

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7665509号  
(P7665509)

(45)発行日 令和7年4月21日(2025.4.21)

(24)登録日 令和7年4月11日(2025.4.11)

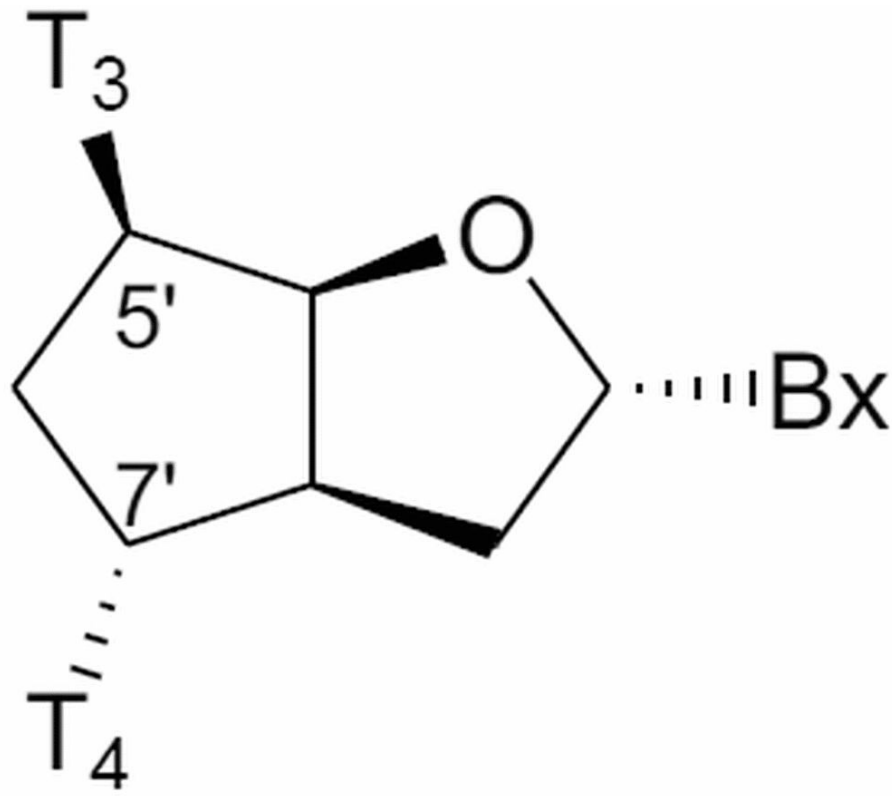
|                   |                               |                         |                          |
|-------------------|-------------------------------|-------------------------|--------------------------|
| (51)国際特許分類        |                               | F I                     |                          |
| C 1 2 N           | 15/11 (2006.01)               | C 1 2 N                 | 15/11                    |
| A 6 1 K           | 47/54 (2017.01)               | A 6 1 K                 | 47/54                    |
| A 6 1 K           | 48/00 (2006.01)               | A 6 1 K                 | 48/00                    |
| A 6 1 P           | 21/04 (2006.01)               | A 6 1 P                 | 21/04                    |
| C 1 2 N           | 15/113 (2010.01)              | C 1 2 N                 | 15/113                   |
|                   |                               | Z Z N A                 |                          |
|                   |                               | Z                       |                          |
|                   |                               | 請求項の数 22 (全172頁) 最終頁に続く |                          |
| (21)出願番号          | 特願2021-513004(P2021-513004)   | (73)特許権者                | 520436633                |
| (86)(22)出願日       | 令和1年5月10日(2019.5.10)          |                         | アルファ アノマリック エスアエス        |
| (65)公表番号          | 特表2021-522862(P2021-522862 A) |                         | フランス国 7 5 0 0 6 パリ, リュ ド |
| (43)公表日           | 令和3年9月2日(2021.9.2)            |                         | ウ レンヌ 1 4 0 ビス           |
| (86)国際出願番号        | PCT/EP2019/062064             | (74)代理人                 | 110002077                |
| (87)国際公開番号        | WO2019/215333                 |                         | 園田・小林弁理士法人               |
| (87)国際公開日         | 令和1年11月14日(2019.11.14)        | (72)発明者                 | レンナー, ヴォルフガング            |
| 審査請求日             | 令和4年5月2日(2022.5.2)            |                         | スイス国 5 2 2 5 ベツベルク, プロ   |
| (31)優先権主張番号       | 62/670,319                    |                         | フェーデンゲート 1               |
| (32)優先日           | 平成30年5月11日(2018.5.11)         | 審査官                     | 西澤 龍彦                    |
| (33)優先権主張国・地域又は機関 | 米国(US)                        |                         |                          |
|                   |                               | 最終頁に続く                  |                          |

(54)【発明の名称】 7'-5'-アルファアノマー二環式糖ヌクレオシドを含むオリゴヌクレオチドコンジュゲート

(57)【特許請求の範囲】  
【請求項1】

オリゴヌクレオチド-脂質基コンジュゲートであって、オリゴヌクレオチドが残基を含み、前記残基の少なくとも2個が、ホスホジエステル結合によって結合されたアルファアノマービスクロDNA (abc-DNA) 残基であり、前記脂質基が、前記オリゴヌクレオチドに共有結合しており、  
前記脂質基は、8〜24個の炭素原子の炭化水素鎖を有する脂肪酸由来基であり、  
前記abc-DNA残基が、式(V)を有し、

【化 1】



式中、式 (V) の前記少なくとも 2 個の a b c - DNA 残基の各々について独立して、  
 $T_3$  または  $T_4$  の一方は、ヌクレオシド結合基であり、 $T_3$  および  $T_4$  の他方は、 $OR_1$   
 、 $OR_2$ 、5' 末端基、7' 末端基、またはヌクレオシド結合基であり、  
 $R_1$  は、H またはヒドロキシル保護基であり、  
 $R_2$  は、式 (V I I) :

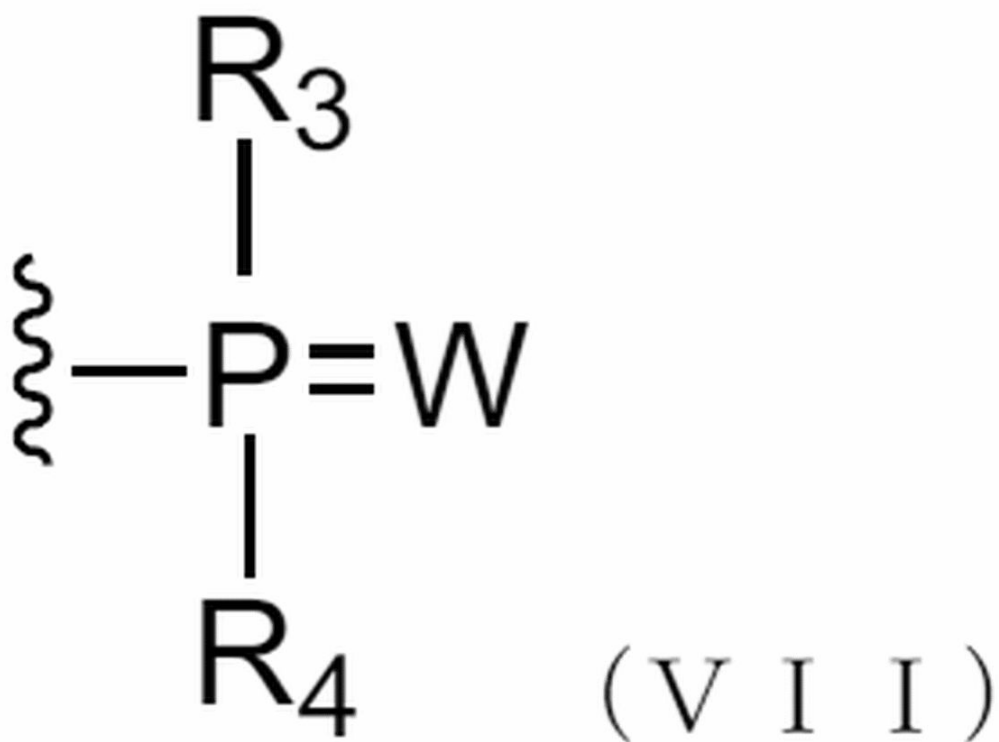
10

20

30

40

50



(式中、

Wは、O、S、もしくはSeを表し、またはWは、電子対を表し、

R<sub>3</sub>およびR<sub>4</sub>は、互いに独立して、H、ハロゲン、OH、OR<sub>5</sub>、NR<sub>6</sub>R<sub>7</sub>、SH、SR<sub>8</sub>、C<sub>1</sub>－C<sub>6</sub>アルキル、C<sub>1</sub>－C<sub>6</sub>ハロアルキル、C<sub>1</sub>－C<sub>6</sub>アルコキシ、C<sub>1</sub>－C<sub>6</sub>ハロアルコキシ、C<sub>1</sub>－C<sub>6</sub>アミノアルキルであり、

R<sub>5</sub>は、シアノ、ニトロ、ハロゲン、－NHC(O)C<sub>1</sub>－C<sub>3</sub>アルキル、－NHC(O)C<sub>1</sub>－C<sub>3</sub>ハロアルキル、C<sub>1</sub>－C<sub>3</sub>アルキルスルホニルで任意選択により置換された、C<sub>1</sub>－C<sub>9</sub>アルキル；各々が互いに独立してシアノ、ニトロ、ハロゲン、C<sub>1</sub>－C<sub>4</sub>アルコキシ、C<sub>1</sub>－C<sub>4</sub>ハロアルキル、C<sub>1</sub>－C<sub>4</sub>ハロアルコキシ、NHC(O)C<sub>1</sub>－C<sub>3</sub>アルキル、NHC(O)C<sub>1</sub>－C<sub>3</sub>ハロアルキル、C<sub>1</sub>－C<sub>3</sub>アルキルスルホニルで任意選択により置換された、アリール、C<sub>1</sub>－C<sub>6</sub>アルキレンアリール、C<sub>1</sub>－C<sub>6</sub>アルキレンジアリール；アセチル；ヒドロキシル保護基であり、

R<sub>6</sub>およびR<sub>7</sub>は、互いに独立して、水素；シアノ、ニトロ、ハロゲン、C<sub>2</sub>－C<sub>6</sub>アルケニル、C<sub>3</sub>－C<sub>6</sub>シクロアルキル、C<sub>1</sub>－C<sub>3</sub>アルコキシで任意選択により置換された、C<sub>1</sub>－C<sub>9</sub>アルキル；シアノ、ニトロ、ハロゲン、C<sub>1</sub>－C<sub>3</sub>アルキル、C<sub>1</sub>－C<sub>3</sub>アルコキシで任意選択により置換された、アリール；アミノ保護基であるか、またはそれらが結合している窒素原子と一緒に複素環を形成し、複素環は、ピロリジニル、ピペリジニル、モルホリニル、ピペラジニル、およびホモピペラジンから選択され、複素環は、C<sub>1</sub>－C<sub>3</sub>アルキルで任意選択により置換され、

R<sub>8</sub>は、チオール保護基であり、

波線は、OR<sub>2</sub>基の酸素への結合を示している）  
のリン部分であり、

B<sub>x</sub>は、核酸塩基である、オリゴヌクレオチド－脂質基コンジュゲート。

【請求項2】

前記オリゴヌクレオチドの残基のすべてが、a b c - DNA 残基である、請求項 1 に記載のオリゴヌクレオチド-脂質基コンジュゲート。

【請求項 3】

前記少なくとも 2 個の a b c - DNA 残基が、ホスホジエステル結合を介して隣接する残基に結合している、請求項 1 又は 2 に記載のオリゴヌクレオチド-脂質基コンジュゲート。

【請求項 4】

前記オリゴヌクレオチドの残基のすべてが、a b c - DNA 残基であり、ホスホジエステル結合を介して結合している、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド-脂質基コンジュゲート。

【請求項 5】

前記脂質基が、前記オリゴヌクレオチドの末端残基に共有結合している、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド-脂質基コンジュゲート。

【請求項 6】

前記オリゴヌクレオチドが、ホスホジエステル結合基、ホスホトリエステル結合基、ホスホロチオエート結合基、ホスホロジチオエート結合基、ホスホネート結合基、ホスホノチオエート結合基、ホスフィネート結合基、ホスホルチオアミデート結合、およびホスホルアミデート結合基からなる群から選択される、リン含有ヌクレオシド結合基を介して結合している残基を含む、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド-脂質基コンジュゲート。

【請求項 7】

前記脂質基が、リンカーを介してオリゴヌクレオチドに結合している、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド-脂質基コンジュゲート。

【請求項 8】

前記リンカーが、炭化水素リンカーまたはポリエチレングリコール (PEG) リンカーであるか、又は

前記リンカーが、アミノ-アルキル-ホスホロチオエートリンカー、アミノ-PEG-ホスホロチオエートリンカー、アルファ-カルボキシレート-アミノ-アルキルホスホロチオエートリンカー、およびアルファ-カルボキシレート-アミノ-PEG-ホスホロチオエートリンカーからなる群から選択される、請求項 7 に記載のオリゴヌクレオチド-脂質基コンジュゲート。

【請求項 9】

前記脂肪酸由来基が、カルボン酸基を含む、及び／又は前記脂肪酸が、ヘキサデカン酸である、請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド-脂質基コンジュゲート。

【請求項 10】

前記脂質基が、チオホスフェート基を介してオリゴヌクレオチドに結合している、請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド-脂質基コンジュゲート。

【請求項 11】

前記オリゴヌクレオチド-脂質基コンジュゲートが、デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) 遺伝子のエクソン 51 の一部に対応するプレ mRNA に結合する、請求項 1 ～ 10 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド-脂質基コンジュゲート。

【請求項 12】

前記オリゴヌクレオチド-脂質基コンジュゲートが、配列番号 4、5、22 ～ 24、36 ～ 39、および 51 ～ 55 からなる群から選択される配列を含む、請求項 1 ～ 10 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド-脂質基コンジュゲート。

【請求項 13】

前記オリゴヌクレオチド-脂質基コンジュゲートが、表 3 :

10

20

30

40

50

| 配列 (5'から7')        | 配列番号 |
|--------------------|------|
| GGTTTGATCTTTACGGTA | 1    |
| GTTTGATCTTTACGGTAG | 2    |
| TTTGATCTTTACGGTAGA | 3    |
| TTGATCTTTACGGTAGAA | 4    |
| TGATCTTTACGGTAGAAG | 5    |
| GATCTTTACGGTAGAAGG | 6    |
| ATCTTTACGGTAGAAGGA | 7    |
| TCTTTACGGTAGAAGGAA | 8    |
| CTTTACGGTAGAAGGAAC | 9    |
| TTTACGGTAGAAGGAACT | 10   |
| TTACGGTAGAAGGAACTA | 11   |
| TACGGTAGAAGGAACTAC | 12   |
| ACGGTAGAAGGAACTACA | 13   |
| GGTTTGATCTTTACGGT  | 14   |
| GTTTGATCTTTACGGTA  | 15   |
| TTTGATCTTTACGGTAG  | 16   |
| TTGATCTTTACGGTAGA  | 17   |
| TGATCTTTACGGTAGAA  | 18   |
| GATCTTTACGGTAGAAG  | 19   |
| ATCTTTACGGTAGAAGG  | 20   |
| TCTTTACGGTAGAAGGA  | 21   |
| CTTTACGGTAGAAGGAA  | 22   |
| TTTACGGTAGAAGGAAC  | 23   |
| TTACGGTAGAAGGAACT  | 24   |
| TACGGTAGAAGGAACTA  | 25   |
| ACGGTAGAAGGAACTAC  | 26   |
| CGGTAGAAGGAACTACA  | 27   |
| GGTTTGATCTTTACGG   | 28   |
| GTTTGATCTTTACGGT   | 29   |
| TTTGATCTTTACGGTA   | 30   |
| TTGATCTTTACGGTAG   | 31   |
| TGATCTTTACGGTAGA   | 32   |
| GATCTTTACGGTAGAA   | 33   |
| ATCTTTACGGTAGAAG   | 34   |
| TCTTTACGGTAGAAGG   | 35   |

10

20

30

40

50

|                  |    |
|------------------|----|
| CTTTACGGTAGAAGGA | 36 |
| TTTACGGTAGAAGGAA | 37 |
| TTACGGTAGAAGGAAC | 38 |
| TACGGTAGAAGGAACT | 39 |
| ACGGTAGAAGGAACTA | 40 |
| CGGTAGAAGGAACTAC | 41 |
| GGTAGAAGGAACTACA | 42 |
| GGTTTGATCTTTACG  | 43 |
| GTTTGATCTTTACGG  | 44 |
| TTTGATCTTTACGGT  | 45 |
| TTGATCTTTACGGTA  | 46 |
| TGATCTTTACGGTAG  | 47 |
| GATCTTTACGGTAGA  | 48 |
| ATCTTTACGGTAGAA  | 49 |
| TCTTTACGGTAGAAG  | 50 |
| CTTTACGGTAGAAGG  | 51 |
| TTTACGGTAGAAGGA  | 52 |
| TTACGGTAGAAGGAA  | 53 |
| TACGGTAGAAGGAAC  | 54 |
| ACGGTAGAAGGAACT  | 55 |
| CGGTAGAAGGAACTA  | 56 |
| GGTAGAAGGAACTAC  | 57 |
| GTAGAAGGAACTACA  | 58 |
| GGTTTGATCTTTAC   | 59 |
| GTTTGATCTTTACG   | 60 |
| TTTGATCTTTACGG   | 61 |
| TTGATCTTTACGGT   | 62 |
| TGATCTTTACGGTA   | 63 |
| GATCTTTACGGTAG   | 64 |
| ATCTTTACGGTAGA   | 65 |
| TCTTTACGGTAGAA   | 66 |
| CTTTACGGTAGAAG   | 67 |
| TTTACGGTAGAAGG   | 68 |
| TTACGGTAGAAGGA   | 69 |
| TACGGTAGAAGGAA   | 70 |
| ACGGTAGAAGGAAC   | 71 |

10

20

30

40

|                |    |
|----------------|----|
| CGGTAGAAGGAACT | 72 |
| GGTAGAAGGAACTA | 73 |
| GTAGAAGGAACTAC | 74 |
| TAGAAGGAACTACA | 75 |

に提供される配列のうちのいずれか1つを含む、請求項1～10のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド-脂質基コンジュゲート。

【請求項14】

50

前記オリゴヌクレオチド-脂質基コンジュゲートが、DMD遺伝子のエクソン53の一部に対応するプレmRNAに結合する、請求項1～10のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド-脂質基コンジュゲート。

【請求項15】

前記オリゴヌクレオチド-脂質基コンジュゲートが、表4：

| 配列（5'から7'）         | 配列番号 |
|--------------------|------|
| CATGTTCTTGTGGAAGTC | 76   |
| ATGTTCTTGTGGAAGTCT | 77   |
| TGTTCTTGTGGAAGTCTT | 78   |
| GTTCTTGTGGAAGTCTTG | 79   |
| TTCTTGTGGAAGTCTTGG | 80   |
| TCTTGTGGAAGTCTTGGC | 81   |
| CTTGTGGAAGTCTTGGCC | 82   |
| TTGTGGAAGTCTTGGCCT | 83   |
| TGTGGAAGTCTTGGCCTC | 84   |
| GTGGAAGTCTTGGCCTCC | 85   |
| TGGAAGTCTTGGCCTCCG | 86   |
| GGAAGTCTTGGCCTCCGT | 87   |
| GAAGTCTTGGCCTCCGTT | 88   |
| AAGTCTTGGCCTCCGTTG | 89   |
| AGTCTTGGCCTCCGTTGT | 90   |
| GTCTTGGCCTCCGTTGTC | 91   |
| TCTTGGCCTCCGTTGTCA | 92   |
| CTTGGCCTCCGTTGTCAA | 93   |
| TTGGCCTCCGTTGTCAAC | 94   |
| TGGCCTCCGTTGTCAACT | 95   |
| GGCCTCCGTTGTCAACTT | 96   |
| GCCTCCGTTGTCAACTTA | 97   |
| CCTCCGTTGTCAACTTAC | 98   |
| CTCCGTTGTCAACTTACT | 99   |
| TCCGTTGTCAACTTACTT | 100  |
| CCGTTGTCAACTTACTTT | 101  |
| CGTTGTCAACTTACTTTA | 102  |
| GTTGTCAACTTACTTTAC | 103  |
| TTGTCAACTTACTTTACA | 104  |
| TGTCAACTTACTTTACAA | 105  |
| GTCAACTTACTTTACAAT | 106  |
| CATGTTCTTGTGGAAGT  | 107  |
| ATGTTCTTGTGGAAGTC  | 108  |
| TGTTCTTGTGGAAGTCT  | 109  |
| GTTCTTGTGGAAGTCTT  | 110  |

10

20

30

40

50

|                   |     |
|-------------------|-----|
| TTCTTGTGGAAGTCTTG | 111 |
| TCTTGTGGAAGTCTTG  | 112 |
| CTTGTGGAAGTCTTGGC | 113 |
| TTGTGGAAGTCTTGGCC | 114 |
| TGTGGAAGTCTTGGCCT | 115 |
| GTGGAAGTCTTGGCCTC | 116 |
| TGGAAGTCTTGGCCTCC | 117 |
| GGAAGTCTTGGCCTCCG | 118 |
| GAAGTCTTGGCCTCCGT | 119 |
| AAGTCTTGGCCTCCGTT | 120 |
| AGTCTTGGCCTCCGTTG | 121 |
| GTCTTGGCCTCCGTTGT | 122 |
| TCTTGGCCTCCGTTGTC | 123 |
| CTTGGCCTCCGTTGTCA | 124 |
| TTGGCCTCCGTTGTCAA | 125 |
| TGGCCTCCGTTGTCAAC | 126 |
| GGCCTCCGTTGTCAACT | 127 |
| GCCTCCGTTGTCAACTT | 128 |
| CCTCCGTTGTCAACTTA | 129 |
| CTCCGTTGTCAACTTAC | 130 |
| TCCGTTGTCAACTTACT | 131 |
| CCGTTGTCAACTTACTT | 132 |
| CGTTGTCAACTTACTTT | 133 |
| GTTGTCAACTTACTTTA | 134 |
| TTGTCAACTTACTTTAC | 135 |
| TGTCAACTTACTTTACA | 136 |
| GTCAACTTACTTTACAA | 137 |
| TCAACTTACTTTACAAT | 138 |
| CATGTTCTTGTGGAAG  | 139 |
| ATGTTCTTGTGGAAGT  | 140 |
| TGTTCTTGTGGAAGTC  | 141 |
| GTTCTTGTGGAAGTCT  | 142 |
| TTCTTGTGGAAGTCTT  | 143 |
| TCTTGTGGAAGTCTTG  | 144 |
| CTTGTGGAAGTCTTGG  | 145 |
| TTGTGGAAGTCTTGGC  | 146 |

10

20

30

40

50

|                  |     |
|------------------|-----|
| TGTGGAAGTCTTGGCC | 147 |
| GTGGAAGTCTTGGCCT | 148 |
| TGGAAGTCTTGGCCTC | 149 |
| GGAAGTCTTGGCCTCC | 150 |
| GAAGTCTTGGCCTCCG | 151 |
| AAGTCTTGGCCTCCGT | 152 |
| AGTCTTGGCCTCCGTT | 153 |
| GTCTTGGCCTCCGTTG | 154 |
| TCTTGGCCTCCGTTGT | 155 |
| CTTGGCCTCCGTTGTC | 156 |
| TTGGCCTCCGTTGTCA | 157 |
| TGGCCTCCGTTGTCAA | 158 |
| GGCCTCCGTTGTCAAC | 159 |
| GCCTCCGTTGTCAACT | 160 |
| CCTCCGTTGTCAACTT | 161 |
| CTCCGTTGTCAACTTA | 162 |
| TCCGTTGTCAACTTAC | 163 |
| CCGTTGTCAACTTACT | 164 |
| CGTTGTCAACTTACTT | 165 |
| GTTGTCAACTTACTTT | 166 |
| TTGTCAACTTACTTTA | 167 |
| TGTCAACTTACTTTAC | 168 |
| GTCAACTTACTTTACA | 169 |
| TCAACTTACTTTACAA | 170 |
| CAACTTACTTTACAAT | 171 |
| CATGTTCTTGTGGAA  | 172 |
| ATGTTCTTGTGGAAG  | 173 |
| TGTTCTTGTGGAAGT  | 174 |
| GTTCTTGTGGAAGTC  | 175 |
| TTCTTGTGGAAGTCT  | 176 |
| TCTTGTGGAAGTCTT  | 177 |
| CTTGTGGAAGTCTTG  | 178 |
| TTGTGGAAGTCTTGG  | 179 |
| TGTGGAAGTCTTGGC  | 180 |
| GTGGAAGTCTTGGCC  | 181 |
| TGGAAGTCTTGGCCT  | 182 |

10

20

30

40

50

|                 |     |
|-----------------|-----|
| GGAAGTCTTGGCCTC | 183 |
| GAAGTCTTGGCCTCC | 184 |
| AAGTCTTGGCCTCCG | 185 |
| AGTCTTGGCCTCCGT | 186 |
| GTCTTGGCCTCCGTT | 187 |
| TCTTGGCCTCCGTTG | 188 |
| CTTGGCCTCCGTTGT | 189 |
| TTGGCCTCCGTTGTC | 190 |
| TGGCCTCCGTTGTCA | 191 |
| GGCCTCCGTTGTCAA | 192 |
| GCCTCCGTTGTCAAC | 193 |
| CCTCCGTTGTCAACT | 194 |
| CTCCGTTGTCAACTT | 195 |
| TCCGTTGTCAACTTA | 196 |
| CCGTTGTCAACTTAC | 197 |
| CGTTGTCAACTTACT | 198 |
| GTTGTCAACTTACTT | 199 |
| TTGTCAACTTACTTT | 200 |
| TGTCAACTTACTTTA | 201 |
| GTCAACTTACTTTAC | 202 |
| TCAACTTACTTTACA | 203 |
| CAACTTACTTTACAA | 204 |
| AACTTACTTTACAAT | 205 |
| CATGTTCTTGTGGA  | 206 |
| ATGTICTTGTGGAA  | 207 |
| TGTTCTTGTGGAAG  | 208 |
| GTTCTTGTGGAAGT  | 209 |
| TTCTTGTGGAAGTC  | 210 |
| TCTTGTGGAAGTCT  | 211 |
| CTTGTGGAAGTCTT  | 212 |
| TTGTGGAAGTCTTG  | 213 |
| TGTGGAAGTCTTGG  | 214 |
| GTGGAAGTCTTGGC  | 215 |
| TGGAAGTCTTGGCC  | 216 |
| GGAAGTCTTGGCCT  | 217 |
| GAAGTCTTGGCCTC  | 218 |

10

20

30

40

50

|                |     |
|----------------|-----|
| AAGTCTTGGCCTCC | 219 |
| AGTCTTGGCCTCCG | 220 |
| GTCTTGGCCTCCGT | 221 |
| TCTTGGCCTCCGTT | 222 |
| CTTGGCCTCCGTTG | 223 |
| TTGGCCTCCGTTGT | 224 |
| TGGCCTCCGTTGTC | 225 |
| GGCCTCCGTTGTCA | 226 |
| GCCTCCGTTGTCAA | 227 |
| CCTCCGTTGTCAAC | 228 |
| CTCCGTTGTCAACT | 229 |
| TCCGTTGTCAACTT | 230 |
| CCGTTGTCAACTTA | 231 |
| CGTTGTCAACTTAC | 232 |
| GTTGTCAACTTACT | 233 |
| TTGTCAACTTACTT | 234 |
| TGTCAACTTACTTT | 235 |
| GTCAACTTACTTTA | 236 |
| TCAACTTACTTTAC | 237 |
| CAACTTACTTTACA | 238 |
| AACTTACTTTACAA | 239 |
| ACTTACTTTACAAT | 240 |

10

20

に提供される配列のうちのいずれか1つを含む、請求項1～10のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド-脂質基コンジュゲート。

30

【請求項16】

前記オリゴヌクレオチド-脂質基コンジュゲートが、DMD遺伝子のエクソン45の一部に対応するプレmRNAに結合する、請求項1～10のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド-脂質基コンジュゲート。

【請求項17】

前記オリゴヌクレオチド-脂質基コンジュゲートが、表5：

40

50

| 配列 (5'から7')        | 配列番号 |
|--------------------|------|
| CCATAGAATGTCCTTGAG | 241  |
| CATAGAATGTCCTTGAGG | 242  |
| ATAGAATGTCCTTGAGGT | 243  |
| TAGAATGTCCTTGAGGTC | 244  |
| AGAATGTCCTTGAGGTCC | 245  |
| GAATGTCCTTGAGGTCCT | 246  |
| AATGTCCTTGAGGTCCTA | 247  |
| ATGTCCTTGAGGTCCTAC | 248  |
| TGTCCTTGAGGTCCTACC | 249  |
| GTCCTTGAGGTCCTACCG | 250  |
| TCCTTGAGGTCCTACCGT | 251  |
| CCTTGAGGTCCTACCGTA | 252  |
| CTTGAGGTCCTACCGTAA | 253  |
| TTGAGGTCCTACCGTAAC | 254  |
| TGAGGTCCTACCGTAACC | 255  |
| GAGGTCCTACCGTAACCC | 256  |
| AGGTCCTACCGTAACCCG | 257  |
| GGTCCTACCGTAACCCGT | 258  |
| GTCCTACCGTAACCCGTC | 259  |
| TCCTACCGTAACCCGTCG | 260  |
| CCTACCGTAACCCGTCGC | 261  |
| CTACCGTAACCCGTCGCC | 262  |
| TACCGTAACCCGTCGCCG | 263  |
| ACCGTAACCCGTCGCCGT | 264  |
| CCGTAACCCGTCGCCGTT | 265  |
| CGTAACCCGTCGCCGTTT | 266  |
| GTAACCCGTCGCCGTTTG | 267  |
| TAACCCGTCGCCGTTTGA | 268  |
| AACCCGTCGCCGTTTGAC | 269  |
| ACCCGTCGCCGTTTGACA | 270  |
| CCATAGAATGTCCTTGA  | 271  |
| CATAGAATGTCCTTGAG  | 272  |
| ATAGAATGTCCTTGAGG  | 273  |
| TAGAATGTCCTTGAGGT  | 274  |
| AGAATGTCCTTGAGGTC  | 275  |

10

20

30

40

50

|                   |     |
|-------------------|-----|
| GAATGTCCTTGAGGTCC | 276 |
| AATGTCCTTGAGGTCCT | 277 |
| ATGTCCTTGAGGTCCTA | 278 |
| TGTCCTTGAGGTCCTAC | 279 |
| GTCCTTGAGGTCCTACC | 280 |
| TCCTTGAGGTCCTACCG | 281 |
| CCTTGAGGTCCTACCGT | 282 |
| CTTGAGGTCCTACCGTA | 283 |
| TTGAGGTCCTACCGTAA | 284 |
| TGAGGTCCTACCGTAAC | 285 |
| GAGGTCCTACCGTAACC | 286 |
| AGGTCCTACCGTAACCC | 287 |
| GGTCCTACCGTAACCCG | 288 |
| GTCCTACCGTAACCCGT | 289 |
| TCCTACCGTAACCCGTC | 290 |
| CCTACCGTAACCCGTCG | 291 |
| CTACCGTAACCCGTCGC | 292 |
| TACCGTAACCCGTCGCC | 293 |
| ACCGTAACCCGTCGCCG | 294 |
| CCGTAACCCGTCGCCGT | 295 |
| CGTAACCCGTCGCCGTT | 296 |
| GTAACCCGTCGCCGTTT | 297 |
| TAACCCGTCGCCGTTTG | 298 |
| AACCCGTCGCCGTTTGA | 299 |
| ACCCGTCGCCGTTTGAC | 300 |
| CCCGTCGCCGTTTGACA | 301 |
| CCATAGAATGTCCTTG  | 302 |
| CATAGAATGTCCTTGA  | 303 |
| ATAGAATGTCCTTGAG  | 304 |
| TAGAATGTCCTTGAGG  | 305 |
| AGAATGTCCTTGAGGT  | 306 |
| GAATGTCCTTGAGGTC  | 307 |
| AATGTCCTTGAGGTCC  | 308 |
| ATGTCCTTGAGGTCCT  | 309 |
| TGTCCTTGAGGTCCTA  | 310 |
| GTCCTTGAGGTCCTAC  | 311 |

10

20

30

40

50

|                  |     |
|------------------|-----|
| TCCTTGAGGTCCTACC | 312 |
| CCTTGAGGTCCTACCG | 313 |
| CTTGAGGTCCTACCGT | 314 |
| TTGAGGTCCTACCGTA | 315 |
| TGAGGTCCTACCGTAA | 316 |
| GAGGTCCTACCGTAAC | 317 |
| AGGTCCTACCGTAACC | 318 |
| GGTCCTACCGTAACCC | 319 |
| GTCCTACCGTAACCCG | 320 |
| TCCTACCGTAACCCGT | 321 |
| CCTACCGTAACCCGTC | 322 |
| CTACCGTAACCCGTCG | 323 |
| TACCGTAACCCGTCGC | 324 |
| ACCGTAACCCGTCGCC | 325 |
| CCGTAACCCGTCGCCG | 326 |
| CGTAACCCGTCGCCGT | 327 |
| GTAACCCGTCGCCGTT | 328 |
| TAACCCGTCGCCGTTT | 329 |
| AACCCGTCGCCGTTTG | 330 |
| ACCCGTCGCCGTTTGA | 331 |
| CCCGTCGCCGTTTGAC | 332 |
| CCGTCGCCGTTTGACA | 333 |
| CCATAGAATGTCCTT  | 334 |
| CATAGAATGTCCTTG  | 335 |
| ATAGAATGTCCTTGA  | 336 |
| TAGAATGTCCTTGAG  | 337 |
| AGAATGTCCTTGAGG  | 338 |
| GAATGTCCTTGAGGT  | 339 |
| AATGTCCTTGAGGTC  | 340 |
| ATGTCCTTGAGGTCC  | 341 |
| TGTCCTTGAGGTCCT  | 342 |
| GTCCCTTGAGGTCCTA | 343 |
| TCCTTGAGGTCCTAC  | 344 |
| CCTTGAGGTCCTACC  | 345 |
| CTTGAGGTCCTACCG  | 346 |
| TTGAGGTCCTACCGT  | 347 |

10

20

30

40

50

|                 |     |
|-----------------|-----|
| TGAGGTCCTACCGTA | 348 |
| GAGGTCCTACCGTAA | 349 |
| AGGTCCTACCGTAAC | 350 |
| GGTCCTACCGTAACC | 351 |
| GTCCTACCGTAACCC | 352 |
| TCCTACCGTAACCCG | 353 |
| CCTACCGTAACCCGT | 354 |
| CTACCGTAACCCGTC | 355 |
| TACCGTAACCCGTCG | 356 |
| ACCGTAACCCGTCGC | 357 |
| CCGTAACCCGTCGCC | 358 |
| CGTAACCCGTCGCCG | 359 |
| GTAACCCGTCGCCGT | 360 |
| TAACCCGTCGCCGTT | 361 |
| AACCCGTCGCCGTTT | 362 |
| ACCCGTCGCCGTTTG | 363 |
| CCCGTCGCCGTTTGA | 364 |
| CCGTCGCCGTTTGAC | 365 |
| CGTCGCCGTTTGACA | 366 |
| CCATAGAATGTCCT  | 367 |
| CATAGAATGTCCTT  | 368 |
| ATAGAATGTCCTTG  | 369 |
| TAGAATGTCCTTGA  | 370 |
| AGAATGTCCTTGAG  | 371 |
| GAATGTCCTTGAGG  | 372 |
| AATGTCCTTGAGGT  | 373 |
| ATGTCCTTGAGGTC  | 374 |
| TGTCCTTGAGGTCC  | 375 |
| GTCCTTGAGGTCCCT | 376 |
| TCCTTGAGGTCCCTA | 377 |
| CCTTGAGGTCCCTAC | 378 |
| CTTGAGGTCCCTACC | 379 |
| TTGAGGTCCCTACCG | 380 |
| TGAGGTCCCTACCGT | 381 |
| GAGGTCCCTACCGTA | 382 |
| AGGTCCCTACCGTAA | 383 |

10

20

30

40

50

|                |     |
|----------------|-----|
| GGTCCTACCGTAAC | 384 |
| GTCCTACCGTAACC | 385 |
| TCCTACCGTAACCC | 386 |
| CCTACCGTAACCCG | 387 |
| CTACCGTAACCCGT | 388 |
| TACCGTAACCCGTC | 389 |
| ACCGTAACCCGTCG | 390 |
| CCGTAACCCGTCGC | 391 |
| CGTAACCCGTCGCC | 392 |
| GTAACCCGTCGCCG | 393 |
| TAACCCGTCGCCGT | 394 |
| AACCCGTCGCCGTT | 395 |
| ACCCGTCGCCGTTT | 396 |
| CCCGTCGCCGTTTG | 397 |
| CCGTCGCCGTTTGA | 398 |
| CGTCGCCGTTTGAC | 399 |
| GTCGCCGTTTGACA | 400 |

10

20

に提供される配列のうちのいずれか1つを含む、請求項1～10のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド-脂質基コンジュゲート。

【請求項18】

前記オリゴヌクレオチドが12～24個の残基を含む、請求項1～17のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド-脂質基コンジュゲート。

【請求項19】

請求項1～18のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド-脂質基コンジュゲートを好適な担体と組み合わせて含む、医薬組成物。

30

【請求項20】

遺伝子から発現されたRNAへのオリゴヌクレオチド-脂質基コンジュゲートのハイブリダイゼーションを可能にすることにより、前記遺伝子の発現を変化させるための医薬の製造における請求項1～18のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド-脂質基コンジュゲートの使用であって、前記オリゴヌクレオチドは、前記RNAの一部に相補的な配列を含む、使用。

【請求項21】

デュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）もしくはベッカー型筋ジストロフィー（BMD）を有する対象において、または前記対象に由来する細胞において、ヒトジストロフィンプレmRNAのエクソン51のスキッピングを誘導するための医薬の製造における請求項1～13のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド-脂質基コンジュゲートの使用であって、前記オリゴヌクレオチド-脂質基コンジュゲートは、配列番号4、5、22～24、36～39、および51～55からなる群から選択される配列を含み、前記オリゴヌクレオチド-脂質基コンジュゲートは、前記対象または前記細胞において前記エクソンのスキッピングを誘導し、前記ヒトジストロフィンプレmRNAのエクソン51のスキッピングから生成されたmRNAが、機能的ジストロフィンタンパク質またはベッカー対象のジストロフィンタンパク質をコードする、使用。

40

【請求項22】

対象においてまたは前記対象に由来する細胞において、デュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）またはベッカー型筋ジストロフィー（BMD）を処置するための医薬の製造

50

における請求項 1 ～ 1 3 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド-脂質基コンジュゲートの使用であって、前記オリゴヌクレオチド-脂質基コンジュゲートは、配列番号 4、5、22 ～ 24、36 ～ 39、および 51 ～ 55 からなる群から選択される配列を含み、前記オリゴヌクレオチド-脂質基コンジュゲートは、ヒトジストロフィンプレ mRNA のエクソン 51 のスキッピングを誘導し、前記ヒトジストロフィンプレ mRNA のエクソン 51 のスキッピングから生成された mRNA が、機能的ジストロフィンタンパク質またはベッカー対象のジストロフィンタンパク質をコードする、使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、オリゴヌクレオチドコンジュゲート、および遺伝子発現を調節するためのその使用に関する。

【背景技術】

【0002】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、RNA プロセッシングに影響を与え、タンパク質発現を調節する。特定の例では、アンチセンス化合物は、標的の転写または翻訳の変化をもたらす。そのような発現の調節は、例えば、標的 mRNA の分解または占有に基づく阻害によって達成することができる。一本鎖または二本鎖標的への強力な配列特異的結合を示し、化学的分解に耐性であるオリゴヌクレオチド類似体は、治療剤として潜在的に有用である。化学的に修飾されたオリゴヌクレオチドが治療用途のために設計されている。

【発明の概要】

【0003】

本発明は、abc-DNAヌクレオシドを含み、脂質基にコンジュゲートしたオリゴヌクレオチドを提供する。abc-DNAヌクレオシドは、好ましくは、ホスホジエステル結合を介して結合されている。

【0004】

本発明は、オリゴヌクレオチド-脂質基コンジュゲートであって、オリゴヌクレオチドが、ホスホジエステル結合によって結合された少なくとも 2 個のアルファアノマービシクロ DNA (abc-DNA) 残基を含み、脂質基が、オリゴヌクレオチドに共有結合している、オリゴヌクレオチド-脂質基コンジュゲートを提供する。

