

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6884268号

(P6884268)

(45) 発行日 令和3年6月9日(2021.6.9)

(24) 登録日 令和3年5月13日(2021.5.13)

(51) Int.Cl.

F I

A 6 1 K 31/7115 (2006.01)

A 6 1 K 31/7115 Z N A

A 6 1 K 47/54 (2017.01)

A 6 1 K 47/54

A 6 1 P 3/08 (2006.01)

A 6 1 P 3/08

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

A 6 1 P 43/00 1 O 1

C 1 2 N 15/113 (2010.01)

C 1 2 N 15/113 1 3 O Z

請求項の数 2 (全 174 頁)

(21) 出願番号 特願2020-505066 (P2020-505066)

(86) (22) 出願日 平成31年3月5日(2019.3.5)

(86) 国際出願番号 PCT/JP2019/008713

(87) 国際公開番号 W02019/172286

(87) 国際公開日 令和1年9月12日(2019.9.12)

審査請求日 令和3年1月12日(2021.1.12)

(31) 優先権主張番号 特願2018-43524 (P2018-43524)

(32) 優先日 平成30年3月9日(2018.3.9)

(33) 優先権主張国・地域又は機関

日本国(JP)

(31) 優先権主張番号 特願2018-128015 (P2018-128015)

(32) 優先日 平成30年7月5日(2018.7.5)

(33) 優先権主張国・地域又は機関

日本国(JP)

(73) 特許権者 307010166

第一三共株式会社

東京都中央区日本橋本町三丁目5番1号

(73) 特許権者 507307374

学校法人神戸学院

兵庫県神戸市中央区港島一丁目1番地3

(74) 代理人 100098121

弁理士 間山 世津子

(74) 代理人 100107870

弁理士 野村 健一

(72) 発明者 小泉 誠

東京都中央区日本橋本町三丁目5番1号

第一三共株式会社内

早期審査対象出願

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 糖原病 I a 型治療薬

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の実施例 1 3 3、1 3 8 ~ 1 4 8 及び 1 5 2 ~ 1 5 5 の式のいずれか一つで表されるオリゴヌクレオチドとGalNAcユニットのコンジュゲート、

実施例 1 3 3 :  $X^{18} - A^{m1s} - A^{e2s} - U^{m1s} - C^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{m1s} - T^{e2s} - G^{m1s} - G^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{m1s} - A^{e2s} - G^{m1t} - H$  (配列番号 4 0)

実施例 1 3 8 :  $X^{18} - A^{e2s} - U^{m1s} - C^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{m1s} - T^{e2s} - G^{m1s} - G^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{m1s} - A^{e2s} - G^{m1s} - C^{e2t} - H$  (配列番号 4 4)

実施例 1 3 9 :  $X^{18} - U^{m1s} - C^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{m1s} - T^{e2s} - G^{m1s} - G^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{m1s} - A^{e2s} - G^{m1s} - C^{e2s} - U^{m1t} - H$  (配列番号 4 5)

実施例 1 4 0 :  $X^{18} - A^{m1s} - A^{m1s} - A^{e2s} - U^{m1s} - C^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{m1s} - T^{e2s} - G^{m1s} - G^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{m1s} - A^{e2s} - G^{m1t} - H$  (配列番号 4 2)

実施例 1 4 1 :  $X^{18} - A^{m1s} - A^{e2s} - U^{m1s} - C^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{m1s} - T^{e2s} - G^{m1s} - G^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{m1s} - A^{e2s} - G^{m1s} - C^{e2t} - H$  (配列番号 4 7)

実施例 1 4 2 :  $X^{18} - A^{e2s} - U^{m1s} - C^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{m1s} - T^{e2s} - G^{m1s} - G^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{m1s} - A^{e2s} - G^{m1s} - C^{e2s} - U^{m1t} - H$  (配列番号 4 8)

実施例 1 4 3 :  $X^{18} - A^{m1s} - A^{e2s} - U^{m1s} - C^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{e2s} - U^{m1s} - G^{m1s} - G^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{m1s} - A^{e2s} - G^{m1t} - H$  (配列番号 4 0)

実施例 1 4 4 :  $X^{18} - A^{e2s} - U^{m1s} - C^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{e2s} - U^{m1s} - G^{m1s} - G^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{m1s} - A^{e2s} - G^{m1s} - C^{e2t} - H$  (配列番号 4 4)

10

20

実施例 1 4 5 :  $X^{18} - U^{m1s} - C^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{e2s} - U^{m1s} - G^{m1s} - G^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{m1s} - A^{e2s} - G^{m1s} - C^{e2s} - U^{m1t} - H$  ( 配列番号 4 5 )

実施例 1 4 6 :  $X^{18} - A^{m1s} - A^{m1s} - A^{e2s} - U^{m1s} - C^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{e2s} - U^{m1s} - G^{m1s} - G^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{m1s} - A^{e2s} - G^{m1t} - H$  ( 配列番号 4 2 )

実施例 1 4 7 :  $X^{18} - A^{m1s} - A^{e2s} - U^{m1s} - C^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{e2s} - U^{m1s} - G^{m1s} - G^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{m1s} - A^{e2s} - G^{m1s} - C^{e2t} - H$  ( 配列番号 4 7 )

実施例 1 4 8 :  $X^{18} - A^{e2s} - U^{m1s} - C^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{e2s} - U^{m1s} - G^{m1s} - G^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{m1s} - A^{e2s} - G^{m1s} - C^{e2s} - U^{m1t} - H$  ( 配列番号 4 8 )

実施例 1 5 2 :  $X^{20} - A^{m1s} - A^{e2s} - U^{m1s} - C^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{e2s} - U^{m1s} - G^{m1s} - G^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{m1s} - A^{e2s} - G^{m1t} - H$  ( 配列番号 4 0 )

実施例 1 5 3 :  $X^{20} - A^{e2s} - U^{m1s} - C^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{e2s} - U^{m1s} - G^{m1s} - G^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{m1s} - A^{e2s} - G^{m1s} - C^{e2t} - H$  ( 配列番号 4 4 )

実施例 1 5 4 :  $X^{20} - A^{m1s} - A^{m1s} - A^{e2s} - U^{m1s} - C^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{e2s} - U^{m1s} - G^{m1s} - G^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{m1s} - A^{e2s} - G^{m1t} - H$  ( 配列番号 4 2 )

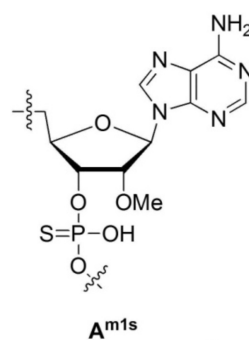
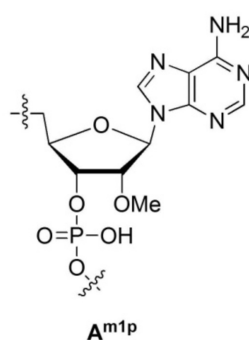
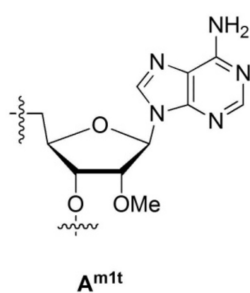
実施例 1 5 5 :  $X^{20} - A^{m1s} - A^{e2s} - U^{m1s} - C^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{e2s} - U^{m1s} - G^{m1s} - G^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{m1s} - A^{e2s} - G^{m1s} - C^{e2t} - H$  ( 配列番号 4 7 )

[ 上記式において、左側が5'末端、右側が3'末端を表し、 $A^{m1t}$ 、 $G^{m1t}$ 、 $C^{m1t}$ 、 $5meC^{m1t}$ 、 $U^{m1t}$ 、 $A^{m1p}$ 、 $G^{m1p}$ 、 $C^{m1p}$ 、 $5meC^{m1p}$ 、 $U^{m1p}$ 、 $A^{m1s}$ 、 $G^{m1s}$ 、 $C^{m1s}$ 、 $5meC^{m1s}$ 、 $U^{m1s}$ 、 $A^{e2t}$ 、 $G^{e2t}$ 、 $C^{e2t}$ 、 $T^{e2t}$ 、 $A^{e2p}$ 、 $G^{e2p}$ 、 $C^{e2p}$ 、 $T^{e2p}$ 、 $A^{e2s}$ 、 $G^{e2s}$ 、 $C^{e2s}$ 、 $T^{e2s}$ 、 $X^{18}$ 、 $X^{20}$  は、下記に示す構造を有する基である。 $X^{18}$  および  $X^{20}$  において、リン酸基に結合した結合手はオリゴヌクレオチドの5'末端の炭素原子に結合して、リン酸ジエステル結合を形成することを表す。 ]

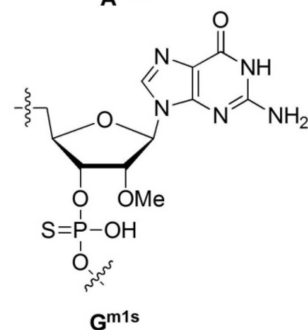
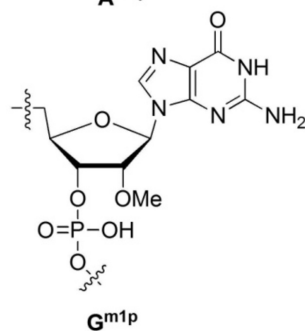
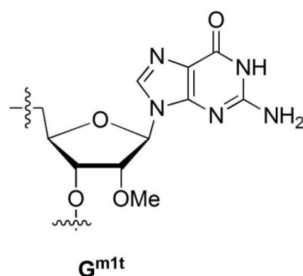
10

20

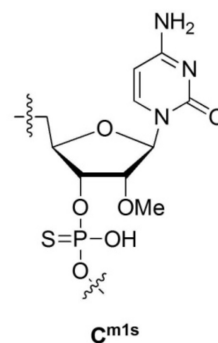
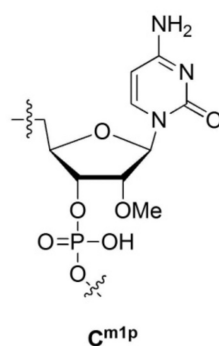
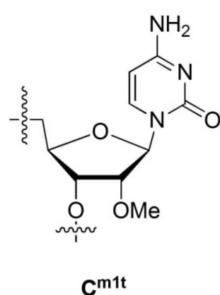
## 【化 1】



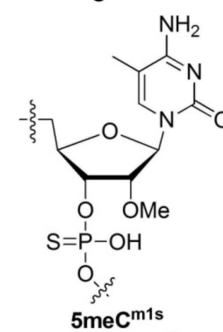
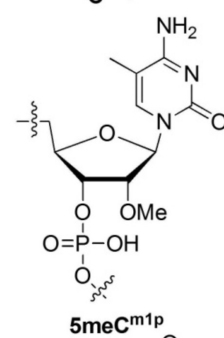
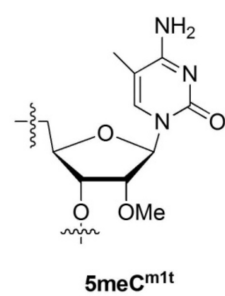
10



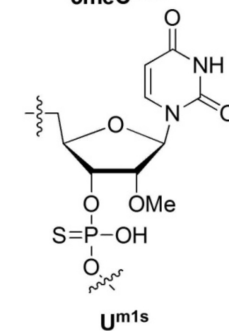
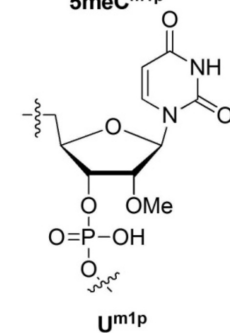
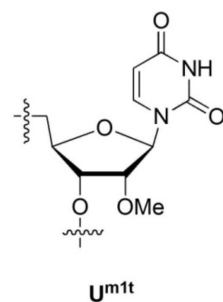
20



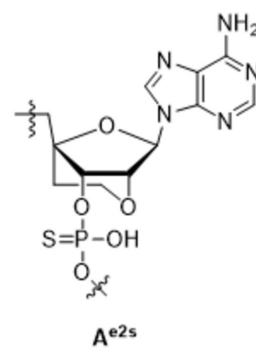
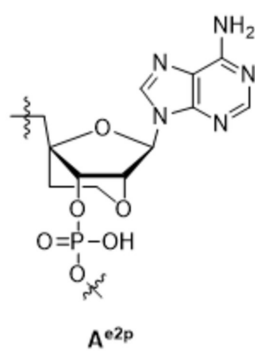
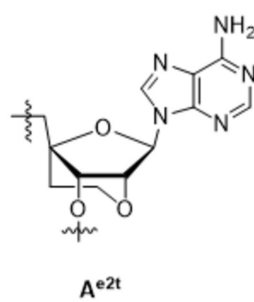
30



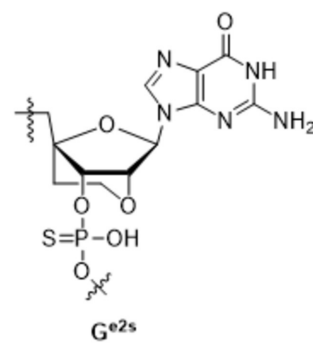
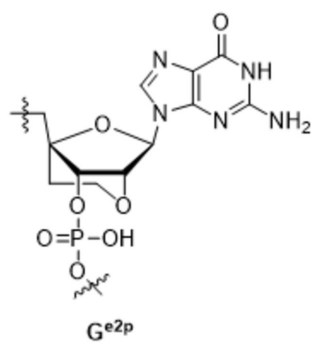
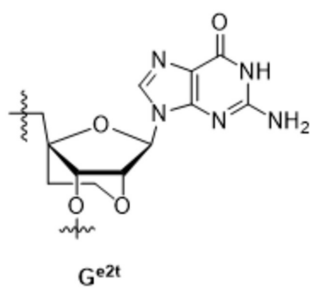
40



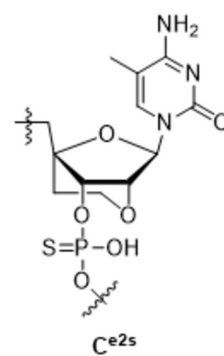
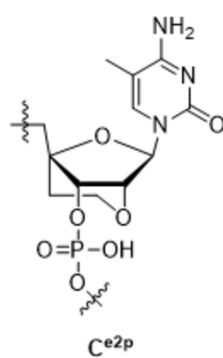
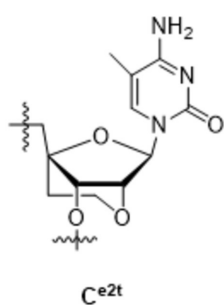
## 【化 2】



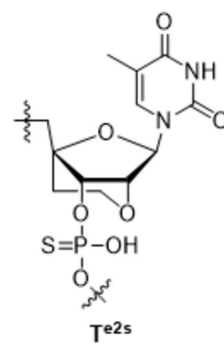
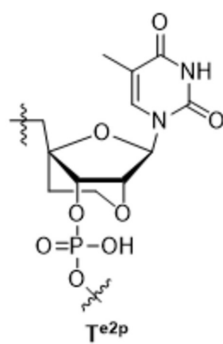
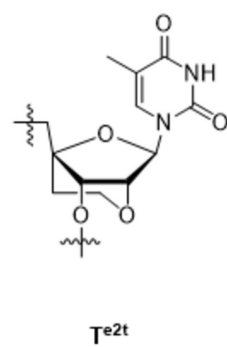
10



20



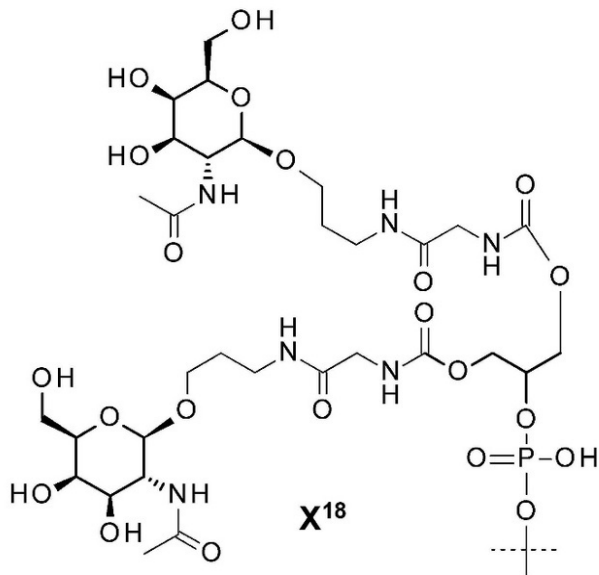
30



40

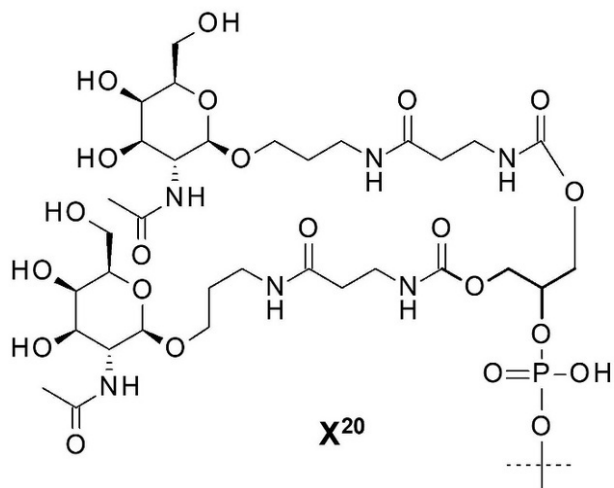


## 【化 3】



10

## 【化 4】



20

30

その薬理上許容される塩又は溶媒和物。

## 【請求項 2】

G6PC遺伝子にc.648G>T変異を有する糖原病1a型患者に投与されることを特徴とする、請求項1に記載のコンジュゲート、その薬理上許容される塩又は溶媒和物を含有する糖原病1a型治療剤。

40

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、糖原病Ⅰa型治療薬に関し、より詳細には、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及びそれを含む医薬に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

糖原病Ⅰa型はグルコース6リン酸脱リン酸化酵素（G6PC）を原因遺伝子とする常染色体劣性遺伝の代謝異常症であり、低血糖、肝腫大、腎腫大を主徴とする。食事療法による

50

血糖コントロールにより生存予後は大幅に改善したが、コントロール良好であってもその過半数が肝腺腫、アルブミン尿を呈する（非特許文献1）。糖原病Ⅰa型患者の好発変異はいくつか報告されており、東アジアにおいてはスプライシング異常を引き起こすG6PC c.648G>T変異が好発変異として知られている（非特許文献2）。

#### 【0003】

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3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

10

#### 【先行技術文献】

#### 【非特許文献】

#### 【0004】

【非特許文献1】Eur J Pediatr. 2002年 161巻 Suppl 1:S20-34

【非特許文献2】Hum Mutat. 2008年、29巻、p.921-930.

【非特許文献3】Methods in Enzymology、1999年、313巻、297～321頁

【非特許文献4】Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 26 (2016) 3690-3693

#### 【特許文献】

#### 【0005】

20

【特許文献1】国際公開第2009/073809

【特許文献2】国際公開第2014/076196

【特許文献3】国際公開第2014/179620

【特許文献4】国際公開第2015/006740

【特許文献5】国際公開第2015/105083

【特許文献6】国際公開第2016/055601

【特許文献7】国際公開第2017/023817

【特許文献8】国際公開第2017/084987

【特許文献9】国際公開第2017/131236

#### 【発明の概要】

30

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0006】

本発明は、糖原病Ⅰa型の分子治療法を確立することを目的とする。

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0007】

本発明者らは、G6PC c.648G>T変異を有する糖原病Ⅰa型患者に対し、アンチセンスオリゴヌクレオチド（ASO）を投与することで、mRNAの異常スプライシングを修復し、正常なG6PCタンパク質の産生を誘導する治療法を確立した（図1）。G6PC c.648G>T変異ではmRNAの異常スプライシングが生じ、intron4とexon5のjunctionからexon5部分の91塩基が欠損し、frame shiftによる酵素の失活が起きる。mRNAの異常スプライシングが是正された場合、この翻訳されるアミノ酸配列は正常型と同じになることが期待できる（CUG(Leu)CUU(Leu)）ため、G6PC c.648G>T変異を有する患者においては、このmRNAの異常スプライシングを修復する治療法により、活性を有する正常なG6PCタンパク質が産生され、糖原病Ⅰa型患者の低血糖発作のリスク軽減、臓器腫大の改善、肝腺腫リスクの軽減が可能になる。本研究は糖原病Ⅰa型に対する世界初の分子治療の開発研究となる。

40

#### 【0008】

本発明の要旨は以下の通りである。

（1）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

50

前記オリゴヌクレオチド、その薬理上許容される塩又は溶媒和物。

(2) 塩基数15~21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、(1)に記載のオリゴヌクレオチド、その薬理上許容される塩又は溶媒和物。

(3) 塩基数15~21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92番目の部位を含む領域に相補的な配列からなる、(1)に記載のオリゴヌクレオチド、その薬理上許容される塩又は溶媒和物。

(4) 塩基数15~18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92番目の部位を含む領域に相補的な配列からなる、(1)に記載のオリゴヌクレオチド、その薬理上許容される塩又は溶媒和物。

10

(5) 塩基数18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92番目の部位を含む領域に相補的な配列からなる、(1)に記載のオリゴヌクレオチド、その薬理上許容される塩又は溶媒和物。

(6) 塩基数17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92番目の部位を含む領域に相補的な配列からなる、(1)に記載のオリゴヌクレオチド、その薬理上許容される塩又は溶媒和物。

(7) 塩基数16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92番目の部位を含む領域に相補的な配列からなる、(1)に記載のオリゴヌクレオチド、その薬理上許容される塩又は溶媒和物。

20

(8) 塩基数15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92番目の部位を含む領域に相補的な配列からなる、(1)に記載のオリゴヌクレオチド、その薬理上許容される塩又は溶媒和物。

(9) 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はuであってもよく、uはtであってもよい)中の連続する少なくとも15個のヌクレオチドの配列を含む、(1)に記載のオリゴヌクレオチド、その薬理上許容される塩又は溶媒和物。

(10) さらに、生体内で切断されうるオリゴヌクレオチドが5'末端及び/又は3'末端に付加された(1)~(9)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド、その薬理上許容される塩又は溶媒和物。

30

(11) オリゴヌクレオチドを構成する糖及び/又はリン酸ジエステル結合の少なくとも1個が修飾されている、(1)~(10)のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド、その薬理上許容される塩又は溶媒和物。

(12) オリゴヌクレオチドを構成する糖がD-リボフラノースであり、糖の修飾がD-リボフラノースの2'位の水酸基の修飾である、(1)~(10)のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド、その薬理上許容される塩又は溶媒和物。

(13) オリゴヌクレオチドを構成する糖がD-リボフラノースであり、糖の修飾がD-リボフラノースの2'-O-アルキル化及び/又は2',4'-架橋化である、(1)~(10)のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド、その薬理上許容される塩又は溶媒和物。

(14) オリゴヌクレオチドを構成する糖がD-リボフラノースであり、糖の修飾がD-リボフラノースの2'-O-アルキル化及び/又は2'-O,4'-C-アルキレン化である、(1)~(10)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド、その薬理上許容される塩又は溶媒和物。

40

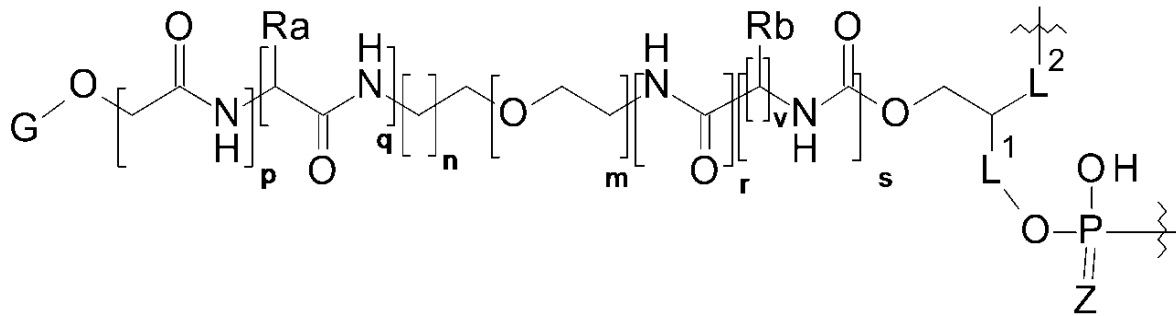
(15) リン酸ジエステル結合の修飾がホスホロチオエートである、(1)~(14)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド、その薬理上許容される塩又は溶媒和物。

(16) 5'末端及び/又は3'末端にGalNAcユニットが結合した(1)~(15)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド、その薬理上許容される塩又は溶媒和物。

(17) 5'末端にGalNAcユニットが結合した(1)~(15)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド、その薬理上許容される塩又は溶媒和物。

(18) GalNAcユニットが、式

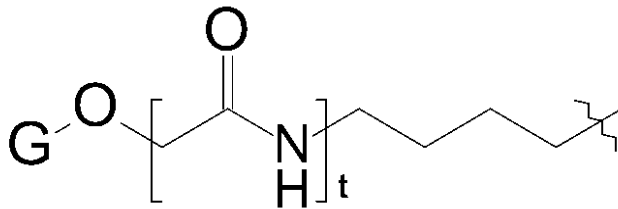
## 【化 1】



10

[ 式中、R a は式

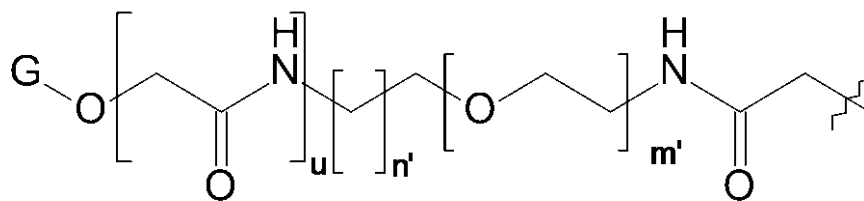
## 【化 2】



で表される基を示し、R b は式

20

## 【化 3】



で表される基または水素原子を示し、XXは、式

## 【化 4】



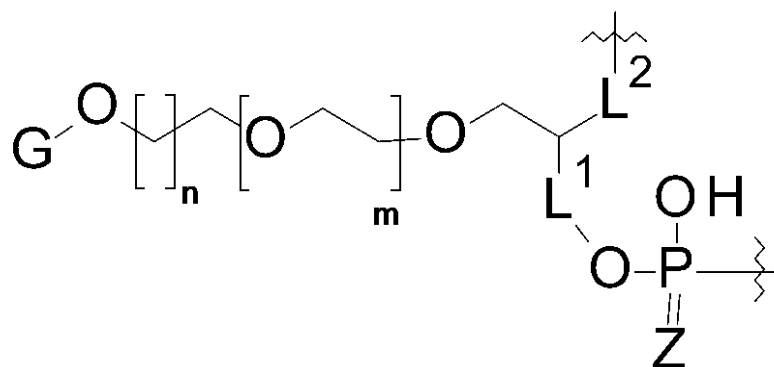
30

で表される基を示し、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<sup>1</sup> 及びL<sup>2</sup> は、一方がメチレン基 (CH<sub>2</sub>) を示し、他方が原子を挟まないを示し、p、q、r、s、t 及びuは互いに独立して0又は1を示し、n及びn'は互いに独立して1～15の整数を示し、m及びm'は互いに独立して0～5の整数を示し、Rbが水素原子でないとき、vは1を示し、Rbが水素原子のとき、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であり、n'が1のときm'は1～5の整数であり、n'が2～15の整数のときm'は0である。リン原子から遠い方の結合手には、水酸基、XX基、又はOG基が結合してもよい。] で表される基である、(16) 又は(17)に記載のオリゴヌクレオチド、その薬理上許容される塩又は溶媒和物。

40

(19) GalNAcユニットが、式

【化 5】

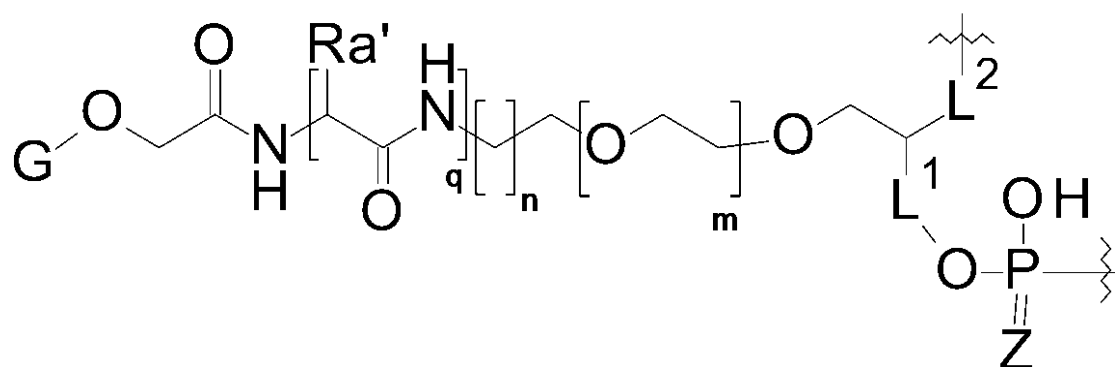


10

[ 式中、G、Z、L<sup>1</sup>、L<sup>2</sup>、n 及び m は、前記と同意義を示す。 ] で表される基である、( 16 ) 又は ( 17 ) に記載のオリゴヌクレオチド、その薬理上許容される塩又は溶媒和物。

( 20 ) GalNAc ユニットが、式

【化 6】

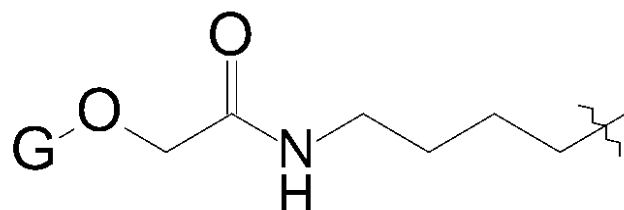


20

[ 式中、G、Z、L<sup>1</sup>、L<sup>2</sup>、q、n 及び m は、前記と同意義を示し、R a ' は、式

【化 7】

30

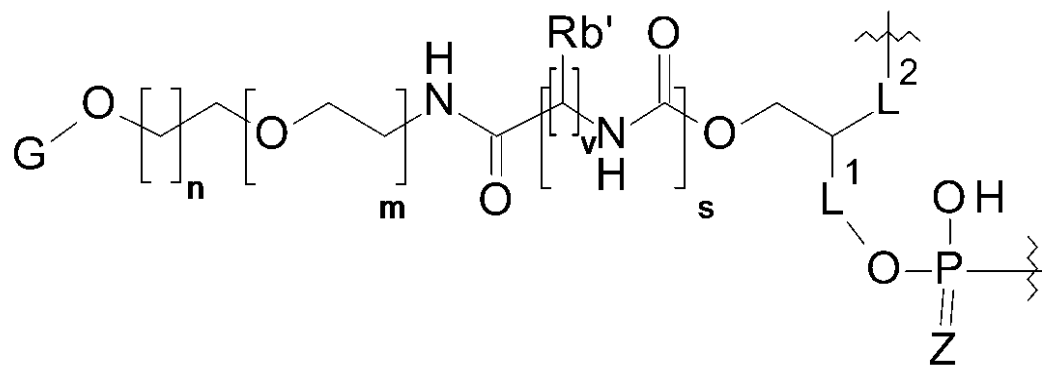


で表される基を示す。 ] で表される基である、( 16 ) 又は ( 17 ) に記載のオリゴヌクレオチド、その薬理上許容される塩又は溶媒和物。

( 21 ) GalNAc ユニットが、式

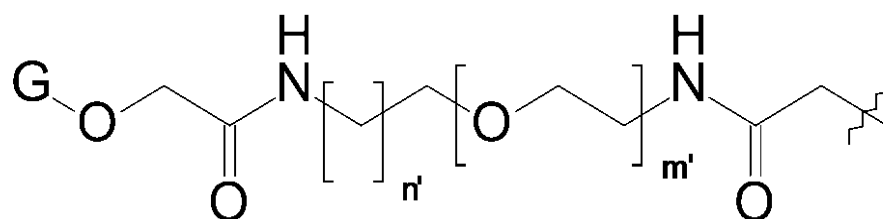
40

【化 8】



10

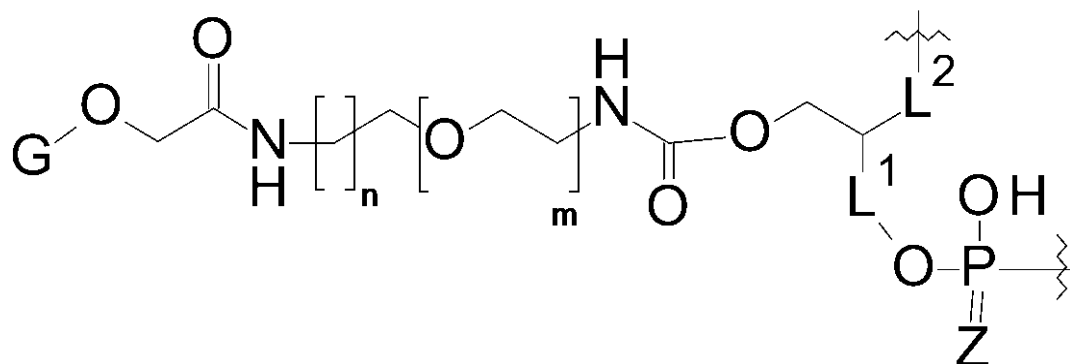
[ 式中、G、Z、 $L^1$ 、 $L^2$ 、s、n、m及びvは、前記と同意義を示し、Rb'は、式【化 9】



20

( 式中、n'及びm'は前記と同意義を示す。 ) で表される基あるいは水素原子を示す。  
] で表される基である、( 16 ) 又は ( 17 ) に記載のオリゴヌクレオチド、その薬理上許容される塩又は溶媒和物。

( 22 ) GalNAcユニットが、又は、式【化 10】



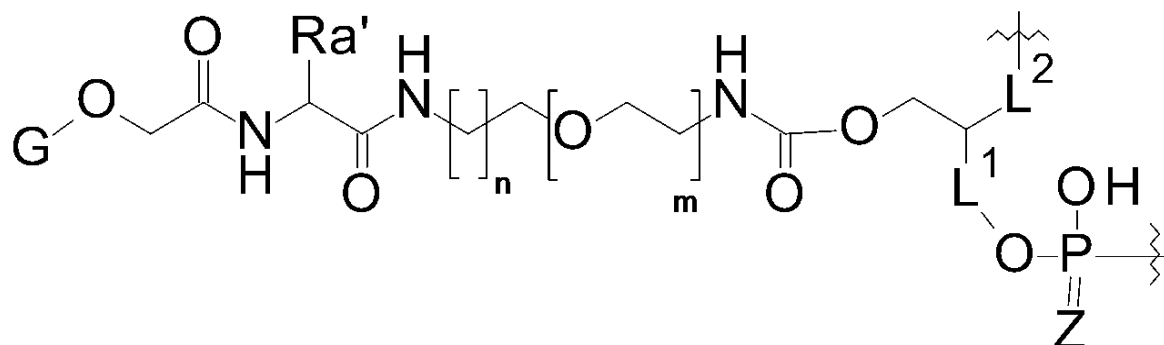
30

[ 式中、G、Z、 $L^1$ 、 $L^2$ 、n及びmは、前記と同意義を示す。 ] で表される基である、( 16 ) 又は ( 17 ) に記載のオリゴヌクレオチド、その薬理上許容される塩又は溶媒和物。

( 23 ) GalNAcユニットが、式

40

## 【化 1 1】

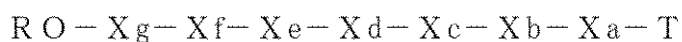


10

[ 式中、G、Z、L<sup>1</sup>、L<sup>2</sup>、n、m及びRa'は、前記と同意義を示す。 ] で表される基である、( 1 6 ) 又は ( 1 7 ) に記載のオリゴヌクレオチド、その薬理上許容される塩又は溶媒和物。

( 2 4 ) 式

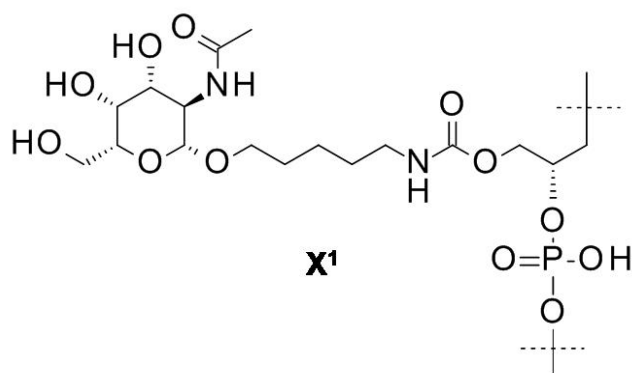
## 【化 1 2】



[ 式中、Rは水素原子、XX基、又はG基を示し、Tは5'末端に水酸基を持たないオリゴヌクレオチドを示し、XgはX<sup>1</sup>～X<sup>6</sup>及びX<sup>9</sup>～X<sup>17</sup>からなる群から選ばれるGalNAcユニットを示し、又は、RO-XgはX<sup>7</sup>、X<sup>8</sup>、X<sup>18</sup>、X<sup>19</sup>、X<sup>20</sup>、X<sup>21</sup>及びX<sup>22</sup>からなる群から選ばれるGalNAcユニットを示し、Xa、Xb、Xc、Xd、Xe及びXfは互いに独立してX<sup>1</sup>～X<sup>6</sup>及びX<sup>9</sup>～X<sup>17</sup>またはそれらの光学異性体からなる群から選ばれるGalNAcユニット又は単結合を示す。 ] で表される、( 1 ) に記載のオリゴヌクレオチド、その薬理上許容される塩又は溶媒和物。

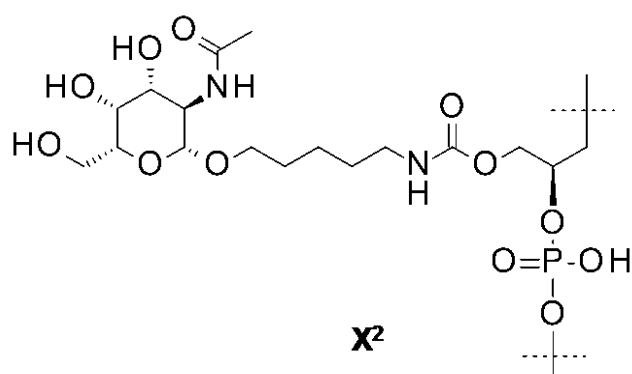
20

## 【化 1 3】



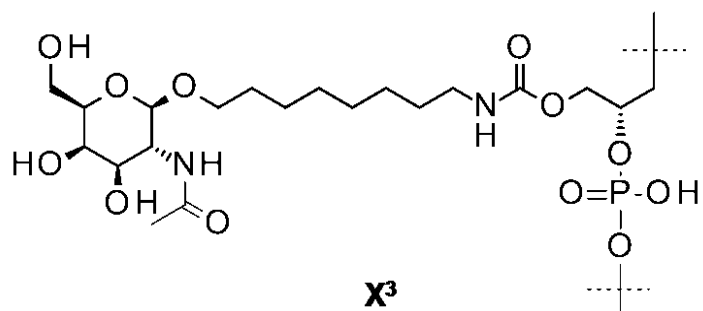
30

## 【化 1 4】



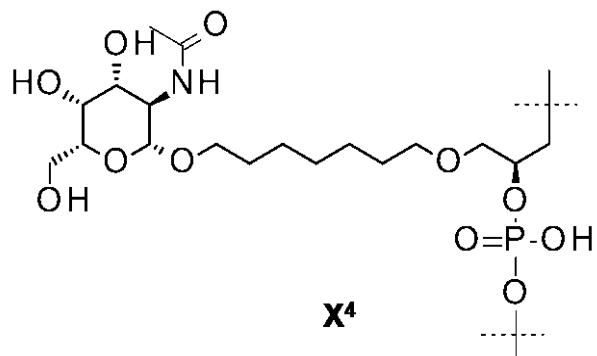
40

【化 1 5】



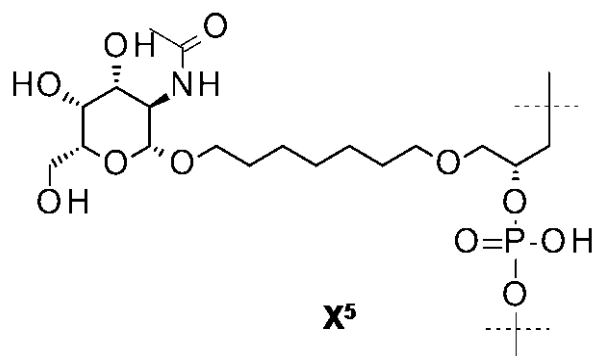
10

【化 1 6】



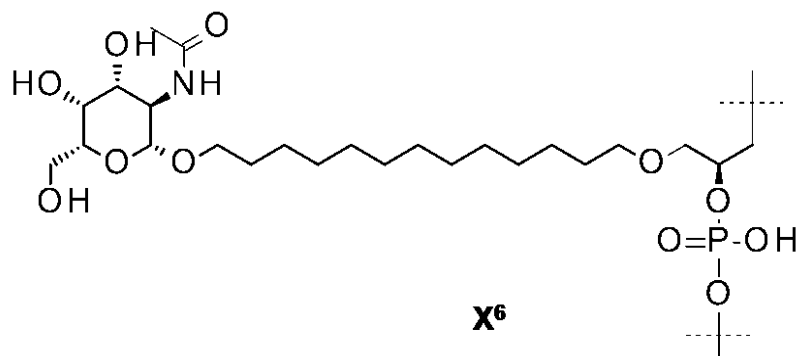
20

【化 1 7】



30

【化 1 8】



40



CC(=O)N[C@@H]1[C@H](O[C@H]2[C@@H](CO)[C@H](O)[C@H](O)[C@H]2O)[C@H](O)[C@H](O)[C@H]1OCCOCCOCCOCCOP(=O)(O)O

**X<sup>9</sup>**

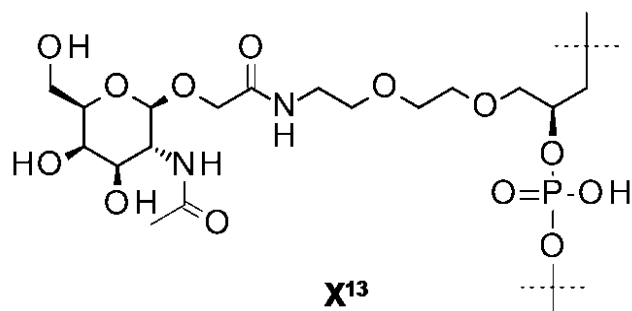
[illegible]CC(C)(COP(=O)(O)O)OCCOCCOCC1OC(CO)C(NC(=O)O)C1O

**X<sup>11</sup>**

CC(=O)N[C@@H]1[C@H](O)[C@H](O)[C@@H](CO)O[C@H]1OCCOCCOCCOCCOP(=O)(O)O

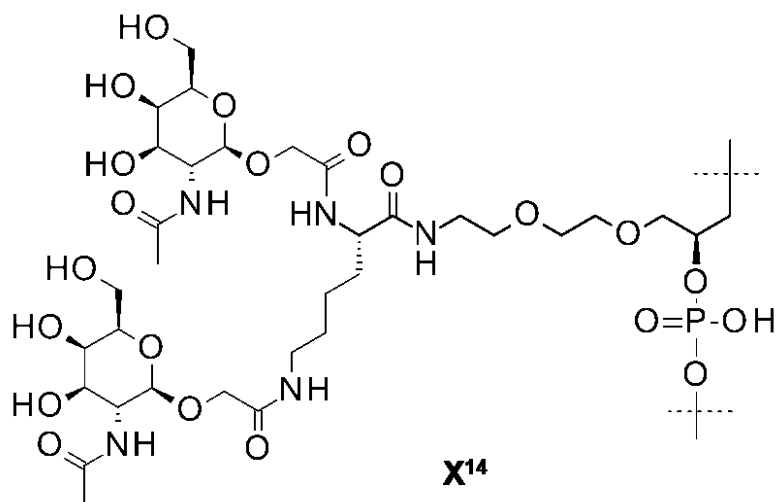
40

## 【化 2 3】



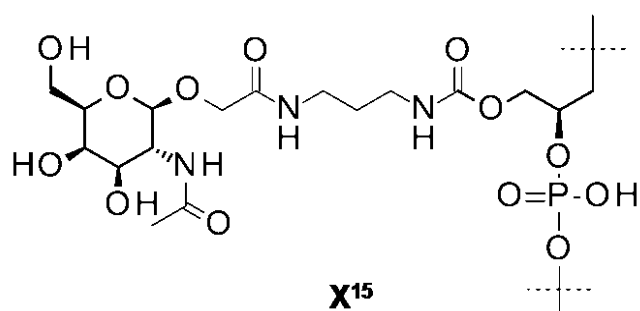
10

## 【化 2 4】



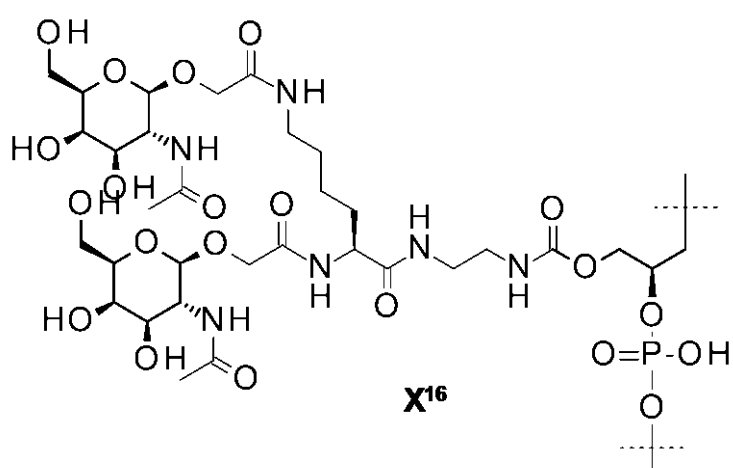
20

## 【化 2 5】



30

## 【化 2 6】



40

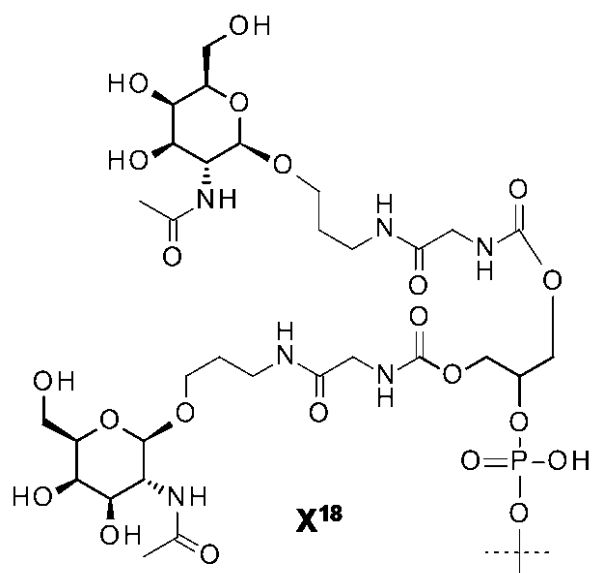
10



30

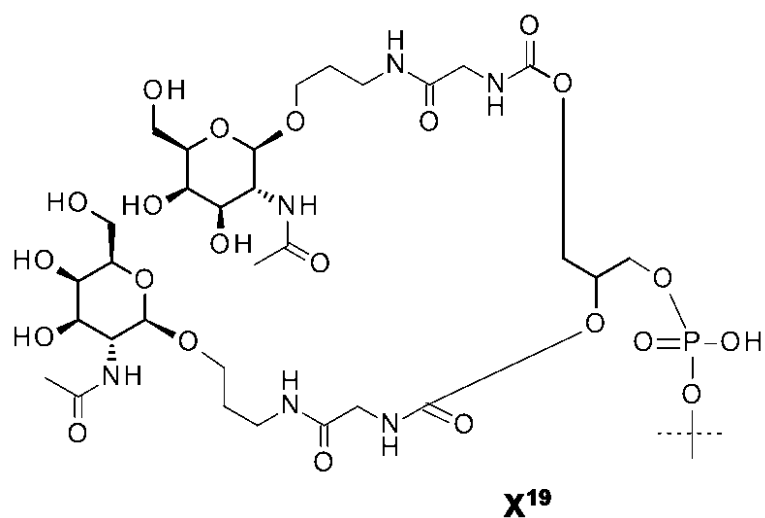


## 【化 3 0】



10

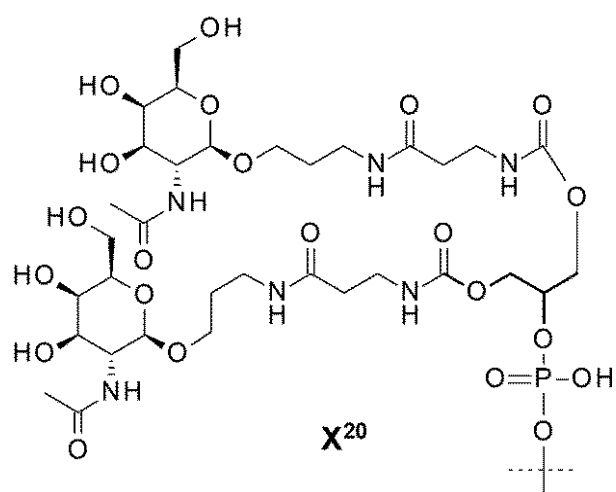
## 【化 3 1】



20

30

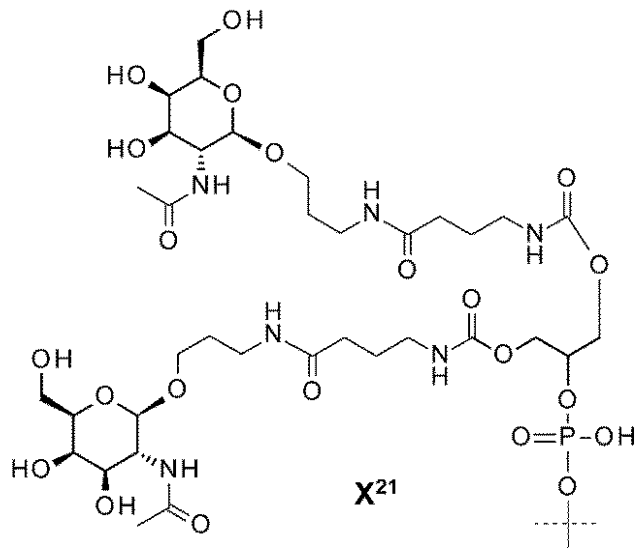
## 【化 3 2】



40

50

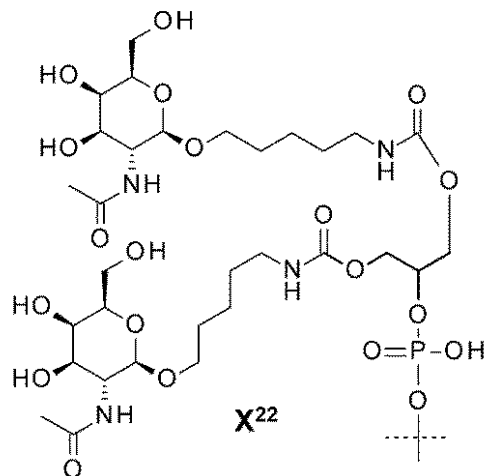
## 【化 3 3】



10

20

## 【化 3 4】



30

40

(25)(1)～(24)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド、その薬理上許容される塩又は溶媒和物を含む、医薬。

(26)(1)～(24)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド、その薬理上許容される塩又は溶媒和物を含む、糖原病Ⅰa型治療薬。

(27)(1)～(24)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド、その薬理上許容される塩又は溶媒和物を医薬的に有効な量で被験者に投与することを含む、糖原病Ⅰa型の治療方法。

(28)糖原病Ⅰa型の治療方法に使用するための、(1)～(24)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド、その薬理上許容される塩又は溶媒和物。

(29)(1)～(24)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド、その薬理上許容され

50

る塩又は溶媒和物を含む、経口又は非経口で投与するための配合物。

(30) 医薬として使用するための、(1)～(24)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド、その薬理上許容される塩又は溶媒和物。

【発明の効果】

【0009】

本発明により、糖原病Ⅰa型患者において、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レベルで修復することができ、その結果、G6PCタンパク質を発現し、糖原病Ⅰa型患者の低血糖の正常化、肝肥大の正常化、肝癌への進行を抑制することが可能となる。

本明細書は、本願の優先権の基礎である日本国特許出願、特願2018-43524及び特願2018-128015の明細書および/または図面に記載される内容を包含する。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】(A) G6PC遺伝子からG6PCタンパク質が生成する過程を説明する図。(B) 糖原病Ⅰa型患者のうち、c.648G>T変異を有したG6PC遺伝子のmRNAのスプライシングのパターンを示す図。

【図2】本発明の糖原病Ⅰa型治療薬ASOによる治療原理を説明する模式図を示す。

【図3】ASO(21e\_001～21e\_012)が、c.648G>T変異を有したG6PC遺伝子のmRNAのエクソン5に結合しうる配列を示す図。

【図4】ASO(21m\_001～21m\_012)が、c.648G>T変異を有したG6PC遺伝子のmRNAのエクソン5に結合しうる配列を示す図。

【図5】ASOを用いて、qRT-PCRによるG6PC mRNAの異常スプライシングが是正される効果を示す図。(A) ASO(21e\_001～21e\_012)を用いた場合。(B) ASO(21m\_001～21m\_012)を用いた場合。RQ: Relative Quantification

【図6】ASOを用いてG6PC mRNAの異常スプライシングを修復し、LC-MS/MSによる正常ヒトG6PC特異的ペプチドを産生する効果を示す図。(A) ASO(21e\_001～21e\_012)を用いた場合。(B) ASO(21m\_001～21m\_012)を用いた場合。

【図7】ASOを用いてG6PC mRNAの異常スプライシングを修復し、G6PC酵素活性を示す図。(A) ASO(21e\_001～21e\_012)を用いた場合。(B) ASO(21m\_001～21m\_012)を用いた場合。

【図8】ASO(21e\_001～21e\_006及び21e\_013～21e\_022)が、c.648G>T変異を有したG6PC遺伝子のmRNAのエクソン5上に結合しうる配列を示す図。

【図9】ASO(21e\_001～21e\_006及び21e\_013～21e\_022)を用いて、qRT-PCRによるG6PC mRNAの異常スプライシングが是正される効果を示す図。RQ: Relative Quantification

【図10】ASO(21e\_001～21e\_006及び21e\_013～21e\_022)を用いてG6PC mRNAの異常スプライシングを修復し、LC-MS/MSによる正常ヒトG6PC特異的ペプチドを産生する効果を示す図。

【図11】ASO(18e\_001～18e\_017)が、c.648G>T変異を有したG6PC遺伝子のmRNAのエクソン5に結合しうる配列を示す図。

【図12】ASO(18m\_001～18m\_017)が、c.648G>T変異を有したG6PC遺伝子のmRNAのエクソン5に結合しうる配列を示す図。

【図13】(A) ASO(18e\_001～18e\_017)を用いて、qRT-PCRによるG6PC mRNAの異常スプライシングが是正される効果を示す図。(B) ASO(18m\_001～18m\_017)を用いて、qRT-PCRによるG6PC mRNAの異常スプライシングが是正される効果を示す図。RQ: Relative Quantification

【図14】(A) ASO(18e\_001～18e\_017)を用いてG6PC mRNAの異常スプライシングを修復し、LC-MS/MSによる正常ヒトG6PC特異的ペプチドを産生する効果を示す図。(B) ASO(18m\_001～18m\_017)を用いてG6PC mRNAの異常スプライシングを修復し、LC-MS/MSによる正常ヒトG6PC特異的ペプチドを産生する効果を示す図。

【図15】ASO(18e\_018～18e\_031)が、c.648G>T変異を有したG6PC遺伝子のmRNAのエク

10

20

30

40

50

ソン 5 に結合しうる配列を示す図。

【図 1 6】(A) ASO (18e\_018 ~ 18e\_031) を用いて、qRT-PCRによるG6PC mRNAの異常スプライシングが是正される効果を示す図。(B) ASO (18e\_018 ~ 18e\_031) を用いてG6PC mRNAの異常スプライシングを修復し、LC-MS/MSによる正常ヒトG6PC特異的ペプチドを産生する効果を示す図。RQ: Relative Quantification

【図 1 7】ASO (21e\_002、18e\_005、21m\_002、18e\_022、18m\_005、15e\_001、15ed\_001、18e\_008、18e\_025、18m\_008、15e\_002及び15ed\_002) が、c.648G>T変異を有したG6PC遺伝子のmRNAのエクソン 5 に結合しうる配列を示す図。

【図 1 8】ASO (21e\_002、18e\_005、21m\_002、18m\_005、18e\_022、15e\_001、15ed\_001、18e\_008、18e\_025、18m\_008、15e\_002、及び、15ed\_002) を用いて、qRT-PCRによるG6PC mRNAの異常スプライシングが是正される効果を示す図。RQ: Relative Quantification; Actn: -アクチン

【図 1 9】実施例91乃至95の化合物をヘテロノックインマウスへ投与した際の、qRT-PCRによる肝臓中のG6PC mRNAの異常スプライシングが是正される効果を示す図。RQ: Relative Quantification; Actn: -アクチン; mpk: mg/kg

【図 2 0】実施例91、及び、実施例96乃至103の化合物をヘテロノックインマウスへ投与した際の、qRT-PCRによる肝臓中のG6PC mRNAの異常スプライシングが是正される効果を示す図。RQ: Relative Quantification; Actn: -アクチン; mpk: mg/kg

【図 2 1】実施例83、実施例87乃至91、及び、実施例104乃至107の化合物をヘテロノックインマウスへ投与した際の、qRT-PCRによる肝臓中のG6PC mRNAの異常スプライシングが是正される効果を示す図。RQ: Relative Quantification; Actn: -アクチン; mpk: mg/kg

【図 2 2】実施例104、及び、実施例108乃至115の化合物をヘテロノックインマウスへ投与した際の、qRT-PCRによる肝臓中のG6PC mRNAの異常スプライシングが是正される効果を示す図。RQ: Relative Quantification; Actn: -アクチン; mpk: mg/kg

【図 2 3】実施例105、113、及び、131乃至137の化合物をヘテロノックインマウスへ投与した際の、qRT-PCRによる肝臓中のG6PC mRNAの異常スプライシングが是正される効果を示す図。RQ: Relative Quantification; Actn: -アクチン; mpk: mg/kg

【図 2 4】実施例 1 の化合物による培養細胞における異常スプライシング修復配列のフラグメント解析を示す図

【図 2 5】実施例133、及び、143乃至149の化合物をヘテロノックインマウスへ投与した際の、qRT-PCRによる肝臓中のG6PC mRNAの異常スプライシングが是正される効果を示す図。RQ: Relative Quantification; mpk: mg/kg

【図 2 6】実施例149、及び、152乃至160の化合物をヘテロノックインマウスへ投与した際の、qRT-PCRによる肝臓中のG6PC mRNAの異常スプライシングが是正される効果を示す図。RQ: Relative Quantification; mpk: mg/kg

【発明を実施するための形態】

【0011】

以下、本発明の実施の形態についてより詳細に説明する。

【0012】

本発明は、糖原病 I a 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、その薬理上許容される塩又は溶媒和物を提供する。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。

【0013】

本発明において、糖原病 I a 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変異と他の変異の複合ヘテロ接合の患者も対象にすることができる。

【0014】

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。

【0015】

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。

【0016】

本発明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。

【0017】

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に対する結合能力が高いこと、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。

【0018】

本発明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)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。

【0019】

本発明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)について、糖の2'、4'-架橋修飾の例としては、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などを挙げることができる。

【0020】

本発明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)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。

【0021】

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-プロモ化、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-プロモ化、5-ヨード化、アデニンのN6-メチル化、8-プロモ化、グアニンのN2-メチル化、8-プロモ化などを挙げることができる。

【0022】

本発明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)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。

【0023】

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。

【0024】

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。

【0025】

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。

【0026】

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。

【0027】

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。

【0028】

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。

【0029】

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。

【0030】

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、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、シチジン、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することができる。

【0031】

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。

【 0 0 3 2 】

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。

【 0 0 3 3 】

AmNAは、文献 (Yahara, A. et al. ChemBioChem (2012), 13, 2513-2516.) または、W02 014/109384 に従って合成できる。

【 0 0 3 4 】

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。

【 0 0 3 5 】

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、キサント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)。

【 0 0 3 6 】

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、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、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したヌクレオチドを文献 (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。

【 0 0 3 7 】

本発明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) は、GalNAcがリンカー及びリン酸部を介して結合していてもよい。

【 0 0 3 8 】

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いてもよい。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ユニットに結合しているGalNAc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2個である。

【 0 0 3 9 】

本発明では、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Gal

10

20

30

40

50

INAc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GaINAc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。

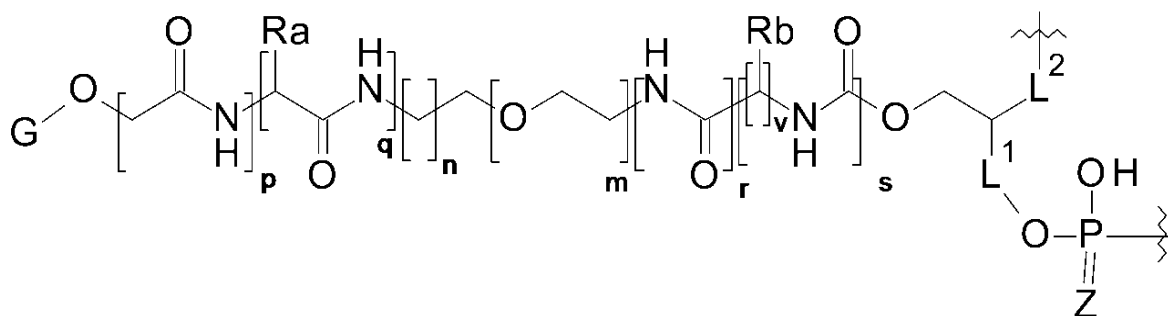
【0040】

本発明では、GaINAcユニットと結合するオリゴヌクレオチド（アンチセンスオリゴヌクレオチド）の5'末端及び／又は3'末端に、アンチセンス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。

