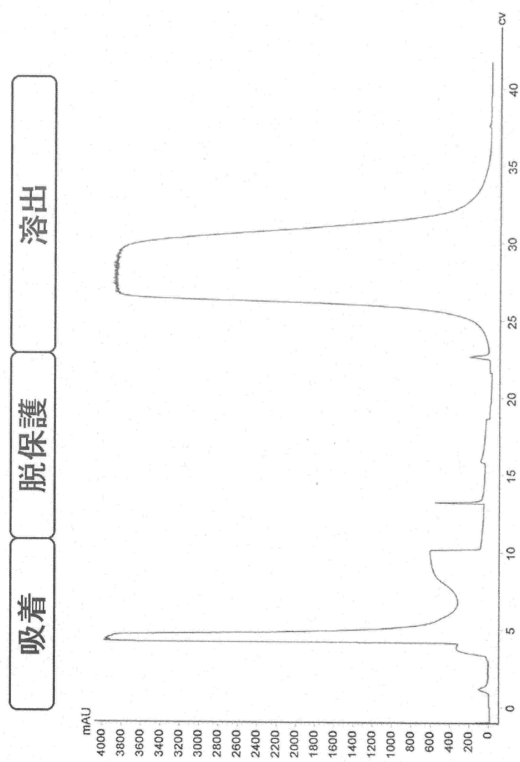
20

30

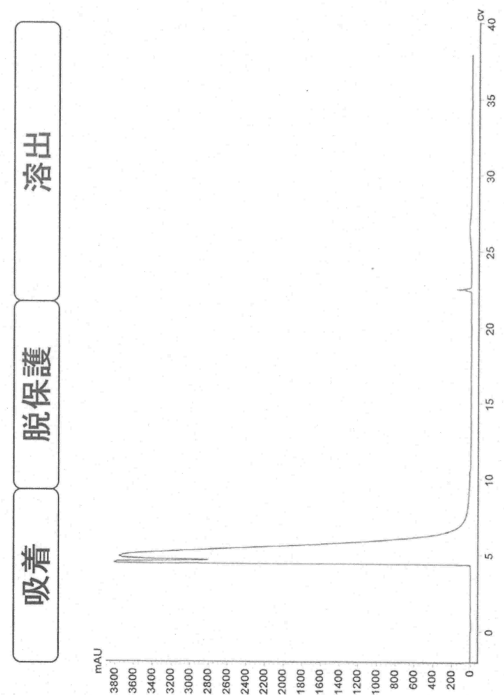
40

50

【図 5】



【図 6】



【配列表】

0007636333000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

一三共株式会社内
(72)発明者 岩本 充広
東京都品川区広町一丁目2番58号 第一三共株式会社内
(72)発明者 関口 幸子
東京都品川区広町一丁目2番58号 第一三共株式会社内
(72)発明者 伊藤 健太郎
東京都品川区広町一丁目2番58号 第一三共株式会社内
審査官 三上 晶子
(56)参考文献 国際公開第2019/008713 (WO, A1)
(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
A61K 9/00- 9/72
A61K 47/00- 47/69
A61P 1/00- 43/00
C07H 1/00- 99/00
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (ST
N)