【0005】

一実施形態では、脂質基は、リンカーを介してオリゴヌクレオチドに共有結合している。

【0006】

別の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、12 ～ 24 個の残基を含む。別の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、14 ～ 20 個の残基を含む。別の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、14 ～ 19 個の残基を含む。別の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、15 ～ 19 個の残基を含む。別の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、15 個の残基を含む。別の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、16 個の残基を含む。別の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、17 個の残基を含む。別の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、18 個の残基を含む。別の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、19 個の残基を含む。

【0007】

別の実施形態では、abc-DNA 残基は、式 (V) を有し、

10

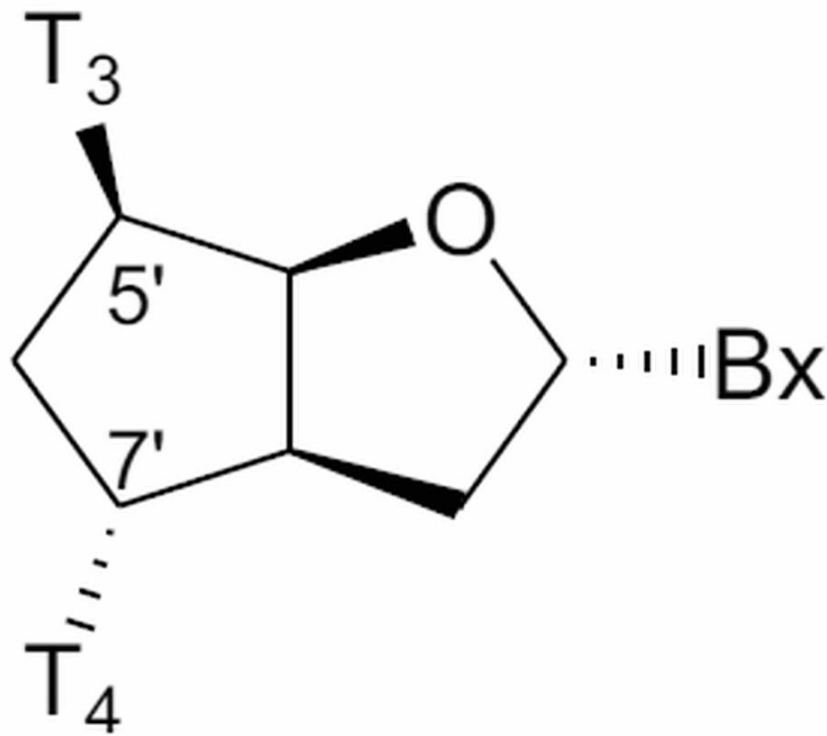
20

30

40

50

【化 1】



式中、式 (I V) の少なくとも 2 個の a b c - D N A 残基の各々について独立して、 $T_3$  または  $T_4$  の一方は、ヌクレオシド結合基であり、 $T_3$  および  $T_4$  の他方は、 $OR_1$ 、 $OR_2$ 、5' 末端基、7' 末端基、またはヌクレオシド結合基であり、

$R_1$  は、H またはヒドロキシル保護基であり、

$R_2$  は、リン部分であり、

$Bx$  は、核酸塩基であり、好ましくは、 $Bx$  は、プリン塩基またはピリミジン塩基から選択され、さらに好ましくは、 $Bx$  は、ウラシル、チミン、シトシン、5-メチルシトシン、アデニンまたはグアニンから選択される。

【0008】

したがって、別の実施形態では、a b c - D N A 残基は、式 (V) を有し、

10

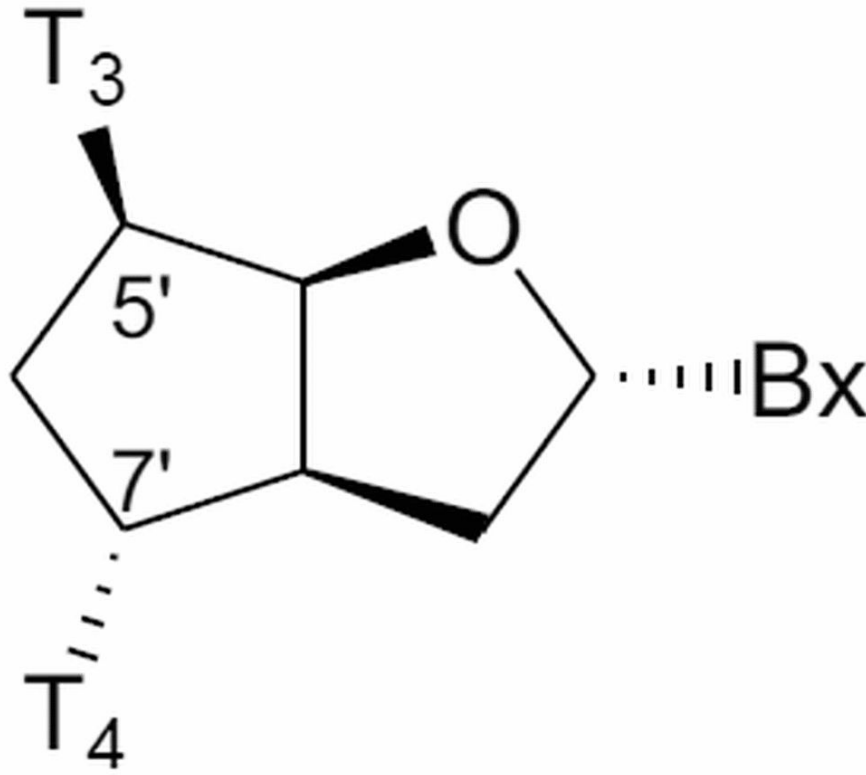
20

30

40

50

【化 2】



、式中、

(I)  $T_3$  は、ヌクレオシド結合基であり、 $T_4$  は、7' 末端基、 $OR_1$ 、もしくは  $OR_2$  であり、好ましくは、 $T_4$  は、7' 末端基もしくは  $OR_1$  であり、または

(ii)  $T_3$  は、5' 末端基、 $OR_1$ 、もしくは  $OR_2$  であり、好ましくは、 $T_3$  は、5' 末端基もしくは  $OR_2$  であり、

$T_4$  は、ヌクレオシド結合基であり、または

(iii)  $T_3$  および  $T_4$  は、互いに独立して、ヌクレオシド結合基であり、

$R_1$  は、H またはヒドロキシル保護基であり、

$R_2$  は、リン部分であり、

$Bx$  は、核酸塩基であり、好ましくは、 $Bx$  は、プリン塩基またはピリミジン塩基から選択され、さらに好ましくは、 $Bx$  は、ウラシル、チミン、シトシン、5-メチルシトシン、アデニンまたはグアニンから選択される。

【0009】

別の実施形態では、残基のすべては、abc-DNA 残基である。

【0010】

別の実施形態では、少なくとも2個の abc-DNA 残基は、ホスホジエステル結合を介して隣接する残基に結合している。別の実施形態では、少なくとも2個の abc-DNA 残基は、ホスホジエステル結合を介して隣接する残基に結合され、それぞれのさらなるヌクレオシド結合基は、互いに独立して、ホスホジエステル結合基、ホスホトリエステル結合基、ホスホロチオエート結合基、ホスホロジチオエート結合基、ホスホネート結合基、ホスホノチオエート結合基、ホスフィネート結合基、ホスホルチオアミデート結合、またはホスホルアミデート結合基から選択される。

【0011】

別の実施形態では、残基のすべては、abc-DNA 残基であり、ホスホジエステル結合を介して結合されている。したがって、別の実施形態では、各ヌクレオシド結合基は、ホスホジエステル結合基である。

【0012】

別の実施形態では、脂質基は、オリゴヌクレオチドの末端残基に共有結合している。

【0013】

別の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、ホスホジエステル結合基、ホスホトリエステル結合基、ホスホロチオエート結合基、ホスホロジチオエート結合基、ホスホネート結合基、ホスホノチオエート結合基、ホスフィネート結合基、ホスホルチオアミデート結合、およびホスホルアミデート結合基からなる群から選択される、リン含有ヌクレオシド結合基を介して結合している残基を含む。

【0014】

別の実施形態では、リンカーは、炭化水素リンカーまたはポリエチレングリコール（PEG）リンカーである。

【0015】

別の実施形態では、リンカーは、アミノアルキルホスホロチオエートリンカー、アミノPEGホスホロチオエートリンカー、アルファカルボキシレートアミノアルキルホスホロチオエートリンカー、およびアルファカルボキシレートアミノPEGホスホロチオエートリンカーからなる群から選択される。

【0016】

別の実施形態では、リンカーは、切断可能な基を含む。

【0017】

別の実施形態では、脂質基は、脂肪酸由来基である。

【0018】

一実施形態では、脂肪酸は、飽和または不飽和である。

【0019】

別の実施形態では、脂肪酸は、4～28個の炭素原子の長さを有する。

【0020】

別の実施形態では、脂肪酸由来基は、カルボン酸基を含む。

【0021】

別の実施形態では、脂肪酸由来基は、ジカルボン酸に由来する。

【0022】

別の実施形態では、脂肪酸は、表1または表2に提示される脂肪酸から選択される。

【0023】

別の実施形態では、脂肪酸は、ヘキサデカン酸である。

【0024】

一実施形態では、脂質基は、チオホスフェート基を介してリンカーに結合している。

【0025】

一実施形態では、脂質基は、チオホスフェート基を介してオリゴヌクレオチドに結合している。

【0026】

別の実施形態では、オリゴヌクレオチドコンジュゲートは、デュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）遺伝子のエクソン51の一部に対応するプレmRNAに結合する。

【0027】

別の実施形態では、オリゴヌクレオチドコンジュゲートは、配列番号4、5、22～24、36～39、51～55、404、および414～425からなる群から選択される配列を含む。別の実施形態では、オリゴヌクレオチドコンジュゲートは、配列番号417または配列番号418の配列を含む。

【0028】

別の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、表3に提供される配列のうちのいずれか1つを含む。

【0029】

一実施形態では、オリゴヌクレオチドコンジュゲートは、DMD遺伝子のエクソン53の一部に対応するプレmRNAに結合する。

10

20

30

40

50

## 【0030】

一実施形態では、オリゴヌクレオチドは、表4に提供される配列のうちのいずれか1つを含む。

## 【0031】

別の実施形態では、オリゴヌクレオチドコンジュゲートは、DMD遺伝子のエクソン45の一部に対応するプレmRNAに結合する。

## 【0032】

一実施形態では、オリゴヌクレオチドは、表5に提供される配列のうちのいずれか1つを含む。

## 【0033】

本発明はまた、好適な担体と組み合わせた、オリゴヌクレオチド-脂質基コンジュゲートを含む医薬組成物であって、オリゴヌクレオチドが、ホスホジエステル結合によって結合された少なくとも2個のアルファアノマービスクロDNA (abc-DNA) 残基を含み、脂質基が、オリゴヌクレオチドに共有結合している、医薬組成物を提供する。

## 【0034】

本発明はまた、遺伝子から発現されるRNAへの、オリゴヌクレオチド-脂質基コンジュゲートのハイブリダイゼーションを可能にすることによって遺伝子の発現を変化させる方法であって、オリゴヌクレオチドは、ホスホジエステル結合によって結合された少なくとも2個のアルファアノマービスクロDNA (abc-DNA) 残基を含み、脂質基は、オリゴヌクレオチドに共有結合しており、オリゴヌクレオチドは、RNAの一部に相補的な配列を含む、方法を提供する。

## 【0035】

本発明はまた、デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) もしくはベッカー型筋ジストロフィー (BMD) を有する対象において、または対象に由来する細胞において、ヒトジストロフィンプレmRNAのエクソン51のスキッピングを誘導する方法であって、該方法は、オリゴヌクレオチド-脂質基コンジュゲートを提供することを含み、オリゴヌクレオチドが、ホスホジエステル結合によって結合された少なくとも2個のアルファアノマービスクロDNA (abc-DNA) 残基を含み、脂質基が、配列番号4、5、22~24、36~39、51~55、404および414~425、好ましくは配列番号417または配列番号418からなる群から選択される配列を含むオリゴヌクレオチドに共有結合し、オリゴヌクレオチド結合が、対象または細胞においてエクソンのスキッピングを誘導し、ジストロフィンプレmRNAのエクソン51のスキッピングから生成されたmRNAが、機能的ジストロフィンタンパク質またはベッカー対象のジストロフィンタンパク質をコードする、方法を提供する。

## 【0036】

本発明はまた、ヒトジストロフィンプレmRNAのエクソン51のスキッピングを誘導することにより、対象においてまたは対象に由来する細胞において、デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) またはベッカー型筋ジストロフィー (BMD) を処置する方法であって、該方法は、対象または細胞に、オリゴヌクレオチド-脂質基コンジュゲートを含む組成物を提供することを含み、オリゴヌクレオチドが、ホスホジエステル結合によって結合された少なくとも2個のアルファアノマービスクロDNA (abc-DNA) 残基を含み、脂質基が、配列番号4、5、22~24、36~39、51~55、404、および414~425、好ましくは配列番号417または配列番号418からなる群から選択される配列を含むオリゴヌクレオチドと共有結合しており、オリゴヌクレオチド結合は、対象または細胞においてエクソンのスキッピングを誘導し、ジストロフィンプレmRNAのエクソン51のスキッピングから生成されたmRNAは、機能的ジストロフィンタンパク質またはベッカー対象のジストロフィンタンパク質をコードする、方法を提供する。

## 【0037】

本発明はまた、デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) もしくはベッカー型筋ジストロフィー (BMD) を有する対象において、または対象に由来する細胞において、ヒト

10

20

30

40

50

ジストロフィンプレmRNAのエクソン51のスキッピングを誘導するための方法であって、該方法が、オリゴヌクレオチド-脂質基コンジュゲートを提供することを含み、オリゴヌクレオチドが、ホスホジエステル結合によって結合された少なくとも2個のアルファアノマービシクロDNA (abc-DNA) 残基を含み、脂質基が、表3に示す配列のうちのいずれか1つを含むオリゴヌクレオチドに共有結合しており、好ましくは、残基のすべてが、abc-DNA残基であり、オリゴヌクレオチド結合が、対象または細胞においてエクソンのスキッピングを誘導し、ジストロフィンプレmRNAのエクソン51のスキッピングから生成されたmRNAが、機能性ジストロフィンタンパク質またはベッカー対象のジストロフィンタンパク質をコードする、方法を提供する。

#### 【0038】

本発明はまた、ヒトジストロフィンプレmRNAのエクソン51のスキッピングを誘導することにより、対象においてまたは対象に由来する細胞において、デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) またはベッカー型筋ジストロフィー (BMD) を処置する方法であって、該方法は、対象または細胞に、オリゴヌクレオチド-脂質基コンジュゲートを含む組成物を提供することを含み、オリゴヌクレオチドが、ホスホジエステル結合によって結合された少なくとも2個のアルファアノマービシクロDNA (abc-DNA) 残基を含み、脂質基が、表3に示されたいずれか1つを含むオリゴヌクレオチドに共有結合しており、好ましくは、残基のすべてが、abc-DNA残基であり、オリゴヌクレオチド結合が、対象または細胞においてエクソンのスキッピングを誘導し、ジストロフィンプレmRNAのエクソン51のスキッピングから生成されたmRNAは、機能的ジストロフィンタンパク質またはベッカー対象のジストロフィンタンパク質をコードする、方法を提供する。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0039】

【図1A】液体クロマトグラフィー質量分析 (LS-MS) によるアルファアノマーオリゴヌクレオチドの酸性安定性の評価。未処理ON1のLS-MSクロマトグラム。

【図1B】未処理ON1のLS-MS断片化パターン。

【図1C】酸性条件で24時間処理したON1のLS-MSクロマトグラム。

【図1D】酸性条件下で24時間処理したON1のLS-MS断片化パターン。

【図2A】LS-MSによるアルファアノマーオリゴヌクレオチドの熱安定性の評価。未処理ON1のLS-MSクロマトグラム。

【図2B】未処理ON1のLS-MS断片化パターン。

【図2C】95℃で60分間加熱したON1のLS-MSクロマトグラム。

【図2D】95℃で60分間加熱したON1のLS-MS断片化パターン。

【図3】20%変性PAGEによるアルファアノマーオリゴヌクレオチドの生体安定性安定性の評価。マウス血清中でインキュベートされたON1およびその対応する天然オリゴヌクレオチドのPAGE。

【図4】異なるアルブミン当量でインキュベートされたON1の移動度シフトアッセイ。

【図5】異なるアルブミン当量でインキュベートされた非複合体化ON1の比較。限外濾過実験によって値を得た。

【図6】異なるマウス血清量でインキュベートされたON1の移動度シフトアッセイ。

【図7】ON1溶液中に存在するナノ粒子の強度。

【図8】ネスティング (nesting) RT-PCRにより検出された、C2C12細胞へのマウスエクソン23スキッピング効率 (skipping efficiency) のためのアガロースゲル。

【図9A】ネスティングRT-PCRにより検出された、KM155細胞におけるヒトエクソン51スキッピング効率のためのアガロースゲル。

【図9B】ネスティングRT-PCRにより検出された、KM155細胞におけるヒトエクソン51スキッピング効率のためのアガロースゲル。

#### 【発明を実施するための形態】

## 【0040】

本発明は、少なくとも1つの（1つ以上の）アルファアノマービスクロDNA（ $\alpha$ bc-DNA）ヌクレオシド、オリゴヌクレオチドのヌクレオシドを結合するホスホジエステル基、およびリンカーを介してオリゴヌクレオチドに結合した脂質基を含む、オリゴヌクレオチドコンジュゲートを提供する。本発明は、ホスホジエステルヌクレオシド間結合を介して結合され、リガンド基にコンジュゲートされた、 $\alpha$ bc-DNAヌクレオシドを含むオリゴヌクレオチドを提供する。

## 【0041】

本発明のオリゴヌクレオチドは、転写、翻訳、スプライシング、および／もしくは分解を妨害することによって、ならびに／または非コードRNAの機能を阻害することによって、遺伝子発現を調節する。

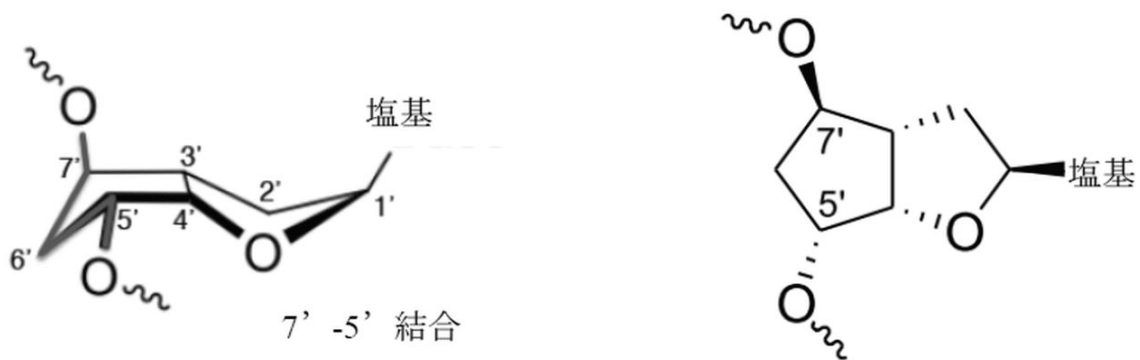
## 【0042】

定義：

本明細書で使用する場合、「アルファアノマービスクロDNA（ $\alpha$ bc-DNA）ヌクレオシド」は、二環式糖部分を含み、以下に示される一般構造を有するヌクレオシド類似体を意味する。

## 【化3】

abcDNA



7' - 5' - アルファアノマービスクロDNAの構造を以下に示す。

10

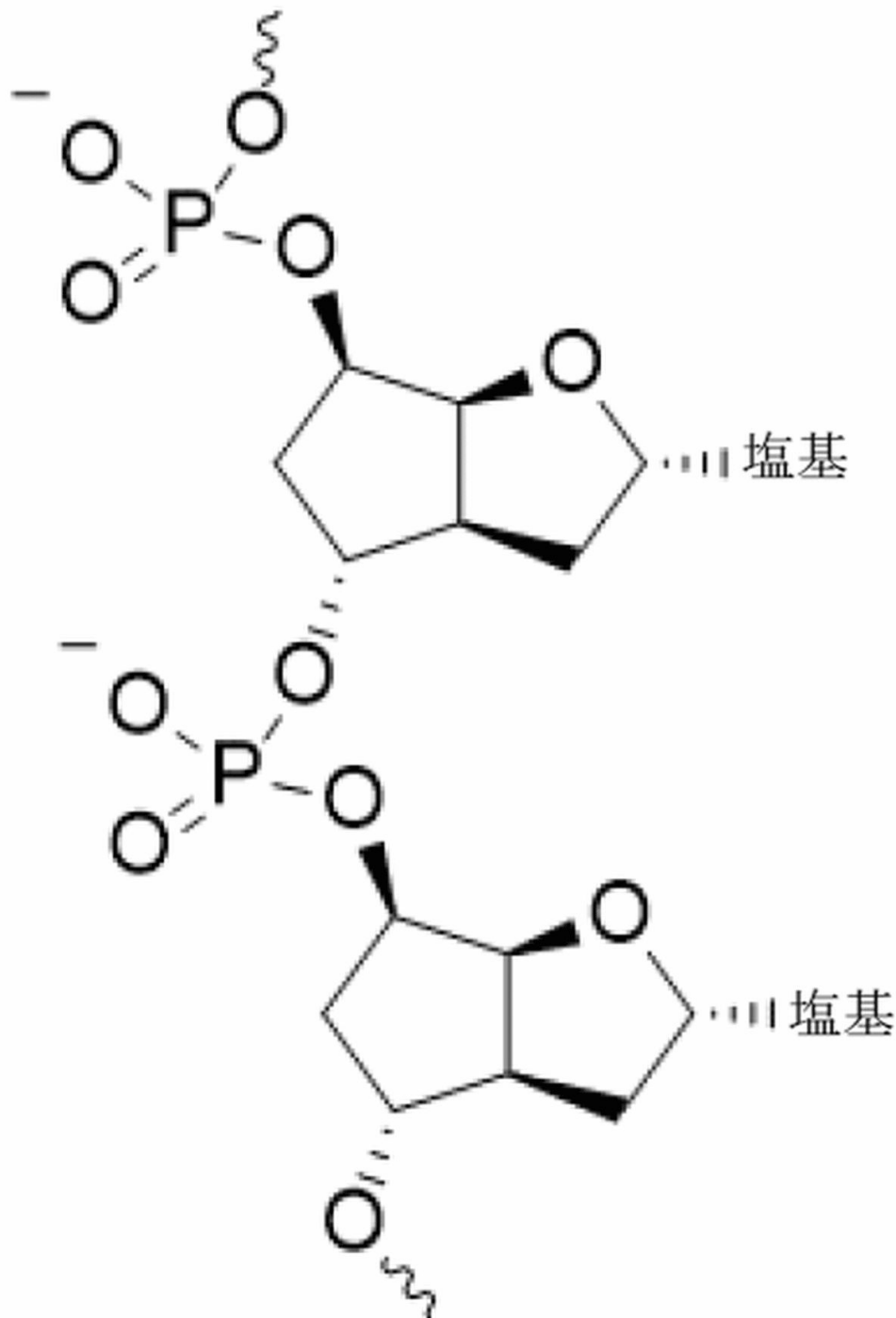
20

30

40

50

## 【化 4】



## 【0043】

本明細書で使用するように、「二環式糖部分」は、2つの相互結合された環系、例えば、二環式ヌクレオシドを含み、糖部分が、2'-O-CH(アルキル)-4'もしくは2'-O-CH<sub>2</sub>-4'基、ロックド核酸(LNA)、キシロー-LNA、アルファ-L-LNA、ベータ-D-LNA、cEt(2'-O, 4'-C拘束(constrained)エチル)LNA、cMOEt(2'-O, 4'-C拘束メトキシエチル)LNA、またはエチレン架橋核酸を有する。

## 【0044】

本明細書で使用する場合、「ヌクレオシド」は、糖に共有結合した核酸塩基を指す。

## 【0045】

「リボヌクレオシド」は、リボースに結合した塩基を指す。「デオキシリボヌクレオシド」は、2'-デオキシリボースに結合した塩基を指す。

## 【0046】

本明細書で使用する場合、「ヌクレオチド」は、ヌクレオシドの糖に共有結合したリン部分をさらに含むヌクレオシドを意味する。

## 【0047】

本明細書で使用する場合、「残基」という用語は、オリゴマー（オリゴヌクレオチドポリマー）の単位を形成するヌクレオシドまたはヌクレオチドモノマーを指す。

## 【0048】

本明細書で使用する場合、「オリゴヌクレオチド」は、一本鎖または二本鎖であり得るが、一本鎖核酸分子として細胞または生物中の相補核酸に結合するオリゴマーである。オリゴヌクレオチドは、本明細書で定義されるヌクレオシド結合基によって互いに結合された少なくとも2個のヌクレオシドを含む。オリゴヌクレオチドは、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、修飾ヌクレオチド（例えば、2'修飾を有するヌクレオチド、合成塩基類似体など）、またはそれらの組み合わせを含み得る。そのような修飾オリゴヌクレオチドは、例えば、増強された細胞取り込みおよびヌクレアーゼの存在下での増加した安定性などの特性のために、天然型よりも好ましいものであり得る。オリゴヌクレオチドには、天然に存在するヌクレオチド、修飾ヌクレオチドまたはヌクレオチド模倣体、ならびに当該技術分野で既知であり、本明細書に記載される、糖および／または核酸塩基および／またはヌクレオシド結合基に改変が加えられたオリゴヌクレオチドを含む化合物が含まれる。

## 【0049】

特定の実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチドは、10ヌクレオチド、11ヌクレオチド、12ヌクレオチド、13ヌクレオチド、14ヌクレオチド、15ヌクレオチド、16ヌクレオチド、17ヌクレオチド、18ヌクレオチド、19ヌクレオチド、20ヌクレオチド、または以上、例えば、12～50ヌクレオチド、もしくは12～40もしくは12～24ヌクレオチド、例えば、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、および50ヌクレオチドの長さを有する。

## 【0050】

本明細書で使用する「オリゴマー」という用語、例えば、オリゴヌクレオチドは、ヌクレオシド結合基によって結合された2つ以上のモノマーサブユニットを含む化合物を指す。本発明のオリゴマーは、最大50個のモノマーサブユニット、例えば、最大40個のモノマーサブユニット、例えば、最大30個のモノマーサブユニット、最大20個のモノマーサブユニット、または最大15個のモノマーサブユニットの長さを有する。オリゴマーは、5～40個のモノマーサブユニット、8～30個のモノマーサブユニット、8～25個のモノマーサブユニット、または8～20個のモノマーサブユニットを含むことができる。

## 【0051】

本明細書で使用する場合、「核酸」という用語は、一本鎖または二本鎖形態のデオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、または修飾ヌクレオチド、およびそれらのポリマーを指す。この用語は、既知のヌクレオチド類似体または修飾骨格残基もしくは結合を含む核酸を含み、これらは、該核酸は、合成によるものであり、天然に存在し、および天然には存在せず、参照核酸と同様の結合特性を有し、特定の場合では、参照ヌクレオチドと同様の様式で代謝される。そのような類似体の例には、限定されないが、ホスホロチオエート、ホスホリアルミデート、ホスホロジアミデート、メチルホスホネート、キラルーメチルホスホネート、2'-O-メチルリボヌクレオチド、およびペプチド-核酸（PNA）が含まれる。

## 【0052】

本発明は、共有結合を介して脂質基にコンジュゲートされるオリゴヌクレオチドを提供する。本明細書で使用する場合、「脂質基」は、任意の脂肪酸基または脂肪酸由来基、任意のステロイド由来基、および任意の脂溶性ビタミン基である。a b c-DNAオリゴヌクレオチド-脂質基コンジュゲートは、インビボで長い半減期を示すことができる。脂質基はまた、アルブミンおよび／または他の脂肪酸受容体もしくは輸送体へのa b c-DNAオリゴヌクレオチドの結合を増加させることができる。脂質基にコンジュゲートされた本発明のオリゴヌクレオチドの構造は、脂質基が露出されてアルブミンおよび／または他の輸送体への結合を促進するようなものである。本発明の別の実施形態では、脂質基は、1つまたは2つのカルボン酸基をさらに含み、アルブミンおよび／または他の脂肪酸受容体もしくは輸送体との相互作用をさらに増加させる。一実施形態では、脂質基は、脂肪酸由来基である。別の実施形態では、脂質基は、ジカルボン酸に由来する脂肪酸由来基である。脂肪酸には、2〜28個の炭素原子の炭化水素鎖を有する飽和または不飽和脂肪酸が含まれ、1つまたは2つのカルボン酸基を含むことができる。1つまたは2つの脂肪酸リガンドは、本明細書に記載されるa b c-DNAオリゴヌクレオチドの5'および／または7'末端上のリンカーを介してオリゴヌクレオチドに結合することができる。本発明による有用な脂質基を表1および2に提供する。

10

## 【0053】

本発明の脂質基には、コレステロール、ビタミンE（トコフェロール）、または胆汁酸が含まれ得る。

20

## 【0054】

本明細書で使用する場合、「リンカー」は、本発明のオリゴヌクレオチドを脂質基に結合する部分を意味する。本発明による有用なリンカーには、炭化水素およびPEGリンカー、例えば、アミノ-アルキル-ホスホロチオエートリンカー、アルファ-カルボキシレート-アミノ-アルキル-ホスホロチオエートリンカー、アミノ-PEG-ホスホロチオエートリンカー、およびアルファ-カルボキシレート-アミノ-PEG-ホスホロチオエートリンカーが含まれるが、これらに限定されない。本発明によるリンカーは、典型的かつ好ましくは、オリゴヌクレオチドのその標的への結合を低減せず、または妨げない。リンカーは、切断可能な基を含むことができる。

## 【0055】

本明細書で使用する場合、「ヌクレオシド結合基」は、オリゴヌクレオチドのa b c-DNAヌクレオシドを結合する結合基を意味する。本発明のヌクレオシド結合基は、主に、ホスホジエステルヌクレオシド間結合（linkage）または結合（bond）である。「ヌクレオシド結合基」という用語は、ホスホジエステル結合ではないリン結合基、および非リン結合基を含む。

30

## 【0056】

本発明は、ヌクレオシド間結合のすべてがホスホジエステル結合である、脂質基にコンジュゲートされたオリゴヌクレオチドを提供する。特定の実施形態では、脂質基にコンジュゲートされたオリゴヌクレオチドのヌクレオシド間結合基は、主にホスホジエステル結合である。本明細書で使用する場合、「主に」は、ヌクレオシド間結合基の50%以上、例えば、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、および100%がホスホジエステル結合であることを意味する。例えば、オリゴヌクレオチドは、1つ以上、および最大50%のホスホロチオエート結合を含むことができる。本発明のオリゴヌクレオチドのヌクレオシドは、主に、a b c-DNAヌクレオシドである。主には、a b c-DNAヌクレオシドを指す場合、ヌクレオシドの50%以上、例えば、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、および100%がa b c-DNAヌクレオシドであることを意味する。例えば、本発明のオリゴヌクレオチドは、1つ以上、および最大50%の、a b c-DNAヌクレオシドではない糖を有するヌクレオシドを含むことができる。

40

## 【0057】

50

本発明は、リン含有ヌクレオシド間結合またはホスホジエステル結合を介して結合されたヌクレオシドを提供する。本発明はまた、主にホスホジエステル結合を介して結合されるが、ホスホトリエステル結合基、ホスホロチオエート結合基、ホスホロジチオエート結合基、ホスホネート結合基から選択される「リン含有ヌクレオシド結合基」、例えば、H-ホスホネート結合基もしくはメチルホスホネート結合基、ホスホノチオエート結合基、例えば、H-ホスホノチオエート結合基、メチルホスホノチオエート結合基、ホスフィネート結合基、ホスホルチオアミデート結合基、またはホスホルアミデート結合基を含む、ヌクレオシドを提供する。

#### 【0058】

本明細書で使用する場合、「ヌクレオシド」または「ヌクレオチド」は、それぞれ、化学的または非化学的なオリゴマー合成方法によって本発明のオリゴマーに組み込むことができる、天然に存在するもしくは修飾されたヌクレオシドもしくはヌクレオシド模倣体、または天然に存在するもしくは修飾されたヌクレオチドもしくはヌクレオチド模倣体を包含する。本明細書で使用する場合、「天然」または「天然に存在する」は、天然起源であることを意味する。

#### 【0059】

「修飾ヌクレオシド」という用語は、当該技術分野で既知であり、かつ、本明細書に記載されるような、ヌクレオシドの糖および／または核酸塩基に修飾を有するヌクレオシドを含む。「修飾ヌクレオチド」という用語は、当該技術分野で既知であり、かつ、本明細書に記載されるような、ヌクレオチドの糖および／もしくは核酸塩基ならびに／またはヌクレオシド結合基もしくはリン部分に修飾を有するヌクレオチドを含む。

#### 【0060】

本明細書で使用する場合、「ヌクレオシド模倣体」は、糖および核酸塩基を置き換えるために使用される構造を含む。「ヌクレオチド模倣体」という用語は、糖およびヌクレオシド結合基を置き換えるために使用されるヌクレオチドを含む。ヌクレオチド模倣体の例には、ペプチド核酸（PNA）またはモルホリノが含まれる。

#### 【0061】

本発明の「ヌクレオシド」または「ヌクレオチド」は、修飾の組み合わせ、例えば、2つ以上の核酸塩基修飾、2つ以上の糖修飾、または少なくとも1つの核酸塩基、および少なくとも1つの糖修飾を含むことができる。

#### 【0062】

本発明のオリゴヌクレオチドは、主に、ピシクロ糖を有するヌクレオシドを含む。

#### 【0063】

しかしながら、オリゴヌクレオチドは、単環式もしくは三環式環系、三環式もしくは二環式系、または単環式リボースもしくはデオキシリボースである糖を有するヌクレオシドを含み得る。糖の修飾には、修飾された立体化学的配置、基の少なくとも1つの置換、または基の少なくとも1つの欠失がさらに含まれるが、これらに限定されない。修飾糖には、RNAおよびDNA中に天然に存在するリボシル部分（すなわち、フラノシル部分）の修飾型、テトラヒドロピラン、2'修飾糖、3'修飾糖、4'修飾糖、5'修飾糖、または4'-置換糖が含まれる。好適な糖修飾の例は、当業者に既知であり、2'，3'および／または4'置換ヌクレオシド（例えば、4'-S修飾ヌクレオシド）、2'-O修飾RNAヌクレオチド残基、例えば、2'-O-アルキルまたは2'-O-（置換）アルキル、例えば、2'-O-メチル、2'-O-（2-シアノエチル）、2'-O-（2-メトキシ）エチル（2'-MOE）、2'-O-（2-チオメチル）エチル、2'-O-（ハロアルコキシ）メチル、例えば、2'-O-（2-クロロエトキシ）メチル（MCEM）、2'-O-（2，2-ジクロロエトキシ）メチル（DCEM）、2'-O-アルコキシカルボニル、例えば、2'-O-[2-（メトキシカルボニル）エチル]（MOCE）、2'-O-[2-（N-メチルカルバモイル）エチル]（MCE）、2'-O-[2-（N，N-ジメチルカルバモイル）エチル]（DMCE）、例えば、2'-O-メチル修飾または2'-O-メトキシエチル（2'-O-MOE）、または他の修飾糖部分、例えば、モルホリノ（PMO）、カチオン

性モルホリノ (PMOP Plus)、または修飾モルホリノ基、例えば、PMO-Xを含むが、これらに限定されない。「PMO-X」という用語は、少なくとも1つの3'または5'末端修飾、例えば、3'-蛍光タグ、3'-クエンチャー (例えば、3'-カルボキシフルオレセイン、3'-GeneTools Blue、3'-リサミン、3'-ダブシル)、3'-親和性タグ、および化学結合のための官能基 (例えば、3'-ビオチン、3'-第一級アミン、3'-ジスルフィドアミド、3'-ピリジルジチオ)、5'末端修飾 (5'-第一級アミン、5'-ダブシル)、3'-アジド、3'-アルキン、5'-アジド、5'-アルキンを含む、またはWO2011/150408およびUS2012/0065169に開示されている、修飾モルホリノ基を指す。

#### 【0064】

本明細書で使用する場合、「リボヌクレオチド」という用語は、天然および合成の未修飾および修飾リボヌクレオチドを包含する。修飾には、糖部分、塩基部分、および／またはオリゴヌクレオチド中のリボヌクレオチド間の結合の変化が含まれる。本明細書で使用する場合、「リボヌクレオチド」という用語は、2'リボース環位置に単一のプロトン基を有するヌクレオチドであるデオキシリボヌクレオチドを特に除外する。

#### 【0065】

本明細書で使用する場合、「デオキシリボヌクレオチド」という用語は、天然および合成の未修飾および修飾されたデオキシリボヌクレオチドを包含する。修飾には、糖部分、塩基部分、および／またはオリゴヌクレオチド中のデオキシリボヌクレオチド間の結合の変化が含まれる。本明細書で使用する場合、「デオキシリボヌクレオチド」という用語はまた、修飾リボヌクレオチド、例えば、2'-O-メチルリボヌクレオチド、ホスホロチオエート修飾リボヌクレオチド残基などを含む。

#### 【0066】

本明細書で使用する場合、「PS-RNA」という用語は、ホスホロチオエート修飾ヌクレオチド残基を指す。したがって、「PS-RNA」という用語は、ホスホロチオエート修飾リボヌクレオチド (「PS-RNA」) およびホスホロチオエート修飾デオキシリボヌクレオチド (「PS-DNA」) の両方を包含する。

#### 【0067】

本明細書で使用する場合、「アンチセンス鎖」は、標的RNAの配列に相補的な配列を有する一本鎖核酸分子を指す。

#### 【0068】

本明細書で使用する場合、「センス鎖」は、アンチセンス鎖の配列に相補的な配列を有する一本鎖核酸分子を指す。

#### 【0069】

本発明はまた、非ヌクレオシド化合物に結合したオリゴヌクレオチドを提供する。

#### 【0070】

本発明は、固体支持体に結合されたオリゴヌクレオチドを提供する。固体支持体には、ビーズ、ポリマー、または樹脂が含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0071】

特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、脂質基に加えて、オリゴマーの5'または7'末端への1つ以上の基の共有結合によって、またはオリゴマーの任意の位置で修飾される。5'末端基または7'末端基にコンジュゲートすることができる基には、キャッピング基、ジホスフェート、トリホスフェート、蛍光標識 (例えば、フルオレセインまたはローダミン) などの標識、色素、オリゴマー、固体支持体、ナノ粒子、非ヌクレオシド基、抗体、またはコンジュゲート基を追跡するのに工程なレポーター基が含まれるが、これらに限定されない。一般に、コンジュゲート基は、それらが結合している化合物の1つ以上の特性を修飾する。そのような特性には、ヌクレアーゼ安定性、結合親和性、薬力学、薬物動態、結合、吸収、細胞分布、細胞取り込み、送達、電荷、および除去が含まれるが、これらに限定されない。コンジュゲート基は、化学技術において日常的に使用されており、直接にまたは任意の結合基を介して、オリゴマーなどの親化合物に結合されている。「コ

10

20

30

40

50

ンジュゲート基」という用語には、脂質基、インターカレーター、ポリアミン、ポリアミド、ポリエチレングリコール、チオエーテル、ポリエーテル、コレステロール、チオコレステロール、コール酸部分、葉酸、脂質、リン脂質、ビオチン、フェナジン、フェナントリジン、アントラキノン、アダマンタン、アクリジン、親油性部分、クマリン、ペプチド、抗体、ナノボディ、およびオリゴ糖、例えば、N-アセチルガラクトサミンが含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0072】

本明細書で使用する場合、「末端」は、オリゴマー、核酸配列、または本明細書に記載の化合物のいずれか1つの末端 (end) または末端 (terminus) を指し、整数 (3'、5'、または7' など) は、オリゴマーのヌクレオチド、核酸配列、または化合物に含まれる糖の炭素原子を示す。本明細書で使用する場合、「5'末端基」または「7'末端基」は、それぞれ、本明細書で提供される化合物のいずれか1つに含まれる糖の5'末端または7'末端に位置する基を指す。

#### 【0073】

特定の実施形態では、オリゴマーは、本明細書に記載される式 (IV)、式 (V) の化合物、または式 (VI) の化合物である少なくとも1つのモノマーサブユニットを含む。一実施形態では、オリゴマーは、式 (IV)、(V)、または (VI) の少なくとも1つの化合物、および少なくとも1つのリボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドを含む。別の実施形態では、オリゴマーは、式 (IV)、(V)、または (VI) の少なくとも1つの化合物および少なくとも1つのデオキシリボヌクレオチドを含む。