【0041】

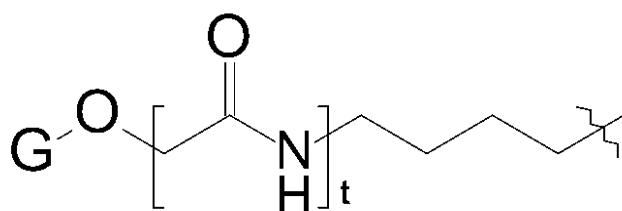
本発明のGaINAcユニットの例としては、例えば、一般式

【化35】



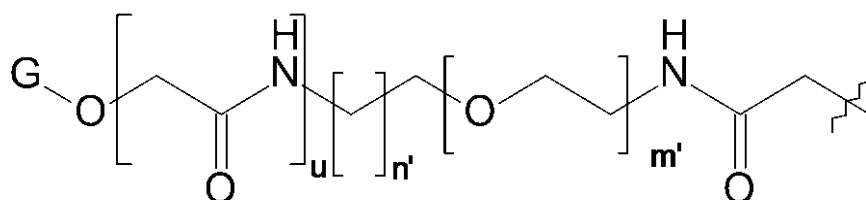
〔式中、R a は式

【化36】



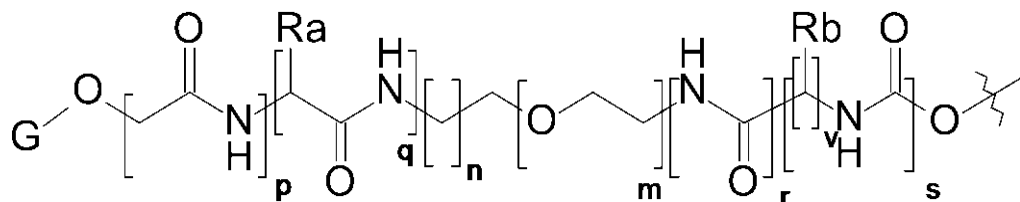
で表される基を示し、R b は式

【化37】



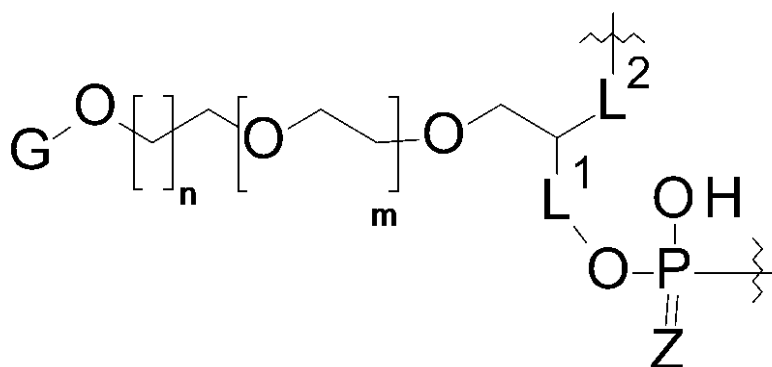
で表される基または水素原子を示し、XXは、式

## 【化 3 8】

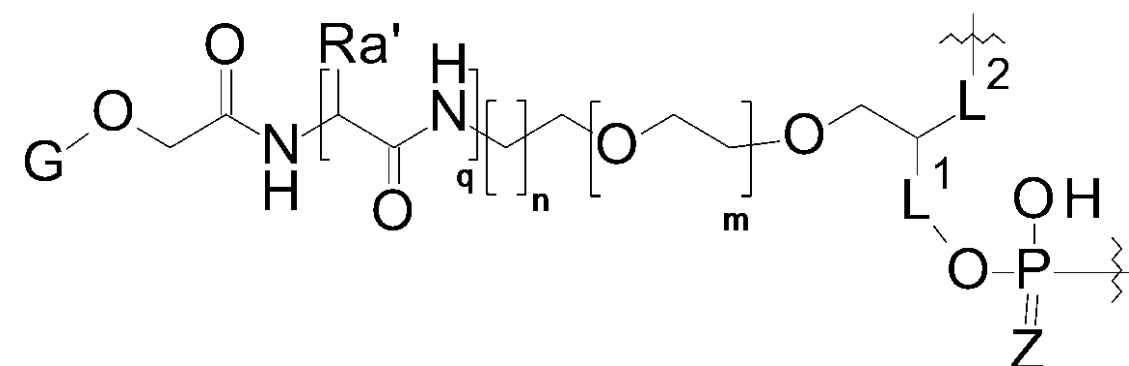


で表される基を示し、Gは5 - アセトアミド - 2 - ヒドロキシメチル - 3 , 4 - ジヒドロキシテトラヒドロピラン - 6 - イル基 (GalNAc) を示し、Zは酸素原子又は硫黄原子を示し、 $L^1$  及び  $L^2$  は、一方がメチレン基 ( $CH_2$ ) を示し、他方が原子を挟まないを示し、p、q、r、s、t 及び u は互いに独立して0又は1を示し、n 及び n' は互いに独立して1 ~ 15 の整数を示し、m 及び m' は互いに独立して0 ~ 5 の整数を示し、Rbが水素原子でないとき、vは1を示し、Rbが水素原子のとき、vは1 ~ 7 を示す。但し、n 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であり、n' が1 のときm' は1 ~ 5 の整数であり、n' が2 ~ 15 の整数のときm' は0である。リン原子から遠い方の結合手には、水酸基、XX基、又はOG基が結合してもよい。] で表される基であり、好適には、式

## 【化 3 9】

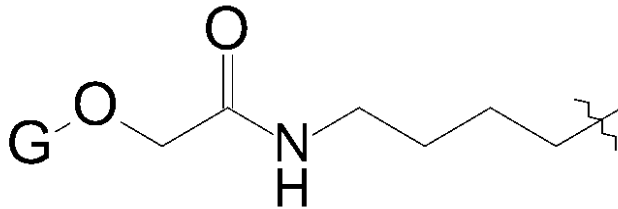


[ 式中、G、Z、 $L^1$ 、 $L^2$ 、n 及び m は、前記と同意義を示す。] で表される基、式



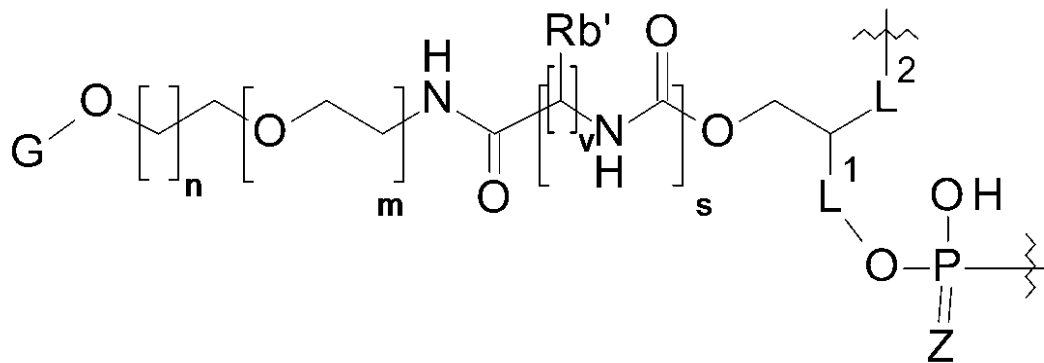
[ 式中、G、Z、 $L^1$ 、 $L^2$ 、q、n 及び m は、前記と同意義を示し、Ra' は、式

【化 4 1】

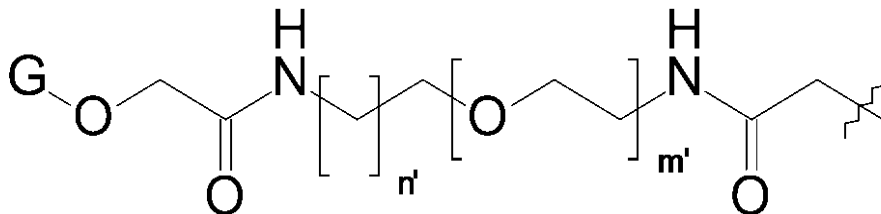


で表される基を示す。]で表される基、式

【化 4 2】

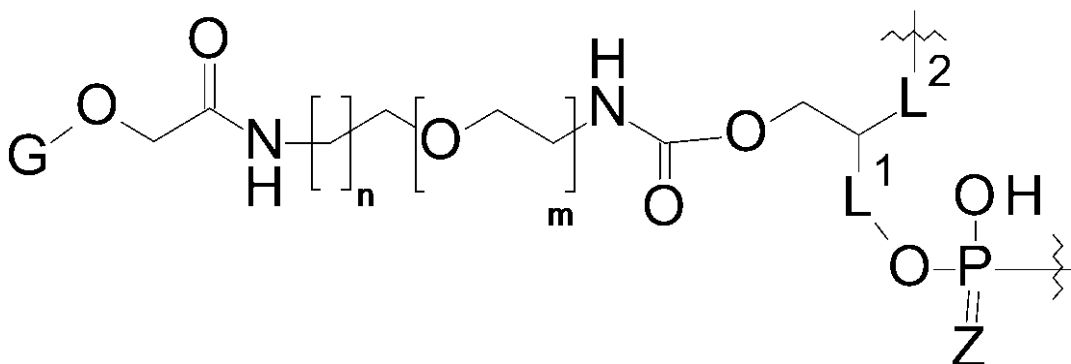


[ 式中、G、Z、L<sup>1</sup>、L<sup>2</sup>、s、n、m及びvは、前記と同意義を示し、Rb'は、式  
【化 4 3】



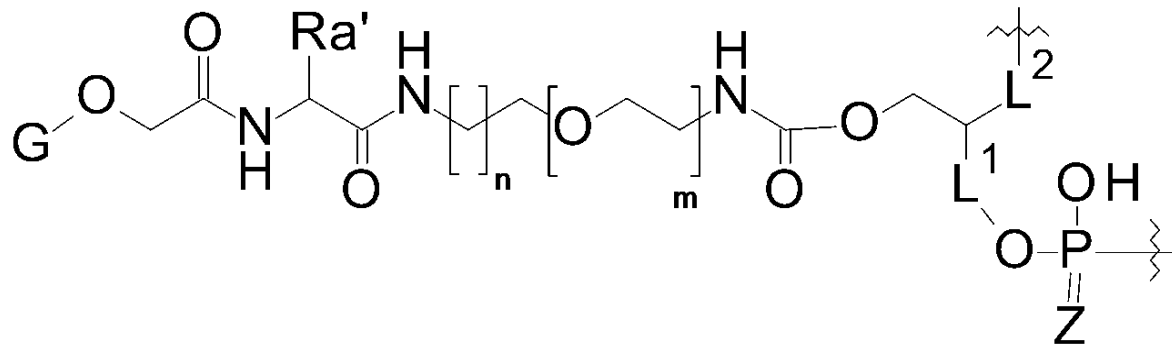
( 式中、n'及びm'は前記と同意義を示す。 ) で表される基あるいは水素原子を示す。  
]で表される基、式

【化 4 4】



[ 式中、G、Z、L<sup>1</sup>、L<sup>2</sup>、n及びmは、前記と同意義を示す。 ] で表される基、又は  
、式

## 【化 4 5】



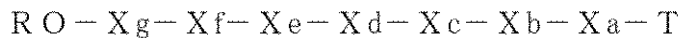
10

[ 式中、G、Z、L<sup>1</sup>、L<sup>2</sup>、n、m及びRa'は、前記と同意義を示す。 ] で表される基である。

## 【 0 0 4 2】

本発明において、GalNAcユニットが結合したオリゴヌクレオチドは、例えば、式

## 【化 4 6】



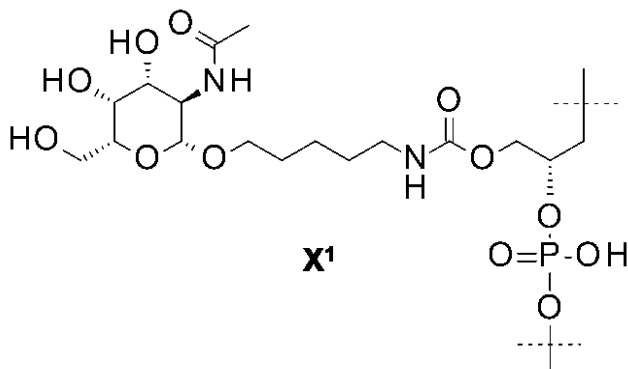
[ 式中、Rは水素原子、XX基、又はG基を示し、Tは5'末端に水酸基を持たないオリゴヌクレオチドを示し、Xgは結合手を有するGalNAcユニットを示し、Xa、Xb、Xc、Xd、Xe及びXfは互いに独立して結合手を有するGalNAcユニット又は単結合を示す。 ] で表されるオリゴヌクレオチドである。

20

## 【 0 0 4 3】

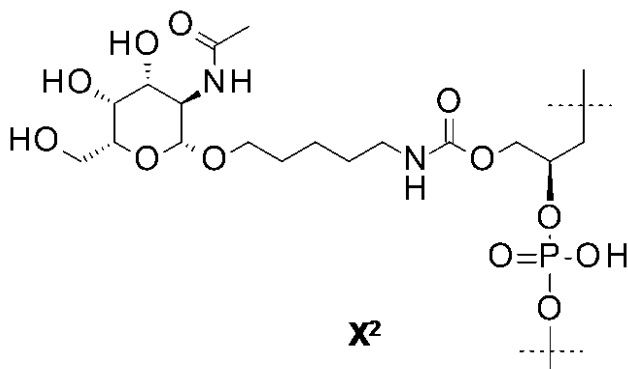
Xa、Xb、Xc、Xd、Xe、Xf及びXgにおける「結合手を有するGalNAcユニット」としては、次のような基が挙げられる。

## 【化 4 7】



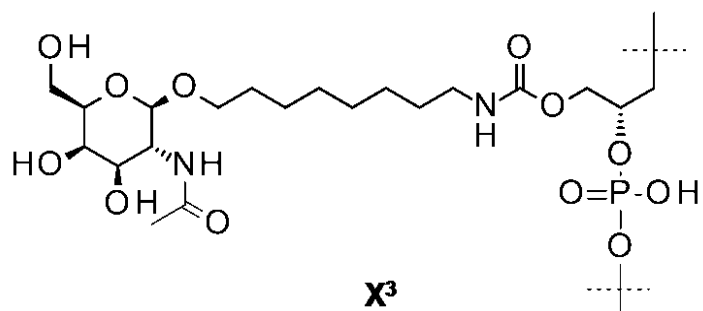
30

## 【化 4 8】



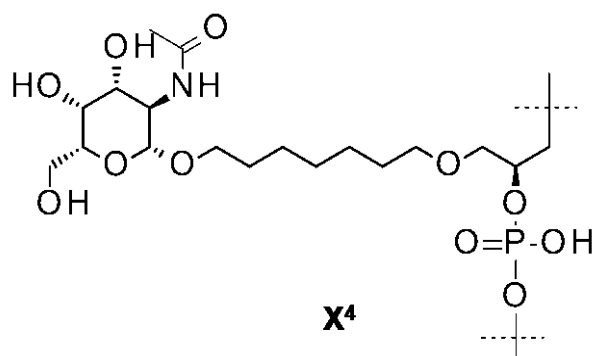
40

【化 4 9】



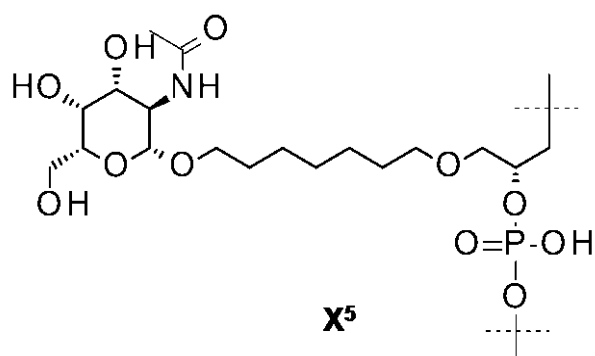
10

【化 5 0】



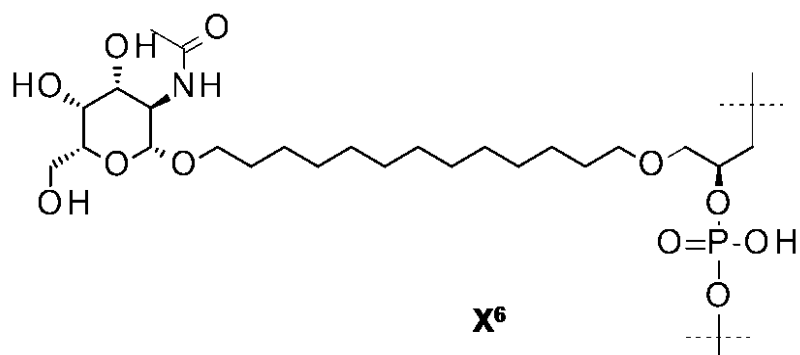
20

【化 5 1】



30

【化 5 2】



40

CC(=O)N[C@@H]1[C@H](O[C@@H]2[C@H](CO)[C@@H](O)[C@H](O)[C@H]2O[C@H]1OCCOCCOCCOCCOP(=O)(O)O)C

**X<sup>9</sup>**

O=C(O[C@H]1O[C@@H](CO)[C@H](O)[C@@H](O)[C@H]1O)OCCOCCOCCOCCOCCOP(=O)(O)OC(C)(C)C

**X<sup>10</sup>**

CC(C)(COP(=O)(O)O)OCCOCCOCCO[C@@H]1O[C@H](CO)[C@@H](O)[C@H](NC(=O)O)[C@H]1O

**X<sup>11</sup>**

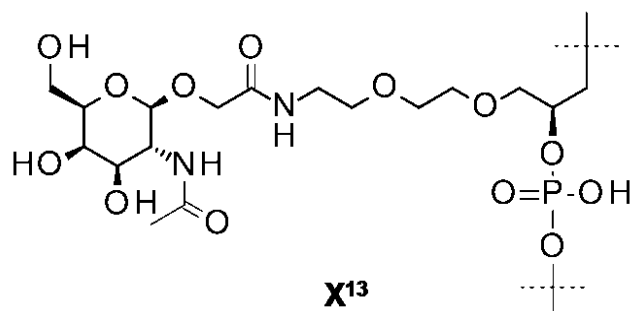
CC(=O)N[C@@H]1[C@H](O[C@@H]2[C@H](CO)[C@H](O)[C@@H](O)[C@H]2O)[C@H](O)[C@H](O)[C@H]1OCCOCCOCCOCCOP(=O)(O)O

**X<sup>12</sup>**

40

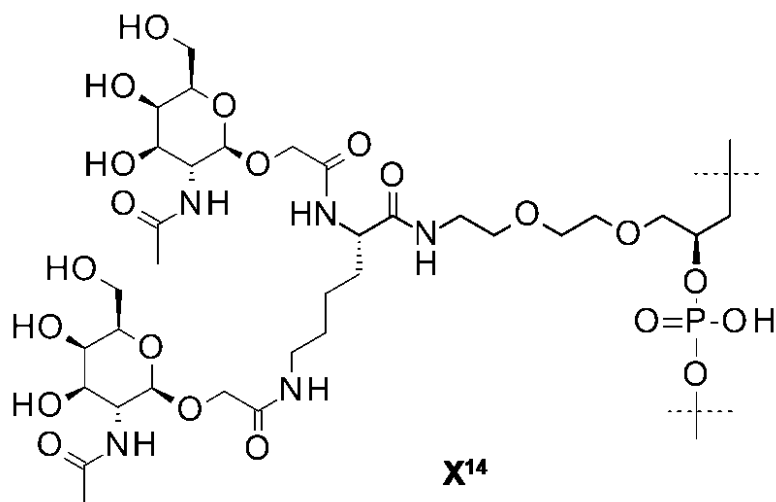


【化 5 7】



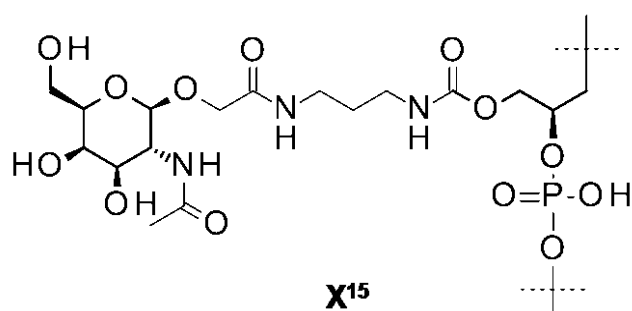
10

【化 5 8】



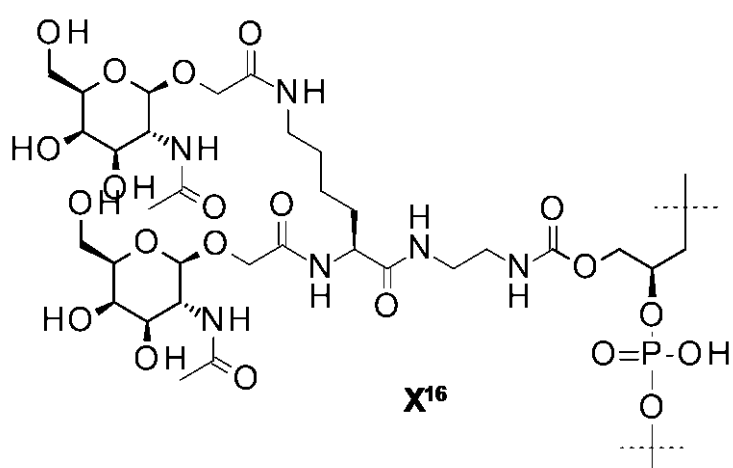
20

【化 5 9】



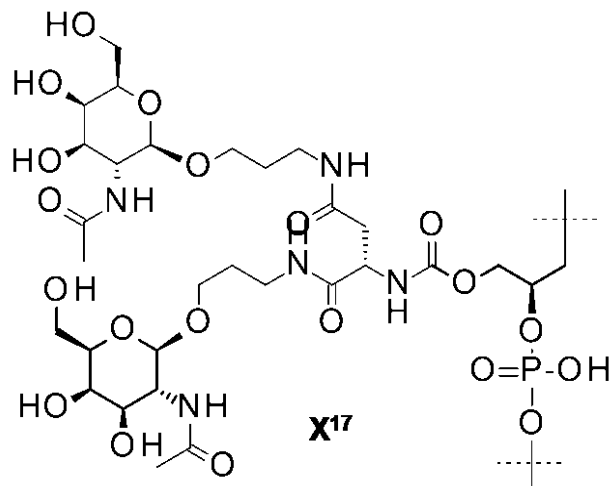
30

【化 6 0】



40

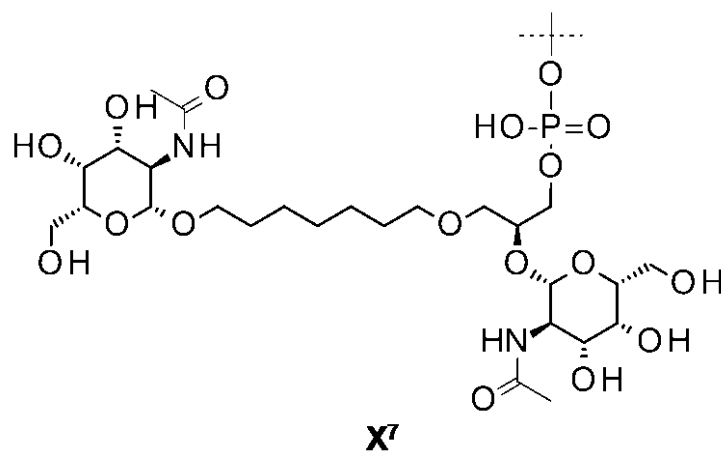
## 【化 6 1】



10

また、「結合手を有するGalNAcユニット」であるXg、及び、RがX X基又はG基からなるRO-Xg-の「GalNAcユニット」としては、次のような基が挙げられる。

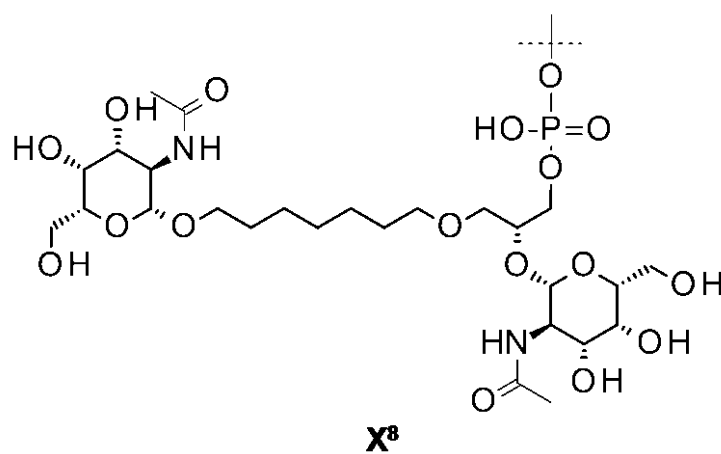
## 【化 6 2】



20

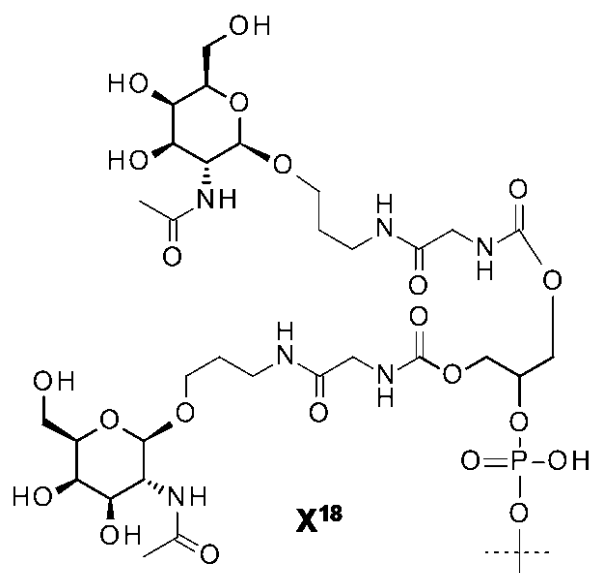
30

## 【化 6 3】



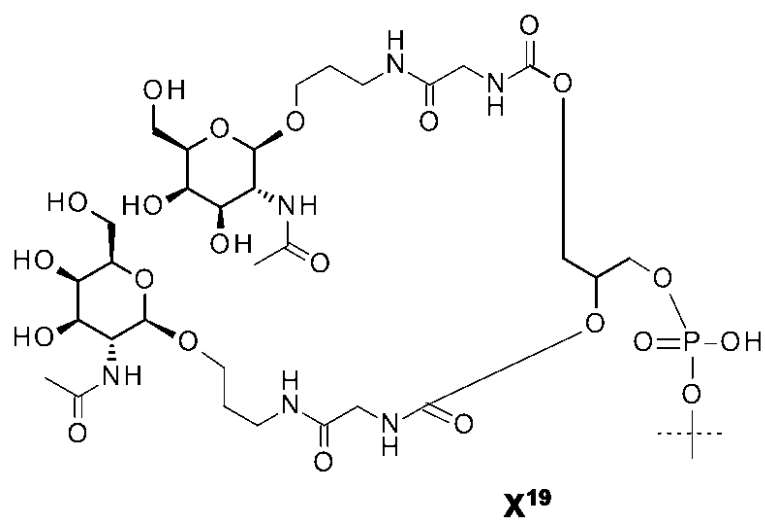
40

## 【化 6 4】



10

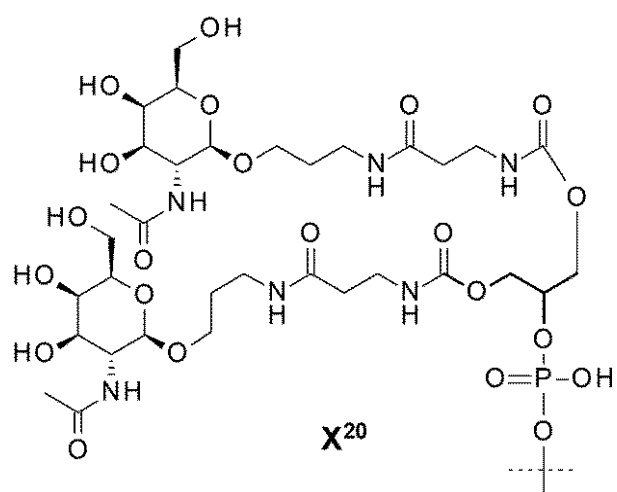
## 【化 6 5】



20

30

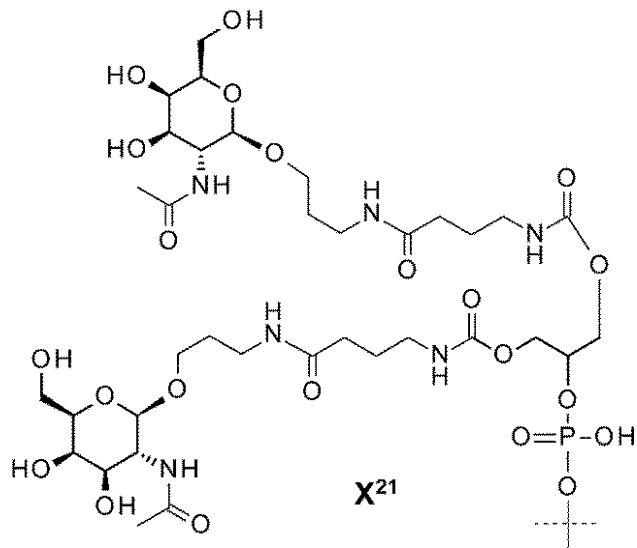
## 【化 6 6】



40

50

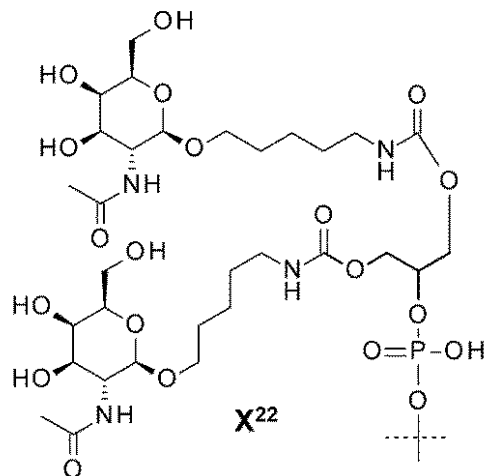
## 【化 6 7】



10

20

## 【化 6 8】



30

40

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ユニットを含有するアミダイトをヌクレオシドの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 3 9 2）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。オリゴヌクレオチドの5'末端に結合する場合は、オリゴヌクレオチドの部分の鎖伸長を終了した後に、GalNAcユニットを含有するアミダイトをカップリングすることで合成することができる。また、オリゴヌクレオチドの3'末端に結合する場合は、修飾されたCPG（特開平 7 - 8 7 9 8 2 の実施例 1 2 b に記載）、3'-amino-Modifier C3 CPG, 3'-

50

amino-Modifier C7 CPG, Glyceryl CPG, (Glen Research), 3'-specer C3 SynBase CPG 1000, 3'-specer C9 SynBase CPG 1000 (link technologies) などを使い、GalNAcユニットを含有するアミダイトをカップリングし、その後、オリゴヌクレオチドの部分の鎖伸長することで、3'末端にヒドロキシルアルキルリン酸基、または、アミノアルキルリン酸基を持ち、さらにGalNAcユニットが結合したオリゴヌクレオチドを合成できる。

#### 【0044】

##### GalNAcユニット含有アミダイトの合成法

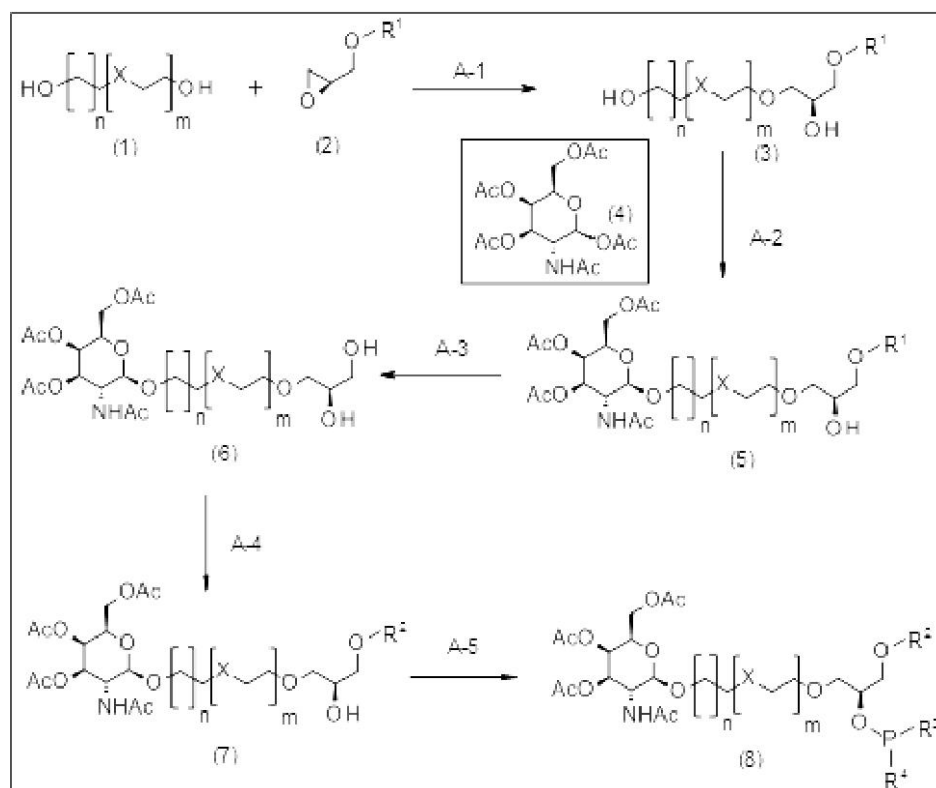
本発明のGalNAcユニット含有アミダイトは、後述するA法からI法に従って製造することができる。A法からI法において、各反応終了後、各反応の目的化合物は常法に従って、反応混合物から採取される。例えば、反応混合物を適宜中和し、また、不溶物が存在する場合にはろ過により除去した後、水と酢酸エチルのような混和しない有機溶媒を加え、目的物を含む有機層を分離し、水などで洗浄後、無水硫酸ナトリウムなどで乾燥後、溶剤を留去することによって得られる。得られた化合物は、必要ならば、常法、例えばシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分離・精製することができる。あるいは、再沈殿、再結晶により精製することができる。

#### 【0045】

##### A法

A法は、化合物(8)を製造するための方法である。化合物(2)に逆の立体配置のものを用いると、化合物(8)において、 $-P(R^3)R^4$ が結合した二級水酸基の立体配置も逆になる。

#### 【化69】



式中  $R^1$  は水酸基の一般的な保護基であり、 $R^2$  は4,4'-ジメトキシトリチル基である。式中、 $-P(R^3)R^4$  は、 $[R^3$  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、炭素原子又は酸素原子である。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。

## 【 0 0 4 6 】

工程 A - 1 は、化合物 ( 3 ) を製造する工程であり、不活性溶媒中、酸の存在下、化合物 ( 1 ) と化合物 ( 2 ) を反応させ、エポキシドの開環時にエーテル結合を生成する。

## 【 0 0 4 7 】

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。

## 【 0 0 4 8 】

上記反応に使用される酸としては、例えば、有機酸類、ルイス酸などが挙げられる。有機酸としては、例えば、トリフルオロメタンスルホン酸などが挙げられ、ルイス酸としては、例えば、三フッ化ホウ素 ジエチルエーテル錯体などが挙げられる。好ましくは、トリフルオロメタンスルホン酸である。

10

## 【 0 0 4 9 】

反応温度は、化合物 ( 1 ) および化合物 ( 2 ) 、酸、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、30 から45 である。

## 【 0 0 5 0 】

反応時間は、化合物 ( 1 ) および化合物 ( 2 ) 、酸、不活性溶媒、反応温度などにより異なるが、通常、15分間から72時間、好ましくは2時間から24時間である。

## 【 0 0 5 1 】

工程 A - 2 は、化合物 ( 5 ) を製造する工程であり、不活性溶媒中、酸の存在下、化合物 ( 3 ) 及び化合物 ( 4 ) を反応させ、グリコシド結合を生成する。

20

## 【 0 0 5 2 】

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。

## 【 0 0 5 3 】

上記反応に使用される酸としては、例えば、有機酸類、ルイス酸などが挙げられる。有機酸としては、例えば、トリフルオロメタンスルホン酸などが挙げられ、ルイス酸としては、例えば、三フッ化ホウ素 ジエチルエーテル錯体などが挙げられ、好ましくは、三フッ化ホウ素 - ジエチルエーテル錯体である。

30

## 【 0 0 5 4 】

反応温度は、化合物 ( 3 ) 、酸、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、30 から45 である。

## 【 0 0 5 5 】

反応時間は、化合物 ( 3 ) 、酸、不活性溶媒、反応温度などにより異なるが、通常、15分間から72時間、好ましくは2時間から24時間である。

## 【 0 0 5 6 】

工程 A - 3 は、化合物 ( 6 ) を製造する工程であり、化合物 ( 5 ) における水酸基の保護基である  $R^1$  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。

40

## 【 0 0 5 7 】

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、4,4'-ジメトキシトリチルクロリドと塩基の存在下、化合物 ( 6 ) の一級水酸基に  $R^2$  を導入する。

## 【 0 0 5 8 】

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、ジクロロメタン又はピリジンである。

## 【 0 0 5 9 】

50

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又はピリジンである。

【0060】

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。

【0061】

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。

【0062】

工程A-5は、化合物(8)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(7)の二級水酸基に-P( $R^3$ ) $R^4$ を導入する。

【0063】

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。

【0064】

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。

【0065】

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。

【0066】

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。

【0067】

B法

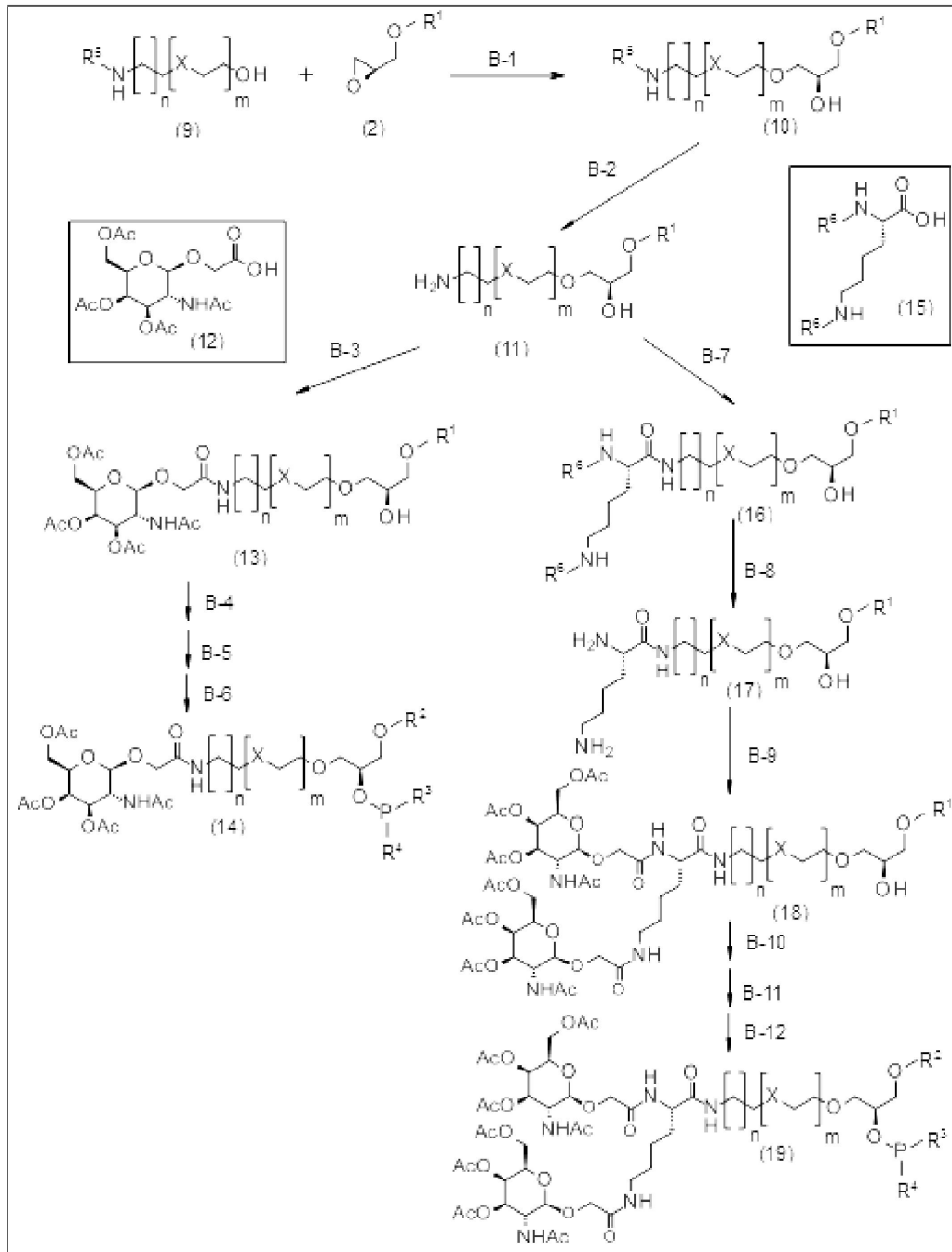
B法は、化合物(14)又は分岐型の化合物(19)を製造するための方法である。化合物(2)に逆の立体配置のものをを用いると、化合物(14)又は分岐型の化合物(19)において、-P( $R^3$ ) $R^4$ が結合した二級水酸基の立体配置も逆になる。

10

20

30

## 【化 7 0】



式中  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $X$ 、 $n$  及び  $m$  は、前記と同意義を示し、 $R^5$  及び  $R^6$  はアミノ基の一般的な保護基である。

## 【0068】

B - 1 工程は、化合物 (10) を製造する工程であり、不活性溶媒中、酸の存在下、化合物 (9) と化合物 (2) を反応させ、エポキシドの開環時にエーテル結合を生成する。前述の工程 A - 1 と同様に行うことができる。

## 【0069】

工程 B - 2 は、化合物 (11) を製造する工程であり、保護基である  $R^5$  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。

## 【0070】

工程 B - 3 は、化合物 (13) を製造する工程であり、不活性溶媒中、縮合剤、塩基の

10

20

30

40

50



存在下、化合物(11)及び化合物(12)をアミド縮合する。

【0071】

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。

【0072】

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。

【0073】

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(O-(7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロリン酸塩)、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。

【0074】

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。

【0075】

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。

【0076】

化合物(13)から化合物(14)への変換は、前述のA法と同様に行える。

【0077】

工程B-4は、保護基であるR<sup>1</sup>を除去する工程で、工程A-3と同様に行うことができる。

【0078】

工程B-5は、一級水酸基にR<sup>2</sup>を導入する工程で、工程A-4と同様に行うことができる。

【0079】

工程B-6は、二級水酸基に-P(R<sup>3</sup>)R<sup>4</sup>を導入する工程で、工程A-4と同様に行うことができる。

【0080】

工程B-7は、化合物(16)を製造する工程であり、不活性溶媒中、縮合剤、塩基の存在下、化合物(11)と化合物(15)をアミド縮合する。前述の工程B-3と同様に行うことができる。

【0081】

工程B-8は、化合物(17)を製造する工程であり、保護基であるR<sup>6</sup>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。

【0082】

10

20

30

40

50

工程 B - 9 は、化合物 ( 1 8 ) を製造する工程であり、不活性溶媒中、縮合剤、塩基の存在下、化合物 ( 1 2 ) と化合物 ( 1 7 ) をアミド縮合する。前述の工程 B - 3 と同様に行うことができる。

【 0 0 8 3 】

化合物 ( 1 8 ) から化合物 ( 1 9 ) への変換は、前述の A 法と同様に行える。

【 0 0 8 4 】

工程 B - 1 0 は、保護基である  $R^1$  を除去する工程で、工程 A - 3 と同様に行うことができる。

【 0 0 8 5 】

工程 B - 1 1 は、一級水酸基に  $R^2$  を導入する工程で、工程 A - 4 と同様に行うことができる。

10

【 0 0 8 6 】

工程 B - 1 2 は、二級水酸基に  $-P(R^3)R^4$  を導入する工程で、工程 A - 5 と同様に行うことができる。

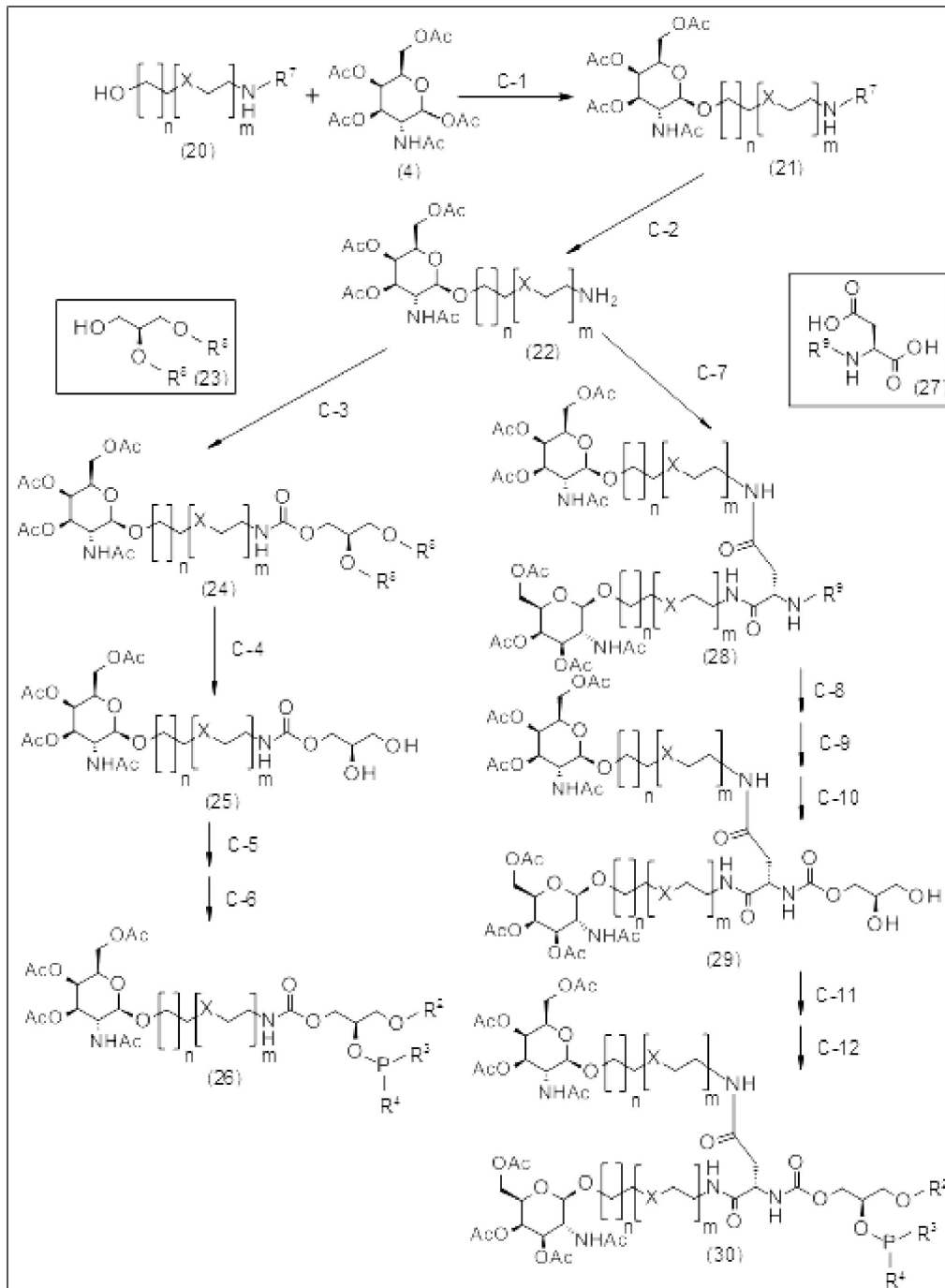
【 0 0 8 7 】

C 法

C 法は、化合物 ( 2 6 ) 又は分岐型の化合物 ( 3 0 ) を合成する製造するための方法である。化合物 ( 2 3 ) の二級水酸基で逆の立体配置のものをを用いると、化合物 ( 2 6 ) あるいは分岐型の化合物 ( 3 0 ) において、 $-P(R^3)R^4$  が結合した二級水酸基の立体配置も逆になる。

20

## 【化 7 1】



式中  $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $X$ 、 $n$  及び  $m$  は、前記と同意義を示し、 $R^8$  は水酸基の一般的な保護基であり、 $R^7$  及び  $R^9$  は、同一又は異なって、アミノ基の一般的な保護基である。

## 【 0 0 8 8 】

C - 1 工程は、化合物 ( 2 1 ) を製造する工程であり、不活性溶媒中、酸の存在下、化合物 ( 2 0 ) と化合物 ( 4 ) を反応させ、グリコシド結合を生成する。前述の工程 A - 2 と同様に行うことができる。

## 【 0 0 8 9 】

工程 C - 2 は、化合物 ( 2 2 ) を製造する工程であり、化合物 ( 2 1 ) のアミノ基の保護基である  $R^7$  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。

## 【 0 0 9 0 】

工程 C - 3 は、化合物 ( 2 4 ) を製造する工程であり、不活性溶媒中、活性化剤、塩基の存在下、化合物 ( 2 3 ) を活性エステルへと変換後、化合物 ( 2 2 ) と反応させ、カルバメート化する。

【 0 0 9 1 】

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。

【 0 0 9 2 】

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。

10

【 0 0 9 3 】

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。

【 0 0 9 4 】

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 から還流温度である。好ましくは、10 から30 である。

20

【 0 0 9 5 】

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。

【 0 0 9 6 】

工程 C - 4 は、化合物 ( 2 5 ) を製造する工程であり、化合物 ( 2 4 ) の水酸基の保護基である R<sup>8</sup> 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。

【 0 0 9 7 】

30

化合物 ( 2 5 ) から化合物 ( 2 6 ) への変換は、前述の A 法と同様に行える。

【 0 0 9 8 】

工程 C - 5 は、一級水酸基に R<sup>2</sup>を導入する工程で、工程 A - 4 と同様に行うことができる。

【 0 0 9 9 】

工程 C - 6 は、二級水酸基に - P ( R<sup>3</sup> ) R<sup>4</sup>を導入する工程で、工程 A - 5 と同様に行うことができる。

【 0 1 0 0 】

工程 C - 7 は、化合物 ( 2 8 ) を製造する工程であり、不活性溶媒中、縮合剤、塩基の存在下、化合物 ( 2 2 ) と化合物 ( 2 7 ) をアミド縮合する。前述の B 法工程 B - 3 と同様に行える。

40

【 0 1 0 1 】

化合物 ( 2 8 ) から化合物 ( 2 9 ) への変換は、前述の方法と同様に行える。

【 0 1 0 2 】

工程 C - 8 は、化合物 ( 2 8 ) のアミノ基の保護基である R<sup>9</sup> を除去する工程であり、工程 C - 2 と同様に行える。

【 0 1 0 3 】

工程 C - 9 は、カルバメート化する工程であり、工程 C - 3 と同様に行える。

【 0 1 0 4 】

工程 C - 1 0 は、保護基である R<sup>8</sup> を除去する工程で、工程 C - 4 と同様に行える。

50

## 【 0 1 0 5 】

化合物 ( 2 9 ) から化合物 ( 3 0 ) への変換は、前述の A 法と同様に行える。

## 【 0 1 0 6 】

工程 C - 1 1 は、一級水酸基に  $R^2$  を導入する工程で、工程 A - 4 と同様に行うことができる。

## 【 0 1 0 7 】

工程 C - 1 2 は、二級水酸基に  $-P(R^3)R^4$  を導入する工程で、工程 A - 5 と同様に行うことができる。

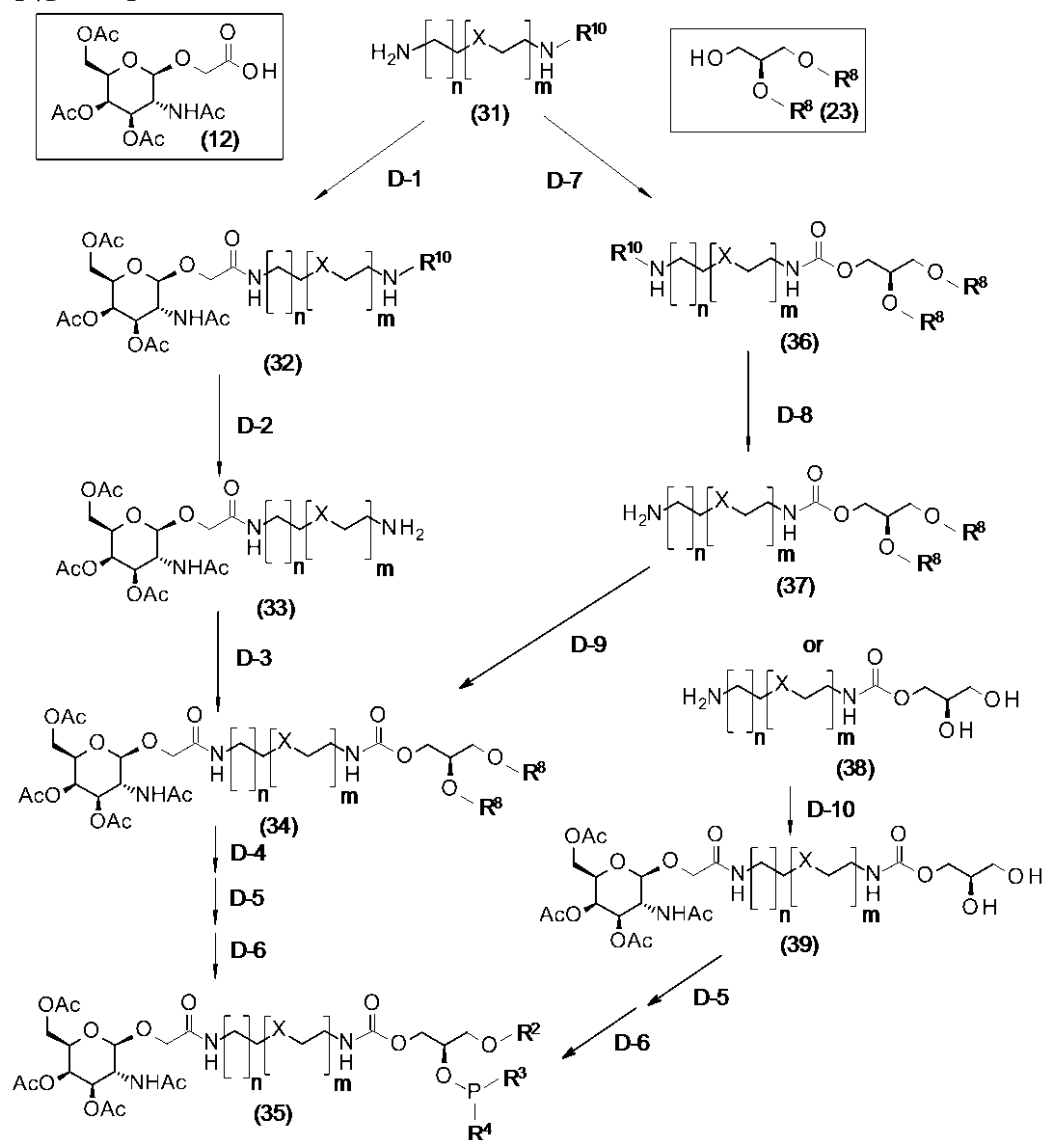
## 【 0 1 0 8 】

D 法

10

D 法は、化合物 ( 3 5 ) を製造するための方法である。2 回あるアミド縮合の順序を変えたり、各化合物の保護基の状態によって、適宜工程を選ぶことができる。化合物 ( 2 3 ) の二級水酸基で逆の立体配置のものをを用いると、化合物 ( 3 5 ) において、 $-P(R^3)R^4$  が結合した二級水酸基の立体配置も逆になる。

## 【 化 7 2 】



20

30

40

式中  $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^8$ 、 $X$ 、 $n$  及び  $m$  は、前記と同意義を示し、 $R^{10}$  はアミノ基の一般的な保護基である。

## 【 0 1 0 9 】

工程 D - 1 は、化合物 ( 3 2 ) を製造する工程であり、不活性溶媒中、縮合剤、塩基の存在下、化合物 ( 3 1 ) と化合物 ( 1 2 ) をアミド縮合する。前述の工程 B - 3 と同様に

50

行うことができる。

【0110】

工程D-2は、化合物(33)を製造する工程であり、化合物(32)のアミノ基の保護基である $R^{10}$ 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。

【0111】

工程D-3は、化合物(34)を製造する工程であり、不活性溶媒中、活性化剤、塩基の存在下、化合物(23)を活性エステルへと変換後、化合物(33)と反応させ、カルバメート化する。前述の工程C-3と同様に行うことができる。

10

【0112】

化合物(34)から化合物(35)への変換は、前述のC法と同様に行える。

【0113】

工程D-4は、保護基である $R^8$ を除去する工程で、工程C-4と同様に行うことができる。

【0114】

工程D-5は、一級水酸基に $R^2$ を導入する工程で、工程C-5と同様に行うことができる。

【0115】

20

工程D-6は、二級水酸基に $-P(R^3)R^4$ を導入する工程で、工程C-6と同様に行うことができる。

【0116】

工程D-7は、化合物(36)を製造する工程であり、不活性溶媒中、活性化剤、塩基の存在下、化合物(23)を活性エステルへと変換後、化合物(31)と反応させ、カルバメート化する。前述の工程C-3と同様に行うことができる。

【0117】

工程D-8は、化合物(36)のアミノ基の保護基である $R^{10}$ のみを除去して化合物(37)を製造するか、又は、水酸基の保護基である $R^8$ とアミノ基の保護基である $R^{10}$ を同時に除去して化合物(38)を製造する。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。

30

【0118】

工程D-9は、化合物(34)を製造する工程であり、不活性溶媒中、縮合剤、塩基の存在下、化合物(37)と化合物(12)をアミド縮合する。前述の工程B-3と同様に行うことができる。

【0119】

工程D-10は、化合物(39)を製造する工程であり、不活性溶媒中、縮合剤、塩基の存在下、化合物(38)と化合物(12)をアミド縮合する。前述の工程B-3と同様に行うことができる。

40

【0120】

化合物(39)から化合物(35)への変換は、工程D-5及びD-6により行うことができる。

【0121】

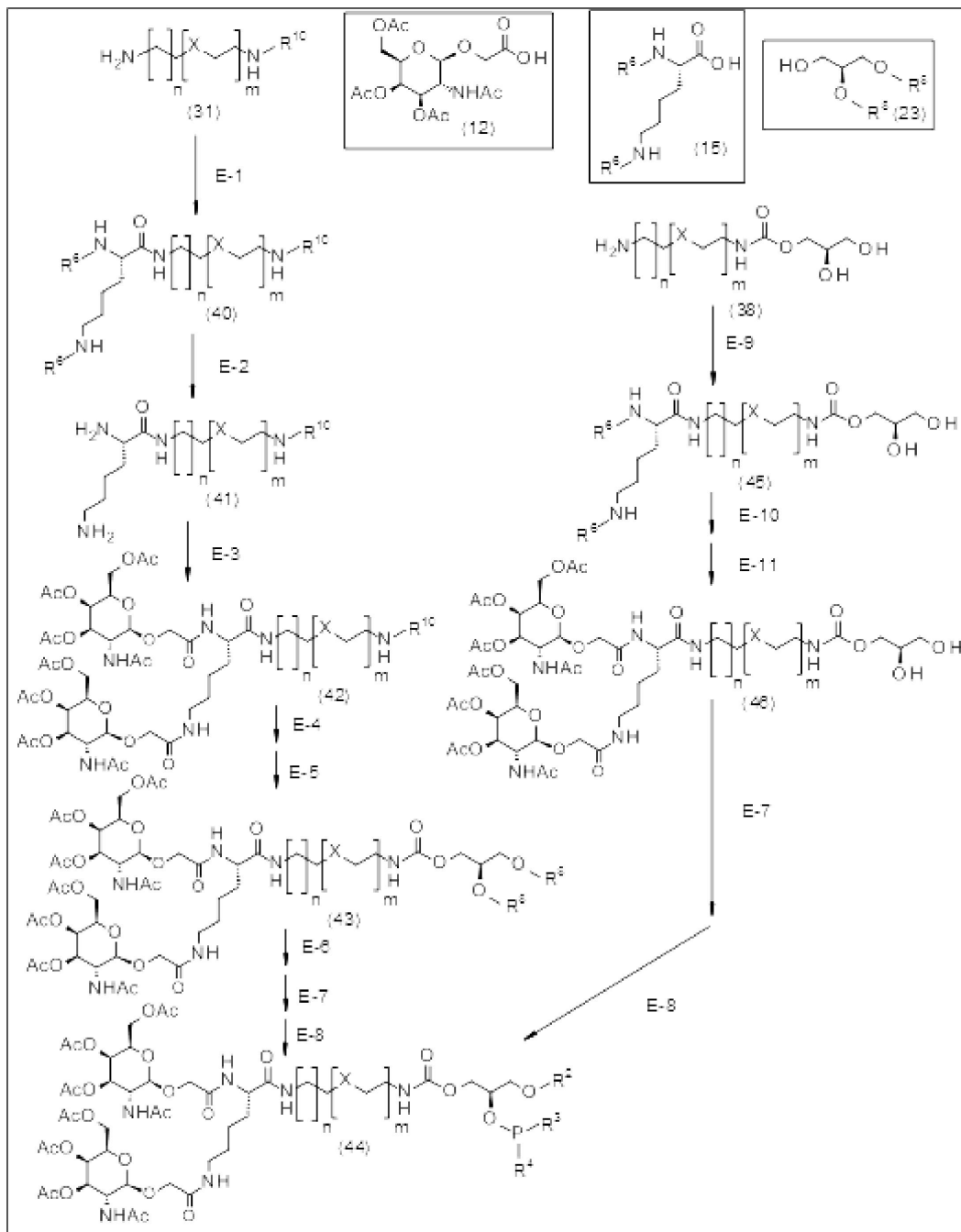
E法

E法は、D法で使用した化合物(31)や合成した中間体(38)を利用して、分岐型の化合物(44)を製造するための方法である。2回あるアミド縮合の順序を変えたり、各化合物の保護基の状態によって、適宜工程を選ぶことができる。化合物(23)の二級水酸基で逆の立体配置のものをを用いると、化合物(44)において、 $-P(R^3)R^4$ が結