#### 【0074】

「相補的」または「相補性」とは、核酸が、従来のワトソン-クリックまたはフーグスティーン型塩基対形成のいずれかによって、別の核酸配列と水素結合を形成できることを意味する。本開示の核酸分子に関して、その相補的配列を有する核酸分子の結合自由エネルギーは、核酸の関連する機能が例えばエクソスキッピングを進行させるのに十分である。核酸分子の結合自由エネルギーの決定は、当該技術分野で周知である (例えば、Turner, et al., CSH Symp Quant. Biol. LII, pp. 123-133, 1987; Frier et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 83: 9373-9377, 1986; Turner et al., J. Am. Chem. Soc. 109: 3783-3785, 1987を参照のこと)。相補性パーセントは、第2の核酸配列と水素結合を形成することができる核酸分子における連続する残基のパーセンテージを示す (例えば、10ヌクレオチドを有する第2の核酸配列と対形成している第1のオリゴヌクレオチド中の合計10ヌクレオチドのうちの5、6、7、8、9、または10ヌクレオチドは、それぞれ、50%、60%、70%、80%、90%、および100%相補性を示す)。相補性パーセントが少なくとも特定のパーセントであることを決定するために、第2の核酸配列と水素結合 (例えば、ワトソン-クリック塩基対形成) を形成することができる核酸分子における連続する残基のパーセンテージが計算され、四捨五入して最も近い整数とする (例えば、23ヌクレオチドを有する第2の核酸配列と塩基対形成している第1のオリゴヌクレオチドにおける合計23ヌクレオチドのうちの12、13、14、15、16、または17ヌクレオチドは、それぞれ、52%、57%、61%、65%、70%、および74%の相補性をそれぞれ表し、それぞれ、少なくとも50%、50%、60%、60%、70%、および70%の相補性を有する。本明細書で使用する場合、「実質的に相補的」とは、鎖が生物学的条件下でハイブリダイズすることができるような鎖間の相補性を指す。実質的に相補的な配列は、60%、70%、80%、90%、95%、またはさらには100%の相補性を有する。さらに、2つの鎖が生物学的条件下でハイブリダイズすることができるかどうかを、それらのヌクレオチド配列を調べることによって決定する技術は、当該技術分野で周知である。

#### 【0075】

本発明はまた、ワトソン-クリック塩基対規則に従わないRNA分子中の2つのヌクレオチド間のゆらぎ塩基対を提供する。4つの主なゆらぎ塩基対は、グアニン-ウラシル (

G-U)、ヒポキサンチン-ウラシル (I-U)、ヒポキサンチン-アデニン (I-A)、およびヒポキサンチン-シトシン (I-C) である。ゆらぎ塩基対の熱力学的安定性は、ワトソン-クリック塩基対のものに匹敵する。

【0076】

いくつかの塩基にわたって塩基対を形成する一本鎖核酸は、「ハイブリダイズする」と言われる。ハイブリダイゼーションは、典型的には、生理学的または生物学的に関連する条件下 (例えば、細胞内: pH 7.2、140 mM カリウムイオン; 細胞外 pH 7.4、145 mM ナトリウムイオン) で決定される。ハイブリダイゼーション条件は、一般に、一価カチオンおよび生物学的に許容される緩衝液を含み、二価カチオン、複合アニオン、例えば、グルコン酸カリウムからのグルコン酸、スクロースなどの非荷電種、および試料中の水の活性を低下させるための不活性ポリマー、例えば PEG を含んでもよいまたは含まなくてもよい。このような条件には、塩基対が形成される条件が含まれる。

【0077】

ハイブリダイゼーションは、核酸の 50% が一本鎖であり、50% が二本鎖になる温度、すなわち (融解温度;  $T_m$ ) で測定される。 $T_m$  は、相補核酸に対するアンチセンス化合物の二本鎖安定性の尺度としてしばしば使用される。

【0078】

ハイブリダイゼーション条件はまた、塩基対が形成される条件である。ストリンジェンシーの様々な条件を、ハイブリダイゼーションを決定するために使用することができる (例えば、Wahl, G. M. and S. L. Berger (1987) *Methods Enzymol.* 152:399; Kimmel, A. R. (1987) *Methods Enzymol.* 152:507) を参照のこと)。ストリンジェントな温度条件には、通常、少なくとも約 30°C、より好ましくは少なくとも約 37°C、最も好ましくは少なくとも約 42°C の温度が含まれる。長さが 50 塩基対未満であると予想されるハイブリッドのハイブリダイゼーション温度は、ハイブリッドの融解温度 ( $T_m$ ) より 5~10°C 低くする必要があり、 $T_m$  は、以下の式に従って決定される。長さが 18 塩基対未満のハイブリッドの場合、 $T_m(^{\circ}\text{C}) = 2(A+T \text{ 塩基の\#}) + 4(G+C \text{ 塩基の\#})$ 。長さが 18~49 塩基対のハイブリッドの場合、 $T_m(^{\circ}\text{C}) = 81.5 + 16.6(\log_{10} [\text{Na}^+]) + 0.41(\%G+C) - (600/N)$  であり、N はハイブリッド中の塩基数であり、 $[\text{Na}^+]$  はハイブリダイゼーション緩衝液中のナトリウムイオンの濃度である ( $1\times \text{SSC} = 0.165\text{ M}$  について  $[\text{Na}^+]$ )。

【0079】

ハイブリダイゼーション条件の有用な変動は、当業者には容易に明らかになるであろう。ハイブリダイゼーション技術は、当業者に周知であり、例えば、Benton and Davis (*Science* 196:180, 1977); Grunstein and Hogness (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72:3961, 1975); Ausubel et al. (*Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience, New York, 2001); Berger and Kimmel (*Antisense to Molecular Cloning Techniques*, 1987, Academic Press, New York); および Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York に記載されている。

【0080】

本明細書で使用する場合、「変化させる」は、発現、例えば遺伝子発現の増加または減少を意味する。発現の減少は、10% 以上、例えば、10%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100% の減少を意味する。減少とは、2 倍以上、例えば、2 倍、5 倍、10 倍、20 倍、30 倍、40 倍、50 倍、60 倍、70 倍も意味する。折り

、80倍、90倍、100倍、500倍以上の減少を意味する。

【0081】

発現の増加は、10%以上、例えば、10%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%の増加を意味する。増加はまた、2倍以上、例えば、2倍、5倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、折り、80倍、90倍、100倍、500倍以上の増加を意味する。

【0082】

遺伝子の発現の増加または減少は、対照または参照レベルの発現のレベル、例えば、本発明のオリゴヌクレオチド脂質基コンジュゲートの非存在下での遺伝子発現のレベルに対するものである。

10

【0083】

本明細書で使用する場合、「標的RNA」は、本発明のオリゴヌクレオチドによる調節を受けるであろうRNAを指す。

【0084】

本明細書で使用する場合、「標的」は、発現または活性が本発明のオリゴヌクレオチドによって調節される任意の核酸配列を指す。

【0085】

本明細書で使用する場合、「参照」は、標準または対照を意味する。当業者には明らかであるように、適切な参照は、1つの要素の効果を決定するために、1つの要素のみが変更される場合である。

20

【0086】

本明細書で使用する場合、「RNAの部分」は、それが結合するオリゴヌクレオチドと同等であり、かつ、それが結合するオリゴヌクレオチドの配列に相補的な配列を有する長さを意味する。

【0087】

「インビトロ」という用語は、例えば、精製された試薬または抽出物、例えば、細胞抽出物を含む、当該技術分野で認識されている意味を有する。「インビボ」という用語はまた、例えば、生細胞、例えば、不死化細胞、一次細胞、細胞株、および／または生物中の細胞を含む、当該技術分野で認識されている意味を有する。

30

【0088】

本明細書で使用する場合、「増加する」または「増強する」は、アッセイにおける参照と比較して少なくとも5%プラスに変化することを意味する。変化は、アッセイにおける参照と比較して、5%、10%、25%、30%、50%、75%、またはさらに100%であり得る。「エクソンスキッピングを強化する」とは、エクソンスキッピングの結果である特定の生成物の量を増やすことを意味する。

【0089】

本明細書で使用する場合、「低減する」は、アッセイにおける参照と比較して少なくとも5%マイナスに変化することを意味する。変化は、アッセイにおける参照と比較して、5%、10%、25%、30%、50%、75%、またはさらに100%であり得る。

40

【0090】

本明細書で使用する場合、「細胞」は、原核生物（例えば、細菌）および真核生物（例えば、哺乳動物または植物）細胞の両方を含むことを意味する。細胞は、体細胞または生殖系列由来であり得、全能性または多能性であり得、および分裂性または非分裂性であり得る。細胞はまた、配偶子もしくは胚、幹細胞、または十分に分化した細胞に由来するか、またはそれらを含むことができる。したがって、「細胞」という用語は、その通常の生物学的意味を保持することを意味し、例えば、鳥、植物、および例えば、ヒト、ウシ、ヒト、ヒツジ、サル（ape）、サル（monkey）、ブタ、イヌ、ネコを含む哺乳動物などの任意の生物に存在することができる。特定の態様において、「細胞」という用語は、具体的には、ヒト細胞などの哺乳動物細胞を指す。

50

## 【0091】

本明細書で使用する場合、「動物」は、哺乳動物、特にヒトを含む多細胞真核生物を意味する。本発明の方法は、一般に、哺乳動物、特にヒトを含む、それを必要とする対象（例えば、動物、ヒト）への本明細書の有効量のオリゴヌクレオチドの投与を含む。そのような処置は、疾患またはその症状を患っている、それに罹患している、それにかかりやすい、またはそのリスクがある対象、特にヒトに好適に投与されるであろう。

## 【0092】

「薬学的に許容される担体」とは、それらの所望の活性に最も好適な物理的位置における本開示の核酸分子の効果的な分布を可能にする組成物または製剤を意味する。

## 【0093】

本発明のオリゴヌクレオチド剤は、 $abc$ -DNAヌクレオシドを欠くオリゴヌクレオチド剤、または $abc$ -DNAヌクレオシドを含むがリン酸ヌクレオシド間結合および脂質基の組み合わせを欠くオリゴヌクレオチドと比較して、そのような薬剤の以下の属性を増強することができる：インビトロでの有効性（例えば、効力および効果の持続時間）、インビボでの有効性（例えば、効力、効果の持続時間、薬物動態、薬力学、細胞内取り込み、毒性の低下）。

## 【0094】

本明細書で使用する場合、「薬物動態」という用語は、薬物が身体によって吸収され、分配され、代謝され、および排除されるプロセスを指す。

## 【0095】

本明細書で使用する場合、「薬力学」という用語は、生物に対する薬物の作用または効果を指す。

## 【0096】

本明細書で使用する場合、「安定化」という用語は、選択された環境（例えば、細胞または生物）における薬剤の増強された持続性の状態を指す。増強された安定性は、分解酵素（例えば、ヌクレアーゼ）または他の薬剤に対するそのような薬剤の増強された耐性により達成することができる。

## 【0097】

本明細書で使用する場合、「修飾ヌクレオチド」は、ヌクレオシド、核酸塩基、フラノース環、またはホスフェート基に対して1つ以上修飾を有するヌクレオチドを指す。例えば、修飾ヌクレオチドは、アデノシンーリン酸、グアノシンーリン酸、ウリジンーリン酸、およびシチジンーリン酸を含むリボヌクレオチド、ならびにデオキシアデノシンーリン酸、デオキシグアノシンーリン酸、デオキシチミジンーリン酸、およびデオキシシチジンーリン酸を含むデオキシリボヌクレオチドを除外する。修飾には、メチルトランスフェラーゼなどのヌクレオチドを修飾する酵素による修飾から生じる天然に存在する修飾が含まれる。修飾ヌクレオチドには、合成または天然に存在しないヌクレオチドも含まれる。ヌクレオチドにおける合成または天然に存在しない修飾には、2'修飾を有するもの、例えば、2'-メトキシエトキシ、2'-フルオロ、2'-アリル、2'-O-[2-(メチルアミノ)-2-オキソエチル]、4'-チオ、4'-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-O-2'-架橋、4'-(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>)<sub>2</sub>-O-2'-架橋、2'-LNA、および2'-O-(N-メチルカルバメート)または塩基類似体を含むものが含まれる。本開示について記載される2'修飾ヌクレオチドに関連して、「アミノ」とは、2'-NH<sub>2</sub>または2'-O-NH<sub>2</sub>を意味し、これらは、修飾または非修飾であり得る。そのような修飾された基は、例えば、Eckstein et al., 米国特許第5,672,695号およびMatulic-Adamic et al., 米国特許第6,248,878号に記載されている。

## 【0098】

本明細書で使用する場合、「塩基類似体」は、核酸二本鎖に組み込むことができる修飾ヌクレオチド中のヌクレオチド糖部分の1'位置（または核酸二本鎖に組み込むことができるヌクレオチド糖部分置換中の同等の位置）に位置する複素環部分を指す。塩基類似体は、一般的な塩基であるグアニン（G）、シトシン（C）、アデニン（A）、チミン（T）

10

20

30

40

50

、およびウラシル（U）を除いて、一般にプリンまたはピリミジン塩基のいずれかである。塩基類似体は、dsRNAにおける他の塩基または塩基類似体と二本鎖を形成することができる。塩基類似体には、本発明の化合物および方法において有用なもの、例えば、Bennerの米国特許第5,432,272号および同第6,001,983号、ならびにManoharanの米国特許公開第2008/0213891号に開示されているものが含まれ、これらは参照により本明細書に組み入れられる。塩基の非限定的な例には、2,6-ジアミノプリン、ヒポキサンチン（I）、キサンチン（X）、3-β-D-リボフラノシル-（2,6-ジアミノピリミジン）（K）、3-β-D-リボフラノシル-（1-メチル-ピラゾロ[4,3-d]ピリミジン-5,7(4H,6H)-d-ジオン）（P）、イソシトシン（イソ-C）、イソグアニン（イソ-G）、1-β-D-リボフラノシル-（5-ニトロインドール）、1-β-D-リボフラノシル-（3-ニトロピロール）、5-プロモウラシル、2-アミノプリン、4-チオ-dT、7-（2-チエニル）-イミダゾ[4,5-b]ピリジン（Ds）、およびピロール-2-カルバルデヒド（Pa）、2-アミノ-6-（2-チエニル）プリン（S）、2-オキソピリジン（Y）、ジフルオロトリル、4-フルオロ-6-メチルベンズイミダゾール、4-メチルベンズイミダゾール、3-メチルイソカルボスチリル、5-メチルイソカルボスチリル、および3-メチル-7-プロピニルイソカルボスチリル、7-アザインドリル、6-メチル-7-アザインドリル、イミジゾピリジニル、9-メチル-イミジゾピリジニル、ピロロピリジニル、イソカルボスチリル、7-プロピニルイソカルボスチリル、プロピニル-7-アザインドリル、2,4,5-トリメチルフェニル、4-メチルインドリル、4,6-ジメチルインドリル、フェニル、ナフタレニル、アントラセニル、フェナントラセニル、ピレニル、スチルベンジル、テトラセニル、ペンタセニル、ならびにそれらの構造誘導体が含まれる（Schweitzer et al., J. Org. Chem. 59:7238-7242 (1994); Berger et al., Nucleic Acids Research, 28(15):2911-2914 (2000); Moran et al., J. Am. Chem. Soc. 119:2056-2057 (1997); Morales et al., J. Am. Chem. Soc. 121:2323-2324 (1999); Guckian et al., J. Am. Chem. Soc. 118:8182-8183 (1996); Morales et al., J. Am. Chem. Soc. 122(6):1001-1007 (2000); McMinin et al., J. Am. Chem. Soc. 121:11585-11586 (1999); Guckian et al., J. Org. Chem. 63:9652-9656 (1998); Moran et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 94:10506-10511 (1997); Das et al., J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1:197-206 (2002); Shibata et al., J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1:1605-1611 (2001); Wu et al., J. Am. Chem. Soc. 122(32):7621-7632 (2000); O'Neill et al., J. Org. Chem. 67:5869-5875 (2002); Chaudhuri et al., J. Am. Chem. Soc. 117:10434-10442 (1995); および米国特許第6,218,108）。塩基類似体はまた、ユニバーサル塩基であり得る。

【0099】

本明細書で使用する場合、「ユニバーサル塩基」は、修飾ヌクレオチドにおけるヌクレオチド糖部分の1'位置またはヌクレオチド糖部分置換における同等の位置に位置し、核酸二本鎖に存在する場合、二重らせん構造（例えば、ホスフェート骨格の構造）を変えることなく、2種以上の塩基の反対側に配置することができる、複素環部分を指す。さらに、ユニバーサル塩基は、オリゴヌクレオチドが標的核酸と二本鎖を形成するオリゴヌクレオチドの能力を破壊しない。標的核酸と二本鎖を形成する、ユニバーサル塩基を含む一本鎖核酸の能力は、当該技術分野で明らかな方法（例えば、UV吸光度、円二色性、ゲルシフト、一本鎖ヌクレアーゼ感受性など）によってアッセイすることができる。さらに、温度

などの、二本鎖形成が観察される条件は、融解温度（ $T_m$ ）が核酸二本鎖の安定性と相関するので、二本鎖の安定性または形成を決定するために変化させてもよい。標的核酸に正確に相補的である参照一本鎖核酸と比較して、ユニバーサル塩基を含む一本鎖核酸は、相補核酸で形成される二本鎖よりも低い $T_m$ を有する標的核酸と二本鎖を形成する。しかしながら、ユニバーサル塩基が塩基で置き換えられて単一のミスマッチを生じている参照一本鎖核酸と比較して、ユニバーサル塩基を含む一本鎖核酸は、ミスマッチの塩基を有する核酸で形成された二本鎖よりも高い $T_m$ を有する標的核酸と二本鎖を形成する。

#### 【0100】

いくつかのユニバーサル塩基は、対形成条件下でユニバーサル塩基と、塩基グアニン（G）、シトシン（C）、アデニン（A）、チミン（T）、およびウラシル（U）のすべてと、の間で水素結合を形成することにより、塩基対形成することができる。ユニバーサル塩基は、1つのみの単一の相補的塩基と塩基対を形成する塩基ではない。二本鎖では、ユニバーサル塩基は、二本鎖の反対側の鎖上のものと反対側にあるG、C、A、T、およびUの各々と、水素結合を形成しない、1つの水素結合を形成する、または2つ以上の水素結合を形成し得る。好ましくは、ユニバーサル塩基は、二本鎖の反対側の鎖上のものと反対側にある塩基と相互作用しない。二本鎖では、ホスフェート骨格の二重らせん構造を変えることなく、ユニバーサル塩基間の塩基対形成が起こる。ユニバーサル塩基はまた、スタッキング（stacking）相互作用によって、同じ核酸鎖上の隣接するヌクレオチドの塩基と相互作用し得る。このようなスタッキング相互作用は、特に、ユニバーサル塩基が、二本鎖の反対側の鎖上のものと反対側に配置された塩基と水素結合を形成しない状況において二本鎖を安定化する。ユニバーサル結合（universal-binding）ヌクレオチドの非限定的な例には、イノシン、1-ベータ-D-リボフラノシル-5-ニトロインドール、および／または1-ベータ-D-リボフラノシル-3-ニトロピロール（Quayらの米国特許出願公開第2007/0254362号；Van Aerschot et al., An acyclic 5-nitroindazole nucleoside analogue as ambiguous nucleoside. *Nucleic Acids Res.* 1995 Nov. 11; 23 (21): 4363-70; Loakes et al., 3-Nitropyrrole and 5-nitroindole as universal bases in primers for DNA sequencing and PCR. *Nucleic Acids Res.* 1995 Jul. 11; 23 (13): 2361-6; Loakes and Brown, 5-Nitroindole as a universal base analogue. *Nucleic Acids Res.* 1994 Oct. 11; 22 (20): 4039-43) が含まれる。

#### 【0101】

「立体異性体」という用語は、同一の化学構成を有するが、空間における原子または基の配置に関して異なる化合物を指す。

#### 【0102】

「ジアステレオマー」は、化合物が互いの鏡像ではない、2つ以上のキラリティー中心を有する立体異性体を指す。ジアステレオマーは、異なる物理的特性、例えば、融点、沸点、スペクトル特性、ならびに化学的および生物学的反応性を有する。ジアステレオマーの混合物は、電気泳動およびクロマトグラフィーなどの高分解能分析手順下で分離され得る。

#### 【0103】

「エナンチオマー」は、互いに重ね合わせることができない鏡像である化合物の2つの立体異性体を指す。

#### 【0104】

本明細書で使用される立体化学の定義および規則は、一般に、S. P. Parker, Ed. *McRaw-Hiff Dictionary of Chemical Terms* (1984), McGraw-Hill Book Company, New York

;およびElie, lE. and WilenS. “Stereochemistry of Organic Compounds” John Wiley & Sons, Inc., New York, 1994に従う。

【0105】

別段で定義しない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解される意味を有する。以下の参考文献は、当業者に本発明で使用される多くの用語の一般的な定義を提供する：Singlet on et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (2nd ed. 1994); The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed. 1988); The Glossary of Genetics, 5th Ed. R. Rieger et al. (eds.) Springer Verlag (1991);およびHale&Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991)。本明細書で使用する場合、以下の用語は、別段で明記しない限り、以下のそれらに帰する意味を有する。

【0106】

本発明は、本発明の以下の詳細な説明およびこれに含まれる実施例を参照することにより、より容易に理解することができる。

【0107】

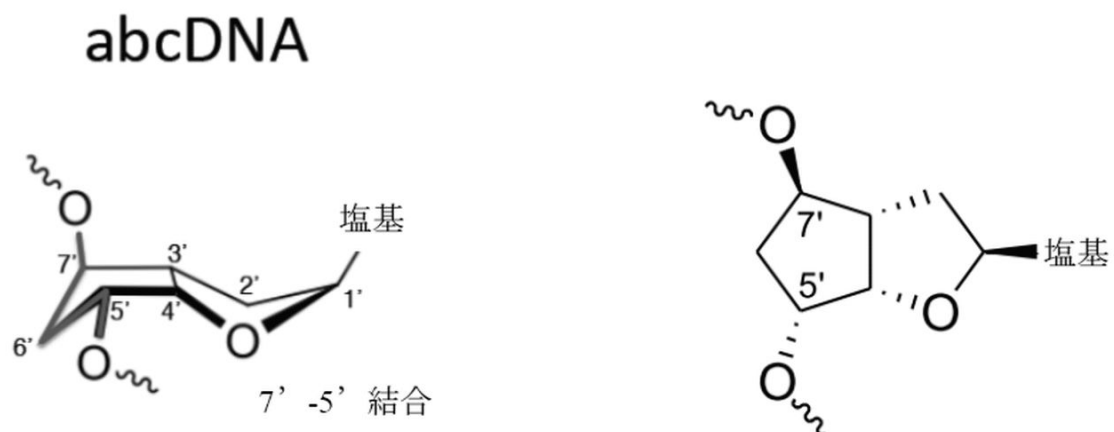
本明細書で言及されるすべての刊行物は、刊行物が引用されることに関連して方法および／または材料を開示および説明するために、参照により本明細書に組み込まれる。本明細書で論じられている刊行物は、本出願の出願日前のそれらの開示のためにのみ提供されている。本明細書のいかなるものも、本発明が先行する発明のためにそのような刊行物に先行する権利がないことを認めるものと解釈されるべきではない。さらに、本明細書で提供される発行日は、実際の発行日とは異なることがあり得、独立した確認が必要になり得る。

【0108】

アルファアノマービスクロ-DNA (abc-DNA) ヌクレオシド

アルファ二環式(「abc」)DNAは、例えば、エクソンスキッピングを引き起こすことによって疾患を処置するために、アンチセンスオリゴヌクレオチド(AON)において有用である二環式糖部分を含むヌクレオシド類似体である。abc-DNAヌクレオシドは、以下の一般的な構造を有する。

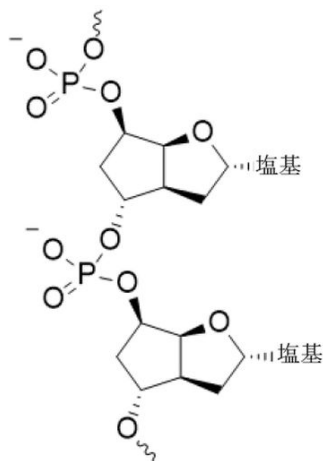
【化5】



【0109】

7' -5' -アルファアノマービスクロ-DNAの構造を以下に示す。

## 【化 6】



7' - 5' - アルファアノマービスシクロDNAの構造

## 【0110】

RNAに対する高い選択性に加えて、7'5'-abc-DNA修飾は、DNAと比較してミスマッチな識別を改善し、ホスホロチオエート修飾と適合し、完全な生体安定性を与え、低い補体活性化を誘導し、高いインビトロエクソンスキッピングを示す。

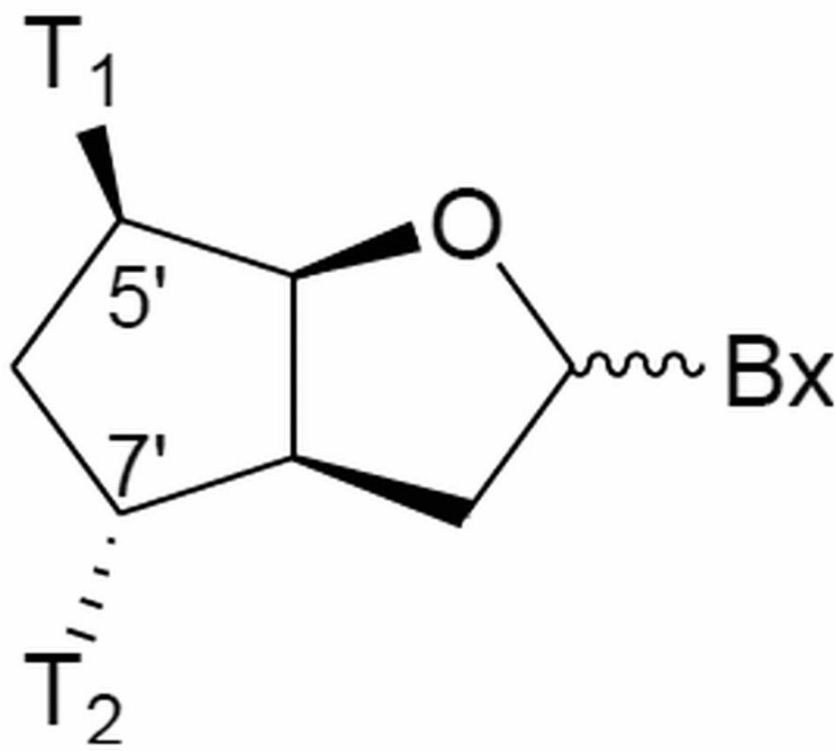
## 【0111】

本発明は、abc-DNAヌクレオシドのいずれか1つを含み、本明細書に開示される置換基のいずれかを有するオリゴヌクレオチドを提供する。

## 【0112】

本発明は、式(I)の少なくとも1つの化合物を含むオリゴヌクレオチドを提供し、

## 【化 7】



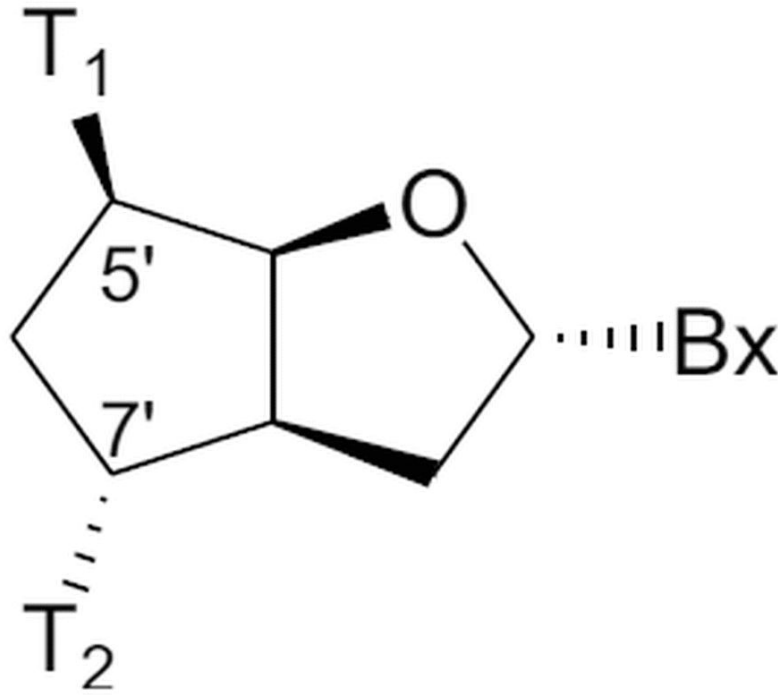
(I)

式中、 $T_1$ および $T_2$ の一方が $OR_1$ または $OR_2$ であり、 $T_1$ および $T_2$ の他方は、 $OR_1$ または $OR_2$ であり、

R<sub>1</sub>は、Hまたはヒドロキシル保護基であり、  
 R<sub>2</sub>は、リン部分であり、  
 B<sub>x</sub>は、核酸塩基である。

【0113】

一実施形態では、本発明の式（I）の化合物は、式（II）の化合物であり、  
 【化8】



式中、

(i) T<sub>1</sub>は、OR<sub>1</sub>であり、T<sub>2</sub>は、OR<sub>1</sub>またはOR<sub>2</sub>であるか、あるいは  
 (II) T<sub>1</sub>は、OR<sub>1</sub>またはOR<sub>2</sub>であり、T<sub>2</sub>は、OR<sub>1</sub>であり、  
 T<sub>1</sub>は、OR<sub>1</sub>またはOR<sub>2</sub>であり、T<sub>2</sub>は、OR<sub>1</sub>である。

【0114】

式（II）の化合物は、1'末端の第1の炭素のキラル中心におけるB<sub>x</sub>の空間配置がベータアノマーとは異なる、アルファアノマーまたはアルファアノマーモノマーである。

【0115】

別の実施形態では、式（I）の化合物は、式（III）の化合物であり、

10

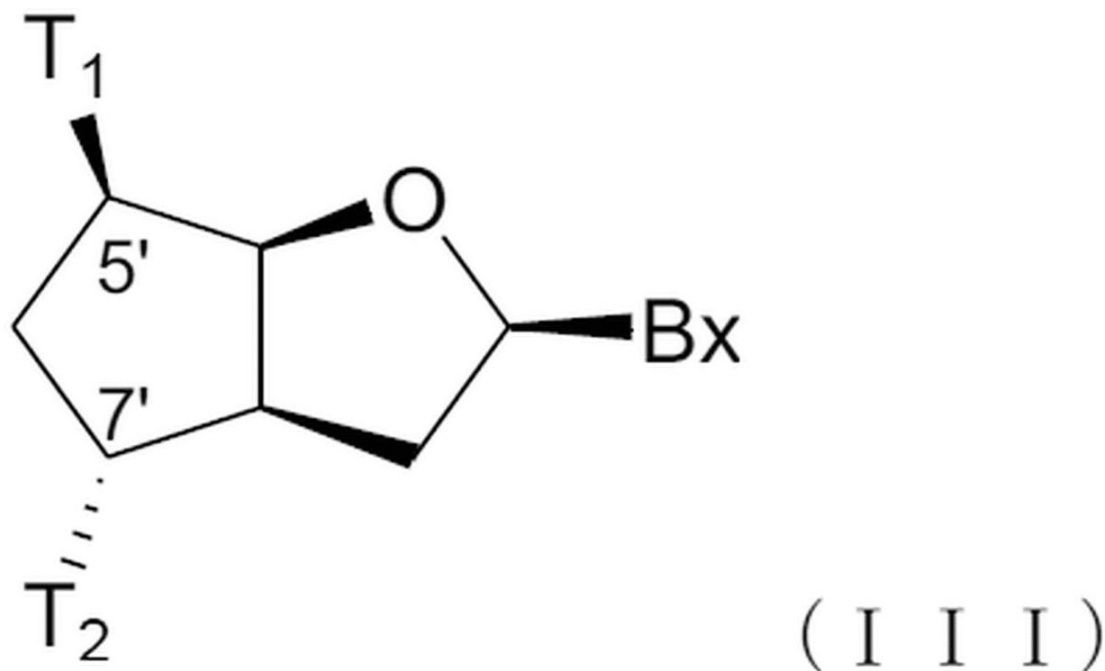
20

30

40

50

【化 9】



式中、

( i )  $T_1$  は、 $OR_1$  であり、 $T_2$  は、 $OR_1$  または  $OR_2$  であるか、あるいは

( I I )  $T_1$  は、 $OR_1$  または  $OR_2$  であり、 $T_2$  は、 $OR_1$  であり、

$T_1$  は、 $OR_1$  であり、 $T_2$  は、 $OR_1$  または  $OR_2$  である。

【 0 1 1 6 】

式 ( I I I ) の化合物は、1' 末端の第 1 の炭素のキラル中心における  $B_x$  の空間配置がアルファアノマーとは異なる、ベータアノマーまたはベータアノマーモノマーである。

【 0 1 1 7 】

別の実施形態では、式 ( I ) または ( I I ) の化合物において、 $B_x$  は、プリン塩基またはピリミジン塩基から選択され、 $B_x$  は、( i ) アデニン ( A )、( i i ) シトシン ( C )、( i i i ) 5-メチルシトシン ( Me C )、( i v ) グアニン ( G )、( v ) ウラシル ( U )、( v i ) チミン、もしくは ( v i i ) 2, 6-ジアミノプリン、または ( i )、( i i )、( i i i )、( i v )、( v )、( v i )、もしくは ( v i i ) の誘導体から選択される。別の実施形態では、式 ( I )、( I I )、または ( I I I ) の化合物において、 $B_x$  は、チミン、5-メチルシトシン、ウラシル、アデニン、またはグアニンから選択される。別の実施形態では、式 ( I )、( I I )、または ( I I I ) の化合物において、 $B_x$  は、チミン、5-メチルシトシン、アデニン、またはグアニンから選択される。

【 0 1 1 8 】

本明細書で使用され、 $B_x$  と略される「核酸塩基」という用語は、未修飾または天然に存在する核酸塩基、ならびに修飾されたまたは天然に存在しない核酸塩基およびそれらの合成模倣体を指す。核酸塩基は、核酸の複素環式塩基に水素結合することができる 1 つ以上の原子または原子群を含む、任意の複素環式塩基である。

【 0 1 1 9 】

一実施形態では、核酸塩基は、プリン塩基またはピリミジン塩基であり、好ましくは、該プリン塩基は、プリンまたは置換プリンであり、該ピリミジン塩基は、ピリミジンまたは置換ピリミジンである。より好ましくは、核酸塩基は、( i ) アデニン ( A )、( i i ) シトシン ( C )、( i i i ) 5-メチルシトシン ( Me C )、( i v ) グアニン ( G )、( v ) ウラシル ( U )、もしくは ( v i ) 5-メチルウラシル ( Me U )、または ( i )、( i i )、( i i i )、( i v )、( v )、もしくは ( v i ) の誘導体である。「( i )、( i i )、( i i i )、( i v )、( v )、または ( v i ) の誘導体」および「核

酸塩基誘導体」という用語は、本明細書では互換的に使用される。(i)、(ii)、(iii)、(iv)、(v)、または(vi)の誘導体および核酸塩基誘導体は、それぞれ、当業者に既知であり、例えば、Sharma V. K. et al., Med. Chem. Commun. 2014, 5, 1454-1471に記載され、限定されないが、5-ヒドロキシメチルシトシン、キサンチン、ヒポキサンチン、2-アミノアデニン、アルキルアデニン、例えば、6-メチルアデニン、2-プロピルアデニン、アルキルグアニン、たとえば、6-メチルグアニン、2-プロピルグアニン、2-チオウラシル、2-チオチミン、および2-チオシトシン、5-ハロウラシル、5-ハロシトシン、アルキニルピリミジン塩基、たとえば、5-プロピニル( $-C\equiv C-CH_3$ )ウラシル、5-プロピニル( $-C\equiv C-CH_3$ )シトシン、6-アゾウラシル、6-アゾシトシン、6-アゾチミン、擬ウラシル(pseudo-uracil)、4-チオウラシル、8-置換プリン塩基、たとえば、8-ハロ-、8-アミノ-、8-チオール-、8-チオアルキル-、8-ヒドロキシル-アデニンもしくはグアニン、5-置換ピリミジン塩基、たとえば、5-ハロ-、特に、5-ブロモ-、5-トリフルオロメチル-ウラシルもしくは-シトシン、7-メチルグアニン、7-メチルアデニン、2-F-アデニン、2-アミノ-アデニン、8-アザグアニンおよび8-アザアデニン、7-デアザグアニン、7-デアザアデニン、3-デアザグアニン、3-デアザアデニン、疎水性塩基、広域塩基(promiscuous base)、サイズ拡張塩基(size-expanded base)、またはフッ素化塩基を含む。特定の実施形態では、核酸塩基には、限定されないが、三環系ピリミジン、例えば、1,3-ジアザフェノキサジン-2-オン、1,3-ジアザフェノチアジン-2-オン、または9-(2-アミノエトキシ)-1,3-ジアザフェノキサジン-2-オン(G-クランプ)が含まれる。「核酸塩基誘導体」という用語にはまた、プリンまたはピリミジン塩基が、他の複素環、例えば、7-デアザーアデニン、7-デアザグアノシン、2-アミノピリジン、または2-ピリドンによって置き換えられているものが含まれる。本発明のさらなるヌクレオベースには、限定されないが、当業者に既知であるものが含まれる(例えば、米国特許第3,687,808号; Swayze et al., The Medicinal Chemistry of Oligonucleotides in Antisense a Drug Technology Chapter, 6 pp. 143-182 (Crookes S. T. ed. 2008); The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering Kroschwitz J. I. Ed. John Wiley & Sons, 1990 pp. 858-859; Englisch et al., Angewandte Chemie International Edition, 1991 Vol. 30 (6) pp. 613-623; Sanghvi Y. S. Antisense Research and Applications Crookes S. T. and Lebleu B. Eds. CRC Press, 1993 pp. 273-302)。

#### 【0120】

好ましい核酸塩基誘導体には、メチル化アデニン、グアニン、ウラシル、およびシトシン、ならびに核酸塩基誘導体、好ましくは(i)、(ii)、(iii)、または(iv)の核酸塩基誘導体が含まれ、それぞれのアミノ基、好ましくは、環外アミノ基は、アシル保護基またはジアルキルホルムアミジノ、好ましくは、ジメチルホルムアミジノ(DMF)によって保護され、核酸塩基誘導体、例えば、2-フルオロウラシル、2-フルオロシトシン、5-ブロモウラシル、5-ヨードウラシル、2,6-ジアミノプリン、アザシトシン、ならびにピリミジン類似体、例えば擬イソシトシンおよび擬ウラシルをさらに含む。

#### 【0121】

さらに好ましい実施形態では、上記核酸塩基誘導体は、メチル化アデニン、メチル化グアニン、メチル化ウラシル、およびメチル化シトシン、ならびに(i)、(ii)、(iii)、または(iv)の核酸塩基誘導体から選択され、それぞれのアミノ基、好ましくは、環外アミノ基は、保護基によって保護されている。

## 【0122】

さらに好ましい実施形態では、上記核酸塩基誘導体は、メチル化アデニン、メチル化グアニン、メチル化ウラシルおよびメチル化シトシンから、ならびに (i)、(ii)、(iii)、または (iv) の核酸塩基誘導体から選択され、それぞれのアミノ基、好ましくは、環外アミノ基は、アシル保護基またはジアルキルホルムアミジノ、好ましくはジメチルホルムアミジノ (DMF) によって保護されている。

## 【0123】

さらに好ましい実施形態では、上記核酸塩基誘導体は、(i)、(ii)、(iii)、または (iv) の核酸塩基誘導体から選択され、それぞれのアミノ基、好ましくは、環外アミノ基は、保護基によって保護されている。

10

## 【0124】

さらに好ましい実施形態では、上記核酸塩基誘導体は、(i)、(ii)、(iii)、または (iv) の核酸塩基誘導体であり、環外アミノ基は、アシル保護基またはジアルキルホルムアミジノ、好ましくはジメチルホルムアミジノ (DMF) によって保護されている。

## 【0125】

さらに非常に好ましい実施形態では、上記 (i)、(ii)、(iii)、または (iv) の核酸塩基誘導体の上記環外アミノ基の上記アシル保護基は、 $-C(O)-R_{11}$  であり、互いに独立して、 $R_{11}$  は、 $C_1-C_{10}$  アルキル、 $C_6-C_{10}$  アリール、 $C_6-C_{10}$  アリール  $C_1-C_{10}$  アルキレン、または  $C_6-C_{10}$  アリールオキシ  $C_1-C_{10}$  アルキレンから選択され、上記ジアルキルホルムアミジノ保護基は、 $=C(H)-NR_{12}R_{13}$  であり、 $R_{12}$  および  $R_{13}$  は、互いに独立して、 $C_1-C_4$  アルキルから選択される。