50

合した二級水酸基の立体配置も逆になる。

【化 7 3】



式中  $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^6$ 、 $R^8$ 、 $R^{10}$ 、 $X$ 、 $n$  及び  $m$  は、前記と同意義を示す。

【0122】

工程 E - 1 は、化合物 (40) を製造する工程であり、不活性溶媒中、縮合剤、塩基の存在下、化合物 (31) と化合物 (15) をアミド縮合する。前述の工程 B - 3 と同様に行うことができる。

【0123】

工程 E - 2 は、化合物 (40) のアミノ基の保護基である  $R^6$  のみを除去して化合物 (41) を製造する。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。

【0124】

工程 E - 3 は、化合物 (42) を製造する工程であり、不活性溶媒中、縮合剤、塩基の

10

20

30

40

50

存在下、化合物(41)と化合物(12)をアミド縮合する。前述の工程B-3と同様に行うことができる。

【0125】

化合物(42)から化合物(43)への変換は、前述のD法と同様に行える。

【0126】

工程E-4は、化合物(42)のアミノ基の保護基である $R^{10}$ を除去する工程で、前述の工程D-2と同様に行うことができる。

【0127】

工程E-5は、カルバメート化する工程である。前述のD-3と同様に行うことができる。

10

【0128】

化合物(43)から化合物(44)への変換は、前述のC法と同様に行える。

【0129】

工程E-6は、化合物(43)の水酸基の保護基である $R^8$ を除去する工程で、工程C-4と同様に行うことができる。

【0130】

工程E-7は、一級水酸基に $R^2$ を導入する工程で、工程C-5と同様に行うことができる。

【0131】

工程E-8は、二級水酸基に $-P(R^3)R^4$ を導入する工程で、工程C-6と同様に行うことができる。

20

【0132】

工程E-9は、化合物(45)を製造する工程であり、不活性溶媒中、縮合剤、塩基の存在下、化合物(38)と化合物(15)をアミド縮合する。前述の工程B-3と同様に行うことができる。

【0133】

化合物(45)から化合物(46)への変換は、前述の工程E-2及びE-3と同様に行える。

【0134】

工程E-10は、化合物(45)のアミノ基の保護基である $R^6$ 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。

30

【0135】

工程E-11は、化合物(15)をアミド縮合で導入する工程である。前述の工程B-3と同様に行うことができる。

【0136】

化合物(46)から化合物(44)への変換は、工程E-7及びE-8により行うことができる。

40

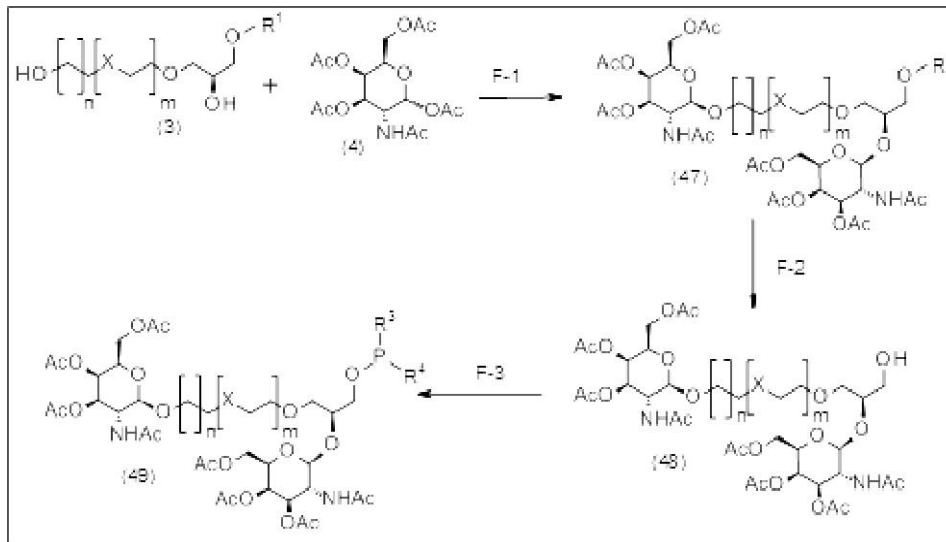
【0137】

F法

F法は、A法で合成した中間体(3)を利用して、分岐型の化合物(49)を製造するための方法である。化合物(3)の二級水酸基で逆の立体配置のものをを用いると、化合物(49)において、GalNAcが結合した二級水酸基の立体配置も逆になる。



## 【化 7 4】



式中  $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^3$ 、 $\text{R}^4$ 、 $\text{X}$ 、 $n$  及び  $m$  は、前記と同意義を示す。

## 【0138】

工程 F - 1 は、化合物 (47) を製造する工程であり、不活性溶媒中、酸の存在下、化合物 (3) と化合物 (4) を反応させ、グリコシド結合を 2 つ生成する。前述の工程 A - 2 と同様に行うことができる。

## 【0139】

工程 F - 2 は、化合物 (48) を製造する工程であり、化合物 (47) の水酸基の保護基である  $\text{R}^1$  を除去する。前述の工程 A - 3 と同様に行うことができる。

## 【0140】

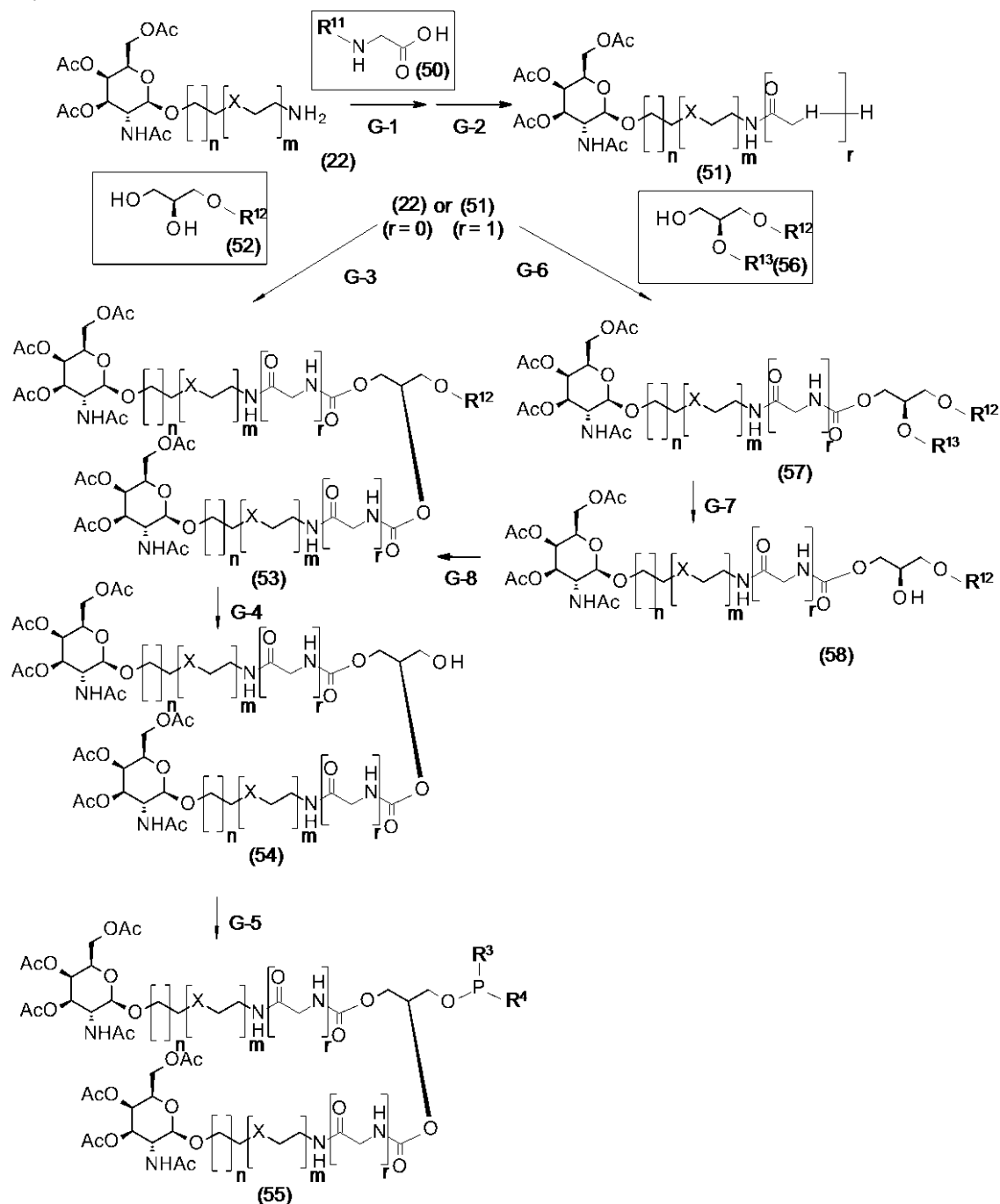
工程 F - 3 は、化合物 (49) を製造する工程であり、水酸基に  $-\text{P}(\text{R}^3)\text{R}^4$  を導入する。前述の工程 A - 5 と同様に行うことができる。

## 【0141】

## G 法

G 法は、C 法で使用した中間体 (22) を利用して、分岐型の化合物 (55) を製造するための方法である。化合物 (52) あるいは化合物 (56) の二級水酸基で逆の立体配置のものをを用いると、化合物 (55) において、GalNAc が結合した二級水酸基の立体配置も逆になる。

## 【化 7 5】



式中  $R^3$ 、 $R^4$ 、 $X$ 、 $n$  及び  $m$  は、前記と同意義を示し、 $r$  は、0 又は 1 を示し、 $R^{11}$  はアミノ基の一般的な保護基であり、 $R^{12}$  及び  $R^{13}$  は水酸基の一般的な保護基である。

## 【0142】

工程 G-1 は、不活性溶媒中、縮合剤、塩基の存在下、化合物 (22) と化合物 (50) をアミド縮合する。前述の工程 B-3 と同様に行うことができる。

## 【0143】

工程 G-2 は、保護基である  $R^{11}$  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。

## 【0144】

工程 G-3 は、カルバメート化する工程である。前述の工程 C-3 と同様に行うことが

10

20

30

40

50

できる。ただし、 $r = 0$ のときは化合物(22)をカルバメート化し、 $r = 1$ のときは化合物(52)をカルバメート化する。

【0145】

工程G-4は、保護基である $R^{12}$ 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。

【0146】

工程G-5は、化合物(55)を製造する工程であり、水酸基に $-P(R^3)R^4$ を導入する。前述の工程A-5と同様に行うことができる。

10

【0147】

工程G-6は、カルバメート化する工程である。前述の工程C-3と同様に行うことができる。ただし、 $r = 0$ のときは化合物(22)をカルバメート化し、 $r = 1$ のときは化合物(52)をカルバメート化する。

【0148】

工程G-7は、保護基である $R^{13}$ 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。

【0149】

20

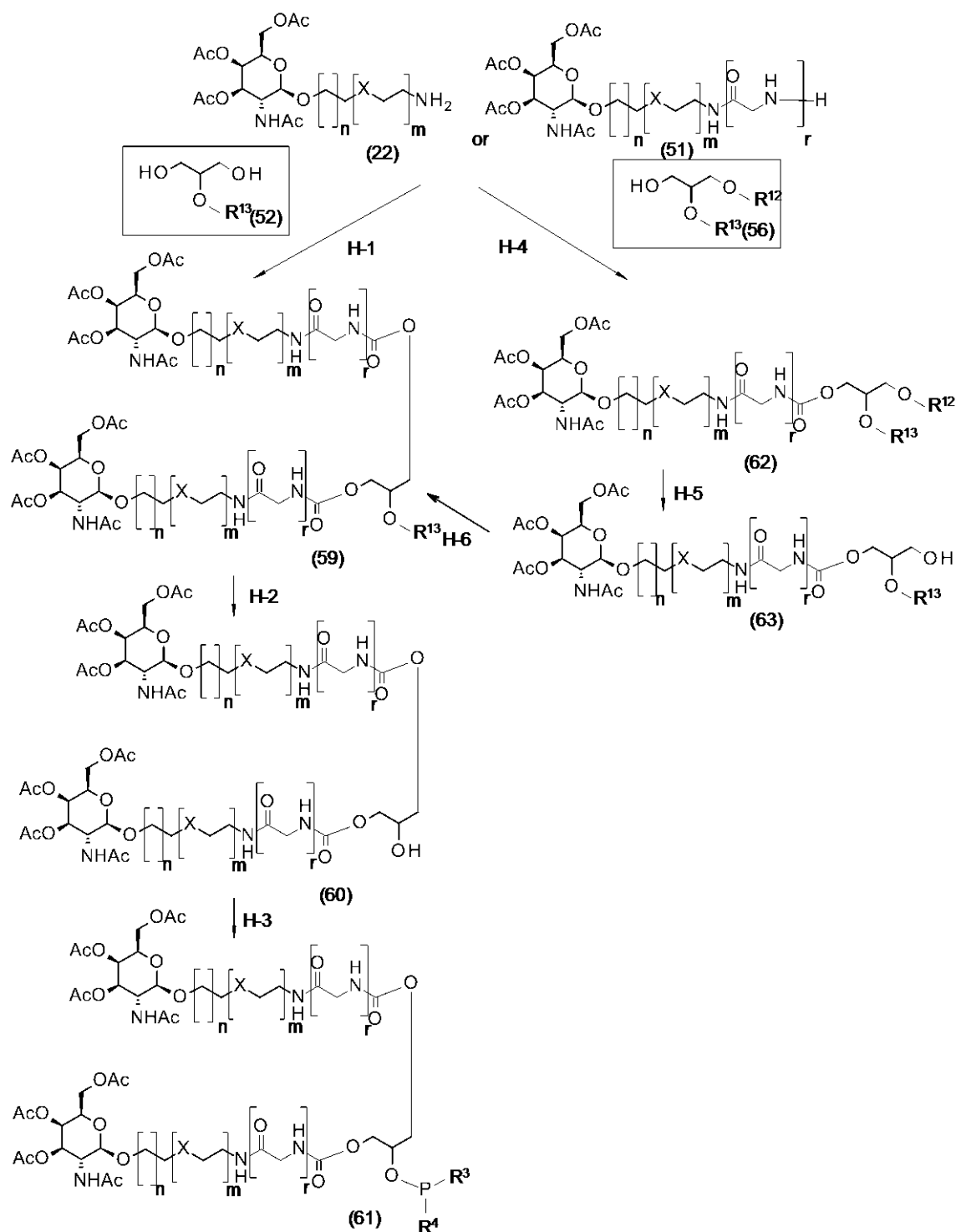
工程G-8は、カルバメート化する工程である。前述のC-3と同様に行うことができる。

【0150】

H法

H法は、C法で使用した中間体(22)あるいはG法で使用した中間体(51)を利用して、分岐型の化合物(61)を製造するための方法である。化合物(52)あるいは化合物(56)の立体配置は限定しない。

## 【化 7 6】



式中  $R^3$ 、 $R^4$ 、 $X$ 、 $n$ 、 $m$ 、 $r$ 、 $R^{12}$  及び  $R^{13}$  は、前記と同意義を示す。

## 【0151】

工程 H - 1 は、カルバメート化する工程である。前述の工程 C - 3 と同様に行うことができる。ただし、 $r = 0$  のときは化合物 (22) をカルバメート化し、 $r = 1$  のときは化合物 (51) をカルバメート化する。

## 【0152】

工程 H - 2 は、保護基である  $R^{13}$  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。

## 【 0 1 5 3 】

工程 H - 3 は、化合物 ( 6 1 ) を製造する工程であり、水酸基に - P ( R <sup>3</sup> ) R <sup>4</sup> を導入する。前述の工程 A - 5 と同様に行うことができる。

## 【 0 1 5 4 】

工程 H - 4 は、カルバメート化する工程である。前述の工程 C - 3 と同様に行うことができる。ただし、r = 0 のときは化合物 ( 2 2 ) をカルバメート化し、r = 1 のときは化合物 ( 5 2 ) をカルバメート化する。

## 【 0 1 5 5 】

工程 H - 5 は、保護基である R <sup>1 2</sup> 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。

10

## 【 0 1 5 6 】

工程 H - 6 は、カルバメート化する工程である。前述の工程 C - 3 と同様に行うことができる。

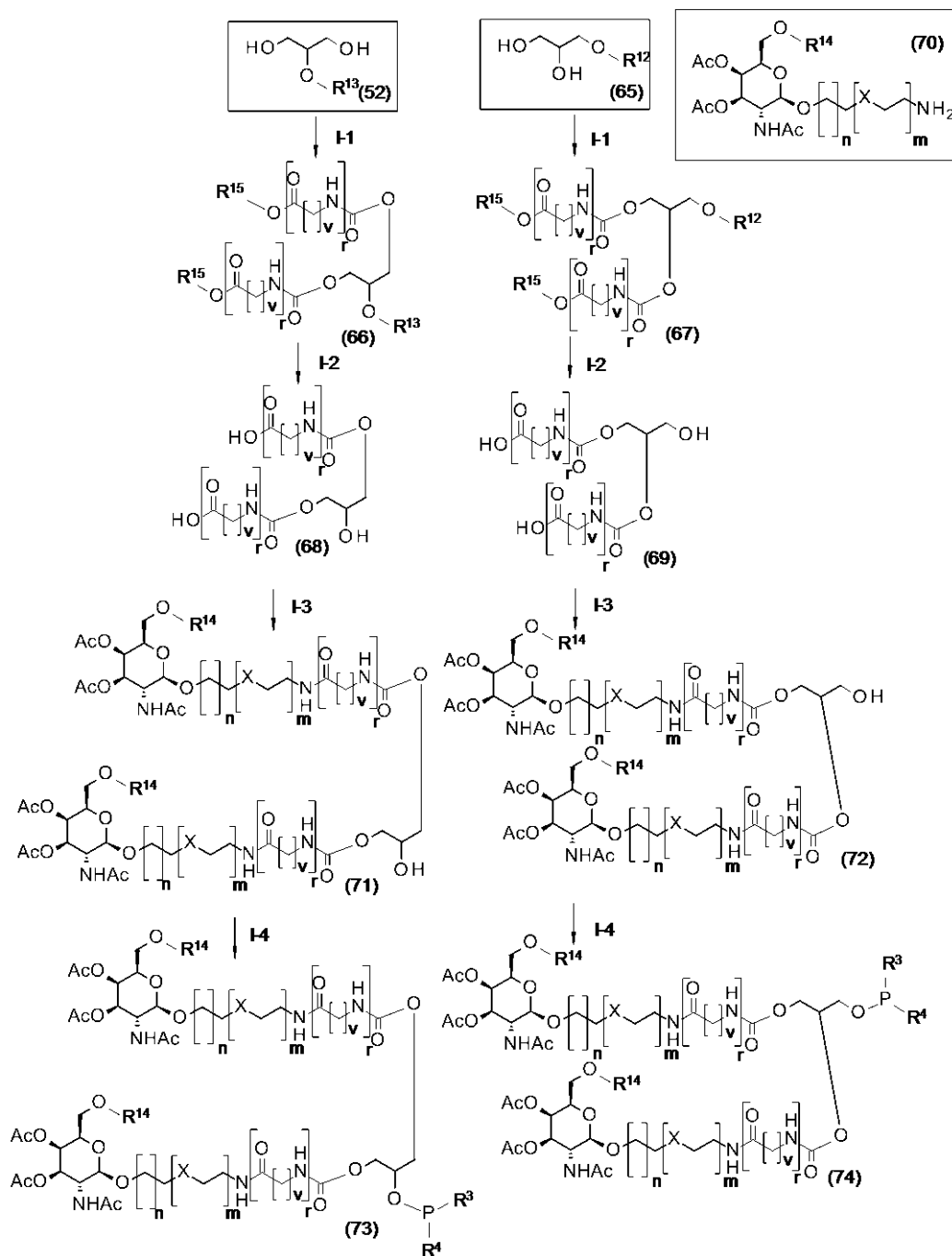
## 【 0 1 5 7 】

## I 法

I 法は、分岐型の化合物 ( 7 3 )、及び化合物 ( 7 4 ) を製造するための方法である。例えば、化合物 ( 7 0 ) 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 <sup>14</sup> がアセチル基の場合、化合物 ( 7 0 ) として、C 法で合成できる化合物 ( 2 2 ) を使用する。R <sup>14</sup> が4,4'-ジメトキシトリチル基の場合、化合物 ( 7 0 ) として、例えば後述する参考例に従って合成できる化合物を使用する。

20

## 【化 77】



(式中  $R^{12}$  及び  $R^{13}$  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、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、 $-P(R^3)R^4$  は、 $[R^3$  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。

## 【0158】

工程 I - 1 は、カルバメート化する工程である。前述の工程 C - 3 と同様に行うことができる。

## 【 0 1 5 9 】

工程 I - 2 は、保護基である  $R^{12}$  あるいは  $R^{13}$  と  $R^{15}$  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。

## 【 0 1 6 0 】

工程 I - 3 は、不活性溶媒中、縮合剤、塩基の存在下、化合物 (22) とアミド縮合する。前述の工程 B - 3 と同様に行うことができる。

## 【 0 1 6 1 】

工程 I - 4 は、化合物 (73) あるいは化合物 (74) を製造する工程であり、水酸基に  $-P(R^3)R^4$  を導入する。前述の工程 A - 5 と同様に行うことができる。

## 【 0 1 6 2 】

本発明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) は、医薬として、特に、糖原病 I a 型の治療に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。

## 【 0 1 6 3 】

本発明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) は、薬理上許容される塩の形態で用いてもよい。「薬理上許容される塩」とは、オリゴヌクレオチド (アンチセンス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、t - オクチルアミン塩、ジベンジルアミン塩、モルホリン塩、グルコサミン塩、フェニルグリシナルキルエステル塩、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。

## 【 0 1 6 4 】

また、オリゴヌクレオチド (アンチセンスオリゴヌクレオチド) 及びその薬理上許容される塩は、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。

## 【 0 1 6 5 】

本発明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)、その薬理上許容される塩又は溶媒和物を糖原病 I a の治療に使用する場合には、それ自体あるいは適宜の薬理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。

## 【 0 1 6 6 】

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、パイレシヨデンプン、澱粉、デキストリン

10

20

30

40

50

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。

#### 【0167】

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（アンチセンスオリゴヌクレオチド）、その薬理上許容される塩又は溶媒和物、 $0.02 \sim 10\% \text{w/v}$ の炭水化物又は多価アルコール及び $0.01 \sim 0.4\% \text{w/v}$ の薬理上許容される界面活性剤を含有させておいてもよい。

#### 【0168】

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。

#### 【0169】

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－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－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、オレート、ラウレート、ステアレート及びパルミートである。これらは単独で用いても、併用してもよい。

#### 【0170】

また、本発明の治療薬は、更に好ましくは、 $0.03 \sim 0.09 \text{M}$ の薬理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。

#### 【0171】

また、本発明の治療薬は、更に好ましくは、 $0.002 \sim 0.05 \text{M}$ の薬理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

10

20

30

40

50



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。

#### 【0172】

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（アンチセンス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。

10

#### 【0173】

本発明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）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。

#### 【0174】

本発明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）、その薬理上許容される塩又は溶媒和物をヒトに投与する場合には、例えば、成人1日あたり約0.01～100mg/kg（体重）、好ましくは0.1～20mg/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。

20

#### 【0175】

糖原病Ⅰa型患者への本発明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）、その薬理上許容される塩又は溶媒和物の投与は、例えば、以下のようにして行うことができる。すなわち、オリゴヌクレオチド（アンチセンスオリゴヌクレオチド）、その薬理上許容される塩又は溶媒和物を当業者に周知の方法で製造し、これを常法により滅菌処理し、例えば125mg/mLの注射用溶液を調製する。この溶液を、患者静脈内にオリゴヌクレオチド（アンチセンスオリゴヌクレオチド）の投与量が体重1kg当たり例えば10mgとなるように、例えば輸液の形で点滴投与する。投与は、例えば1週間の間隔で行い、その後も、血糖値、血中乳酸値、CTによる肝腫大・肝グリコーゲン値などにより治療効果の確認をしながら、適宜この治療を繰り返す。

30

#### 【実施例】

#### 【0176】

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。

#### 【0177】

##### （実施例1～11）

HO-A<sup>e2s</sup>-G<sup>m1s</sup>-A<sup>m1s</sup>-T<sup>e2s</sup>-A<sup>m1s</sup>-A<sup>m1s</sup>-A<sup>e2s</sup>-A<sup>m1s</sup>-U<sup>m1s</sup>-C<sup>e2s</sup>-C<sup>m1s</sup>-G<sup>m1s</sup>-A<sup>e2s</sup>-U<sup>m1s</sup>-G<sup>m1s</sup>-G<sup>e2s</sup>-C<sup>m1s</sup>-G<sup>m1s</sup>-A<sup>e2s</sup>-A<sup>m1s</sup>-G<sup>e2t</sup>-H (21e\_002)（配列番号1）

40

核酸自動合成機（「ABI 394 DNA/RNA Synthesizer」Applied Biosystems製）を用い、ホスホロアミダイト法（Nucleic Acids Research, 12, 4539 (1984)）を用いて合成を行った。試薬としては、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）、CAP A for AKT A（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）、DCA Deblock（ジクロロ酢酸・トルエン溶液、Sigma-Aldrich製、product No. L023050）を用いた。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. FP07

50

495) 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。アミダイト試薬としては、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製のものをを用いた。非天然型のホスホロアミダイトは特開 2 0 0 0 - 2 9 7 0 9 7 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。固相担体としてGlen Unysupport 0.1 μmol (GlenResearch製) を用い、表記の化合物を合成した。プログラムは、核酸自動合成機に付属している0.2 μmolスケール用を用い、但し、アミダイト体の縮合に要する時間は、600秒とし、チオ化に要する時間は、150秒とした。

#### 【 0 1 7 8 】

目的配列を有する保護されたオリゴヌクレオチド類縁体を300 μL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。

#### 【 0 1 7 9 】

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112番目に相補的な配列である。

#### 【 0 1 8 0 】

実施例2乃至11の化合物も実施例1と同様に合成した。実施例1のデータ、及び、実施例2乃至11について表 1 に記載する。

#### 【 0 1 8 1 】

表 1

実施例	配列名称	配列 (5'-3')	開始	終了	分子量	配列番号
1	21e_002	AgaTaaAauCcgAugGcgAaG	112	92	7544.86	1
2	21e_003	TaaAauCcgAugGcgAagCuG	109	89	7512.84	2
3	21e_004	AauCcgAugGcgAagCugAaA	106	86	7520.89	3
4	21e_005	CcgAugGcgAagCugAaaAgG	103	83	7575.87	4
5	21e_006	AugGcgAagCugAaaAggAaG	100	80	7610.88	5
6	21e_007	GcgAagCugAaaAggAagAaG	97	77	7633.90	6
7	21e_008	AagCugAaaAggAagAagGuA	94	74	7618.89	7
8	21e_009	CugAaaAggAagAagGuaAuG	91	71	7595.86	8
9	21e_010	AaaAggAagAagGuaAugAgA	88	68	7628.89	9
10	21e_011	AggAagAagGuaAugAgaAaA	85	65	7628.88	1 0
11	21e_012	AagAagGuaAugAgaAaaTaT	82	62	7578.93	1 1

表中の配列において大文字は2'-O,4'-C-エチレン架橋核酸、小文字は2'-OMe-RNAを示す。2'-O,4'-C-エチレン架橋核酸の C は、5-メチルシトシンである。開始および終了については、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'末端から番号を示す。化合物は負イオンESI質量分析により同定し、表中に実測値を示す。

【0182】

(実施例12～22)

HO-A<sup>m1s</sup>-G<sup>m1s</sup>-A<sup>m1s</sup>-U<sup>m1s</sup>-A<sup>m1s</sup>-A<sup>m1s</sup>-A<sup>m1s</sup>-A<sup>m1s</sup>-U<sup>m1s</sup>-C<sup>m1s</sup>-C<sup>m1s</sup>-G<sup>m1s</sup>-A<sup>m1s</sup>-U<sup>m1s</sup>-G<sup>m1s</sup>-G<sup>m1s</sup>-C<sup>m1s</sup>-G<sup>m1s</sup>-A<sup>m1s</sup>-A<sup>G<sup>m1t</sup></sup>-H (21m\_002) (配列番号1)

核酸自動合成機 (BioAutomation製MerMade 192X) を用い、実施例1と同様に合成および精製を行い、目的化合物を得た。

【0183】

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112番目に相補的な配列である。

【0184】

実施例13乃至22の化合物も実施例12と同様に合成した。実施例12のデータ、及び、実施例13乃至22について表2に記載する。

【0185】

表2

実施例	配列名称	配列 (5'-3')	開始	終了	分子量	配列番号	
12	21m_002	agauaaaauccgauggcgaag	112	92	7416.86	1	
13	21m_003	uaaaauccgauggcgaagcug	109	89	7369.80	2	
14	21m_004	aauccgauggcgaagcugaaa	106	86	7368.81	3	
15	21m_005	ccgauggcgaagcugaaaagg	103	83	7423.81	4	
16	21m_006	auggcgaagcugaaaaggaag	100	80	7475.89	5	
17	21m_007	gcgaagcugaaaaggaagaag	97	77	7494.86	6	
18	21m_008	aagcugaaaaggaagaaggua	94	74	7483.90	7	
19	21m_009	cugaaaaggaagaagguaaug	91	71	7456.82	8	
20	21m_010	aaaaggaagaagguaaugaga	88	68	7503.86	9	
21	21m_011	aggaagaagguaaugagaaaa	85	65	7527.88	10	
22	21m_012	aagaagguaaugagaaaaau	82	62	7453.87	11	

表中の配列において小文字は2'-OMe-RNAを示す。開始および終了については、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'末端から番号を示す。化合物は負イオンESI質量分析により同定し、表中に実測値を示す。

【0186】

(実施例23～50)

HO-G<sup>e2s</sup>-A<sup>m1s</sup>-U<sup>m1s</sup>-A<sup>e2s</sup>-A<sup>m1s</sup>-A<sup>m1s</sup>-A<sup>e2s</sup>-U<sup>m1s</sup>-C<sup>m1s</sup>-C<sup>e2s</sup>-G<sup>m1s</sup>-A<sup>m1s</sup>-T<sup>e2s</sup>-G<sup>m1s</sup>-G<sup>m1s</sup>-C<sup>e2s</sup>-G<sup>m1s</sup>-A<sup>m1s</sup>-A<sup>e2s</sup>-G<sup>m1s</sup>-C<sup>e2t</sup>-H (21e\_015) (配列番号12)

実施例12と同様に合成および精製を行い、目的化合物を得た。

【0187】

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111番目に相補的な配列である。

【0188】

実施例24乃至50の化合物も実施例23と同様に合成した。実施例23のデータ、及び、実施

例24乃至50について表3に記載する。

【0189】

表3

実施例	配列名称	配列 (5'-3')	開始	終了	分子量	配列番号
23	21e_015	GauAaaAucCgaTggCgaAgC	111	91	7544.88	1 2
24	21e_016	AuaAaaTccGauGgcGaaGcT	110	90	7477.80	1 3
25	21e_017	AaaAucCgaTggCgaAgcTgA	108	88	7544.87	1 4
26	21e_018	AaaTccGauGgcGaaGcuGaA	107	87	7506.86	1 5
27	21e_019	AucCgaTggCgaAgcTgaAaA	105	85	7544.86	1 6
28	21e_020	TccGauGgcGaaGcuGaaAaG	104	84	7518.81	1 7
29	21e_021	CgaTggCgaAgcTgaAaaGgA	102	82	7623.82	1 8
30	21e_022	GauGgcGaaGcuGaaAagGaA	101	81	7591.85	1 9
31	21e_002m01	Agauaaaauccgauggcgaag	112	92	7432.84	1
32	21e_002m02	agauaaaauccgauggcgaaG	112	92	7432.84	1
33	21e_002m03	AgauaaaauccgauggcgaaG	112	92	7440.85	1
34	21e_002m04	AgauaaaauccgauggcgaaG	112	92	7452.86	1
35	21e_002m05	AgauaaaauCcgauggcgaaG	112	92	7466.86	1
36	21e_002m06	AgaTaaaauccgauggcgAaG	112	92	7482.86	1
37	21e_002m07	AgauaaaauCcgauggcgaaG	112	92	7478.83	1
38	21e_002m08	AgauaaaauCcgaugGcgaaG	112	92	7478.84	1
39	21e_002m09	AgaTaaAauccgauggcgaaG	112	92	7490.83	1
40	21e_002m10	AgauaaAauccgaugGcgAaG	112	92	7476.81	1
41	21e_002m11	AgauaaAauccgaugGcgaaG	112	92	7481.84	1
42	21e_002m12	AgauaaAauCcgaugGcgaaG	112	92	7490.85	1
43	21e_002m13	AgaTaaAauccgauggcgAaG	112	92	7502.82	1
44	21e_002m14	AgaTaaaauCcgauggcgAaG	112	92	7516.85	1
45	21e_002m15	AgauaaAauCcgaugGcgaaG	112	92	7502.82	1
46	21e_002m16	AgaTaaAauCcgauggcgAaG	112	92	7533.87	1
47	21e_002m17	AgaTaaaauCcgaugGcgAaG	112	92	7528.84	1
48	21e_002m18	AgaTaAaaTcCgaTgGcgAaG	112	92	7584.91	1
49	21e_002m19	AgAuaAaAuCcGaTgGcgAaG	112	92	7564.84	1
50	21e_002m20	AgAuAaAaTcCuAuGgCgAaG	112	92	7594.88	1

表中の配列において大文字は2'-0,4'-C-エチレン架橋核酸、小文字は2'-OMe-RNAを示す。2'-0,4'-C-エチレン架橋核酸のCは、5-メチルシトシンである。開始および終了については、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'末端から番号を示す。化合物は負イオンESI質量分析により同定し、表中に実測値を示す。

【0190】

(実施例51~69)

HO-U<sup>m1s</sup>-A<sup>e2s</sup>-A<sup>m1s</sup>-A<sup>m1s</sup>-A<sup>e2s</sup>-U<sup>m1s</sup>-C<sup>m1s</sup>-C<sup>e2s</sup>-G<sup>m1s</sup>-A<sup>m1s</sup>-T<sup>e2s</sup>-G<sup>m1s</sup>-G<sup>m1s</sup>-C<sup>e2s</sup>-G<sup>m1s</sup>-A<sup>m1s</sup>-A<sup>e2s</sup>-G<sup>m1t</sup>-H (18e\_005) (配列番号20)

実施例12と同様に合成を行った。目的配列を有する保護されたオリゴヌクレオチド類縁体を450μL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。オリゴマーの混合溶液を、Clarity QSP DNA Loading Buffer (Phenomenex製) 300μLを混合し、Clarity SPE 96 well plate (Phenomenex製) 上にチャージした。Clarity QSP DNA Loadi

ng Buffer:水=1:1溶液1mL、水3mL、3%ジクロロ酢酸(DCA)水溶液3mL、水6mLの順に添加した後、20mM Tris水溶液:アセトニトリル=9:1溶液にて抽出される成分を集めた。溶媒除去後、目的化合物を得た。

【 0 1 9 1 】

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109番目に相補的な配列である。

【 0 1 9 2 】

実施例52乃至69の化合物も実施例51と同様に合成した。実施例51のデータ、及び、実施例52乃至69について表4に記載する。

【 0 1 9 3 】

表 4

実施例	配列名称	配列 (5'-3')	開始	終了	分子量	配列番号
51	18e_005	uAaaAucCgaTggCgaAg	109	92	6437.79	2 0
52	18e_006	aAaaTccGauGgcGaaGc	108	91	6408.78	2 1
53	18e_007	aAauCcgAugGcgAagCu	107	90	6399.76	2 2
54	18e_008	aAucCgaTggCgaAgcTg	106	89	6443.80	2 3
55	18e_009	aTccGauGgcGaaGcuGa	105	88	6401.74	2 4
56	18e_010	uCcgAugGcgAagCugAa	104	87	6415.75	2 5
57	18e_011	cCgaTggCgaAgcTgaAa	103	86	6466.81	2 6
58	18e_012	cGauGgcGaaGcuGaaAa	102	85	6434.76	2 7
59	18e_013	gAugGcgAagCugAaaAg	101	84	6488.79	2 8
60	18e_014	aTggCgaAgcTgaAaaGg	100	83	6516.82	2 9
61	18e_015	uGgcGaaGcuGaaAagGa	99	82	6474.78	3 0
62	18e_016	gGcgAagCugAaaAggAa	98	81	6511.81	3 1
63	18e_017	gCgaAgcTgaAaaGgaAg	97	80	6525.84	3 2
64	18e_022	TaaaauCCgaTggCgaag	109	92	6453.82	2 0
65	18e_023	aaaauCCgaTggCgaagC	108	91	6452.84	2 1
66	18e_024	aaauCCgaTggCgaagCT	107	90	6455.83	2 2
67	18e_025	aaauCCgaTggCgaagCTg	106	89	6471.82	2 3
68	18e_026	auCCgaTggCgaagCTga	105	88	6471.83	2 4
69	18e_031	TaAaaTccgauGgcGaag	109	92	6411.77	2 0

表中の配列において大文字は2'-0,4'-C-エチレン架橋核酸、小文字は2'-OMe-RNAを示す。2'-0,4'-C-エチレン架橋核酸のCは、5-メチルシトシンである。開始および終了については、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'末端から番号を示す。化合物は負イオンESI質量分析により同定し、表中に実測値を示す。

【 0 1 9 4 】

( 実施例 7 0 ~ 8 2 )

HO-U<sup>m1s</sup>-A<sup>m1s</sup>-A<sup>m1s</sup>-A<sup>m1s</sup>-A<sup>m1s</sup>-U<sup>m1s</sup>-C<sup>m1s</sup>-C<sup>m1s</sup>-G<sup>m1s</sup>-A<sup>m1s</sup>-U<sup>m1s</sup>-G<sup>m1s</sup>-G<sup>m1s</sup>-C<sup>m1s</sup>-G<sup>m1s</sup>-A<sup>m1s</sup>-A<sup>m1s</sup>-G<sup>m1t</sup>-H (18m\_005) (配列番号 2 0)

核酸自動合成機 (BioAutomation製MerMade 192X) を用い、実施例 1 2 と同様に合成および精製を行い、目的化合物を得た。

【 0 1 9 5 】

本化合物の塩基配列は、Homo sapiens glucose-6-phosphatase catalytic subunit (G6

PC), 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109番目に相補的な配列である。

【0196】

実施例71乃至82の化合物も実施例70と同様に合成した。実施例70のデータ、及び、実施例71乃至82について表5に記載する。

【0197】

表5

実施例	配列名称	配列 (5'-3')	開始	終了	分子量	配列番号	
70	18m_005	uaaaauccgauggcgaag	109	92	6323.74	2 0	10
71	18m_006	aaaauccgauggcgaagc	108	91	6322.76	2 1	
72	18m_007	aaauccgauggcgaagcu	107	90	6299.74	2 2	
73	18m_008	auccgauggcgaagcug	106	89	6315.73	2 3	
74	18m_009	auccgauggcgaagcuga	105	88	6315.73	2 4	
75	18m_010	uccgauggcgaagcugaa	104	87	6315.73	2 5	
76	18m_011	ccgauggcgaagcugaaa	103	86	6338.75	2 6	
77	18m_012	cgauggcgaagcugaaaa	102	85	6362.76	2 7	
78	18m_013	gauggcgaagcugaaaag	101	84	6402.77	2 8	20
79	18m_014	auggcgaagcugaaaagg	100	83	6402.77	2 9	
80	18m_015	uggcgaagcugaaaagga	99	82	6402.77	3 0	
81	18m_016	ggcgaagcugaaaaggaa	98	81	6425.79	3 1	
82	18m_017	gcgaagcugaaaaggaa	97	80	6425.80	3 2	

表中の配列において小文字は2'-OMe-RNAを示す。開始および終了については、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'末端から番号を示す。化合物は負イオンESI質量分析により同定し、表中に実測値を示す。

【0198】

(参考例1)

HO-A<sup>e2s</sup>-G<sup>m1s</sup>-A<sup>m1s</sup>-T<sup>e2s</sup>-A<sup>m1s</sup>-A<sup>m1s</sup>-A<sup>e2s</sup>-A<sup>m1s</sup>-U<sup>m1s</sup>-C<sup>e2s</sup>-C<sup>m1s</sup>-G<sup>m1s</sup>-A<sup>e2s</sup>-U<sup>m1s</sup>-G<sup>m1s</sup>-G<sup>e2s</sup>-C<sup>m1s</sup>-G<sup>m1s</sup>-A<sup>e2s</sup>-A<sup>m1s</sup>-G<sup>e2t</sup>-H (21e\_001) (配列番号33)

実施例1と同様に合成、精製し、目的化合物を得た。

【0199】

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95番目から115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: 7520.85)。

【0200】

(参考例2~3)

HO-G<sup>e2s</sup>-C<sup>m1s</sup>-A<sup>m1s</sup>-G<sup>e2s</sup>-A<sup>m1s</sup>-U<sup>m1s</sup>-A<sup>e2s</sup>-A<sup>m1s</sup>-A<sup>m1s</sup>-A<sup>e2s</sup>-U<sup>m1s</sup>-C<sup>m1s</sup>-C<sup>e2s</sup>-G<sup>m1s</sup>-A<sup>m1s</sup>-T<sup>e2s</sup>-G<sup>m1s</sup>-G<sup>m1s</sup>-C<sup>e2s</sup>-G<sup>m1s</sup>-A<sup>e2t</sup>-H (21e\_013) (配列番号34)

実施例12と同様に合成および精製を行い、目的化合物を得た。

【0201】

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

10

20

30

40

50

端から94番目から114番目に相補的な配列である。

【0202】

参考例3の化合物も参考例2と同様に合成した。参考例2のデータ、及び、参考例3について表6に記載する。

【0203】

表6

参考例	配列名称	配列 (5'-3')	開始	終了	分子量	配列番号
2	21e_013	GcaGauAaaAucCgaTggCgA	114	94	7530.86	3 4
3	21e_014	CagAuaAaaTccGauGgcGaA	113	93	7505.88	3 5

表中の配列において大文字は2'-0,4'-C-エチレン架橋核酸、小文字は2'-OMe-RNAを示す。2'-0,4'-C-エチレン架橋核酸のCは、5-メチルシトシンである。開始および終了については、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'末端から番号を示す。化合物は負イオンESI質量分析により同定し、表中に実測値を示す。

【0204】

(参考例4～15)

HO-C<sup>m1s</sup>-A<sup>e2s</sup>-G<sup>m1s</sup>-A<sup>m1s</sup>-T<sup>e2s</sup>-A<sup>m1s</sup>-A<sup>m1s</sup>-A<sup>e2s</sup>-A<sup>m1s</sup>-U<sup>m1s</sup>-C<sup>e2s</sup>-C<sup>m1s</sup>-G<sup>m1s</sup>-A<sup>e2s</sup>-U<sup>m1s</sup>-G<sup>m1s</sup>-G<sup>e2s</sup>-C<sup>m1t</sup>-H (18e\_001) (配列番号36)

実施例51と同様に合成および精製を行い、目的化合物を得た。

【0205】

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96番目から113番目に相補的な配列である。

【0206】

参考例5乃至15の化合物も参考例4と同様に合成した。参考例4のデータ、及び、参考例5乃至15について表7に記載する。

【0207】

表7

参考例	配列名称	配列 (5'-3')	開始	終了	分子量	配列番号
4	18e_001	cAgaTaaAauCcgAugGc	113	96	6383.77	3 6
5	18e_002	aGauAaaAucCgaTggCg	112	95	6437.79	3 7
6	18e_003	gAuaAaaTccGauGgcGa	111	94	6409.76	3 8
7	18e_004	aTaaAauCcgAugGcgAa	110	93	6407.78	3 9
8	18e_018	CagaTaaaauCCgaTggC	113	96	6439.82	3 6
9	18e_019	agaTaaaauCCgaTggCg	112	95	6453.82	3 7
10	18e_020	gaTaaaauCCgaTggCga	111	94	6453.82	3 8
11	18e_021	aTaaaauCCgaTggCgaa	110	93	6437.83	3 9
12	18e_027	CaGauAaaaucCgaTggc	113	96	6385.78	3 6
13	18e_028	AgAuaAaauccGauGgcg	112	95	6383.74	3 7
14	18e_029	GaTaaAauccgAugGcga	111	94	6397.76	3 8
15	18e_030	AuAaaAuccgaTggCgaa	110	93	6395.78	3 9

表中の配列において大文字は2'-0,4'-C-エチレン架橋核酸、小文字は2'-OMe-RNAを示す。2'-0,4'-C-エチレン架橋核酸のCは、5-メチルシトシンである。開始および終了については、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'末端から番号を示す。化合物は負イオンESI質量分析により同定し、表中に実測値を示す。

#### 【0208】

(参考例16~20)

HO-C<sup>m1s</sup>-A<sup>m1s</sup>-G<sup>m1s</sup>-A<sup>m1s</sup>-U<sup>m1s</sup>-A<sup>m1s</sup>-A<sup>m1s</sup>-A<sup>m1s</sup>-A<sup>m1s</sup>-U<sup>m1s</sup>-C<sup>m1s</sup>-C<sup>m1s</sup>-G<sup>m1s</sup>-A<sup>m1s</sup>-U<sup>m1s</sup>-G<sup>m1s</sup>-G<sup>m1s</sup>-C<sup>m1t</sup>-H (18m\_001) (配列番号36)

10

実施例70と同様に合成および精製を行い、目的化合物を得た。

#### 【0209】

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96番目から113番目に相補的な配列である。

#### 【0210】

参考例17乃至20の化合物も参考例16と同様に合成した。参考例16のデータ、及び、参考例17乃至20について表8に記載する。

#### 【0211】

20

表8

参考例	配列名称	配列 (5'-3')	開始	終了	分子量	配列番号
16	18m_001	cagauaaaauccgauggc	113	96	6283.74	36
17	18m_002	agauaaaauccgauggcg	112	95	6323.74	37
18	18m_003	gauaaaauccgauggcga	111	94	6323.75	38
19	18m_004	auaaaauccgauggcgaa	110	93	6307.75	39
20	21m_001	agcagauaaaauccgauggcg	115	95	7396.88	33

30

表中の配列において小文字は2'-OMe-RNAを示す。開始および終了については、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'末端から番号を示す。化合物は負イオンESI質量分析により同定し、表中に実測値を示す。

#### 【0212】

(実施例83~86)

HO-A<sup>m1s</sup>-A<sup>e2s</sup>-U<sup>m1s</sup>-C<sup>m1s</sup>-C<sup>e2s</sup>-G<sup>m1s</sup>-A<sup>m1s</sup>-T<sup>e2s</sup>-G<sup>m1s</sup>-G<sup>m1s</sup>-C<sup>e2s</sup>-G<sup>m1s</sup>-A<sup>m1s</sup>-A<sup>e2s</sup>-G<sup>m1t</sup>-H (15e\_001) (配列番号40)

AKTA Oligopilotを用いて、固相担体としてPrimer Support 5G Unylinker 350, 100 μmol (GE Healthcare製)を用い、実施例1と同様に合成を行った。目的配列を有する保護されたオリゴヌクレオチド類縁体を25mL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。オリゴマーの混合溶液を、phenomenex Clarity QSP 5gを用いて、脱保護、精製を行い、溶媒留去後、目的化合物を得た。

40

#### 【0213】

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。

50



## 【 0 2 1 4 】

実施例84乃至86の化合物も実施例83と同様に合成した。実施例83のデータ、及び、実施例84乃至86について表9に記載する。

## 【 0 2 1 5 】

表9

実施例	配列名称	配列 (5'-3')	開始	終了	分子量	配列番号
83	15e_001	aAucCgaTggCgaAg	106	92	5371.68	4 0
84	15e_002	cCgaTggCgaAgcTg	103	89	5377.68	4 1
85	15ed_001	aAtcCgaTggCgaAg	106	92	5099.59	4 0
86	15ed_002	cCgaTggCgaAgcTg	103	89	5105.60	4 1

表中の配列において大文字は2'-0,4'-C-エチレン架橋核酸、小文字は2'-OMe-RNA、小文字に下線のものはDNAを示す。2'-0,4'-C-エチレン架橋核酸のCは、5-メチルシトシンである。開始および終了については、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'末端から番号を示す。化合物は負イオンESI質量分析により同定し、表中に実測値を示す。

## 【 0 2 1 6 】

( 実施例 8 7 ~ 9 0 )

HO- A<sup>m1s</sup>- A<sup>e2s</sup>- U<sup>m1s</sup>- C<sup>e2s</sup>- C<sup>e2s</sup>- G<sup>m1s</sup>- A<sup>e2s</sup>- T<sup>e2s</sup>- G<sup>m1s</sup>- G<sup>m1s</sup>- C<sup>e2s</sup>- G<sup>m1s</sup>- A<sup>m1s</sup>- A<sup>e2s</sup>- G<sup>m1t</sup>-H (15e\_001.1) (配列番号 4 0)

実施例1と同様に合成を行った。但し、固相担体としてPrimer Support 5G Unylinker 350, 10 μmol (GE Healthcare製)を用い、10 μmolのプログラムを用いた。実施例83と同様に精製を行い、目的化合物を得た。

## 【 0 2 1 7 】

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。

## 【 0 2 1 8 】

実施例88乃至90の化合物も実施例87と同様に合成した。実施例87のデータ、及び、実施例88乃至90について表10に記載する。

## 【 0 2 1 9 】

表10

実施例	配列名称	配列 (5'-3')	開始	終了	分子量	配列番号
87	15e_001.1	aAuCCgATggCgaAg	106	92	5409.71	4 0
88	15e_001.2	aAucCgATggCgAAg	106	92	5395.69	4 0
89	15e_001.3	aAuCCgATggCgAAg	106	92	5409.71	4 0
90	15e_001.4	aAuCCgATggCgAAg	106	92	5421.70	4 0

表中の配列において大文字は2'-0,4'-C-エチレン架橋核酸、小文字は2'-OMe-RNAを示す。2'-0,4'-C-エチレン架橋核酸のCは、5-メチルシトシンである。開始および終了については、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'末端から番号を示

す。化合物は負イオンESI質量分析により同定し、表中に実測値を示す。

【0220】

(実施例91)

HO-X-X-X-A<sup>p</sup>-A<sup>m1s</sup>-A<sup>e2s</sup>-U<sup>m1s</sup>-C<sup>m1s</sup>-C<sup>e2s</sup>-G<sup>m1s</sup>-A<sup>m1s</sup>-T<sup>e2s</sup>-G<sup>m1s</sup>-G<sup>m1s</sup>-C<sup>e2s</sup>-G<sup>m1s</sup>-A<sup>m1s</sup>-A<sup>e2s</sup>-G<sup>m1t</sup>-H(配列番号42)

実施例1と同様に合成を行った。但し、固相担体としてPrimer Support 5G Unylinker 350, 10 μmol (GE Healthcare製)を用い、10 μmolのプログラムを用いた。X部分は、文献(Bioorg. Med. Chem. (2016) 24, 26-32)記載のGalNAc phosphoramidite unit 1を用いて3回縮合した。実施例83と同様に精製を行い、目的化合物を得た。

【0221】

10

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を有している。化合物は負イオンESI質量分析により同定した(実測値:7131.24)。

【0222】

(実施例92)

HO-X-X-X-A<sup>m1s</sup>-A<sup>e2s</sup>-U<sup>m1s</sup>-C<sup>m1s</sup>-C<sup>e2s</sup>-G<sup>m1s</sup>-A<sup>m1s</sup>-T<sup>e2s</sup>-G<sup>m1s</sup>-G<sup>m1s</sup>-C<sup>e2s</sup>-G<sup>m1s</sup>-A<sup>m1s</sup>-A<sup>e2s</sup>-G<sup>m1t</sup>-H(配列番号40)

実施例91と同様に合成を行った。

20

【0223】

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:6818.18)。

【0224】

(実施例93)

HO-X-X-X-T<sup>p</sup>-C<sup>p</sup>-A<sup>p</sup>-A<sup>m1s</sup>-A<sup>e2s</sup>-U<sup>m1s</sup>-C<sup>m1s</sup>-C<sup>e2s</sup>-G<sup>m1s</sup>-A<sup>m1s</sup>-T<sup>e2s</sup>-G<sup>m1s</sup>-G<sup>m1s</sup>-C<sup>e2s</sup>-G<sup>m1s</sup>-A<sup>m1s</sup>-A<sup>e2s</sup>-G<sup>m1t</sup>-H(配列番号43)

実施例91と同様に合成を行った。

30

【0225】

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を有している。化合物は負イオンESI質量分析により同定した(実測値:7738.35)。

【0226】

(実施例94)

HO-X-X-X-A<sup>p</sup>-A<sup>m1s</sup>-A<sup>e2s</sup>-U<sup>m1s</sup>-C<sup>e2s</sup>-C<sup>m1s</sup>-G<sup>e2s</sup>-A<sup>m1s</sup>-T<sup>e2s</sup>-G<sup>m1s</sup>-G<sup>e2s</sup>-C<sup>m1s</sup>-G<sup>e2s</sup>-A<sup>m1s</sup>-A<sup>e2s</sup>-G<sup>m1t</sup>-H(配列番号42)

実施例91と同様に合成を行った。

40

【0227】

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を有している。化合物は負イオンESI質量分析により同定した(実測値:7141.22)。

【0228】

(実施例95)

50

HO-X-X-X-A<sup>p</sup>-A<sup>e2s</sup>-A<sup>m1s</sup>-T<sup>e2s</sup>-C<sup>m1s</sup>-C<sup>e2s</sup>-G<sup>m1s</sup>-A<sup>e2s</sup>-U<sup>m1s</sup>-G<sup>e2s</sup>-G<sup>m1s</sup>-  
C<sup>e2s</sup>-G<sup>m1s</sup>-A<sup>e2s</sup>-A<sup>m1s</sup>-G<sup>e2t</sup>-H (配列番号 4 2)

実施例 9 1 と同様に合成を行った。

【 0 2 2 9 】

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を有している。化合物は負イオン ESI 質量分析により同定した (実測値 : 7167.24)。

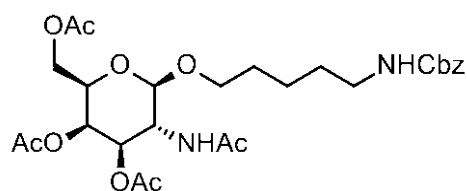
【 0 2 3 0 】

( 参考例 2 1 )

( 2 1 A )

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 2 1 A) の合成

【 化 7 8 】



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  $\mu$ L, 5.23mmol) を加え、45 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 2 1 A (17.0g、収率 94%) を得た。

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) : 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).

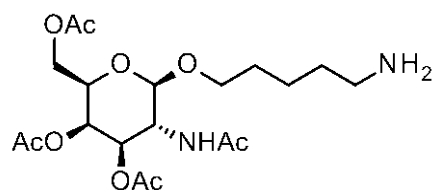
Calcd for C<sub>27</sub>H<sub>38</sub>N<sub>2</sub>O<sub>11</sub>: [M+H]<sup>+</sup> 567, Found 567.

【 0 2 3 1 】

( 2 1 B )

酢酸 [(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 (化合物 2 1 B) の合成

【 化 7 9 】



工程 ( 2 1 A ) で合成した化合物 2 1 A (17.0 g, 30.0 mmol) をエタノール (200ml) に溶解した。10%パラジウム/炭素 (wet) (2g) 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 2 1 B (12.64g、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。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) : 5.78 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz), 5.36-5.32 (2H, m), 4.72 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz), 4.21-4.09 (2H, m), 3.96-3.88 (3H, m), 3.52-3.47 (1H, m), 2.70 (2H, t,  $J = 6.7$  Hz), 2.15 (3H, s), 2.05 (3H, s), 2.01 (3H, s), 1.96 (3H, s), 1.75-1.36 (6H, m).

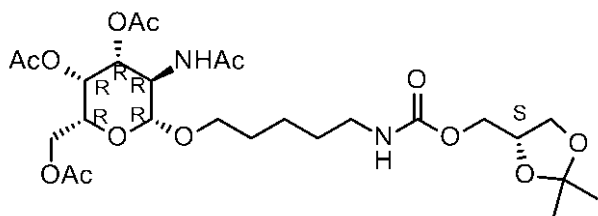
Calcd for  $\text{C}_{19}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_9$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  433, Found 433.

【 0 2 3 2 】

( 2 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-[5-[[[(4S)-2,2-ジメチル-1,3-ジオキソラン-4-イル]メト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 2 1 C)の合成

【化 8 0】



(R)-(-)-2,2-ジメチル-1,3-ジオキソラン-4-メタノール(1.68g, 12.8mmol)、トリエチルアミン(3.22mL, 23.1mmol)をジクロロメタン(100mL)溶解させた。4-ニトロフェニルクロロホルメート(2.56g, 12.7mmol)を加え、室温で1時間攪拌した。続いて、トリエチルアミン(5mL, 36mmol)、工程(2 1 B)で合成した化合物 2 1 B(5.0g, 11.56mmol)のジクロロメタン溶液(20mL)を加え、45 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(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 2 1 C(3.46 g、収率51%)を得た。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) : 5.75 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz), 5.36 (1H, d,  $J = 3.0$  Hz), 5.30 (1H, dd,  $J = 11.2, 3.3$  Hz), 4.97 (1H, br), 4.71 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz), 4.33-4.29 (1H, m), 4.23-3.88 (8H, m), 3.74-3.72 (1H, m), 3.49-3.46 (1H, m), 3.19-3.14 (2H, m), 2.15 (3H, s), 2.05 (3H, s), 2.01 (3H, s), 1.96 (3H, s), 1.63-1.53 (6H, m), 1.44 (3H, s), 1.37 (3H, s).

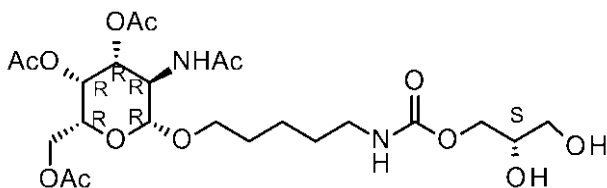
Calcd for  $\text{C}_{26}\text{H}_{42}\text{N}_2\text{O}_{13}$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  591, Found 591.

【 0 2 3 3 】

( 2 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-[5-[[[(2S)-2,3-ジヒドロキシプロポキシ]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 2 1 D)の合成

【化 8 1】



工程(2 1 C)で合成した化合物 2 1 C(4.38g, 7.42mmol)に純水(2mL)、トリフルオロ酢酸(6mL)を加え、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。更にトルエン共沸することで、水を除去し、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 0：100, v/v)で精製し、アモルファス状

の目的物 2 1 D (2.47g、収率61%)を得た。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) : 5.75 (1H, d,  $J = 7.3$  Hz), 5.35 (1H, d,  $J = 3.0$  Hz), 5.22 (1H, dd,  $J = 11.5, 3.0$  Hz), 5.13 (1H, br s), 4.61 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz), 4.23-3.87 (7H, m), 3.67-3.60 (3H, m), 3.49-3.46 (1H, m), 3.22-3.16 (2H, m), 2.16 (3H, s), 2.05 (3H, s), 2.01 (3H, s), 1.97 (3H, s), 1.61-1.50 (6H, m).

Calcd for  $\text{C}_{23}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_{13}$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  551, Found 551.

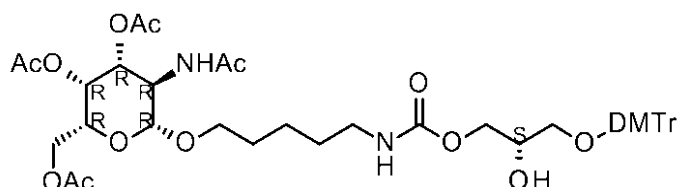
【 0 2 3 4 】

( 2 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-[5-[[[(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]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 2 1 E)の合成

10

【化 8 2】



工程 ( 2 1 D ) で合成した化合物 2 1 D (2.47g, 4.52mmol)をピリジン(15mL)に溶解した。4,4'-ジメトキシトリチルクロリド(1.82g, 5.38mmol)を加え、室温で攪拌した。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=100:0:100, v/v、その後、酢酸エチル:メタノール=95:5, v/v)で精製し、アモルファス状の目的物 2 1 E (1.84g、収率48%)を得た。

20

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) : 7.43-7.42 (2H, m), 7.32-7.29 (6H, m), 7.24-7.19 (1H, m), 6.84-6.81 (4H, m), 5.74 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz), 5.35 (1H, d,  $J = 3.0$  Hz), 5.26 (1H, dd,  $J = 11.2, 3.3$  Hz), 4.94 (1H, br), 4.65 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz), 4.22-4.09 (4H, m), 3.97-3.91 (4H, m), 3.79 (6H, s), 3.47-3.43 (1H, m), 3.18-3.15 (4H, m), 3.00 (1H, d,  $J = 4.8$  Hz), 2.14 (3H, s), 2.04 (3H, s), 1.99 (3H, s), 1.95 (3H, s), 1.65-1.34 (6H, m).

Calcd for  $\text{C}_{44}\text{H}_{56}\text{N}_2\text{O}_{15}$ :  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  875, Found 875.