20

## 【0126】

さらに非常に好ましい実施形態では、(i)、(ii)、(iii)、または (iv) の上記核酸塩基誘導体の上記環外アミノ基の上記アシル保護基は、 $-C(O)-R_{14}$  であり、互いに独立して、 $R_{14}$  は、 $C_1-C_4$  アルキル、フェニル、ハロゲン、 $C_1-C_6$  アルキル、 $C_3-C_6$  シクロアルキル、 $C_1-C_4$  アルコキシで置換されたフェニル、ベンジル、ハロゲン、 $C_1-C_6$  アルキル、 $C_3-C_6$  シクロアルキル、 $C_1-C_4$  アルコキシで置換されたベンジル、またはハロゲン、 $C_1-C_6$  アルキル、 $C_1-C_4$  アルコキシで任意選択により置換されたフェニルオキシ  $C_1-C_2$  アルキレンから選択され、上記ジアルキルホルムアミジノ保護基は、 $=C(H)-NR_{12}R_{13}$  であり、 $R_{12}$  および  $R_{13}$  は、互いに独立して、 $C_1-C_4$  アルキルから選択される。

30

## 【0127】

さらに非常に好ましい実施形態では、(i)、(ii)、(iii)、または (iv) の上記核酸塩基誘導体の上記環外アミノ基の上記アシル保護基は、 $-C(O)-R_{15}$  であり、互いに独立して、 $R_{15}$  は、 $C_1-C_4$  アルキル、フェニル、ハロゲン、 $C_1-C_4$  アルキル、 $C_5-C_6$  シクロアルキル、 $C_1-C_4$  アルコキシで置換されたフェニル、ベンジル、ハロゲン、 $C_1-C_4$  アルキル、 $C_1-C_4$  アルコキシで置換されたベンジル、またはフェニルオキシメチレン ( $CH_2-OC_6H_5$ ) から選択され、フェニルは、ハロゲン、 $C_1-C_4$  アルキル、 $C_5-C_6$  シクロアルキル、 $C_1-C_4$  アルコキシで任意選択により置換され、上記ジアルキルホルムアミジノ保護基は、 $=C(H)-NR_{12}R_{13}$  であり、 $R_{12}$  および  $R_{13}$  は、互いに独立して、 $C_1-C_4$  アルキルから選択される。

40

## 【0128】

さらに非常に好ましい実施形態では、(i)、(ii)、(iii)、または (iv) の上記核酸塩基誘導体の上記環外アミノ基の上記アシル保護基は、互いに独立して、 $R_{16}$  は、 $C_1-C_3$  アルキル、フェニル、 $C_1-C_3$  アルキル、メトキシで置換されたフェニル、ベンジル、 $C_1-C_3$  アルキル、メトキシで置換されたベンジル、またはフェニルオキシメチレン ( $CH_2-OC_6H_5$ ) から選択され、 $C_6H_5$  は、 $C_1-C_3$  アルキル、メトキシで任意選択により置換され、上記ジアルキルホルムアミジノ保護基は、 $=C(H)-NR_{12}R_{13}$  であり、 $R_{12}$  および  $R_{13}$  は、互いに独立して、 $C_1-C_4$  アルキルから

50

選択される。

【0129】

さらに非常に好ましい実施形態では、(i)、(ii)、(iii)、または(iv)の上記核酸塩基誘導体の上記環外アミノ基の上記アシル保護基は、 $-C(O)-R_{17}$ であり、互いに独立して、 $R_{17}$ は、 $C_1-C_3$ アルキル、フェニル、 $C_1-C_3$ アルキル、メトキシで置換されたフェニル、ベンジル、 $C_1-C_3$ アルキル、メトキシで置換されたベンジル、またはフェニルオキシメチレン( $CH_2-OC_6H_5$ )から選択され、 $C_6H_5$ は、 $C_1-C_3$ アルキル、メトキシで任意選択により置換され、上記ジアルキルホルムアミジノ保護基は、ジメチルホルムアミジノ(DMF)である。

【0130】

さらに非常に好ましい実施形態では、(i)、(ii)、(iii)、または(iv)の上記核酸塩基誘導体の上記環外アミノ基の上記アシル保護基は、 $-C(O)-R_{18}$ であり、互いに独立して、 $R_{18}$ は、メチル、イソプロピル、フェニル、ベンジル、またはフェニルオキシメチレン( $CH_2-OC_6H_5$ )から選択され、 $C_6H_5$ は、 $C_1-C_3$ アルキル、メトキシで任意選択により置換され、上記ジアルキルホルムアミジノ保護基は、ジメチルホルムアミジノ(DMF)である。

【0131】

さらに非常に好ましい実施形態では、(i)、(ii)、(iii)、または(iv)の上記核酸塩基誘導体の上記環外アミノ基の上記アシル保護基は、 $-C(O)-R_{19}$ であり、互いに独立して、 $R_{19}$ は、メチル、イソプロピル、フェニル、ベンジル、またはフェニルオキシメチレン( $CH_2-OC_6H_5$ )から選択され、 $C_6H_5$ は、メチル、イソプロピルで任意選択により置換され、上記ジアルキルホルムアミジノ保護基は、ジメチルホルムアミジノ(DMF)である。

【0132】

本明細書で使用する「ジアルキルホルムアミジノ」という用語は、 $=C(H)-NR_{12}R_{13}$ を指し、 $R_{12}$ および $R_{13}$ は、互いに独立して、 $C_1-C_4$ アルキルから選択される。好ましい実施形態では、上記ジアルキルホルムアミジノは、(i)、(ii)、(iii)、または(iv)の上記核酸塩基誘導体の上記環外アミノ基の保護基である。得られる化合物は、(E)または(Z)配置のいずれか、および両方の形態であり得、任意の比率のそれらの混合物が、本発明の範囲内に含まれるべきである。好ましい実施形態では、本発明の化合物は、(Z)配置の、ジアルキルホルムアミジノ、好ましくはジメチルホルムアミジノ(DMF)を含む。

【0133】

一実施形態によれば、 $B_x$ は、ウラシル、チミン、シトシン、5-メチルシトシン、アデニン、およびグアニンから選択される。好ましくは、 $B_x$ は、チミン、5-メチルシトシン、アデニン、およびグアニンから選択される。一実施形態によれば、 $B_x$ は、塩基ウラシル、チミン、シトシン、5-メチルシトシン、アデニン、およびグアニンの代わりに、DNAまたはRNAオリゴマーに組み込まれたときに、塩基対を形成することができる芳香族複素環部分である。

【0134】

本明細書で使用される「リン部分」という用語は、独立して、各々の場合において、ホスホネート、ホスファイトリエステル、モノホスフェート、ジホスフェート、トリホスフェート、ホスフェートリエステル、ホスフェートジエステル、チオホスフェートエステル、ジチオホスフェートエステル、またはホスホルアミダイトに由来する部分から選択される。

【0135】

別の実施形態では、式(I)の化合物において、リン部分 $R_2$ は、ホスフェート部分、ホスホルアミデート部分、およびホスホルアミダイト部分から選択される。別の実施形態では、式(II)の化合物において、リン部分 $R_2$ は、ホスフェート部分、ホスホルアミデート部分、およびホスホルアミダイト部分から選択される。別の実施形態では、式(I

10

20

30

40

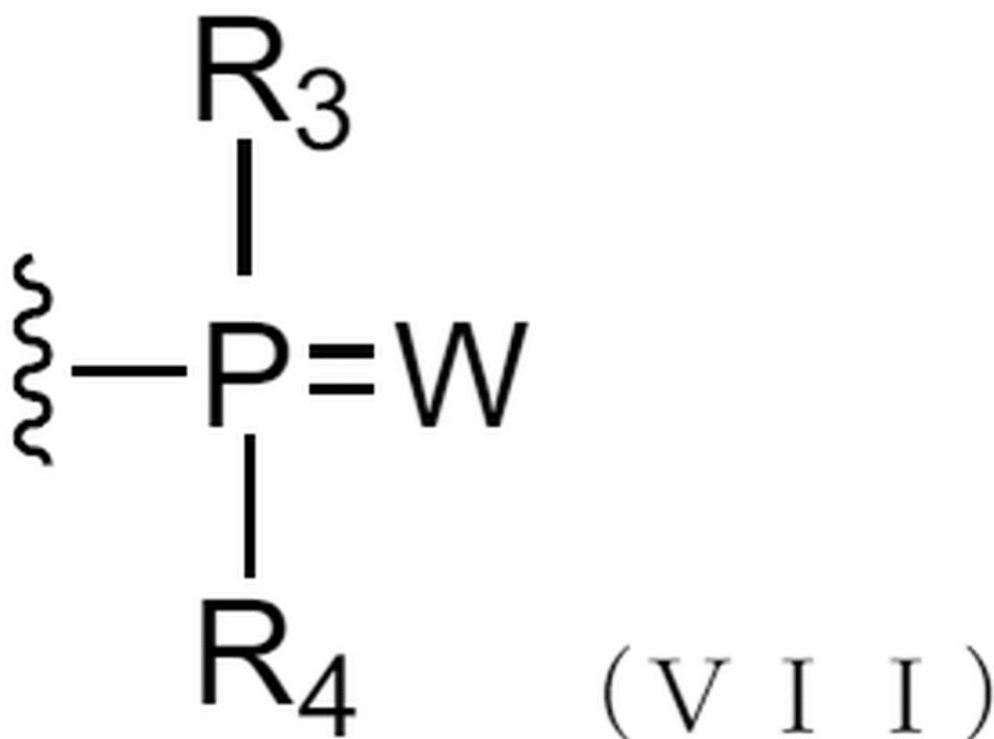
50

ⅠⅠ) の化合物において、リン部分  $R_2$  は、ホスフェート部分、ホスホルアミデート部分、およびホスホルアミダイト部分から選択される。

【0136】

本明細書で使用する「リン部分」という用語は、 $P^{III}$  または  $P^V$  原子価状態のリン原子を含み、式 (ⅤⅠⅠ) によって表される部分を指し、

【化10】



、式中、

$W$  は、 $O$ 、 $S$ 、もしくは  $Se$  を表し、または  $W$  は、電子対を表し、または  $W$  は、 $BH_2$  を表し、

$R_3$  および  $R_4$  は、互いに独立して、 $H$ 、ハロゲン、 $OH$ 、 $OR_5$ 、 $NR_6R_7$ 、 $SH$ 、 $SR_8$ 、 $C_1-C_6$  アルキル、 $C_1-C_6$  ハロアルキル、 $C_1-C_6$  アルコキシ、 $C_1-C_6$  ハロアルコキシ、 $C_1-C_6$  アミノアルキルであり、 $R_5$  は、各々が互いに独立してシアノ、ニトロ、ハロゲン、 $-NHC(O)C_1-C_3$  アルキル、 $-NHC(O)C_1-C_3$  ハロアルキル、 $C_1-C_3$  アルキルスルホニルで任意選択により置換された、 $C_1-C_9$  アルキル、 $C_1-C_6$  アルコキシ；各々が互いに独立してシアノ、ニトロ、ハロゲン、 $C_1-C_4$  アルコキシ、 $C_1-C_4$  ハロアルキル、 $C_1-C_4$  ハロアルコキシ、 $NHC(O)C_1-C_3$  アルキル、 $NHC(O)C_1-C_3$  ハロアルキル、 $C_1-C_3$  アルキルスルホニルで任意選択により置換された、アリール、 $C_1-C_6$  アルキレンアリール、 $C_1-C_6$  アルキレンジアリール；アセチル；ヒドロキシル保護基であり、 $R_6$  および  $R_7$  は、互いに独立して、水素、シアノ、ニトロ、ハロゲン、 $C_2-C_6$  アルケニル、 $C_3-C_6$  シクロアルキル、 $C_1-C_3$  アルコキシで任意選択により置換された、 $C_1-C_9$  アルキル；シアノ、ニトロ、ハロゲン、 $C_1-C_3$  アルキル、 $C_1-C_3$  アルコキシで任意選択により置換された、アリール；アミノ保護基であるか、またはそれらが結合している窒素原子と一緒に複素環を形成し、複素環は、ピロリジニル、ピペリジニル、モルホリニル、ピペラジニル、およびホモピペラジンから選択され、複素環は、 $C_1-C_3$  アルキルで任意選択により置換され

、 $R_8$ は、チオール保護基であり、波線は、 $OR_2$ 基の酸素への結合を示している。 $W$ が $O$ 、 $S$ 、または $Se$ を表す場合、リン部分内の $P$ 原子は $P^V$ 原子価状態である。 $W$ が電子対を表す場合、リン部分内の $P$ 原子は $P^{III}$ 原子価である。式(VII)の部分には、任意の可能な立体異性体が含まれる。式(VII)の塩が、式(VII)によって表される部分にさらに含まれ、該塩は、無機塩基またはアミンでの処理時に形成することができ、(互いに独立して) $R_3$ および $R_4$ である $OH$ 基または $SH$ 基との反応から誘導される塩であり得る。 $OH$ 基または $SH$ 基との塩形成をもたらす無機塩基またはアミンは、当該技術分野で周知であり、トリメチルアミン、ジエチルアミン、メチルアミン、または水酸化アンモニウムを含む。本発明に含まれるこれらのリン部分は、適切な場合、「 $O-HB^+$ 」とも略され、 $HB^+$ は、形成された対カチオンを指す。

10

#### 【0137】

一実施形態では、「リン部分」において、 $R_3$ および $R_4$ は、互いに独立して、 $H$ 、 $O$ 、 $OR_5$ 、 $NR_6R_7$ 、 $C_1-C_6$ アルキル、 $C_1-C_6$ ハロアルキル、 $C_1-C_6$ アルコキシ、 $C_1-C_6$ ハロアルコキシ、 $C_1-C_6$ アミノアルキルであり、 $R_5$ は、シアノ、ニトロ、ハロゲンで任意選択により置換された $C_1-C_9$ アルキル；各々が互いに独立してシアノ、ニトロ、ハロゲンで任意選択により置換された、アリール、 $C_1-C_6$ アルキレンアリール；アセチル；ヒドロキシル保護基であり、 $R_6$ および $R_7$ は、互いに独立して、水素、シアノ、ニトロ、ハロゲンで任意選択により置換された $C_1-C_9$ アルキル；シアノ、ニトロ、ハロゲン、 $C_1-C_3$ アルキル、 $C_1-C_3$ アルコキシで任意選択により置換されたアリール；アミノ保護基であり、 $R_8$ は、チオール保護基であり、上記波線は、 $OR_2$ 基の酸素への結合を示している。

20

#### 【0138】

本明細書で使用される「リン部分」という用語には、ホスホネート、ホスファイトリエステル、モノホスフェート、ジホスフェート、トリホスフェート、ホスフェートリエステル、ホスフェートジエステル、チオホスフェートエステル、ジチオホスフェートエステル、またはホスホルアミダイトに由来する部分が含まれる。

#### 【0139】

したがって、一実施形態では、 $OR_2$ は、各々の場合において、ホスホネート、ホスファイトリエステル、モノホスフェート、ジホスフェート、トリホスフェート、ホスフェートリエステル、ホスフェートジエステル、チオホスフェートエステル、ジチオホスフェートエステル、またはホスホルアミダイトから選択され、 $OR_2$ は、ホスホルアミダイトまたはホスフェートリエステルである。

30

#### 【0140】

一実施形態では、リン部分は、式(VII)によって表されるホスホネートに由来し、式中、 $W$ は、 $O$ であり、 $R_3$ は、 $C_1-C_6$ アルキル、 $C_1-C_6$ ハロアルキル、 $C_1-C_6$ アルコキシ、 $C_1-C_6$ ハロアルコキシ、 $C_1-C_6$ アミノアルキルから選択され、 $R_4$ は、 $OH$ または $O-HB^+$ であり、上記波線は、 $OR_2$ 基の酸素への結合を示している。別の実施形態では、式(VII)のリン部分は、 $H$ -ホスホネートであり、式中、 $W$ は、 $O$ であり、 $R_3$ は、水素であり、 $R_4$ は、 $OH$ または $O-HB^+$ であり、 $O-HB^+$ は、 $HNEt_3^+$ である。さらなる実施形態では、式(VII)のリン部分は、アルキルホスホネートであり、式中、 $W$ は、 $O$ であり、 $R_3$ は、アルキルであり、 $R_4$ は、 $OH$ または $O-HB^+$ であり、 $O-HB^+$ は、 $HNEt_3^+$ である。一実施形態では、式(VII)のリン部分は、メチルホスホネートであり、式中、 $W$ は、 $O$ であり、 $R_3$ は、水素であり、 $R_4$ は、 $OH$ または $O-HB^+$ であり、 $O-HB^+$ は、 $HNEt_3^+$ である。別の実施形態では、式(VII)のリン部分は、ホスホノカルボキシレートであり、式中、 $R_3$ または $R_4$ は、互いに独立して、カルボン酸である。ホスホノカルボキシレートは、ホスホノ酢酸またはホスホノギ酸であり得る。さらなる実施形態では、式(VII)のリン部分は、2-アミノエチル-ホスホネートである。

40

#### 【0141】

別の実施形態では、式(VII)のリン部分の $R_3$ および $R_4$ は、互いに独立して、 $H$

50

、OH、ハロゲン、OR<sub>5</sub>、NR<sub>6</sub>R<sub>7</sub>、SH、SR<sub>8</sub>、C<sub>1</sub>－C<sub>4</sub>アルキル、例えば、C<sub>1</sub>－C<sub>2</sub>アルキル、C<sub>1</sub>－C<sub>4</sub>ハロアルキル、C<sub>1</sub>－C<sub>2</sub>ハロアルキル、C<sub>1</sub>－C<sub>4</sub>アルコキシ、C<sub>1</sub>－C<sub>2</sub>アルコキシ、C<sub>1</sub>－C<sub>4</sub>ハロアルコキシ、C<sub>1</sub>－C<sub>2</sub>ハロアルコキシ、C<sub>1</sub>－C<sub>4</sub>アミノアルキル、C<sub>1</sub>－C<sub>2</sub>アミノアルキルであり、R<sub>5</sub>は、各々が互いに独立してシアノ、ニトロ、ハロゲン、NHC(O)C<sub>1</sub>－C<sub>3</sub>アルキル、NHC(O)C<sub>1</sub>－C<sub>3</sub>ハロアルキル、C<sub>1</sub>－C<sub>3</sub>アルキルスルホニルで任意選択により置換された、C<sub>1</sub>－C<sub>6</sub>アルキル、例えば、C<sub>1</sub>－C<sub>3</sub>アルキル；各々が互いに独立してシアノ、ニトロ、ハロゲン、C<sub>1</sub>－C<sub>4</sub>アルコキシ、C<sub>1</sub>－C<sub>4</sub>ハロアルキル、C<sub>1</sub>－C<sub>4</sub>ハロアルコキシ、NHC(O)C<sub>1</sub>－C<sub>3</sub>アルキル、NHC(O)C<sub>1</sub>－C<sub>3</sub>ハロアルキル、C<sub>1</sub>－C<sub>3</sub>アルキルスルホニルで任意選択により置換された、アリール、C<sub>1</sub>－C<sub>3</sub>アルキレンアリール、C<sub>1</sub>－C<sub>3</sub>アルキレンジアリール；アセチル；ヒドロキシル保護基であり、R<sub>6</sub>およびR<sub>7</sub>は、互いに独立して、水素、各々が互いに独立してシアノ、ニトロ、ハロゲン、C<sub>2</sub>－C<sub>4</sub>アルケニル、C<sub>3</sub>－C<sub>6</sub>シクロアルキル、C<sub>1</sub>－C<sub>3</sub>アルコキシで任意選択により置換された、C<sub>1</sub>－C<sub>6</sub>アルキル、例えば、C<sub>1</sub>－C<sub>4</sub>アルキル；シアノ、ニトロ、ハロゲン、C<sub>1</sub>－C<sub>3</sub>アルキル、C<sub>1</sub>－C<sub>3</sub>アルコキシで任意選択により置換された、アリール；アミノ保護基であるか、またはそれらが結合している窒素原子と一緒に複素環を形成し、複素環は、ピロリジニル、ピペリジニル、モルホリニル、ピペラジニル、およびホモピペラジンから選択され、複素環は、C<sub>1</sub>－C<sub>3</sub>アルキルで任意選択により置換され、R<sub>8</sub>は、チオール保護基であり、波線は、OR<sub>2</sub>基の酸素への結合を示している。

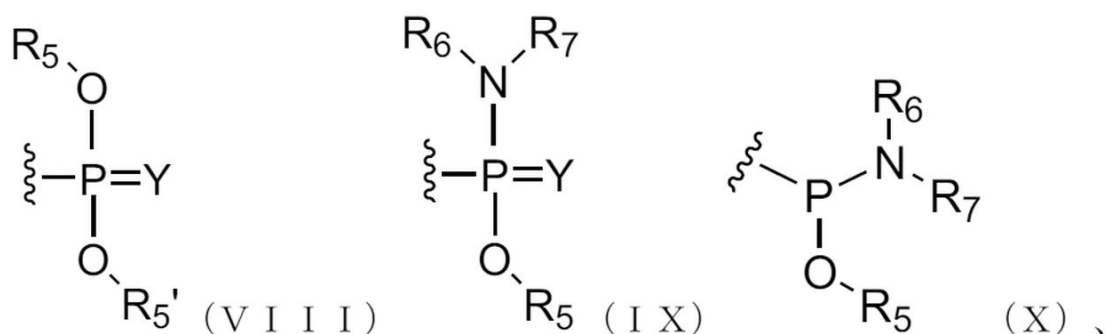
【0142】

別の実施形態では、式(VII)のリン部分のR<sub>3</sub>またはR<sub>4</sub>は、独立して各々の場合においておよび互いに独立して、ハロゲン、例えば、塩素、またはOR<sub>5</sub>であり、R<sub>5</sub>は、ヒドロキシル保護基である。本発明で使用される追加のリン部分は、Tetrahedron Report Number 309 (Beaucage and Iyer, Tetrahedron, 1992, 48, 2223-2311)に開示されている。

【0143】

本明細書で使用される「リン部分」という用語には、P<sup>III</sup>またはP<sup>V</sup>原子価状態のリン原子を含み、かつ、式(VII)、式(IX)、または式(X)のいずれかによって独立して各々の場合において表される、R<sub>2</sub>基が含まれ、

【化11】



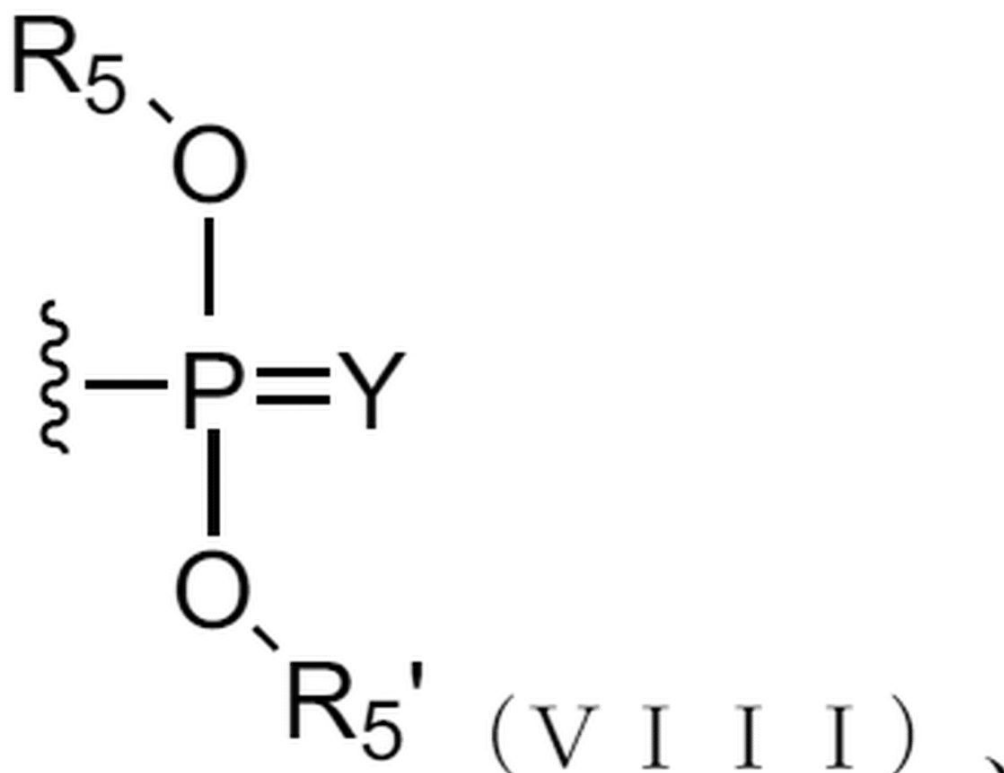
式中、Yは、O、S、またはSeであり、R<sub>5</sub>およびR<sub>5</sub>'は、独立して各々の場合においておよび互いに独立して、水素、各々が互いに独立してシアノ、ニトロ、ハロゲン、－NHC(O)C<sub>1</sub>－C<sub>3</sub>アルキル、－NHC(O)C<sub>1</sub>－C<sub>3</sub>ハロアルキル、C<sub>1</sub>－C<sub>3</sub>アルキルスルホニルで任意選択により置換されたC<sub>1</sub>－C<sub>9</sub>アルキル、C<sub>1</sub>－C<sub>6</sub>アルコキシ；各々が互いに独立してシアノ、ニトロ、ハロゲン、C<sub>1</sub>－C<sub>4</sub>アルコキシ、C<sub>1</sub>－C<sub>4</sub>ハロアルキル、C<sub>1</sub>－C<sub>4</sub>ハロアルコキシ、－NHC(O)C<sub>1</sub>－C<sub>3</sub>アルキル、NHC(O)C<sub>1</sub>－C<sub>3</sub>ハロアルキル、C<sub>1</sub>－C<sub>3</sub>アルキルスルホニルで任意選択により置換された、アリール、C<sub>1</sub>－C<sub>6</sub>アルキレンアリール、C<sub>1</sub>－C<sub>6</sub>アルキレンジアリール；ヒドロキシル保護基であり、R<sub>6</sub>およびR<sub>7</sub>は、互いに独立して、水素、シアノ、ニトロ、ハロゲン

、 $C_2-C_6$ アルケニル、 $C_3-C_6$ シクロアルキル、 $C_1-C_3$ アルコキシで任意選択により置換された、 $C_1-C_9$ アルキル；シアノ、ニトロ、ハロゲン、 $C_1-C_3$ アルキル、 $C_1-C_3$ アルコキシで任意選択により置換された、アリール、例えば、フェニル；またはアミノ保護基であるか、またはそれらが結合している窒素原子と一緒に複素環を形成し、複素環は、ピロリジニル、ピペリジニル、モルホリニル、ピペラジニル、およびホモピペラジンから選択され、複素環は、 $C_1-C_3$ アルキルで任意選択により置換され、 $R_8$ は、チオール保護基であり、波線は、 $OR_2$ 基の酸素への結合を示している。

【0144】

一実施形態では、リン部分 $R_2$ は、式(VIII)によって表され、

【化12】



式中、 $Y$ は、 $O$ 、 $S$ 、もしくは $Se$ であり、 $Y$ は、 $O$ もしくは $S$ であり、または $Y$ は、 $O$ であり、 $R_5$ および $R_{5'}$ は、独立して各々の場合においておよび互いに独立して、水素、各々が互いに独立してシアノ、ニトロ、ハロゲン、 $-NHC(O)C_1-C_3$ アルキル、 $-NHC(O)C_1-C_3$ ハロアルキル、 $C_1-C_3$ アルキルスルホニルで任意選択により置換された、 $C_1-C_9$ アルキル、 $C_1-C_6$ アルコキシ；各々が互いに独立してシアノ、ニトロ、ハロゲン、 $C_1-C_4$ アルコキシ、 $C_1-C_4$ ハロアルキル、 $C_1-C_4$ ハロアルコキシ、 $-NHC(O)C_1-C_3$ アルキル、 $NHC(O)C_1-C_3$ ハロアルキル、 $C_1-C_3$ アルキルスルホニルで任意選択により置換された、アリール、 $C_1-C_6$ アルキレンアリール、 $C_1-C_6$ アルキレンジアリール；ヒドロキシル保護基； $P(O)(OR_9)$  ( $OR_9$ )、 $P(O)OP(O)(OR_9)(OR_9)$ であり、 $R_9$ および $R_9$ は、独立して各々の場合においておよび互いに独立して、水素、シアノ、ニトロ、ハロゲン、 $-NHC(O)C_1-C_3$ アルキル、 $-NHC(O)C_1-C_3$ ハロアルキル、 $C_1-C_3$ アルキルスルホニルで任意選択により置換された、 $C_1-C_9$ アルキル；各々が互いに独立してシアノ、ニトロ、ハロゲン、 $C_1-C_4$ アルコキシ、 $C_1-C_4$ ハロアルキル、 $C_1-C_4$ ハロアルコキシ、 $-NHC(O)C_1-C_3$ アルキル、 $NHC(O)C_1-C_3$ ハロアルキル、 $C_1-C_3$ アルキルスルホニルで任意選択により置換された、アリール、 $C_1-C_6$

アルキレンアリール、 $C_1-C_6$ アルキレンジアリール；ヒドロキシル保護基であり、上記波線は、 $OR_2$ 基の酸素への結合を示している。

【0145】

別の実施形態では、式(VIII)の $R_5$ および $R_5$ は、独立して各々の場合においておよび互いに独立して、水素、各々が互いに独立してシアノ、ニトロ、ハロゲン、 $-NHC(O)C_1-C_3$ アルキル、 $-NHC(O)C_1-C_3$ ハロアルキル、 $C_1-C_3$ アルキルスルホニルで任意選択により置換された、 $C_1-C_6$ アルキル、 $C_1-C_3$ アルキル、 $C_1-C_4$ アルコキシ、 $C_1-C_2$ アルコキシ；各々が互いに独立してシアノ、ニトロ、ハロゲン、 $C_1-C_4$ アルコキシ、 $C_1-C_4$ ハロアルキル、 $C_1-C_4$ ハロアルコキシ、 $-NHC(O)C_1-C_3$ アルキル、 $NHC(O)C_1-C_3$ ハロアルキル、 $C_1-C_3$ アルキルスルホニルで任意選択により置換された、アリール、例えば、フェニル、 $C_1-C_4$ アルキレンアリール、 $C_1-C_4$ アルキレンジアリール；ヒドロキシル保護基である。

10

【0146】

別の実施形態では、式(VIII)の $R_5$ および $R_5$ は、互いに独立して、 $C_1-C_4$ アルキルまたはアリール、例えば、フェニルである。別の実施形態では、式(VIII)の $R_5$ および $R_5$ は、互いに独立して、メチルまたはエチルである。別の実施形態では、式(VIII)の $R_5$ および $R_5$ は、互いに独立して、フェニルまたはベンジルである。別の実施形態では、 $R_5$ および $R_5$ は、独立して各々の場合においておよび互いに独立して、水素またはヒドロキシル保護基である。別の実施形態では、式(VIII)において、 $R_5$ および $R_5$ は、独立して各々の場合においておよび互いに独立して、水素、各々が互いに独立してシアノ、ニトロ、ハロゲンで任意選択により置換された、 $C_1-C_9$ アルキル、 $C_1-C_6$ アルコキシ；各々が互いに独立してシアノ、ニトロ、ハロゲンで任意選択により置換された、アリール、 $C_1-C_6$ アルキレンアリール；またはヒドロキシル保護基である。一実施形態では、式(VIII)によって表されるリン部分 $R_2$ は、本明細書では「ホスフェート部分」と称される。

20

【0147】

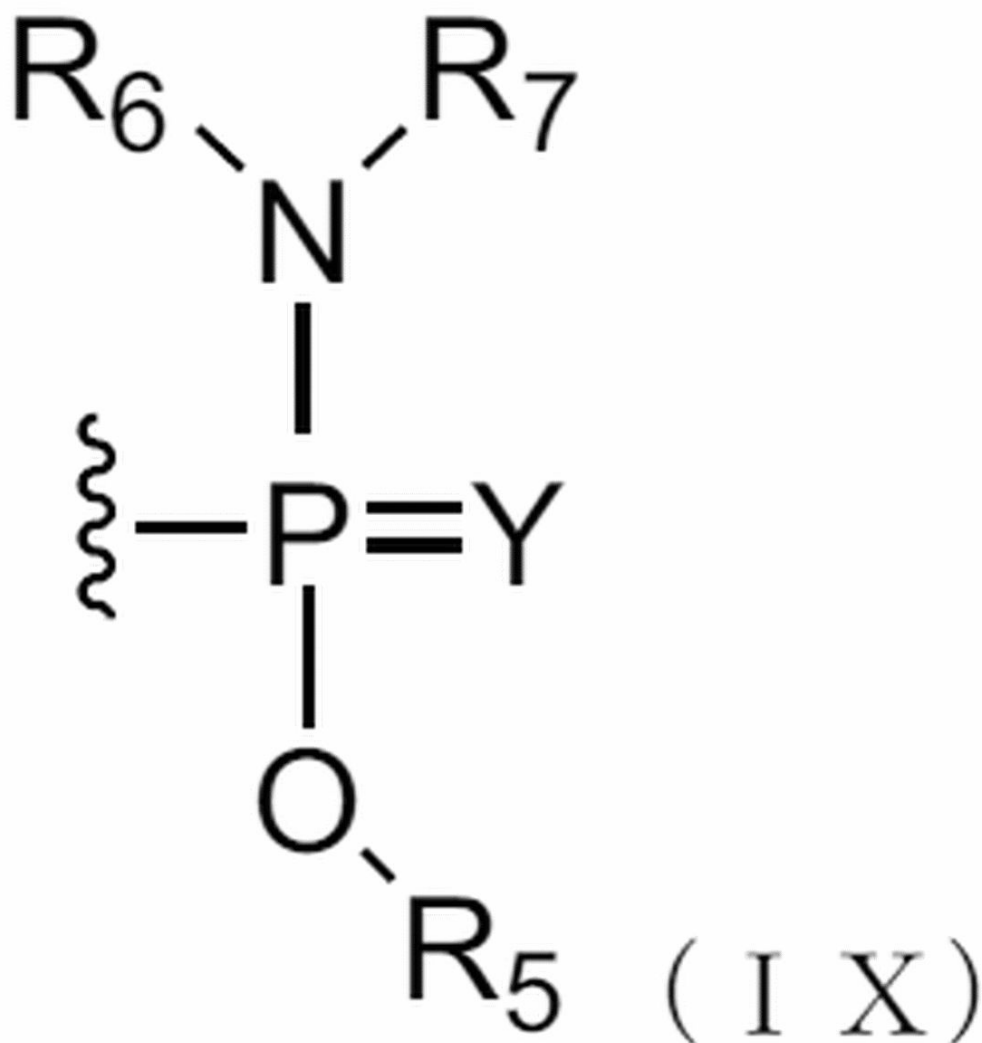
一実施形態では、リン部分 $R_2$ は、式(IX)によって表され、

30

40

50

【化 1 3】



式中、

Y は、O、S、または Se であり、Y は、O または S であり、

R<sub>5</sub> は、独立して各々の場合において、水素、各々が互いに独立してシアノ、ニトロ、ハロゲン、-NHC(O)C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>アルキル、-NHC(O)C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>ハロアルキル、C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>アルキルスルホニルで任意選択により置換された、C<sub>1</sub>-C<sub>9</sub>アルキル、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>アルコキシ；各々が互いに独立してシアノ、ニトロ、ハロゲン、C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>アルコキシ、C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>ハロアルキル、C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>ハロアルコキシ、-NHC(O)C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>アルキル、NHC(O)C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>ハロアルキル、C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>アルキルスルホニルで任意選択により置換された、アリール、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>アルキレンアリール、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>アルキレンジアリール；ヒドロキシル保護基であり、

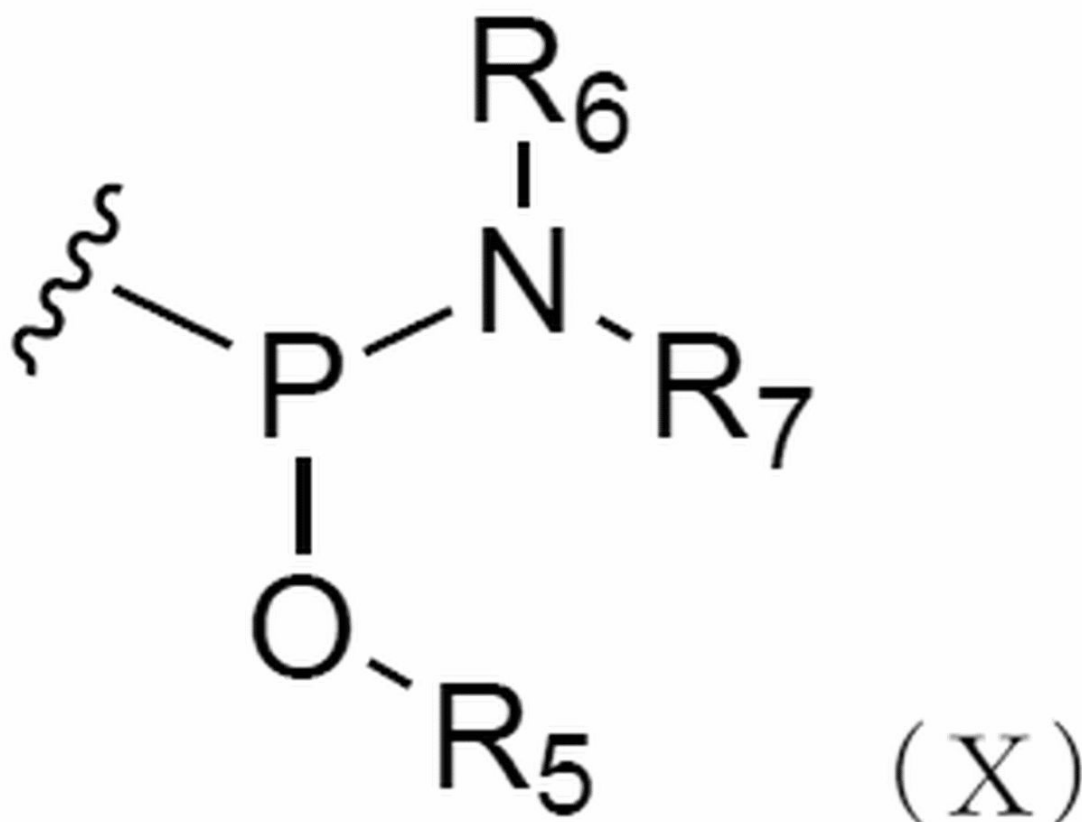
R<sub>6</sub> および R<sub>7</sub> は、互いに独立して、水素、シアノ、ニトロ、ハロゲン、C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>アルケニル、C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>シクロアルキル、C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>アルコキシで任意選択により置換された、C<sub>1</sub>-C<sub>9</sub>アルキル；シアノ、ニトロ、ハロゲン、C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>アルキル、C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>アルコキシで任意選択により置換された、アリール、例えば、フェニル；アミノ保護基であるか、またはそれらが結合している窒素原子と一緒に複素環を形成し、複素環が、ピロリジニル、ピペリジニル、モルホリニル、ピペラジニル、およびホモピペラジンから選択され、複素環が、C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>アルキルで任意選択により置換された、波線は、OR<sub>2</sub>基の酸素への

結合を示している。一実施形態では、式 (IX) によって表されるリン部分  $R_2$  は、本明細書では「ホスホルアミデート部分」または互換的に使用される「ホスホロアミデート部分」と称される。

【0148】

別の実施形態では、リン部分  $R_2$  は、式 (X) によって表され、

【化14】



、式中、

$R_5$  は、水素、各々が互いに独立してシアノ、ニトロ、ハロゲン、 $-NHC(O)C_1-C_3$  アルキル、 $-NHC(O)C_1-C_3$  ハロアルキル、 $C_1-C_3$  アルキルスルホニルで任意選択により置換された、 $C_1-C_9$  アルキル、 $C_1-C_6$  アルコキシ；各々が互いに独立してシアノ、ニトロ、ハロゲン、 $C_1-C_4$  アルコキシ、 $C_1-C_4$  ハロアルキル、 $C_1-C_4$  ハロアルコキシ、 $-NHC(O)C_1-C_3$  アルキル、 $NHC(O)C_1-C_3$  ハロアルキル、 $C_1-C_3$  アルキルスルホニル、ヒドロキシル保護基で任意選択により置換された、アリール、 $C_1-C_6$  アルキレンアリール、 $C_1-C_6$  アルキレンジアリールであり、

$R_6$  および  $R_7$  は、互いに独立して、水素、シアノ、ニトロ、ハロゲン、 $C_2-C_6$  アルケニル、 $C_3-C_6$  シクロアルキル、 $C_1-C_3$  アルコキシで任意選択により置換された、 $C_1-C_9$  アルキル、シアノ、ニトロ、ハロゲン、 $C_1-C_3$  アルキル、 $C_1-C_3$  アルコキシで任意選択により置換された、アリール、例えば、フェニルであるか、またはそれらが結合している窒素原子と一緒に複素環を形成し、複素環が、ピロリジニル、ピペリジニル、モルホリニル、ピペラジニル、およびホモピペラジンから選択され、複素環が、 $C_1-C_3$  アルキルで任意選択により置換された、波線は、 $OR_2$  基の酸素への結合を示している。典型的にはかつ上記において、式 (X) によって表されるリン部分  $R_2$  は、本明細

書では「ホスホルアミダイト部分」または互換的に使用される「ホスホロアミダイト部分」と称される。

【0149】

別の実施形態では、式 (IX) において、Y は O であり、R<sub>5</sub> は、独立して各々の場合において、水素、各々が互いに独立してシアノ、ニトロ、ハロゲンで任意選択により置換された、C<sub>1</sub> - C<sub>9</sub> アルキル、C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub> アルコキシ、各々が互いに独立してシアノ、ニトロ、ハロゲンで任意選択により置換された、アリール、C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub> アルキレンアリール；ヒドロキシル保護基であり、R<sub>6</sub> および R<sub>7</sub> は、互いに独立して、水素、シアノ、ニトロ、ハロゲン、C<sub>2</sub> - C<sub>6</sub> アルケニルで任意選択により置換された、C<sub>1</sub> - C<sub>9</sub> アルキル；シアノ、ニトロ、ハロゲン、C<sub>1</sub> - C<sub>3</sub> アルキル、C<sub>1</sub> - C<sub>3</sub> アルコキシで任意選択により置換された、アリール；アミノ保護基である、上記波線は、OR<sub>2</sub> 基の酸素への結合を示している。

10

【0150】

一実施形態では、式 (X) において、R<sub>5</sub> は、独立して各々の場合において、水素、各々が互いに独立してシアノ、ニトロ、ハロゲンで任意選択により置換された、C<sub>1</sub> - C<sub>9</sub> アルキル、C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub> アルコキシ；各々が互いに独立してシアノ、ニトロ、ハロゲンで任意選択により置換された、アリール、C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub> アルキレンアリール；ヒドロキシル保護基であり、R<sub>6</sub> および R<sub>7</sub> は、互いに独立して、水素、シアノ、ニトロ、ハロゲン、C<sub>2</sub> - C<sub>6</sub> アルケニルで任意選択により置換された、C<sub>1</sub> - C<sub>9</sub> アルキル；シアノ、ニトロ、ハロゲン、C<sub>1</sub> - C<sub>3</sub> アルキル、C<sub>1</sub> - C<sub>3</sub> アルコキシで任意選択により置換された、アリール；アミノ保護基であり、上記波線は、OR<sub>2</sub> 基の酸素への結合を示している。

20

【0151】

別の実施形態では、リン部分 R<sub>2</sub> は、独立して各々の場合において、ホスフェート部分、ホスホルアミデート部分、およびホスホルアミダイト部分から選択される。

【0152】

別の実施形態では、R<sub>5</sub> は、独立して各々の場合において、水素、各々が互いに独立してシアノ、ニトロ、ハロゲン、-NHC(O)C<sub>1</sub> - C<sub>3</sub> アルキル、-NHC(O)C<sub>1</sub> - C<sub>3</sub> ハロアルキル、C<sub>1</sub> - C<sub>3</sub> アルキルスルホニルで任意選択により置換された、C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub> アルキル、C<sub>1</sub> - C<sub>4</sub> アルキル、C<sub>1</sub> - C<sub>4</sub> アルコキシ；各々が互いに独立してシアノ、ニトロ、ハロゲン、C<sub>1</sub> - C<sub>4</sub> アルコキシ、C<sub>1</sub> - C<sub>4</sub> ハロアルキル、C<sub>1</sub> - C<sub>4</sub> ハロアルコキシ、-NHC(O)C<sub>1</sub> - C<sub>3</sub> アルキル、NHC(O)C<sub>1</sub> - C<sub>3</sub> ハロアルキル、C<sub>1</sub> - C<sub>3</sub> アルキルスルホニルで任意選択により置換された、アリール、C<sub>1</sub> - C<sub>4</sub> アルキレンアリール、C<sub>1</sub> - C<sub>4</sub> アルキレンジアリール；ヒドロキシル保護基であり、R<sub>6</sub> および R<sub>7</sub> は、互いに独立して、水素、シアノ、ニトロ、ハロゲン、C<sub>2</sub> - C<sub>4</sub> アルケニル、C<sub>3</sub> - C<sub>6</sub> シクロアルキル、C<sub>1</sub> - C<sub>3</sub> アルコキシで任意選択により置換された、C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub> アルキル；シアノ、ニトロ、ハロゲン、C<sub>1</sub> - C<sub>3</sub> アルキル、C<sub>1</sub> - C<sub>3</sub> アルコキシで任意選択により置換された、アリール；アミノ保護基であるか、またはそれらが結合している窒素原子と一緒に複素環を形成し、複素環は、ピロリジニル、ピペリジニル、モルホリニル、ピペラジニル、およびホモピペラジンから選択され、複素環は、C<sub>1</sub> - C<sub>3</sub> アルキルで任意選択により置換され、波線は、OR<sub>2</sub> 基の酸素への結合を示している。

30

40

【0153】

別の実施形態では、R<sub>5</sub> は、シアノ、塩素、フッ素、または臭素で任意選択により置換された C<sub>1</sub> - C<sub>3</sub> アルキル；各々が互いに独立してシアノ、ニトロ、塩素、フッ素、臭素、C<sub>1</sub> - C<sub>2</sub> アルコキシ、C<sub>1</sub> ハロアルキルで任意選択により置換された、アリール、C<sub>1</sub> - C<sub>3</sub> アルキレンアリール、C<sub>1</sub> - C<sub>3</sub> アルキレンジアリールである。別の実施形態では、R<sub>5</sub> は、シアノ、塩素、フッ素、または臭素で任意選択により置換された C<sub>1</sub> - C<sub>3</sub> アルキルである。別の実施形態では、R<sub>5</sub> は、シアノ置換 C<sub>2</sub> アルキル、例えば、-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-CN である。

【0154】

別の実施形態では、R<sub>5</sub> は、C<sub>1</sub> - C<sub>4</sub> アルキル、例えば、メチルもしくはエチル；アリ

50

ール、例えば、フェニルもしくはベンジル；塩化物、またはヒドロキシル保護基である。別の実施形態では、 $R_5$ は、メチルまたはヒドロキシル保護基である。

【0155】

別の実施形態では、 $R_5$ は、シアノ、塩素、フッ素、または臭素で任意選択により置換された $C_1-C_6$ アルコキシである。

【0156】

別の実施形態では、 $R_6$ および $R_7$ は、互いに独立して、 $H$ または $C_1-C_3$ アルキルであるか、またはそれらが結合している窒素原子と一緒に複素環を形成し、複素環は、ピロリジニル、ピペリジニル、モルホリニル、ピペラジニルから選択され、複素環は、メチルで任意選択により置換されている。一実施形態では、 $R_6$ および $R_7$ は、互いに独立して、 $C_1-C_3$ アルキル、アルコキシ、またはアリールであり、アリールは、シアノ、ニトロ、塩素、フッ素、臭素で任意選択により置換された、フェニルまたはベンジルである。別の実施形態では、 $R_6$ は、水素であり、 $R_7$ は、(i)  $C_1-C_9$ アルキルまたは(ii)アリールであり、(i)または(ii)はシアノ、ニトロ、ハロゲン、アリールで任意選択により置換され、 $R_7$ は、 $C_1-C_3$ アルキル、フェニル、またはベンジルである。

【0157】

別の実施形態では、 $R_6$ および $R_7$ は、互いに独立して、メチル、エチル、イソプロピル、またはイソブチルから選択される。別の実施形態では、 $R_6$ および $R_7$ は、互いに独立して、イソプロピルである。

【0158】

別の実施形態では、リン部分 $R_2$ は、式(X)によって表され、式中、 $R_5$ は、(i)  $C_1-C_9$ アルキル、(ii)アリール、例えば、フェニル、または(iii)シアノ、ニトロ、ハロゲン、アリールで任意選択により置換された、(i)もしくは(ii)であり、 $R_6$ および $R_7$ は、互いに独立して、 $C_1-C_9$ アルキル、例えば、イソプロピルである。

【0159】

別の実施形態では、リン部分 $R_2$ は、式(X)によって表され、式中、 $R_5$ は、シアノ、ニトロ、ハロゲン、 $-NHC(O)C_1-C_3$ アルキル、 $-NHC(O)C_1-C_3$ ハロアルキル、 $C_1-C_3$ アルキルスルホニルで任意選択により置換された、 $C_1-C_9$ アルキル；各々が互いに独立してシアノ、ニトロ、ハロゲン、 $C_1-C_4$ アルコキシ、 $C_1-C_4$ ハロアルキル、 $C_1-C_4$ ハロアルコキシ、 $-NHC(O)C_1-C_3$ アルキル、 $-NHC(O)C_1-C_3$ ハロアルキル、 $C_1-C_3$ アルキルスルホニルで任意選択により置換された、アリール、 $C_1-C_6$ アルキレンアリール、 $C_1-C_6$ アルキレンジアリールであり、 $R_6$ および $R_7$ は、互いに独立してシアノ、ニトロ、ハロゲン、 $C_2-C_6$ アルケニル、 $C_3-C_6$ シクロアルキル、 $C_1-C_3$ アルコキシで任意選択により置換された、 $C_1-C_9$ アルキル、シアノ、ニトロ、ハロゲン、 $C_1-C_3$ アルキル、 $C_1-C_3$ アルコキシで任意選択により置換された、フェニルであるか、またはそれらが結合している窒素原子と一緒に複素環を形成し、複素環は、ピロリジニル、ピペリジニル、モルホリニル、ピペラジニル、およびホモピペラジンから選択され、複素環は、 $C_1-C_3$ アルキルで任意選択により置換され、波線は、 $OR_2$ 基の酸素への結合を示している。

【0160】

別の実施形態では、リン部分 $R_2$ は、式(X)によって表され、式中、 $R_5$ は、シアノ、ニトロ、塩素、フッ素、臭素、 $-NHC(O)C_1-C_3$ アルキル、 $-NHC(O)C_1-C_3$ ハロアルキルで任意選択により置換された $C_1-C_9$ アルキル；各々が互いに独立してシアノ、ニトロ、塩素、フッ素、臭素、 $C_1-C_4$ アルコキシ、 $C_1-C_4$ ハロアルキルで任意選択により置換された、アリール、 $C_1-C_6$ アルキレンアリール、 $C_1-C_6$ アルキレンジアリールである。

【0161】

別の実施形態では、リン部分 $R_2$ は、式(X)によって表され、式中、 $R_5$ は、シアノ、塩素、フッ素、および臭素で任意選択により置換された $C_1-C_3$ アルキル；各々が互

10

20

30

40

50

いに独立してシアノ、ニトロ、塩素、フッ素、臭素、 $C_1-C_2$ アルコキシ、 $C_1$ ハロアルキルで任意選択により置換された、アリール、 $C_1-C_3$ アルキレンアリール、 $C_1-C_3$ アルキレンジアリールである。

#### 【0162】

別の実施形態では、リン部分 $R_2$ は、式(X)によって表され、式中、 $R_5$ は、 $C_1-C_3$ アルキル、2-シアノエチル、2, 2, 2-トリクロロエチル、2, 2, 2-トリブromoエチル、 $-(CH_2)_nNHCO(CF_3)$  ( $n=3\sim6$ である)；各々が互いに独立してシアノ、ニトロ、塩素、フッ素、臭素、 $C_1-C_2$ アルコキシ、 $-CF_3$ で任意選択により置換された、フェニル、 $C_1-C_3$ アルキレンフェニル、ベンズヒドリルである。

#### 【0163】

別の実施形態では、リン部分 $R_2$ は、式(X)によって表され、式中、 $R_5$ は、メチル、エチル、2-シアノエチル、例えば、2-シアノエチル $(CH_2)_2CN$ である。

#### 【0164】

別の実施形態では、リン部分 $R_2$ は、式(X)によって表され、式中、 $R_6$ および $R_7$ は、互いに独立して、 $C_1-C_3$ アルキルであるか、またはそれらが結合している窒素原子と一緒に複素環を形成し、複素環は、ピロリジン、ピペリジン、モルホリンから選択され、複素環は、 $C_1-C_3$ アルキルで任意選択により置換され、複素環は、メチルで任意選択により置換されている。

#### 【0165】

別の実施形態では、リン部分 $R_2$ は、式(X)によって表され、式中、 $R_6$ は、 $R_7$ に等しく、 $R_6$ および $R_7$ は、イソプロピルまたはメチルである。

#### 【0166】

別の実施形態では、リン部分 $R_2$ は、式(X)によって表され、式中、 $R_5$ は、メチル、エチル、2-シアノエチルであり、 $R_6$ は、 $R_7$ に等しく、 $R_6$ および $R_7$ は、イソプロピルまたはメチルである。

#### 【0167】

各アルキル部分は、単独で、またはアルコキシもしくはアルキレンなどのより大きな基の一部として、直鎖または分枝鎖であり、 $=C_1-C_6$ アルキル、例えば、 $C_1-C_3$ アルキルであり得る。例には、メチル、エチル、 $n$ -プロピル、プロブ-2-イル(イソプロピル；本明細書では、特に示される化学式において、 $iPr$ または $Pr i$ と互換的に省略される)、 $n$ -ブチル、ブト-2-イル、2-メチルプロブ-1-イル、または2-メチルプロブ-2-イルが含まれる。アルコキシの例には、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、イソプロポキシ、 $n$ -ブトキシ、 $sec$ -ブトキシ、 $tert$ -ブトキシ、 $n$ -ペントキシ、 $neo$ -ペントキシ、 $n$ -ヘキソキシが含まれる。本明細書に記載されるように、アルコキシは、ハロアルコキシ部分をもたらすハロゲン原子などのさらなる置換基を含み得る。

#### 【0168】

各アルキレン部分は、直鎖または分枝鎖であり、例えば、 $-CH_2-$ 、 $-CH_2-CH_2-$ 、 $-CH(CH_3)-$ 、 $-CH_2-CH_2-CH_2-$ 、 $-CH(CH_3)-CH_2-$ 、または $-CH(CH_2CH_3)-$ である。

#### 【0169】

各アルケニル部分は、単独で、またはアルケニルオキシもしくはアルケニレンなどのより大きな基の一部として、直鎖または分枝鎖であり、 $C_2-C_6$ アルケニル、例えば、 $C_2-C_4$ アルケニルである。各部分は、(E)配置または(Z)配置のいずれかであり得る。例には、ビニルおよびアリルが含まれる。したがって、アルケニル部分を含む本発明の化合物には、該当する場合、(E)配置でのアルケニル部分を有する化合物、(Z)配置でのアルケニル部分を有する化合物、および任意の比のそれらの混合物が含まれる。

#### 【0170】

各アルキニル部分は、単独で、またはアルキニルオキシなどのより大きな基の一部として、直鎖または分枝鎖であり、例えば、 $C_2-C_6$ アルキニル、または $C_2-C_4$ アルキニル

10

20

30

40

50

ルである。例は、エチニルおよびプロパルギルである。

【0171】

ハロゲンは、フッ素、塩素、臭素、またはヨウ素である。

【0172】

各ハロアルキル部分は、単独で、またはハロアルコキシなどのより大きな基の一部として、1つ以上の同じまたは異なるハロゲン原子で置換されたアルキル基である。例には、ジフルオロメチル、トリフルオロメチル、クロロジフルオロメチル、および2,2,2-トリフルオロエチルが含まれる。

【0173】

別の実施形態では、式(I)または(II)の化合物は、非ヌクレオシド化合物、例えば、固相に結合されている。

10

【0174】

別の実施形態では、式(I)の化合物は、以下から選択される。

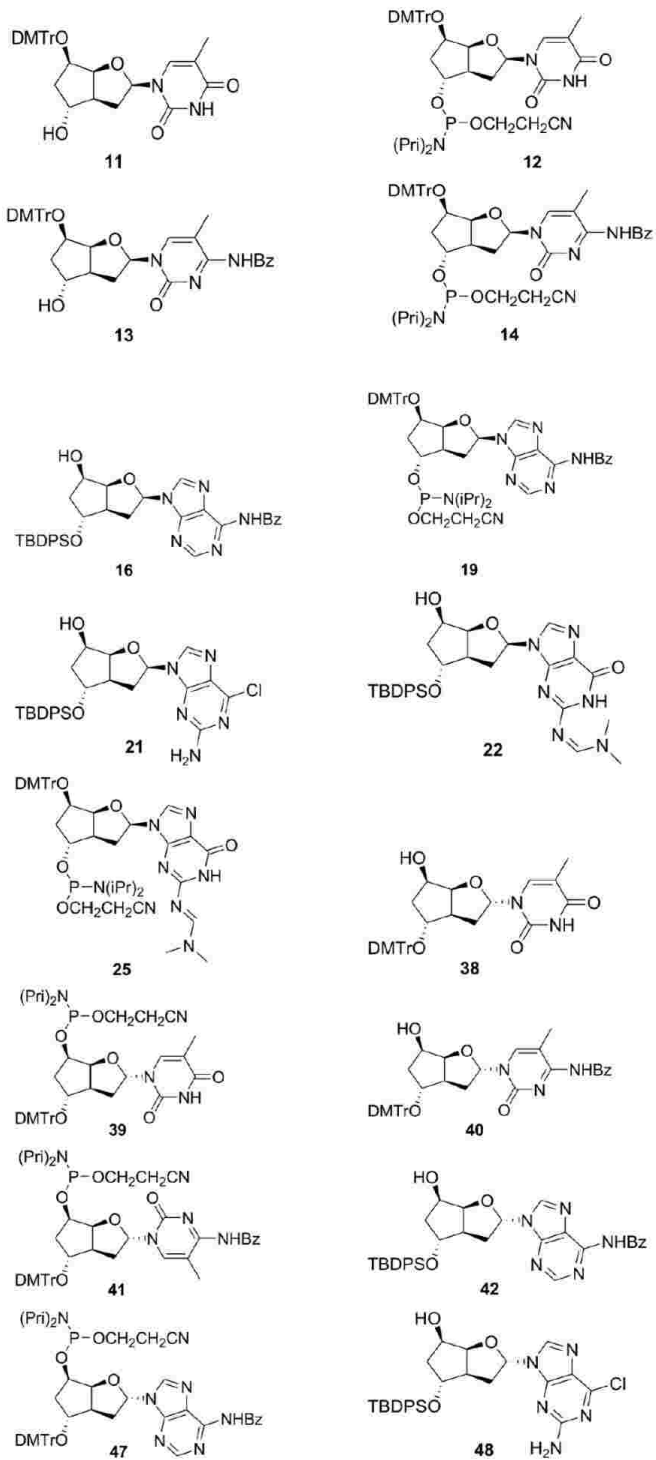
20

30

40

50

## 【化 15 - 1】



10

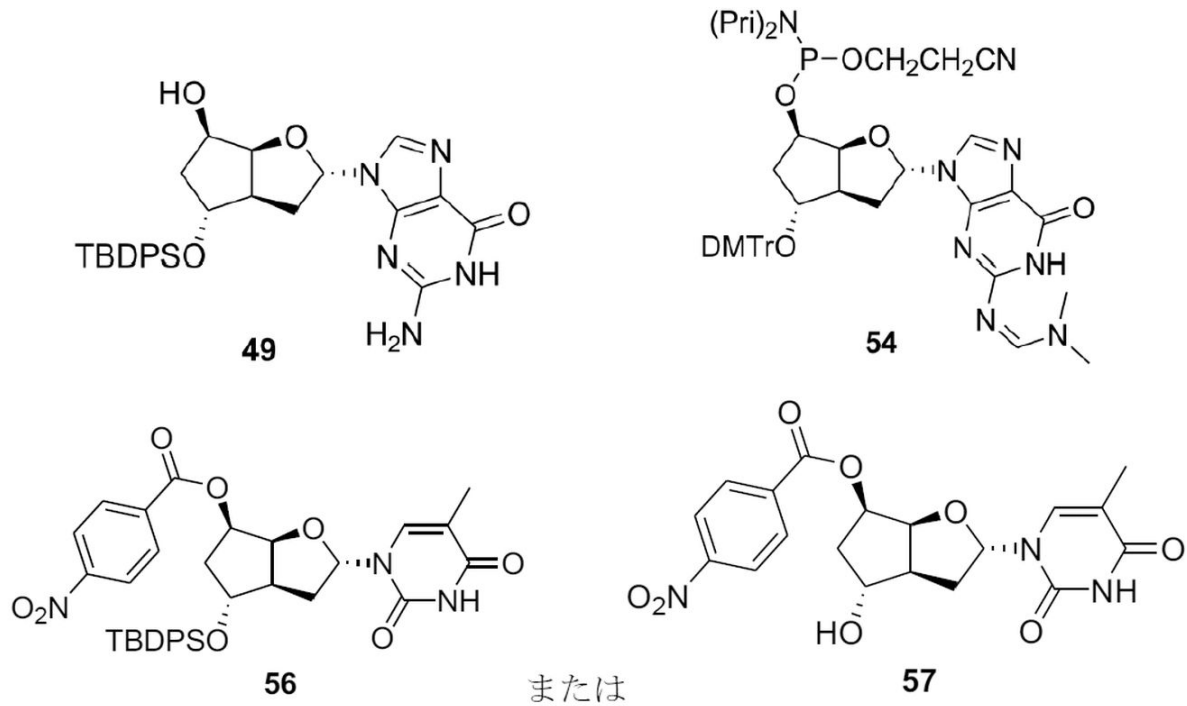
20

30

40

50

## 【化 15-2】



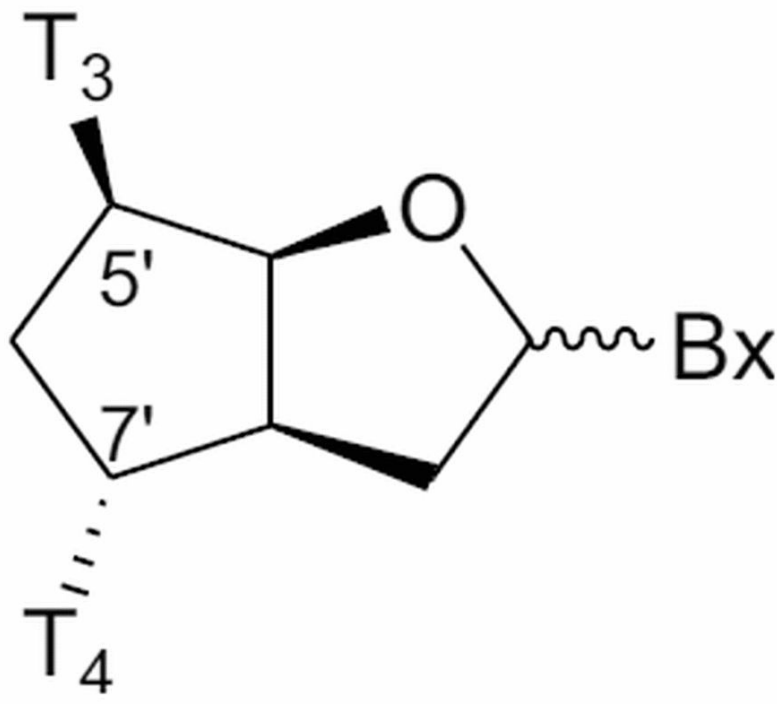
10

20

## 【0175】

本発明は、少なくとも1つの式(IV)の化合物を含むオリゴヌクレオチドを提供し、

## 【化16】



30

40

式中、少なくとも1つの式(IV)の化合物の各々について独立して、

T<sub>3</sub>またはT<sub>4</sub>のうちの一方は、ヌクレオシド結合基であり、

T<sub>3</sub>およびT<sub>4</sub>は、OR<sub>1</sub>、OR<sub>2</sub>であり、5'末端基、7'末端基、またはヌクレオシド結合基であり、R<sub>1</sub>は、Hまたはヒドロキシル保護基であり、R<sub>2</sub>は、リン部分であり、B

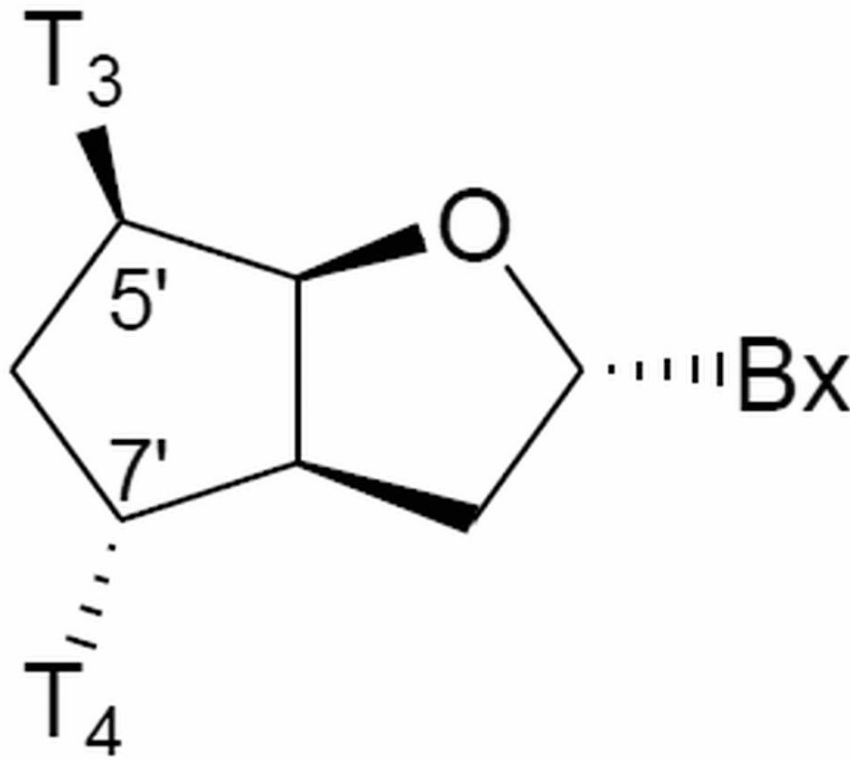
50

x は、核酸塩基である。

【0176】

別の実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの式（IV）の化合物を含み、式（IV）の化合物は、式（V）の化合物であり、

【化17】



式中、

（I）T<sub>3</sub>は、ヌクレオシド結合基であり、T<sub>4</sub>は、7'末端基またはOR<sub>1</sub>、またはOR<sub>2</sub>であり、好ましくは、T<sub>4</sub>は、7'末端基またはOR<sub>1</sub>であるか、あるいは

（ii）T<sub>3</sub>は、5'末端基、OR<sub>1</sub>、またはOR<sub>2</sub>であり、好ましくはT<sub>3</sub>は、5'末端基またはOR<sub>2</sub>であり、T<sub>4</sub>は、ヌクレオシド結合基であるか、あるいは

（iii）T<sub>3</sub>およびT<sub>4</sub>は、互いに独立して、ヌクレオシド結合基である。

【0177】

別の実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの式（IV）の化合物を含み、上記式（IV）の化合物は、式（VI）の化合物であり、

10

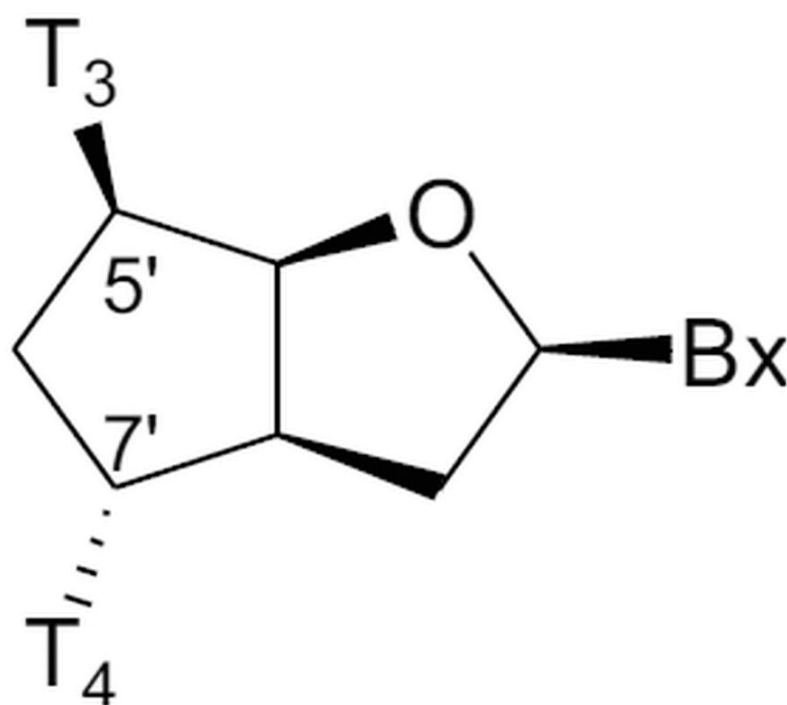
20

30

40

50

【化 18】



式中、

(I)  $T_3$  は、ヌクレオシド結合基であり、 $T_4$  は、7' 末端基、 $OR_1$ 、または  $OR_2$  であり、好ましくは  $T_4$  は、7' 末端基または  $OR_2$  であるか、あるいは

(ii)  $T_3$  は、5' 末端基、 $OR_1$ 、または  $OR_2$  であり、好ましくは  $T_3$  は、5' 末端基または  $OR_1$  であり、

$T_4$  は、ヌクレオシド結合基であるか、あるいは

(iii)  $T_3$  および  $T_4$  は、互いに独立して、ヌクレオシド結合基である。

【0178】

別の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、式 (V) の化合物を含む。別の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、式 (VI) の化合物を含む。別の実施形態では、少なくとも 1 つの式 (IV)、(V)、または (VI) の化合物を含むオリゴヌクレオチドは、DNA または RNA である。

【0179】

$Bx$  と本発明化合物の二環式コアとの間の結合を示す式 (I) および (IV) 内の波線は、核酸塩基  $Bx$  の任意の空間的配向が式 (I) または (IV) によって包含されることを示す。これは、式 (I) および (IV) が、本発明の化合物のアルファもしくはベータ立体配座、またはアルファおよびベータアノマーの任意の混合物のいずれかを包含することを意味する。

【0180】

本明細書で使用する「アリール」という用語は、親芳香族環系の単一の炭素原子から 1 個の水素原子を除去することによって誘導される 6 ～ 14 個の炭素原子 ( $C_6 - C_{14}$ ) の一価芳香族炭化水素基、ならびに、1 つ以上の置換基、典型的にかつ好ましくは、以下に記載される 1 つまたは 2 つの置換基で独立して任意選択で置換された、上記アリールを意味する。アリールには、飽和、部分的不飽和の環、芳香環または芳香族炭素環または複素環に縮合した二環式基が含まれる。アリール基は、1 つ以上の置換基で、典型的には例えば 1 つまたは 2 つの置換基で任意選択により独立して置換され、上記置換基は、独立して各々の場合において、 $C_1 - C_4$  アルキル、ハロゲン、 $CF_3$ 、OH、 $C_1 - C_3$  アルコキ

シ、 $\text{NR}_{20}\text{R}_{21}$ 、 $\text{C}_6\text{H}_5$ 、ハロゲンで置換された $\text{C}_6\text{H}_5$ 、 $\text{C}_1-\text{C}_3$ アルキル、 $\text{C}_1-\text{C}_3$ アルコキシ、 $\text{NR}_{20}\text{R}_{21}$ から選択され、 $\text{R}_{20}$ 、 $\text{R}_{21}$ は、独立して各々の場合において、 $\text{H}$ 、 $\text{C}_1-\text{C}_3$ アルキルである。典型的なアリール基には、ベンゼン（フェニル）、置換フェニル、ナフタレン、アントラセン、ビフェニル、インデニル、インダニル、1,2-ジヒドロナフタレン、1,2,3,4-テトラヒドロナフチルなどに由来する基が含まれるが、これらに限定されない。本明細書で使用される「アリール」という用語は、好ましくは、1~3の $\text{R}_{22}$ で任意選択により置換されたフェニルを指し、 $\text{R}_{22}$ は、独立して各々の場合において、ハロゲン、 $-\text{OH}$ 、1つまたは2つの $\text{OH}$ で任意選択により置換された $\text{C}_1-\text{C}_3$ アルキル、 $\text{C}_1-\text{C}_2$ フルオロアルキル、 $\text{C}_1-\text{C}_2$ アルコキシ、 $\text{C}_1-\text{C}_2$ アルコキシ $\text{C}_1-\text{C}_3$ アルキル、 $\text{C}_3-\text{C}_6$ シクロアルキル、 $-\text{NH}_2$ 、 $\text{NHC}_3\text{H}_7$ または $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ である。

#### 【0181】

本明細書で互換的に使用される「アミノの保護基」、「アミノ基の保護基」、または「アミノ保護基」という用語は、当該技術分野で周知であり、Protecting Groups in Organic Synthesis, T. W. Greene and P. G. M. Wuts, 3<sup>rd</sup> edition, John Wiley & Sons, 1999, Greene's Protective Groups in Organic Synthesis, P. G. M. Wuts, 5<sup>th</sup> edition, John Wiley & Sons, 2014、およびNucleic Acid Chemistry, edited by S. L. Beaucage et al. 06/2012における現在のプロトコル、および特に第2章で詳細に記載されているものを含む。本発明のための好適な「アミノ保護基」には、メチルカルバメート、エチルカルバメート、9-フルオレニルメチルカルバメート（Fmoc）、9-（2-スルホ）フルオレニルメチルカルバメート、2,7-ジ-*t*-ブチル- [9-（10,10-ジオキソ-10,10,10,10-テトラヒドロチオキサントリル）] メチルカルバメート（DBD-Tmoc）、4-メトキシフェナシルカルバメート（Phenoc）、2,2,2-トリクロロエチルカルバメート（Troc）、2-トリメチルシリルエチルカルバメート（Teoc）、2-フェニルエチルカルバメート（hZ）、1,1-ジメチル-2,2-ジブromoエチルカルバメート（DB-*t*-BOC）、1,1-ジメチル-2,2,2-トリクロロエチルカルバメート（TCBOC）、ベンジルカルバメート（Cbz）、*p*-メトキシベンジルカルバメート（Moz）、および2,4,6-トリメチルベンジルカルバメート、ならびにホルムアミド、アセトアミド、ベンズアミドが含まれ、典型的にはかつ好ましくは、独立して各々の場合において、それらから選択される。

#### 【0182】

本明細書で互換的に使用される「ヒドロキシルの保護基」、「ヒドロキシル基の保護基」、または「ヒドロキシル保護基」という用語は、当該技術分野で周知であり、Protecting Groups in Organic Synthesis, T. W. Greene and P. G. M. Wuts, 3<sup>rd</sup> edition, John Wiley & Sons, 1999; Greene's Protective Groups in Organic Synthesis, P. G. M. Wuts, 5<sup>th</sup> edition John Wiley & Sons, 2014、およびNucleic Acid Chemistry, edited by S. L. Beaucage et al. 06/2012における現在のプロトコル、および特に第2章で詳細に記載されているものを含む。特定の実施形態では、本発明の「ヒドロキシル保護基」は、独立して各々の場合において、アセチル、ベンゾイル、ベンジル、 $\beta$ -メトキシエトキシメチルエーテル（MEM）、ジメトキシトリチル、[ビス-（4-メトキシフェニル）フェニルメチル]（DMTr）、メトキシメチルエーテル（MOM）、メトキシトリチル [（4-メトキシフェニル）ジフェニルメチル]（MMT）、*p*-メトキシベンジルエーテル（PMB）、メチルチオメチルエーテル、ピバロイル（Piv）、テトラヒドロピラニル（THP）、テトラヒドロフラン（THF）、トリチル（トリフェニルメチル、Tr）、シリルエーテル、例えば、

**【 0 1 8 3 】**

20

**【 0 1 8 4 】**

30

**【 0 1 8 5 】**

**【 0 1 8 6 】**

40

【 0 1 8 7 】

**【 0 1 8 8 】**

50

リルオキシメチル (TOM)、または $\epsilon$ -ブチルジフェニルシリルエーテル (TB DPS) である。別の実施形態では、ヒドロキシル保護基は、独立して各々の場合において、4, 4'-ジメトキシトリチル (DMTr) または4-モノメトキシトリチルから選択される。別の実施形態では、ヒドロキシル保護基は、4, 4'-ジメトキシトリチル (DMTr) である。

#### 【0189】

基が任意選択により置換されていると言う場合、1～5個の置換基、1～3個の置換基、または1個もしくは2個の置換基があり得る。基が任意選択により置換されていると言う場合、および2つ以上の置換基が存在する場合、2つ以上の置換基は同じでもまたは異なってもよい。

#### 【0190】

##### ヌクレオシド間リン含有結合基

本発明のオリゴヌクレオチドは、主に、ホスホジエステルヌクレオシド間結合を含み、例えば、ヌクレオシド間結合基の50%以上、例えば、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、および100%は、ホスホジエステル結合基である。

#### 【0191】

本発明のオリゴヌクレオチドはまた、主にホスホジエステルヌクレオシド間結合に加えて、ホスホトリエステル結合基、ホスホロチオエート結合基、ホスホロジチオエート結合基、ホスホネート結合基、ホスホノチオエート結合基、ホスフィネート結合基、ホスホルチオアミデート結合、またはホスホルアミデート結合基から選択されるヌクレオシド結合基を含むことができる。

#### 【0192】

「ヌクレオシド結合基」という用語には、リン結合基および非リン結合基が含まれる。

#### 【0193】

一実施形態では、ヌクレオシド結合基は、リン結合基であり、リン結合基は、ホスホジエステル結合基、ホスホトリエステル結合基、ホスホロチオエート結合基、ホスホロジチオエート結合基、ホスホネート結合基、例えば、H-ホスホネート結合基またはメチルホスホネート結合基、ホスホノチオエート結合基、例えば、H-ホスホノチオエート結合基、メチルホスホノチオエート結合基、ホスフィネート結合基、ホスホルチオアミデート結合、ホスホルアミデート結合基、またはホスホロジアミデート結合基から選択される。別の実施形態では、ヌクレオシド結合基は、リン結合基であり、リン結合基は、ホスホジエステル結合基、ホスホトリエステル結合基、ホスホロチオエート結合基、またはホスホネート結合基から選択され、ホスホネートは、H-ホスホネート結合基またはメチルホスホネート結合基である。

#### 【0194】

別の実施形態では、ヌクレオシド結合基は、リン結合基であり、リン結合基は、ホスホジエステル結合基である。別の実施形態では、ヌクレオシド結合基は、リン結合基であり、リン結合基は、ホスホロチオエート結合基である。

#### 【0195】

リン結合基は、アルキルホスホジエステル結合基、アルキレンホスホジエステル結合基、チオノアルキルホスホジエステル結合基またはアミノアルキルホスホジエステル結合基、アルキルホスホトリエステル結合基、アルキレンホスホトリエステル結合基、チオノアルキルホスホトリエステル結合基またはアミノアルキルホスホトリエステル結合基、アルキルホスホネート結合基、アルキレンホスホネート結合基、アミノアルキルホスホネート結合基、チオノアルキルホスホネート結合基またはキラルホスホネート結合基から選択することができる。本発明のヌクレオシド結合基は、リン結合基を含み、リン結合基は、ホスホジエステル結合基-O-P(=O)(OH)O-または対イオンとして[HB<sup>+</sup>]を有する-O-P(=O)(O<sup>-</sup>)O-であり、ホスホロチオエート-O-P(=S)(OH)O-または対イオンとして[HB<sup>+</sup>]を有する-O-P(=S)(O<sup>-</sup>)O-、メチ

10

20

30

40

50

ルホスホネート-O-P(=O)(CH<sub>3</sub>)O-である。リン結合基の様々な塩、混合塩、および遊離酸形態が含まれる。

【0196】

ヌクレオシド結合基は、ヌクレオシド、ヌクレオチド、またはオリゴヌクレオチドを、さらなるヌクレオシド、ヌクレオチド、またはオリゴヌクレオチドと結合することができる。