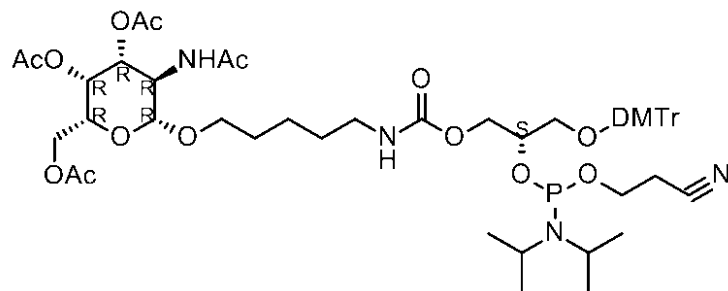
30

【 0 2 3 5 】

( 2 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-[5-[[[(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]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 2 1 F)の合成

【化 8 3】



40

工程 ( 2 1 E ) で合成した化合物 2 1 E (1.84g, 2.16mmol)を適量のピリジンを加え、減圧下共沸した後に、ジクロロメタン(21mL)に溶解させた。N,N-ジイソプロピルエチルアミン(2.25mL, 12.9mmol)、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(0.96mL, 4.31mmol)を加え、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。適量のトルエンを加え共沸した後に、粗生成物を得た。これをシリカゲルカラムクロマトグラ

50

フィー（ヘキサン：酢酸エチル＝100：0 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 2 1 F（1.87g、収率82%）を得た。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) : 7.46-7.40 (2H, m), 7.35-7.17 (7H, m), 6.82-6.80 (4H, m), 5.73-5.63 (1H, m), 5.37-5.35 (1H, m), 5.30-5.26 (1H, m), 4.97-4.94 (0.5H, m), 4.72-4.68 (1H, m), 4.42-4.40 (0.5H, m), 4.22-4.10 (4H, m), 3.99-3.43 (14H, m), 3.18-3.12 (4H, m), 2.67-2.62 (1H, m), 2.46-2.44 (1H, m), 2.14 (3H, s), 2.01-1.96 (9H, m), 1.65-0.97 (18H, m).

【 0 2 3 6 】

（実施例 9 6）

$\text{HO-X}^1-\text{X}^1-\text{X}^1-\text{A}^{\text{m1s}}-\text{A}^{\text{e2s}}-\text{U}^{\text{m1s}}-\text{C}^{\text{m1s}}-\text{C}^{\text{e2s}}-\text{G}^{\text{m1s}}-\text{A}^{\text{m1s}}-\text{T}^{\text{e2s}}-\text{G}^{\text{m1s}}-\text{G}^{\text{m1s}}-\text{C}^{\text{e2s}}-\text{G}^{\text{m1s}}-\text{A}^{\text{m1s}}-\text{A}^{\text{e2s}}-\text{G}^{\text{m1t}}-\text{H}$ （配列番号 4 0） 10

Xの部分をX<sup>1</sup>と置き換えて、実施例 9 1と同様に合成を行った。X<sup>1</sup>の部分は参考例 2 1で合成した化合物 2 1 Fを用い、3回縮合した。

【 0 2 3 7 】

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：6830.15）。

【 0 2 3 8 】

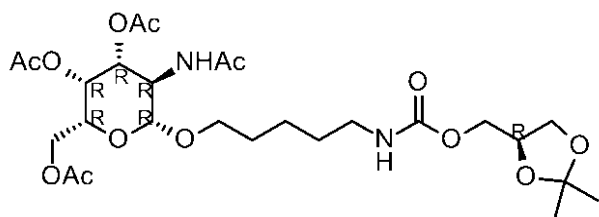
20

（参考例 2 2）

（ 2 2 A ）

酢酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-アセトアミド-3,4-ジアセトキシ-6-[5-[[[(4R)-2,2-ジメチル-1,3-ジオキソラン-4-イル]メト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 2 2 A）の合成

【化 8 4】



30

(S)-(+)-2,2-ジメチル-1,3-ジオキソラン-4-メタノール（1.68g, 2.54mmol）、トリエチルアミン（3.22mL, 23.1mmol）をジクロロメタン（100mL）溶解させた。4-ニトロフェニルクロロホルメート（2.56g, 12.72mmol）を加え、室温で1時間攪拌した。続いて、トリエチルアミン（5mL, 36mmol）、工程（ 2 1 B ）で合成した化合物 2 1 B（5.2g, 13mmol）を加え、45℃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（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 2 2 A（3.82g、収率54%）を得た。

40

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) : 5.71 (1H, d, J = 8.5 Hz), 5.36 (1H, d, J = 3.0 Hz), 5.31 (1H, dd, J = 11.2, 3.0 Hz), 4.97 (1H, br), 4.71 (1H, d, J = 8.5 Hz), 4.33-4.30 (1H, m), 4.22-3.99 (5H, m), 3.95-3.89 (3H, m), 3.74-3.71 (1H, m), 3.50-3.46 (1H, m), 3.19-3.14 (2H, m), 2.15 (3H, s), 2.05 (3H, s), 2.01 (3H, s), 1.96 (3H, s), 1.69-1.47 (6H, m), 1.44 (3H, s), 1.37 (3H, s).

Calcd for  $\text{C}_{26}\text{H}_{42}\text{N}_2\text{O}_{13}$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  591, Found 591.

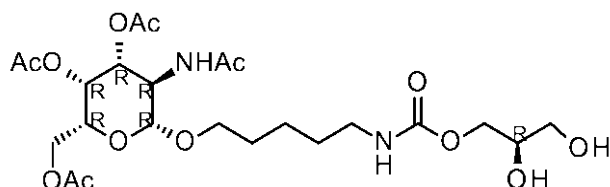
【 0 2 3 9 】

（ 2 2 B ）

酢酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-アセトアミド-3,4-ジアセトキシ-6-[5-[[[(2R)-2,3-ジヒドロキシプロポキシ]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 50

## 物 2 2 B ) の 合 成

## 【化 8 5】



## 【 0 2 4 0 】

工程 ( 2 2 A ) で合成した化合物 2 2 A ( 3.82g, 6.47mmol ) に純水 ( 2mL )、トリフルオロ酢酸 ( 6mL ) を加え、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。更にトルエン共沸することで、水を除去し、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 0 : 100, v/v ) で精製し、アモルファス状の目的物 2 2 B ( 2.49g、収率 70% ) を得た。

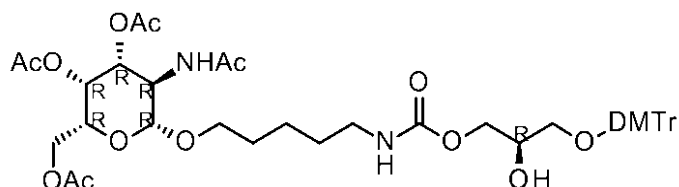
$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) : 5.98 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz), 5.37-5.20 (3H, m), 4.63 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz), 4.21-3.88 (7H, m), 3.69-3.57 (3H, m), 3.51-3.44 (1H, m), 3.21-3.14 (2H, m), 2.16 (3H, s), 2.05 (3H, s), 2.01 (3H, s), 1.97 (3H, s), 1.66-1.34 (6H, m).  
Calcd for  $\text{C}_{23}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_{13}$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  551, Found 551.

## 【 0 2 4 1 】

## ( 2 2 C )

酢酸 [(2R,3R,4R,5R,6R)-5-アセトアミド-3,4-ジアセトキシ-6-[5-[[[(2R)-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]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 2 2 C) の合成

## 【化 8 6】



工程 ( 2 2 B ) で合成した化合物 2 2 B ( 2.49g, 4.52mmol ) をピリジン ( 15mL ) に溶解した。4,4'-ジメトキシトリチルクロリド ( 1.84g, 5.43mmol ) を加え、室温で攪拌した。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 0 : 100, v/v、その後、酢酸エチル : メタノール = 95:5, v/v ) で精製し、アモルファス状の目的物 2 2 C ( 2.1g、収率 54% ) を得た。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) : 7.42 (2H, d,  $J = 7.9$  Hz), 7.32-7.16 (6H, m), 6.83 (4H, d,  $J = 9.1$  Hz), 5.74 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz), 5.35 (1H, d,  $J = 3.0$  Hz), 5.27 (1H, dd,  $J = 11.2, 3.0$  Hz), 4.93 (1H, br), 4.66 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz), 4.25-4.11 (4H, m), 4.01-3.89 (4H, m), 3.79 (6H, s), 3.50-3.43 (1H, m), 3.21-3.13 (4H, m), 2.98 (1H, br), 2.13 (3H, s), 2.04 (3H, s), 1.99 (3H, s), 1.94 (3H, s), 1.65-1.34 (6H, m).

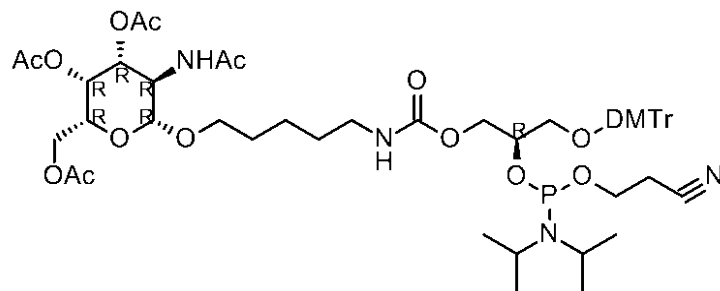
Calcd for  $\text{C}_{44}\text{H}_{56}\text{N}_2\text{O}_{15}$ :  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  875, Found 875.

## 【 0 2 4 2 】

## ( 2 2 D )

酢酸 [(2R,3R,4R,5R,6R)-5-アセトアミド-3,4-ジアセトキシ-6-[5-[[[(2R)-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]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 2 2 D) の合成

## 【化 8 7】



工程 ( 2 2 C ) で合成した化合物 2 2 C (2.10g, 2.50mmol) を適量のピリジンを加え、減圧下共沸した後に、ジクロロメタン (20mL) に溶解させた。N,N-ジイソプロピルエチルアミン (2.6mL, 15mmol)、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 (1.11mL, 4.9mmol) を加え、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。適量のトルエンを加え共沸した後に、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、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 2 2 D (1.63g、収率63%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) : 7.46-7.40 (2H, m), 7.35-7.17 (7H, m), 6.85-6.78 (4H, m), 5.70-5.57 (1H, m), 5.38-5.34 (1H, m), 5.32-5.24 (1H, m), 4.96-4.91 (0.5H, m), 4.73-4.65 (1H, m), 4.44-4.38 (0.5H, m), 4.23-4.08 (4H, m), 4.00-3.41 (14H, m), 3.27-3.03 (4H, m), 2.68-2.60 (1H, m), 2.49-2.42 (1H, m), 2.14 (3H, s), 2.07-1.91 (9H, m), 1.65-0.97 (18H, m).

## 【 0 2 4 3 】

( 実施例 9 7 )

$\text{HO-X}^2-\text{X}^2-\text{X}^2-\text{A}^{\text{m1s}}-\text{A}^{\text{e2s}}-\text{U}^{\text{m1s}}-\text{C}^{\text{m1s}}-\text{C}^{\text{e2s}}-\text{G}^{\text{m1s}}-\text{A}^{\text{m1s}}-\text{T}^{\text{e2s}}-\text{G}^{\text{m1s}}-\text{G}^{\text{m1s}}-\text{C}^{\text{e2s}}-\text{G}^{\text{m1s}}-\text{A}^{\text{m1s}}-\text{A}^{\text{e2s}}-\text{G}^{\text{m1t}}-\text{H}$  ( 配列番号 4 0 )

X の部分を  $\text{X}^2$  と置き換えて、実施例 9 1 と同様に合成を行った。 $\text{X}^2$  の部分は参考例 2 2 で合成した化合物 2 2 D を用い、3 回縮合した。

## 【 0 2 4 4 】

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 : 6830.14 ) 。

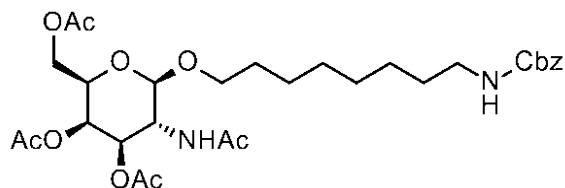
## 【 0 2 4 5 】

( 参考例 2 3 )

( 2 3 A )

酢酸 [(2R,3R,4R,5R,6R)-5-アセトアミド-3,4-ジアセトキシ-6-[8-(ベンジルオキシカルボニルアミノ)オクトキシ]テトラヒドロピラン-2-イル]メチル (化合物 2 3 A) の合成

## 【化 8 8】



文献既知化合物のベンジルN-(8-ヒドロキシオクチル)カーバメート (J. Med. Chem, 1993, 36, 3721-3726.) (6.5g, 23mmol) 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-トリオキシ-テトラヒドロピラン-2-イル]メチル (WO2011053614) (8.2g, 21mmol) とのジクロロメタン (150mL) 懸濁溶液に、トリフルオロメタンスルホン酸 (310  $\mu\text{L}$ , 3.6 mmol) を加え、45 °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 2 3 A（12.68g、収率99%）を得た。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) : 7.39-7.29 (5H, m), 5.65 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz), 5.35 (1H, d,  $J = 3.0$  Hz), 5.29 (1H, dd,  $J = 11.5, 3.0$  Hz), 5.10 (2H, s), 4.83 (1H, br), 4.68 (1H, d,  $J = 7.9$  Hz), 4.20-4.09 (2H, m), 3.99-3.85 (3H, m), 3.50-3.42 (1H, m), 3.22-3.15 (2H, m), 2.14 (3H, s), 2.05 (3H, s), 2.00 (3H, s), 1.95 (3H, s), 1.62-1.27 (12H, m).

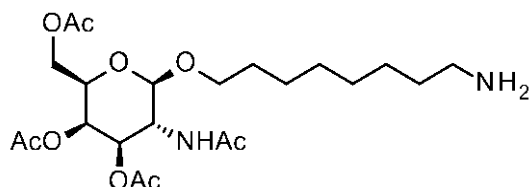
Calcd for  $\text{C}_{30}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{O}_{11}$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  609, Found 609.

【 0 2 4 6 】

( 2 3 B )

酢酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-アセトアミド-3,4-ジアセトキシ-6-(8-アミノオクトキシ)テトラヒドロピラン-2-イル]メチル（化合物 2 3 B）の合成

【化 8 9】



工程（ 2 3 A ）で合成した化合物 2 3 A (12.68g, 20.83mmol) をエタノール（200mL）に溶解した。10%パラジウム/炭素(wet)（2g）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 2 3 B (10.1g) 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。

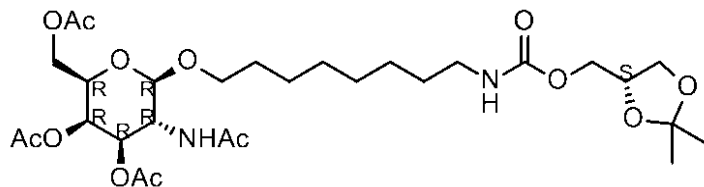
Calcd for  $\text{C}_{22}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_9$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  475, Found 475.

【 0 2 4 7 】

( 2 3 C )

酢酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-アセトアミド-3,4-ジアセトキシ-6-[8-[(4S)-2,2-ジメチル-1,3-ジオキソラン-4-イル]メトキシカルボニルアミノ]オクトキシ]テトラヒドロピラン-2-イル]メチル（化合物 2 3 C）の合成

【化 9 0】



(R)-(-)-2,2-ジメチル-1,3-ジオキソラン-4-メタノール（1.6g, 12mmol）、トリエチルアミン（3.1mL, 22mmol）をジクロロエタン（30mL）溶解させた。4-ニトロフェニルクロロホルメート（2.2g, 12mmol）を加え、室温で1.5時間攪拌した。続いて、トリエチルアミン（4.5mL, 32mmol）、工程（ 2 3 B ）で合成した化合物 2 3 B（5.1g, 11mmol）を加え、45℃で4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（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 2 3 C（2.45g、収率36%）を得た。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) : 5.64 (1H, d,  $J = 7.9$  Hz), 5.36 (1H, d,  $J = 3.0$  Hz), 5.29 (1H, dd,  $J = 11.2, 3.0$  Hz), 4.85 (1H, br), 4.69 (1H, d,  $J = 7.9$  Hz), 4.35-3.86 (9H, m), 3.76-3.70 (1H, m), 3.50-3.43 (1H, m), 3.20-3.12 (2H, m), 2.14 (3H, s), 2.05 (3H, s), 2.01 (3H, s), 1.96 (3H, s), 1.65-1.28 (12H, m), 1.44 (3H, s), 1.37 (3H, s).

s).

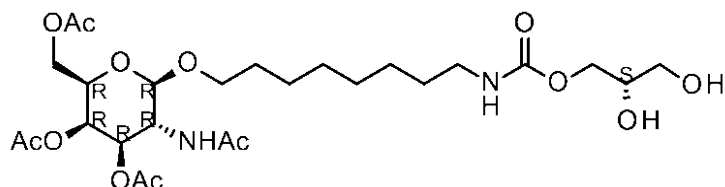
Calcd for  $C_{29}H_{48}N_2O_{13}$ :  $[M+H]^+$  633, Found 633.

【 0 2 4 8 】

( 2 3 D )

酢酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-アセトアミド-3,4-ジアセトキシ-6-[8-[[[(2S)-2,3-ジヒドロキシプロポキシ]カルボニルアミノ]オクトキシ]テトラヒドロピラン-2-イル]メチル(化合物 2 3 D)の合成

【化 9 1】



10

工程(23C)で合成した化合物23C(2.45g, 3.87mmol)に純水(2mL)、トリフルオロ酢酸(6mL)を加え、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。更にトルエン共沸することで、水を除去し、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 0：100, v/v)で精製し、アモルファス状の目的物23D(1.18g、収率51%)を得た。

$^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ ) : 5.87 (1H, d,  $J = 7.9$  Hz), 5.35 (1H, d,  $J = 3.0$  Hz), 5.27 (1H, dd,  $J = 11.2, 3.0$  Hz), 5.07 (1H, br), 4.66 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz), 4.27-3.86 (7H, m), 3.70-3.57 (2H, m), 3.50-3.43 (2H, m), 3.24-3.13 (2H, m), 2.15 (3H, s), 2.05 (3H, s), 2.01 (3H, s), 1.96 (3H, s), 1.67-1.24 (12H, m).

20

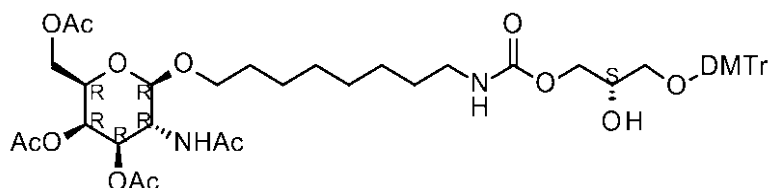
Calcd for  $C_{26}H_{44}N_2O_{13}$ :  $[M+H]^+$  593, Found 593.

【 0 2 4 9 】

( 2 3 E )

酢酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-アセトアミド-3,4-ジアセトキシ-6-[8-[[[(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]カルボニルアミノ]オクトキシ]テトラヒドロピラン-2-イル]メチル(化合物 2 3 E)の合成

【化 9 2】



30

工程(23D)で合成した化合物23D(1.18g, 1.99mmol)をピリジン(20mL)に溶解した。4,4'-ジメトキシトリチルクロリド(0.81g, 2.39mmol)を加え、室温で攪拌した。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(ヘキサン：酢酸エチル=100：0 0：100, v/v、その後、酢酸エチル：メタノール=95：5, v/v)で精製し、アモルファス状の目的物23E(0.6 g、収率34%)を得た。

40

$^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ ) : 7.44-7.40 (2H, m), 7.33-7.19 (7H, m), 6.85-6.81 (4H, m), 5.61 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz), 5.35 (1H, d,  $J = 3.0$  Hz), 5.29 (1H, dd,  $J = 11.2, 3.3$  Hz), 4.79 (1H, br), 4.69 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz), 4.24-4.09 (4H, m), 4.00-3.86 (4H, m), 3.79 (6H, s), 3.50-3.43 (1H, m), 3.21-3.12 (4H, m), 2.14 (3H, s), 2.04 (3H, s), 2.00 (3H, s), 1.95 (3H, s), 1.63-1.26 (12H, m).

Calcd for  $C_{47}H_{62}N_2O_{15}$ :  $[M+Na]^+$  917, Found 917.

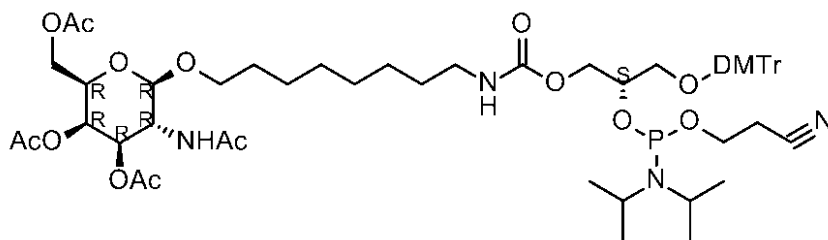
【 0 2 5 0 】

( 2 3 F )

50

酢酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-アセトアミド-3,4-ジアセトキシ-6-[8-[[[(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]カルボニルアミノ]オクトキシ]テトラヒドロピラン-2-イル]メチル(化合物 2 3 F)の合成

【化 9 3】



10

工程(23E)で合成した化合物 2 3 E (0.60g, 0.67mmol)を適量のピリジンを加え、減圧下共沸した後に、ジクロロエタン(5mL)に溶解させた。N,N-ジイソプロピルエチルアミン(0.70ml, 4.0mmol)、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 (0.30mL, 1.3mmol)を加え、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。適量のトルエンを加え共沸した後に、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、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 2 3 F (0.51g、収率69%)を得た。

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) : 7.46-7.40 (2H, m), 7.34-7.17 (7H, m), 6.84-6.78 (4H, m), 5.56-5.48 (1H, m), 5.37-5.34 (1H, m), 5.32-5.28 (1H, m), 4.87-4.80 (0.5H, m), 4.73-4.68 (1H, m), 4.43-4.37 (0.5H, m), 4.23-4.08 (4H, m), 3.97-3.43 (14H, m), 3.26-3.06 (4H, m), 2.66-2.61 (1H, m), 2.47-2.41 (1H, m), 2.14 (3H, s), 2.06-1.93 (9H, m), 1.64-1.23 (12H, m), 1.21-0.98 (12H, m).

20

【0 2 5 1】

(実施例 9 8)

HO-X<sup>3</sup>-X<sup>3</sup>-X<sup>3</sup>-A<sup>m1s</sup>-A<sup>e2s</sup>-U<sup>m1s</sup>-C<sup>m1s</sup>-C<sup>e2s</sup>-G<sup>m1s</sup>-A<sup>m1s</sup>-T<sup>e2s</sup>-G<sup>m1s</sup>-G<sup>m1s</sup>-C<sup>e2s</sup>-G<sup>m1s</sup>-A<sup>m1s</sup>-A<sup>e2s</sup>-G<sup>m1t</sup>-H (配列番号 4 0)

Xの部分X<sup>3</sup>と置き換えて、実施例 9 1と同様に合成を行った。X<sup>3</sup>の部分は参考例 2 3で合成した化合物 2 3 Fを用い、3回縮合した。

30

【0 2 5 2】

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：6957.27)。

【0 2 5 3】

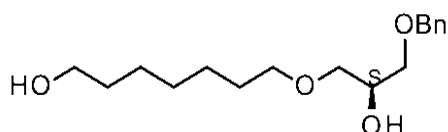
(参考例 2 4)

(2 4 A)

7-[(2S)-3-ベンジルオキシ-2-ヒドロキシプロポキシ]ヘプタン-1-オール(化合物 2 4 A)の合成

40

【化 9 4】



ベンジル (S)-(+)-グリシジルエーテル (5.0g, 30mmol)をジクロロメタン (150mL)に溶解した。1,7-ヘプタンジオール (6.0g, 45mmol)、三フッ化ホウ素-ジエチルエーテル錯体 (0.76mL, 6.1mmol)を加え、室温で2日間攪拌した。反応溶液を酢酸エチル/飽和炭酸水素ナトリウム水溶液の混合溶液に加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水

50

/飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄した後、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 = 50 : 50, v/v）で精製し、無色油状の目的物 2 4 A（3.3 g、収率37%）を得た。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) : 7.39-7.28 (5H, m), 4.57 (2H, s), 4.02-3.96 (1H, m), 3.67-3.61 (2H, m), 3.59-3.43 (6H, m), 2.48 (1H, d,  $J = 4.2$  Hz), 1.61-1.52 (4H, m), 1.37-1.30 (6H, m).

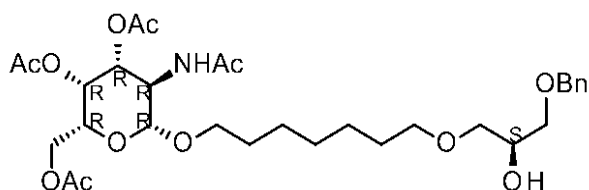
Calcd for  $\text{C}_{17}\text{H}_{28}\text{O}_4$ :  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  319, Found 319.

【 0 2 5 4 】

( 2 4 B )

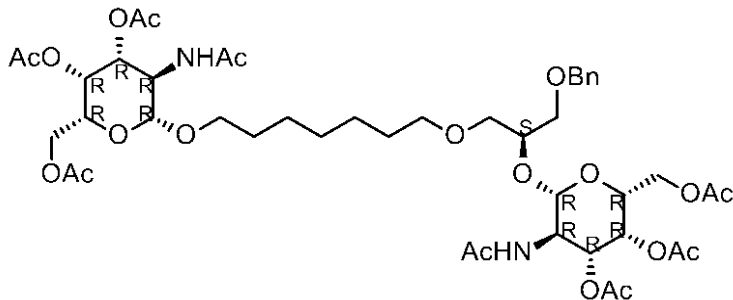
酢酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-アセトアミド-3,4-ジアセトキシ-6-[7-[(2S)-3-ベンジルオキシ-2-ヒドロキシ-プロポキシ]ヘプトキシ]テトラヒドロピラン-2-イル]メチル(化合物 2 4 B - 1)の合成

【化 9 5】



及び、酢酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-アセトアミド-6-[7-[(2S)-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-3-ベンジルオキシ-プロポキシ]ヘプトキシ]-3,4-ジアセトキシテトラヒドロピラン-2-イル]メチル(化合物 2 4 B - 2)の合成

【化 9 6】



【 0 2 5 5 】

工程( 2 4 A )で合成した化合物 1 5 A (3.3g, 11mmol)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)(4.0g, 10mmol)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(0.15mL, 1.7mmol)を加え、45 で3日間攪拌した。反応終了後、溶媒を半分ほど減圧留去して濃縮し、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、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水/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 : 100, v/v）で精製し、アモルファス状の目的物 2 4 B - 1 (4.5 g、収率70%)及び 2 4 B - 2 (1.9g、収率20%)を得た。

(化合物 2 4 B - 1)

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) : 7.39-7.28 (5H, m), 5.51 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz), 5.37-5.29 (2H, m), 4.71 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz), 4.56 (2H, s), 4.20-4.09 (2H, m), 4.03-3.85 (4H, m), 3.58-3.41 (7H, m), 2.58 (1H, d,  $J = 4.2$  Hz), 2.14 (3H, s), 2.05 (3H, s), 2.00 (3H, s), 1.95 (3H, s), 1.63-1.52 (4H, m), 1.36-1.29 (6H, m).

Calcd for  $C_{31}H_{47}NO_{12}$ :  $[M+H]^+$  626, Found 626.

(化合物 2 4 B - 2)

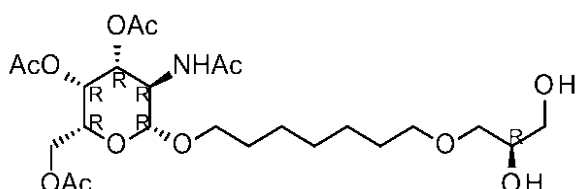
$^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ ) : 7.41-7.28 (5H, m), 5.65 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz), 5.48 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz), 5.42-5.23 (4H, m), 4.84 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz), 4.72 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz), 4.59-4.49 (2H, m), 4.20-3.38 (17H, m), 2.19-1.92 (24H, m), 1.61-1.47 (4H, m), 1.38-1.26 (6H, m).

Calcd for  $C_{45}H_{66}N_2O_{20}$ :  $[M+H]^+$  955, Found 955.

【 0 2 5 6 】

( 2 4 C )

酢酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-アセトアミド-3,4-ジアセトキシ-6-[7-[(2R)-2,3-ジヒドロキシプロポキシ]ヘプトキシ]テトラヒドロピラン-2-イル]メチル(化合物 2 4 C)の合成  
【化 9 7】



工程(2 4 B)で合成した化合物 2 4 B - 1 (4.5g, 7.2mmol)をエタノール(100mL)に溶解した。10%パラジウム/炭素(wet)(2.0g)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た。適量のトルエンを加えて共沸後、適量のピリジンを加えて共沸し目的物 2 4 C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。

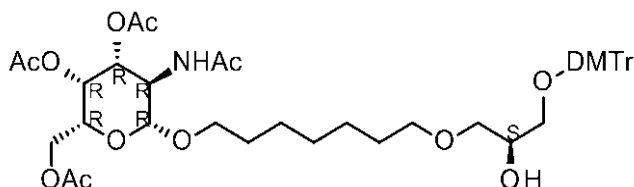
$^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ ) : 5.55 (1H, d,  $J = 9.1$  Hz), 5.37-5.27 (2H, m), 4.69 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz), 4.21-4.09 (2H, m), 3.99-3.42 (11H, m), 2.69 (1H, d,  $J = 5.4$  Hz), 2.15 (3H, s), 2.05 (3H, s), 2.01 (3H, s), 1.96 (3H, s), 1.65-1.52 (4H, m), 1.40-1.29 (6H, m).

Calcd for  $C_{24}H_{41}NO_{12}$ :  $[M+H]^+$  536, Found 536.

【 0 2 5 7 】

( 2 4 D )

酢酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-アセトアミド-3,4-ジアセトキシ-6-[7-[(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]ヘプトキシ]テトラヒドロピラン-2-イル]メチル(化合物 2 4 D)の合成  
【化 9 8】



工程(2 4 C)で合成した化合物 2 4 Cの粗生成物をピリジン(30mL)に溶解した。4, 4'-ジメトキシトリチルクロリド(2.7g, 7.9mmol)を加え、室温で13時間攪拌した。反応終了後、溶媒を減圧留去した。トルエンを加え共沸した後に、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=50:50 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 2 4 D(3.0g、収率2steps 49%)を得た。

$^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ ) : 7.45-7.41 (2H, m), 7.34-7.20 (7H, m), 6.85-6.80 (4H, m), 5.50 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz), 5.37-5.29 (2H, m), 4.71 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz), 4.20-4.09 (2H, m), 3.98-3.85 (4H, m), 3.79 (6H, s), 3.55-3.40 (5H, m), 3.22-3.13 (2H, m), 2.51 (1H, d,  $J = 4.2$  Hz), 2.14 (3H, s), 2.05 (3H, s), 2.00 (3H, s), 1.93 (3H, s), 1.

60-1.52 (4H, m), 1.35-1.27 (6H, m).

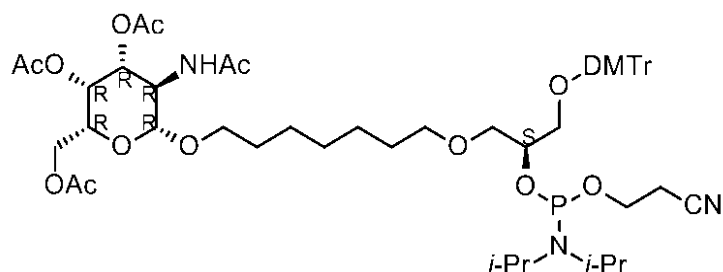
Calcd for  $C_{45}H_{59}NO_{14}$ :  $[M+Na]^+$  860, Found 860.

【 0 2 5 8 】

( 2 4 E )

酢酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-アセトアミド-3,4-ジアセトキシ-6-[7-[(2S)-3-[ビス(4-メトキシフェニル)-フェニル-メトキシ]-2-[2-シアノエチル-(ジイソプロピルアミノ)ホスファニル]オキシプロポキシ]ヘプトキシ]テトラヒドロピラン-2-イル]メチル(化合物 2 4 E)の合成

【化 9 9】



10

【 0 2 5 9 】

工程(2 4 D)で合成した化合物 2 4 D (3.0g, 3.6mmol)を適量のピリジンで共沸した後に、ジクロロメタン(50mL)に溶解した。N,N-ジイソプロピルエチルアミン(2.5mL, 14mmol)、2-シアノエチルジイソプロピルクロロホスホアミド(0.88mL, 3.9mmol)を加え、室温で1.5時間撹拌した。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=50：50 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 2 4 E (3.0g、収率82%)を得た。

20

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) : 7.48-7.41 (2H, m), 7.36-7.15 (7H, m), 6.85-6.77 (4H, m), 5.59-5.41 (1H, m), 5.38-5.26 (2H, m), 4.75-4.68 (1H, m), 4.20-4.07 (2H, m), 3.97-3.06 (21H, m), 2.67-2.40 (2H, m), 2.14 (3H, s), 2.04 (3H, s), 2.00 (3H, s), 1.92 (3H, s), 1.64-1.46 (4H, m), 1.37-1.22 (6H, m), 1.22-0.97 (12H, m).

【 0 2 6 0 】

30

( 実施例 9 9 )

$\text{HO-X}^4-\text{X}^4-\text{X}^4-\text{A}^{\text{m1s}}-\text{A}^{\text{e2s}}-\text{U}^{\text{m1s}}-\text{C}^{\text{m1s}}-\text{C}^{\text{e2s}}-\text{G}^{\text{m1s}}-\text{A}^{\text{m1s}}-\text{T}^{\text{e2s}}-\text{G}^{\text{m1s}}-\text{G}^{\text{m1s}}-\text{C}^{\text{e2s}}-\text{G}^{\text{m1s}}-\text{A}^{\text{m1s}}-\text{A}^{\text{e2s}}-\text{G}^{\text{m1t}}-\text{H}$  (配列番号 4 0)

Xの部分 $\text{X}^4$ と置き換えて、実施例 9 1と同様に合成を行った。 $\text{X}^4$ の部分は参考例 2 4で合成した化合物 2 4 Eを用い、3回縮合した。

【 0 2 6 1 】

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：6785.22)

40

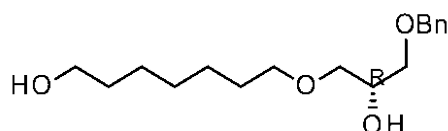
【 0 2 6 2 】

( 参考例 2 5 )

( 2 5 A )

7-[(2R)-3-ベンジルオキシ-2-ヒドロキシプロポキシ]ヘプタン-1-オール(化合物 2 5 A)の合成

## 【化 1 0 0】



ベンジル(R)-(-)-グリシジルエーテル(5.0g, 30mmol)をジクロロメタン(150mL)に溶解した。1,7-ヘプタンジオール(6.0g, 45mmol)、三フッ化ホウ素-ジエチルエーテル錯体(0.76mL, 6.1mmol)を加え、室温で2日間撹拌した。反応溶液を酢酸エチル/飽和炭酸水素ナトリウム水溶液の混合溶液に加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水/飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄した後、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=50:50, v/v)で精製し、無色油状の目的物25A(4.0g、収率44%)を得た。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) : 7.39-7.27 (5H, m), 4.56 (2H, s), 4.04-3.94 (1H, m), 3.67-3.59 (2H, m), 3.58-3.40 (6H, m), 2.51 (1H, d,  $J = 4.2$  Hz), 1.63-1.49 (4H, m), 1.41-1.30 (6H, m).

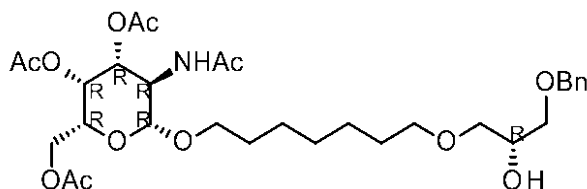
Calcd for  $\text{C}_{17}\text{H}_{28}\text{O}_4$ :  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  319, Found 319.

## 【0 2 6 3】

(25B)

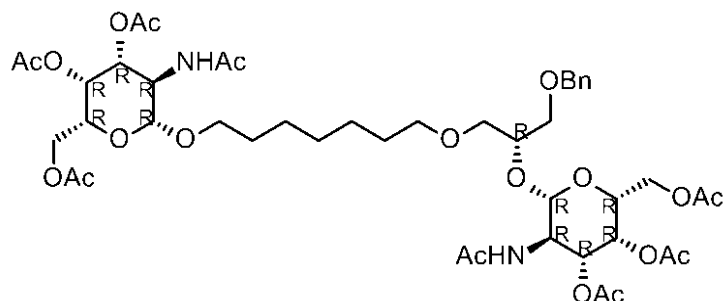
酢酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-アセトアミド-3,4-ジアセトキシ-6-[7-[(2R)-3-ベンジルオキシ-2-ヒドロキシ-プロポキシ]ヘプトキシ]テトラヒドロピラン-2-イル]メチル(化合物25B-1)の合成

## 【化 1 0 1】



酢酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-アセトアミド-6-[7-[(2R)-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-3-ベンジルオキシ-プロポキシ]ヘプトキシ]-3,4-ジアセトキシテトラヒドロピラン-2-イル]メチル(化合物25B-2)の合成

## 【化 1 0 2】



## 【0 2 6 4】

工程(25A)で合成した化合物25A(4.0g, 14mmol)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)(4.8g, 12mmol)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(0.18mL, 2.1mmol)を加え、45℃で3日間撹拌した。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、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩

水/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 2 5 B - 1（4.8g、収率62%）及び 2 5 B - 2（1.9g、収率16%）を得た。

（化合物 2 5 B - 1）

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) : 7.39-7.27 (5H, m), 5.50 (1H, d,  $J = 9.1$  Hz), 5.37-5.28 (2H, m), 4.70 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz), 4.57 (2H, s), 4.20-4.08 (2H, m), 4.03-3.85 (4H, m), 3.58-3.42 (7H, m), 2.58 (1H, d,  $J = 4.2$  Hz), 2.14 (3H, s), 2.05 (3H, s), 2.00 (3H, s), 1.95 (3H, s), 1.64-1.50 (4H, m), 1.38-1.29 (6H, m).

Calcd for  $\text{C}_{31}\text{H}_{47}\text{NO}_{12}$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  626, Found 626.

10

（化合物 2 5 B - 2）

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) : 7.39-7.28 (5H, m), 5.85-5.21 (6H, m), 4.90-4.73 (2H, m), 4.53 (2H, s), 4.22-3.38 (17H, m), 2.20-1.91 (24H, m), 1.63-1.51 (4H, m), 1.41-1.30 (6H, m).

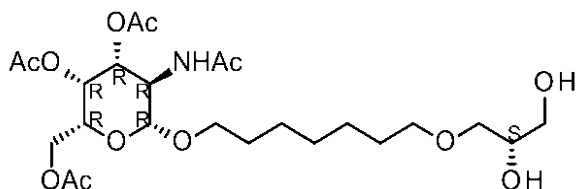
Calcd for  $\text{C}_{45}\text{H}_{66}\text{N}_2\text{O}_{20}$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  955, Found 955.

【 0 2 6 5 】

（ 2 5 C ）

酢酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-アセトアミド-3,4-ジアセトキシ-6-[7-[(2S)-2,3-ジヒドロキシプロポキシ]ヘプトキシ]テトラヒドロピラン-2-イル]メチル（化合物 2 5 C）の合成  
【化 1 0 3】

20



工程（ 2 5 B ）で合成した化合物 2 5 B - 1（4.8g, 7.7mmol）をエタノール（100mL）に溶解した。10% パラジウム/炭素(wet)（2.0g）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た。適量のトルエンを加えて共沸後、適量のピリジンを加えて共沸し目的物 2 5 C 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。

30

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) : 5.62 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz), 5.38-5.26 (2H, m), 4.69 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz), 4.21-4.09 (2H, m), 4.00-3.43 (11H, m), 2.74 (1H, br s), 2.15 (3H, s), 2.05 (3H, s), 2.01 (3H, s), 1.96 (3H, s), 1.68-1.50 (4H, m), 1.41-1.29 (6H, m).

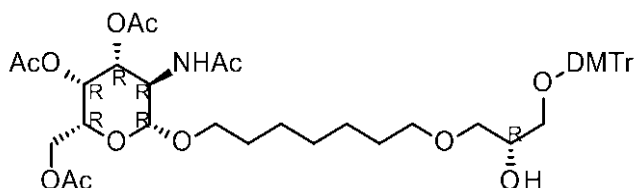
Calcd for  $\text{C}_{24}\text{H}_{41}\text{NO}_{12}$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  536, Found 536.

【 0 2 6 6 】

（ 2 5 D ）

酢酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-アセトアミド-3,4-ジアセトキシ-6-[7-[(2R)-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]ヘプトキシ]テトラヒドロピラン-2-イル]メチル（化合物 2 5 D）の合成  
【化 1 0 4】

40



工程（ 2 5 C ）で合成した化合物 2 5 C の粗生成物をピリジン（30mL）に溶解した。4, 4'-ジメトキシトリチルクロリド（2.7g, 8.0mmol）を加え、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。トルエンを加え共沸した後に、粗生成物を得た。これを

50



シリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン：酢酸エチル＝50：50 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 2 5 D（4.5g、収率2steps 70%）を得た。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) : 7.46-7.40 (2H, m), 7.34-7.18 (7H, m), 6.86-6.79 (4H, m), 5.50 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz), 5.37-5.28 (2H, m), 4.70 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz), 4.20-4.08 (2H, m), 3.98-3.84 (4H, m), 3.79 (6H, s), 3.55-3.39 (5H, m), 3.21-3.14 (2H, m), 2.51 (1H, d,  $J = 4.2$  Hz), 2.14 (3H, s), 2.04 (3H, s), 2.00 (3H, s), 1.94 (3H, s), 1.65-1.47 (4H, m), 1.36-1.27 (6H, m).

Calcd for  $\text{C}_{45}\text{H}_{59}\text{NO}_{14}$ :  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  860, Found 860.

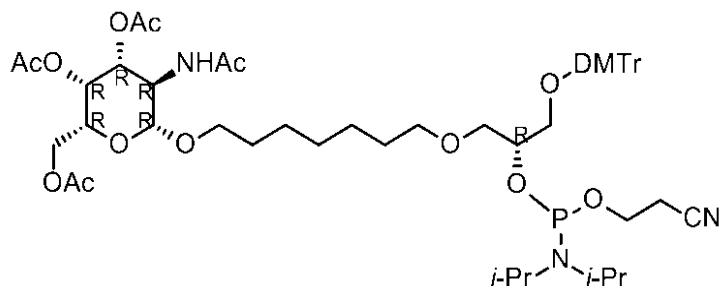
【 0 2 6 7 】

10

( 2 5 E )

酢酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-アセトアミド-3,4-ジアセトキシ-6-[7-[(2R)-3-[ビス(4-メトキシフェニル)-フェニル-メトキシ]-2-[2-シアノエチル-(ジイソプロピルアミノ)ホスファニル]オキシプロポキシ]ヘプトキシ]テトラヒドロピラン-2-イル]メチル(化合物 2 5 E)の合成

【化 1 0 5】



20

工程 ( 2 5 D ) で合成した化合物 2 5 D (4.5g, 5.4mmol) を適量のピリジンで共沸した後に、ジクロロメタン (50mL) に溶解した。N,N-ジイソプロピルエチルアミン (3.7mL, 21mmol)、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 (1.3mL, 5.9mmol) を加え、室温で 1 時間攪拌した。反応終了後、溶媒を減圧留去した。適量のトルエンを加え共沸した後に、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＝50：50 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 2 5 E (4.5g、収率81%)を得た。

30

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) : 7.48-7.40 (2H, m), 7.36-7.16 (7H, m), 6.84-6.77 (4H, m), 5.58-5.42 (1H, m), 5.37-5.27 (2H, m), 4.74-4.68 (1H, m), 4.20-4.07 (2H, m), 3.97-3.06 (21H, m), 2.67-2.39 (2H, m), 2.14 (3H, s), 2.05 (3H, s), 2.00 (3H, s), 1.92 (3H, s), 1.63-1.45 (4H, m), 1.36-1.23 (6H, m), 1.21-0.98 (12H, m).

【 0 2 6 8 】

( 実施例 1 0 0 )

$\text{HO-X}^5 - \text{X}^5 - \text{X}^5 - \text{A}^{\text{m1s}} - \text{A}^{\text{e2s}} - \text{U}^{\text{m1s}} - \text{C}^{\text{m1s}} - \text{C}^{\text{e2s}} - \text{G}^{\text{m1s}} - \text{A}^{\text{m1s}} - \text{T}^{\text{e2s}} - \text{G}^{\text{m1s}} - \text{G}^{\text{m1s}} - \text{C}^{\text{e2s}} - \text{G}^{\text{m1s}} - \text{A}^{\text{m1s}} - \text{A}^{\text{e2s}} - \text{G}^{\text{m1t}} - \text{H}$  (配列番号 4 0)

X の部分を  $\text{X}^5$  と置き換えて、実施例 9 1 と同様に合成を行った。 $\text{X}^5$  の部分は参考例 1 6 で合成した化合物 2 5 E を用い、3 回縮合した。

40

【 0 2 6 9 】

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：6785.21)。

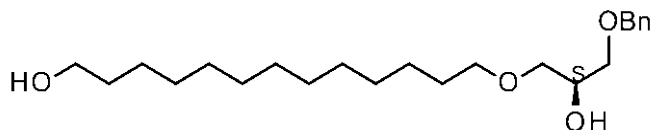
【 0 2 7 0 】

( 参考例 2 6 )

( 2 6 A )

50

13-[(2S)-3-ベンジルオキシ-2-ヒドロキシプロポキシ]トリデカン-1-オール (化合物 2 6 A) の合成  
【化 1 0 6】



ベンジル(S)-(+)-グリシジルエーテル (4.0g, 24mmol) をジクロロメタン (150mL) に溶解した。トリデカン-1,13-ジオール (7.6g, 35mmol)、三フッ化ホウ素 - ジエチルエーテル錯体 (0.61mL, 4.9mmol) を加え、室温で2日間撹拌した。反応溶液を酢酸エチル/飽和炭酸水素ナトリウム水溶液の混合溶液に加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水/飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄した後、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 = 50: 50, v/v) で精製し、無色油状の目的物 2 6 A (3.8g、収率41%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) : 7.38-7.27 (5H, m), 4.56 (2H, s), 4.02-3.94 (1H, m), 3.69-3.39 (8H, m), 2.49 (1H, d,  $J = 4.2$  Hz), 1.61-1.50 (4H, m), 1.39-1.21 (18H, m).

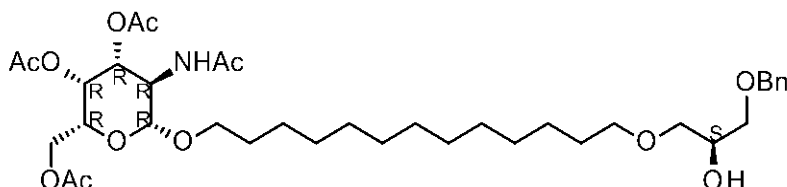
Calcd for  $\text{C}_{23}\text{H}_{40}\text{O}_4$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  381, Found 381.

【 0 2 7 1】

( 2 6 B )

酢酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-アセトアミド-3,4-ジアセトキシ-6-[13-[(2S)-3-ベンジルオキシ-2-ヒドロキシ-プロポキシ]トリデコキシ]テトラヒドロピラン-2-イル]メチル (化合物 2 6 B) の合成

【化 1 0 7】



工程 ( 2 6 A ) で合成した化合物 2 6 A (3.8g, 9.9mmol) 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) (3.5g, 9.0mmol) とのジクロロメタン (60mL) 懸濁溶液に、トリフルオロメタンスルホン酸 (0.13mL, 1.5mmol) を加え、45 で17時間撹拌した。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、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水/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 2 6 B (3.7g、収率58%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) : 7.38-7.27 (5H, m), 5.39-5.30 (3H, m), 4.72 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz), 4.57 (2H, s), 4.20-4.09 (2H, m), 4.02-3.85 (4H, m), 3.58-3.40 (7H, m), 2.48 (1H, d,  $J = 4.2$  Hz), 2.14 (3H, s), 2.05 (3H, s), 2.01 (3H, s), 1.96 (3H, s), 1.63-1.51 (4H, m), 1.37-1.21 (18H, m).

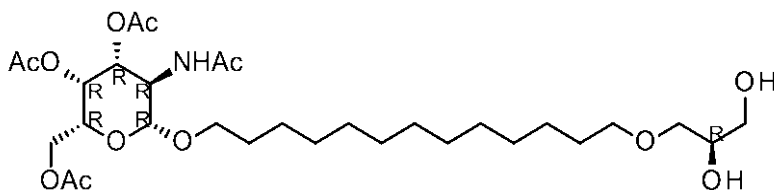
Calcd for  $\text{C}_{37}\text{H}_{59}\text{NO}_{12}$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  710, Found 710.

【 0 2 7 2】

( 2 6 C )

酢酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-アセトアミド-3,4-ジアセトキシ-6-[13-[(2R)-2,3-ジヒドロキシプロポキシ]トリデコキシ]テトラヒドロピラン-2-イル]メチル (化合物 2 6 C) の合成

## 【化 1 0 8】



工程 ( 2 6 B ) で合成した化合物 2 6 B ( 3.7g, 5.2mmol ) をエタノール ( 100mL ) に溶解した。10%パラジウム/炭素(wet) ( 2.0g ) 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 : 10, v/v ) で精製し、無色油状の目的物 2 6 C ( 1.4g、収率43% ) を得た。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) : 5.42-5.29 (3H, m), 4.57 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz), 4.21-4.09 (2H, m), 3.95-3.44 (11H, m), 2.60 (1H, d,  $J = 4.8$  Hz), 2.14 (3H, s), 2.05 (3H, s), 2.01 (3H, s), 1.96 (3H, s), 1.64-1.51 (4H, m), 1.37-1.22 (18H, m).

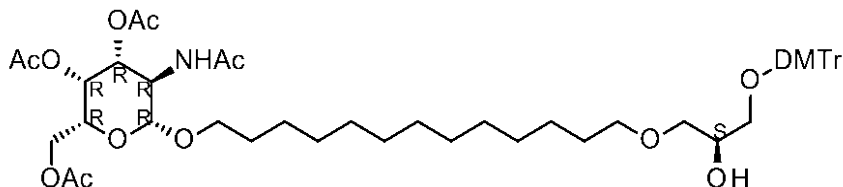
Calcd for  $\text{C}_{30}\text{H}_{53}\text{NO}_{12}$ :  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  642, Found 642.

## 【 0 2 7 3】

( 2 6 D )

酢酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-アセトアミド-3,4-ジアセトキシ-6-[13-[(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]トリデコキシ]テトラヒドロピラン-2-イル]メチル (化合物 2 6 D) の合成

## 【化 1 0 9】



工程 ( 2 6 C ) で合成した化合物 2 6 C ( 1.4g, 2.3mmol ) をピリジン ( 10mL ) に溶解した。4,4'-ジメトキシトリチルクロリド ( 0.84g, 2.5mmol ) を加え、室温で15時間攪拌した。反応終了後、溶媒を減圧留去した。トルエンを加え共沸した後に、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 = 50 : 50 20 : 80, 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 2 6 D ( 1.9g、収率91% ) を得た。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) : 7.45-7.41 (2H, m), 7.34-7.18 (7H, m), 6.85-6.80 (4H, m), 5.40-5.30 (3H, m), 4.72 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz), 4.20-4.09 (2H, m), 3.97-3.84 (4H, m), 3.79 (6H, s), 3.56-3.40 (5H, m), 3.22-3.13 (2H, m), 2.43 (1H, d,  $J = 4.8$  Hz), 2.14 (3H, s), 2.05 (3H, s), 2.01 (3H, s), 1.95 (3H, s), 1.63-1.50 (4H, m), 1.35-1.21 (18H, m).

Calcd for  $\text{C}_{51}\text{H}_{71}\text{NO}_{14}$ :  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  944, Found 944.

## 【 0 2 7 4】

( 2 6 E )

酢酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-アセトアミド-3,4-ジアセトキシ-6-[13-[(2S)-3-[ビス(4-メトキシフェニル)-フェニルメトキシ]-2-[2-シアノエチル-(ジイソプロピルアミノ)ホスファニル]オキシプロポキシ]トリデコキシ]テトラヒドロピラン-2-イル]メチル (化合物 2 6 E) の合成

10

20

( 实施例 1 0 1 )

X の部分を X<sup>6</sup> と置き換えて、実施例 91 と同様に合成を行った。X<sup>6</sup> の部分は参考例 6 で合成した化合物 26E を使い、3 回縮合した。

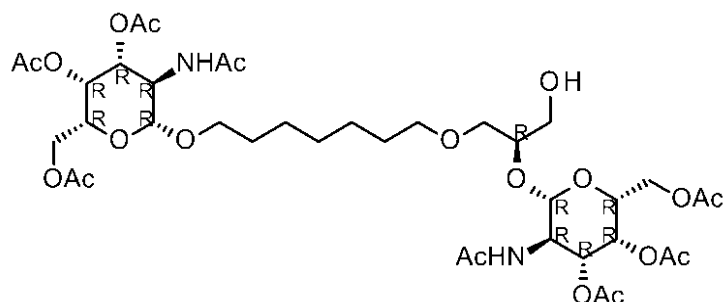
## 30

## ( 参考例 27 )

( 2 7 A )

酢酸〔(2R,3R,4R,5R,6R)-5-アセトアミド-6-[7-[(2R)-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-3-ヒドロキシ-プロポキシ]ヘプトキシ]-3,4-ジアセトキシテトラヒドロピラン-2-イル]メチル(化合物27A)の合成

## 40



50

に溶解した。10%パラジウム/炭素(wet) (2.0g) を加え、水素雰囲気下、室温で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。適量のトルエンを加えて共沸後、適量のピリジンを加えて共沸し目的物 27A の粗生成物 (1.3g) を得た。これ以上精製せずに次の反応に用いた。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) : 5.84 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz), 5.69 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz), 5.41-5.14 (4H, m), 4.85 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz), 4.70 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz), 4.22-3.40 (17H, m), 2.86-2.81 (1H, m), 2.20-1.93 (24H, m), 1.65-1.49 (4H, m), 1.39-1.23 (6H, m).

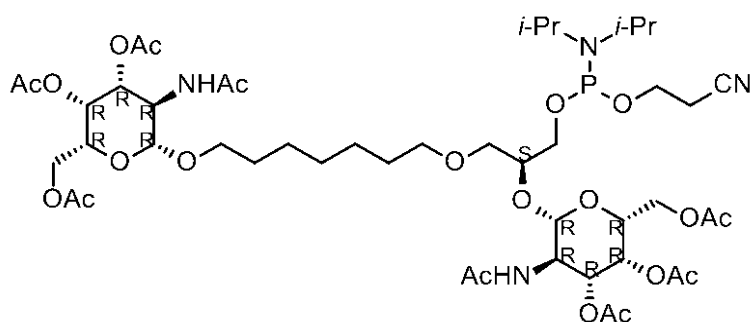
Calcd for  $\text{C}_{38}\text{H}_{60}\text{N}_2\text{O}_{20}$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  865, Found 865.

【0278】

(27B)

酢酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-アセトアミド-6-[7-[(2S)-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-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]オキシプロボキシ]ヘプトキシ]-3,4-ジアセトキシテトラヒドロピラン-2-イル]メチル(化合物 27B)の合成

【化112】



工程(27A)で合成した化合物 27A の粗生成物 (1.3g) をジクロロメタン (50mL) に溶解した。ジイソプロピルエチルアミン (1.0mL, 5.8mmol)、2-シアノエチルジイソプロピルクロロホスホアミジト (0.36mL, 1.6mmol) を加え、室温で1時間攪拌した。さらに、2-シアノエチルジイソプロピルクロロホスホアミジト (0.36mL, 1.6mmol) を加え、室温で1時間攪拌した。反応終了後、溶媒を減圧留去した。適量のトルエンを加え共沸した後に、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:アセトニトリル=100:0 90:10, v/v)で精製し、アモルファス状の目的物 27B (0.56g、収率 2steps 26%)を得た。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) : 6.04-5.69 (2H, m), 5.39-5.06 (4H, m), 4.86-4.69 (2H, m), 4.25-3.40 (21H, m), 2.80-2.67 (2H, m), 2.21-1.92 (24H, m), 1.66-1.48 (4H, m), 1.38-1.15 (18H, m).

【0279】

(実施例102)

$\text{HO-X}^7-\text{X}^4-\text{A}^{\text{m1s}}-\text{A}^{\text{e2s}}-\text{U}^{\text{m1s}}-\text{C}^{\text{m1s}}-\text{C}^{\text{e2s}}-\text{G}^{\text{m1s}}-\text{A}^{\text{m1s}}-\text{T}^{\text{e2s}}-\text{G}^{\text{m1s}}-\text{G}^{\text{m1s}}-\text{C}^{\text{e2s}}-\text{G}^{\text{m1s}}-\text{A}^{\text{m1s}}-\text{A}^{\text{e2s}}-\text{G}^{\text{m1t}}-\text{H}$  (配列番号40)

Xの部分<sup>40</sup>を $\text{X}^4$ と $\text{X}^7$ と置き換えて、実施例91と同様に合成を行った。 $\text{X}^4$ の部分は参考例15で合成した化合物 24Eを用い、1回縮合した。 $\text{X}^7$ の部分は参考例27で合成した化合物 27Bを用い、1回縮合した。

【0280】

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: 6517.17)。

【0281】

(参考例28)

10

20

30

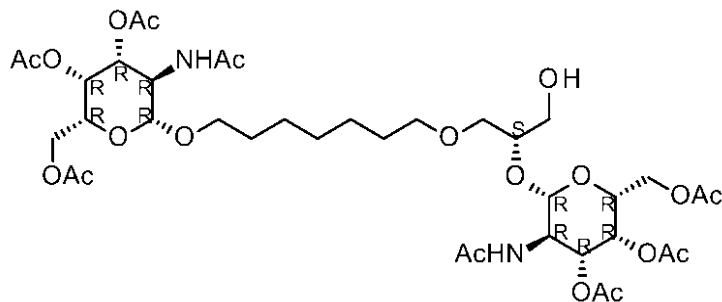
40

50

( 2 8 A )

酢酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-アセトアミド-6-[7-[(2S)-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-3-ヒドロキシ-プロボキシ]ヘプトキシ]-3,4-ジアセトキシテトラヒドロピラン-2-イル]メチル(化合物 2 8 A)の合成

【化 1 1 3】



10

工程( 2 5 B )で合成した化合物 2 5 B - 2 (1.9g, 2.0mmol)をエタノール(60mL)に溶解した。10%パラジウム/炭素(wet)(2.0g)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た。適量のトルエンを加えて共沸後、適量のピリジンを加えて共沸し目的物 2 8 A の粗生成物(1.8g)を得た。これ以上精製せずに次の反応に用いた。

20

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) : 5.93 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz), 5.71 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz), 5.42-5.22 (4H, m), 4.82-4.73 (2H, m), 4.23-3.35 (17H, m), 2.98-2.92 (1H, m), 2.21-1.92 (2H, m), 1.66-1.48 (4H, m), 1.42-1.23 (6H, m).

Calcd for  $\text{C}_{38}\text{H}_{60}\text{N}_2\text{O}_{20}$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  865, Found 865.

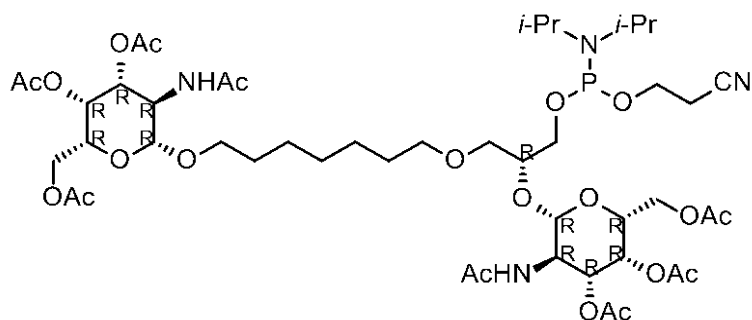
【 0 2 8 2 】

( 2 8 B )

酢酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-アセトアミド-6-[7-[(2R)-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-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]オキシプロボキシ]ヘプトキシ]-3,4-ジアセトキシテトラヒドロピラン-2-イル]メチル(化合物 2 8 B)の合成

30

【化 1 1 4】



40

工程( 2 8 A )で合成した化合物 2 8 A の粗生成物(1.8g)をジクロロメタン(50mL)に溶解した。ジイソプロピルエチルアミン(1.5mL, 8.4mmol)、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(0.51mL, 2.3mmol)を加え、室温で5.5時間攪拌した。さらに、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(0.51mL, 2.3mmol)を加え、室温で1時間攪拌した。反応終了後、溶媒を減圧留去した。適量のトルエンを加え共沸した後に、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:アセトニトリル=100:0 90:10, v/v)で精製し、アモルファス状の目的物 2 8 B (1.5g、収率 2steps 71%)を得た。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) : 5.91-5.67 (2H, m), 5.41-5.18 (4H, m), 4.91-4.72 (2H, m), 4.26-3.35 (21H, m), 2.79-2.63 (2H, m), 2.20-1.92 (24H, m), 1.67-1.50 (4H, m), 1.40-1

50

.13 (18H, m).

【 0 2 8 3 】

( 実施例 1 0 3 )

HO-X<sup>8</sup>-X<sup>5</sup>-A<sup>m1s</sup>-A<sup>e2s</sup>-U<sup>m1s</sup>-C<sup>m1s</sup>-C<sup>e2s</sup>-G<sup>m1s</sup>-A<sup>m1s</sup>-T<sup>e2s</sup>-G<sup>m1s</sup>-G<sup>m1s</sup>-C<sup>e2s</sup>-G<sup>m1s</sup>-A<sup>m1s</sup>-A<sup>e2s</sup>-G<sup>m1t</sup>-H ( 配列番号 4 0 )

X の部分を X<sup>5</sup> と X<sup>8</sup> と置き換えて、実施例 9 1 と同様に合成を行った。X<sup>5</sup> の部分は参考例 2 5 で合成した化合物 2 5 E を用い、1 回縮合した。X<sup>8</sup> の部分は参考例 2 8 で合成した化合物 2 8 B を用い、1 回縮合した。

【 0 2 8 4 】

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 : 6517.10 ) 。

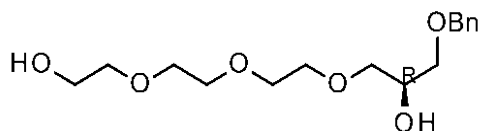
【 0 2 8 5 】

( 参考例 2 9 )

( 2 9 A )

(2R)-1-ベンジルオキシ-3-[2-[2-(2-ヒドロキシエトキシ)エトキシ]エトキシ]プロパン-2-オール ( 化合物 2 9 A ) の合成

【 化 1 1 5 】



トリエチレングリコール ( 6.9g, 46mmol )、ベンジル(S)-(+)-グリシジルエーテル ( 5.0g, 30mmol ) をジクロロメタン ( 75mL ) に溶解させ、三フッ化ホウ素 - ジエチルエーテル錯体 ( 0.77mL, 6.1mmol ) 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ジクロロメタンで抽出した。有機層を飽和食塩水/飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄した後、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。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、溶媒を減圧留去した。目的物をジクロロメタンに溶解させ、有機層を飽和食塩水、飽和食塩水/飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥、濾過し、溶媒を減圧留去して、油状の目的物 2 9 A ( 5.6g、収率 58% ) を得た。

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) : 7.37-7.25 (5H, m), 4.55 (2H, s), 4.05-3.97 (1H, m), 3.65-3.56 (16H, m).

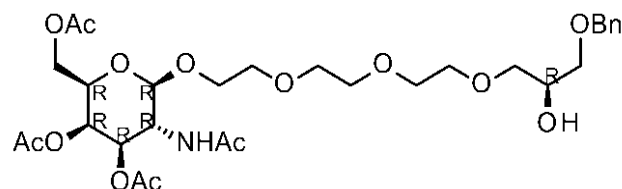
Calcd for C<sub>16</sub>H<sub>26</sub>O<sub>6</sub>: [M+H]<sup>+</sup> 315, Found 315.

【 0 2 8 6 】

( 2 9 B )

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]エトキシ]エトキシ]テトラヒドロピラン-2-イル]メチル ( 化合物 2 9 B ) の合成

【 化 1 1 6 】



10

20

30

40

50

工程(29A)で合成した化合物29A(5.6g, 18mmol)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)(6.3g, 16mmol)とのジクロロメタン(100mL)懸濁溶液に、トリフルオロメタンスルホン酸(0.24mL, 2.8mmol)を加え、45℃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ジクロロメタンで抽出した。有機層を飽和食塩水/飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄した後、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。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、溶媒を減圧留去した。目的物を酢酸エチルに溶解させ、有機層を飽和食塩水、飽和食塩水/飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で洗

10

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、アモルファス状の目的物29B(4.9g、収率47%)を得た。  
 $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) : 7.38-7.27 (5H, m), 6.69 (1H, d,  $J = 9.1$  Hz), 5.28 (1H, d,  $J = 3.0$  Hz), 5.02 (1H, dd,  $J = 11.2, 3.0$  Hz), 4.77 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz), 4.56 (2H, s), 4.29-3.47 (21H, m), 2.15 (3H, s), 2.04 (3H, s), 1.97 (3H, s), 1.96 (3H, s).  
 Calcd for  $\text{C}_{30}\text{H}_{45}\text{NO}_{14}$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  644, Found 644.

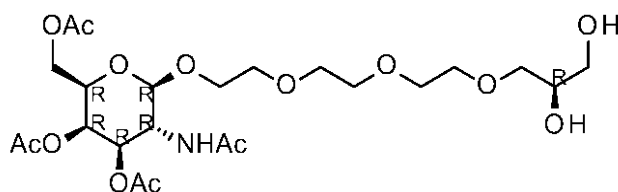
【0287】

(29C)

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]エトキシ]エトキシ]テトラヒドロピラン-2-イル]メチル(化合物29C)の合成

20

【化117】



工程(29B)で合成した化合物29B(4.9g, 7.6mmol)をエタノール(100mL)に溶解した。10%パラジウム/炭素(wet)(4.0g)を加え、水素雰囲気下、室温で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。適量のトルエンを加えて共沸し、油状の目的物29C(4.0g、収率95%)を得た。

30

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) : 6.83-6.76 (1H, m), 5.32 (1H, d,  $J = 3.0$  Hz), 5.11 (1H, dd,  $J = 11.2, 3.0$  Hz), 4.79 (1H, d,  $J = 9.1$  Hz), 4.27-4.08 (3H, m), 3.97-3.53 (18H, m), 2.16 (3H, s), 2.06 (3H, s), 2.00 (3H, s), 1.97 (3H, s).

Calcd for  $\text{C}_{23}\text{H}_{39}\text{NO}_{14}$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  554, Found 554.

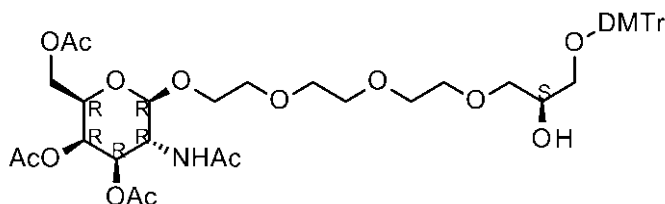
【0288】

(29D)

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]エトキシ]エトキシ]テトラヒドロピラン-2-イル]メチル(化合物29D)の合成

40

【化118】



工程(29C)で合成した化合物29C(4.0g, 7.2mmol)に適量のピリジンを加え、減圧下、共沸した。ピリジン(30mL)に溶解させ、4,4'-ジメトキシトリチルクロリド(2

50



<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) : 7.44-7.40 (2H, m), 7.33-7.18 (7H, m), 6.85-6.80 (4H, m), 6.59 (1H, d, J = 9.7 Hz), 5.29 (1H, d, J = 3.0 Hz), 5.00 (1H, dd, J = 11.2, 3.0 Hz), 4.77 (1H, d, J = 8.5 Hz), 4.27-4.07 (3H, m), 4.00-3.82 (4H, m), 3.79 (6H, s), 3.71-3.49 (12H, m), 3.20-3.10 (2H, m), 2.14 (3H, s), 2.01 (3H, s), 1.93 (6H, s). Calcd for C<sub>44</sub>H<sub>57</sub>NO<sub>16</sub>: [M+Na]<sup>+</sup> 878, Found 878.

10

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]エトキシ]エトキシ]テトラヒドロピラン-2-イル]メチル(化合物29E)の合成

[illegible]

20

工程(29D)で合成した化合物29D(3.5g, 4.1mmol)を適量のピリジンで共沸した後に、ジクロロメタン(40mL)に溶解した。N,N-ジイソプロピルエチルアミン(2.8mL, 16mmol)、2-シアノエチルジイソプロピルクロロホスホアミジト(1.1mL, 4.9mmol)を加え、室温で3時間撹拌した。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に、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=50：50 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29E(2.2g、収率51%)を得た。

30

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) : 7.47-7.40 (2H, m), 7.35-7.16 (7H, m), 6.85-6.77 (4H, m), 6.40 (1H, d, J = 9.1 Hz), 5.33-5.28 (1H, m), 5.03-4.93 (1H, m), 4.81-4.74 (1H, m), 4.28-4.08 (3H, m), 3.96-3.46 (26H, m), 3.27-3.04 (2H, m), 2.69-2.41 (2H, m), 2.15 (3H, s), 2.04 (3H, s), 1.97-1.90 (6H, m), 1.30-0.98 (12H, m).

( 实施例 1 0 4 )

$$\text{HO}-\text{X}^9-\text{X}^9-\text{X}^9-\text{A}^{\text{m1s}}-\text{A}^{\text{e2s}}-\text{U}^{\text{m1s}}-\text{C}^{\text{m1s}}-\text{C}^{\text{e2s}}-\text{G}^{\text{m1s}}-\text{A}^{\text{m1s}}-\text{T}^{\text{e2s}}-\text{G}^{\text{m1s}}-\text{G}^{\text{m1s}}-\text{C}^{\text{e2s}}-\text{G}^{\text{m1s}}-\text{A}^{\text{m1s}}-\text{A}^{\text{e2s}}-\text{G}^{\text{m1t}}-\text{H} \quad (\text{配列番号 } 40)$$

Xの部分をX<sup>9</sup>と置き換えて、実施例91と同様に合成を行った。X<sup>9</sup>の部分は参考例29で合成した化合物29Eを用い、3回縮合した。

40

【 0 2 9 1 】

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: 6839.16)。

【 0 2 9 2 】

( 参考例 3 0 )

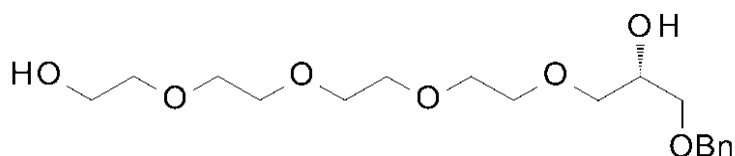
( 3 0 A )

(2R)-1-ベンジルオキシ-3-[2-[2-[2-(2-ヒドロキシエトキシ)エトキシ]エトキシ]エトキ

50

シ]プロパン-2-オール(化合物30Aの合成)

【化120】



テトラエチレングリコール(8.87g, 45.7mmol)、ベンジル(S)-(+)-グリシジルエーテル(4.66mL, 30.5mmol)をジクロロメタン(75mL)に溶解させ、三フッ化ホウ素-ジエチルエーテル錯体(0.76mL, 6.1mmol)を加え、室温で終夜攪拌した。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。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、溶媒を減圧留去した。目的物をジクロロメタンに溶解させ、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、油状の目的物30A(5.3g、収率49%)を得た。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) : 7.37-7.23 (5H, m), 4.56 (2H, s), 4.01 (1H, br), 3.75-3.41 (20H, m).

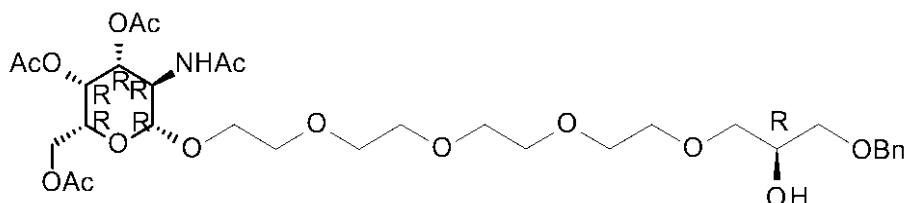
Calcd for  $\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{O}_7$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  359, Found 359.

【0293】

(30B)

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-[2-[(2R)-3-ベンジルオキシ-2-ヒドロキシ-プロボキシ]エトキシ]エトキシ]エトキシ]エトキシ]テトラヒドロピラン-2-イル]メチル(化合物30Bの合成)

【化121】



工程30Aで合成した化合物(5.3g, 15mmol)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)(5.2g, 13mmol)とのジクロロメタン(100mL)懸濁溶液に、トリフルオロメタンスルホン酸(0.2mL, 2.3mmol)を加え、45℃で22時間攪拌した。反応終了後、溶媒を減圧留去して濃縮し、酢酸エチルを加えた。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。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、溶媒を減圧留去した。目的物をジクロロメタンに溶解させ、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、アモルファス状の目的物30B(4.5g、収率49%)を得た。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) : 7.38-7.24 (5H, m), 6.72 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz), 5.29 (1H, d,  $J = 3.0$  Hz), 5.00 (1H, dd,  $J = 11.2, 3.3$  Hz), 4.76 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz), 4.56 (2H, s), 4.31-4.21 (1H, m), 4.18-3.46 (24H, m), 2.15 (3H, s), 2.04 (3H, s), 1.97 (6H, s).

Calcd for  $\text{C}_{32}\text{H}_{49}\text{NO}_{15}$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  688, Found 688.

【0294】

(30C)

10

20

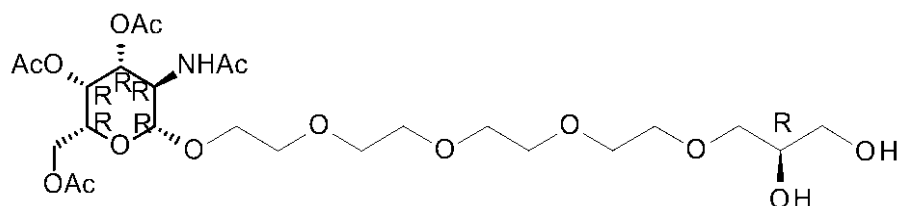
30

40

50

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-[2-[(2R)-2,3-ジヒドロキシプロポキシ]エトキシ]エトキシ]エトキシ]エトキシ]テトラヒドロピラン-2-イル]メチル(30Cの合成)

【化122】



10

工程(30B)で合成した化合物30B(4.5g, 6.5mmol)をエタノール(80mL)に溶解した。10%パラジウム/炭素(wet)(4g)を加え、水素雰囲気下、室温で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て目的物30C(3.9g、収率quant.)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。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) : 6.85 (1H, d,  $J = 9.7$  Hz), 5.32 (1H, d,  $J = 3.0$  Hz), 5.10 (1H, dd,  $J = 11.2, 3.0$  Hz), 4.74 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz), 4.32-4.09 (2H, m), 3.99-3.56 (23H, m), 2.16 (3H, s), 2.05 (3H, s), 2.00 (3H, s), 1.99 (3H, s).

Calcd for  $\text{C}_{25}\text{H}_{43}\text{NO}_{15}$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  598, Found 598.

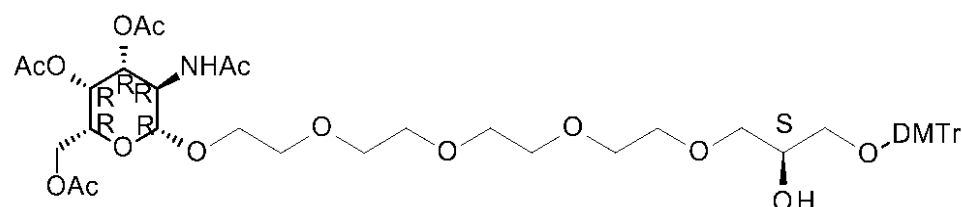
【0295】

(30D)

20

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-[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]エトキシ]エトキシ]エトキシ]テトラヒドロピラン-2-イル]メチル(化合物30Dの合成)

【化123】



30

工程(30C)で合成した化合物30C(3.9g, 6.5mmol)に適量のピリジンを加え、減圧下、共沸した。ピリジン(22mL)に溶解させ、4,4'-Dimethoxytrityl Chloride(2.4g, 7.2mmol)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%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30D(3.12g、収率53%)を得た。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) : 7.44-7.40 (2H, m), 7.33-7.18 (7H, m), 6.85-6.79 (4H, m), 6.63 (1H, d,  $J = 9.1$  Hz), 5.29 (1H, d,  $J = 3.0$  Hz), 4.96 (1H, dd,  $J = 11.2, 3.3$  Hz), 4.75 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz), 4.29-4.21 (1H, m), 4.17-4.07 (2H, m), 4.00-3.81 (4H, m), 3.79 (6H, s), 3.71-3.58 (14H, m), 3.53-3.43 (2H, m), 3.21-3.10 (2H, m), 2.14 (3H, s), 2.02 (3H, s), 1.95 (6H, s).

40

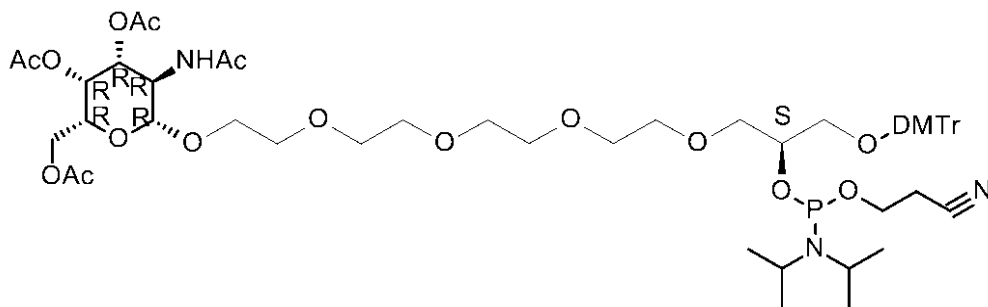
Calcd for  $\text{C}_{46}\text{H}_{61}\text{NO}_{17}$ :  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  922, Found 922.

【0296】

(30E)

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-[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]エトキシ]エトキシ]エトキシ]テトラヒドロピラン-2-イル]メチル(化合物30Eの合成)

## 【化 1 2 4】



10

工程(30D)で合成した化合物30D(3.12g, 3.47mmol)に適量のピリジンを加え、減圧下共沸した後にジクロロメタン(35mL)に溶解させた。N,N-ジイソプロピルエチルアミン(2.42mL, 13.9mmol)、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(0.93mL, 4.16mmol)を加え、室温で1時間攪拌した。反応終了後、溶媒を減圧留去した。適量のトルエンを加え、減圧下共沸した後に、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、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30E(2.98g、収率78%)を得た。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) : 7.46-7.40 (2H, m), 7.35-7.17 (7H, m), 6.84-6.78 (4H, m), 6.43 (1H, d,  $J = 9.1$  Hz), 5.31 (1H, br), 5.00-4.93 (1H, m), 4.78 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz), 4.29-4.08 (3H, m), 3.91-3.48 (30H, m), 3.27-3.04 (2H, m), 2.67-2.62 (1H, m), 2.46-2.41 (1H, m), 2.15 (3H, s), 2.04 (3H, s), 1.97-1.94 (6H, m), 1.30-0.99 (12H, m).

20

## 【0297】

(実施例105)

$\text{HO-X}^{10}-\text{X}^{10}-\text{X}^{10}-\text{A}^{\text{m1s}}-\text{A}^{\text{e2s}}-\text{U}^{\text{m1s}}-\text{C}^{\text{m1s}}-\text{C}^{\text{e2s}}-\text{G}^{\text{m1s}}-\text{A}^{\text{m1s}}-\text{T}^{\text{e2s}}-\text{G}^{\text{m1s}}-\text{G}^{\text{m1s}}-\text{C}^{\text{e2s}}-\text{G}^{\text{m1s}}-\text{A}^{\text{m1s}}-\text{A}^{\text{e2s}}-\text{G}^{\text{m1t}}-\text{H}$  (配列番号40)

Xの部分 $\text{X}^{10}$ と置き換えて、実施例91と同様に合成を行った。 $\text{X}^{10}$ の部分は参考例30で合成した化合物30Eを用い、3回縮合した。

## 【0298】

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：6971.21)。

30

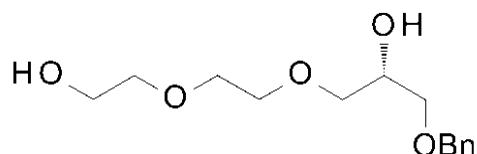
## 【0299】

(参考例31)

(31A)

(2R)-1-ベンジルオキシ-3-[2-(2-ヒドロキシエトキシ)エトキシ]プロパン-2-オール(化合物31Aの合成)

## 【化 1 2 5】



40

ジエチレングリコール(5.0g, 30.5mmol)、ベンジル(S)-(+)-グリシジルエーテル(6.5, 60.9mmol)をジクロロメタン(75mL)に溶解させ、三フッ化ホウ素-ジエチルエーテル錯体(0.76mL, 6.1mmol)を加え、室温で2時間攪拌した。反応終了後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えた。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。0.1%トリフルオ

50

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、溶媒を減圧留去した。目的物をジクロロメタンに溶解させ、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、油状の目的物 3 1 A (5.3g、収率64%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) : 7.38-7.27 (5H, m), 4.56 (2H, s), 4.05-3.97 (1H, m), 3.77-3.48 (12H, m), 2.85-2.82 (1H, m), 2.47-2.42 (1H, m).

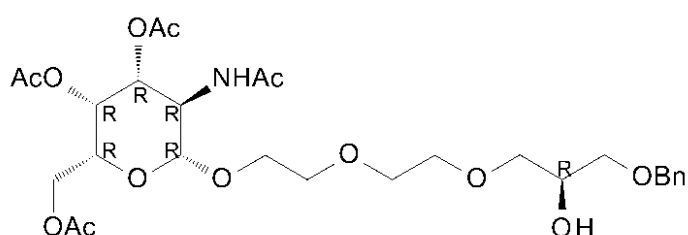
Calcd for  $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}_5$ :  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  293, Found 293.

【 0 3 0 0 】

( 3 1 B )

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-[(2R)-3-ベンジルオキシ-2-ヒドロキシ-プロポキシ]エトキシ]エトキシ]テトラヒドロピラン-2-イル]メチル (化合物 3 1 B の合成)

【化 1 2 6】



工程 3 1 A で合成した化合物(4.0g, 15mmol)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)(5.2g, 13mmol)とのジクロロメタン(100mL)懸濁溶液に、トリフルオロメタンスルホン酸(0.2mL, 2.3mmol)を加え、45 で22時間攪拌した。反応終了後、溶媒を減圧留去して濃縮し、酢酸エチルを加えた。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。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、溶媒を減圧留去した。目的物をジクロロメタンに溶解させ、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、アモルファス状の目的物 3 1 B (4.15g、収率52%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) : 7.37-7.28 (5H, m), 6.71 (1H, d,  $J = 9.7$  Hz), 5.30 (1H, d,  $J = 3.0$  Hz), 5.12 (1H, dd,  $J = 11.2, 3.3$  Hz), 4.77 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz), 4.57 (2H, s), 4.27-4.05 (1H, m), 3.93-3.45 (16H, m), 2.15 (3H, s), 2.05 (3H, s), 1.98 (3H, s), 1.95 (3H, s).

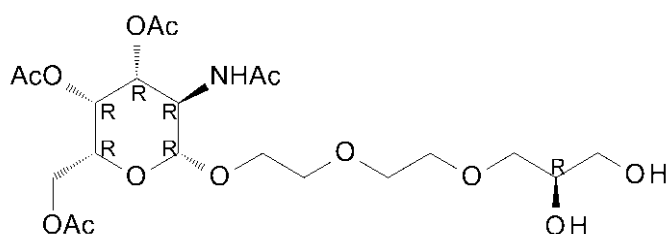
Calcd for  $\text{C}_{28}\text{H}_{41}\text{NO}_{13}$ :  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  622, Found 622.

【 0 3 0 1 】

( 3 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-[(2R)-2,3-ジヒドロキシプロポキシ]エトキシ]エトキシ]テトラヒドロピラン-2-イル]メチル (化合物 3 1 C の合成)

【化 1 2 7】



10

20

30

40

50

工程 ( 3 1 B ) で合成した化合物 3 1 B ( 4.15g, 6.9mmol ) をエタノール ( 80mL ) に溶解した。10%パラジウム/炭素(wet) ( 4g ) を加え、水素雰囲気下、室温で 8 時間激しく攪拌した。さらに10%パラジウム/炭素(wet) ( 1g ) を加え、水素雰囲気下、50 で 4 時間激しく攪拌した。さらに、10%パラジウム/炭素(wet) ( 1g ) を加え、水素雰囲気下、50 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て目的物 3 1 C ( 3.0g、収率86% ) 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。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) : 6.58 (1H, d,  $J = 9.1$  Hz), 5.32-5.30 (1H, m), 5.16 (1H, dd,  $J = 11.2, 3.3$  Hz), 4.78 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz), 4.26-4.09 (2H, m), 3.95-3.58 (15H, m), 2.16 (3H, s), 2.06 (3H, s), 2.01 (3H, s), 1.98 (3H, s).

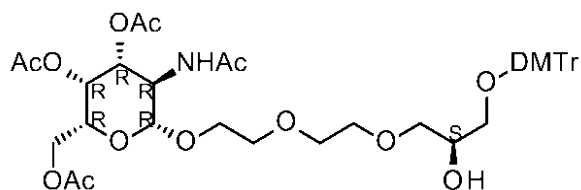
Calcd for  $\text{C}_{21}\text{H}_{35}\text{NO}_{13}$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  510, Found 510.

【 0 3 0 2 】

( 3 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-[(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]エトキシ]テトラヒドロピラン-2-イル]メチル ( 化合物 3 1 D ) の合成

【 化 1 2 8 】



工程 ( 3 1 C ) で合成した化合物 3 1 C ( 3.0g, 5.9mmol ) に適量のピリジンを加え、減圧下、共沸した。ピリジン ( 25mL ) に溶解させ、4,4'-ジメトキシトリチルクロリド ( 2.2 g, 6.5 mmol ) 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% 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 3 1 D ( 1.7g、収率36% ) を得た。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) : 7.47-7.42 (2H, m), 7.35-7.18 (7H, m), 6.86-6.80 (4H, m), 6.73 (1H, d,  $J = 9.7$  Hz), 5.31 (1H, d,  $J = 3.0$  Hz), 5.14 (1H, dd,  $J = 11.2, 3.0$  Hz), 4.76 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz), 4.28-4.09 (3H, m), 4.07-3.83 (4H, m), 3.79 (6H, s), 3.72-3.49 (8H, m), 3.26 (1H, d,  $J = 3.6$  Hz), 3.18-3.13 (2H, m), 2.14 (3H, s), 2.04 (3H, s), 1.94 (3H, s), 1.90 (3H, s).

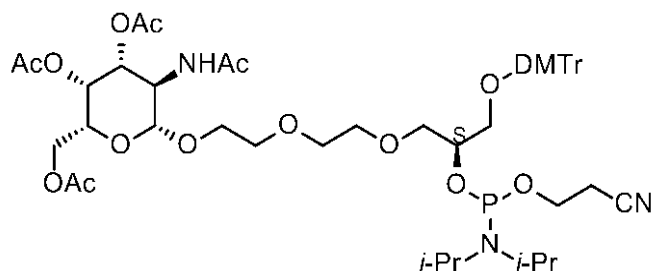
Calcd for  $\text{C}_{42}\text{H}_{53}\text{NO}_{15}$ :  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  834, Found 834.

【 0 3 0 3 】

( 3 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-[(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]エトキシ]テトラヒドロピラン-2-イル]メチル ( 化合物 3 1 E ) の合成

【 化 1 2 9 】



工程 ( 3 1 D ) で合成した化合物 3 1 D ( 1.7g, 2.1mmol ) を適量のピリジンで共沸し

た後に、ジクロロメタン (20mL) に溶解した。N,N-ジイソプロピルエチルアミン (1.5mL, 8.4mmol)、2-シアノエチルジイソプロピルクロロホスホアミジト (0.56mL, 2.5mmol) を加え、室温で3時間撹拌した。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に、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 = 50:50 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 3 1 E (1.5g、収率71%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) : 7.47-7.40 (2H, m), 7.37-7.17 (7H, m), 6.86-6.77 (4H, m), 6.08-5.95 (1H, m), 5.34-5.29 (1H, m), 5.16-5.06 (1H, m), 4.76-4.69 (1H, m), 4.20-4.02 (3H, m), 3.95-3.47 (22H, m), 3.31-3.08 (2H, m), 2.69-2.40 (2H, m), 2.14 (3H, s), 2.04-2.02 (3H, m), 1.97-1.94 (3H, m), 1.91-1.88 (3H, m), 1.21-1.01 (12H, m).

【0304】

(実施例 106)

$\text{HO-X}^{11}-\text{X}^{11}-\text{X}^{11}-\text{A}^{\text{m1s}}-\text{A}^{\text{e2s}}-\text{U}^{\text{m1s}}-\text{C}^{\text{m1s}}-\text{C}^{\text{e2s}}-\text{G}^{\text{m1s}}-\text{A}^{\text{m1s}}-\text{T}^{\text{e2s}}-\text{G}^{\text{m1s}}-\text{G}^{\text{m1s}}-\text{C}^{\text{e2s}}-\text{G}^{\text{m1s}}-\text{A}^{\text{m1s}}-\text{A}^{\text{e2s}}-\text{G}^{\text{m1t}}-\text{H}$  (配列番号 40)

X の部分を  $\text{X}^{11}$  と置き換えて、実施例 91 と同様に合成を行った。 $\text{X}^{11}$  の部分は参考例 31 で合成した化合物 3 1 E を用い、3 回縮合した。

【0305】

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: 6708.09)。

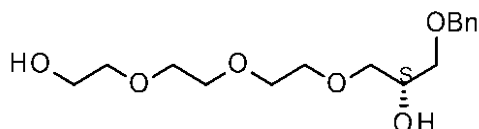
【0306】

(参考例 32)

(32A)

(2S)-1-ベンジルオキシ-3-[2-[2-(2-ヒドロキシエトキシ)エトキシ]エトキシ]プロパン-2-オール (化合物 3 2 A) の合成

【化130】



トリエチレングリコール (9.2g, 61mmol)、ベンジル(R)-(-)-グリシジルエーテル (5.0g, 30mmol) をジクロロメタン (75mL) に溶解させ、三フッ化ホウ素 - ジエチルエーテル錯体 (0.77mL, 6.1mmol) を加え、室温で4時間撹拌した。反応終了後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えジクロロメタンで抽出した。有機層を飽和食塩水/飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄した後、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。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、溶媒を減圧留去した。目的物をジクロロメタンに溶解させ、有機層を飽和食塩水、飽和食塩水/飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥、濾過し、溶媒を減圧留去して、油状の目的物 3 2 A (6.4g、収率67%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) : 7.38-7.25 (5H, m), 4.56 (2H, s), 4.19-3.45 (17H, m).

Calcd for  $\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{O}_6$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  315, Found 315.

【0307】

(32B)

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-ベンジルオキシ-2-ヒドロキシ-プロボキシ]エトキシ]エトキシ]エトキシ]テトラヒドロピラン-2-イル]メチル (化合物 3 2 B) の合成

10

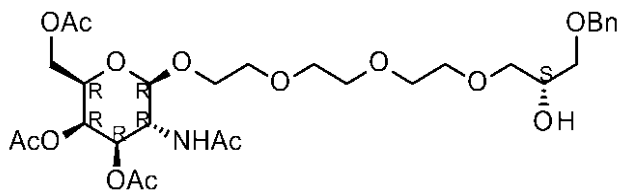
20

30

40

50

## 【化 1 3 1】



工程 (3 2 A) で合成した化合物 3 2 A (6.4g, 20mmol) 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) (7.2g, 18mmol) 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 (0.28mL, 3.1mmol) を加え、45 で20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ジクロロメタンで抽出した。有機層を飽和食塩水/飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄した後、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。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、溶媒を減圧留去した。目的物を酢酸エチルに溶解させ、有機層を飽和食塩水、飽和食塩水/飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥、濾過し、溶媒を減圧留去して、アモルファス状の目的物 3 2 B (5.6 g、収率47%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) : 7.39-7.25 (5H, m), 6.68 (1H, d,  $J = 9.1$  Hz), 5.33-5.27 (1H, m), 5.07-4.95 (1H, m), 4.78 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz), 4.55 (2H, s), 4.25-3.24 (21H, m), 2.15 (3H, s), 2.04 (3H, s), 1.97 (3H, s), 1.96 (3H, s).

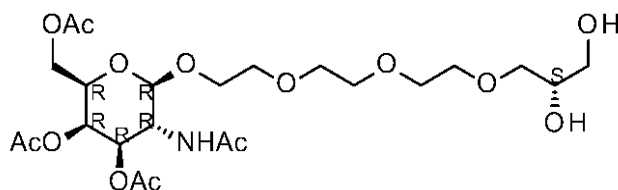
Calcd for  $\text{C}_{30}\text{H}_{45}\text{NO}_{14}$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  644, Found 644.

## 【0 3 0 8】

## (3 2 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-[(2S)-2,3-ジヒドロキシプロポキシ]エトキシ]エトキシ]エトキシ]テトラヒドロピラン-2-イル]メチル (化合物 3 2 C) の合成

## 【化 1 3 2】



工程 (3 2 B) で合成した化合物 3 2 B (5.6g, 8.7mmol) をエタノール (100mL) に溶解した。20% 水酸化パラジウム/炭素(wet) (1.5g) を加え、水素雰囲気下、50 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。適量のトルエンを加えて共沸し、油状の目的物 3 2 C (4.1g、収率85%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) : 6.80 (1H, d,  $J = 9.1$  Hz), 5.34-5.30 (1H, m), 5.15-5.03 (1H, m), 4.81 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz), 4.33-4.08 (3H, m), 3.99-3.48 (18H, m), 2.16 (3H, s), 2.06 (3H, s), 2.00 (3H, s), 1.98 (3H, s).

Calcd for  $\text{C}_{23}\text{H}_{39}\text{NO}_{14}$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  554, Found 554.

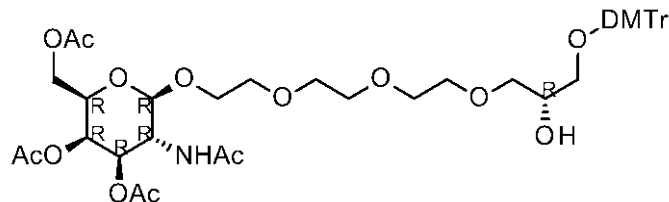
## 【0 3 0 9】

## (3 2 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)-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]エトキシ]エトキシ]テトラヒドロピラン-2-イル]メチル (化合物 3 2 D) の合成



## 【化 1 3 3】



工程 ( 3 2 C ) で合成した化合物 3 2 C ( 4.1g, 7.4mmol ) に適量のピリジンを加え、減圧下、共沸した。ピリジン ( 30mL ) に溶解させ、4,4'-ジメトキシトリチルクロリド ( 2.8g, 8.2mmol ) を加え、室温で3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% 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 3 2 D ( 1.9g、収率 30% ) を得た。

$^1\text{H-NMR}$  (  $\text{CDCl}_3$  ) : 7.44-7.40 ( 2H, m ), 7.35-7.18 ( 7H, m ), 6.86-6.79 ( 4H, m ), 6.67 ( 1H, d,  $J = 9.1$  Hz ), 5.29 ( 1H, d,  $J = 3.0$  Hz ), 5.03 ( 1H, dd,  $J = 11.2, 3.0$  Hz ), 4.77 ( 1H, d,  $J = 9.1$  Hz ), 4.26-4.06 ( 3H, m ), 4.00-3.81 ( 4H, m ), 3.79 ( 6H, s ), 3.75-3.50 ( 12H, m ), 3.23-3.11 ( 2H, m ), 2.15 ( 3H, s ), 2.01 ( 3H, s ), 1.94 ( 6H, s ).

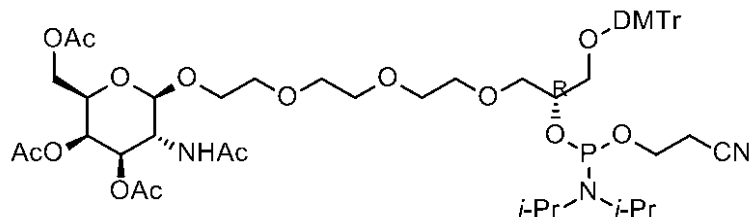
Calcd for  $\text{C}_{44}\text{H}_{57}\text{NO}_{16}$ :  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  878, Found 878.

## 【 0 3 1 0 】

( 3 2 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 - [ ( 2R ) - 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 ] エトキシ ] テトラヒドロピラン - 2 - イル ] メチル ( 化合物 3 2 E ) の合成

## 【化 1 3 4】



工程 ( 3 2 D ) で合成した化合物 3 2 D ( 1.9g, 2.2mmol ) を適量のトルエンで共沸した後、ジクロロメタン ( 22mL ) に溶解した。N,N-ジイソプロピルエチルアミン ( 1.6mL, 9.0mmol )、2-シアノエチルジイソプロピルクロロホスホアミジト ( 0.59mL, 2.7mmol ) 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 ( ヘキサン : 酢酸エチル = 50 : 50 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 3 2 E ( 1.5 g、収率 64% ) を得た。

$^1\text{H-NMR}$  (  $\text{CDCl}_3$  ) : 7.47-7.40 ( 2H, m ), 7.36-7.16 ( 7H, m ), 6.85-6.78 ( 4H, m ), 6.45 - 6.38 ( 1H, m ), 5.33-5.28 ( 1H, m ), 5.03-4.94 ( 1H, m ), 4.80-4.75 ( 1H, m ), 4.27-4.08 ( 3H, m ), 3.93-3.45 ( 26H, m ), 3.28-3.04 ( 2H, m ), 2.69-2.40 ( 2H, m ), 2.15 ( 3H, s ), 2.04 ( 3H, s ), 1.97-1.92 ( 6H, m ), 1.21-1.01 ( 12H, m ).

## 【 0 3 1 1 】

( 実施例 1 0 7 )

$\text{HO-X}^1\text{X}^2\text{-X}^1\text{X}^2\text{-X}^1\text{X}^2\text{-A}^{\text{m1s}}\text{-A}^{\text{e2s}}\text{-U}^{\text{m1s}}\text{-C}^{\text{m1s}}\text{-C}^{\text{e2s}}\text{-G}^{\text{m1s}}\text{-A}^{\text{m1s}}\text{-T}^{\text{e2s}}\text{-G}^{\text{m1s}}\text{-G}^{\text{m1s}}\text{-C}^{\text{e2s}}\text{-G}^{\text{m1s}}\text{-A}^{\text{m1s}}\text{-A}^{\text{e2s}}\text{-G}^{\text{m1t}}\text{-H}$  ( 配列番号 4 0 )

X の部分を  $\text{X}^1\text{X}^2$  と置き換えて、実施例 9 1 と同様に合成を行った。 $\text{X}^1\text{X}^2$  の部分は参考例 3 2 で合成した化合物 3 2 E を用い、3 回縮合した。

## 【 0 3 1 2 】

10

20

30

40

50

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: 6839.16)。

【0313】

(実施例108)

HO-X<sup>9</sup>-X<sup>9</sup>-X<sup>9</sup>-X<sup>9</sup>-X<sup>9</sup>-A<sup>m1s</sup>-A<sup>e2s</sup>-U<sup>m1s</sup>-C<sup>m1s</sup>-C<sup>e2s</sup>-G<sup>m1s</sup>-A<sup>m1s</sup>-T<sup>e2s</sup>-G<sup>m1s</sup>-G<sup>m1s</sup>-C<sup>e2s</sup>-G<sup>m1s</sup>-A<sup>m1s</sup>-A<sup>e2s</sup>-G<sup>m1t</sup>-H (配列番号40)

Xの部分をX<sup>9</sup>と置き換えて、実施例91と同様に合成を行った。X<sup>9</sup>の部分は参考例29で合成した化合物29Eを用い、5回縮合した。

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: 7817.33)。

【0314】

(実施例109)

HO-X<sup>9</sup>-X<sup>9</sup>-X<sup>9</sup>-X<sup>9</sup>-X<sup>9</sup>-X<sup>9</sup>-X<sup>9</sup>-A<sup>m1s</sup>-A<sup>e2s</sup>-U<sup>m1s</sup>-C<sup>m1s</sup>-C<sup>e2s</sup>-G<sup>m1s</sup>-A<sup>m1s</sup>-T<sup>e2s</sup>-G<sup>m1s</sup>-G<sup>m1s</sup>-C<sup>e2s</sup>-G<sup>m1s</sup>-A<sup>m1s</sup>-A<sup>e2s</sup>-G<sup>m1t</sup>-H (配列番号40)

Xの部分をX<sup>9</sup>と置き換えて、実施例91と同様に合成を行った。X<sup>9</sup>の部分は参考例29で合成した化合物29Eを用い、7回縮合した。

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: 8796.73)。

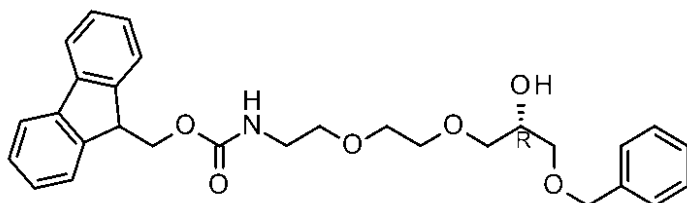
【0315】

(参考例33)

(33A)

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33A)の合成

【化135】



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33A(0.74g、収率30%)を得た。

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) : 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).

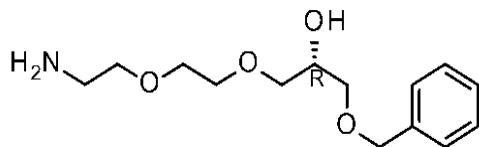
Calcd for  $C_{29}H_{33}NO_6$ :  $[M+H]^+$  492, Found 492.

【 0 3 1 6 】

( 3 3 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 3 3 B) の合成

【 化 1 3 6 】



10

工程 ( 3 3 A ) で合成した化合物 3 3 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、1 N 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、1 N 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 3 3 B (7.1g、収率 66%) を得た。

20

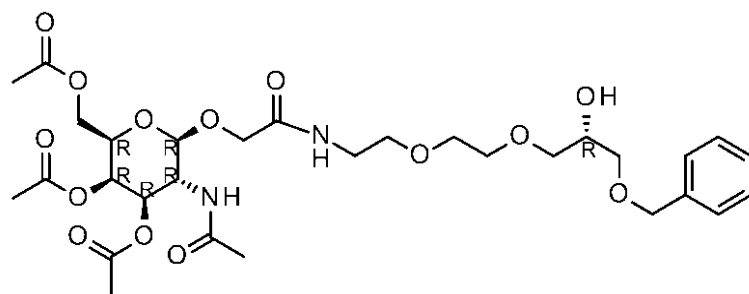
$^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ ) : 7.38-7.27 (5H, m), 4.55 (2H, s), 4.07-3.99 (1H, m), 3.77-3.48 (10H, m), 2.96-2.88 (2H, m).

【 0 3 1 7 】

( 3 3 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-エトキシ]テトラヒドロピラン-2-イル]メチル (化合物 3 3 C) の合成

【 化 1 3 7 】



30

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 (W02012037254) (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 ( 3 3 B ) で合成した化合物 3 3 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 3 3 C (7.9g、収率 81%) を得た。

40

$^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ ) : 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).

50

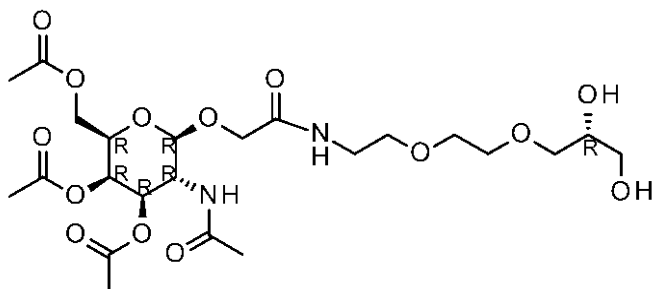
Calcd for  $C_{30}H_{44}N_2O_{14}$ :  $[M+H]^+$  657, Found 657.

【 0 3 1 8 】

( 3 3 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 3 3 D) の合成

【 化 1 3 8 】



10

工程 ( 3 3 C ) で合成した化合物 3 3 C ( 7.9g, 12mmol ) をエタノール ( 80mL ) 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 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 3 3 D ( 6.7g、収率98% ) を得た。

$^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ ) : 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).

20

Calcd for  $C_{23}H_{38}N_2O_{14}$ :  $[M+H]^+$  568, Found 568.

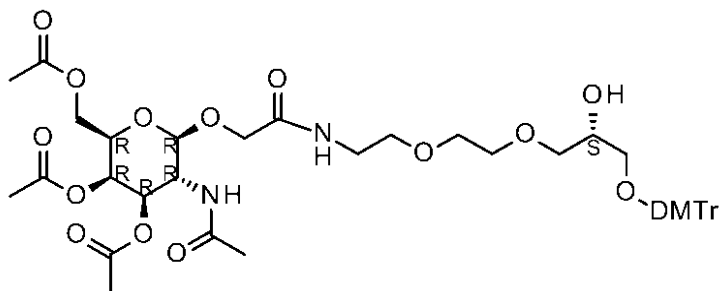
【 0 3 1 9 】

( 3 3 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-オキソ-エトキシ]テトラヒドロピラン-2-イル]メチル (化合物 3 3 E) の合成

【 化 1 3 9 】

30



工程 ( 3 3 D ) で合成した化合物 3 3 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 ( 4.5 g, 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%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 3 3 E ( 6.9g、収率66% ) を得た。

40

$^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ ) : 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).

50

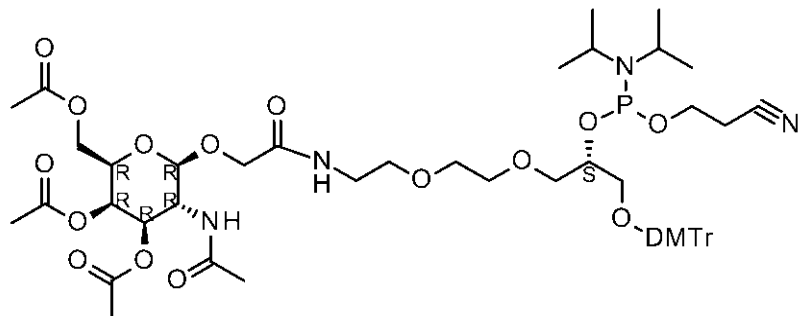
Calcd for  $C_{44}H_{56}N_2O_{16}$ :  $[M+Na]^+$  893, Found 892.

【 0 3 2 0 】

( 3 3 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-プロボキシ]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 3 3 F)の合成

【化 1 4 0】



10

工程(3 3 E)で合成した化合物 3 3 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時間撹拌した。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 3 3 F (6.6g、収率78%)を得た。

20

$^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ ) : 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).

【 0 3 2 1 】

( 実施例 1 1 0 )

30

HO-X<sup>1 3</sup>-X<sup>1 3</sup>-X<sup>1 3</sup>-A<sup>m1s</sup>-A<sup>e2s</sup>-U<sup>m1s</sup>-C<sup>m1s</sup>-C<sup>e2s</sup>-G<sup>m1s</sup>-A<sup>m1s</sup>-T<sup>e2s</sup>-G<sup>m1s</sup>-G<sup>m1s</sup>-C<sup>e2s</sup>-G<sup>m1s</sup>-A<sup>m1s</sup>-A<sup>e2s</sup>-G<sup>m1t</sup>-H (配列番号 4 0)

Xの部分をX<sup>1 3</sup>と置き換えて、実施例 9 1と同様に合成を行った。X<sup>1 3</sup>の部分は参考例 3 3で合成した化合物 3 3 Fを用い、3回縮合した。

【 0 3 2 2 】

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)。

40

【 0 3 2 3 】

( 実施例 1 1 1 )

HO-X<sup>1 3</sup>-X<sup>1 3</sup>-X<sup>1 3</sup>-X<sup>1 3</sup>-X<sup>1 3</sup>-A<sup>m1s</sup>-A<sup>e2s</sup>-U<sup>m1s</sup>-C<sup>m1s</sup>-C<sup>e2s</sup>-G<sup>m1s</sup>-A<sup>m1s</sup>-T<sup>e2s</sup>-G<sup>m1s</sup>-G<sup>m1s</sup>-C<sup>e2s</sup>-G<sup>m1s</sup>-A<sup>m1s</sup>-A<sup>e2s</sup>-G<sup>m1t</sup>-H (配列番号 4 0)

Xの部分をX<sup>1 3</sup>と置き換えて、実施例 9 1と同様に合成を行った。X<sup>1 3</sup>の部分は参考例 3 3で合成した化合物 3 3 Fを用い、5回縮合した。

【 0 3 2 4 】

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

50

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：7882.43）。

【0325】

（実施例112）

HO-X<sup>13</sup>-X<sup>13</sup>-X<sup>13</sup>-X<sup>13</sup>-X<sup>13</sup>-X<sup>13</sup>-X<sup>13</sup>-A<sup>m1s</sup>-A<sup>e2s</sup>-U<sup>m1s</sup>-C<sup>m1s</sup>-C<sup>e2s</sup>-G<sup>m1s</sup>-A<sup>m1s</sup>-T<sup>e2s</sup>-G<sup>m1s</sup>-G<sup>m1s</sup>-C<sup>e2s</sup>-G<sup>m1s</sup>-A<sup>m1s</sup>-A<sup>e2s</sup>-G<sup>m1t</sup>-H（配列番号40）

Xの部分にX<sup>13</sup>と置き換えて、実施例91と同様に合成を行った。X<sup>13</sup>の部分は参考例33で合成した化合物33Fを用い、7回縮合した。

【0326】

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、次のHPLC条件で分析した。分析カラムはClarity Oligo-MS C18 (Phenomenex製) (2.6 μm, 50 x 2.1mm)、移動相Aは100mMヘキサフルオロイソプロパノール、8mMトリエチルアミン水溶液、移動相Bはメタノールを使用し、移動相Bが4分間で10%から25%に変化するグラジエント、流速0.5mL/min、60分で分析した。化合物のHPLC保持時間は3.0分であった。

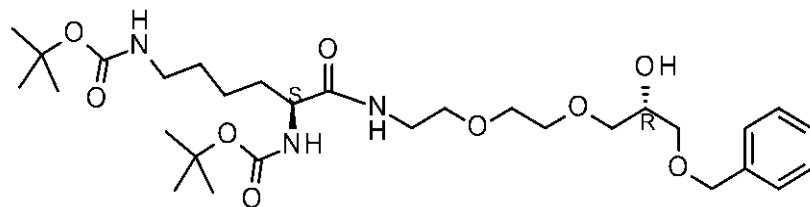
【0327】

（参考例34）

（34A）

tert-ブチル N-[(5S)-6-[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]-5-(tert-ブトキシカルボニルアミノ)-6-オキソ-ヘキシル]カーバメート（化合物34A）の合成

【化141】



(2S)-2,6-ビス(tert-ブトキシカルボニルアミノ)ヘキサン酸(1.7g, 4.9mmol)、1-(-3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド 塩酸塩(1.3g, 6.9mmol)、3H-1,2,3-トリアゾール[4,5-b]ピリジン-3-オール(0.67g, 4.9mmol)、N,N-ジイソプロピルエチルアミン(3.0mL, 17mmol)、工程(33B)で合成した化合物33B(2.1g, 5.4mmol)をジクロロメタン(40mL)に溶解し、室温で4時間撹拌した。さらに、1-(-3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジアミド 塩酸塩(1.3g, 6.9mmol)、N,N-ジイソプロピルエチルアミン(1.0mL, 5.7mmol)を加え、終夜撹拌した。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、化合物34Aを含む粗生成物(3.1g)を得た。これ以上精製せず、全量を次の反応に用いた。

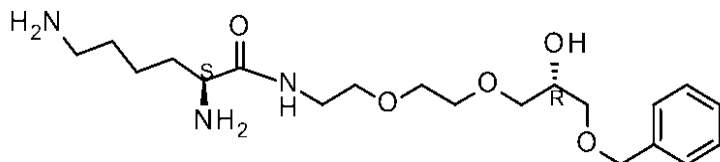
Calcd for C<sub>30</sub>H<sub>51</sub>N<sub>3</sub>O<sub>9</sub>: [M+H]<sup>+</sup> 599, Found 599.

【0328】

（34B）

(2S)-2,6-ジアミノ-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]ヘキサナムイド TFA塩（化合物34B）の合成

## 【化 1 4 2】



工程 (3 4 A) で合成した化合物 3 4 A を含む粗生成物 (3.1g) をジクロロメタン (24mL) / トリフルオロ酢酸 (6mL) に溶解させ、室温で90分間攪拌した。反応終了後、溶媒を減圧留去し、適量のジクロロメタンを加え、再び溶媒を減圧留去した。続いて、適量のアセトニトリル/蒸留水 (4/1) を加え、再び溶媒を減圧留去した。過剰のトリフルオロ酢酸が除去

10

できるまで、上記操作を繰り返した。化合物 3 4 B を含む粗生成物 (3.8g) を得た。これ以上精製せず、全量を次の反応に用いた。

Calcd for  $C_{20}H_{35}N_3O_5$ :  $[M+H]^+$  399, Found 398.

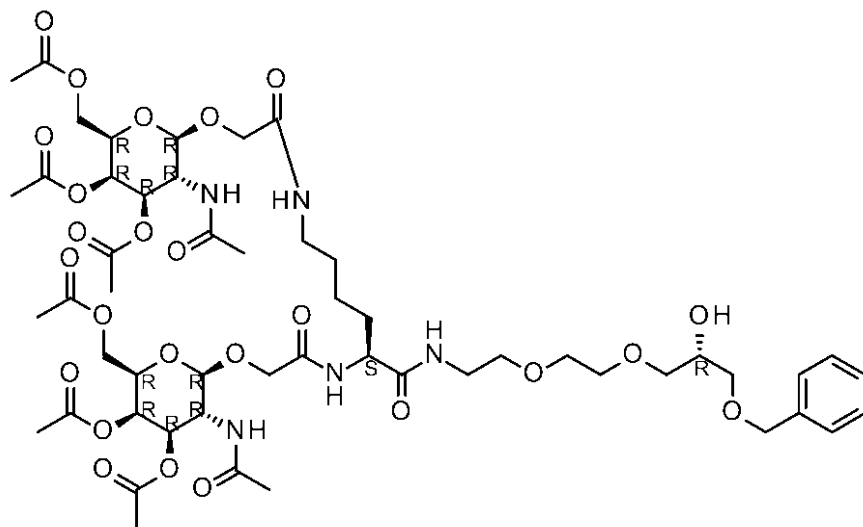
## 【0 3 2 9】

(3 4 C)

酢酸 [(2R,3R,4R,5R,6R)-5-アセトアミド-6-[2-[[ (5S)-5-[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]オキシアセチル]アミノ]-6-[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]-6-オキソ-ヘキシル]アミノ]-2-オキソ-エトキシ]-3,4-ジアセトキシ-テトラヒドロピラン-2-イル]メチル (化合物 3 4 C) の合成

20

## 【化 1 4 3】



30

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 (W02012037254) (3.5g, 8.6mmol)、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 (2.3g, 12mmol)、3H-1,2,3-トリアゾール[4,5-b]ピリジン-3-オール (1.3g, 9.6mmol)、N,N-ジイソプロピルエチルアミン (10mL, 59mmol)、工程 (3 4 B) で合成した化合物 3 4 B を含む粗生成物をジクロロメタン (80mL) に溶解し、室温で終夜攪拌した。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 70:30, v/v) で精製し、アモルファス状の目的物 3 4 C (3.5g、収率62%(3工程)) を得た。

40

$^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ ) : 7.50-7.44 (1H, m), 7.39-7.28 (5H, m), 7.17-7.11 (2H, m), 6.94-6.88 (1H, m), 6.30-6.26 (1H, m), 5.37-5.32 (2H, m), 5.09-4.99 (2H, m), 4.57 (2H, s), 4.56-3.11 (30H, m), 2.18 (3H, s), 2.16 (3H, s), 2.07-1.99 (15H, m), 1.97 (3H, s), 1.96-1.34 (6H, m).

50

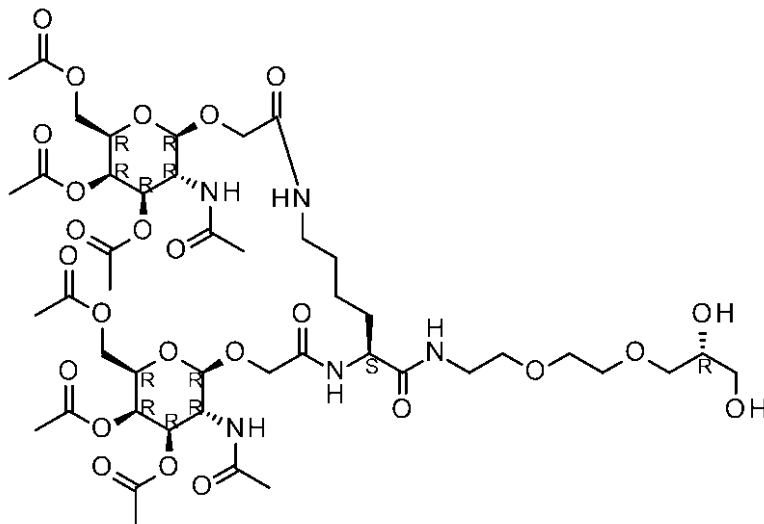
Calcd for  $C_{52}H_{77}N_5O_{25}$ :  $[M+H]^+$  1172, Found 1173.

【 0 3 3 0 】

( 3 4 D )

酢酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-アセトアミド-6-[2-[[[(5S)-5-[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]オキシアセチル]アミノ]-6-[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]-6-オキソ-ヘキシル]アミノ]-2-オキソ-エトキシ]-3,4-ジアセトキシ-テトラヒドロピラン-2-イル]メチル(化合物34D)の合成

【化144】



10

20

工程(34C)で合成した化合物34C(3.5g, 3.0mmol)をエタノール(40mL)に溶解した。20%水酸化パラジウム/炭素(wet)(1.2g)を加え、水素雰囲気下、50℃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34D(3.14g、収率97%)を得た。

$^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ ) : 7.72-7.67 (1H, m), 7.16 (2H, d,  $J = 9.1$  Hz), 7.04-6.98 (1H, m), 6.27 (1H, d,  $J = 9.1$  Hz), 5.36 (2H, d,  $J = 3.0$  Hz), 5.10-4.99 (2H, m), 4.67-3.07 (30H, m), 2.18 (3H, s), 2.17 (3H, s), 2.08-2.00 (15H, m), 1.98 (3H, s), 1.93-1.33 (6H, m).

30

Calcd for  $C_{45}H_{71}N_5O_{25}$ :  $[M+H]^+$  1082, Found 1083.

【 0 3 3 1 】

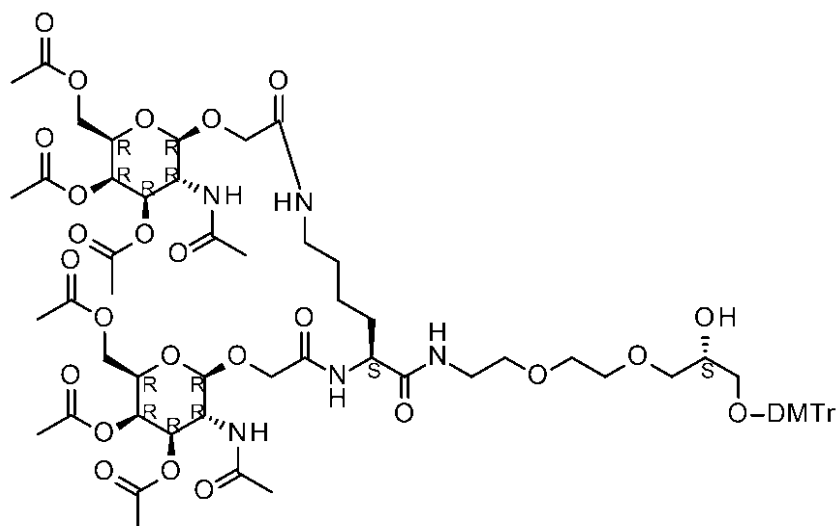
( 3 4 E )

酢酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-アセトアミド-6-[2-[[[(5S)-5-[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]オキシアセチル]アミノ]-6-[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]-6-オキソ-ヘキシル]アミノ]-2-オキソ-エトキシ]-3,4-ジアセトキシ-テトラヒドロピラン-2-イル]メチル(化合物34E)の合成

40



## 【化 1 4 5】



10

工程 ( 3 4 D ) で合成した化合物 3 4 D ( 3.14g, 2.9mmol ) に適量のピリジンを加え、減圧下、共沸した。ピリジン ( 10 ml ) に溶解させ、4,4'-ジメトキシトリチルクロリド ( 1.1g, 3.2mmol ) を加え、室温で2時間攪拌した。反応終了後、トルエン(20mL)、エタノール(1mL)、N,N-ジイソプロピルエチルアミン(1mL)を加え、溶媒を減圧留去した後、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%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 3 4 E ( 2.5g、収率62% ) を得た。

20

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) : 7.60-7.55 (1H, m), 7.43 (2H, d,  $J = 7.3$  Hz), 7.35-7.20 (7H, m), 7.17-7.10 (2H, m), 6.92-6.87 (1H, m), 6.83 (4H, d,  $J = 9.1$  Hz), 6.30 (1H, d,  $J = 9.1$  Hz), 5.36-5.30 (2H, m), 5.09-4.95 (2H, m), 4.60-3.07 (36H, m), 2.19-2.14 (6H, m), 2.06-1.99 (15H, m), 1.97 (3H, s), 1.70-1.34 (6H, m).

Calcd for  $\text{C}_{66}\text{H}_{89}\text{N}_5\text{O}_{27}$ :  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  1407, Found 1407.