【0197】

非リン結合基は、リン原子を含まず、非リン結合基の例には、各々が互いに独立してシアノ、ニトロ、ハロゲン、カルボキシル、アミド、アミン、アミノ、イミン、チオール、スルフィド、スルホキシド、スルホン、スルファメート、スルホネート、スルホンアミド、シロキサン、またはそれらの混合物で任意選択により置換された、アルキル、アリール、好ましくは、フェニル、ベンジル、またはベンゾイル、シクロアルキル、アルキレンアリール、アルキレンジアリール、アルコキシ、アルコキシアルキレン、アルキルスルホニル、アルキン、エーテルが含まれる。非リン結合基には、アミノプロピル、長鎖アルキルアミン基、ビニル、アセチルアミド、アミノメチル、ホルムアセタール(formacetal)、チオホルムアセタール、チオホルムアセチル、リボアセチル、メチレンイミノ、メチレンヒドラジノ、または中性非イオン性ヌクレオシド結合基、例えば、アミド-3(3'-CH<sub>2</sub>-C(=O)-N(H)-5')またはアミド-4(3'-CH<sub>2</sub>-N(H)-C(=O)-5')が含まれる。非リン結合基には、アルキル、アリール、好ましくは、フェニル、ベンジル、またはベンゾイル、シクロアルキル、アルキレン、アルキレンジアリール、アルコキシ、アルコキシアルキレン、アルキルスルホニル、アルキン、またはエーテルから選択される化合物が含まれ、化合物は、C<sub>1</sub>-C<sub>9</sub>、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>、またはC<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>を含む。

【0198】

脂質基

本発明は、リンカーを介して結合したabc-DNAヌクレオシドおよび脂質基を含む、オリゴヌクレオチドを提供する。脂質基がコンジュゲートしたオリゴヌクレオチドの構造は、脂質基、例えば脂肪酸の炭化水素鎖が露出し、それによって炭化水素鎖と、アルブミンおよび／または脂肪酸受容体または輸送体と、の相互作用を可能となり、それによってインビボでの長い半減期を有するオリゴヌクレオチドを提供するようなものである。脂質基は、リンカーを介して、オリゴヌクレオチドの5'末端または7'末端のヒドロキシル基にコンジュゲートされている。

【0199】

特定の実施形態では、脂質基は、脂肪酸由来基である。特定の実施形態では、脂肪酸由来基は、カルボキシ基を含む。脂肪酸には、4〜28個の炭素原子の炭化水素鎖を有する任意の飽和または不飽和脂肪酸が含まれ、脂肪酸は、1つまたは2つのカルボン酸基を含むことができる。2つのカルボン酸基を含む脂肪酸は、ジカルボン酸である。1つまたは2つの脂肪酸リガンドは、本明細書に記載されるように、abc-DNAオリゴヌクレオチドの5'および／または7'末端上のリンカーを介してオリゴヌクレオチドに結合することができる。

【0200】

特定の実施形態では、脂質基は、脂肪酸由来基であり、脂肪酸は、表1および2に示される脂肪酸のうちのいずれか1つである。

10

20

30

40

50

## 【表 1】

表 1 : 飽和脂肪酸

|         |          |                                              |         |
|---------|----------|----------------------------------------------|---------|
| 酪酸      | ブタン酸     | $\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_2 \text{COOH}$    | C4 : 0  |
| 吉草酸     | ペンタン酸    | $\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_3 \text{COOH}$    | C5 : 0  |
| カプロン酸   | ヘキサン酸    | $\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_4 \text{COOH}$    | C6 : 0  |
| エナント酸   | ヘプタン酸    | $\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_5 \text{COOH}$    | C7 : 0  |
| カプリル酸   | オクタン酸    | $\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_6 \text{COOH}$    | C8 : 0  |
| ペラルゴン酸  | ノナン酸     | $\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_7 \text{COOH}$    | C9 : 0  |
| カプリン酸   | デカン酸     | $\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_8 \text{COOH}$    | C10 : 0 |
| ウンデシル酸  | ウンデカン酸   | $\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_9 \text{COOH}$    | C11 : 0 |
| ラウリン酸   | ドデカン酸    | $\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_{10} \text{COOH}$ | C12 : 0 |
| トリデシル酸  | トリデカン酸   | $\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_{11} \text{COOH}$ | C13 : 0 |
| ミリスチン酸  | テトラデカン酸  | $\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_{12} \text{COOH}$ | C14 : 0 |
| ペンタデカン酸 | ペンタデカン酸  | $\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_{13} \text{COOH}$ | C15 : 0 |
| パルミチン酸  | ヘキサデカン酸  | $\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_{14} \text{COOH}$ | C16 : 0 |
| マルガリン酸  | ヘプタデカン酸  | $\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_{15} \text{COOH}$ | C17 : 0 |
| ステアリン酸  | オクタデカン酸  | $\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_{16} \text{COOH}$ | C18 : 0 |
| ノナデシル酸  | ノナデカン酸   | $\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_{17} \text{COOH}$ | C19 : 0 |
| アラキジン酸  | エイコサン酸   | $\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_{18} \text{COOH}$ | C20 : 0 |
| ヘンイコシル酸 | ヘンイコサノン酸 | $\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_{19} \text{COOH}$ | C21 : 0 |
| ベヘン酸    | ドコサン酸    | $\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_{20} \text{COOH}$ | C22 : 0 |
| トリコシル酸  | トリコサン酸   | $\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_{21} \text{COOH}$ | C23 : 0 |
| リグノセリン酸 | テトラコサン酸  | $\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_{22} \text{COOH}$ | C24 : 0 |
| ペンタコシル酸 | ペンタコサン酸  | $\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_{23} \text{COOH}$ | C25 : 0 |
| セロチン酸   | ヘキサコサン酸  | $\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_{24} \text{COOH}$ | C26 : 0 |
| ヘプタコシル酸 | ヘプタコサン酸  | $\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_{25} \text{COOH}$ | C27 : 0 |
| モンタン酸   | オクタコサン酸  | $\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_{26} \text{COOH}$ | C28 : 0 |

10

20

30

40

50

【表 2】

表 2：不飽和脂肪酸

|             |                     |         |                                 |                                                                                                                                                                                          |      |
|-------------|---------------------|---------|---------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| $\omega$ -3 | $\alpha$ -リノレン酸     | C18 : 3 | $\Delta^{6, 12, 15}$            | $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$                                                                      | シス   |
| $\omega$ -3 | ステアリドン酸             | C18 : 4 | $\Delta^{6, 9, 12, 15}$         | $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$                                               | シス   |
| $\omega$ -3 | エイコサペンタエン酸          | C20 : 5 | $\Delta^{5, 8, 11, 14, 17}$     | $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$                        | シス   |
| $\omega$ -3 | ドコサヘキサエン酸           | C22 : 6 | $\Delta^{4, 7, 10, 13, 16, 19}$ | $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$ | シス   |
| $\omega$ -6 | リノール酸               | C18 : 2 | $\Delta^{9, 12}$                | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$                                                                                         | シス   |
| $\omega$ -6 | リノレライジン酸            | C18 : 2 |                                 | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$                                                                                         | トランス |
| $\omega$ -6 | $\gamma$ -リノレン酸     | C18 : 3 | $\Delta^{6, 9, 12}$             | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$                                                                  | シス   |
| $\omega$ -6 | ジホモ $\gamma$ -リノレン酸 | C20 : 3 | $\Delta^{8, 11, 14}$            | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$                                                                  | シス   |
| $\omega$ -6 | アラキドン酸              | C20 : 4 | $\Delta^{6, 9, 11, 14}$         | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$                                           | シス   |
| $\omega$ -6 | ドコサテトラエン酸           | C22 : 4 | $\Delta^{7, 10, 13, 16}$        | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_5\text{COOH}$                                           | シス   |
| $\omega$ -7 | パルミトレイン酸            | C16 : 1 | $\Delta^9$                      | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$                                                                                                                | シス   |
| $\omega$ -7 | バクセン酸               | C18 : 1 | $\Delta^{11}$                   | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_9\text{COOH}$                                                                                                                | トランス |
| $\omega$ -7 | パウリン酸               | C20 : 1 | $\Delta^{13}$                   | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{11}\text{COOH}$                                                                                                             | シス   |
| $\omega$ -9 | オレイン酸               | C18 : 1 | $\Delta^9$                      | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$                                                                                                                | シス   |
| $\omega$ -9 | エライジン酸              | C18 : 1 | $\Delta^9$                      | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$                                                                                                                | トランス |
| $\omega$ -9 | ゴンド酸                | C20 : 1 | $\Delta^{11}$                   | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_9\text{COOH}$                                                                                                                | シス   |
| $\omega$ -9 | エルカ酸                | C22 : 1 | $\Delta^{13}$                   | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{11}\text{COOH}$                                                                                                             | シス   |
| $\omega$ -9 | ネルボン酸               | C24 : 1 | $\Delta^{15}$                   | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{13}\text{COOH}$                                                                                                             | シス   |
| $\omega$ -9 | ミード酸                | C20 : 3 | $\Delta^{3, 6, 11}$             | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$                                                                  | シス   |

## 【0201】

本発明に従って有用な追加の脂質基には、コレステロール、ビタミンE（トコフェロール）、および胆汁酸が含まれる。

## 【0202】

一実施形態では、上記脂質基は、8～24個の炭素原子の炭化水素鎖を有する飽和脂肪酸由来基である。特定の実施形態では、上記脂質基は、飽和脂肪酸由来基であり、該脂肪酸は、オクタン酸、デカン酸、ドデカン酸、テトラデカン酸、ヘキサデカン酸、オクタデカン酸、エイコサン酸、ドコサン酸、およびテトラコサン酸からなる群から選択される。一実施形態では、上記脂質基は、飽和脂肪酸由来基であり、該脂肪酸は、ヘキサデカン酸である。一実施形態では、上記脂肪酸由来基は、a b c-DNAオリゴヌクレオチドの5'末端でリンカーを介してオリゴヌクレオチドに結合している。一実施形態では、上記脂肪酸由来基は、a b c-DNAオリゴヌクレオチドの7'末端でリンカーを介してオリゴヌクレオチドに結合している。

## 【0203】

一実施形態では、上記脂質基は、8～24個の炭素原子の炭化水素鎖を有する不飽和脂肪酸由来基である。特定の実施形態では、上記脂質基は、不飽和脂肪酸由来基であり、該脂肪酸は、ミリストレイン酸、パルミトリン酸、サピエン酸、オレイン酸、エライジン酸、バクセン酸、リノール酸、リノレン酸、 $\alpha$ -リノレン酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸、エルカ酸、およびドコサヘキサエン酸からなる群から選択される。

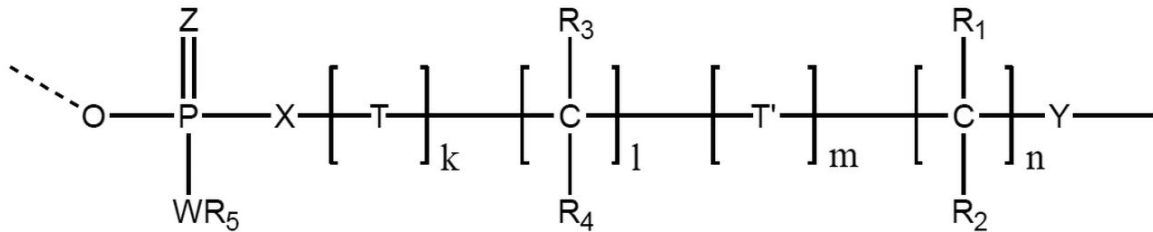
## 【0204】

リンカー

本発明のオリゴヌクレオチドは、リンカーを介して脂質基に結合している。いくつかの

実施形態では、リンカーは、アミド結合を介して脂質基に結合されている。炭化水素リンカーの場合、リンカーは、2～20個の炭素、例えば2、3、4、5、6、7、8、9または10個の炭素を含む。ポリエチレングリコール（PEG）リンカーの場合、リンカーは、1～20個のエチレングリコールサブユニット、例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個のエチレングリコール反復を含む。リンカーは、炭化水素リンカーまたはポリエチレングリコール（PEG）リンカーであり得る。abcDNAが、リンカーのリン部分に結合し、脂質基、例えば脂肪酸由来基が、Yに結合している、本発明によるリンカーは、例えば、以下に示す一般的な構造を有することができ、

【化19】



式中、

Y = NHの場合、脂肪酸由来基は、アミド結合を介して結合され、

n = 1の場合、R<sub>1</sub>は、例えば、CO<sub>2</sub>Hであり、R<sub>2</sub>は、例えば、Hであり得、

T'は、-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Oであり得、mは、エチレングリコール反復の数であり、

Tは、ジスルフィド基などの生体切断可能な部分であり得、kは、1に等しく、特定の  
の実施形態では、

Xは、酸素またはNHであり得、

Zは、OまたはSであり得、

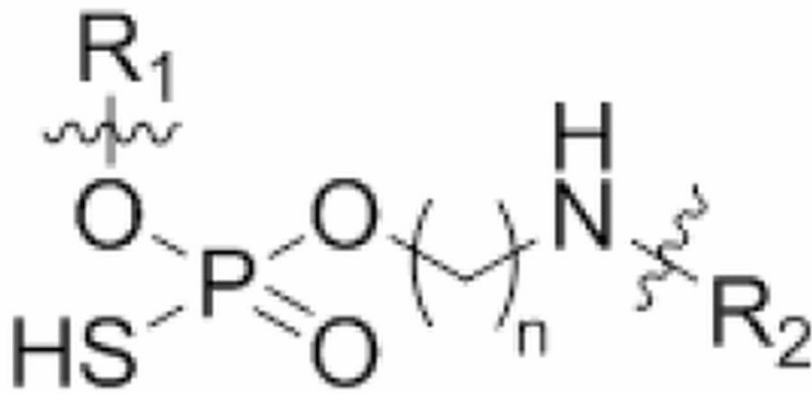
WR<sub>5</sub>は、OHまたはSHであり得る。

【0205】

本発明による有用なリンカーには、以下が含まれるが、これらに限定されない：

アミノ-アルキル-ホスホロチオエートリンカー：

【化 20】



$R_1$  = オリゴヌクレオチド

$R_2$  = コンジュゲートした脂質基

式中、 $n$ は、好ましくは2～12の整数、好ましくは4～10の整数である。一実施形態では、 $n$ は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または12の整数である。一実施形態では、 $n$ は、6である。

アルファ-カルボキシレート-アミノ-アルキル-ホスホロチオエートリンカー：

10

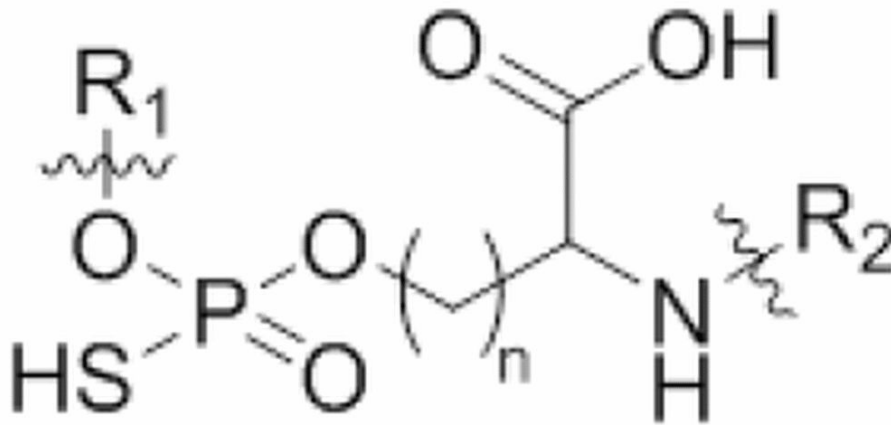
20

30

40

50

【化 2 1】



10

$R_1$  = オリゴヌクレオチド

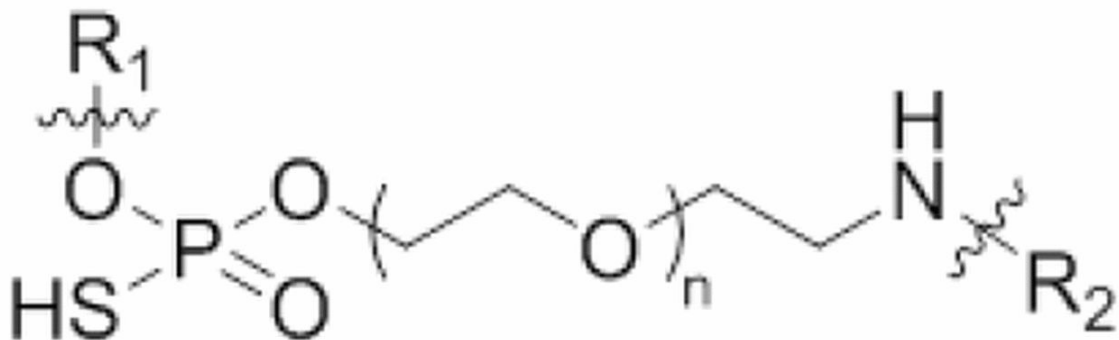
$R_2$  = コンジュゲートした脂質基

20

式中、 $n$ は、好ましくは2～12の整数、好ましくは4～10の整数である。一実施形態では、 $n$ は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または12の整数である。一実施形態では、 $n$ は、6である。

アミノ-PEG-ホスホロチオエートリンカー：

【化 2 2】



30

$R_1$  = オリゴヌクレオチド

$R_2$  = コンジュゲートした脂質基

40

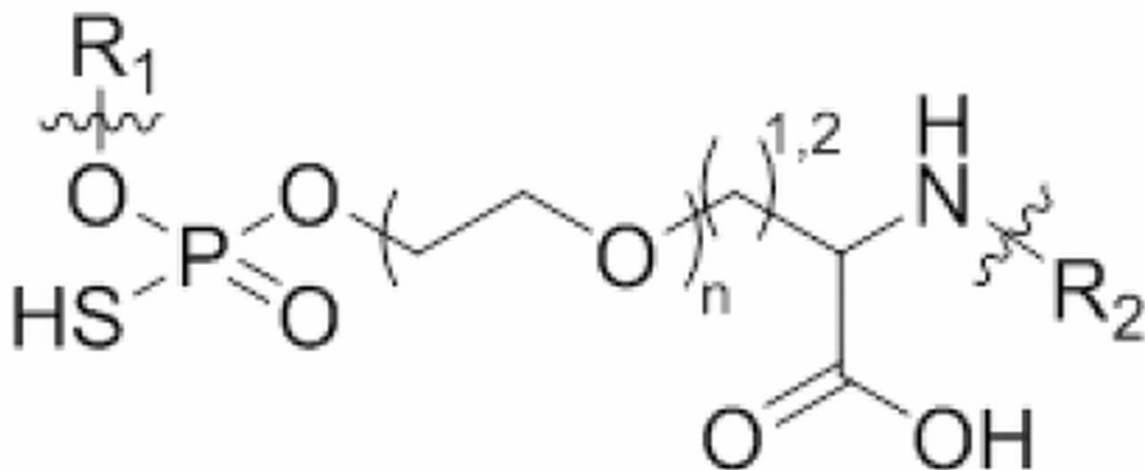
50

式中、 $n$ は、好ましくは1～8の整数である。一実施形態では、 $n$ は、1、2、3、4、5、6、7、または8の整数である。

および

アルファ-カルボキシレート-アミノ-PEG-ホスホロチオエートリンカー：

【化23】



$R_1$  = オリゴヌクレオチド

$R_2$  = コンジュゲートした脂質基

式中、 $n$ は、好ましくは1～8の整数である。一実施形態では、 $n$ は、1、2、3、4、5、6、7、または8の整数である。

【0206】

したがって、一実施形態では、上記リンカーは、以下からなる群から選択される：

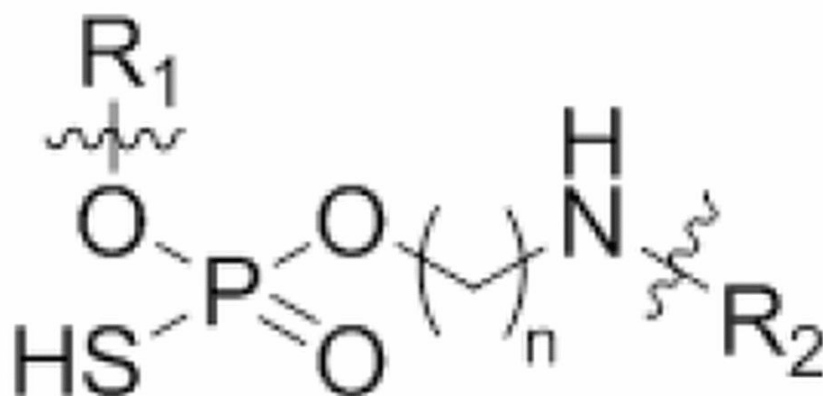
- (i) アミノ-アルキル-ホスホロチオエートリンカー；
- (ii) アルファ-カルボキシレート-アミノ-アルキル-ホスホロチオエートリンカー；
- (iii) アミノ-PEG-ホスホロチオエートリンカー、および
- (iv) アルファ-カルボキシレート-アミノ-PEG-ホスホロチオエートリンカー

すべて、提供した式において上記で定義された通りである。

【0207】

一実施形態では、上記リンカーは、以下の式のアミノ-アルキル-ホスホロチオエートリンカーであり、

【化 2 4】



$\text{R}_1$  = オリゴヌクレオチド

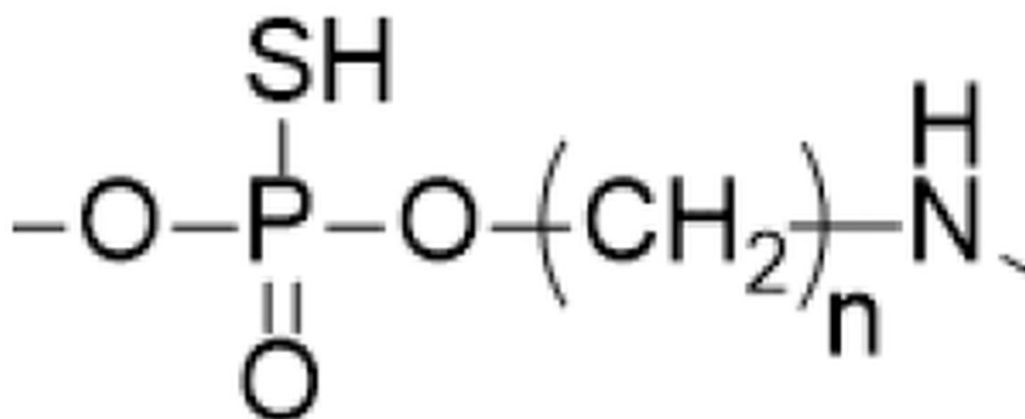
$\text{R}_2$  = コンジュゲートした脂質基

式中、 $n$ は、2～12の整数、好ましくは4～10の整数である。一実施形態では、 $n$ は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または12の整数である。一実施形態では、 $n$ は、6である。

【0208】

したがって、本発明は、以下に示される構造を有するアミノアルキルホスホロチオエー  
トリンカーを提供する：

【化 2 5】

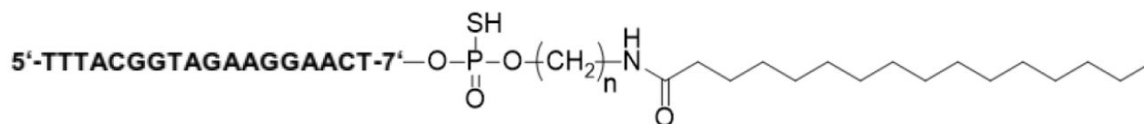


(式中、 $n$ は、2～12の整数、好ましくは4～10の整数である)。一実施形態では、 $n$ は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または12の整数である。一実施形態では、 $n$ は、6である。

【0209】

アミノアルキルホスホロチオエートリンカーを介して脂質基に結合された配列番号 10 を含む本発明のオリゴヌクレオチドの例は、以下の構造を有する：

【化 26】

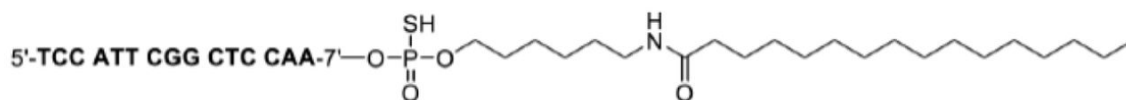


(式中、n は、2～12 の整数、好ましくは 4～10 の整数であり、より好ましくは、n は 6 である)。好ましくは、配列番号 10 の残基のすべては、配列番号 418 に対応する abc-DNA 残基である。

【0210】

アミノアルキルホスホロチオエートリンカーを介して脂質基に結合された本発明のオリゴヌクレオチド (配列番号 412) の別の例は、以下の構造を有する。

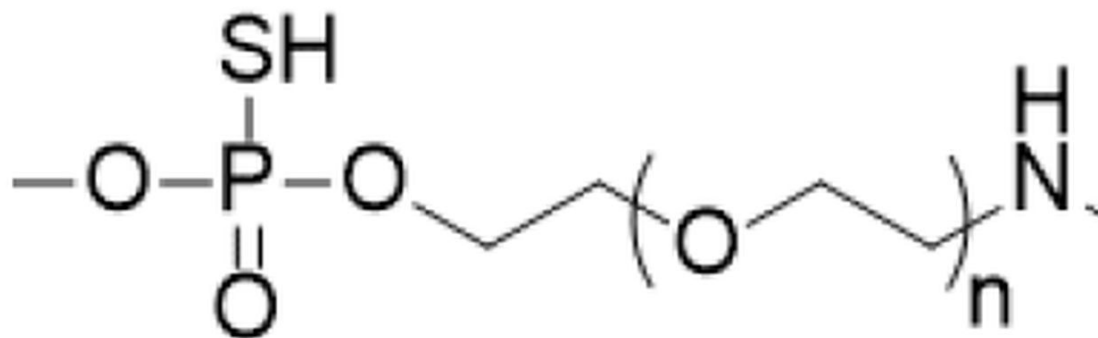
【化 27】



【0211】

本発明はまた、以下に提供される構造を有するアミノ-PEG-ホスホロチオエートリンカーを提供する：

【化 28】

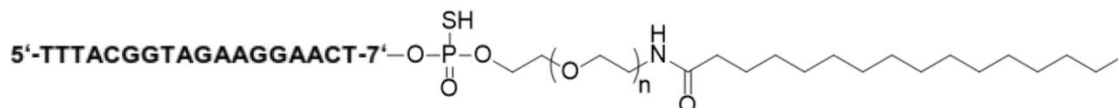


(式中、n は、好ましくは 1～8 の整数である)。一実施形態では、n は、1、2、3、4、5、6、7、または 8 の整数である。

【0212】

アミノ-PEG-ホスホロチオエートリンカーを介して脂質基に結合された配列番号 10 を含む本発明のオリゴヌクレオチドの例は、以下の構造を有する：

【化 29】

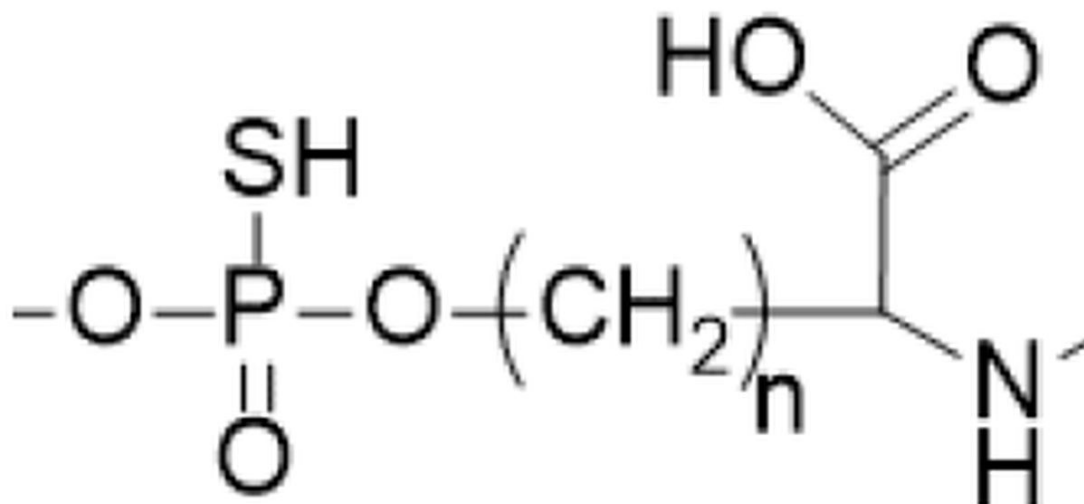


(式中、n は、好ましくは 1～8 の整数である)。一実施形態では、n は、2、3、4、5、6、7、または 8 の整数である。好ましくは、配列番号 10 の残基のすべては、配列番号 418 に対応する abc-DNA 残基である。

## 【0213】

本発明はまた、以下に提供される構造を有するアルファ-カルボキシレート-アミノ-アルキル-ホスホロチオエートリンカーを提供する：

## 【化30】

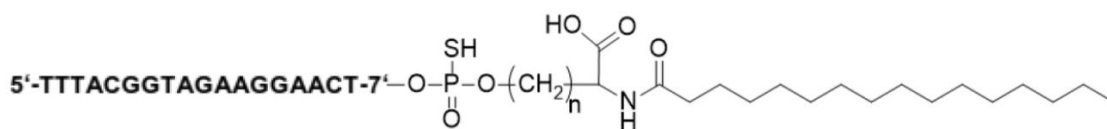


(式中、nは、好ましくは2～12の整数、好ましくは4～10の整数である)。一実施形態では、nは、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または12の整数である。一実施形態では、nは、6である。

## 【0214】

アルファ-カルボキシレート-アミノ-アルキル-ホスホロチオエートリンカーを介して脂質基に結合された配列番号10を含む本発明のオリゴヌクレオチドの例は、以下の構造を有する：

## 【化31】



(式中、nは、2～12の整数、好ましくは4～10の整数であり、より好ましくは、nは6である)。好ましくは、配列番号10の残基のすべては、配列番号418に対応するabc-DNA残基である。

## 【0215】

本発明はまた、以下に提供される構造を有するアルファ-カルボキシレート-アミノ-PEG-ホスホロチオエートリンカーを提供する：

10

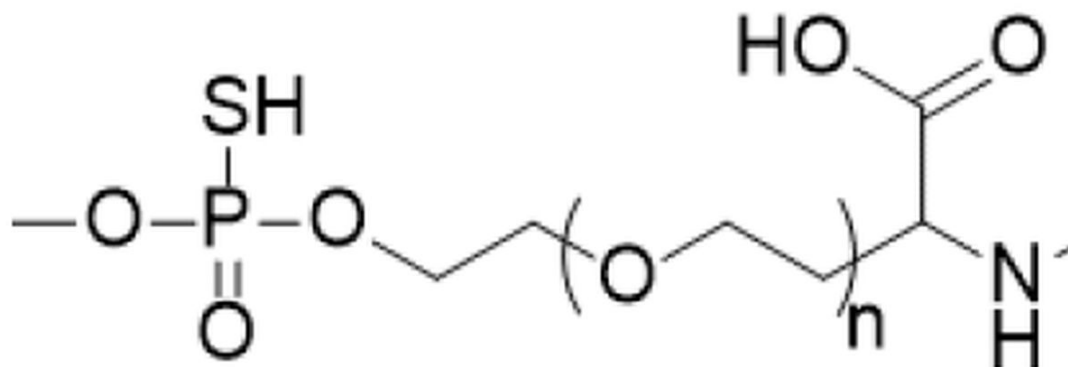
20

30

40

50

【化 3 2】



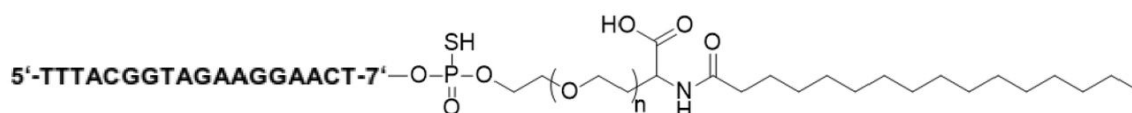
10

(式中、 $n$ は、好ましくは1～8の整数である)。一実施形態では、 $n$ は、2、3、4、5、6、7、または8の整数である。

【0216】

アルファーカルボキシレート-アミノ-PEG-ホスホロチオエートリンカーを介して脂質基に結合された配列番号10を含む本発明のオリゴヌクレオチドの例は、以下の構造：

【化 3 3】

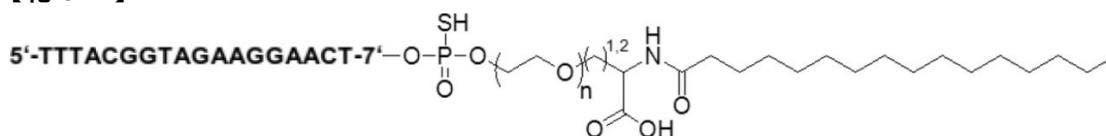


20

(式中、 $n$ は、好ましくは1～8の整数である)。一実施形態では、 $n$ は、2、3、4、5、6、7、または8の整数である。好ましくは、配列番号10の残基のすべては、配列番号418に対応する $a b c$ -DNA残基である)

または以下の構造を有する：

【化 3 4】



30

(式中、 $n$ は、好ましくは1～8の整数である)。一実施形態では、 $n$ は、2、3、4、5、6、7、または8の整数である。好ましくは、配列番号10の残基のすべては、配列番号418に対応する $a b c$ -DNA残基である。

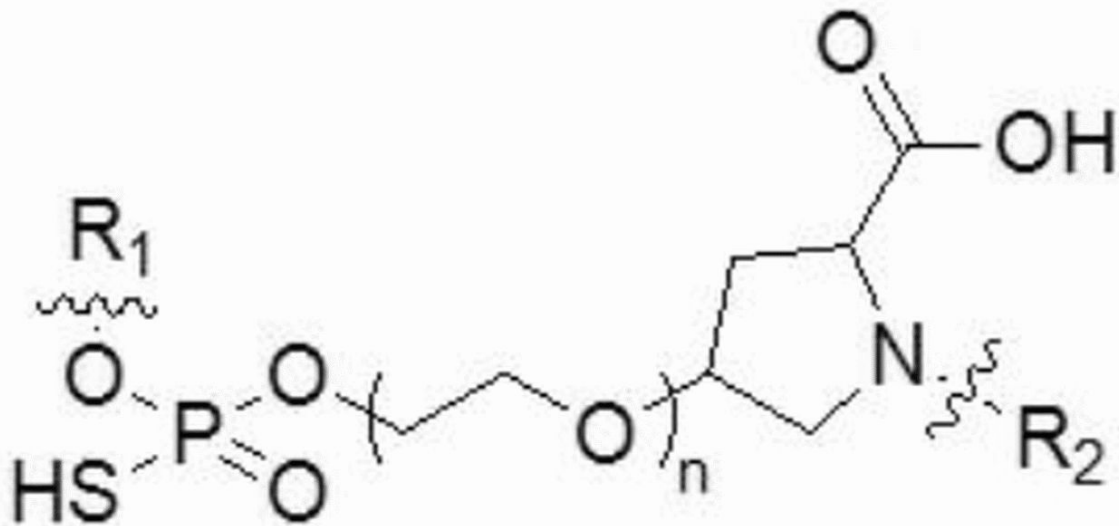
【0217】

一実施形態では、本発明は、例えばヒドロキシプロリンに基づいて、立体配座的に制限されたリンカーを提供する。

40

50

【化 3 5】



$R_1$  = オリゴヌクレオチド

$R_2$  = コンジュゲートした脂質基

(式中、 $n$ は、好ましくは1～8の整数である)。一実施形態では、 $n$ は、2、3、4、5、6、7、または8の整数である。

【0218】

リンカーは、例えば、チオホスフェート基を介して、オリゴヌクレオチドの5'および/または7'末端OH基に結合することができる。一実施形態では、リンカーは、例えばチオホスフェート基を介して、オリゴヌクレオチドの5'末端OH基に結合している。一実施形態では、リンカーは、例えばチオホスフェート基を介して、オリゴヌクレオチドの7'末端OH基に結合している。リンカーをオリゴヌクレオチドに結合するために使用することができる追加の基には、ホスフェート基が含まれる。

【0219】

いくつかの実施形態では、脂肪酸コンジュゲートホスホルアミダイトは、脂肪酸を5'末端、7'末端のいずれか、または5'末端および7'末端の両方でabc-DNAに結合するために使用され得る。脂肪酸のabc-DNAへの結合に使用することができるホスホルアミダイトの例は、以下の構造を有し、

10

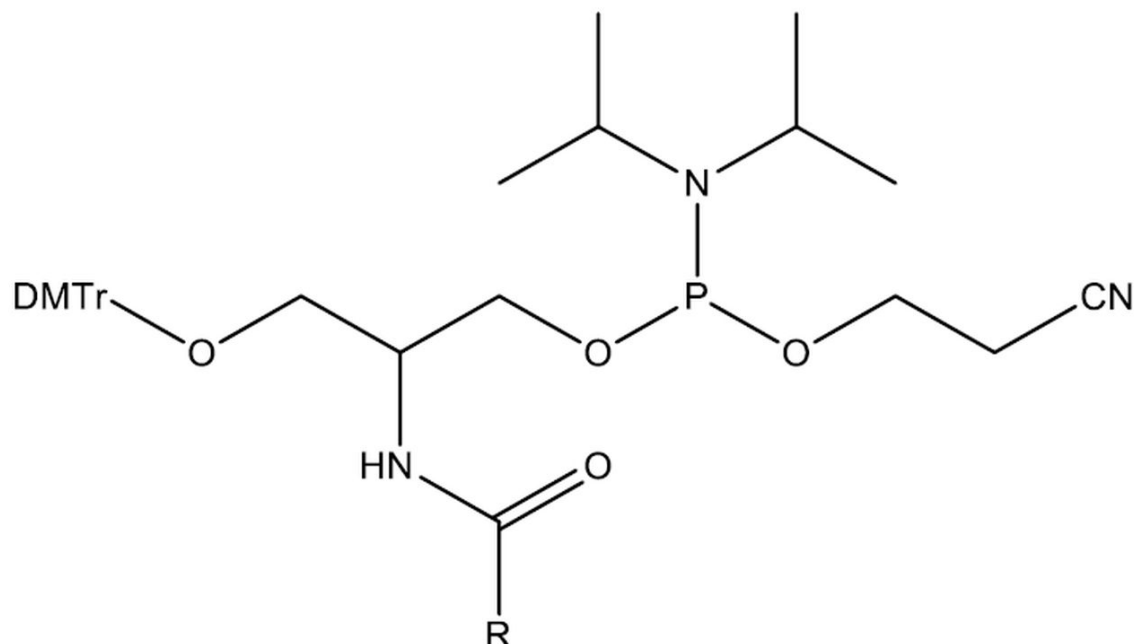
20

30

40

50

【化 3 6】



10

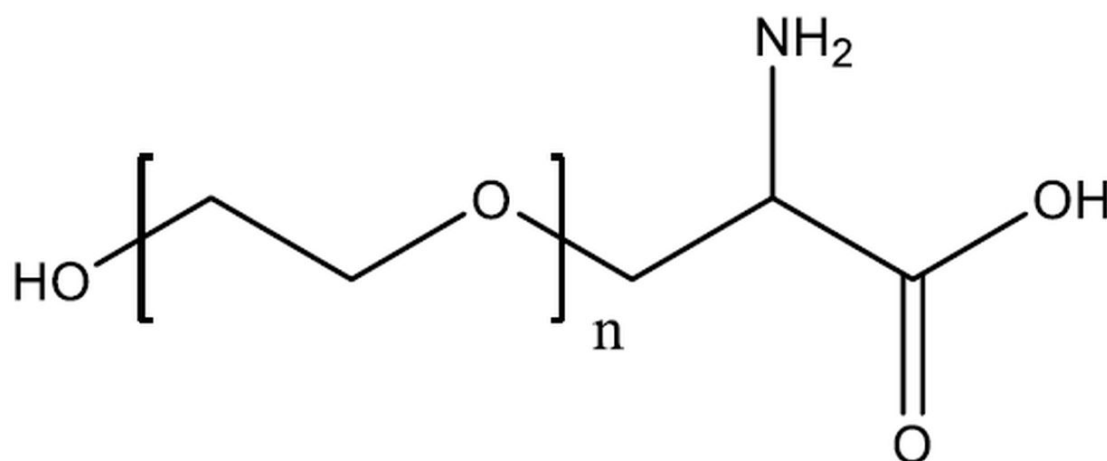
式中、 $R-CO$ は、脂肪酸部分である。

20

【0220】

他の実施形態では、リンカーは、例えば、以下の構造を有するアルファ-カルボキシレート-アミノリンカーである：

【化 3 7】



30

(式中、 $n$ は、好ましくは1～8の整数である)。一実施形態では、 $n$ は、2、3、4、5、6、7、または8の整数である。

40

【0221】

最も簡単な形態では、リンカーは、 $n=1$ である、2-アミノ-6-ヒドロキシ-4-オキサヘキサン酸リンカーである。あるいは、C2における立体化学がセリンのものと同じである上記の構造を有するリンカーは、O-(2-ヒドロキシエチル)-L-セリンリンカーである。abcDNA脂肪酸コンジュゲートの関連では、リンカーのヒドロキシル機能は、ホスホロチオエート結合を介してabcDNAに結合され、アミノ基は、アミド結合を介して脂肪酸部分のカルボキシル基に結合される。