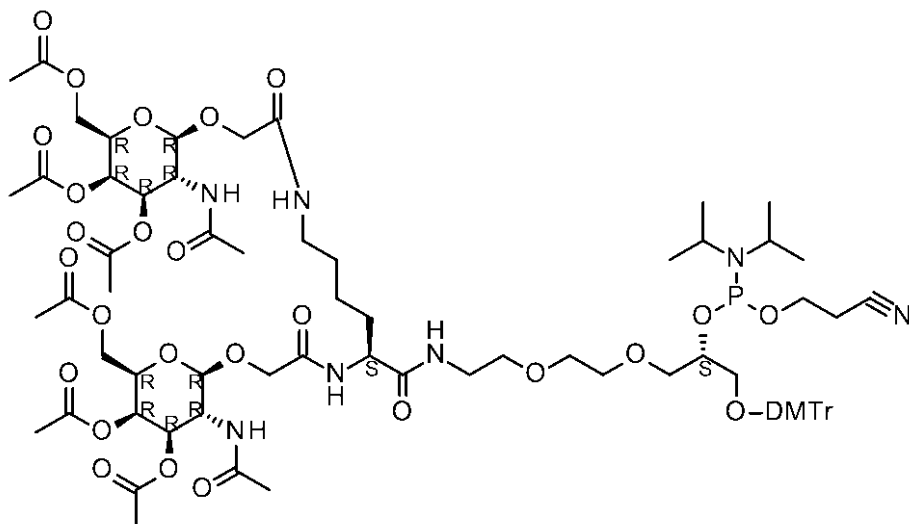
## 【 0 3 3 2 】

( 3 4 F )

30

酢酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-アセトアミド-6-[2-[(5S)-5-[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]オキシアセチル]アミノ]-6-[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-プロボキシ]エトキシ]エチルアミノ]-6-オキソ-ヘキシル]アミノ]-2-オキソ-エトキシ]-3,4-ジアセトキシ-テトラヒドロピラン-2-イル]メチル ( 化合物 3 4 F ) の合成

## 【化 1 4 6】



10

工程(34E)で合成した化合物34E(2.5g, 1.8mmol)を適量のトルエン/ジクロロメタン(3/1)で共沸した後に、ジクロロメタン(18mL)に溶解した。N,N-ジイソプロピルエチルアミン(1.3mL, 7.2mmol)、2-シアノエチルジイソプロピルクロロホスホロアミト(0.48mL, 2.2mmol)を加え、室温で1時間撹拌した。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34F(2.1g、収率73%)を得た。

20

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) : 7.47-7.41 (2H, m), 7.35-7.05 (10H, m), 6.89-6.78 (5H, m), 6.35-6.25 (1H, m), 5.37-5.34 (2H, m), 5.11-4.98 (2H, m), 4.55-3.08 (40H, m), 2.70-2.45 (2H, m), 2.18 (3H, s), 2.17 (3H, s), 2.07-1.99 (15H, m), 1.98-1.94 (3H, m), 1.91-1.31 (6H, m), 1.21-1.02 (12H, m)。

## 【0333】

(実施例113)

HO-X<sup>14</sup>-A<sup>m1s</sup>-A<sup>e2s</sup>-U<sup>m1s</sup>-C<sup>m1s</sup>-C<sup>e2s</sup>-G<sup>m1s</sup>-A<sup>m1s</sup>-T<sup>e2s</sup>-G<sup>m1s</sup>-G<sup>m1s</sup>-C<sup>e2s</sup>-G<sup>m1s</sup>-A<sup>m1s</sup>-A<sup>e2s</sup>-G<sup>m1t</sup>-H (配列番号40)

30

Xの部分X<sup>14</sup>と置き換えて、実施例91と同様に合成を行った。X<sup>14</sup>の部分は参考例34で合成した化合物34Fを用い、1回縮合した。

## 【0334】

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：6263.04)。

## 【0335】

(実施例114)

HO-X<sup>14</sup>-X<sup>14</sup>-A<sup>m1s</sup>-A<sup>e2s</sup>-U<sup>m1s</sup>-C<sup>m1s</sup>-C<sup>e2s</sup>-G<sup>m1s</sup>-A<sup>m1s</sup>-T<sup>e2s</sup>-G<sup>m1s</sup>-G<sup>m1s</sup>-C<sup>e2s</sup>-G<sup>m1s</sup>-A<sup>m1s</sup>-A<sup>e2s</sup>-G<sup>m1t</sup>-H (配列番号40)

40

Xの部分X<sup>14</sup>と置き換えて、実施例91と同様に合成を行った。X<sup>14</sup>の部分は参考例34で合成した化合物34Fを用い、2回縮合した。

## 【0336】

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

50

定した（実測値：7154.36）。

#### 【0337】

（実施例115）

HO-X<sup>14</sup>-X<sup>14</sup>-X<sup>14</sup>-A<sup>m1s</sup>-A<sup>e2s</sup>-U<sup>m1s</sup>-C<sup>m1s</sup>-C<sup>e2s</sup>-G<sup>m1s</sup>-A<sup>m1s</sup>-T<sup>e2s</sup>-G<sup>m1s</sup>-G<sup>m1s</sup>-C<sup>e2s</sup>-G<sup>m1s</sup>-A<sup>m1s</sup>-A<sup>e2s</sup>-G<sup>m1t</sup>-H（配列番号40）

Xの部分をX<sup>14</sup>と置き換えて、実施例91と同様に合成を行った。X<sup>14</sup>の部分は参考例34で合成した化合物34Fを用い、3回縮合した。

#### 【0338】

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：8046.64）。

#### 【0339】

（実施例116～127）オリゴヌクレオチドを封入した核酸脂質粒子の調製

ジステアロイルホスファチジルコリン（1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine：以下DSPCと表記、NOF CORPORATION）、コレステロール（Cholesterol：以下Cholと表記、Sigma-Aldrich, Inc.）、国際公開第2015/005253に記載されている実施例8の化合物（LPとする）、及びN-[メトキシポリ（エチレングリコール）2000]カルバモイル-1,2-ジミリスチルオキシプロピル-3-アミン（以下PEG-C-DMAと表記、NOF CORPORATION）を、DSPC:Chol:LP:PEG-C-DMA=10:48:40:2のモル比にてエタノール中、総脂質濃度5mMになるように脂質溶液を調製した。

#### 【0340】

オリゴヌクレオチド（21e\_002, 18e\_005, 21m\_002, 18e\_005, 18m\_022, 15e\_001, 15ed\_001, 18e\_008, 18e\_025, 18m\_008, 15e\_002, 及び、15ed\_002）を、それぞれクエン酸緩衝液（20mM、Citrate Buffer、pH4.0）に溶解し、オリゴヌクレオチド溶液を調製した。

#### 【0341】

上記の脂質溶液とオリゴヌクレオチド溶液を、LP由来の窒素原子（N）とオリゴヌクレオチド由来のリン原子（P）の比率（N/P）が3となるように、NanoAssemblr Benchtop（登録商標。Precision Nanosystems）を用いて、付属のマイクロ流路カートリッジ内で混合し（流速：12mL/min、混合体積比率：脂質溶液：オリゴヌクレオチド溶液＝1：3、温度：室温）、核酸脂質粒子の分散液を得た。続いて、核酸脂質粒子の分散液を約2Lのリン酸緩衝液（pH7.4）にて12～18時間透析（Float-A-Lyzer G2, MWCO:1000kD, Spectra/Por）することにより、エタノール除去及び中和を行い、オリゴヌクレオチドを封入した核酸脂質粒子の精製された分散液を得た。適宜、濃度調整のため、限外濾過（Amicon-Ultra, MWCO:100kD, MILLIPORE）によって核酸脂質粒子の分散液を濃縮した。

#### 【0342】

実施例116～127のオリゴヌクレオチド封入核酸脂質粒子の特性評価を行った。それぞれの特性評価の方法について以下に説明する。

#### 【0343】

（1）オリゴヌクレオチドの封入率

オリゴヌクレオチドの封入率は、Quant-iT RiboGreen RNA Assay kit（Invitrogen）を用い、添付文書に準じて測定した。すなわち、0.015%Triton X-100界面活性剤存在下及び非存在下において、核酸脂質粒子の分散液中のオリゴヌクレオチドを定量し、次式により封入率を算出した。

{ [ 界面活性剤存在下におけるオリゴヌクレオチド量 ] - [ 界面活性剤非存在下におけるオリゴヌクレオチド量 ] } / [ 界面活性剤存在下におけるオリゴヌクレオチド量 ] × 100（%）

（2）オリゴヌクレオチドと脂質の比率

核酸脂質粒子の分散液中のリン脂質量をリン脂質C-テストワコー（和光純薬工業株式

10

20

30

40

50

会社)を用い、添付文書に準じて測定した。すなわち、1%Triton X-100界面活性剤存在下において、試料中のリン脂質を定量した。

核酸脂質粒子の分散液中のコレステロール及びL P量を逆相クロマトグラフィーにて測定した(System: Agilent 1100series, Column: Chromolith Performance RP-18 endcapped 100-3 monolithic HPLC-column(Merck), Buffer A: 0.01%トリフルオロ酢酸, Buffer B: 0.01%トリフルオロ酢酸, メタノール, Gradient (B%): 82 - 97% (0 - 17 min), Flow Rate: 2mL/min, Temperature: 50, Detection: 205 nm)。

リン脂質量、コレステロール量、及びL P量とリポソームを構成する脂質成分の組成比から総脂質量を算出し、上述(1)の「界面活性剤存在下におけるオリゴヌクレオチド量」から、次式によりオリゴヌクレオチドと脂質の比率を算出した。

[界面活性剤存在下におけるオリゴヌクレオチド濃度] / [総脂質濃度] (wt/wt)

(3) 平均粒子径

リポソームの粒子径は、Zeta Potential/Particle Sizer NICOMPTM 380ZLS (PARTICLE SIZING SYSTEMS)にて測定した。表中の平均粒子径は体積平均粒子径を表し、±以下は、偏差を表す。

【0344】

結果を表11に示した。

【0345】

(表11)

核酸脂質粒子	ASO	封入率 (%)	ASO/lipid (wt/wt)*	粒子径 (nm)
実施例116	21e_002	98	12	60 ± 35
実施例117	18e_005	98	12	69 ± 36
実施例118	21m_002	98	13	67 ± 33
実施例119	18e_005	98	12	61 ± 31
実施例120	18m_022	98	13	59 ± 21
実施例121	15e_001	98	13	57 ± 20
実施例122	15ed_001	99	15	58 ± 19
実施例123	18e_008	97	14	62 ± 36
実施例124	18e_025	98	14	58 ± 25
実施例125	18m_008	98	13	62 ± 28
実施例126	15e_002	98	13	62 ± 33
実施例127	15ed_002	98	14	54 ± 21

\* ASO/lipid(wt/wt): オリゴヌクレオチドと脂質の重量比。

【0346】

以上の結果より、オリゴヌクレオチドが脂質粒子内に封入されており、それらの核酸脂質粒子は、約50nmから約70nmの平均粒子径を有していることが明らかとなった。

【0347】

(実施例128)

HO-X<sup>14</sup>-A<sup>m1s</sup>-T<sup>e2s</sup>-C<sup>m1s</sup>-C<sup>m1s</sup>-G<sup>e2s</sup>-A<sup>m1s</sup>-U<sup>m1s</sup>-G<sup>e2s</sup>-G<sup>m1s</sup>-C<sup>m1s</sup>-G<sup>e2s</sup>-A<sup>m1s</sup>-A<sup>m1s</sup>-G<sup>e2s</sup>-C<sup>m1s</sup>-H (配列番号44)

実施例113で使用した配列の代わりに上記の配列である15e\_005を用い、実施例113と同様に合成を行った。

【0348】

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：6210.94）。

【0349】

（実施例129）

HO-X<sup>14</sup> - U<sup>m1s</sup> - C<sup>e2s</sup> - C<sup>m1s</sup> - G<sup>m1s</sup> - A<sup>e2s</sup> - U<sup>m1s</sup> - G<sup>m1s</sup> - G<sup>e2s</sup> - C<sup>m1s</sup> - G<sup>m1s</sup> - A<sup>e2s</sup> - A<sup>m1s</sup> - G<sup>m1s</sup> - C<sup>e2s</sup> - U<sup>m1t</sup> - H （配列番号45）

実施例113で使用した配列の代わりに上記の配列である15e\_006を用い、実施例113と同様に合成を行った。

【0350】

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：6201.95）。

【0351】

（実施例130）

HO-X<sup>14</sup> - C<sup>m1s</sup> - C<sup>e2s</sup> - G<sup>m1s</sup> - A<sup>m1s</sup> - T<sup>e2s</sup> - G<sup>m1s</sup> - G<sup>m1s</sup> - C<sup>e2s</sup> - G<sup>m1s</sup> - A<sup>m1s</sup> - A<sup>e2s</sup> - G<sup>m1s</sup> - C<sup>m1s</sup> - T<sup>e2s</sup> - G<sup>m1t</sup> - H （配列番号41）

実施例113で使用した配列の代わりに上記の配列である15e\_002を用い、実施例113と同様に合成を行った。

【0352】

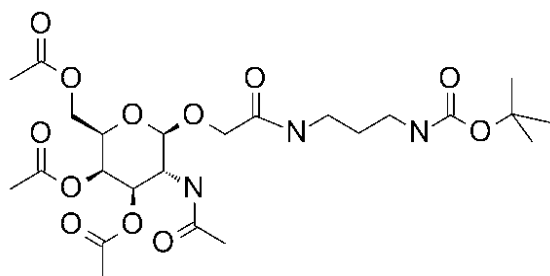
本化合物の塩基配列は、Homo sapiens glucose-6-phosphatase catalytic subunit (G6PC), transcript variant 1, mRNA (NCBI-GenBank accession No. NM\_000151.3)のヌクレオチド番号728のGからTへ変異している、c.648G>T変異G6PC遺伝子のエクソン5の5'末端から89番目から103番目に相補的な配列である。化合物は負イオンESI質量分析により同定した（実測値：6268.98）。

【0353】

（参考例35）

（35A）[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-アセトアミド-3,4-ジアセトキシ-6-[2-[3-(tert-ブトキシカルボニルアミノ)プロピルアミノ]-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35A）の合成

【化147】

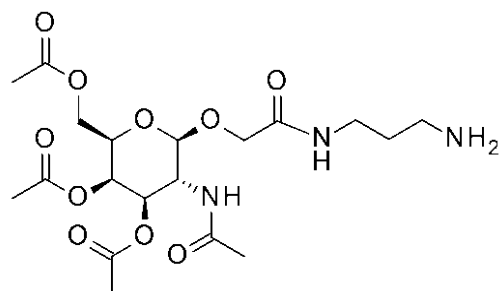


文献既知化合物の2-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-アセトアミド-4,5-ジアセトキシ-6-(アセトキシメチル)テトラヒドロピラン-2-イル]オキシ酢酸(WO2012037254)(10g, 24.7mmol)、N-(3-アミノプロピル)カルバミン酸tert-ブチルエステル(4.7ml, 27.1mmol)のN,N-ジメチルホルムアミド(70ml)溶液に、1-[ビス(ジメチルアミノ)メチレン]-1H-1,2,3-トリアゾロ[4,5-b]ピリジニウム3-オキシドヘキサフルオロホスファート(11.3g, 29.6mmol)とN,N-ジイソプロピルエチルアミン(8.6mL, 49.3mmol)を加え、室温で40分撹拌した。反応終了後、酢酸エチルを加え、有機層を15%食塩水、0.5N塩酸、飽和食塩水、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、表記目的物を含む粗生成物を約14g得た。これ以上、精製せずに次の反応に用いた。

## 【 0 3 5 4 】

( 3 5 B ) [(2R,3R,4R,5R,6R)-5-アセトアミド-3,4-ジアセトキシ-6-[2-(3-アミノプロピルアミノ)-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 TFA塩 (化合物 3 5 B) の合成

## 【化 1 4 8 】



10

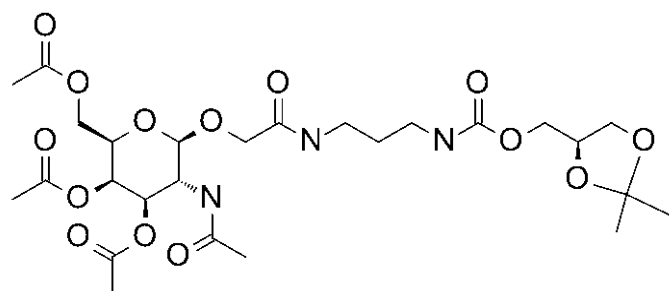
工程 ( 3 5 A ) で合成した粗生成物 ( 14g ) をジクロロメタン (40ml) に溶解させ、反応が終了するまで、トリフルオロ酢酸を計16ml加えた。反応終了後、溶媒を減圧留去して粗生成物を得た。適量のジエチルエーテルを加えて、デカンテーションした。適量のアセトニトリルを加え、減圧留去した。更に、適量のジクロロメタンを加え、減圧留去した。表記目的物を含む粗生成物を約15.9g得た。これ以上、精製せずに次の反応に用いた。

Calcd for  $C_{19}H_{31}N_3O_{10}$ :  $[M+H]^+$  462, Found 462.

## 【 0 3 5 5 】

( 3 5 C ) [(2R,3R,4R,5R,6R)-5-アセトアミド-3,4-ジアセトキシ-6-[2-[3-[(4R)-2,2-ジメチル-1,3-ジオキソラン-4-イル]メトキシカルボニルアミノ]プロピルアミノ]-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 3 5 C) の合成

## 【化 1 4 9 】



30

(S)-(+)-1,2-イソプロピリデングリセロール (6.53g, 49.4mmol)、クロロギ酸4-ニトロフェニル (9.96g, 49.4mmol) をジクロロメタン (200ml) に溶解させ、ピリジン (7.95ml, 98.8mmol) を加え、室温で 30 分攪拌した。この反応液に、工程 ( 3 5 B ) で合成した粗生成物 ( 15.9g ) のジクロロメタン (100ml) 溶液、トリエチルアミン (20.5ml, 148mmol) を加え、室温で、終夜攪拌した。反応終了後、有機層を0.5N塩酸、飽和食塩水、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 (酢酸エチル:メタノール = 100 : 0 65 : 35, v/v) で精製し、目的物 3 5 C ( 9.0g、収率59%(3工程) ) を固体として得た。

40

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) : 7.09-7.01 (1H, m), 6.16 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz), 5.53-5.46 (1H, m), 5.37 (1H, d,  $J = 3.6$  Hz), 5.22-5.14 (1H, m), 4.53 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz), 4.41-3.99 (9H, m), 3.96-3.89 (1H, m), 3.79-3.71 (1H, m), 3.44-3.15 (4H, m), 2.17 (3H, s), 2.06 (3H, s), 2.04 (3H, s), 1.98 (3H, s), 1.80-1.58 (2H, m), 1.43 (3H, s), 1.37 (3H, s).

Calcd for  $C_{26}H_{41}N_3O_{14}$ :  $[M+Na]^+$  642, Found 642.

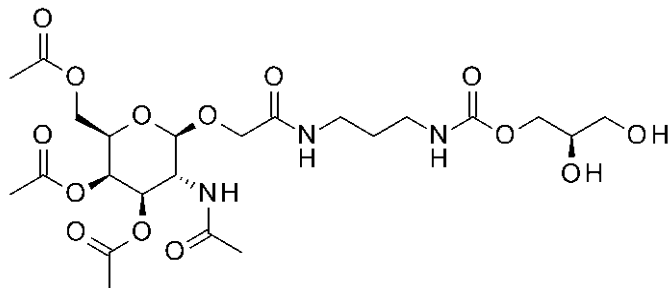
## 【 0 3 5 6 】

( 3 5 D ) [(2R,3R,4R,5R,6R)-5-アセトアミド-3,4-ジアセトキシ-6-[2-[3-[(2R)-2,3-ジ

50

ヒドロキシプロポキシ]カルボニルアミノ]プロピルアミノ]-2-オキシ-エトキシ]テトラヒドロピラン-2-イル]メチル アセテート (化合物 3 5 D) の合成

【化 1 5 0】



10

工程 (3 5 C) で合成した化合物 (7.87g, 12.7mmol) のメタノール溶液 (160ml) に p-トルエンスルホン酸 (0.242g, 1.27mmol) を加え、終夜攪拌した。反応終了後、溶媒を減圧留去して、表記目的物を含む粗生成物を 7.36g 得た。これ以上、精製せずに次の反応に用いた。

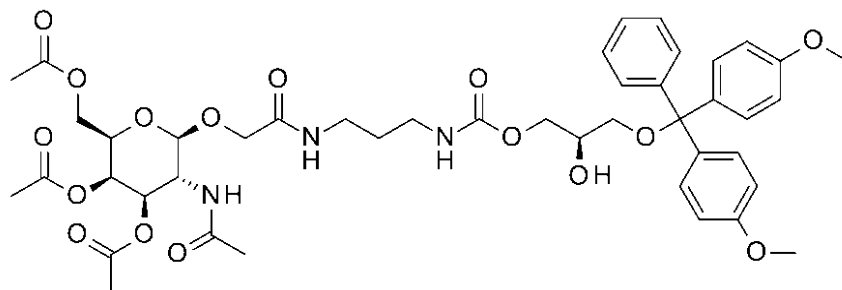
Calcd for  $C_{23}H_{37}N_3O_{14}$ :  $[M+H]^+$  580, Found 580,  $[M+Na]^+$  602, Found 602.

【0 3 5 7】

(3 5 E) [(2R,3R,4R,5R,6R)-5-アセトアミド-3,4-ジアセトキシ-6-[2-[3-[[[(2R)-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]カルボニルアミノ]プロピルアミノ]-2-オキシ-エトキシ]テトラヒドロピラン-2-イル]メチル アセテート (化合物 3 5 E) の合成

20

【化 1 5 1】



30

工程 (3 5 D) で合成した粗生成物 (7.36g) にジクロロメタン (150ml)、ピリジン (10ml) を加え、溶媒を減圧留去した。その後、ピリジン (60ml) に溶解させ、4,4'-ジメトキシトリチルクロリド (5.59 g, 16.5 mmol) を加え、室温で 30 分攪拌した。反応終了後、メタノール (1.03ml, 25.4mmol)、N,N-ジイソプロピルエチルアミン (4.42mL, 25.4mmol) 溶媒を減圧留去した。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 0:100, v/v、1% トリエチルアミン含有) で精製し、目的物 3 5 E (4.51 g、収率 40%) を固体として得た。

$^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ ) : 7.45-7.39 (2H, m), 7.34-7.28 (6H, m), 7.24-7.18 (1H, m), 7.07-6.99 (1H, m), 6.86-6.80 (4H, m), 6.21 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz), 5.48-5.41 (1H, m), 5.36 (1H, d,  $J = 3.6$  Hz), 5.19-5.13 (1H, m), 4.52 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz), 4.39-3.88 (9H, m), 3.79 (6H, s), 3.50-3.12 (6H, m), 2.92 (1H, d,  $J = 4.8$  Hz), 2.16 (3H, s), 2.05 (3H, s), 1.99 (3H, s), 1.95 (3H, s), 1.80-1.54 (2H, m).

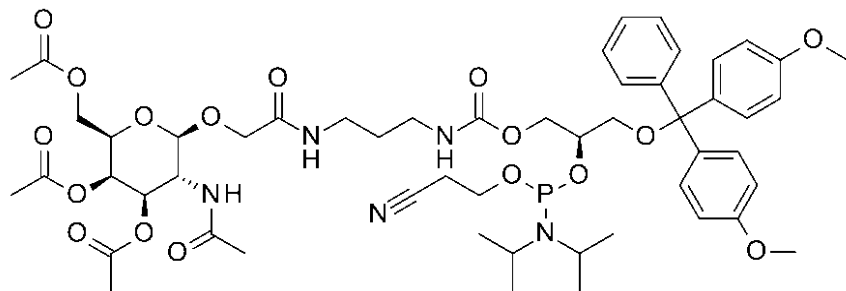
40

Calcd for  $C_{44}H_{55}N_3O_{16}$ :  $[M+Na]^+$  904, Found 904.

【0 3 5 8】

(3 5 F) [(2R,3R,4R,5R,6R)-5-アセトアミド-3,4-ジアセトキシ-6-[2-[3-[[[(2R)-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]カルボニルアミノ]プロピルアミノ]-2-オキシ-エトキシ]テトラヒドロピラン-2-イル]メチル アセテート (化合物 3 5 F) の合成

## 【化 1 5 2】



工程 (35E) で合成した化合物 35E (4.51 g, 5.11 mmol) を適量の酢酸エチル/トルエン (1/4) で共沸した後に、ジクロロメタン (90ml) に溶解した。N,N-ジイソプロピルエチルアミン (3.56 ml, 20.5 mmol)、2-シアノエチルジイソプロピルクロロホスホリット (1.57 ml, 5.63 mmol) 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、目的物 35F (3.97 g, 収率72%) を固体として得た。

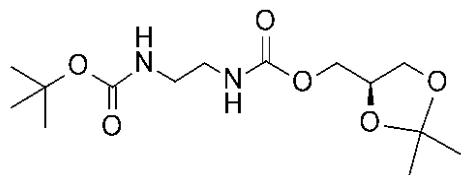
$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) : 7.47-7.38 (2H, m), 7.35-7.16 (7H, m), 7.12-7.04 (1H, m), 6.86-6.76 (4H, m), 6.25-6.12 (1H, m), 5.58-5.18 (3H, m), 4.61-4.53 (1H, m), 4.46-3.42 (19H, m), 3.39-3.02 (6H, m), 2.68-2.41 (2H, m), 2.19-2.13 (3H, m), 2.08-2.02 (3H, m), 2.01-1.91 (6H, m), 1.78-1.54 (2H, m), 1.31-0.94 (12H, m).

## 【0359】

(参考例 36)

(36A) [(4R)-2,2-ジメチル-1,3-ジオキソラン-4-イル]メチル N-[2-(tert-ブトキシカルボニルアミノ)エチル]カルバメート (化合物 36A) の合成

## 【化 1 5 3】

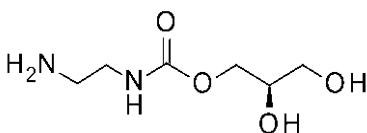


(S)-(+)-1,2-イソプロピリデングリセロール (5.0g, 37.5mmol)、クロロギ酸4-ニトロフェニル (7.55g, 37.5mmol) をジクロロメタン (150ml) に溶解させ、ピリジン (5.0ml, 61.8mmol) を加え、室温で1時間攪拌した。この反応液に、N-(2-アミノエチル)カルバミン酸 tert-ブチル (6g, 37.5mmol) のジクロロメタン溶液 (40ml)、トリエチルアミン (8.8ml, 63.7mmol) を加え、室温で1時間攪拌した。反応終了後、有機層を0.5N塩酸、飽和食塩水、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥、濾過し、溶媒を減圧留去して目的物を含む粗生成物 (10.6g) 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。

## 【0360】

(36B) [(2R)-2,3-ジヒドロキシプロピル] N-(2-アミノエチル)カルバメート TFA塩 (化合物 36B) の合成

## 【化 1 5 4】



工程 (36A) で合成した粗生成物 (10.6g) に、トリフルオロ酢酸 (16.6ml)、純水 (5.55 ml) を加え、室温で1時間攪拌した。反応終了後、溶媒を減圧留去した。続いて、アセトニトリルを加え、溶媒を減圧留去した。更に、アセトニトリル/純水 (4/1) を加え、溶媒を減

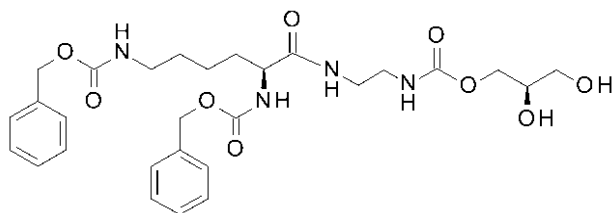


圧留去した後に、減圧下乾燥した。目的物を含むオイル状の粗生成物(14.3g)を得た。これ以上、精製せずに次の反応に用いた。

【0361】

(36C) ペンジル N-[(5S)-5-(ペンジルオキシカルボニルアミノ)-6-[2-[[[(2R)-2,3-ジヒドロキシプロポキシ]カルボニルアミノ]エチルアミノ]-6-オキソ-ヘキシル]カルバメート (化合物36C) の合成

【化155】



10

N,N-Di-Cbz-L-lysine(13.7g)のN,N-ジメチルホルムアミド(100ml)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(15.0g, 40mmol)とN,N-ジイソプロピルエチルアミン(12mL, 66mmol)を加えた。更に、工程(36B)で合成した粗生成物(9.7g)とN,N-ジイソプロピルエチルアミン(12mL, 66mmol)のN,N-ジメチルホルムアミド(20ml)溶液を加え、室温で40分攪拌した。反応終了後、酢酸エチルを加え、有機層を15%食塩水、0.5N塩酸、飽和食塩水、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固形物を得た。この固形物を1N塩酸、純水で洗浄後、ジクロロメタン、ジエチルエーテルで洗浄した後に、減圧下乾燥し、目的物を含む粗生成物(10.5g)を得た。

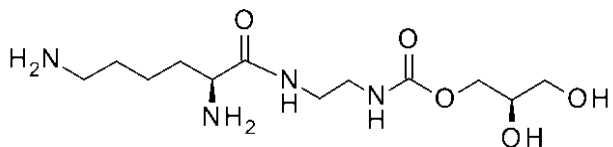
20

Calcd for  $C_{28}H_{38}N_4O_9$ :  $[M+H]^+$  575, Found 575.

【0362】

(36D) [(2R)-2,3-ジヒドロキシプロピル] N-[2-[[[(2S)-2,6-ジアミノヘキサノイル]アミノ]エチル]カルバメート 塩酸塩 (化合物36D) の合成

【化156】



30

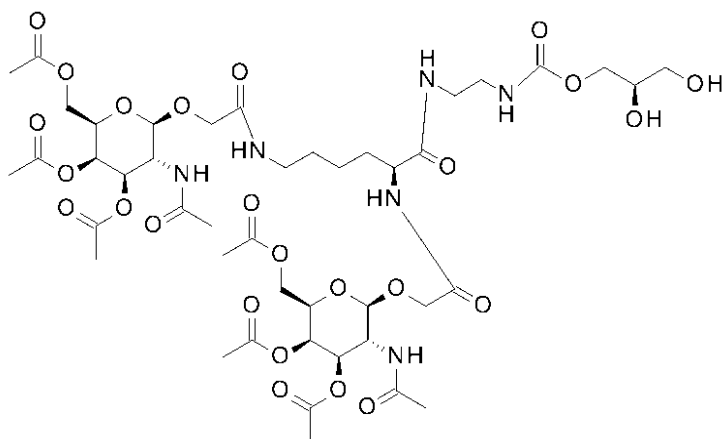
工程(36C)で合成した粗生成物(9.5g)をテトラヒドロフラン/1規定塩酸(36ml)に溶解させ、10%パラジウム炭素(2.0g)を加え、水素雰囲気下、室温で2.5時間攪拌した。反応終了後、ろ過をした。溶媒を減圧留去した後に、高速濃縮装置V-10(バイオタージ)で減圧下乾燥した。表記目的化合物の粗生成物(6.4g)を得た。これ以上、精製せずに次の反応に用いた。

【0363】

(36E) [(2R,3R,4R,5R,6R)-5-アセトアミド-6-[2-[[[(5S)-5-[[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]オキシアセチル]アミノ]-6-[2-[[[(2R)-2,3-ジヒドロキシプロポキシ]カルボニルアミノ]エチルアミノ]-6-オキソ-ヘキシル]アミノ]-2-オキソ-エトキシ]-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36E) の合成

40

## 【化 1 5 7】



10

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)(2.64g, 6.5mmol)、工程(36D)で合成した粗生成物(1.37g, 3.6mmol)のN,N-ジメチルホルムアミド(30ml)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(3.0g, 8.0mmol)とN,N-ジイソプロピルエチルアミン(3.8mL, 21.7mmol)を加え、室温で40分撹拌した。反応終了後、ジエチルエーテル(500ml)を加え、沈殿した残渣を得た。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、溶媒を減圧留去した。アモルファス状の目的物(2.23 g、収率57%)を得た。

20

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $\text{D}_6$ ) : 8.14-8.08 (1H, m), 8.03-7.91 (2H, m), 7.33-7.22 (2H, m), 7.16-7.10 (1H, m), 5.27-5.23 (2H, m), 5.01-4.93 (2H, m), 4.59-4.52 (2H, m), 4.26-3.55 (17H, m), 3.36-3.30 (2H, m), 3.18-2.86 (7H, m), 2.14-2.06 (6H, m), 2.04-1.98 (6H, m), 1.94-1.89 (6H, m), 1.88-1.79 (6H, m), 1.71-1.48 (2H, m), 1.47-1.35 (2H, m), 1.32-1.15 (2H, m).

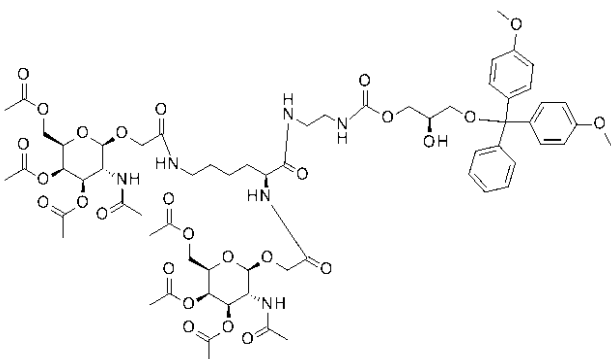
Calcd for  $\text{C}_{44}\text{H}_{68}\text{N}_6\text{O}_{25}$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  1081, Found 1081.

## 【0364】

30

(36F) [(2R,3R,4R,5R,6R)-5-アセトアミド-6-[2-[[[(5S)-5-[[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]オキシアセチル]アミノ]-6-[2-[[[(2R)-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]カルボニルアミノ]エチルアミノ]-6-オキソ-ヘキシル]アミノ]-2-オキソ-エトキシ]-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36F) の合成

## 【化 1 5 8】



40

工程(36E)で合成した化合物(7.36g, 2.1mmol)にピリジン(10ml)を加え、溶媒を減圧留去した。この操作を3回繰り返した。その後、ピリジン(10ml)に溶解させ、4,4'-ジメトキシトリチルクロリド(0.77 g, 2.3mmol)を加え、室温で30分撹拌した。反応終了後、

50

エタノール(1.0ml)、N,N-ジイソプロピルエチルアミン(1.0mL)を加え、溶媒を減圧留去した。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)=100:0:100, 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(1.17 g、収率41%)を得た。

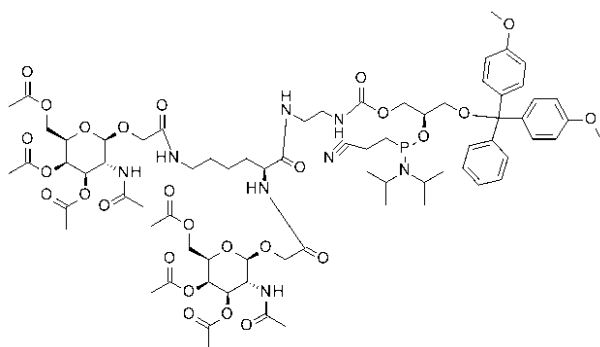
$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) : 7.47-7.38 (2H, m), 7.36-6.95 (10H, m), 6.86-6.79 (4H, m), 6.33-6.27 (1H, m), 5.53-4.99 (4H, m), 4.57-3.07 (30H, m), 2.21-2.14 (6H, m), 2.08-1.94 (18H, m), 1.92-1.07 (6H, m).

Calcd for  $\text{C}_{65}\text{H}_{86}\text{N}_6\text{O}_{27}$ :  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  1406, Found 1406.

【0365】

(36G) [(2R,3R,4R,5R,6R)-5-アセトアミド-6-[2-[[[(5S)-5-[[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]オキシアセチル]アミノ]-6-[2-[[[(2R)-3-[ビス(4-メトキシフェニル)-フェニル-メトキシ]-2-[2-シアノエチル-(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]エチルアミノ]-6-オキソ-ヘキシル]アミノ]-2-オキソ-エトキシ]-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36G)の合成

【化159】



工程(36F)で合成した化合物36F(1.17 g, 0.85 mmol)を適量のジクロロメタン/トルエン(1/4)で共沸した後に、ジクロロメタン(8ml)に溶解した。N,N-ジイソプロピルエチルアミン(0.59 ml, 3.4 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(0.23 ml, 1.0 mmol)を加え、室温で1時間撹拌した。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)=100:0:100, 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36G(0.81 g、収率61%)を得た。

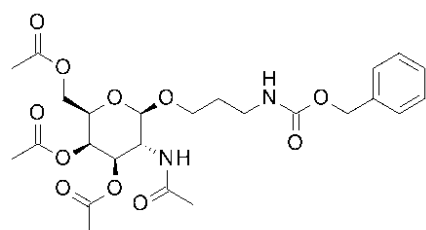
$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) : 7.47-7.40 (2H, m), 7.36-7.10 (11H, m), 6.95-6.86 (1H, m), 6.85-6.78 (4H, m), 6.34-6.28 (1H, m), 5.56-5.33 (2H, m), 5.12-4.98 (2H, m), 4.52-3.04 (36H, m), 2.72-2.46 (2H, m), 2.20-2.15 (6H, m), 2.08-1.94 (18H, m), 1.93-1.81 (2H, m), 1.67-1.52 (2H, m), 1.46-1.34 (2H, m), 1.22-0.98 (12H, m).

【0366】

(参考例37)

(37A) [(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 (化合物37A)の合成

【化160】



10

20

30

40

50

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]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  $\mu$ 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37A(11.9 g)を得た。これ以上、精製せずに次の反応に用いた。

10

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) : 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).

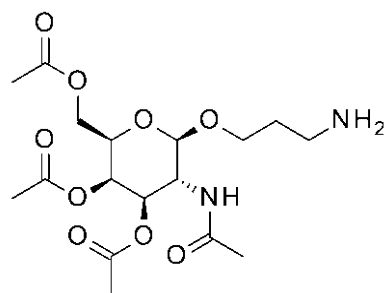
Calcd for  $\text{C}_{25}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_{11}$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  539, Found 539.

【0367】

(37B) [(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37B)の合成

【化161】

20



工程(37A)で合成した化合物37A(10 g, 18.6 mmol)をテトラヒドロフラン(200 ml)/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37B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。

30

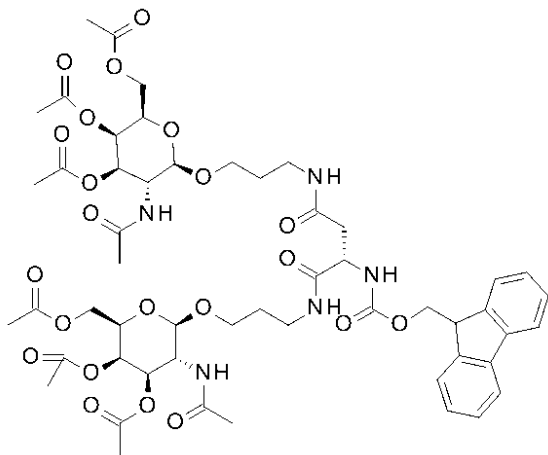
Calcd for  $\text{C}_{17}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_9$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  405, Found 405.

【0368】

(37C) [(2R,3R,4R,5R,6R)-5-アセトアミド-6-[3-[(3S)-4-[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ド]-3-(9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ)-4-オキソ-ブタノイル]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37C)の合成

40

## 【化 1 6 2】



10

N-[(9H-フルオレン-9-イルメトキシ)カルボニル]-L-アスパラギン酸 (1.7g, 4.78mmol)、工程 (3 7 B) で合成した化合物 (5.48g, 12.4mmol) の N,N-ジメチルホルムアミド (15ml) 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 (4.7g, 12.4mmol) と N,N-ジイソプロピルエチルアミン (5.8mL, 33.5mmol) を加え、室温で 1 時間撹拌した。酢酸エチルを加え、有機層を 1%食塩水、0.5N塩酸、飽和食塩水、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固形物を得た。この固形物をイソプロピルエーテルで洗浄後、減圧下乾燥し、目的物 3 7 C を含む粗生成物 (5.4g) を得た。これ以上精製せずに次の反応に用いた。

20

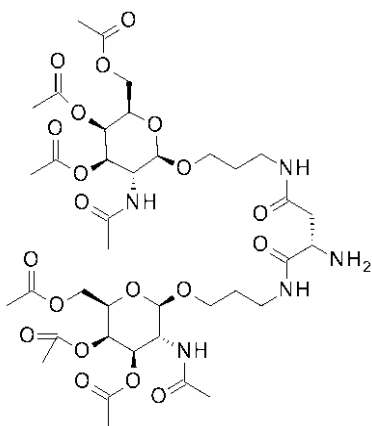
Calcd for  $C_{53}H_{69}N_5O_{22}$ :  $[M+H]^+$  1128, Found 1129,  $[M+Na]^+$  1151, Found 1151.

## 【 0 3 6 9】

(3 7 D) [(2R,3R,4R,5R,6R)-5-アセトアミド-6-[3-[[[(3S)-4-[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-アミノ-4-オキソ-プタノイル]アミノ]プロボキシ]-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 TFA塩 (化合物 3 7 D) の合成

## 【化 1 6 3】

30



40

工程 (3 7 C) で合成した化合物 (5.4g, 4.8mmol) の N,N-ジメチルホルムアミド (25ml) 溶液に、ペリリジン (0.57ml, 5.7mmol) を加え、室温で 1.5 時間撹拌した。反応終了後、トリフルオロ酢酸 (0.31ml) を加えた。反応液を適量のジエチルエーテルに添加し、沈殿した残渣を得た。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、溶媒を減圧留去した。アモルファス状の目的物 (2.7 g、収率 55%) を得た。

$^1H$ -NMR (DMSO- $D_6$ ) : 8.34-8.26 (1H, m), 8.14-8.05 (4H, m), 7.90-7.82 (2H, m), 5.

50

25-5.21 (2H, m), 5.00-4.92 (2H, m), 4.50-4.45 (2H, m), 4.08-3.82 (5H, m), 3.80-3.63 (3H, m), 3.51-3.39 (3H, m), 3.19-3.02 (4H, m), 2.70-2.53 (2H, m), 2.14-2.05 (6H, m), 2.04-1.96 (6H, m), 1.93-1.86 (6H, m), 1.84-1.75 (6H, m), 1.69-1.57 (4H, m).

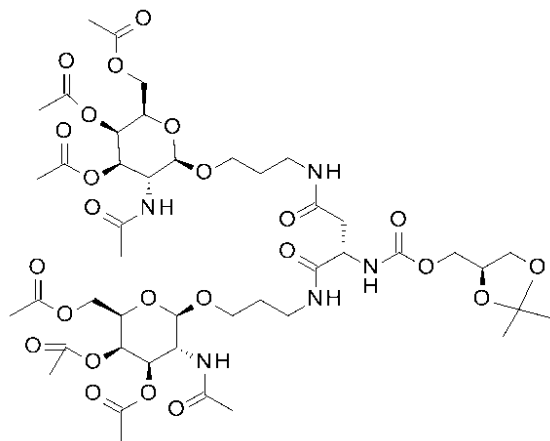
Calcd for  $C_{38}H_{59}N_5O_{20}$ :  $[M+H]^+$  905, Found 906.

【 0 3 7 0 】

( 3 7 E ) [(2R,3R,4R,5R,6R)-5-アセトアミド-6-[3-[[[(3S)-4-[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-[[[(4R)-2,2-ジメチル-1,3-ジオキソラン-4-イル]メトキシカルボニルアミノ]-4-オキソ-ブタノイル]アミノ]プロボキシ]-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 3 7 E) の合成

10

【化 1 6 4】



20

工程 ( 3 7 D ) で合成した化合物(2.7g, 2.6mmol)を用い、工程 ( 3 5 C ) と同様にして、アモルファス状の目的物0.77 g、収率27%)を得た。

$^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ ) : 7.19-7.12 (1H, m), 6.96-6.85 (2H, m), 6.83-6.75 (1H, m), 6.16 (1H, d,  $J = 9.1$  Hz), 5.41-5.34 (2H, m), 5.25-5.08 (2H, m), 4.66 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz), 4.51-3.87 (16H, m), 3.79-3.72 (1H, m), 3.64-3.14 (6H, m), 3.01-2.91 (1H, m), 2.68-2.57 (1H, m), 2.22-2.14 (6H, m), 2.10-1.93 (18H, m), 1.90-1.63 (4H, m), 1.42 (3H, s), 1.35 (3H, s).

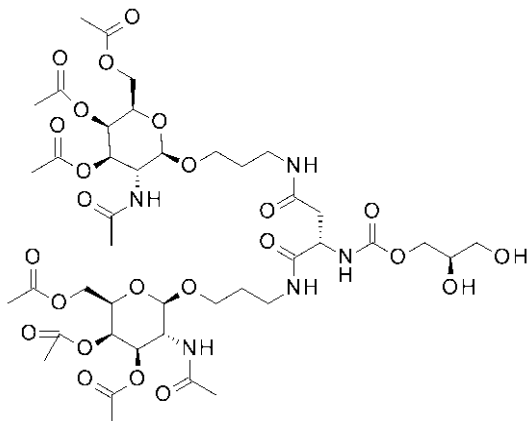
30

Calcd for  $C_{45}H_{69}N_5O_{24}$ :  $[M+Na]^+$  1086, Found 1086.

【 0 3 7 1 】

( 3 7 F ) [(2R,3R,4R,5R,6R)-5-アセトアミド-6-[3-[[[(3S)-4-[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-[[[(2R)-2,3-ジヒドロキシプロボキシ]カルボニルアミノ]-4-オキソ-ブタノイル]アミノ]プロボキシ]-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 3 7 F) の合成

## 【化 1 6 5】



10

工程 ( 3 7 E ) で合成した化合物(0.77g, 0.72mmol)を用い、工程 ( 3 5 D ) と同様に  
して、目的物 3 7 Fを含む粗生成物(0.74g)を得た。これ以上精製せずに次の反応に用いた。

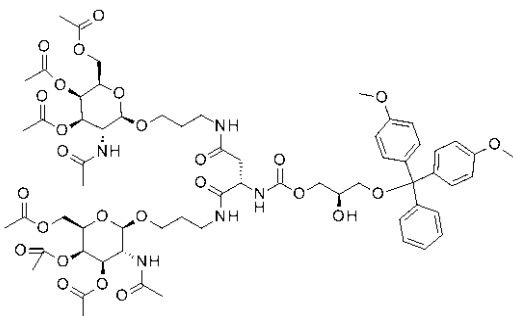
Calcd for  $C_{42}H_{65}N_5O_{24}$ :  $[M+H]^+$  1024, Found 1024.

## 【 0 3 7 2】

( 3 7 G ) [(2R,3R,4R,5R,6R)-5-アセトアミド-6-[3-[[[(3S)-4-[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-[[[(2R)-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-プロボキシ]カルボニルアミノ]-4-オキシ-ブタノイル]アミノ]プロボキシ]-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 3 7 G) の合成

20

## 【化 1 6 6】



30

工程 ( 3 7 F ) で合成した化合物(0.74g)を用い、工程 ( 3 5 E ) と同様にして、アモ  
ルファス状の目的物(0.63 g、収率66%(2工程))を得た。

$^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ ) : 7.44-7.38 (2H, m), 7.33-7.09 (9H, m), 6.86-6.69 (6H, m), 6.22  
(1H, d,  $J = 7.9$  Hz), 5.38-5.33 (2H, m), 5.23-5.09 (2H, m), 4.66 (1H, d,  $J = 7.9$   
Hz), 4.54-4.42 (2H, m), 4.24-3.87 (16H, m), 3.79 (6H, s), 3.57-3.14 (8H, m), 2.  
97-2.87 (1H, m), 2.66-2.50 (1H, m), 2.19-2.13 (6H, m), 2.08-1.91 (10H, m), 1.87-  
1.65 (4H, m).

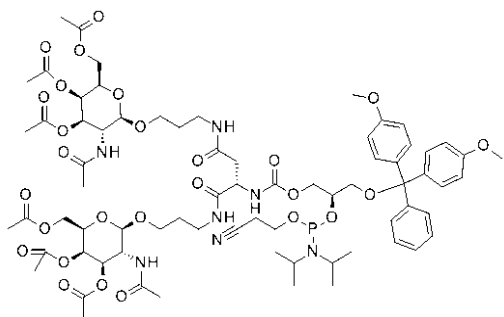
40

Calcd for  $C_{63}H_{83}N_5O_{26}$ :  $[M+Na]^+$  1349, Found 1349.

## 【 0 3 7 3】

( 3 7 H ) [(2R,3R,4R,5R,6R)-5-アセトアミド-6-[3-[[[(3S)-4-[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-[[[(2R)-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-プロボキシ]カルボニルア  
ミノ]-4-オキシ-ブタノイル]アミノ]プロボキシ]-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 3 7 H) の合成

## 【化 1 6 7】



10

工程 ( 3 7 G ) で合成した化合物 (0.63g, 0.48mmol) を用い、工程 ( 3 5 F ) と同様にし  
て、アモルファス状の目的物 (0.52 g、収率71%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) : 7.45-7.38 (2H, m), 7.34-6.95 (9H, m), 6.88-6.62 (6H, m), 6.18-6.10 (1H, m), 5.39-5.32 (2H, m), 5.24-5.05 (2H, m), 4.69-4.60 (1H, m), 4.52-4.41 (2H, m), 4.34-2.90 (32H, m), 2.68-2.42 (3H, m), 2.20-2.14 (6H, m), 2.09-1.91 (18H, m), 1.87-1.66 (4H, m), 1.21-0.97 (12H, m).

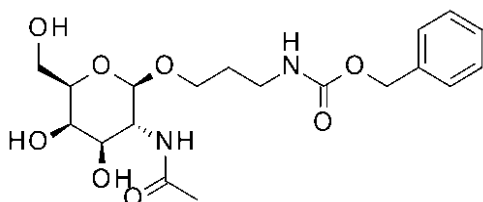
## 【 0 3 7 4】

(参考例 3 8)

( 3 8 A ) 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 3 8 A ) の合成

20

## 【化 1 6 8】



工程 ( 3 7 A ) 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 3 8 A 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。

30

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{DMSO-D}_6$ ) : 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).

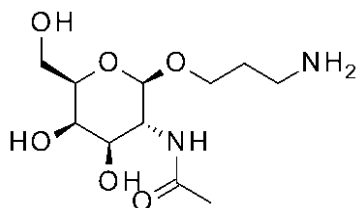
Calcd for  $\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_8$ :  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  435, Found 435.

## 【 0 3 7 5】

( 3 8 B ) 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 3 8 B) の合成

40

## 【化 1 6 9】



工程 ( 3 8 A ) 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

50



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 38B 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。

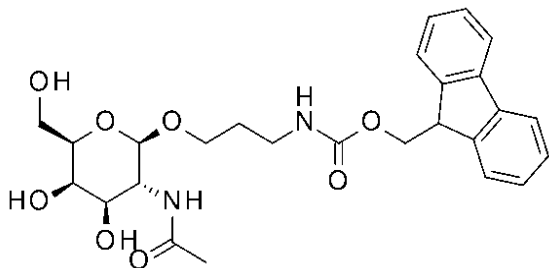
<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O) : 4.27 (1H, d, J = 8.5 Hz), 3.90-3.50 (8H, m), 2.93 (2H, t, J = 7.0 Hz), 1.89 (3H, s), 1.82-1.75 (2H, m).

【0376】

(38C) 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 38C) の合成

10

【化170】



工程 (38B) 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(21.1g, 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 38C を含む粗生成物(22.9g)を得た。

20

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-D<sub>6</sub>) : 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).

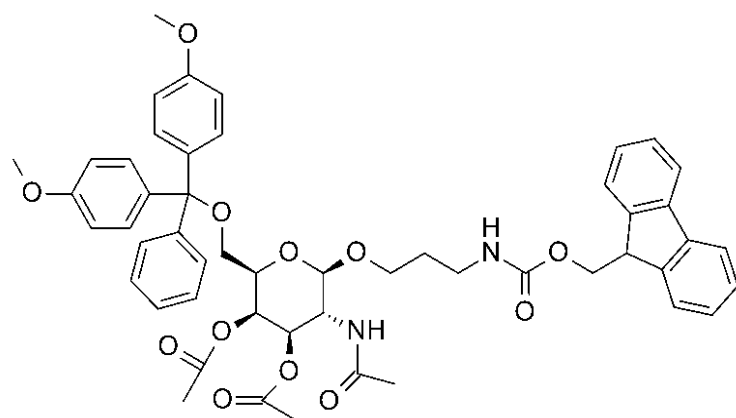
30

Calcd for C<sub>26</sub>H<sub>32</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>: [M+Na]<sup>+</sup> 523, Found 523.

【0377】

(38D) [(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)プロボキシ]テトラヒドロピラン-3-イル] アセテート (化合物 38D) の合成

【化171】



40

工程 (38C) 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 (1.27 g, 3.7mmol) を加え、室温で30分攪拌した。続いて

50

、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 3 8 D (2.8 g、quant.)を得た。

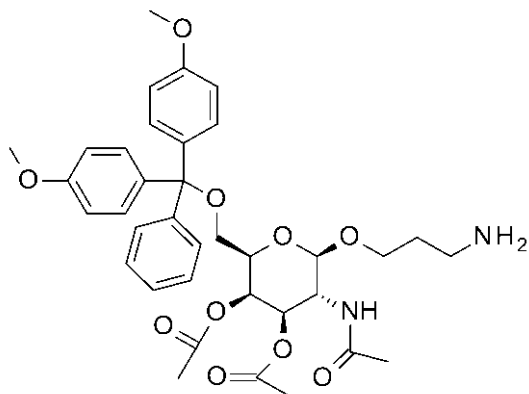
$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) : 7.77 (2H, d,  $J = 7.3$  Hz), 7.62 (2H, d,  $J = 7.3$  Hz), 7.43-7.18 (13H, m), 6.83-6.79 (4H, m), 6.03 (1H, d,  $J = 9.1$  Hz), 5.55 (1H, d,  $J = 3.0$  Hz), 5.14-5.03 (2H, m), 4.46-4.43 (3H, m), 4.24-4.04 (2H, m), 3.97-3.91 (1H, m), 3.85-3.82 (1H, m), 3.77 (6H, 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.

【0378】

(38E) [(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 3 8 D) の合成

【化172】



工程(38D)で合成した化合物(2.49g, 2.8mmol)のジクロロメタン(8ml)溶液に、ピペリジン(0.45ml, 4.5mmol)を加え、室温で攪拌した。反応が完了しない場合は、適宜ピペリジンを追加した。反応終了後、溶媒を減圧留去し、粗生成物を得た。これをNH-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 85：15, v/v)で精製し、アモルファス状の目的物 3 8 E (1.48 g、収率79%)を得た。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) : 7.39-7.18 (9H, m), 6.83-6.80 (4H, m), 5.55 (1H, d,  $J = 3.0$  Hz), 5.51 (1H, d,  $J = 9.1$  Hz), 5.27 (1H, dd,  $J = 11.2, 3.3$  Hz), 4.64 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz), 3.98-3.90 (2H, m), 3.84-3.82 (1H, m), 3.79 (6H, s), 3.75-3.74 (1H, m), 3.58-3.56 (1H, m), 3.35 (1H, dd,  $J = 9.1, 5.4$  Hz), 3.07 (1H, t,  $J = 8.5$  Hz), 2.82-2.74 (4H, m), 2.01 (3H, s), 1.96 (3H, s), 1.89 (3H, s), 1.74-1.69 (2H, m).

Calcd for  $\text{C}_{37}\text{H}_{45}\text{NO}_{10}$ :  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  687, Found 687.

【0379】

(参考例 3 9)

(39A) ベンジル 2-[[2-ベンジルオキシ-3-[(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 3 9 A) の合成

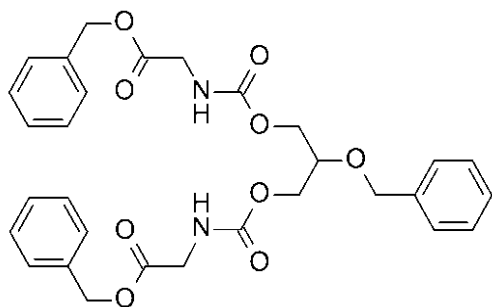
10

20

30

40

## 【化 1 7 3】



10

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、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39A(6.5g、収率84%)を得た。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) : 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).

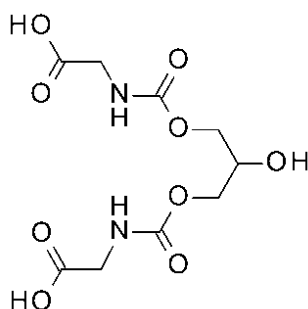
20

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

## 【0 3 8 0】

(39B) 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39B)の合成

## 【化 1 7 4】



30

工程(39A)で合成した化合物39A(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39B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。

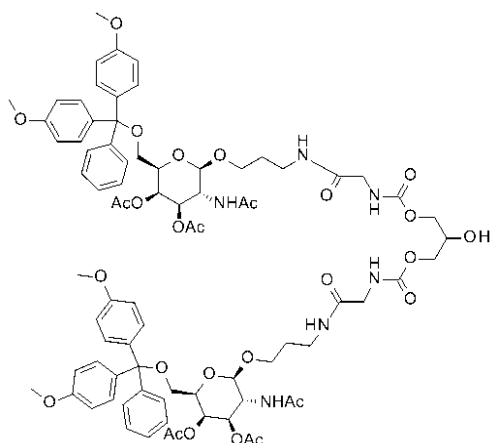
40

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ) : 4.21-4.14 (5H, m), 3.86 (4H, s).

## 【0 3 8 1】

(39C) [(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-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39C)の合成

## 【化 1 7 5】



10

工程 ( 3 9 B ) で合成した化合物 3 9 B (0.31g, 1.05mmol)、工程 ( 3 8 E ) で合成した化合物 3 8 E (1.47g, 2.21mmol)、N,N-ジイソプロピルエチルアミン (0.91mL, 5.27mmol) のN,N-ジメチルホルムアミド(9ml)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(11.3g, 29.6mmol)を加え、室温で3時間撹拌した。反応終了後、反応液をジエチルエーテル(計185ml)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 3 9 C (1.05 g、収率63%) を固体として得た。

20

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) : 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).

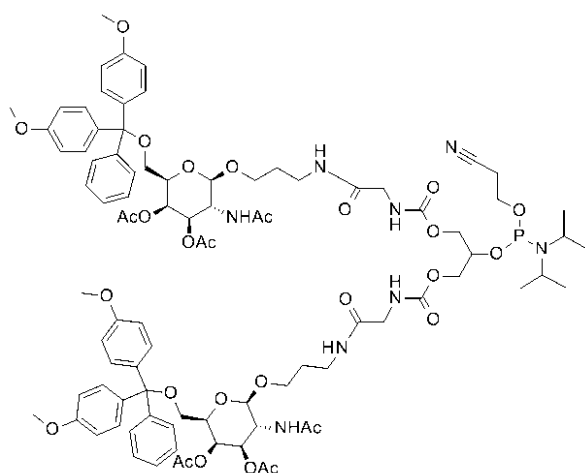
Calcd for C<sub>81</sub>H<sub>98</sub>N<sub>6</sub>O<sub>27</sub>: [M+Na]<sup>+</sup> 1611, Found 1611

## 【 0 3 8 2】

( 3 9 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-プロボキシ]カルボニルアミノ]アセチル]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 3 9 D) の合成

30

## 【化 1 7 6】



40

工程 ( 3 9 C ) で合成した化合物 3 9 C (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 μl, 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

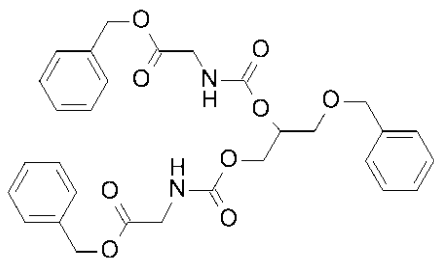
50

ジト (79  $\mu$ 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  $\mu$ 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 39D (0.34g、収率64%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) : 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).

【0383】

(40A) 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40A) の合成  
【化177】

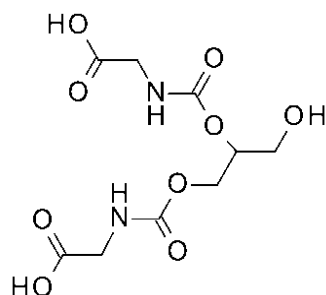


2-ベンジルオキシ-1,3-プロパンジオールの代わりに、(+/-)-3-ベンジルオキシ-1,2-プロパンジオール (1.0g, 5.5mmol) を用い、工程 (39A) と同様にして、目的物 40A (2.8g、収率90%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) : 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

【0384】

(40B) 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40B) の合成  
【化178】



化合物 39A の代わりに、化合物 40A (2.8g, 5.0mmol) を用い、工程 (39B) と同様にして、目的物 40B を含む粗生成物 (1.2g) を得た。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ) : 4.32-4.19 (3H, m), 3.94-3.87 (4H, m), 3.81-3.71 (2H, m).

【0385】

(40C) [(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40C) の合成

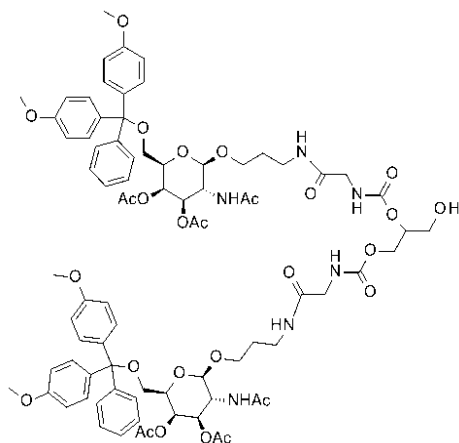
10

20

30

40

## 【化 1 7 9】



10

化合物 3 9 B の代わりに、化合物 4 0 B (0.31g, 1.05mmol) を用い、工程 ( 3 9 C ) と同様に、目的物 4 0 C ( 0.74 g、収率44%) を得た。

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) : 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 (4H, m), 2.01 (6H, s), 1.95 (6H, s), 1.88 (6H, s), 1.77-1.68 (4H, m).

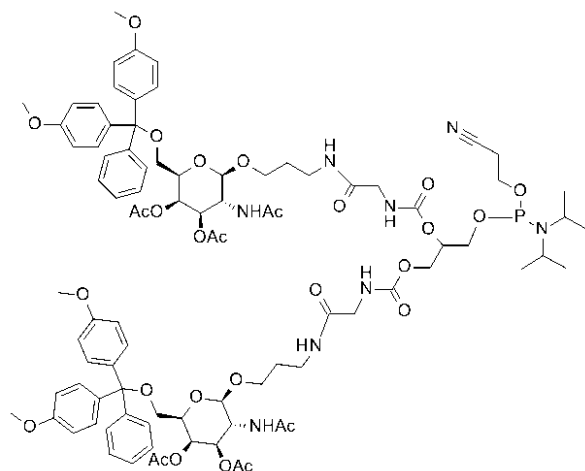
Calcd for C<sub>81</sub>H<sub>98</sub>N<sub>6</sub>O<sub>27</sub>: [M+Na]<sup>+</sup> 1611, Found 1611

## 【 0 3 8 6】

20

( 4 0 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-オキシ-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-プロボキシ]カルボニルアミノ]アセチル]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 4 0 D) の合成

## 【化 1 8 0】



30

化合物 3 9 C の代わりに、化合物 4 0 C (0.31g, 1.05mmol) を用い、工程 ( 3 9 D ) と同様に、目的物 4 0 D ( 0.60g、収率72%) を得た。

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) : 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 8 7】

( 実施例 1 3 1 )

HO-X<sup>1 6</sup> - A<sup>m1s</sup> - A<sup>e2s</sup> - U<sup>m1s</sup> - C<sup>m1s</sup> - C<sup>e2s</sup> - G<sup>m1s</sup> - A<sup>m1s</sup> - T<sup>e2s</sup> - G<sup>m1s</sup> - G<sup>m1s</sup> - C<sup>e2s</sup> - G<sup>m1</sup>

50

$s-A^{m1s}-A^{e2s}-G^{m1t}-H$  (配列番号 40)

Xの部分を $X^{16}$ と置き換えて、実施例91と同様に合成を行った。 $X^{16}$ の部分は参考例36で合成した化合物36Gを用い、1回縮合した。

【0388】

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: 6261.97)

【0389】

10

(実施例132)

$HO-X^{15}-X^{15}-X^{15}-A^{m1s}-A^{e2s}-U^{m1s}-C^{m1s}-C^{e2s}-G^{m1s}-A^{m1s}-T^{e2s}-G^{m1s}-G^{m1s}-C^{e2s}-G^{m1s}-A^{m1s}-A^{e2s}-G^{m1t}-H$  (配列番号 40)

Xの部分を $X^{15}$ と置き換えて、実施例91と同様に合成を行った。 $X^{15}$ の部分は参考例35で合成した化合物35Fを用い、3回縮合した。

【0390】

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: 6917.09)

20

【0391】

(実施例133)

$X^{18}-A^{m1s}-A^{e2s}-U^{m1s}-C^{m1s}-C^{e2s}-G^{m1s}-A^{m1s}-T^{e2s}-G^{m1s}-G^{m1s}-C^{e2s}-G^{m1s}-A^{m1s}-A^{e2s}-G^{m1t}-H$  (配列番号 40)

Xの部分を $X^{18}$ と置き換えて、実施例91と同様に合成を行った。 $X^{18}$ の部分は参考例39で合成した化合物39Dを用い、1回縮合した。

【0392】

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)

30

【0393】

(実施例134)

$HO-X^{15}-X^{15}-X^{15}-A^{e2s}-U^{m1s}-C^{m1s}-C^{e2s}-G^{m1s}-A^{m1s}-T^{e2s}-G^{m1s}-G^{m1s}-C^{e2s}-G^{m1s}-A^{m1s}-A^{e2s}-G^{m1s}-C^{e2t}-H$  (配列番号 44)

実施例132で使用した配列の代わりに上記の配列である15e\_005.1を用い、実施例132と同様に合成を行った。

【0394】

40

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: 6919.09)

【0395】

(実施例135)

$HO-X^{15}-X^{15}-X^{15}-U^{m1s}-C^{m1s}-C^{e2s}-G^{m1s}-A^{m1s}-T^{e2s}-G^{m1s}-G^{m1s}-C^{e2s}-G^{m1s}-A^{m1s}-A^{e2s}-G^{m1t}-C^{e2s}-U^{m1t}-H$  (配列番号 45)

実施例132で使用した配列の代わりに上記の配列である15e\_006.1を用い、実施例1

50

3 2 と同様に合成を行った。

【 0 3 9 6 】

本化合物の塩基配列は、Homo sapiens glucose-6-phosphatase catalytic subunit (G6 PC), 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: 6884.07)

【 0 3 9 7 】

(実施例 1 3 6 )

HO-X<sup>1 5</sup> - X<sup>1 5</sup> - X<sup>1 5</sup> - A<sup>m1s</sup> - A<sup>m1s</sup> - A<sup>e2s</sup> - U<sup>m1s</sup> - C<sup>m1s</sup> - C<sup>e2s</sup> - G<sup>m1s</sup> - A<sup>m1s</sup> - T<sup>e2s</sup> - G<sup>m1s</sup> - G<sup>m1s</sup> - C<sup>e2s</sup> - G<sup>m1s</sup> - A<sup>m1s</sup> - A<sup>e2s</sup> - G<sup>m1t</sup> - H (配列番号 4 2 )

10

実施例 1 3 2 で使用した配列の代わりに上記の配列である16e\_001を用い、実施例 1 3 2 と同様に合成を行った。

【 0 3 9 8 】

本化合物の塩基配列は、Homo sapiens glucose-6-phosphatase catalytic subunit (G6 PC), 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: 7276.10)

【 0 3 9 9 】

20

(実施例 1 3 7 )

HO-X<sup>1 5</sup> - X<sup>1 5</sup> - X<sup>1 5</sup> - A<sup>m1s</sup> - A<sup>m1s</sup> - A<sup>m1s</sup> - A<sup>e2s</sup> - U<sup>m1s</sup> - C<sup>m1s</sup> - C<sup>e2s</sup> - G<sup>m1s</sup> - A<sup>m1s</sup> - T<sup>e2s</sup> - G<sup>m1s</sup> - G<sup>m1s</sup> - C<sup>e2s</sup> - G<sup>m1s</sup> - A<sup>m1s</sup> - A<sup>e2s</sup> - G<sup>m1t</sup> - H (配列番号 4 6 )

実施例 1 3 2 で使用した配列の代わりに上記の配列である17e\_001を用い、実施例 1 3 2 と同様に合成を行った。

【 0 4 0 0 】

本化合物の塩基配列は、Homo sapiens glucose-6-phosphatase catalytic subunit (G6 PC), 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108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: 7636.19)

30

【 0 4 0 1 】

(実施例 1 3 8 )

X<sup>1 8</sup> - A<sup>e2s</sup> - U<sup>m1s</sup> - C<sup>m1s</sup> - C<sup>e2s</sup> - G<sup>m1s</sup> - A<sup>m1s</sup> - T<sup>e2s</sup> - G<sup>m1s</sup> - G<sup>m1s</sup> - C<sup>e2s</sup> - G<sup>m1s</sup> - A<sup>m1s</sup> - A<sup>e2s</sup> - G<sup>m1s</sup> - C<sup>e2t</sup> - H (配列番号 4 4 )

実施例 1 3 3 で使用した配列の代わりに上記の配列である15e\_005.1を用い、実施例 1 3 3 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 (G6 PC), 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: 6250.00)

40

【 0 4 0 2 】

(実施例 1 3 9 )

X<sup>1 8</sup> - U<sup>m1s</sup> - C<sup>m1s</sup> - C<sup>e2s</sup> - G<sup>m1s</sup> - A<sup>m1s</sup> - T<sup>e2s</sup> - G<sup>m1s</sup> - G<sup>m1s</sup> - C<sup>e2s</sup> - G<sup>m1s</sup> - A<sup>m1s</sup> - A<sup>e2s</sup> - G<sup>m1s</sup> - C<sup>e2s</sup> - U<sup>m1t</sup> - H (配列番号 4 5 )

実施例 1 3 3 で使用した配列の代わりに上記の配列である15e\_006.1を用い、実施例 1 3 3 と同様に合成を行った。

【 0 4 0 3 】

本化合物の塩基配列は、Homo sapiens glucose-6-phosphatase catalytic subunit (G6

50



PC), 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:6214.96)

【0404】

(実施例140)

$X^{18} - A^{m1s} - A^{m1s} - A^{e2s} - U^{m1s} - C^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{m1s} - T^{e2s} - G^{m1s} - G^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{m1s} - A^{e2s} - G^{m1t} - H$  (配列番号42)

実施例133で使用した配列の代わりに上記の配列である16e\_001を用い、実施例133と同様に合成を行った。

10

【0405】

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:6607.02)

【0406】

(実施例141)

$X^{18} - A^{m1s} - A^{e2s} - U^{m1s} - C^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{m1s} - T^{e2s} - G^{m1s} - G^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{m1s} - A^{e2s} - G^{m1s} - C^{e2t} - H$  (配列番号47)

20

実施例133で使用した配列の代わりに上記の配列である16e\_002を用い、実施例133と同様に合成を行った。

【0407】

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:6609.03)

【0408】

(実施例142)

$X^{18} - A^{e2s} - U^{m1s} - C^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{m1s} - T^{e2s} - G^{m1s} - G^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{m1s} - A^{e2s} - G^{m1s} - C^{e2s} - U^{m1t} - H$  (配列番号48)

30

実施例133で使用した配列の代わりに上記の配列である16e\_003を用い、実施例133と同様に合成を行った。

【0409】

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:6586.00)

40

【0410】

(実施例143)

$X^{18} - A^{m1s} - A^{e2s} - U^{m1s} - C^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{e2s} - U^{m1s} - G^{m1s} - G^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{m1s} - A^{e2s} - G^{m1t} - H$  (配列番号40)

実施例133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133と同様に合成を行った。

【0411】

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

50

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：6233.97）

【0412】

（実施例144）

$X^{18} - A^{e2s} - U^{m1s} - C^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{e2s} - U^{m1s} - G^{m1s} - G^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{m1s} - A^{e2s} - G^{m1s} - C^{e2t} - H$ （配列番号44）

実施例133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133と同様に合成を行った。

【0413】

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）

【0414】

（実施例145）

$X^{18} - U^{m1s} - C^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{e2s} - U^{m1s} - G^{m1s} - G^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{m1s} - A^{e2s} - G^{m1s} - C^{e2s} - U^{m1t} - H$ （配列番号45）

実施例133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133と同様に合成を行った。

【0415】

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）

【0416】

（実施例146）

$X^{18} - A^{m1s} - A^{m1s} - A^{e2s} - U^{m1s} - C^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{e2s} - U^{m1s} - G^{m1s} - G^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{m1s} - A^{e2s} - G^{m1t} - H$ （配列番号42）

実施例133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133と同様に合成を行った。

【0417】

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）

【0418】

（実施例147）

$X^{18} - A^{m1s} - A^{e2s} - U^{m1s} - C^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{e2s} - U^{m1s} - G^{m1s} - G^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{m1s} - A^{e2s} - G^{m1s} - C^{e2t} - H$ （配列番号47）

実施例133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133と同様に合成を行った。

【0419】

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）

10

20

30

40

50

## 【 0 4 2 0 】

( 実施例 1 4 8 )

X<sup>18</sup> - A<sup>e2s</sup> - U<sup>m1s</sup> - C<sup>m1s</sup> - C<sup>e2s</sup> - G<sup>m1s</sup> - A<sup>e2s</sup> - U<sup>m1s</sup> - G<sup>m1s</sup> - G<sup>m1s</sup> - C<sup>e2s</sup> - G<sup>m1s</sup> - A<sup>m1s</sup> - A<sup>e2s</sup> - G<sup>m1s</sup> - C<sup>e2s</sup> - U<sup>m1t</sup> - H ( 配列番号 4 8 )

実施例 1 3 3 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 1 3 3 と同様に合成を行った。

## 【 0 4 2 1 】

本化合物の塩基配列は、Homo sapiens glucose-6-phosphatase catalytic subunit (G6 PC), 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 )

## 【 0 4 2 2 】

( 実施例 1 4 9 )

HO-X<sup>16</sup> - A<sup>m1s</sup> - A<sup>e2s</sup> - U<sup>m1s</sup> - C<sup>m1s</sup> - C<sup>e2s</sup> - G<sup>m1s</sup> - A<sup>e2s</sup> - U<sup>m1s</sup> - G<sup>m1s</sup> - G<sup>m1s</sup> - C<sup>e2s</sup> - G<sup>m1s</sup> - A<sup>m1s</sup> - A<sup>e2s</sup> - G<sup>m1t</sup> - H ( 配列番号 4 0 )

実施例 1 3 1 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 1 3 1 と同様に合成を行った。

## 【 0 4 2 3 】

本化合物の塩基配列は、Homo sapiens glucose-6-phosphatase catalytic subunit (G6 PC), 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 : 6247.99 )

## 【 0 4 2 4 】

( 実施例 1 5 0 )

X<sup>19</sup> - A<sup>m1s</sup> - A<sup>e2s</sup> - U<sup>m1s</sup> - C<sup>m1s</sup> - C<sup>e2s</sup> - G<sup>m1s</sup> - A<sup>m1s</sup> - T<sup>e2s</sup> - G<sup>m1s</sup> - G<sup>m1s</sup> - C<sup>e2s</sup> - G<sup>m1s</sup> - A<sup>m1s</sup> - A<sup>e2s</sup> - G<sup>m1t</sup> - H ( 配列番号 4 0 )

X の部分を X<sup>19</sup> と置き換えて、実施例 9 1 と同様に合成を行った。X<sup>19</sup> の部分は参考例 4 0 で合成した化合物 4 0 D を用い、1 回縮合した。

## 【 0 4 2 5 】

本化合物の塩基配列は、Homo sapiens glucose-6-phosphatase catalytic subunit (G6 PC), 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 : 6247.99 )

## 【 0 4 2 6 】

( 実施例 1 5 1 )

X<sup>17</sup> - A<sup>m1s</sup> - A<sup>e2s</sup> - U<sup>m1s</sup> - C<sup>m1s</sup> - C<sup>e2s</sup> - G<sup>m1s</sup> - A<sup>m1s</sup> - T<sup>e2s</sup> - G<sup>m1s</sup> - G<sup>m1s</sup> - C<sup>e2s</sup> - G<sup>m1s</sup> - A<sup>m1s</sup> - A<sup>e2s</sup> - G<sup>m1t</sup> - H ( 配列番号 4 0 )

X の部分を X<sup>17</sup> と置き換えて、実施例 9 1 と同様に合成を行った。X<sup>17</sup> の部分は参考例 3 7 で合成した化合物 3 7 H を用い、1 回縮合した。

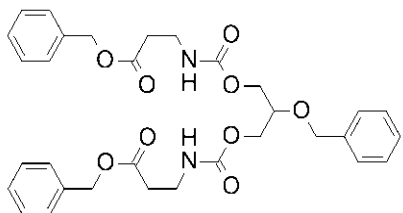
## 【 0 4 2 7 】

本化合物の塩基配列は、Homo sapiens glucose-6-phosphatase catalytic subunit (G6 PC), 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 : 6204.97 )

( 参考例 4 1 )

(41A) 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41A)の合成

【化181】



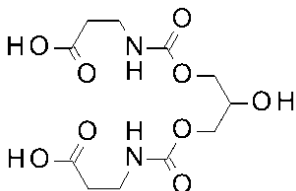
10

工程(39A)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(39A)と同様にして、目的物41A(1.62g、収率80%)を得た。

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) : 7.39-7.27 (15H, m), 5.21 (2H, br s), 5.14 (4H, s), 4.63 (2H, 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<sub>32</sub>H<sub>36</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub>: [M+H]<sup>+</sup> 593, Found 593, [M+Na]<sup>+</sup> 615, Found 615

(41B) 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41B)の合成

【化182】



20

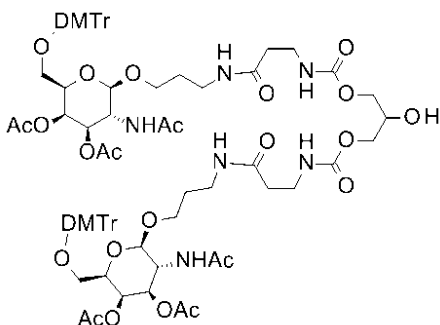
工程(39B)で使用した化合物39Aのかわりに、化合物41A(1.62g, 2.73mmol)を用い、工程(39B)と同様にして、目的物41B(0.89g、quant)を得た。

<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O) : 4.22-4.04 (5H, m), 3.46-3.32 (4H, m), 2.57 (4H, t, J = 6.7 Hz).

30

(41C) [(2R,3R,4R,5R,6R)-5-アセトアミド-6-[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41C)の合成

【化183】



40

工程(39C)で使用した化合物39Bのかわりに、化合物41B(300mg, 0.93mmol)を用い、工程(39C)と同様にして、目的物41C(950mg、収率63%)を得た。

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) : 7.32-7.24 (18H, m), 6.82-6.80 (8H, m), 6.64-6.61 (1H, br), 6.

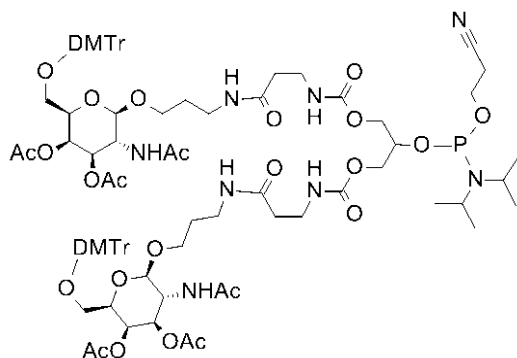
50

27-6.24 (1H, br), 5.91-5.88 (1H, br), 5.56 (2H, d, J = 3.0 Hz), 5.10 (2H, 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]<sup>+</sup> 1638, Found 1638

(41D) [(2R,3R,4R,5R,6R)-5-アセトアミド-6-[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41D) の合成

【化184】



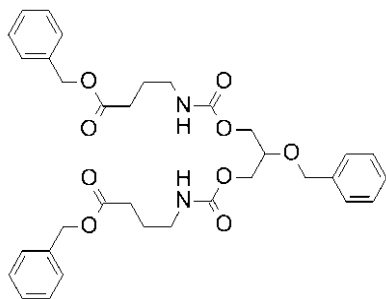
工程(39D)で使用した化合物39Cのかわりに、化合物41C (945mg, 0.58mmol) を用い、工程(39D)と同様にして、目的物41D (638mg、収率60%)を得た。

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) : 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).

(参考例42)

(42A) 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]プロポキシ]カルボニルアミノ]ブタン酸ベンジルエステル (化合物42A) の合成

【化185】



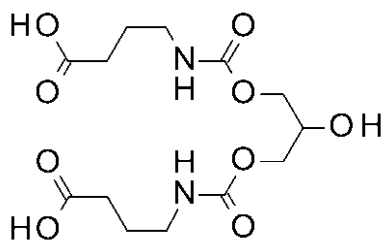
工程(39A)で使用したグリシンベンジルエステル TFA塩のかわりに、4-アミノブタン酸ベンジルエステルTFA塩 (1.30g, 4.21mmol) を用い、工程(39A)と同様にして、目的物42A (0.85g、収率78%)を得た。

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) : 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).

Calcd for  $C_{34}H_{40}N_2O_9$ :  $[M+H]^+$  621, Found 622,  $[M+Na]^+$  643, Found 644

( 4 2 B ) 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-プロボキシ]カルボニルアミノ]ブタン酸 (化合物 4 2 B) の合成

【化 1 8 6】



10

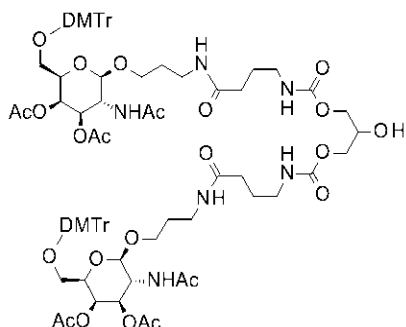
工程 ( 3 9 B ) で使用した化合物 3 9 A のかわりに、化合物 4 2 A (0.85g, 1.4mmol) を用い、工程 ( 3 9 B ) と同様にして、目的物 4 2 B (0.49g, quant) を得た。

$^1H$ -NMR (D<sub>2</sub>O) : 4.19-4.05 (5H, m), 3.19-3.12 (4H, m), 2.36-2.27 (4H, m), 1.83-1.73 (4H, m).

( 4 2 C ) [(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-プロボキシ]カルボニルアミノ]ブタノイルアミノ]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 4 2 C) の合成

20

【化 1 8 7】



30

工程 ( 3 9 C ) で使用した化合物 3 9 B のかわりに、化合物 4 2 B (300mg, 0.86mmol) を用い、工程 ( 3 9 C ) と同様にして、目的物 4 2 C (1.16g, 収率82%) を得た。

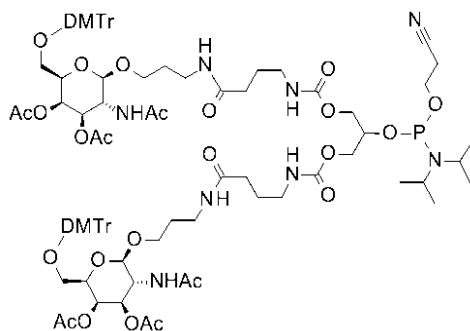
$^1H$ -NMR (CDCl<sub>3</sub>) : 7.31-7.24 (18H, m), 6.82-6.80 (8H, m), 6.68-6.65 (3H, m), 5.91-5.84 (1H, m), 5.56 (2H, d, J = 3.0 Hz), 5.10 (2H, d, J = 10.9 Hz), 4.45 (2H, d, J = 8.5 Hz), 4.23-3.12 (40H, m), 2.31-2.22 (4H, m), 2.01 (6H, s), 1.98 (6H, s), 1.90 (6H, s), 1.81-1.68 (8H, m).

Calcd for  $C_{85}H_{106}N_6O_{27}$ :  $[M+Na]^+$  1666, Found 1667

40

( 4 2 D ) [(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-プロボキシ]カルボニルアミノ]ブタノイルアミノ]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 4 2 D) の合成

## 【化 1 8 8】



10

工程 (3 9 D) で使用した化合物 3 9 C のかわりに、化合物 4 2 C (1.16g, 0.71mmol) を用い、工程 (3 9 D) と同様にして、目的物 4 2 D (795mg、収率61%) を得た。

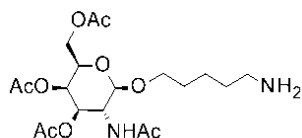
$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) : 7.40-7.17 (18H, m), 6.85-6.77 (8H, m), 6.72-5.65 (5H, m), 5.56 (2H, d,  $J = 3.0$  Hz), 5.11-5.03 (2H, m), 4.46-4.35 (2H, m), 4.25-3.02 (42H, m), 2.65 (2H, t,  $J = 6.0$  Hz), 2.39-2.16 (4H, m), 2.02 (6H, s), 1.99-1.94 (6H, m), 1.90 (6H, s), 1.87-1.59 (8H, m), 1.18 (12H, d,  $J = 6.7$  Hz).

## (参考例 4 3)

(4 3 A) [(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 4 3 A) の合成

20

## 【化 1 8 9】



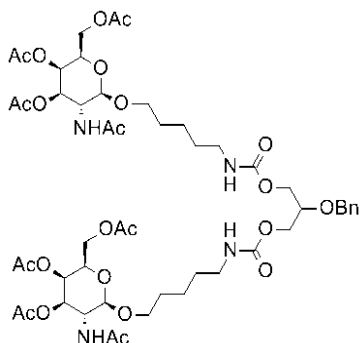
工程 (2 1 A) で合成した化合物 2 1 A (3.87 g, 6.83 mmol) をテトラヒドロピラン (32ml) / 1N 塩酸 (8ml) に溶解した。10%パラジウム/炭素(wet) (2g) を加え、水素雰囲気下、室温で激しく攪拌した。反応終了後、ろ過し、得られた通過液を減圧留去して目的物 4 3 A (3.1g、収率97%) の粗生成物を得た。これ以上精製せずに次の反応に用いた。

Calcd for  $\text{C}_{19}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_9$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  433, Found 433.

30

(4 3 B) [(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 4 3 B) の合成

## 【化 1 9 0】



40

2-ベンジルオキシ-1,3-プロパンジオール(600mg, 3.29mmol)、クロロギ酸4-ニトロフェニル(1.39g, 6.91mmol) をテトラヒドロフラン(22ml)に溶解させ、ピリジン(1.1ml, 13.2mmol)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(16ml)

50

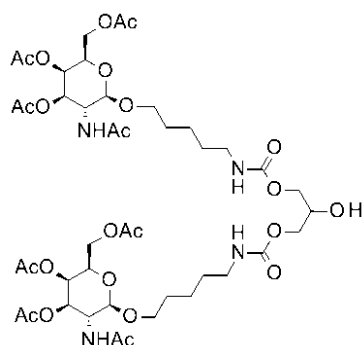
l)加えた。続いて、工程(43A)で合成した化合物(43A)(3.09g,6.59mmol)のテトラヒドロフラン(15ml)/ジクロロメタン(5ml)溶液とN,N-ジイソプロピルエチルアミン(3.4mL, 19.8mmol)を加え、40℃で2時間攪拌した。反応終了後、溶媒を減圧留去した。ジクロロメタンを加え、有機層を0.5N塩酸、飽和食塩水、0.2N水酸化ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥、濾過し、溶媒を減圧留去し、粗生成物を得た。これをシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ジクロロメタン:メタノール=100:0 90:10, v/v)で精製し、目的物43Bをメインに含む混合物(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.

10

(43C) [(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-プロボキシ]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43C)の合成

【化191】



20

工程(43B)で得られた43B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43C(1.38 g,収率72%)を固体として得た。

30

$^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ ) : 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).

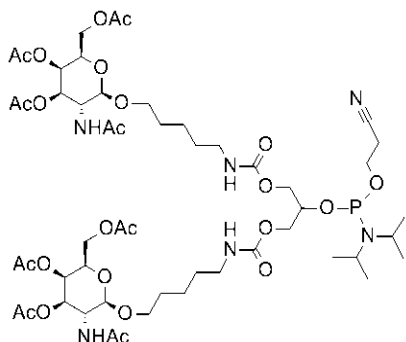
Calcd for  $C_{43}H_{68}N_4O_{23}$  :  $[M+H]^+$  1009, Found 1009.  $[M+Na]^+$  1031, Found 1031.

(43D) [(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43D)の合成

40



## 【化 1 9 2】



10

工程 (3 9 D) で使用した化合物 3 9 C のかわりに、化合物 4 3 C (1.38g, 1.37mmol) を用い、工程 (3 9 D) と同様にして、目的物 4 3 D (850mg、収率51%) を得た。

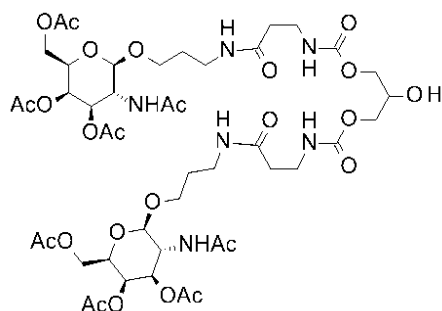
$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) : 5.95-5.89 (1H, m), 5.38-5.26 (4H, m), 5.20-5.16 (1H, m), 5.00-4.95 (1H, m), 4.71-4.68 (2H, m), 4.36-3.44 (22H, m), 3.15 (4H, q,  $J = 6.4$  Hz), 2.67 (2H, t,  $J = 6.3$  Hz), 2.15 (6H, s), 2.05 (6H, s), 2.01 (6H, s), 1.96 (6H, s), 1.67-1.33 (12H, m), 1.18 (12H, d,  $J = 6.7$  Hz).

## (参考例 4 4)

(4 4 A) [(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]-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 4 4 A) の合成

20

## 【化 1 9 3】



30

工程 (4 1 B) で合成した化合物 4 1 B (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 (3 7 B) で合成した化合物 3 7 B (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 4 4 A (408mg、収率60%) を得た。

40

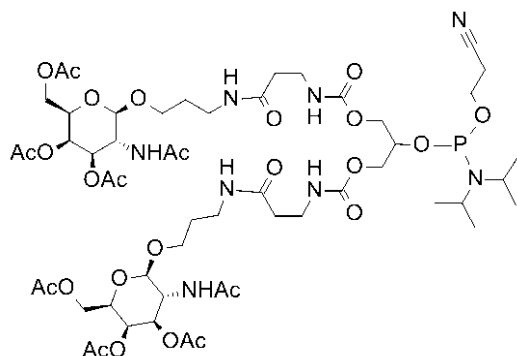
$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) : 6.76 (2H, br), 6.69-6.63 (2H, m), 5.96 (1H, br), 5.36 (2H, d,  $J = 3.0$  Hz), 5.13-5.08 (2H, m), 4.53 (2H, d,  $J = 8.5$  Hz), 4.25-3.07 (27H, m), 2.51-2.44 (4H, m), 2.17 (6H, s), 2.06 (6H, s), 2.02 (6H, s), 2.00 (6H, s), 1.86-1.73 (4H, m).

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.

(4 4 B) [(2R,3R,4R,5R,6R)-5-アセトアミド-6-[3-[3-[3-[3-[3-[(2R,3R,4R,5R,6R)-

50

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]-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 4 4 B) の合成  
【化 1 9 4】



10

工程 (3 9 D) で使用した化合物 3 9 C のかわりに、化合物 4 4 A (1.53g, 1.40mmol) を用い、工程 (3 9 D) と同様にして、目的物 4 4 B (510mg、収率28%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) : 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

( 実施例 1 5 2 )

$\text{X}^{20} - \text{A}^{\text{m1s}} - \text{A}^{\text{e2s}} - \text{U}^{\text{m1s}} - \text{C}^{\text{m1s}} - \text{C}^{\text{e2s}} - \text{G}^{\text{m1s}} - \text{A}^{\text{e2s}} - \text{U}^{\text{m1s}} - \text{G}^{\text{m1s}} - \text{G}^{\text{m1s}} - \text{C}^{\text{e2s}} - \text{G}^{\text{m1s}} - \text{A}^{\text{m1s}} - \text{A}^{\text{e2s}} - \text{G}^{\text{m1t}} - \text{H}$  ( 配列番号 4 0 )

$\text{X}^{18}$  の部分を  $\text{X}^{20}$  と置き換えて、実施例 1 4 3 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 (G6 PC), 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 )

30

( 実施例 1 5 3 )

$\text{X}^{20} - \text{A}^{\text{e2s}} - \text{U}^{\text{m1s}} - \text{C}^{\text{m1s}} - \text{C}^{\text{e2s}} - \text{G}^{\text{m1s}} - \text{A}^{\text{e2s}} - \text{U}^{\text{m1s}} - \text{G}^{\text{m1s}} - \text{G}^{\text{m1s}} - \text{C}^{\text{e2s}} - \text{G}^{\text{m1s}} - \text{A}^{\text{m1s}} - \text{A}^{\text{e2s}} - \text{G}^{\text{m1s}} - \text{C}^{\text{e2t}} - \text{H}$  ( 配列番号 4 4 )

$\text{X}^{18}$  の部分を  $\text{X}^{20}$  と置き換えて、実施例 1 4 4 と同様に合成を行った。使用した配列は上記配列15e\_005.5である。

40

本化合物の塩基配列は、Homo sapiens glucose-6-phosphatase catalytic subunit (G6 PC), 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 )

( 実施例 1 5 4 )

$\text{X}^{20} - \text{A}^{\text{m1s}} - \text{A}^{\text{m1s}} - \text{A}^{\text{e2s}} - \text{U}^{\text{m1s}} - \text{C}^{\text{m1s}} - \text{C}^{\text{e2s}} - \text{G}^{\text{m1s}} - \text{A}^{\text{e2s}} - \text{U}^{\text{m1s}} - \text{G}^{\text{m1s}} - \text{G}^{\text{m1s}} - \text{C}^{\text{e2s}} - \text{G}^{\text{m1s}} - \text{A}^{\text{m1s}} - \text{A}^{\text{e2s}} - \text{G}^{\text{m1t}} - \text{H}$  ( 配列番号 4 2 )

50

X<sup>18</sup>の部分をX<sup>20</sup>と置き換えて、実施例146と同様に合成を行った。使用した配列は上記配列16e\_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)

(実施例155)

X<sup>20</sup> - A<sup>m1s</sup> - A<sup>e2s</sup> - U<sup>m1s</sup> - C<sup>m1s</sup> - C<sup>e2s</sup> - G<sup>m1s</sup> - A<sup>e2s</sup> - U<sup>m1s</sup> - G<sup>m1s</sup> - G<sup>m1s</sup> - C<sup>e2s</sup> - G<sup>m1s</sup> - A<sup>m1s</sup> - A<sup>e2s</sup> - G<sup>m1s</sup> - C<sup>e2t</sup> - H (配列番号47)

X<sup>18</sup>の部分をX<sup>20</sup>と置き換えて、実施例147と同様に合成を行った。使用した配列は上記配列16e\_002.5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)

(実施例156)

X<sup>21</sup> - A<sup>m1s</sup> - A<sup>e2s</sup> - U<sup>m1s</sup> - C<sup>m1s</sup> - C<sup>e2s</sup> - G<sup>m1s</sup> - A<sup>e2s</sup> - U<sup>m1s</sup> - G<sup>m1s</sup> - G<sup>m1s</sup> - C<sup>e2s</sup> - G<sup>m1s</sup> - A<sup>m1s</sup> - A<sup>e2s</sup> - G<sup>m1t</sup> - H (配列番号40)

X<sup>18</sup>の部分をX<sup>21</sup>と置き換えて、実施例143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)

(実施例157)

X<sup>22</sup> - A<sup>m1s</sup> - A<sup>e2s</sup> - U<sup>m1s</sup> - C<sup>m1s</sup> - C<sup>e2s</sup> - G<sup>m1s</sup> - A<sup>e2s</sup> - U<sup>m1s</sup> - G<sup>m1s</sup> - G<sup>m1s</sup> - C<sup>e2s</sup> - G<sup>m1s</sup> - A<sup>m1s</sup> - A<sup>e2s</sup> - G<sup>m1t</sup> - H (配列番号40)

X<sup>18</sup>の部分をX<sup>22</sup>と置き換えて、実施例143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)

(実施例158)

X<sup>22</sup> - A<sup>e2s</sup> - U<sup>m1s</sup> - C<sup>m1s</sup> - C<sup>e2s</sup> - G<sup>m1s</sup> - A<sup>e2s</sup> - U<sup>m1s</sup> - G<sup>m1s</sup> - G<sup>m1s</sup> - C<sup>e2s</sup> - G<sup>m1s</sup> - A<sup>m1s</sup> - A<sup>e2s</sup> - G<sup>m1s</sup> - C<sup>e2t</sup> - H (配列番号44)

X<sup>18</sup>の部分をX<sup>22</sup>と置き換えて、実施例144と同様に合成を行った。使用した配列は上記配列15e\_005.5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

10

20

30

40

50

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)

(実施例159)

$X^{22} - A^{m1s} - A^{m1s} - A^{e2s} - U^{m1s} - C^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{e2s} - U^{m1s} - G^{m1s} - G^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{m1s} - A^{e2s} - G^{m1t} - H$  (配列番号42)

$X^{18}$ の部分を $X^{22}$ と置き換えて、実施例146と同様に合成を行った。使用した配列は上記配列16e\_001.5である。

10

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)

(実施例160)

$X^{22} - A^{m1s} - A^{e2s} - U^{m1s} - C^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{e2s} - U^{m1s} - G^{m1s} - G^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{m1s} - A^{e2s} - G^{m1s} - C^{e2t} - H$  (配列番号47)

20

$X^{18}$ の部分を $X^{22}$ と置き換えて、実施例147と同様に合成を行った。使用した配列は上記配列16e\_002.5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)

【0428】

(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  
293A細胞(ヒト胎児腎細胞)の培養

30

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 $2 \times 10^5$  cells/well 12 well plateに $1 \times 10^5$  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。

【0429】

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)。

40

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)

50

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)。

G6PC Int4 Amplified primer:

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

10

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

G6PC Int4 IF primer:

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

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

hG6PC vector IF primer:

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

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

【 0 4 3 0 】

20

#### 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  $\mu$ L Opti-MEM Medium(gibco)、0.50  $\mu$ Lプラスミドベクター (1mg/mL)、4.0  $\mu$ L (final: 20nM) 実施例で製造した化合物 (12.5  $\mu$ M) を準備し、B液として250  $\mu$ L Opti-MEM Medium(gibco)、6.0  $\mu$ 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  $\mu$ L Opti-MEM Medium(gibco)、0.25  $\mu$ Lプラスミドベクター (1mg/mL)、2.0  $\mu$ L (final: 20nM) 実施例で製造した化合物 (12.5  $\mu$ M) B液として125  $\mu$ L Opti-MEM Medium(gibco)、3.0  $\mu$ L Lipofectamine 2000(Invitrogen)を準備し、A液とB液を混合した。

30

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CO<sub>2</sub>インキュベーターでインキュベーションした。

【 0 4 3 1 】

#### RNA抽出 (in vitro)

以下のようにしてRNAの抽出を行った。

【 0 4 3 2 】

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  $\mu$ 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。

40

【 0 4 3 3 】

#### 逆転写反応

以下のようにして逆転写反応を行った。

【 0 4 3 4 】

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  $\mu$ L Buffer mix、1  $\mu$ L Enzyme mix、9  $\mu$ L精製水、+ 抽出RN

50

Aとなるよう混合し逆転写反応を行った(37 60min、95 5min、4 Hold)。

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

【0435】

#### 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59)

リバースプライマー 5'-ATGCTGTGGATGTGGCTGAA-3' (配列番号60)

hActin primer (SYBR) :

フォワードプライマー 5'-TGGCACCCAGCACAATGAA-3' (配列番号61)

リバースプライマー 5'-CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA-3' (配列番号62)

10

またPCR反応液を1 wellあたり、5 µL 2x FAST SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems)、2 µL 精製水、1 µL Primer mix (10 µM)、2 µL cDNA(5倍希釈済)を懸濁し、viia 7 (Applied Biosystems) でPCR反応を行った(プログラム: SYBR Green Regents, FAST, include Melt curve)。

【0436】

#### 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。

20

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'-TCCTGTCTAGGCATTGC-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

30

また1ウェル辺りに5 µL 2x Taqman Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems)、2.5 µL精製水、0.5 µL 20x Primer probe mix (10 µM)、2 µL cDNA (5倍希釈済)を懸濁しPCR反応液を調整(1 tubeあたり)し、viia7またはQuantstudio7 (Applied Biosystems社)にてPCR反応を行った(プログラム: Taqman regents, FAST)。

【0437】

#### LC-MS/MSによる正常ヒトG6PC特異的ペプチドの定量

以下のようにしてタンパク質の抽出ならびに正常ヒトG6PC特異的ペプチドのLC-MS/MS定量を行った。

【0438】

40

#### タンパク質ライセートの抽出、調整

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。RIPA buffer (ナカライテスク) を1 wellにつき100 µLずつ加え、氷上でインキュベーション後回収した。回収液について、氷上で20分間インキュベート後、10000g、10分、4 で遠心し上清を回収した。上清について総タンパク質量を測定し、0.4mg/mLになるように調整しタンパク質ライセートとした。

【0439】

#### 試薬の調整

DS264\_100u: 安定同位体標識ペプチドGLGVD(L\*)LWT(L\*)EK (Scrum、L\*: L-Leucine-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>,<sup>15</sup>N) を50%cn (精製水/acetonitrile)で100 µMに調整した。

50

DS266\_100u: 安定同位体標識ペプチドWCEQPEW(V\*)HIDTTPFAS(L\*)LK (L\*: L-Leucine-  $^{13}\text{C}_6$ ,  $^{15}\text{N}$ , V\*: L-Valine-  $^{13}\text{C}_5$ ,  $^{15}\text{N}$ ) を50%cn (精製水/acetonitrile) で100  $\mu\text{M}$  に調整した。

DS268\_100u: 安定同位体標識ペプチドNLGTLFG(L\*)GLA(L\*)NSSMYR (Scrum、L\*: L-Leucine-  $^{13}\text{C}_6$ ,  $^{15}\text{N}$ ) を50%cn (精製水/acetonitrile) で100  $\mu\text{M}$  に調整した。

IS solution-1: 50mL acetonitrile、0.5mL Trifluoroacetic acid(ナカライ)、20  $\mu\text{L}$  DS264\_100u、20  $\mu\text{L}$  DS266\_100u、20  $\mu\text{L}$  DS268\_100uを懸濁した。

IS solution-2: 50mL acetonitrile、50mL 精製水、0.5mL Trifluoroacetic acid(ナカライ)、20  $\mu\text{L}$  DS264\_100u、20  $\mu\text{L}$  DS266\_100u、20  $\mu\text{L}$  DS268\_100uを懸濁した。

0.1M Tris-HCl : 5mL 1M Tris-HCl Buffer Solution (pH 8.0) を45mLの精製水に添加懸濁した。

Urea/EDTA solution : 2.4g Urea(ナカライ)、100  $\mu\text{L}$  0.5M EDTA(sigma-aldrich) を4.9mL 0.1M Tris-HClに添加、懸濁した。

DTT solution (20mg/mL) : 20mg DTT (dithiothreitol)(Wako) を1mLの精製水に添加懸濁した。

IAA solution (50mg/mL) : 50mg IAA (iodoacetamide)(sigma-aldrich) を1mL精製水に添加懸濁した。

Trypsin /LysC Mix solution (200  $\mu\text{g/mL}$ ) : 20  $\mu\text{g}$  Trypsin/Lys-C Mix (1 vial) (Promega) を100  $\mu\text{L}$  Resuspension buffer (Promega) に添加懸濁した。

【0440】

#### 消化処理

下記に従い酵素消化反応を実施し、LC-MSインジェクションサンプルを調整した(1 sampleあたり)。

【0441】

20  $\mu\text{L}$  Urea/EDTA solution、10  $\mu\text{L}$  タンパク質ライセート、10  $\mu\text{L}$  DTT solutionを懸濁し60分間室温で静置した後、2.5  $\mu\text{L}$  IAA solutionを添加懸濁し60分間室温で静置した。その後、懸濁液に対し、112.5  $\mu\text{L}$  0.1M Tris-HClと2.5  $\mu\text{L}$  Trypsin /LysC Mix solutionを添加懸濁し、37℃で一晩インキュベーションした後、150  $\mu\text{L}$  IS solution-1、300  $\mu\text{L}$  IS solution-2を添加しLC-MSインジェクションサンプルとした。

【0442】

#### LC-MS分析、試料中濃度測定

Ultimate 3000(Thermo Fisher)、Q Exactive plus(Thermo Fisher)を用いてLC-MSインジェクションサンプルのLC-MS分析を実施した。内部標準法を用いてMass range 820.0632-820.0782 (m/z) より下記ペプチド (DS265) の試料中濃度を算出した

DS265 : WCEQPEWVHIDTTPFASLLK (配列番号 66)

【0443】

#### G6PC酵素活性の測定

下記のように抽出した各検体のミクロソーム画分のG6PCの活性測定を実施した。

【0444】

##### (1) 試薬の調製

BufferA: 100mM BIS-TRIS Buffer, pH 6.5 37

180mL精製水に4.2g BIS-TRIS (Sigma-Aldrich)を添加。塩酸、精製水を用いてpH 6.5、37℃、200mLに調整。

BufferB: HEPES 20mM, EDTA 1mM, Sucrose 250mM (4℃ 保存)

180mL精製水に4.0mL 1.0M HEPES (Gibco), 0.4mL 0.5M EDTA (USB), 17g Sucrose (Wako)を添加。精製水を200mLに調整後、0.22  $\mu\text{m}$  フィルターの透過処理。

Substrate: 200mM Glucose 6-Phosphate (4℃ 保存)

88.65 mL 精製水に 5mg D-Glucose 6-Phosphate Sodium Salt (Sigma-Aldrich)を添加。

TCA: 20% Trichloroacetic Acid (室温、遮光保存)

40 mL 精製水に 10 mL Trichloroacetic Acid Solution (Sigma-Aldrich)を添加。

Standard: Phosphorus Standard Solution, 20 µg/ml (Sigma-Aldrich) (4 保存)

5M Sulfuric Acid Solution (室温、遮光保存)

67mL 精製水に25 mL Sulfuric Acid (Aldrich 258105) を添加。

TSCR: Taussky-Shorr Color Reagent (用時調製)

5M Sulfuric Acid Solution 20mL に2.4mg Ammonium Molybdate Tetrahydrate (Sigma-Aldrich) 添加、溶解液を 140mLの精製水に添加。さらに10 g Ferrous Sulfate Heptahydrate (Sigma-Aldrich) を添加し、溶解するまで攪拌後、精製水で200mLまでメスアップ。

#### 【 0 4 4 5 】

##### (2) ミクロソーム画分の精製

10

下記手順に従いミクロソーム画分を精製、調整した。

実施例化合物、及び、プラスミドベクターのコトランスフェクションを行った293A細胞 (in 6 well plate) をice cold PBSでwash後、ice cold BufferBを各wellに添加、セルスクレーパーで回収した。回収した細胞をOn iceにてダウンスホモジナイザーを用いて十分にホモジナイズした後、1000g 10min 4 にて遠心し上清を回収した。その上清を13000g 60min 4 で遠心し、上清を除去、ペレットをBufferBで懸濁した。懸濁液の蛋白濃度が一定になるように (0.3~1.0 mg/mL) になるようにBufferBで調整を行った。

#### 【 0 4 4 6 】

##### (3) G6PC 酵素活性測定

蛋白濃度を調整したミクロソーム画分 (sample) のG6PC酵素活性を下記の方法にて測定した。試薬の呼称は(1)に準じた。

20

各sampleにつきTestとBlankを作製した。Testでは150 µL BufferA、50uL substrateを懸濁し、5分間37 でインキュベートした。そこに5 µLのsampleを添加、懸濁し、正確に5分間、37 でインキュベートした後、45 µL TCAを添加した。よく懸濁した後、5分間、25 でインキュベートした。Blankでは150 µL BufferA、50uL substrateを懸濁し、5分間37 でインキュベートした。そこに5 µLのsample、45 µL TCAを懸濁し25 でインキュベートしたものを添加した。各sampleのTestとBlankを4000g、10分間、室温で遠心し、その上清を別チューブに分注した。各上清100 µLに対し、100 µLのTSCRを添加、室温で5分間インキュベートした後、660nmの吸光度をプレートリーダー (Spectra Max M4 Molecular Devices) で測定した。Standardの希釈系列を用いて算出した検量線、各sampleのTestとBlankの吸光度、sampleの蛋白濃度からG6PC酵素活性 (U/mg: sample中の総タンパク質1mgが1分間に分解するG6P量 (µmol)) を算出した。

30

#### 【 0 4 4 7 】

ヒトG6PC全長プラスミドベクター (pcDNA hG6PC (c.648G>T) + Int4) を用いた実施例化合物によるG6PC mRNAの異常スプライシングの修復評価 (1)

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 (21e\_001~012、及び、21m\_001~012) 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。図5 A 及び 5 B に示したように、21e\_002~012、及び、21m\_002~012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。また、LC-MS/MSによる正常ヒトG6PC特異的ペプチドの産生を調べたところ、図6 A 及び 6 B に示したように、21e\_002~012、及び、21m\_002~012の化合物において、正常ヒトG6PC特異的ペプチドの産生が認められた。さらに、G6PC 酵素活性測定したところ、図7 A 及び 7 B に示したように、21e\_002~012、及び、21m\_002~012の化合物において、G6PC 酵素活性が認められた。

40

#### 【 0 4 4 8 】

ヒトG6PC全長プラスミドベクター (pcDNA hG6PC (c.648G>T) + Int4) を用いた実施例化合物によるG6PC mRNAの異常スプライシングの修復評価 (2)

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 (21e\_001~006、及び、21e\_013~022) 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

50



。図 9 に示したように、21e\_002～006、及び、21e\_015～022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。また、LC-MS/MSによる正常ヒトG6PC特異的ペプチドの産生を調べたところ、図 10 に示したように、21e\_002～006、及び、21e\_015～022の化合物において、正常ヒトG6PC特異的ペプチドの産生が認められた。

#### 【 0 4 4 9 】

ヒトG6PC全長プラスミドベクター ( pcDNA hG6PC ( c.648G>T ) + Int4 ) を用いた実施例化合物によるG6PC mRNAの異常スプライシングの修復評価 ( 3 )

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 ( 18e\_001～017、及び、18m\_001～017 ) 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。図 13 A 及び 13 B に示したように、18e\_005～017、及び、18m\_005～017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。また、LC-MS/MSによる正常ヒトG6PC特異的ペプチドの産生を調べたところ、図 14 A 及び 14 B に示したように、18e\_005～017、及び、18m\_005～017の化合物において、正常ヒトG6PC特異的ペプチドの産生が認められた。

#### 【 0 4 5 0 】

ヒトG6PC全長プラスミドベクター ( pcDNA hG6PC ( c.648G>T ) + Int4 ) を用いた実施例化合物によるG6PC mRNAの異常スプライシングの修復評価 ( 4 )

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 ( 18e\_018～031 ) 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。図 16 A に示したように、18e\_022～026、及び、18e\_031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。また、LC-MS/MSによる正常ヒトG6PC特異的ペプチドの産生を調べたところ、図 16 B に示したように、18e\_022～026、及び、18e\_031の化合物において、正常ヒトG6PC特異的ペプチドの産生が認められた。

#### 【 0 4 5 1 】

ヒトG6PC全長プラスミドベクター ( pcDNA hG6PC ( c.648G>T ) + Int4 ) を用いた実施例化合物によるG6PC mRNAの異常スプライシングの修復評価 ( 5 )

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 ( 21e\_002, 18e\_005, 21m\_002, 18e\_005, 18m\_022, 15e\_001, 15ed\_001, 18e\_008, 18e\_025, 18m\_008, 15e\_002, 15ed\_002、及び、コントロールとして国際公開第 2 0 0 4 / 0 4 8 5 7 0 の実施例 9 3 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。図 18 に示したように、21e\_002, 18e\_005, 21m\_002, 18e\_005, 18m\_022, 15e\_001, 15ed\_001, 18e\_008, 18e\_025, 18m\_008, 15e\_002, 及び、15ed\_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。

#### 【 0 4 5 2 】

( 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

### 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 6 7 )

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

mG6PC 5' arm IF primer:

フォワードプライマー 5'-CGGGCCCCCCTCGAAAACTAGGCCTGAAGAGATGGC-3' ( 配列番号 6 9 )

リバースプライマー 5'-TACCGTCGACCTCGAGGGTTGGCCTTGATCCCTCTGCTA-3' (配列番号 7 0)

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 site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 7 1)

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)

10

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 vetor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)

20

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)

【 0 4 5 3 】

#### 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 vetor 10ng/μL、pSPgRNA(KI 5') 5ng/μL、pSPgRNA(KI 3') 5ng/μL、pSPCas9 (addgene) 5ng/μLとなるように調整した後、MILLEX-GVシリンジフィルター (ミリボア) 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。

30

【 0 4 5 4 】

#### 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 10 min、(95 30 sec、60 30 sec、72 30 sec) 35 cycles、72 2 min、4 Hold)。

40

KI screening primer:

フォワードプライマー 5'-TACGTCTCTTCCCCATCTG-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 2 min、(95 15 sec、68 5 min) 38 cycles、68 7 min、15 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(1))

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

50

KI genotyping primer (3') :

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

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 7 min、15 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.648G>T) + Int4 KI系統とした。

【 0 4 5 5 】

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、68 5 min、4 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)'

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。

【 0 4 5 6 】

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。

【 0 4 5 7 】

RNA抽出 (in vivo)

以下のようにしてRNAの抽出を行った。

【 0 4 5 8 】

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 lysis II (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 q RT-PCR (Taqman assay) に従い修復G6PC mRNA の定量を行った。

【 0 4 5 9 】

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 ( 1 )

hG6PC (c.648G>T) + Int4 Ht KIマウスに対して実施例 1 1 6 乃至 1 2 7 の化合物をPBSに溶解し、3mg/kgとなるように尾静脈投与を実施することができる。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)にて評価することができる。

【 0 4 6 0 】

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 ( 2 )

hG6PC (c.648G>T) + Int4 Ht KIマウスに対して実施例91乃至95の化合物を大塚生食注に溶解し、25mg/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 9 に示したように、実施例91乃至95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

【 0 4 6 1 】

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 ( 3 )

hG6PC (c.648G>T) + Int4 Ht KIマウスに対して実施例91、92、及び、96乃至103の化合物を大塚生食注に溶解し、25mg/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 2 0 に示したように、実施例91、92、及び、96乃至103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。

20

【 0 4 6 2 】

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 ( 4 )

hG6PC (c.648G>T) + Int4 Ht KIマウスに対して実施例83乃至91、及び、104乃至107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 2 1 に示したように、実施例83乃至91、及び、104乃至107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。

30

【 0 4 6 3 】

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 ( 5 )

hG6PC (c.648G>T) + Int4 Ht KIマウスに対して実施例104、及び、108乃至115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 2 2 に示したように、実施例83乃至91、及び、104乃至107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。

40

【 0 4 6 4 】

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 ( 6 )

hG6PC (c.648G>T) + Int4 Ht KIマウスに対して実施例105、113、及び、131乃至137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 2 3 に示したように、実施例105、113、及び、131乃至137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。

50

## 【 0 4 6 5 】

( 試験例3 ) 異常スプライシング修復配列のフラグメント解析

PCR反応とフラグメント配列解析

以下のようにしてPCR反応とフラグメント配列解析を行った。

## 【 0 4 6 6 】

下記のようにhG6PC splicing validation primerを設計した。

hG6PC splicing validation primer :

フォワードプライマー 5'-TTGTGGTTGGGATTCTGGGC-3' (配列番号 9 0 )

リバースプライマー 5'-TCCAGAGTCCACAGGAGGTC -3' (配列番号 9 1 )

10

以下のようにPCR反応液を調整し、PCR反応を行った。

23  $\mu$ L Platinum<sup>TM</sup> PCR SuperMix High Fidelity (thermo fisher)、2  $\mu$ L Primer mix (10  $\mu$ M)、1  $\mu$ L cDNA(5倍希釈済)を懸濁し、PCR反応を行った (95 5min, (95 30sec, 62 30sec, 68 30sec) 36 cycles, 68 4min, 4 Hold)。

PCR産物はE-Gel (登録商標) アガロースゲル電気泳動システムを用い、E-gel Ex 2% agarose (Invitrogen)にて電気泳動し、解析した。各フラグメントは、NucleoSpin (登録商標) Gel and PCR Clean-up (MACHEREY-NAGEL)にてゲルから抽出し、G6PC sequence primer を添加の上、BigDye v3.1を用いてシーケンス反応を行った。Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer(Life technologies)をもちいて塩基配列を確認した (図 2 4 )。G6PC sequence primer 5'-GCTGTGCAGCTGAATGTCTG-3' (配列番号 9 2 )

20

## 【 0 4 6 7 】

実施例 1 の化合物 ( 21e\_002 ) による培養細胞における異常スプライシング修復配列のフラグメント解析

ヒトG6PC全長プラスミドベクター ( pcDNA hG6PC ( c.648G>T ) + Int4 ) を用いた実施例化合物によるG6PC mRNAの異常スプライシングの修復評価 ( 1 ) において作成したヒトG6PC全長プラスミドベクター ( pcDNA hG6PC ( c.648G>T ) + Int4 ) のみをトランスフェクションした検体、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 ( 21e\_002 ) をコトランスフェクションした検体から作成したcDNAをテンプレートとして用いてPCR反応とフラグメント配列解析を行った。図 2 4 に示したように実施例 1 の化合物 ( 21e\_002 ) によって 9 1 塩基が欠損する異常スプライシングの正常化が認められた。

30

( 試験例4 ) 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  
試験例 2 と同様に実施例化合物について、モデルマウスを用いて評価をした。

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 ( 7 )

40

hG6PC ( c.648G>T ) + Int4 Ht KIマウスに対して実施例133及び、143乃至149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 2 5 に示したように、実施例133及び、143乃至149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。

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 ( 8 )

hG6PC ( c.648G>T ) + Int4 Ht KIマウスに対して実施例149及び、152乃至160の化合物を

50

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日後に一晚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26に示したように、実施例149及び、152乃至160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。

#### 【0468】

##### (実施例161)

$X^{20} - A^{m1s} - A^{m1s} - T^{e2s} - C^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{m1s} - T^{e2s} - G^{m1s} - G^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{m1s} - A^{m1s} - G^{m1t} - H$  (配列番号93)

実施例133で使用した配列の代わりに上記の配列である15e\_001.6を用い、 $X^{18}$ の部分を $X^{20}$ と置き換えて、実施例133と同様に合成を行った。

10

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: 6278.03)

##### (実施例162)

$X^{20} - A^{m1s} - T^{e2s} - C^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{m1s} - T^{e2s} - G^{m1s} - G^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{m1s} - A^{m1s} - G^{m1s} - C^{e2t} - H$  (配列番号94)

20

実施例133で使用した配列の代わりに上記の配列である15e\_005.6を用い、 $X^{18}$ の部分を $X^{20}$ と置き換えて、実施例133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: 6280.03)

##### (実施例163)

$X^{20} - A^{m1s} - A^{m1s} - T^{e2s} - C^{e2s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{m1s} - T^{e2s} - G^{m1s} - G^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{m1s} - A^{m1s} - G^{m1t} - H$  (配列番号93)

30

実施例133で使用した配列の代わりに上記の配列である15e\_001.7を用い、 $X^{18}$ の部分を $X^{20}$ と置き換えて、実施例133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質量分析により同定した(実測値: 6304.04)

##### (実施例164)

40

$X^{20} - A^{m1s} - T^{e2s} - C^{e2s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{m1s} - T^{e2s} - G^{m1s} - G^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{m1s} - A^{m1s} - G^{m1s} - C^{e2t} - H$  (配列番号94)

実施例133で使用した配列の代わりに上記の配列である15e\_005.7を用い、 $X^{18}$ の部分を $X^{20}$ と置き換えて、実施例133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: 6306.03)

50

## (実施例 1 6 5)

$X^{20} - A^{m1s} - U^{m1s} - C^{m1s} - C^{m1s} - G^{m1s} - A^{m1s} - U^{m1s} - G^{m1s} - G^{m1s} - C^{m1s} - G^{m1s} - A^{m1s} - A^{m1s} - G^{m1s} - C^{m1t} - H$  (配列番号 9 5)

実施例 1 3 3 で使用した配列の代わりに上記の配列である 15e\_005.8 を用い、 $X^{18}$  の部分を  $X^{20}$  と置き換えて、実施例 1 3 3 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 : 6149.93)

10

## (実施例 1 6 6)

$X^{20} - A^{e2s} - U^{m1p} - C^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{e2s} - U^{m1s} - G^{m1s} - G^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{m1s} - A^{e2s} - G^{m1s} - C^{e2t} - H$  (配列番号 9 5)

実施例 1 5 3 で使用した配列の代わりに上記の配列である 15e\_005.5.01 を用い、実施例 1 5 3 と同様に合成を行った。ただし、核酸自動合成機で使用する試薬のうち、表記配列合成に必要な部分の酸化剤として、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、適宜使用した。

20

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 : 6248.00)

## (実施例 1 6 7)

$X^{20} - A^{e2s} - U^{m1s} - C^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{e2s} - U^{m1p} - G^{m1s} - G^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{m1s} - A^{e2s} - G^{m1s} - C^{e2t} - H$  (配列番号 9 5)

30

実施例 1 6 6 で使用した配列の代わりに上記の配列である 15e\_005.5.02 を用い、実施例 1 6 6 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 : 6248.00)

## (実施例 1 6 8)

$X^{20} - A^{e2s} - U^{m1s} - C^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{e2s} - U^{m1s} - G^{m1p} - G^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{m1s} - A^{e2s} - G^{m1s} - C^{e2t} - H$  (配列番号 9 5)

40

実施例 1 6 6 で使用した配列の代わりに上記の配列である 15e\_005.5.03 を用い、実施例 1 6 6 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 : 6247.99)

50

## (実施例 169)

$X^{20} - A^{e2s} - U^{m1s} - C^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{e2s} - U^{m1s} - G^{m1s} - G^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1p} - A^{m1s} - A^{e2s} - G^{m1s} - C^{e2t} - H$  (配列番号 95)

実施例 166 で使用した配列の代わりに上記の配列である 15e\_005.5.04 を用い、実施例 166 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: 6248.00)

10

## (実施例 170)

$X^{20} - A^{e2s} - U^{m1p} - C^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{e2s} - U^{m1p} - G^{m1s} - G^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{m1s} - A^{e2s} - G^{m1s} - C^{e2t} - H$  (配列番号 95)

実施例 166 で使用した配列の代わりに上記の配列である 15e\_005.5.05 を用い、実施例 166 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: 6232.02)

20

## (実施例 171)

$X^{20} - A^{e2s} - U^{m1p} - C^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{e2s} - U^{m1s} - G^{m1p} - G^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{m1s} - A^{e2s} - G^{m1s} - C^{e2t} - H$  (配列番号 95)

実施例 166 で使用した配列の代わりに上記の配列である 15e\_005.5.06 を用い、実施例 166 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: 6232.02)

30

## (実施例 172)

$X^{20} - A^{e2s} - U^{m1p} - C^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{e2s} - U^{m1s} - G^{m1s} - G^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1p} - A^{m1s} - A^{e2s} - G^{m1s} - C^{e2t} - H$  (配列番号 95)

実施例 166 で使用した配列の代わりに上記の配列である 15e\_005.5.07 を用い、実施例 166 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: 6232.02)

40

## (実施例 173)

$X^{20} - A^{e2s} - U^{m1s} - C^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{e2s} - U^{m1p} - G^{m1p} - G^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{m1s} - A^{e2s} - G^{m1s} - C^{e2t} - H$  (配列番号 95)

実施例 166 で使用した配列の代わりに上記の配列である 15e\_005.5.08 を用い、実施例 166 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 (G6

50



PC), 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:6232.02)

(実施例174)

$\chi^{20} - A^{e2s} - U^{m1s} - C^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{e2s} - U^{m1p} - G^{m1s} - G^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1p} - A^{m1s} - A^{e2s} - G^{m1s} - C^{e2t} - H$  (配列番号95)

実施例166で使用する配列の代わりに上記の配列である15e\_005.5.09を用い、実施例166と同様に合成を行った。

10

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:6232.01)

(実施例175)

$\chi^{20} - A^{e2s} - U^{m1s} - C^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{e2s} - U^{m1s} - G^{m1p} - G^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1p} - A^{m1s} - A^{e2s} - G^{m1s} - C^{e2t} - H$  (配列番号95)

実施例166で使用する配列の代わりに上記の配列である15e\_005.5.10を用い、実施例166と同様に合成を行った。使用した配列は上記配列15e\_005.5.10である。

20

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:6232.01)

(実施例176)