【0222】

別の実施形態では、脂肪酸コンジュゲート $\alpha$ -カルボキシレート-アミノ-PEGホス

50

【化 3 8】



20

他の実施形態では、脂肪酸の a b c - DNA への結合に使用し得るホスホルアミダイトは、以下の構造を有し (A M C h e m i c a l s、L L C、カリフォルニア州オーシャンサイド)、

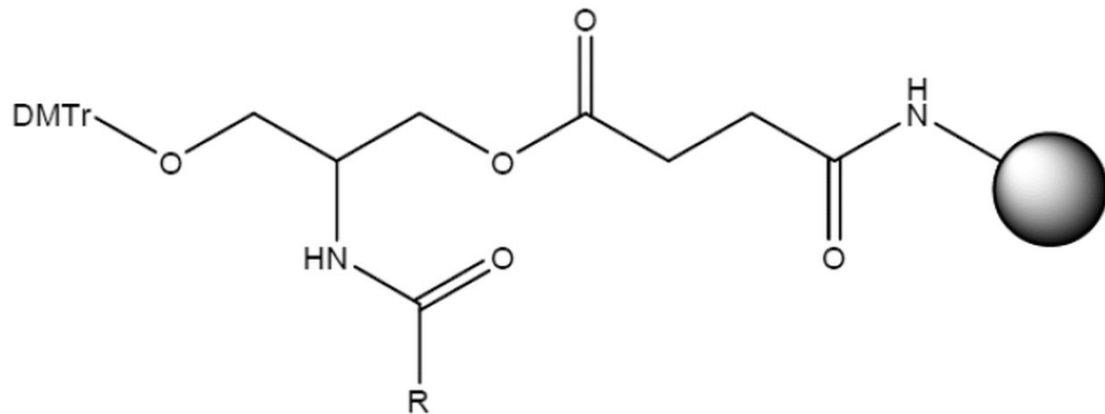
【化 3 9】



【 0 2 2 4 】

40

【化 4 0】



10

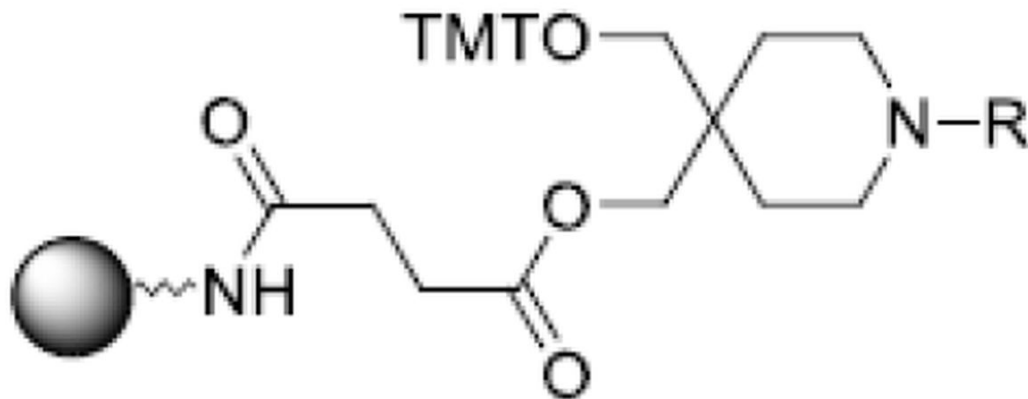
式中、 $R-CO$ は、脂肪酸部分であり、影付きの円は、固相支持体である。

【0225】

他の実施形態では、脂肪酸の $abc-DNA$ への結合に使用することができる固相支持体は、以下の構造を有し（AM Chemicals、LLC、カリフォルニア州オーシャンサイド）、

20

【化 4 1】



30

式中、 $R$ は、脂肪酸部分であり、影付きの円は、固相支持体である。

【0226】

特定の実施形態では、リンカーは、切断可能な結合、例えば、ジスルフィド結合、酸切断可能なヒドラゾン結合、またはプロテアーゼ切断可能な部分を含む。

【0227】

40

合成方法

当該技術分野で周知の合成方法を使用して、 $abc-DNA$ ヌクレオシドおよび $abc-DNA$ ヌクレオシドを含むオリゴヌクレオチドを合成する。いくつかの実施形態では、5'末端で脂質基にコンジュゲートされたオリゴヌクレオチドについて、本発明のリンカーは、オリゴヌクレオチドの合成および付加の前に、固体支持体に付加される。特定の実施形態では、脂質基がオリゴヌクレオチドの7'末端にコンジュゲートしているオリゴヌクレオチドの場合、コンジュゲーションは、固相合成中に起こる。他の実施形態では、脂質基がオリゴヌクレオチドの7'末端にコンジュゲートしているオリゴヌクレオチドの場合、コンジュゲーションは、合成が完了した後に起こる。

【0228】

50

### 一般的な手順

すべての反応は、乾燥したガラス器具中およびアルゴンの不活性雰囲気下で行われる。反応のための無水溶媒は、活性アルミナを通して濾過するか、またはモレキュラーシーブ（4 Å）で保存することにより得る。カラムクロマトグラフィー（CC）は、シリカゲル（Silica Flash P60、40～63 μm、60 Å）で行う。CCに使用されるメタノールは、HPLCグレードであり、CCに使用される他のすべての溶媒は、テクニカルグレードであり、使用前に蒸留される。薄層クロマトグラフィーは、シリカゲルプレート（Macherey-Nagel、プレコートしたTLCプレートsilG-25UV254）上で行う。化合物は、UV光の下で、またはp-アニスアルデヒド染色溶液〔p-アニスアルデヒド（3.7 mL）、氷酢酸（3.7 mL）、濃硫酸（5 mL）、エタノール（135 mL）〕に浸し、続いてヒートガンで加熱することにより、視覚化する。NMRスペクトルは、CDCl<sub>3</sub>またはCD<sub>3</sub>OD、CD<sub>3</sub>CN中、300または400 MHz（<sup>1</sup>H）、75または101 MHz（<sup>13</sup>C）、および122 MHz（<sup>31</sup>P）で記録される。化学シフト（δ）は、未処理の溶媒ピーク〔CDCl<sub>3</sub>：7.26 ppm（<sup>1</sup>H）, 77.16 ppm（<sup>13</sup>C）；CD<sub>3</sub>OD：3.31 ppm（<sup>1</sup>H）, 49.00 ppm（<sup>13</sup>C）〕に対して報告される。シグナルの帰属は、APTおよびDEPTならびに<sup>1</sup>H、<sup>1</sup>H、および<sup>1</sup>H、<sup>13</sup>C相関実験（COSYの、HSQC、HMBC）に基づく。高分解能質量データは、ポジティブモードでのエレクトロスプレーイオン化（イオントラップ、ESI<sup>+</sup>）によって得られる。

### 【0229】

#### 融解温度

UV融解実験は、Varian Cary Bio 100UV/vis分光光度計で記録される。実験は、2 μMの2つの濃度である10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0 M～150 mM NaCl（アルファアノマー）または0.05 M～1.00 M NaCl（ベータアノマー）、および7.0に調整したpHで行う。メチルポリシロキサンのカバー層によって、試料を蒸発から保護する。吸光度を260 nmでモニターする。すべての実験において、0.5 °C/分の温度勾配で3回の冷却-加熱サイクルを行う。曲線一次導関数の最大値は、Varian WinUVソフトウェアで導き出され、T<sub>m</sub>値は、6つのランプ（ramp）の平均として報告される。

### 【0230】

#### 円二色性分光法

CDスペクトルは、Jasco PFO-350S温度コントローラーを備えたJasco J-715分光偏光計で記録される。試料条件は、UV融解実験と同じである。スペクトルは50 nm/分の速度で210～320 nmで記録され、温度は試料から直接測定される。各実験について、試料と同じ塩濃度を含むブランクが記録される。報告されたスペクトルは、3回のスキャンの平滑化された平均を取り、対応するブランクスペクトルを差し引くことによって得られる。

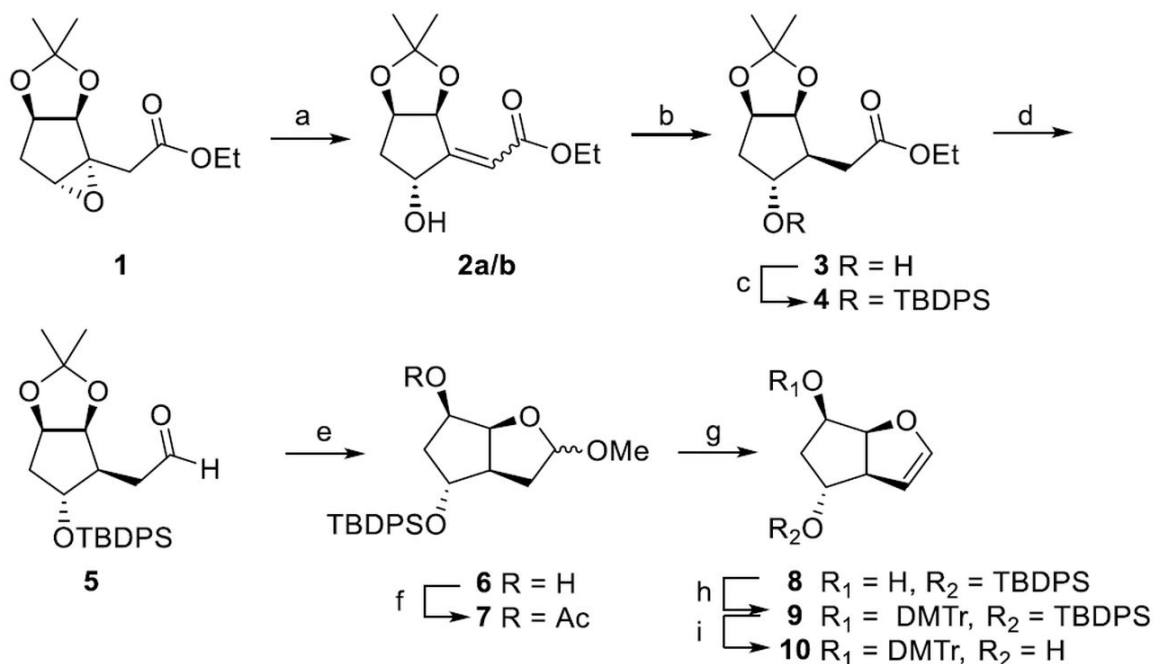
### 【0231】

#### abcDNAヌクレオシドの合成

後のヌクレオシド合成のために企図される二環式足場7および10を前述の中間体1から構築する（Tarkoy, M.; Bollim.; Schweizer, B.; Leumann, C. Helv. Chim. Acta 1993, 76, 481）（スキーム1）。1におけるエポキシド環を-78 °CにおいてLiHMDS媒介の分子内脱離によって効率的に開環し、不飽和エステル2が良好な収率で生成される。その後の2のニッケル触媒によるNaBH<sub>4</sub>還元が、二環式コア構造の凸側から立体特異的に進み、エステル3が唯一同定可能であるジアステレオ異性体としてもたらされる。3におけるヒドロキシル官能基をTBDPSで保護し、4を定量的収率で得る。その結果、中間体4が-78 °CにおいてDIBALで還元され、アルデヒド5になる。次いで、5のアセトニド保護基を、触媒としてのIn(OTf)<sub>3</sub>を用いて（Golden, K. C.; Gregg, B. T.; Quinn, J. F. Tetrahedron Lett. 2010, 51, 4010

)、穏やかな条件下で、MeCNおよびH<sub>2</sub>Oの混合物中で加水分解し、溶媒を単にMeOHに変えることによって、得られた二環式ヘミアセタールをメチルグリコシド6に変換する。次いで、化合物6をアセチル化して、保護された前駆体7を生成し、これをVorbrogen化学による対応するプリンヌクレオシドの合成に使用する。

【化42】



スキーム1：(a) LiHMDS、THF、 $-78^{\circ}\text{C}$ 、2時間、74%、(b) NaBH<sub>4</sub>、NiCl<sub>2</sub>・EtOH、 $0^{\circ}\text{C}$ →室温、2時間、90%、(c) TBDPSCl、I<sub>2</sub>、N-メチルイミダゾール、THF、室温、3時間、定量的、(d) DiBAL-H、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>、 $-78^{\circ}\text{C}$ 、90分間、89%、(e) i) In(OTf)<sub>3</sub>、MeCN/H<sub>2</sub>O、室温、48時間、ii) MeOH、6時間、81%、(f) Ac<sub>2</sub>O、DMAP、DCM、室温、2時間、96%、(g) i) TMSOTf、2,6-ルチジン、DCM、室温、60分間、ii) TBAF、THF、 $0^{\circ}\text{C}$ 、20分間、92%、(h) DMTr-Cl、AgOTf、DCM/ルチジン、室温、4時間、93%、(i) TBAF、THF、室温、20時間、定量的。

【0232】

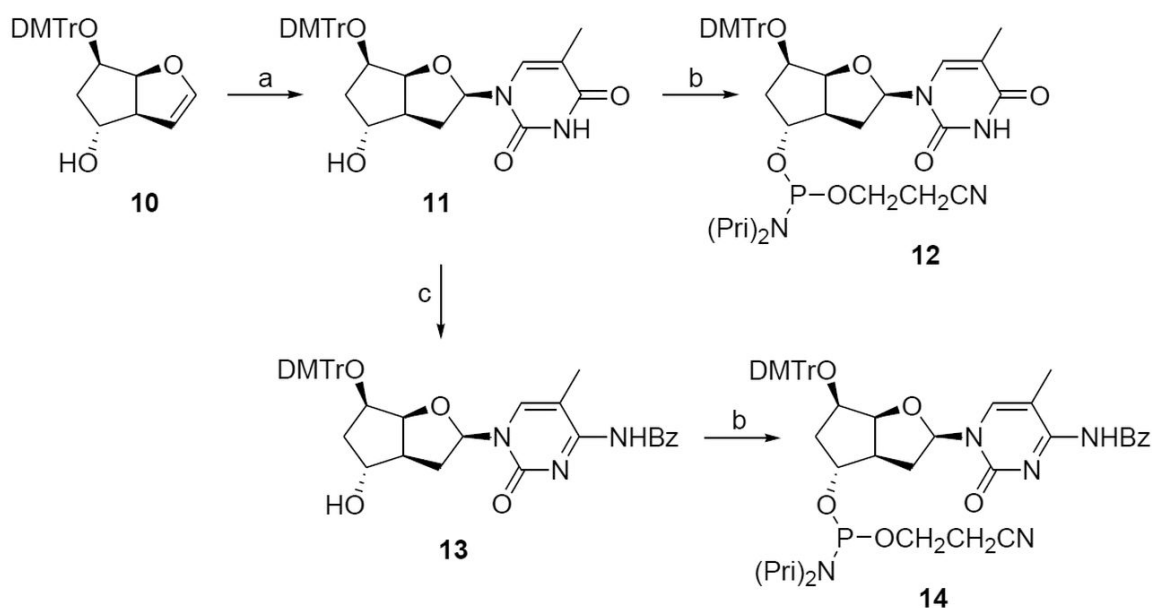
本発明のピリミジンヌクレオシドの合成は、対応する二環式グリカルへの、核酸塩基のβ-立体選択的NIS誘導付加の十分に確立された適用からなる(Medvecky, M.; Istrate, A.; Leumann, C. J. J. Org. Chem. 2015, 80, 3556; Dugovic, B.; Leumann, C. J. Journal of Organic Chemistry 2014, 79, 1271; Lietard, J.; Leumann, C. J. J. Org. Chem. 2012, 77, 4566)。まず、チミン核酸塩基を導入するために、N-ヨードスクシンイミド(NIS)誘導ヌクレオシド化を、TMSOTfのみで処理することで6から簡単に得られる、グリカル8の直接前駆体(式中、R<sub>1</sub>=TMS)に対して行う。このアプローチにより、対応するβ-ヌクレオシドの立体選択的形成をもたらすが、標準的なクロマトグラフィー技術では分離されないままであったα-アノマーのうちの7%が著しく汚染される。グリカル10のように、R<sub>1</sub>において立体的嵩高さを増加させ、R<sub>2</sub>において立体的嵩高さを減少させることにより、β選択性を高め得ると考えられる。これは、C(4)における求電子性ヨウ素の最初のα攻撃に有利となるであろう。この目的のために、化合物6をTMSOTfでグリカル8に変換し、続いてTBAFで短時間処理して、新しく導入されたTMS基を選択的に除去する。次いで、中間体8をジメトキシトリチル化合物9に精緻化し、これをT

B A FによりT B D P S保護基の除去に最終的に供して、所望の糖成分10を得る。

【0233】

インサイチュのT M S保護グリカル10上のN I Sヌクレオシド化、続いてB u <sub>3</sub> S n Hによるヨウ化物物中間体のラジカル還元により、ほんの微量の (<sup>1</sup> H-NMRにより2%未満)のα-アノマーを含むD M T r保護チミジン誘導体11を良好な収率で得る(スキーム2)。2-シアノエチルN, N, N', N'-テトライソプロピルホスホルジアミダイトによる最終的なホスフィチル化により、チミジンホスホルアミダイトビルディングブロック12が生ずる。5-メチルシトシンヌクレオシドの合成を塩基性チミンの変換によって達成する。この目的のために、1, 2, 4-トリアゾールおよびP O C l <sub>3</sub>で処理することにより、ヌクレオシド11をT M Sで保護し、対応するトリアゾリドに変換される。このトリアゾリドをアンモニアおよび1, 4-ジオキサン混合物中でその後に処理することにより、対応する5-メチルシトシンヌクレオシドが生じ、これをB z <sub>2</sub> Oで直接保護して、3工程で88%の収率で13を得る。ホスホルアミダイト14を上記のホスフィチル化によって得る。

【化43】



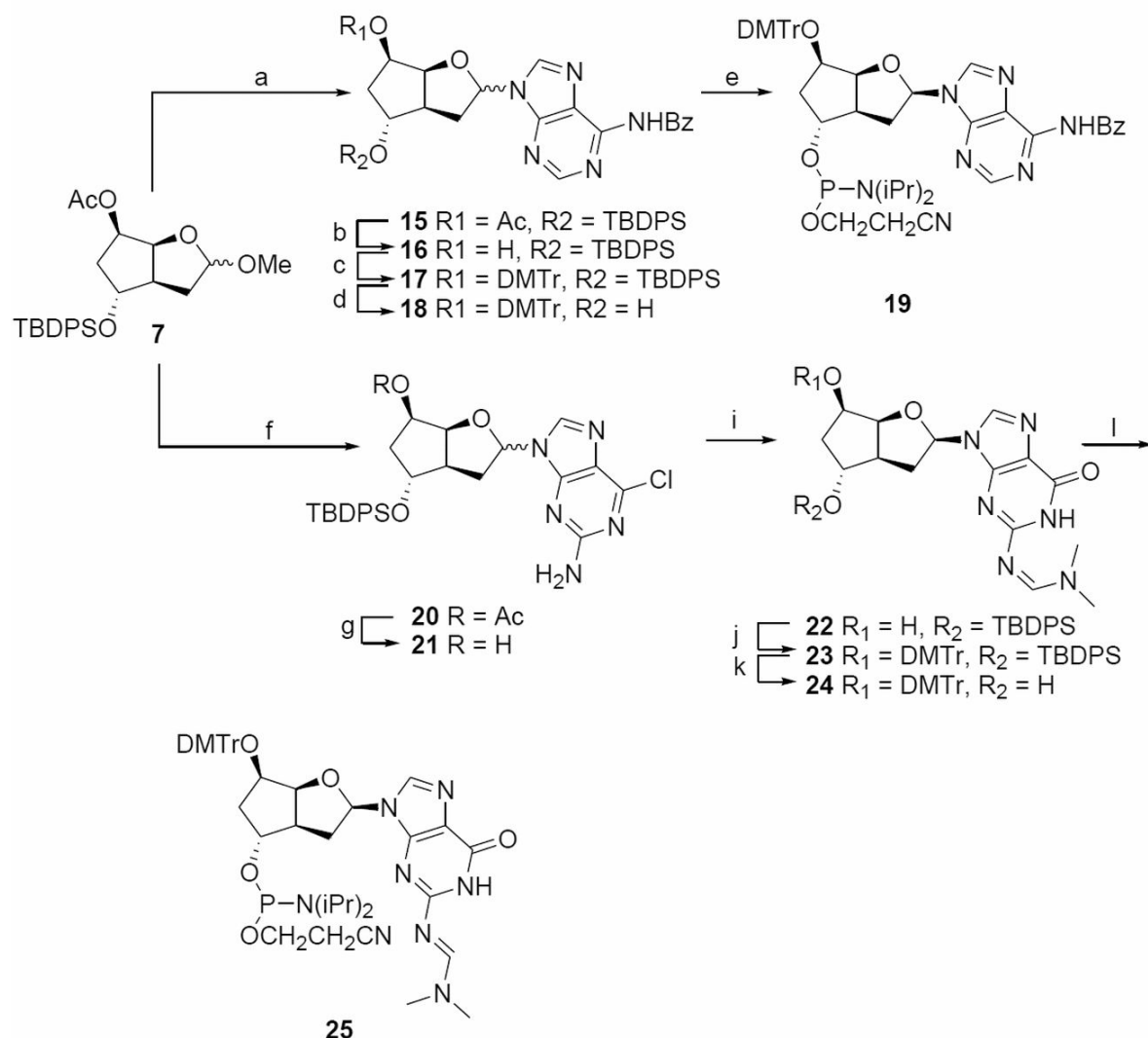
スキーム2: (a) i) チミン、B S A, N I S、D C M、室温、7時間、i i) B u <sub>3</sub> S n H、A I B N、トルエン、70℃、30分間、73%、(b) 2-シアノエチルN, N, N', N'-テトライソプロピルホスホルジアミダイト、E T T、D C M、室温、30分間、12について70%、14について75%、(c) i) B S A、トリアゾール、P O C l <sub>3</sub>、E t <sub>3</sub> N、C H <sub>3</sub> C N、室温、5時間、i i) 1, 4-ジオキサン/N H <sub>4</sub> O H、室温、2時間、i i i) B z <sub>2</sub> O、E t <sub>3</sub> N、D M F、室温、20時間、88%。

【0234】

プリン核酸塩基を導入するために古典的なV o r b r u g g e nヌクレオシド化を適用し、これにより、一般にα-ヌクレオシドが広く存在することとなる。前駆体7をN<sup>6</sup>-ベンゾイルアデニンまたは2-アミノ-6-クロロプリンいずれかで変換することにより、それぞれ、分離不可能なアノマー混合物15および20が4:1および7:3のα/β比で生じる(スキーム3)。脱アセチル化後にアノマーの分離が可能であり、純粋なβ-アノマー16および21が生ずる。ここから、標準的なジメトキシトリチル化(→17)、続いてシリル保護基のT B A F媒介開裂(→19)およびホスフィチル化によって、アデニンビルディングブロック19を得る。グアニンビルディングブロックの合成には、2-アミノ-6-クロロプリン核酸塩基の変換が必要である。これは、21を3-ヒドロキシプロピオニトリルおよびT B Dで処理し、その後に2-アミノ基をD M Fで保護することにより達成され、保護されたグアノシン誘導体22を得る。上記と同じ化学的経路に

従って、ジメトキシトリチル化(→23)、続いてシリル保護基の除去(→24)およびホスフィチル化によって、グアニンビルディングブロック25の合成を達成する。

【化44】



スキーム3：(a) N<sup>6</sup>-ベンゾイルアデニン、BSA、TMSOTf、MeCN、70℃、20分間、64%、(b) NaOH、THF/MeOH/H<sub>2</sub>O、0℃、20分間、69%、(c) DMTr-Cl、ピリジン、室温、24時間、87%、(d) TBAF、THF、室温、48時間、87%、(e) CEP-Cl、DIPEA、THF、室温、2時間、71%、(f) 2-アミノ-6-クロロプリン、BSA、TMSOTf、MeCN、55℃、50分間、77%、(g) NaOH、THF/MeOH/H<sub>2</sub>O、0℃、20分間、85%、(i) i) TBD、3-ヒドロキシプロピオニトリル、DCM、48時間、ii) N,N-ジメチルホルムアミドジメチルアセタール、DMF、55℃、2時間、73%、(j) DMTr-Cl、ピリジン、室温、18時間、70%、(k) TBAF、THF、室温、7時間、87%、(l) 2-シアノエチルN,N,N',N'-テトライソプロピルホスホルジアミダイト、ETT、DCM、室温、50分間、69%。

【0235】

保護された糖7から出発して、本発明の4つの好ましいホスホルジアミダイトビルディングブロックの合成を開発する。糖7およびインサイチュのシリル化チミンの混合物をTMSOTfで処理することにより、約85:15の好ましいアノマー比α/β(<sup>1</sup>H-NMRにより決定)を有するヌクレオシド35が速やかに形成される(スキーム4)。5'位置にDMTr基を有するチミジンホスホルジアミダイトを生ずる化学的経路によって、標準的なク

10

20

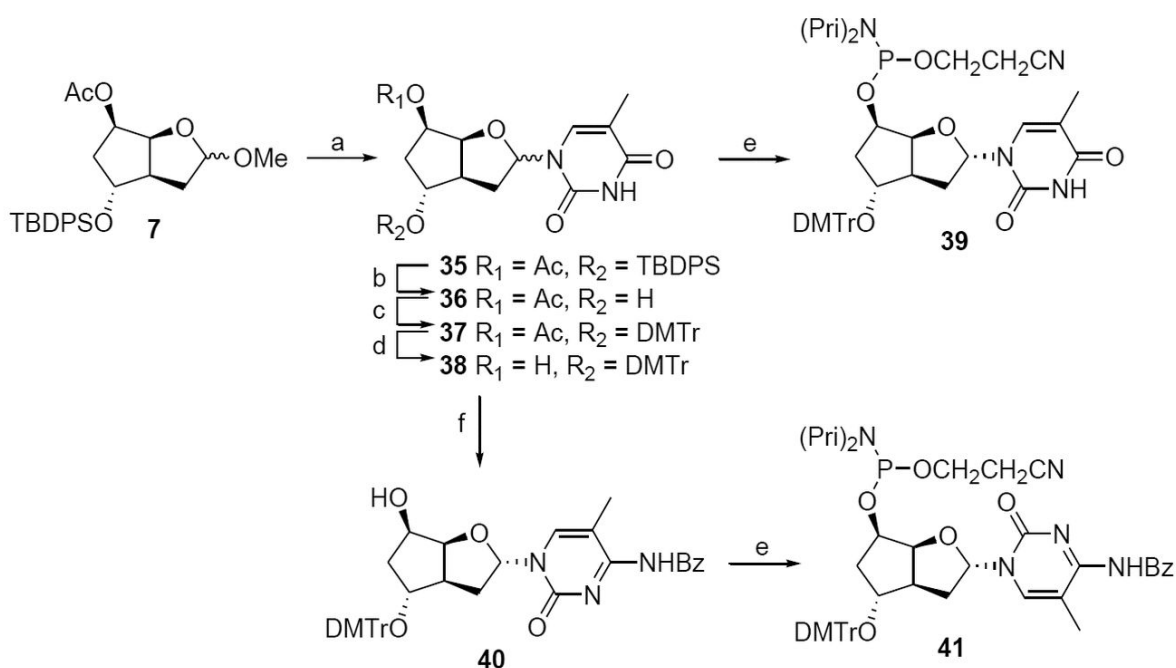
30

40

50

ロマトグラフィーによりアノマーを分離することはできない。したがって、極性の反転による修飾をDNA鎖に導入するために、DMTr基を7'位に導入する。この目的のために、TBAFでの短時間の処理(→36)、続いて標準的なジメトキシトリチル化(→37)によって、35のシリル基を除去する。標準的な脱アセチル化の後、2つのアノマーの分離が可能となり、純粋な $\alpha$ -アノマー38が生ずる。5-(エチルチオ)-1H-テトラゾールの存在下での2-シアノエチルN,N,N',N'-テトライソプロピルホスホルジアミダイトによるホスフィチル化によって、チミジンビルディングブロック39を最終的に得る。中間体38はまた、インサイチュのTMS保護ヌクレオシド38を、POCl<sub>3</sub>および1,2,4-トリアゾールを用いて、対応するトリアゾリドに変換し、続いてアンモニアおよび1,4-ジオキサンの混合物で処理することにより、5-メチルシチシンヌクレオシドへの短いアクセスを提供する。DMF中のBz<sub>2</sub>Oによる直接的な保護により、ヌクレオシド40が効率的に形成され、不安定なシリル保護基はプロセス中に切断される。上記の条件下での最終的なリン酸化により、5-メチルシチジンホスホルアミダイト41が得られる。

【化45】



スキーム4：(a) チミン、BSA、TMSOTf、MeCN、室温、18時間、82%、(b) TBAF、THF、2時間、75%、(c) DMTr-Cl、ピリジン、室温、24時間、96%、(d) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、MeOH、3時間、86%、(e) 2-シアノエチルN,N,N',N'-テトライソプロピルホスホルジアミダイト、ETT、DCM、室温、1時間、39について81%、30分間、41について80%、f) i) BSA、1,2,4-トリアゾール、POCl<sub>3</sub>、Et<sub>3</sub>N、MeCN、室温、7時間、ii) 1,4-ジオキサン/NH<sub>4</sub>OH、室温、3時間、iii) Bz<sub>2</sub>O、Et<sub>3</sub>N、DMF、室温、18時間、83%。

【0236】

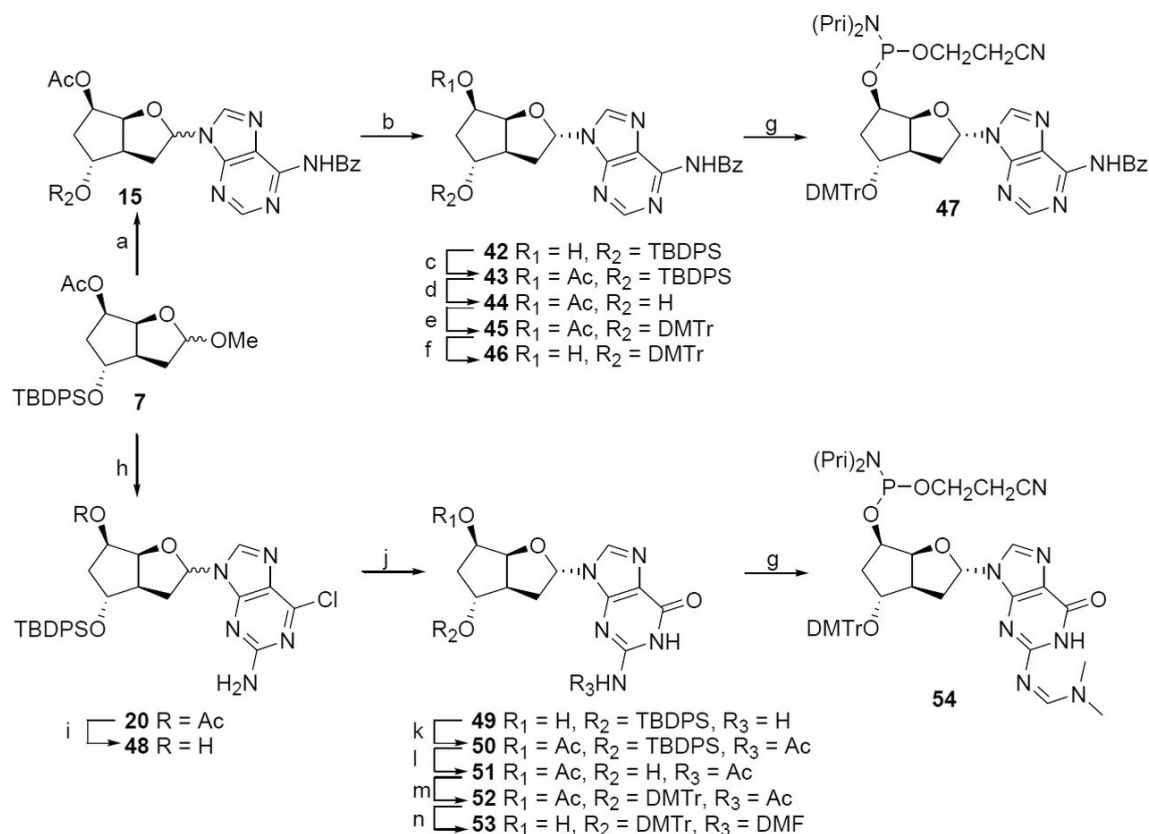
プリン核酸塩基の場合、プリンの導入は、N<sup>6</sup>-ベンゾイルアデニンまたは2-アミノ-6-クロロプリンのいずれかを用いた、わずかに高温における短いヌクレオシド化によって行い、それぞれ、4:1および7:3の $\alpha/\beta$ 比のヌクレオシド15および20が生ずる(スキーム5)。アノマーを分離するために、穏やかな条件下でアセチル基を除去し、純粋な $\alpha$ -アノマー42および48を得る。アデノシンビルディングブロックの形成を、アセチル保護基の再導入(→43)、TBAFによるTBDPS保護基の除去(→44)、続いて標準的なジメトキシトリチル化(→45)を用いて継続する。アセチル基の選

択的脱保護(→46)、続いて上記の条件下でのリン酸化により、アデニンビルディングブロック47が得られる。

【0237】

グアニンビルディングブロックの場合、2つのアノマーを分離した後、TBDおよび3-ヒドロキシプロピオニトリルで処理することにより、6-クロロプリンをグアニン核酸塩基に変換し、グアノシンヌクレオシド49を得る。48時間にわたるアセチル化により、5'-ヒドロキシ基および2-アミノ基の同時保護が可能であり、保護されたヌクレオシド50が得られる。上記と同様に、TBAFによるシリル保護基の除去(→51)、続いてジメトキシトリチル化(→52)によって、DMTr基を導入する。2つのアセチル基を $K_2CO_3$ で処理することにより除去し、得られた極性生成物をDMFで直接保護し、グアノシンヌクレオシド53を得る。最終的なリン酸化により、ビルディングブロック54を得た。

【化46】



スキーム5：a) N<sup>6</sup>-ベンゾイルアデニン、BSA、TMSOTf、MeCN、70℃、20分、64%、(b) NaOH、THF/MeOH/H<sub>2</sub>O、0℃、20分、51% α-アノマー、18% β-アノマー、(c) Ac<sub>2</sub>O、DMAP、DCM、室温、18時間、90%、(d) TBAF、THF、室温、3.5時間、90%、(e) DMTr-Cl、ピリジン、室温、24時間、89%、(f) NaOH、THF/MeOH/H<sub>2</sub>O、0℃、30分、94%、(g) 2-シアノエチルN,N,N',N'-テトライソプロピルホスホルジアミド、ETT、DCM、室温、1時間、47について77%、50分、54について67%、(h) 2-アミノ-6-クロロプリン、BSA、TMSOTf、MeCN、55℃、50分、77%、(i) NaOH、THF/MeOH/H<sub>2</sub>O、0℃、20分、85%、(j) TBD、3-ヒドロキシプロピオニトリル、DCM、48時間、87% (k) Ac<sub>2</sub>O、DMAP、DCM、室温、48時間、76%、(l) TBAF、THF、室温、4時間、87%、(m) DMTr-Cl、ピリジン、室温、48時間、99%、(n) i) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、MeOH、室温、7時間、ii) N,N-ジメチルホルムアミドジメチルアセタール、DMF、55℃、2時間、77%。

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 167.91 (C (1)), 167.43 (C (6')), 120.13 (C (2)), 111.75 (C (3')), 81.62

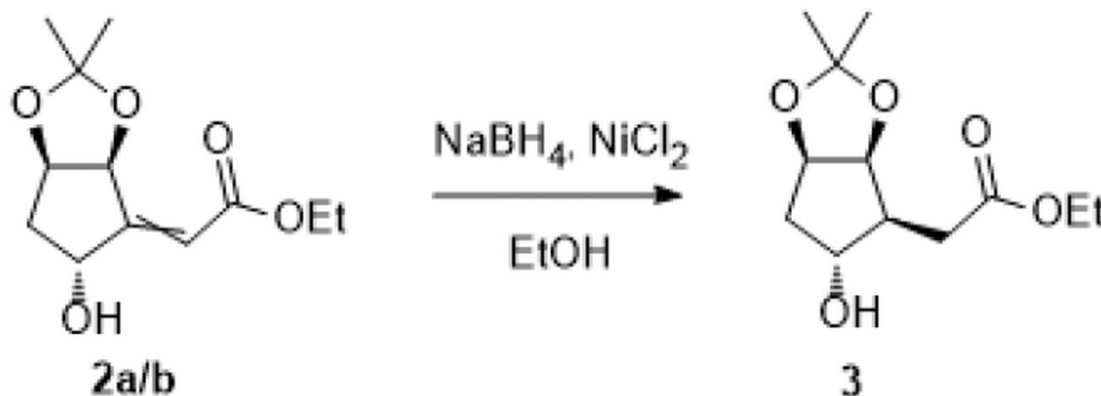
(C (5'))、78.08 (C (1'))、70.85 (C (7'))、61.25 (CH<sub>3</sub>)、36.53 (C (8'))、27.38、25.45 ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C)、14.19 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)。

C<sub>12</sub>H<sub>19</sub>O<sub>5</sub> ([M+H]<sup>+</sup>) についてのESI+-HRMS m/z 計算値 243.1227、実測値 243.1227。

【0240】

エチル (1'R, 5'S, 6'S, 7'R) - (7'-ヒドロキシ-3', 3'-ジメチル-2', 4'-ジオキサビシクロ [3.3.0] オクト-6'-イル) アセテート (3)

【化48】



EtOH (300 mL) 中のアルコール 2a/b (12.65 g、52.2 mmol) および塩化ニッケル六水和物 (2.48 g、10.4 mmol) の溶液に、水素化ホウ素ナトリウム (9.88 g、261 mmol) を 0℃ で少しずつ添加する。得られた暗色の溶液を 0℃ で 30 分間、室温で 90 分間攪拌する。次いで、EtOH を減圧下で注意深く除去し、得られた固体を EtOAc (200 mL) で希釈し、過剰の NaBH<sub>4</sub> を 0℃ で水 (100 mL) を添加してクエンチし、続いて室温で 30 分間攪拌する。次いで、2つの相を分離する。有機相を水 (100 mL) で洗浄する。次いで、水相を合わせ、濾過し、EtOAc (2×100 mL) で抽出する。合わせた有機相を MgSO<sub>4</sub> で乾燥し、濾過し、濃縮する。粗生成物を CC (EtOAc/ヘキサン 2:1) により精製して、3 (11.4 g、90%) を白色固体として得る。

【0241】

3 のデータ: R<sub>f</sub> = 0.40 (EtOAc/ヘキサン 1:1) :

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 4.65–4.52 (m, 2H, H-C (1')), 4.15 (qd, J = 7.1, 1.4 Hz, 2H, C<sub>3</sub>HCH<sub>2</sub>), 4.05 (ddd, J = 10.0, 9.99, 6.2 Hz, 1H, H-C (7')), 2.86 (br, s, 1H, OH), 2.65 (qd, J = 16.9, 7.1 Hz, 2H, H-C (2)), 2.24 (dd, J = 13.7, 6.2 Hz, 1H, H-C (8')), 1.93 (dt, J = 12.7, 7.1 Hz, 1H, H-C (6')), 1.56 (ddd, J = 13.9, 10.2, 5.5 Hz, 1H, H-C (8')), 1.38 (s, 3H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C), 1.30~1.21 (m, 6H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)。

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 174.38 (C (1)), 109.06 (C (3')), 79.65 (C (5')), 77.19 (C (1')), 74.32 (C (7')), 60.80 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 46.66 (C (6')), 40.38 (C (8')), 32.43 (C (2)), 26.00, 23.69 ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C), 14.17 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)。

C<sub>12</sub>H<sub>21</sub>O<sub>5</sub> ([M+H]<sup>+</sup>) についてのESI+-HRMS m/z 計算値 24

【 0 2 4 2 】

【化 4 9】



20

**【 0 2 4 3 】**

30

40

**【 0 2 4 4 】**

50

【化 5 0】



20

5 のデータ：  $R_f = 0.65$  (EtOAc / ヘキサン 2 : 1) :

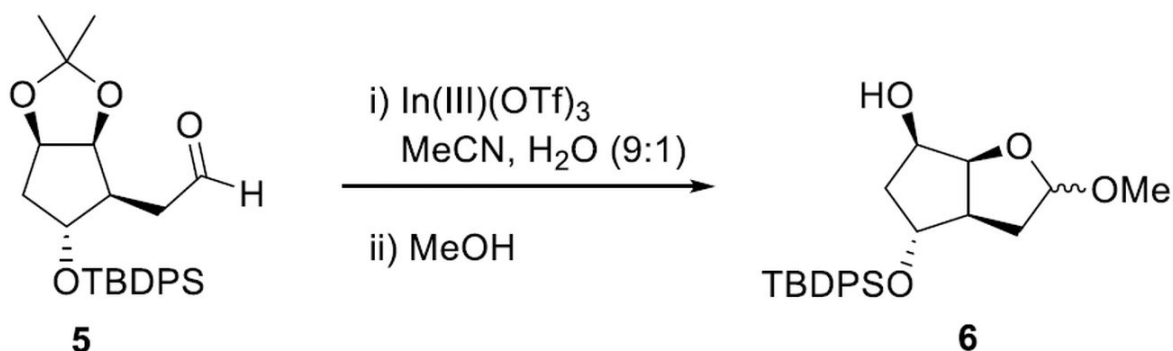
30

40

40

(3aR, 4R, 6R, 6aS) - 4 - (tert-ブチルジフェニルシリル) オキシ  
- 2 - メトキシヘキサヒドロ - 2H - シクロペンタ [b] フラン - 6 - オール (6)

## 【化51】



10

MeCN (170 mL) および H<sub>2</sub>O (19 mL) 中のアルデヒド 5 (13.73 g、31.31 mmol) の溶液に、トリフルオロメタンスルホン酸インジウム (III) (703 mg、1.25 mmol) を添加する。溶液をさらに 48 時間攪拌し、次いで溶媒を減圧下で除去し、トルエンと共蒸発させる。残渣を乾燥 MeOH に溶解し、6 時間攪拌する。溶媒を蒸発させた後、粗生成物を CC (EtOAc/ヘキサン 3:10) により精製して、アノマー比 α/β

## 【化52】

≈

20

4:1 の 6 (10.50 g、81%) の混合物を無色の油状物として得る。

## 【0247】

6 のデータ: R<sub>f</sub> = 0.53 (EtOAc/ヘキサン 1:1):

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.63 (dd, J = 7.1, 0.6 Hz, 4H, H-arom), 7.46–7.34 (m, 6H, H-arom), 4.98 (d, J = 4.8 Hz, 0.8H, H-C(2)), 4.91 (dd, J = 5.9, 1.3 Hz, 0.2H, H-C(2)), 4.63–4.54 (m, 1H, H-C(6a)), 4.53–4.37 (m, 1H, H-C(6)), 4.09 (m, 0.2H, H-C(4)), 3.92 (br, 0.8H, H-C(4)), 3.29, 3.27 (2s, 3H, MeO), 2.79 (dd, J = 17.0, 8.2 Hz, 0.8H, H-C(3a)), 2.64–2.51 (m, 0.2H, H-C(3a)), 2.29 (d, J = 8.1 Hz, 1H, OH), 2.10–1.80 (m, 2.4H, H-C(3), H-C(5)), 1.65 (ddd, J = 13.2, 9.1, 4.4 Hz, 0.8H, H-C(5)), 1.44–1.34 (m, 0.2H, H-C(3)), 1.22 (ddd, J = 13.2, 8.1, 4.9 Hz, 0.8H, H-C(3)), 1.05 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-Si).