$\chi^{20} - A^{e2s} - U^{m1p} - C^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{e2s} - U^{m1p} - G^{m1p} - G^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{m1s} - A^{e2s} - G^{m1s} - C^{e2t} - H$  (配列番号95)

30

実施例166で使用する配列の代わりに上記の配列である15e\_005.5.11を用い、実施例166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:6216.00)

(実施例177)

$\chi^{20} - A^{e2s} - U^{m1p} - C^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{e2s} - U^{m1p} - G^{m1s} - G^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1p} - A^{m1s} - A^{e2s} - G^{m1s} - C^{e2t} - H$  (配列番号95)

40

実施例166で使用する配列の代わりに上記の配列である15e\_005.5.12を用い、実施例166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:6216.03)

(実施例178)

50

$X^{20} - A^{e2s} - U^{m1p} - C^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{e2s} - U^{m1s} - G^{m1p} - G^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1p} - A^{m1s} - A^{e2s} - G^{m1s} - C^{e2t} - H$  (配列番号 95)

実施例 166 で使用した配列の代わりに上記の配列である 15e\_005.5.13 を用い、実施例 166 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 : 6216.02)

10

(実施例 179)

$X^{20} - A^{e2s} - U^{m1s} - C^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{e2s} - U^{m1p} - G^{m1p} - G^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1p} - A^{m1s} - A^{e2s} - G^{m1s} - C^{e2t} - H$  (配列番号 95)

実施例 166 で使用した配列の代わりに上記の配列である 15e\_005.5.14 を用い、実施例 166 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 : 6216.03)

20

(実施例 180)

$X^{20} - A^{e2s} - U^{m1p} - C^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{e2s} - U^{m1p} - G^{m1p} - G^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1p} - A^{m1s} - A^{e2s} - G^{m1s} - C^{e2t} - H$  (配列番号 95)

実施例 166 で使用した配列の代わりに上記の配列である 15e\_005.5.15 を用い、実施例 166 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 : 6200.06)

30

(実施例 181)

$X^{20} - A^{e2p} - U^{m1s} - C^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{e2s} - U^{m1s} - G^{m1s} - G^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{m1s} - A^{e2s} - G^{m1s} - C^{e2t} - H$  (配列番号 95)

実施例 166 で使用した配列の代わりに上記の配列である 15e\_005.5.16 を用い、実施例 166 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 : 6247.99)

40

(実施例 182)

$X^{20} - A^{e2s} - U^{m1s} - C^{m1p} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{e2s} - U^{m1s} - G^{m1s} - G^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{m1s} - A^{e2s} - G^{m1s} - C^{e2t} - H$  (配列番号 95)

実施例 166 で使用した配列の代わりに上記の配列である 15e\_005.5.17 を用い、実施例 166 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

50

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:6248.01)

(実施例183)

$X^{20} - A^{e2s} - U^{m1s} - C^{m1s} - C^{e2p} - G^{m1s} - A^{e2s} - U^{m1s} - G^{m1s} - G^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{m1s} - A^{e2s} - G^{m1s} - C^{e2t} - H$  (配列番号95)

実施例166で使用した配列の代わりに上記の配列である15e\_005.5.18を用い、実施例166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:6248.00)

10

(実施例184)

$X^{20} - A^{e2s} - U^{m1s} - C^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1p} - A^{e2s} - U^{m1s} - G^{m1s} - G^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{m1s} - A^{e2s} - G^{m1s} - C^{e2t} - H$  (配列番号95)

実施例166で使用した配列の代わりに上記の配列である15e\_005.5.19を用い、実施例166と同様に合成を行った。

20

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:6248.01)

(実施例185)

$X^{20} - A^{e2s} - U^{m1s} - C^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{e2p} - U^{m1s} - G^{m1s} - G^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{m1s} - A^{e2s} - G^{m1s} - C^{e2t} - H$  (配列番号95)

実施例166で使用した配列の代わりに上記の配列である15e\_005.5.20を用い、実施例166と同様に合成を行った。

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:6248.00)

(実施例186)

$X^{20} - A^{e2s} - U^{m1s} - C^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{e2s} - U^{m1s} - G^{m1s} - G^{m1p} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{m1s} - A^{e2s} - G^{m1s} - C^{e2t} - H$  (配列番号95)

40

実施例166で使用した配列の代わりに上記の配列である15e\_005.5.21を用い、実施例166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:6248.01)

(実施例187)

$X^{20} - A^{e2s} - U^{m1s} - C^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{e2s} - U^{m1s} - G^{m1s} - G^{m1s} - C^{e2p} - G^{m1s} - A^{m1s} - A^{e2s} - G^{m1s} - C^{e2t} - H$

50

$^{2s} - G^{m1s} - C^{e2t} - H$  (配列番号 95)

実施例 166 で使用した配列の代わりに上記の配列である 15e\_005.5.22 を用い、実施例 166 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 : 6248.00)

(実施例 188)

$X^{20} - A^{e2s} - U^{m1s} - C^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{e2s} - U^{m1s} - G^{m1s} - G^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{m1p} - A^{e2s} - G^{m1s} - C^{e2t} - H$  (配列番号 95)

実施例 166 で使用した配列の代わりに上記の配列である 15e\_005.5.23 を用い、実施例 166 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 : 6248.00)

(実施例 189)

$X^{20} - A^{e2s} - U^{m1s} - C^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{e2s} - U^{m1s} - G^{m1s} - G^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{m1s} - A^{e2p} - G^{m1s} - C^{e2t} - H$  (配列番号 95)

実施例 166 で使用した配列の代わりに上記の配列である 15e\_005.5.24 を用い、実施例 166 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 : 6248.00)

(実施例 190)

$X^{20} - A^{e2s} - U^{m1s} - C^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{e2s} - U^{m1s} - G^{m1s} - G^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{m1s} - A^{e2s} - G^{m1p} - C^{e2t} - H$  (配列番号 95)

実施例 166 で使用した配列の代わりに上記の配列である 15e\_005.5.25 を用い、実施例 166 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 : 6248.00)

(実施例 191)

$X^{20} - A^{e2s} - U^{m1s} - C^{m1s} - C^{e2p} - G^{m1s} - A^{e2s} - U^{m1s} - G^{m1s} - G^{m1s} - C^{e2p} - G^{m1s} - A^{m1s} - A^{e2s} - G^{m1s} - C^{e2t} - H$  (配列番号 95)

実施例 166 で使用した配列の代わりに上記の配列である 15e\_005.5.26 を用い、実施例 166 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

10

20

30

40

50

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：6232.01）

（実施例 1 9 2）

$X^{20} - A^{e2s} - U^{m1s} - C^{m1s} - C^{e2p} - G^{m1s} - A^{e2p} - U^{m1s} - G^{m1s} - G^{m1s} - C^{e2p} - G^{m1s} - A^{m1s} - A^{e2s} - G^{m1s} - C^{e2t} - H$ （配列番号 9 5）

実施例 1 6 6 で使用した配列の代わりに上記の配列である15e\_005.5.27を用い、実施例 1 6 6 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 (G6 PC), 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：6216.03）

10

（実施例 1 9 3）

$X^{20} - A^{e2p} - U^{m1s} - C^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{e2p} - U^{m1s} - G^{m1s} - G^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{m1s} - A^{e2p} - G^{m1s} - C^{e2t} - H$ （配列番号 9 5）

実施例 1 6 6 で使用した配列の代わりに上記の配列である15e\_005.5.28を用い、実施例 1 6 6 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 (G6 PC), 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：6216.03）

20

（実施例 1 9 4）

$X^{20} - A^{e2p} - U^{m1s} - C^{m1s} - C^{e2p} - G^{m1s} - A^{e2p} - U^{m1s} - G^{m1s} - G^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{m1s} - A^{e2p} - G^{m1s} - C^{e2t} - H$ （配列番号 9 5）

実施例 1 6 6 で使用した配列の代わりに上記の配列である15e\_005.5.29を用い、実施例 1 6 6 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 (G6 PC), 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：6200.06）

30

（実施例 1 9 5）

$X^{20} - A^{e2p} - U^{m1s} - C^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{e2p} - U^{m1s} - G^{m1s} - G^{m1s} - C^{e2p} - G^{m1s} - A^{m1s} - A^{e2p} - G^{m1s} - C^{e2t} - H$ （配列番号 9 5）

実施例 1 6 6 で使用した配列の代わりに上記の配列である15e\_005.5.30を用い、実施例 1 6 6 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 (G6 PC), 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：6200.06）

40

（実施例 1 9 6）

$X^{20} - A^{e2p} - U^{m1s} - C^{m1s} - C^{e2p} - G^{m1s} - A^{e2p} - U^{m1s} - G^{m1s} - G^{m1s} - C^{e2p} - G^{m1s} - A^{m1s} - A^{e2p} - G^{m1s} - C^{e2t} - H$ （配列番号 9 5）

50

実施例 1 6 6 で使用した配列の代わりに上記の配列である 15e\_005.5.31 を用い、実施例 1 6 6 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 : 6184.11)

( 実施例 1 9 7 )

$\chi^{20} - A^{e2p} - U^{m1p} - C^{m1p} - C^{e2p} - G^{m1p} - A^{e2p} - U^{m1p} - G^{m1p} - G^{m1p} - C^{e2p} - G^{m1p} - A^{m1p} - A^{e2p} - G^{m1p} - C^{e2t} - H$  ( 配列番号 9 5 ) 10

実施例 1 6 6 で使用した配列の代わりに上記の配列である 15e\_005.5.32 を用い、実施例 1 6 6 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 : 6040.30)

( 実施例 1 9 8 )

$\chi^{20} - A^{e2p} - U^{m1s} - C^{m1s} - C^{e2p} - G^{m1s} - A^{e2s} - U^{m1s} - G^{m1s} - G^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{m1s} - A^{e2s} - G^{m1s} - C^{e2t} - H$  ( 配列番号 9 5 ) 20

実施例 1 6 6 で使用した配列の代わりに上記の配列である 15e\_005.5.33 を用い、実施例 1 6 6 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 : 6232.02)

( 実施例 1 9 9 )

$\chi^{20} - A^{e2p} - U^{m1s} - C^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{e2p} - U^{m1s} - G^{m1s} - G^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{m1s} - A^{e2s} - G^{m1s} - C^{e2t} - H$  ( 配列番号 9 5 ) 30

実施例 1 6 6 で使用した配列の代わりに上記の配列である 15e\_005.5.34 を用い、実施例 1 6 6 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 : 6232.01)

( 実施例 2 0 0 )

$\chi^{20} - A^{e2p} - U^{m1s} - C^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{e2s} - U^{m1s} - G^{m1s} - G^{m1s} - C^{e2p} - G^{m1s} - A^{m1s} - A^{e2s} - G^{m1s} - C^{e2t} - H$  ( 配列番号 9 5 ) 40

実施例 1 6 6 で使用した配列の代わりに上記の配列である 15e\_005.5.35 を用い、実施例 1 6 6 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 : 6232.04)

## (実施例 201)

$\chi^{20} - A^{e2p} - U^{m1s} - C^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{e2s} - U^{m1s} - G^{m1s} - G^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{m1s} - A^{e2p} - G^{m1s} - C^{e2t} - H$  (配列番号 95)

実施例 166 で使用した配列の代わりに上記の配列である 15e\_005.5.36 を用い、実施例 166 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 : 6232.03)

10

## (実施例 202)

$\chi^{20} - A^{e2s} - U^{m1s} - C^{m1s} - C^{e2p} - G^{m1s} - A^{e2p} - U^{m1s} - G^{m1s} - G^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{m1s} - A^{e2s} - G^{m1s} - C^{e2t} - H$  (配列番号 95)

実施例 166 で使用した配列の代わりに上記の配列である 15e\_005.5.37 を用い、実施例 166 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 : 6232.02)

20

## (実施例 203)

$\chi^{20} - A^{e2s} - U^{m1s} - C^{m1s} - C^{e2p} - G^{m1s} - A^{e2s} - U^{m1s} - G^{m1s} - G^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{m1s} - A^{e2p} - G^{m1s} - C^{e2t} - H$  (配列番号 95)

実施例 166 で使用した配列の代わりに上記の配列である 15e\_005.5.38 を用い、実施例 166 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 : 6232.01)

30

## (実施例 204)

$\chi^{20} - A^{e2s} - U^{m1s} - C^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{e2p} - U^{m1s} - G^{m1s} - G^{m1s} - C^{e2p} - G^{m1s} - A^{m1s} - A^{e2s} - G^{m1s} - C^{e2t} - H$  (配列番号 95)

実施例 166 で使用した配列の代わりに上記の配列である 15e\_005.5.39 を用い、実施例 166 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 : 6232.02)

40

## (実施例 205)

$\chi^{20} - A^{e2s} - U^{m1s} - C^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{e2p} - U^{m1s} - G^{m1s} - G^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{m1s} - A^{e2p} - G^{m1s} - C^{e2t} - H$  (配列番号 95)

実施例 166 で使用した配列の代わりに上記の配列である 15e\_005.5.40 を用い、実施例 166 と同様に合成を行った。

50

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:6232.02)

(実施例206)

$X^{20} - A^{e2s} - U^{m1s} - C^{m1s} - C^{e2s} - G^{m1s} - A^{e2s} - U^{m1s} - G^{m1s} - G^{m1s} - C^{e2p} - G^{m1s} - A^{m1s} - A^{e2p} - G^{m1s} - C^{e2t} - H$  (配列番号95)

実施例166で使用する配列の代わりに上記の配列である15e\_005.5.41を用い、実施例166と同様に合成を行った。

10

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:6232.02)

(実施例207)

$X^{20} - A^{e2s} - U^{m1s} - C^{m1s} - C^{e2p} - G^{m1s} - A^{e2s} - U^{m1s} - G^{m1s} - G^{m1s} - C^{e2p} - G^{m1s} - A^{m1s} - A^{e2p} - G^{m1s} - C^{e2t} - H$  (配列番号95)

20

実施例166で使用する配列の代わりに上記の配列である15e\_005.5.42を用い、実施例166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:6216.00)

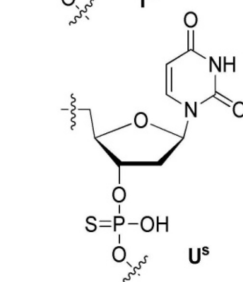
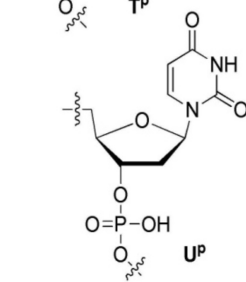
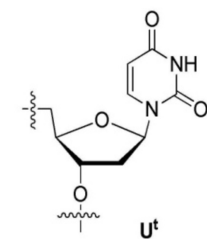
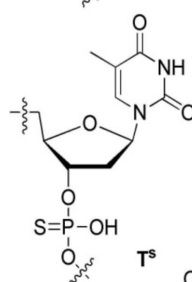
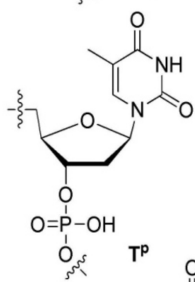
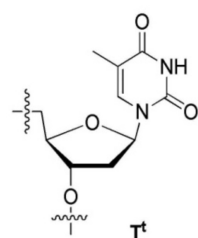
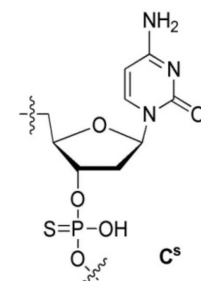
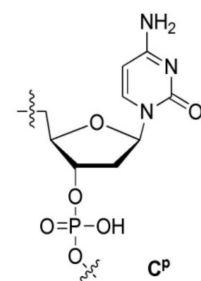
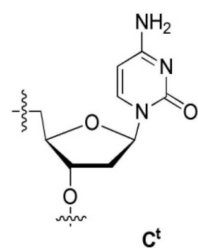
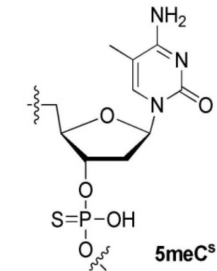
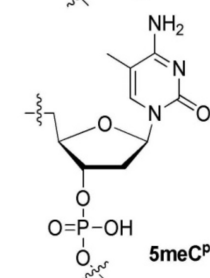
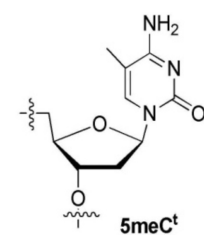
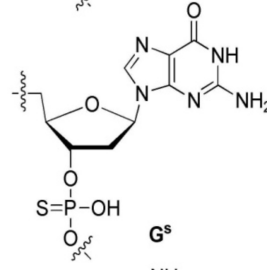
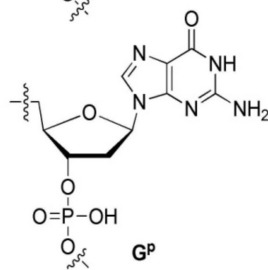
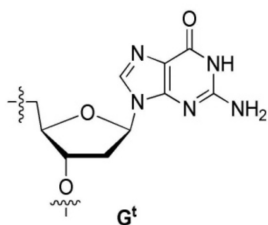
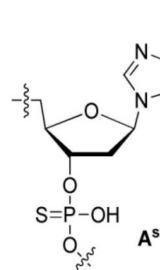
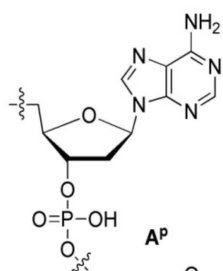
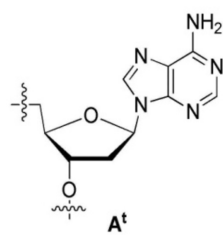
【0469】

なお、本明細書において、 $A^t$ 、 $G^t$ 、 $5meC^t$ 、 $C^t$ 、 $T^t$ 、 $U^t$ 、 $A^p$ 、 $G^p$ 、 $5meC^p$ 、 $C^p$ 、 $T^p$ 、 $U^p$ 、 $A^s$ 、 $G^s$ 、 $5meC^s$ 、 $C^s$ 、 $T^s$ 、 $U^s$ 、 $A^{m1t}$ 、 $G^{m1t}$ 、 $C^{m1t}$ 、 $5meC^{m1t}$ 、 $U^{m1t}$ 、 $A^{m1p}$ 、 $G^{m1p}$ 、 $C^{m1p}$ 、 $5meC^{m1p}$ 、 $U^{m1p}$ 、 $A^{m1s}$ 、 $G^{m1s}$ 、 $C^{m1s}$ 、 $5meC^{m1s}$ 、 $U^{m1s}$ 、 $A^{e2t}$ 、 $G^{e2t}$ 、 $C^{e2t}$ 、 $T^{e2t}$ 、 $A^{e2p}$ 、 $G^{e2p}$ 、 $C^{e2p}$ 、 $T^{e2p}$ 、 $A^{e2s}$ 、 $G^{e2s}$ 、 $C^{e2s}$ 、 $T^{e2s}$ 、 $A^{1t}$ 、 $G^{1t}$ 、 $C^{1t}$ 、 $T^{1t}$ 、 $A^{e1p}$ 、 $G^{e1p}$ 、 $C^{e1p}$ 、 $T^{e1p}$ 、 $A^{e1s}$ 、 $G^{e1s}$ 、 $C^{e1s}$ 、 $T^{e1s}$ 、 $A^{m2t}$ 、 $G^{m2t}$ 、 $5meC^{m2t}$ 、 $T^{m2t}$ 、 $A^{m2p}$ 、 $G^{m2p}$ 、 $5meC^{m2p}$ 、 $T^{m2p}$ 、 $A^{m2s}$ 、 $G^{m2s}$ 、 $5meC^{m2s}$ 、 $T^{m2s}$ 、 $X$ 、 $X^1$ 、 $X^2$ 、 $X^3$ 、 $X^4$ 、 $X^5$ 、 $X^6$ 、 $X^7$ 、 $X^8$ 、 $X^9$ 、 $X^{10}$ 、 $X^{11}$ 、 $X^{12}$ 、 $X^{13}$ 、 $X^{14}$ 、 $X^{15}$ 、 $X^{16}$ 、 $X^{17}$ 、 $X^{18}$ 、 $X^{19}$ 、 $X^{20}$ 、 $X^{21}$ 、 $X^{22}$ は、下記に示す構造を有する基である。

30



【化 1 9 5】



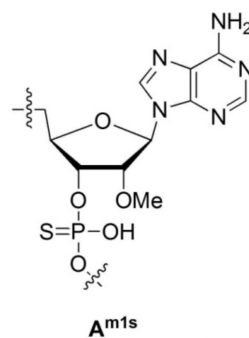
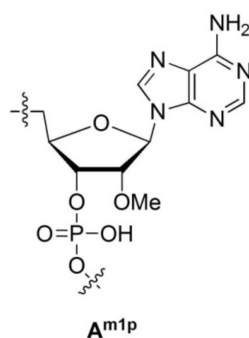
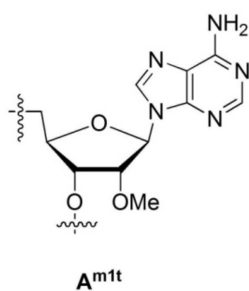
10

20

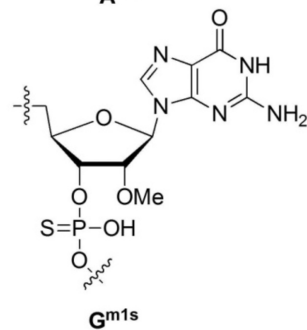
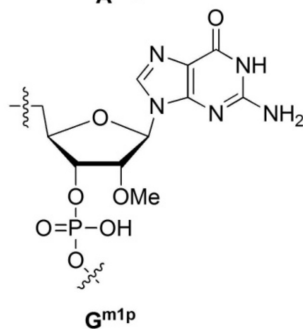
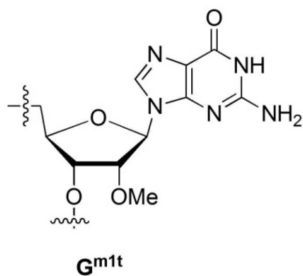
30

40

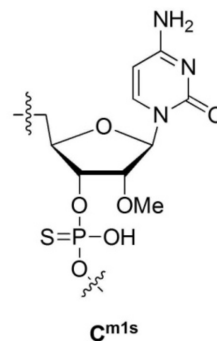
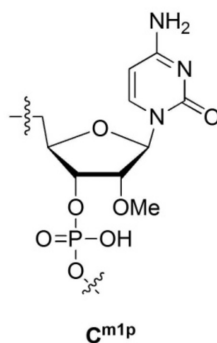
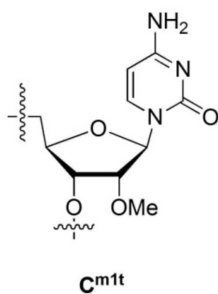
【化 1 9 6】



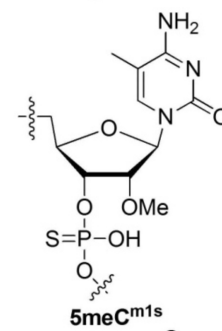
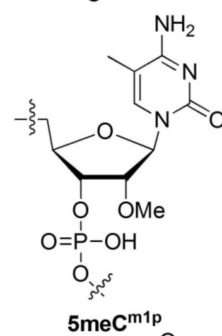
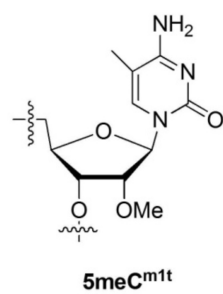
10



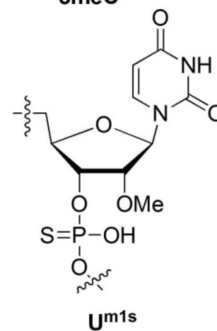
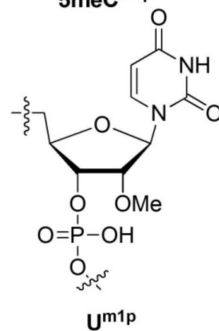
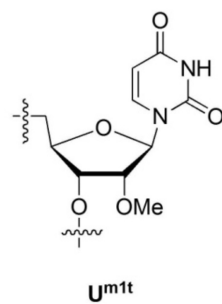
20



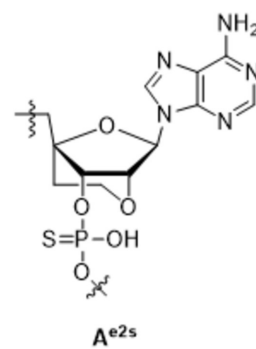
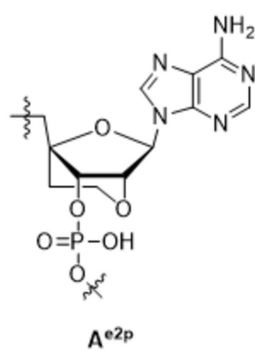
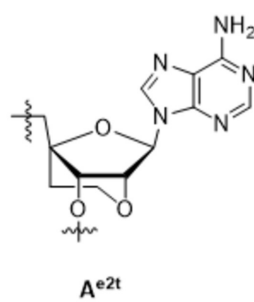
30



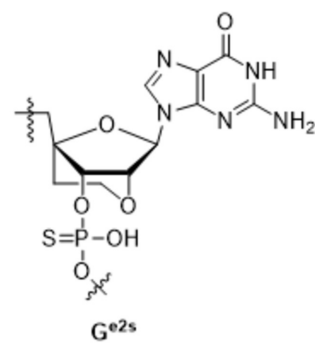
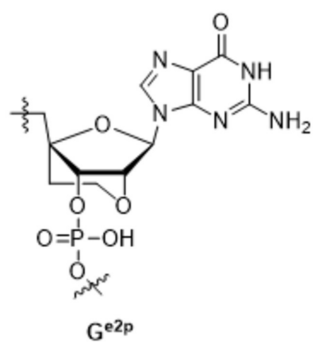
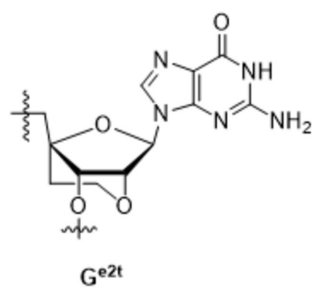
40



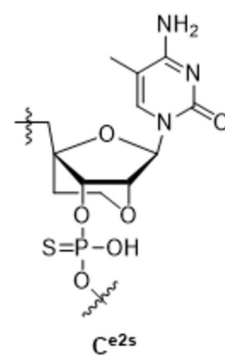
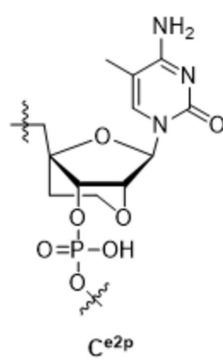
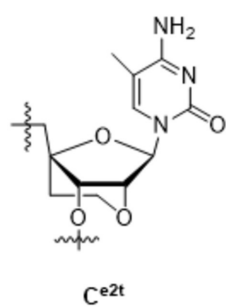
【化 1 9 7】



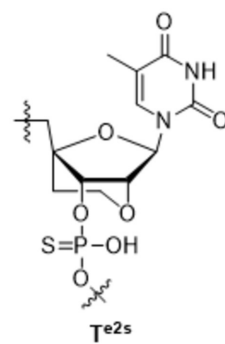
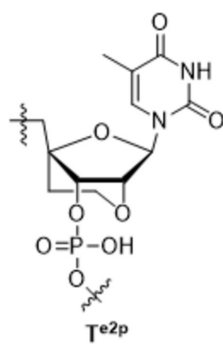
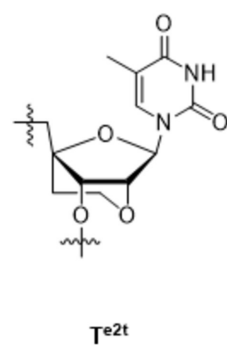
10



20

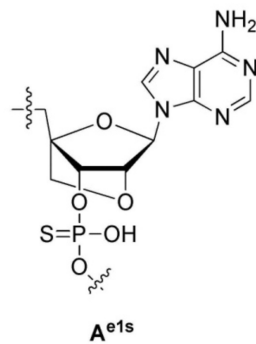
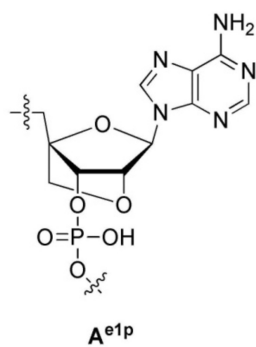
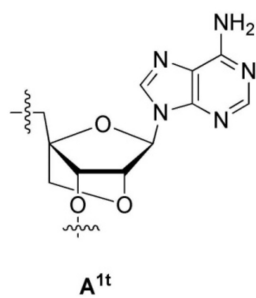


30

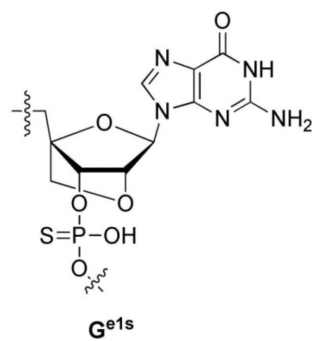
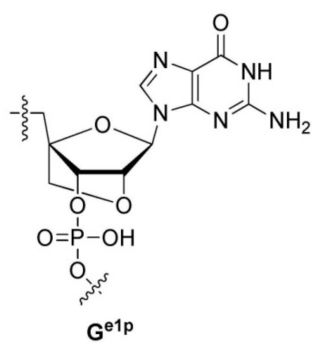
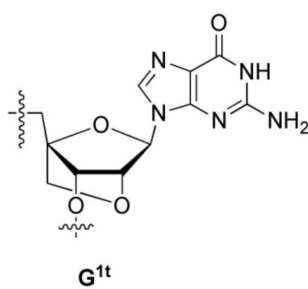


40

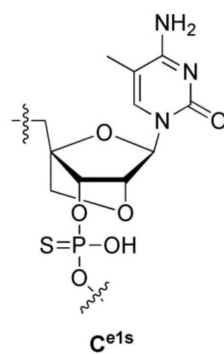
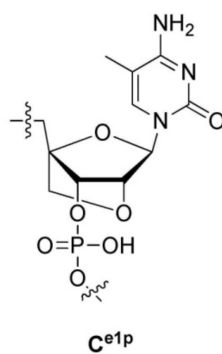
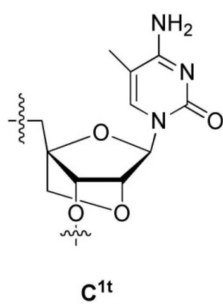
【化 1 9 8】



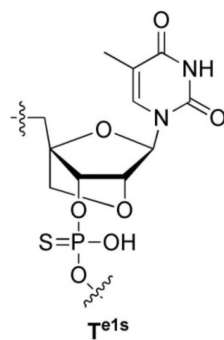
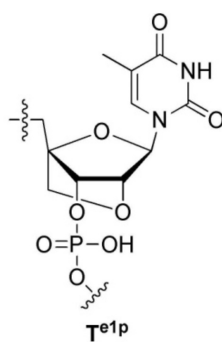
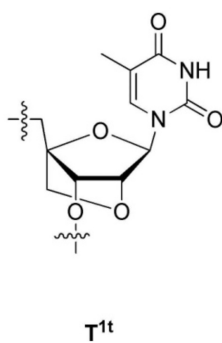
10



20

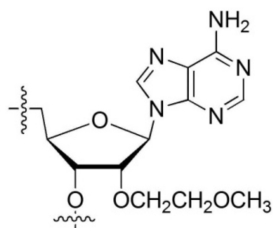
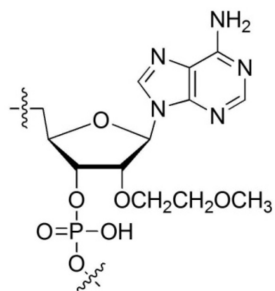
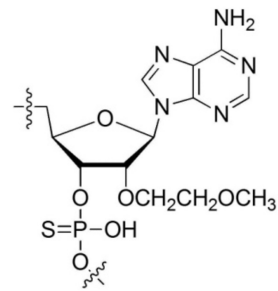


30

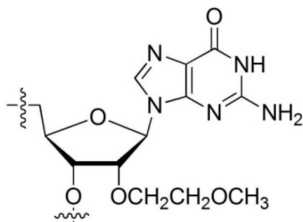
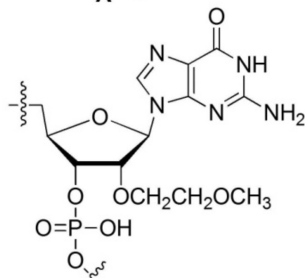
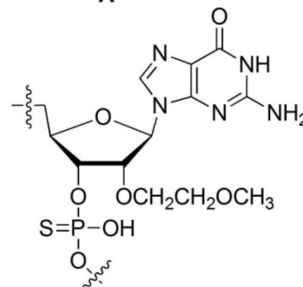


40

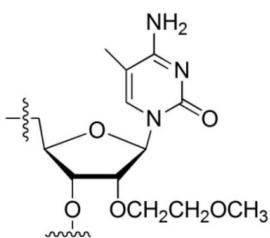
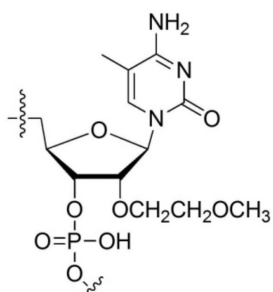
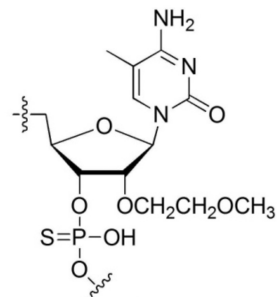
【化 1 9 9】

**A<sup>m2t</sup>****A<sup>m2p</sup>****A<sup>m2s</sup>**

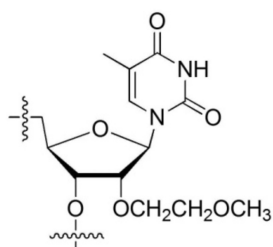
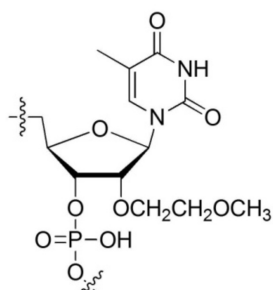
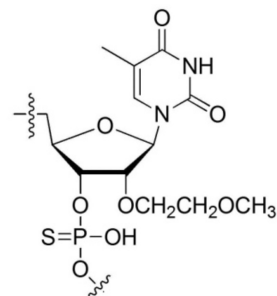
10

**G<sup>m2t</sup>****G<sup>m2p</sup>****G<sup>m2s</sup>**

20

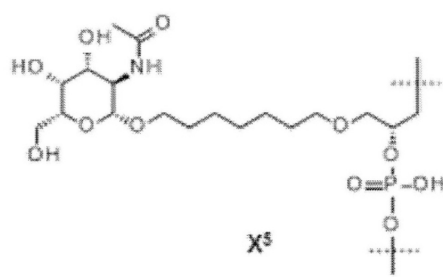
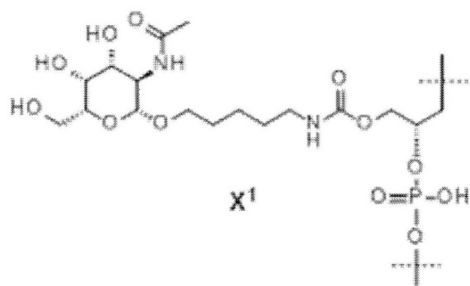
**5meC<sup>m2t</sup>****5meC<sup>m2p</sup>****5meC<sup>m2s</sup>**

30

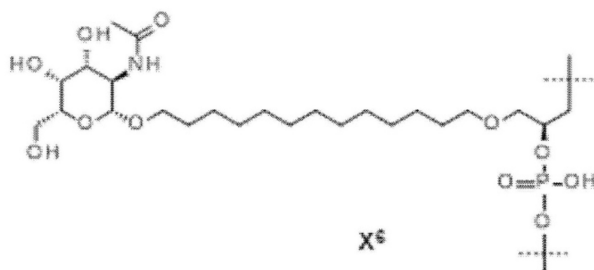
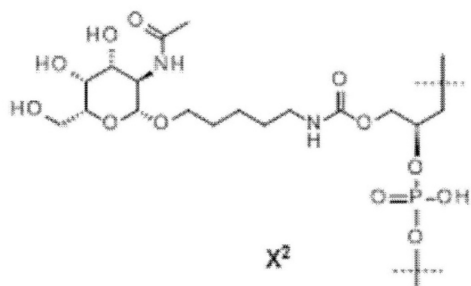
**T<sup>m2t</sup>****T<sup>m2p</sup>****T<sup>m2s</sup>**

40

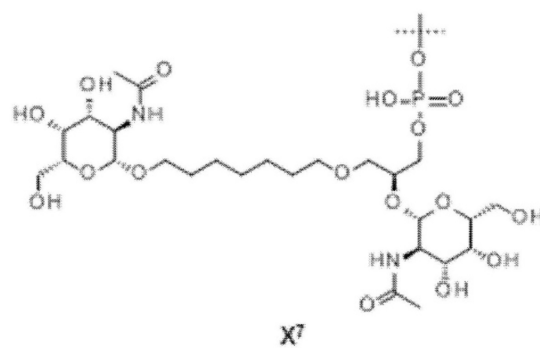
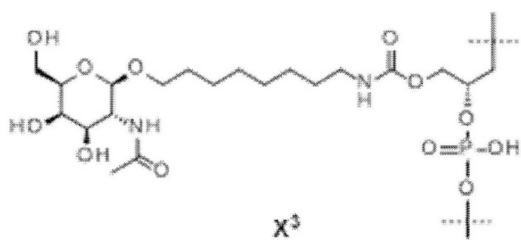
【化 2 0 0】



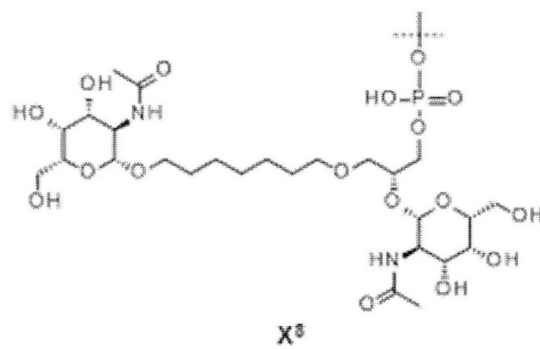
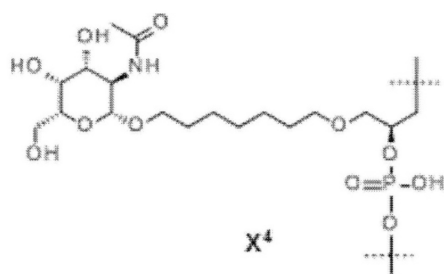
10



20

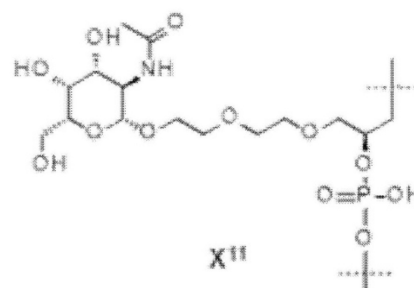
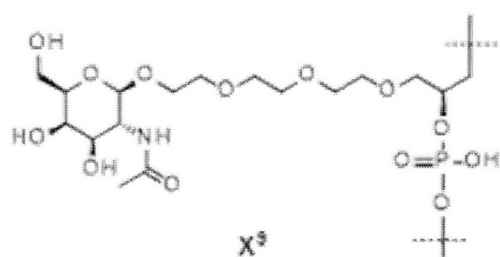


30

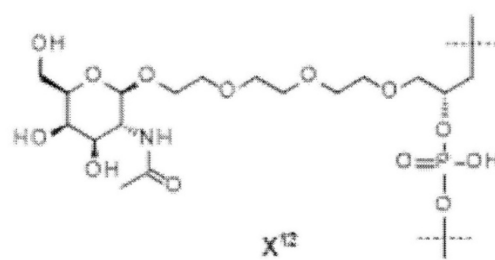
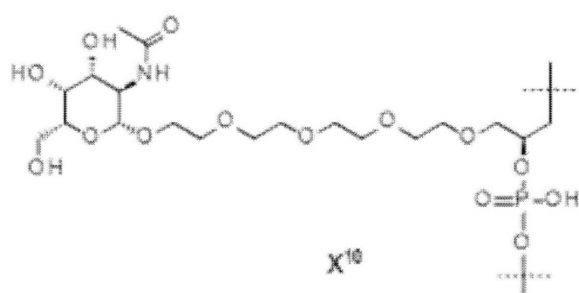


40

【化 2 0 1】

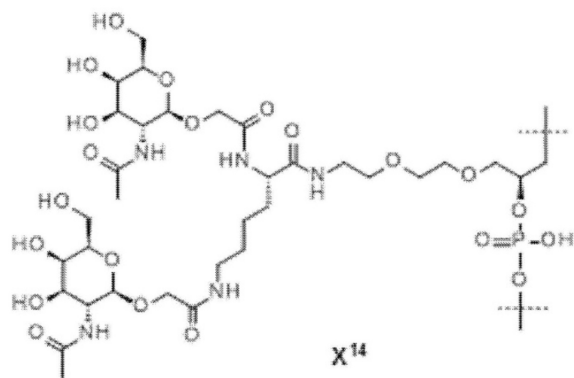
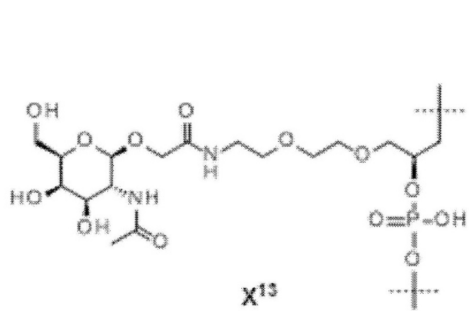


10

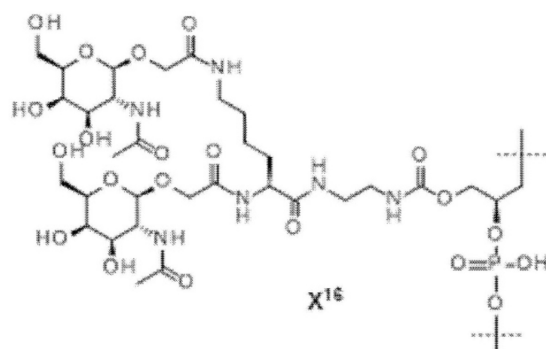
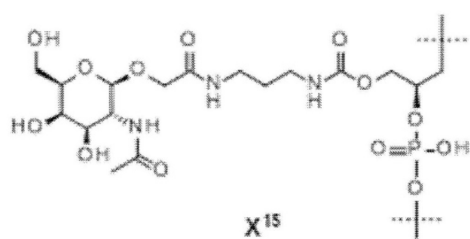


20

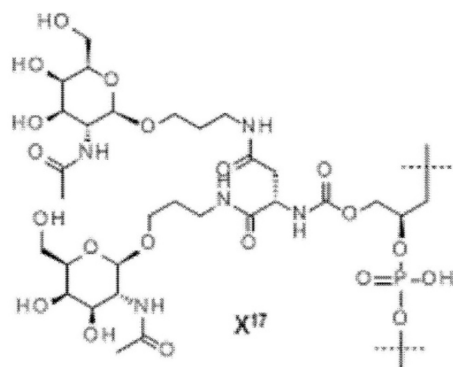
【化 2 0 2】



10



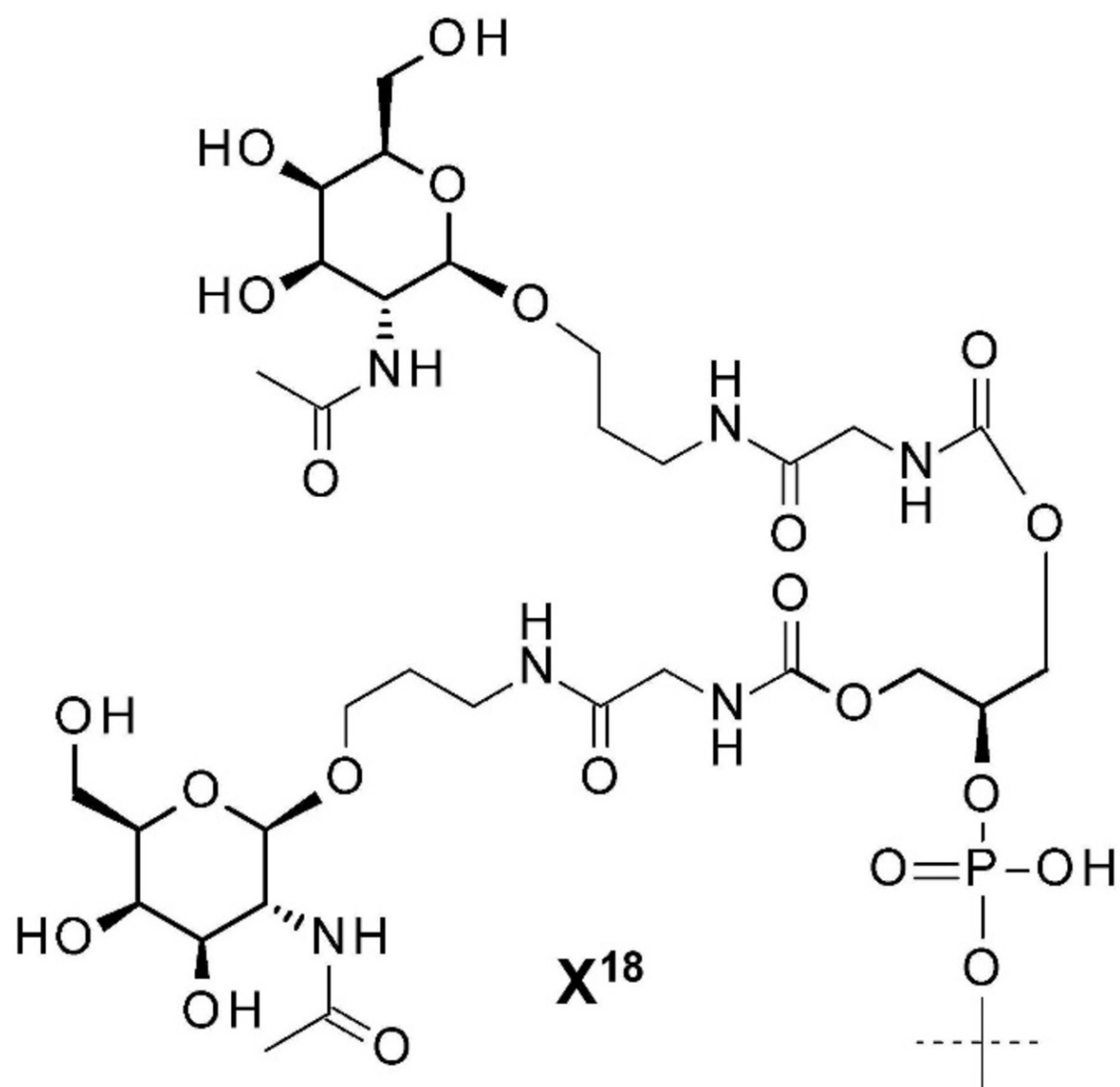
20



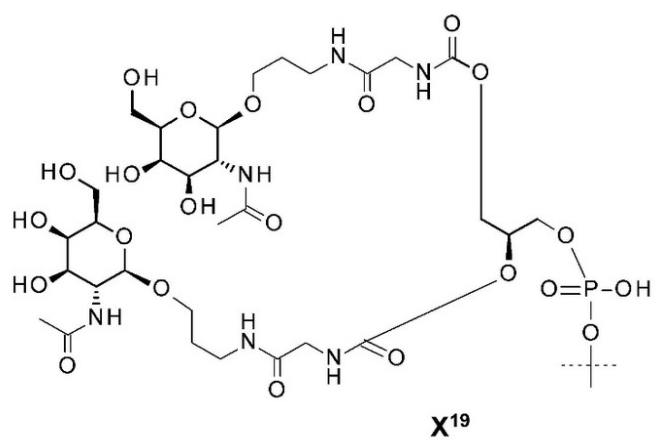
30



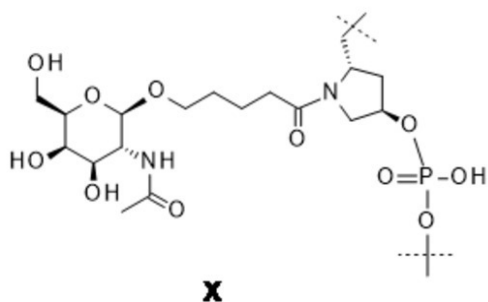
【化 2 0 3】



【化 2 0 4】

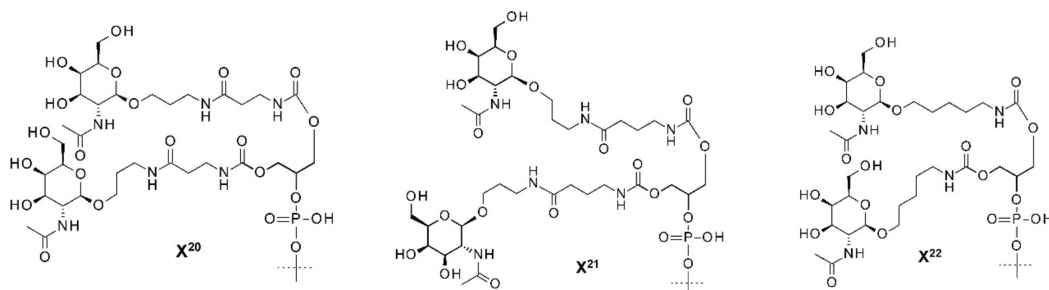


## 【化 2 0 5】



## 【化 2 0 6】

10



20

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にとり入れるものとする。

## 【産業上の利用可能性】

## 【0 4 7 0】

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】

30

## 【0 4 7 1】

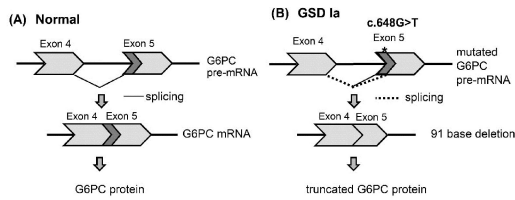
< 配列番号 1 ~ 4 8、9 3 ~ 9 5 > アンチセンスオリゴヌクレオチドの配列を示す。アンチセンスオリゴヌクレオチドを構成するヌクレオチドは、天然型DNA、天然型RNA、DNA/RNAのキメラ、これらの修飾体のいずれであってもよいが、少なくとも1つが修飾ヌクレオチドであることが好ましい。

< 配列番号 4 9 ~ 6 5、6 7 ~ 9 2 > プライマーの配列を示す。

< 配列番号 6 6 > ペプチドの配列を示す。

【 図 1 】

図 1



【 図 3 】

図 3

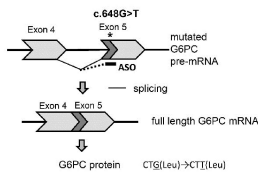
G6PC exon5

```
1      10      20      30      40      50      60      G6PC mRNA
GCAUUGCUU UACAGAAACU UUCAGCCACA UCCACAGCAU CUUAUAGCC AGCCUCAGA G6PC AS
CGUACGACA AUGUCUUGA AAGUGCGUGU AGGUGUGUA GAUAUACGG UCGAGUUCU

70      80      90      100      110      120      G6PC mRNA
AAUAUUUUCU CAUUAACUUC UUCUUUUUCA CCUUCGCUU CGGAUUUUU CUUCUGCUCA 3'
UUUAUAAAGA GUAAUGGAAG AAGGAAGAAG CCAAGCGGUA GCCUAAAUA GACGACGAGU 5'
                                     GcGguA gcCuaAaaTa gAcgA
                                     Gu CpaAgcGguA gcCuaAaaT 5'
                                     AaAgU CpaAgcGguA gcCuaA 5'
                                     GgAaaAgU CpaAgcGguA gcc 5'
                                     G aAggAaaAgU CpaAgcGguA 5'
                                     GaAg aAggAaaAgU CpaAgcG 5'
                                     AuGgaAg aAggAaaAgU CpaA 5'
                                     GtAauGgaAg aAggAaaAgU C 5'
                                     AgA gtAauGgaAg aAggAaaA 5'
                                     AaaAgA gtAauGgaAg aAggA 5'
                                     TaTaaAgA gtAauGgaAg aa 5'
```

【 図 2 】

図 2



【 図 4 】

図 4

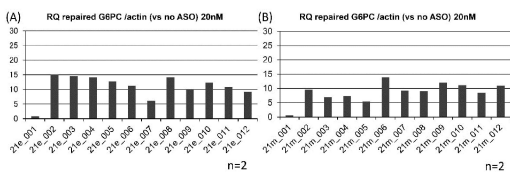
G6PC exon5

```
1      10      20      30      40      50      60      G6PC mRNA
GCAUUGCUU UACAGAAACU UUCAGCCACA UCCACAGCAU CUUAUAGCC AGCCUCAGA G6PC AS
CGUACGACA AUGUCUUGA AAGUGCGUGU AGGUGUGUA GAUAUACGG UCGAGUUCU

70      80      90      100      110      120      G6PC mRNA
AAUAUUUUCU CAUUAACUUC UUCUUUUUCA CCUUCGCUU CGGAUUUUU CUUCUGCUCA 3'
UUUAUAAAGA GUAAUGGAAG AAGGAAGAAG CCAAGCGGUA GCCUAAAUA GACGACGAGU 5'
                                     gcggua gccuaaaaua ga 5'
                                     aaagcgua gccuaaaaua ga 5'
                                     gu CpaAgcGguA gcCuaAaaT 5'
                                     aaAgU CpaAgcGguA gcCuaA 5'
                                     GgAaaAgU CpaAgcGguA gcc 5'
                                     g aAggAaaAgU CpaAgcGguA 5'
                                     qaag aAggAaaAgU CpaAgcG 5'
                                     auggaa aAggAaaAgU CpaA 5'
                                     gtaauggaag aAggAaaAgU c 5'
                                     age gtAauGgaAg aAggAaaA 5'
                                     aaaga gtAauGgaAg aAggA 5'
                                     uauaaaga gtAauGgaAg aa 5'
```

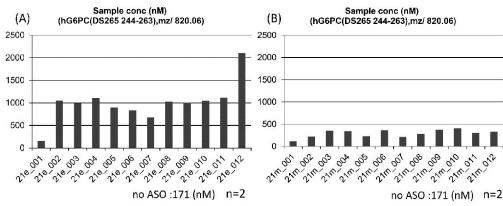
【 図 5 】

図 5



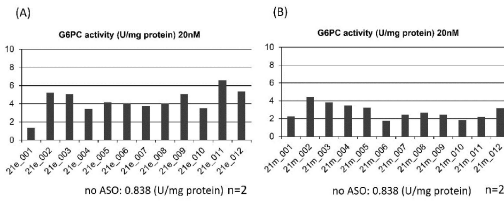
【 図 6 】

図6



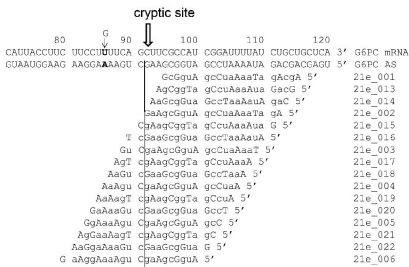
【 図 7 】

図7



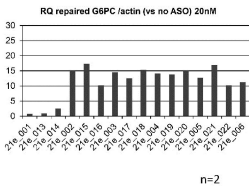
【 図 8 】

図8



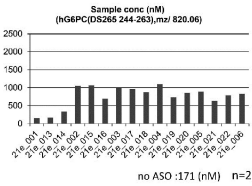
【 図 9 】

図9



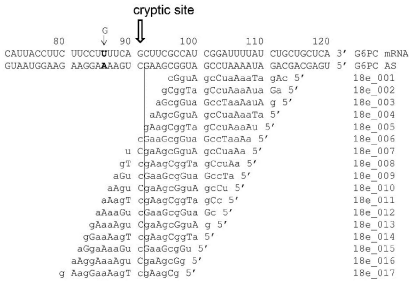
【図 10】

図10



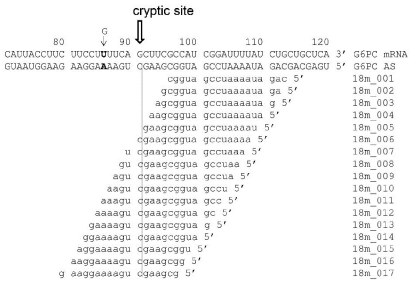
【図 11】

図11



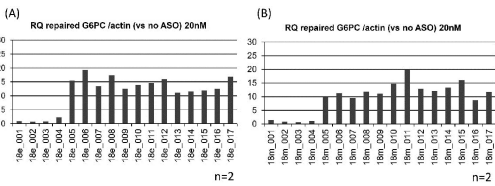
【図 12】

図12



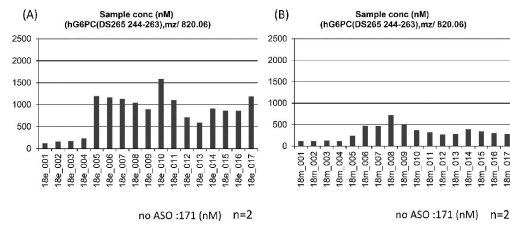
【図 13】

図13



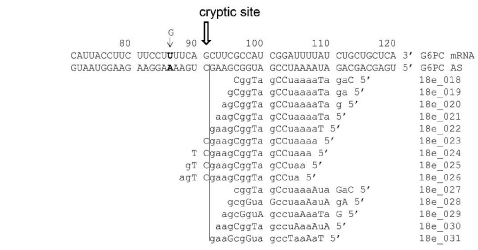
【図 14】

図 14



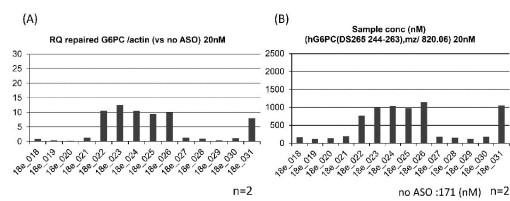
【図 15】

図 15



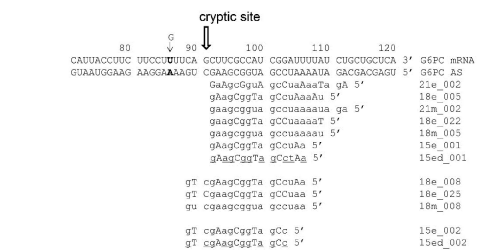
【図 16】

図 16



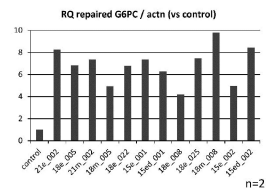
【図 17】

図 17



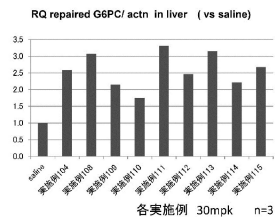
【図 18】

図18



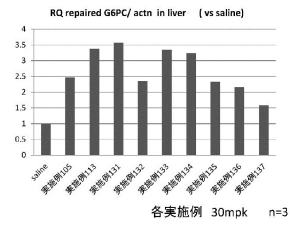
## 【図 2 2】

図22



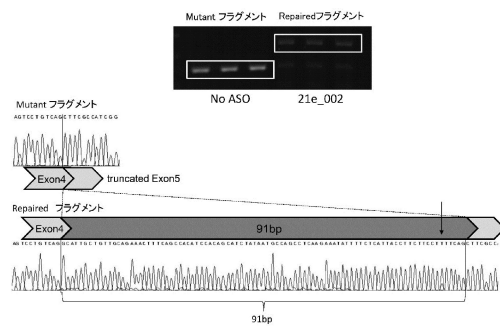
## 【図 2 3】

図23



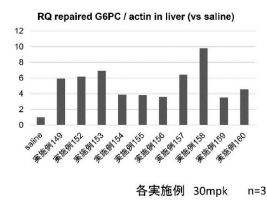
## 【図 2 4】

図24



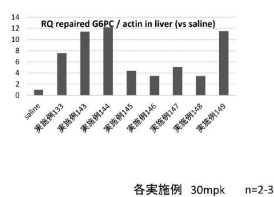
## 【図 2 6】

図26



## 【図 2 5】

図25





【配列表】

0006884268000001.app

## フロントページの続き

- (72)発明者 大西 朗之  
東京都中央区日本橋本町三丁目5番1号 第一三共株式会社内
- (72)発明者 益田 剛  
東京都中央区日本橋本町三丁目5番1号 第一三共株式会社内
- (72)発明者 岩本 充広  
東京都中央区日本橋本町三丁目5番1号 第一三共株式会社内
- (72)発明者 関口 幸子  
東京都中央区日本橋本町三丁目5番1号 第一三共株式会社内
- (72)発明者 伊藤 健太郎  
東京都中央区日本橋本町三丁目5番1号 第一三共株式会社内
- (72)発明者 辻 真之介  
東京都中央区日本橋本町三丁目5番1号 第一三共株式会社内
- (72)発明者 松尾 雅文  
兵庫県神戸市西区伊川谷町有瀬518番 神戸学院大学内

審査官 池上 文緒

- (56)参考文献 国際公開第2012/168435(WO, A1)  
特表2015-501817(JP, A)  
特表平08-510130(JP, A)  
特表2017-501684(JP, A)  
特表2016-529230(JP, A)  
特表2016-523515(JP, A)  
国際公開第2018/164275(WO, A1)  
Hum. Mutat. (2008) vol.29, issue 7, p.921-930  
Am. J. Hum. Genet., 1995年, vol.57, issue 3, p.549-555  
但馬剛ほか, アンチセンス核酸によるG6PG高頻度スプライシング変異の発現修復, 日本小児科学会雑誌, 2019年 2月, vol.123, no.2, p.281(2-0-248)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 31/7115  
C12N 15/113  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)  
CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)  
GenBank/EMBL/DDBJ/GenSeq