30

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 135.78, 135.74 (CH-arom), 133.96, 133.84 (C-arom), 129.78, 127.72 (CH-arom), 107.21, 106.50 (C(2)), 85.37, 81.76 (C(6a)), 78.11, 77.19 (C(4)), 73.03, 72.44 (C(6)), 55.30, 54.46 (MeO), 50.91, 49.67 (C(3a)), 41.13, 40.29 (C(3)), 38.16, 37.98 (C(5)), 26.96, 26.92 (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-Si, 19.07 (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-Si.

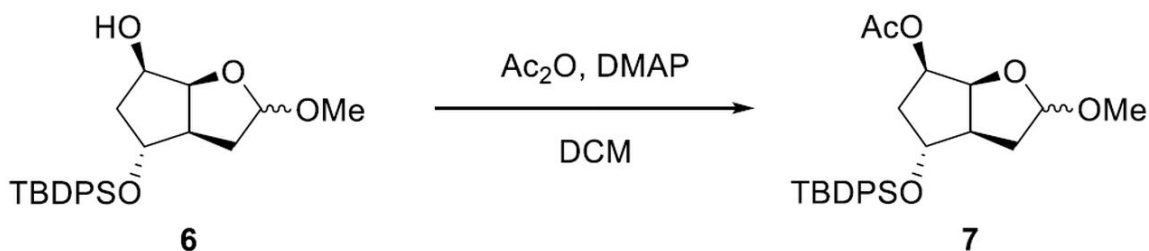
40

C<sub>26</sub>H<sub>35</sub>O<sub>4</sub>Si ([M+H]<sup>+</sup>) についての ESI<sup>+</sup>-HRMS m/z 計算値 435.1962、実測値 435.1950。

## 【0248】

(3aR, 4R, 6R, 6aS) - 4 - ((tert-ブチルジフェニルシリル)オキシ) - 2 - メトキシヘキサヒドロ - 2H - シクロペンタ [b] フラン - 6 - イルアセテート (7)

50

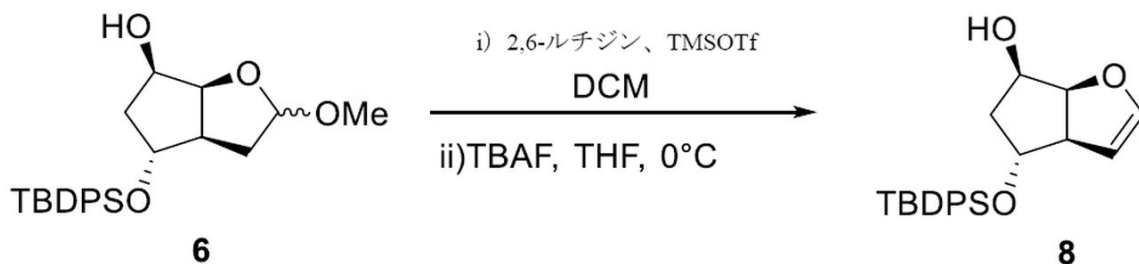


22

(3 a R, 4 R, 6 R, 6 a S) - 4 - ( ( t e r t - ブチルジフェニルシリル) オキシ

) - 3a, 5, 6, 6a-テトラヒドロ-4H-シクロペンタ [b] フラン-6-オール (8)

【化55】



10

乾燥DCM (35 mL) 中の糖6 (2.08 g、5.04 mmol) の溶液に、2,6-ルチジン (2.95 mL、25.2 mmol) を0°Cで添加する。0°Cで20分間撹拌した後、TMSOTf (2.73 mL、15.1 mmol) を滴下して加え、次いで、溶液を室温に温め、さらに60分間撹拌する。次いで、飽和NaHCO<sub>3</sub> (40 mL) を添加することにより反応物をクエンチする。有機相を分離し、水相をさらにDCM (3×30 mL) で抽出する。合わせた有機相をMgSO<sub>4</sub>で乾燥し、濾過し、蒸発させる。

【0251】

得られた生成物を乾燥THF (35 mL) に溶解し、0°Cに冷却し、TBAF (THF中1 M、5.6 mL、5.6 mmol) を添加する。溶液を10分間撹拌し、次いで飽和NaHCO<sub>3</sub> (30 mL) で希釈し、DCM (4×40 mL) で抽出する。合わせた有機相をMgSO<sub>4</sub>で乾燥し、濾過し、蒸発させる。粗生成物をCC (EtOAc/ヘキサン1:4) によって精製して、グリカル8 (1.76 g、92%) を得る。

20

【0252】

8のデータ: R<sub>f</sub> = 0.49 (EtOAc/ヘキサン1:2):  
<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.66 (m, 4H, H-arom)、7.42 (m, 6H, H-arom)、6.22 (t, J = 2.1 Hz, 1H, H-C(2))、4.91 (dd, J = 8.2, 5.3 Hz, 1H, H-C(3))、4.70 (dt, J = 11.1, 5.6 Hz, 1H, H-C(6))、4.56 (t, J = 2.8 Hz, 1H, H-C(6a))、3.97 (d, J = 4.0 Hz, 1H, H-C(4))、3.24 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H-C(3a))、2.30 (br, 1H, OH)、2.03 (dd, J = 12.6, 5.4 Hz, 1H, H-C(5))、1.51 (ddd, J = 12.7, 11.2, 4.2 Hz, 1H, H-C(5))、1.08 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-Si)。  
<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 146.24 (C(2))、135.72、135.69 (CH-arom)、134.03、133.74 (C-arom)、129.80、129.78、127.73 (CH-arom)、101.84 (C(3))、84.59 (C(6a))、76.79 (C(4))、74.10 (C(6))、55.56 (C(3a))、39.38 (C(5))、26.93 (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-Si、19.08 (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-Si)。

30

C<sub>23</sub>H<sub>29</sub>O<sub>3</sub>Si ([M+H]<sup>+</sup>) についてのESI<sup>+</sup>-HRMS m/z 計算値381.1880、実測値381.1893。

40

【0253】

((3aR, 4R, 6R, 6aS) - 6 - (ビス(4-メトキシフェニル) (フェニル)メトキシ) - 3a, 5, 6, 6a-テトラヒドロ-4H-シクロペンタ [b] フラン-4-イル) オキシ) (tert-ブチル) ジフェニルシラン (9)

50

## 【化 5 6】



10

乾燥 DCM (15 mL) および乾燥 2, 6-ルチジン (15 mL) の混合物中のグリカル 8 (1.34 g、3.52 mmol) および DMTr-Cl (1.43 g、4.23 mmol) の溶液に、銀トリフラート (1.13 g、4.40 mmol) を少しずつ添加し、濃赤色の懸濁液となる。室温で 2 時間攪拌した後、DMTr-Cl の追加の部分 (239 mg、0.705 mmol) を添加する。懸濁液をさらに 2 時間攪拌し、次いで濾過する。有機相を飽和 NaHCO<sub>3</sub> (100 mL) で洗浄し、水相を DCM (3×30 mL) で抽出する。合わせた有機相を MgSO<sub>4</sub> で乾燥し、濾過し、蒸発させる。粗生成物を CC (EtOAc/ヘキサン 1:7+0.5% Et<sub>3</sub>N) によって精製して、保護された

20

## 【0254】

9 のデータ: R<sub>f</sub> = 0.59 (EtOAc/ヘキサン 1:2):

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.76 (d, J = 7.4 Hz, 2H, H-arom), 7.69–7.60 (m, J = 9.3, 5.9, 4.6 Hz, 8H, H-arom), 7.56–7.39 (m, 8H, H-arom), 7.33 (t, J = 7.3 Hz, 1H, H-arom), 7.00–6.93 (m, 4H, H-arom), 6.47–6.37 (m, 1H, H-C(2)), 4.67–4.58 (m, 1H, H-C(6)), 4.58–4.50 (m, 2H, H-C(3), H-C(6a)), 3.86, 3.85 (2s, 6H, MeO), 3.82 (d, J = 4.0 Hz, 1H, H-C(4)), 3.08 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H-C(3a)), 1.67 (td, J = 12.4, 4.2 Hz, 1H, H-C(5)), 1.28 (dd, J = 12.7, 5.4 Hz, 1H, H-C(5)), 1.11 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-Si).

30

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 158.67 (MeO-C-arom), 147.61 (C(2)), 146.26, 137.36, 137.21 (C-arom), 135.81, 135.78 (CH-arom), 134.17, 134.04 (C-arom), 130.48, 129.83, 129.81, 128.37, 127.98, 127.76, 127.73, 126.79, 113.32, 113.28 (CH-arom), 100.29 (C(3)), 86.96 (C(Ph)<sub>3</sub>), 84.95 (C(6a)), 76.17 (C(6)), 76.07 (C(4)), 55.26 (MeO-DMTr), 55.11 (C(3a)), 37.32 (C(5)), 27.04 (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-Si, 19.21 (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-Si).

40

C<sub>44</sub>H<sub>46</sub>O<sub>5</sub>NaSi ([M+Na]<sup>+</sup>) についての ESI<sup>+</sup>-HRMS m/z 計算値 705.3007、実測値 705.3021。

## 【0255】

(3aS, 4R, 6R, 6aS) - 6 - (ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ) - 3a, 5, 6, 6a-テトラヒドロ-4H-シクロペンタ [b] フラン-4-オール (10)

50

10



30

40

$C_{30}H_{27}O_5$  ( $[M+H]^+$ ) についてのESI+-HRMS  $m/z$  計算値 467.1853、実測値 467.1844。

(3' S, 5' R, 7' R) - 1 - {2', 3' - ジデオキシ - 3', 5' - エタノ - 7' - ヒドロキシ - 5' - O - [(4, 4' - ジメトキシトリフェニル) メチル] - β - D - リボフラノシル} チミン (11)



. 64 (C (2'))、12.58 (Me-C (5)).

C<sub>33</sub>H<sub>34</sub>O<sub>7</sub>N<sub>2</sub>Na ([M+Na]<sup>+</sup>) についてのESI<sup>+</sup>-HRMS m/z 計算値593.2258、実測値593.2250。

【0260】

(3'R, 5'R, 7'R)-1-{7'-O-[(2-シアノエトキシ)-ジイソプロピルアミノホスファニル]-2', 3'-ジデオキシ-3', 5'-エタノ-5'-O-[(4, 4'-ジメトキシトリフェニル)メチル]-β-D-リボフラノシル} チミン (12)

【化59】



乾燥DCM (10mL) 中のヌクレオシド11 (232mg、0.406mmol) および5-(エチルチオ)-1H-テトラゾール (90mg、0.69mmol) の溶液に、2-シアノエチルN, N, N', N'-テトライソプロピルホスホルジアミダイト (0.26mL、0.81mmol) を室温で滴下して添加する。30分間攪拌した後、反応混合物をDCM (50mL) で希釈し、飽和NaHCO<sub>3</sub> (2X30mL) および飽和NaCl (30mL) で洗浄する。水相を合わせ、DCM (50mL) で抽出する。合わせた有機相をMgSO<sub>4</sub>で乾燥し、濾過し、蒸発させる。粗生成物をCC (DCM中1.8% MeOH、+0.5% Et<sub>3</sub>N) によって精製して、12 (219mg、2つの異性体の混合物、70%) を白色フォームとして得る。

【0261】

11のデータ：R<sub>f</sub>=0.68 (DCM中6%MeOH)：

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.93 (br, 1H, H-N (3))、7.85 (d, J=1.2 Hz, 1H, H-C (6))、7.65-7.52 (m, 2H, H-arom)、7.52-7.40 (m, 4H, H-arom)、7.40-7.21 (m, 3H, H-arom)、6.96-6.81 (m, 4H, H-arom)、6.00、5.94 (2dd, J=8.3、5.2 Hz, 1H, H-C (1'))、4.29-4.17 (m, 1H, H-C (5'))、4.12-3.89 (m, 2H, H-C (4'))、H-C (7'))、3.85、3.84 (2s, 6H, MeO)、3.81-3.63 (m, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN)、3.56-3.41 (m, 2H, (Me<sub>2</sub>CH)<sub>2</sub>N)、2.88-2.69 (m, 2H, H-C (3'))、H-C (2'))、2.61、2.56 (dt, J=12.9、6.3 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN)、1.92、1.82 (2d, J=0.8 Hz, 3H, Me-C (5))、1.75-1.56 (m, 1H, H-C (6'))、1.52-1.36 (m, 2H, H-C (6'))、H-C (2'))、1.22-1.01 (m, 12H, (Me<sub>2</sub>CH)<sub>2</sub>N)。

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 163.86 (C (4))、158.66、158.64 (MeO-C-arom)、150.29、150.27 (C (2))、145.58、145.52、136.76、136.71、136.69、136.60 (C-arom)、135.49、135.35 (C (6))、130.21、130.16、128.17、128.13、127.88、126.91、126.89 (CH-arom)、117.49 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN)、113.18 (CH-arom)、110.74 (C (5))、87.27、87.25 (C (Ph)<sub>3</sub>)、86.58、86.45 (C (1'))、81.79、81.68 (C (4'))、76.02、75.50 (J<sub>C, P</sub>=16.5、15.7 Hz, C (7'))、74.22 (C (5'))、58.26、58.06、57.87 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN)、55.26、55.

$^2\text{H}$  (MeO-DMTr)、48.85、48.62 ( $J_{\text{C}}, p=2.6, 5.0 \text{ Hz}$ , C(3'))、43.10、43.04 ( $J_{\text{C}}, p=12.3, 12.4 \text{ Hz}$  ( $\text{Me}_2\text{CH}$ ) $_2\text{N}$ )、37.78 ( $J_{\text{C}}, p=5.3 \text{ Hz}$  C(6'))、37.62、37.48 (C(2'))、37.41 ( $J_{\text{C}}, p=3.6 \text{ Hz}$  C(6'))、24.57、24.53、24.50、24.46、24.44、24.39、24.37 ( $\text{Me}_2\text{CH}$ ) $_2\text{N}$ )、20.35、20.25 ( $J_{\text{C}}, p=7.1, 7.0 \text{ Hz}$ ,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$ )、12.58、12.41 (7s, Me-C(5))。

$^{31}\text{P}$  NMR (122 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  147.32、146.98。

$\text{C}_{42}\text{H}_{52}\text{O}_8\text{N}_4\text{P}$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) についてのESI $^+$ -HRMS  $m/z$  計算値 771.3517、実測値 771.3512。

【0262】

(3'S, 5'R, 7'R)  $^4\text{H}$ ベンゾイル-1- {2', 3'-ジデオキシ-3', 5'-エタノ-7'-ヒドロキシ-5'-O- [(4,4'-ジメトキシトリフェニル)メチル] - $\beta$ -D-リボフラノシル} -5-メチルシトシン (13)

【化60】



11

13

乾燥MeCN (5 mL) 中のヌクレオシド11 (302 mg、0.530 mmol) の溶液に、BSA (0.31 mL、1.27 mmol) を0℃で滴下して添加し、次いで、溶液を室温で一晩攪拌する。別のフラスコ中で、乾燥MeCN (50 mL) 中の1, 2, 4-トリアゾール (1.28 g、18.55 mmol) の懸濁液を0℃に冷却し、 $\text{POCl}_3$  (0.40 mL、4.2 mmol) および $\text{Et}_3\text{N}$  (2.96 mL、21.2 mmol) を添加する。懸濁液を0℃で30分間攪拌し、次いで、事前に調製したシリル化合物11の溶液を懸濁液に添加し、混合物をさらに室温で5時間攪拌する。飽和 $\text{NaHCO}_3$  (10 mL) を添加することにより反応物をクエンチし、MeCNを減圧下で除去し、得られた混合物を飽和 $\text{NaHCO}_3$  (35 mL) で希釈し、DCM (3×40 mL) で抽出する。合わせた有機相を $\text{MgSO}_4$ で乾燥し、濾過し、蒸発させる。

【0263】

次いで、粗生成物を1, 4-ジオキサン (10 mL) および濃 $\text{NH}_4\text{OH}$  (10 mL) の混合物に溶解する。室温で2時間攪拌した後、混合物を真空中で体積の半分に減少させ、飽和 $\text{NaHCO}_3$  (30 mL) で希釈し、DCM (4×30 mL) で抽出する。合わせた有機相を $\text{MgSO}_4$ で乾燥し、濾過し、蒸発させる。

【0264】

次いで、粗生成物を乾燥DMF (13 mL) に溶解し、 $\text{Et}_3\text{N}$  (90  $\mu\text{L}$ 、0.64 mmol)、続いて $\text{Bz}_2\text{O}$  (300 mg、1.33 mmol) を室温で添加し、溶液を一晩攪拌する。飽和 $\text{NaHCO}_3$  (50 mL) を注意深く添加することにより、得られた褐色溶液をクエンチし、DCM (4×50 mL) で抽出する。合わせた有機相を $\text{MgSO}_4$ で乾燥し、濾過し、蒸発させる。粗生成物をCC (ヘキサン/ $\text{EtOAc}$  1:2、+ 0.5%  $\text{Et}_3\text{N}$ ) によって精製して、13 (315 mg、88%) を白色フォームとして得る。

【0265】

13のデータ： $R_f=0.57$  (DCM中4% MeOH)：

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  13.39 (br, 1H, NH)、8.46–8.26 (m, 2H, H-arom)、8.13 (d,  $J=0.5 \text{ Hz}$ , 1H、

10

20

30

40

50

C (6))、7.61 (d、J=7.3 Hz、2H、H-arom)、7.58-7.43 (m、7H、H-arom)、7.34 (t、J=7.4 Hz、2H、H-arom)、7.30-7.23 (m、1H、H-arom)、6.89 (d、J=8.8 Hz、4H、H-arom)、5.96 (dd、J=7.5、5.8 Hz、1H、H-C (1'))、4.38-4.25 (m、1H、H-C (5'))、4.22-4.12 (m、1H、H-C (4'))、3.90 (d、J=3.6 Hz、1H、H-C (7'))、3.83 (s、6H、MeO)、2.82 (ddd、J=13.3、10.2、5.7 Hz、1H、H-C (2'))、2.66 (dd、J=17.0、8.1 Hz、1H、H-C (3'))、2.08 (s、3H、Me-C (5))、1.77 (br、1H、OH)、1.71-1.57 (m、1H、H-C (6'))、1.49-1.36 (m、1H、H-C (2'))、1.21 (dd、J=13.7、6.2 Hz、1H、H-C (6'))。  
<sup>13</sup>C NMR (75 MHz、CDCl<sub>3</sub>) δ 179.56 (CONH)、160.01 (C (4))、158.70 (MeO-C-arom)、147.96 (C (2))、145.65 (C-arom)、137.26 (C (6))、136.99、136.83、136.71 (C-arom)、132.41、130.22、129.89、128.16、128.14、127.95、126.94、113.25 (CH-arom)、111.57 (C (5))、87.34 (C (Ph)<sub>3</sub>)、87.32 (C (1'))、82.57 (C (4'))、74.30 (C (5'))、74.16 (C (7'))、55.27 (MeO-DMTr)、49.56 (C (3'))、38.52 (C (6'))、38.00 (C (2'))、13.63 (Me-C (5))。

C<sub>40</sub>H<sub>40</sub>O<sub>7</sub>N<sub>3</sub> ([M+H]<sup>+</sup>) についてのESI+-HRMS m/z 計算値 74.2861、実測値 74.2862。

【0266】

(3'R, 5'R, 7'R) 4-Nベンゾイル-1-{7'-O-[(2-シアノエトキシ)-ジイソプロピルアミノホスファニル]-2', 3'-ジデオキシ-3', 5'-エタノ-5'-O-[(4,4'-ジメトキシトリフェニル)メチル]-β-D-リボフラノシル}-5-メチルシトシン (14)

【化61】



乾燥DCM (10 mL) 中のヌクレオシド13 (276 mg、0.409 mmol) および5-(エチルチオ)-1H-テトラゾール (69 mg、0.53 mmol) の溶液に、2-シアノエチルN,N,N',N'-テトライソプロピルホスホルジアミダイト (0.20 mL、0.61 mmol) を室温で滴下して添加する。60分間攪拌した後、反応混合物をDCM (50 mL) で希釈し、飽和NaHCO<sub>3</sub> (2 X 30 mL) および飽和NaCl (30 mL) で洗浄する。水相を合わせ、DCM (50 mL) で抽出する。合わせた有機相をMgSO<sub>4</sub>で乾燥し、濾過し、蒸発させる。粗生成物をCC (EtOAc/ヘキサン2:3、+0.5% Et<sub>3</sub>N) によって精製して、14 (268 mg、2つの異性体の混合物、75%) を白色フォームとして得る。

【0267】

14のデータ：R<sub>f</sub>=0.77 (DCM中5% MeOH)：

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz、CDCl<sub>3</sub>) δ 13.32 (s、1H、NH)、8.41-8.28 (m、2H、H-arom)、8.13-8.04 (m、1H、C (6))

10

20

30

30

30

30

30



50

飽和  $\text{NaHCO}_3$  (100 mL) を添加してクエンチし、 $\text{EtOAc}$  (4×50 mL) で抽出する。合わせた有機相を  $\text{MgSO}_4$  で乾燥し、濾過し、蒸発させる。粗生成物を  $\text{CC}$  ( $\text{DCM}$  中 2%  $\text{MeOH}$ ) によって精製して、アノマー比  $\alpha/\beta$  【化 63】

≈

4 : 1 の 15 (1.74 g、64%) の混合物を白色フォームとして得る。

【0269】

15 のデータ :  $R_f = 0.33$  ( $\text{EtOAc}/\text{ヘキサン} 4:1$ ) :

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.33 (br, 1H, NH)、8.68 (d,  $J = 5.4$  Hz, 0.8H, H-C(2))、8.64 (d,  $J = 5.6$  Hz、0.2H, H-C(2))、8.10 (d,  $J = 1.5$  Hz, 0.2H, H-C(8))、7.99 (d,  $J = 7.3$  Hz, 2H, H-arom)、7.95 (s, 0.8H, H-C(8))、7.63 (t,  $J = 8.7$  Hz, 4H, H-arom)、7.55 (dd,  $J = 13.0$ , 6.4 Hz, 1H, H-arom)、7.50–7.34 (m、8H, H-arom)、6.20 (dd,  $J = 6.3$ , 2.5 Hz, 0.8H, H-C(1'))、6.05 (t,  $J = 6.5$  Hz, 0.2H, H-C(1'))、5.43–5.32 (m, 1H, H-C(5'))、5.03–4.97 (m, 0.8H, H-C(4'))、4.83 (t,  $J = 6.0$  Hz, 0.2H, H-C(4'))、4.14 (br、0.2H, H-C(7'))、4.08 (d,  $J = 3.7$  Hz, 0.8H, H-C(7'))、3.02 (dd,  $J = 16.1$ , 6.6 Hz, 0.8H, H-C(3'))、2.83 (dd,  $J = 16.9$ , 7.7 Hz, 0.2H, H-C(3'))、2.59–2.39 (m, 1H, H-C(2'))、2.18–2.11 (m, 1H, H-C(6'))、2.07 (d,  $J = 1.6$  Hz, 2.4H,  $\text{MeCO}_2$ )、2.02 (d,  $J = 1.9$  Hz, 0.6H,  $\text{MeCO}_2$ )、2.01–1.92 (m, 1H, H-C(6'))、1.91–1.80 (m, 1H, H-C(3'))、1.07 (s, 9H,  $(\text{CH}_3)_3\text{-C-Si}$ )。 10

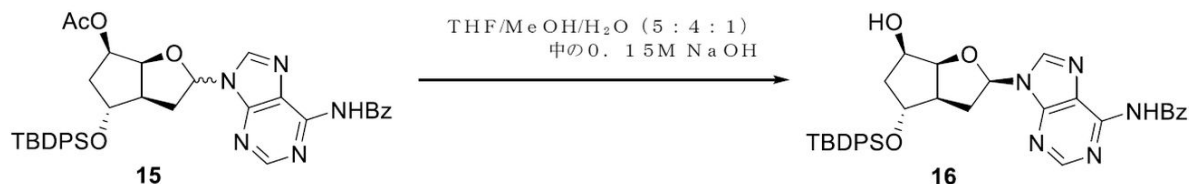
$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  170.57、170.49 ( $\text{MeCO}_2$ )、164.82 (CONH)、152.50 (C(2))、151.27 (C(4))、149.56 (C(6))、141.37、141.06 (C(8))、135.72、135.68、135.66 (CH-arom)、133.67、133.57、133.24、133.22 (C-arom)、132.73、130.03、129.98、128.80、128.78、127.92、127.86、127.85 (CH-arom)、123.61 (C(5))、87.19、86.17 (C(1'))、83.22、80.96 (C(4'))、76.50、76.04 (C(7'))、74.38 (C(5'))、51.07 (C(3'))、37.29、37.15、36.80、36.60 (C(2'))、C(6'))、26.89 ( $(\text{CH}_3)_3\text{-C-Si}$ )、20.97、20.90 ( $\text{MeCO}_2$ )、19.01 ( $(\text{CH}_3)_3\text{-C-Si}$ )。 30

$\text{C}_{37}\text{H}_{40}\text{O}_5\text{N}_5\text{Si}$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) についての  $\text{ESI}^+ \text{--HRMS}$   $m/z$  計算値 662.2793、実測値 662.2787。 40

【0270】

(3'R, 5'R, 7'R)  $\beta$ -Nベンゾイル-9- $\{7' \text{--}[(\text{tert-ブチルジフェニルシリル})\text{オキシ}]-2', 3' \text{--ジデオキシ}-3', 5' \text{--エタノ-}\beta\text{-D-リボフラノシル}\}$  アデニン (16) :

## 【化 6 4】



ヌクレオシド15 (1.74 g、2.64 mmol) を THF / MeOH / H<sub>2</sub>O (5 : 4 : 1、80 mL) 中の 0.15 M NaOH に 0℃ で溶解する。反応物を 20 分間攪拌し、NH<sub>4</sub>Cl (1.06 g) を添加することによりクエンチする。次いで、溶媒を減圧下で除去し、生成物を CCl<sub>4</sub> (DCM 中 5% イソプロパノール) によって精製して、16 (287 mg、18%) およびその対応する α アノマー (836 mg、51%) の白色フォームを得る。

## 【0271】

16 のデータ : R<sub>f</sub> = 0.44 (DCM 中 6% MeOH) :

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz、CDCl<sub>3</sub>) δ 8.70 (s、1H、H-C(2))、8.09–7.98 (m、2H、H-arom)、7.97 (s、1H、H-C(8))、7.63 (ddd、J = 7.4、5.7、1.5 Hz、4H、H-arom)、7.59–7.55 (m、1H、H-arom)、7.51 (m、2H、H-arom)、7.44–7.33 (m、6H、H-arom)、6.02 (dd、J = 9.4、5.5 Hz、1H、H-C(1'))、4.57 (dd、J = 8.1、5.0 Hz、1H、H-C(4'))、4.43 (dd、J = 11.8、5.3 Hz、1H、H-C(5'))、4.26 (br、1H、H-C(7'))、2.78 (q、J = 8.9 Hz、1H、H-C(3'))、2.32–1.80 (m、5H、H-C(2')、H-C(6')、OH)、1.06 (s、9H、(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-Si)。

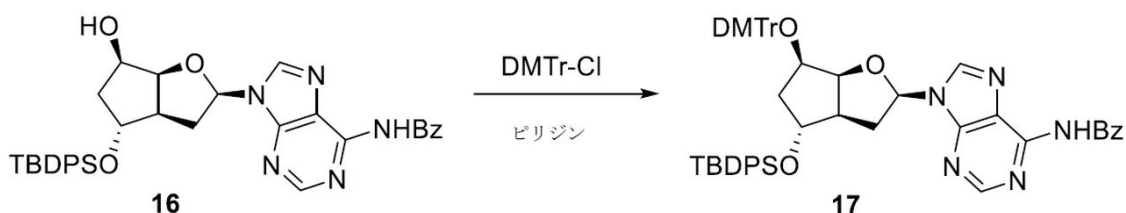
<sup>13</sup>C NMR (101 MHz、CDCl<sub>3</sub>) δ 164.85 (CONH)、152.56 (C(2))、151.17 (C(4))、149.86 (C(6))、141.25 (C(8))、135.68 (CH-arom)、133.87、133.39 (C-arom)、132.78、129.92、128.78、128.01、127.78 (CH-arom)、123.51 (C(5))、87.65 (C(1'))、82.91 (C(4'))、76.66 (C(7'))、72.54 (C(5'))、50.44 (C(3'))、41.42 (C(6'))、36.17 (C(2'))、26.89 (CH<sub>3</sub>-C-Si)、19.03 (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-Si)。

C<sub>35</sub>H<sub>38</sub>O<sub>4</sub>N<sub>5</sub>Si ([M+H]<sup>+</sup>) についての ESI<sup>+</sup>-HRMS m/z 計算値 620.2688、実測値 620.2671。

## 【0272】

(3' R, 5' R, 7' R) 6-Nベンゾイル-9-{7'-[(tert-ブチルジフェニルシリル)オキシ]-2', 3'-ジデオキシ-3', 5'-エタノ-5'-O-[(4, 4'-ジメトキシトリフェニル)メチル]-β-D-リボフラノシル} アデニン (17)

## 【化 6 5】



乾燥ピリジン (6 mL) 中のヌクレオシド16 (307 mg、0.495 mmol) の溶液に、DMTr-Cl (503 mg、1.49 mmol) を室温で添加する。溶液を 1

日間攪拌し、次いで飽和  $\text{NaHCO}_3$  (50 mL) で希釈し、DCM (3×70 mL) で抽出する。合わせた有機相を  $\text{MgSO}_4$  で乾燥し、濾過し、蒸発させる。粗生成物を CC (DCM 中 1.5% MeOH、+0.5%  $\text{Et}_3\text{N}$ ) によって精製して、17 (395 mg、87%) を黄色フォームとして得る。

【0273】

17 のデータ:  $R_f = 0.65$  (DCM 中 5% MeOH) :

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz、MeOD)  $\delta$  8.64 (s、1H、H-C(2))、8.61 (s、1H、H-C(8))、8.08 (d、 $J=7.2$  Hz、2H、H-arom)、7.68–7.17 (m、22H、H-arom)、6.86–6.75 (m、4H、H-arom)、6.14 (dd、 $J=7.4$ 、6.3 Hz、1H、H-C(1'))、4.48–4.31 (m、1H、H-C(5'))、4.28–4.15 (m、1H、H-C(4'))、3.88 (d、 $J=3.8$  Hz、1H、H-C(7'))、3.75、3.74 (2s、6H、MeO)、2.67 (dd、 $J=16.6$ 、6.7 Hz、1H、H-C(3'))、2.47 (ddd、 $J=13.3$ 、10.2、6.1 Hz、1H、H-C(2'))、2.15–1.94 (m、1H、H-C(6'))、1.71 (ddd、 $J=13.0$ 、11.3、4.4 Hz、1H、H-C(2'))、1.11 (dd、 $J=12.2$ 、4.9 Hz、1H、H-C(6'))、0.95 (s、9H、 $(\text{CH}_3)_3\text{-C-Si}$ ) .

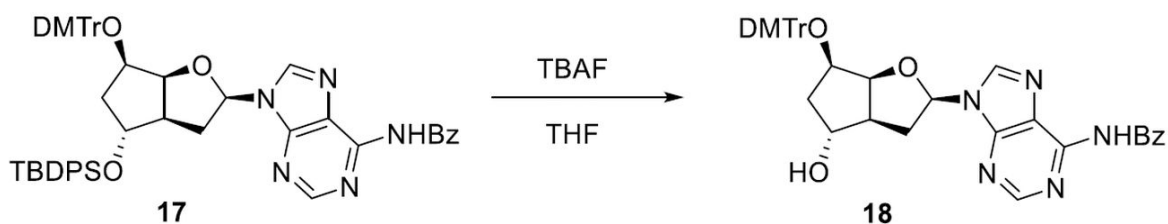
$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz、 $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  164.69 (CONH)、158.61、158.60 (MeO-C-arom)、152.42 (C(2))、151.27 (C(4))、149.41 (C(6))、145.81 (C-arom)、141.25 (C(8))、137.00、136.85 (C-arom)、135.60、135.57 (CH-arom)、133.80、133.69、133.43 (C-arom)、132.70、130.28、130.25、129.85、129.81、128.84、128.18、127.89、127.71、127.65、126.78 (CH-arom)、123.52 (C(5))、113.22、113.19 (CH-arom)、87.09 (C(Ph)<sub>3</sub>)、86.41 (C(1'))、83.52 (C(4'))、76.05 (C(7'))、74.78 (C(5'))、55.20 (MeO-DMTr)、50.43 (C(3'))、38.10 (C(2')、C(6'))、26.84 ( $(\text{CH}_3)_3\text{-C-Si}$ )、19.00 ( $(\text{CH}_3)_3\text{-C-Si}$ ) .

$\text{C}_{56}\text{H}_{56}\text{O}_6\text{N}_5\text{Si}$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) についての  $\text{ESI}^+ - \text{HRMS}$   $m/z$  計算値 922.3994、実測値 922.3953。

【0274】

(3'S, 5'R, 7'R)  $\text{N}$ -ベンゾイル-9-{2', 3'-ジデオキシ-3', 5'-エタノー-7'-ヒドロキシ-5'-O-[(4, 4'-ジメトキシトリフェニル)メチル]- $\beta$ -D-リボフラノシル} アデニン(18)

【化66】



乾燥 THF (9 mL) 中のヌクレオシド 17 (376 mg、0.408 mmol) の溶液に、TBAF (THF 中 1M、1.22 mL、1.22 mmol) を室温で添加する。溶液を 2 日間攪拌し、次いで飽和  $\text{NaHCO}_3$  (25 mL) で希釈し、DCM (4×25 mL) で抽出する。合わせた有機相を  $\text{MgSO}_4$  で乾燥し、濾過し、蒸発させる。粗生成物を CC (DCM 中 4% MeOH、+0.5%  $\text{Et}_3\text{N}$ ) によって精製して、18 (242 mg、87%) を白色フォームとして得る。

## 【0275】

18のデータ： $R_f=0.33$ （DCM中5%MeOH）：

$^1\text{H}$  NMR（300 MHz、 $\text{CD}_3\text{CN}$ ） $\delta$  9.35（br、1H、NH）、8.67（s、1H、C（2））、8.46（s、1H、C（8））、8.01（d、 $J=7.4$  Hz、2H、H-arom）、7.54（m、5H、H-arom）、7.35（m、4H、H-arom）、7.30–7.17（m、3H、H-arom）、6.84（d、 $J=8.9$  Hz、4H、H-arom）、6.09（dd、 $J=7.8$ 、6.2 Hz、1H、H-C（1'））、4.12（dt、 $J=11.2$ 、5.8 Hz、1H、C（5'））、3.87–3.79（m、2H、C（4'）、C（7'））、3.75（s、6H、MeO）、2.83–2.64（m、2H、C（2'）、OH）、2.58–2.46（m、1H、C（3'））、2.21（dd、 $J=13.9$ 、7.1 Hz、1H、C（2'））、1.92–1.82（m、1H、C（6'））、1.29–1.17（m、1H、C（6'））。

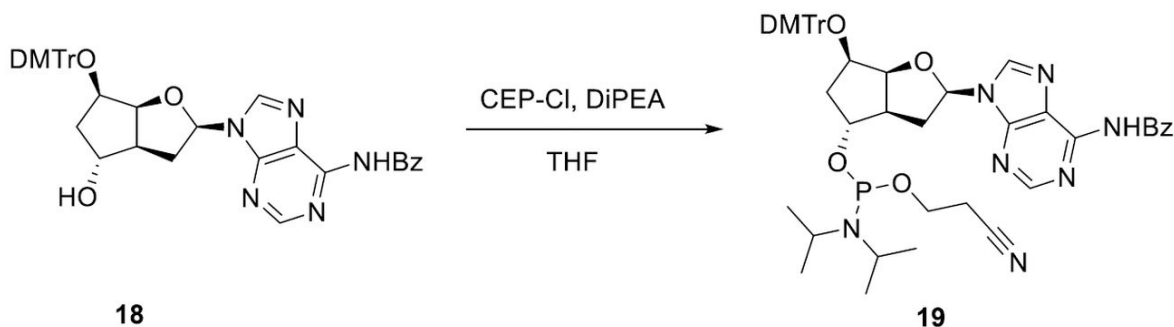
$^{13}\text{C}$  NMR（75 MHz、 $\text{CDCl}_3$ ） $\delta$  165.03（CONH）、158.57（MeO-C-arom）、152.40（C（2））、151.23（C（4））、149.52（C（6））、145.68（C-arom）、141.49（C（8））、136.86、136.84、133.77（C-arom）、132.77、130.22、128.81、128.16、128.02、127.89、126.84（CH-arom）、123.40（C（5））、113.19（CH-arom）、87.06（C（Ph）<sub>3</sub>）、86.74（C（1'））、83.58（C（4'））、74.62（C（5'））、74.38（C（8'））、55.25（MeO-DMTr）、49.77（C（3'））、38.55、38.32（C（6'）、C（2'））。

$\text{C}_{40}\text{H}_{38}\text{O}_6\text{N}_5$ （ $[\text{M}+\text{H}]^+$ ）についてのESI<sup>+</sup>-HRMS  $m/z$  計算値684.2817、実測値684.2830。

## 【0276】

（3'R, 5'R, 7'R） $\beta$ -Nベンゾイル-9-〔7'-O-〔（2-シアノエトキシ）-ジイソプロピルアミノホスファニル〕-2', 3'-ジデオキシ-3', 5'-エタノ-5'-O-〔（4, 4'-ジメトキシトリフェニル）メチル〕- $\beta$ -D-リボフラノシル} アデニン（19）

## 【化67】



乾燥THF（8mL）中のヌクレオシド18（173mg、0.253mmol）およびN,N-ジイソプロピルエチルアミン（0.18mL、1.0mmol）の溶液に、N,N-ジイソプロピルクロロホスホルアミダイト（0.11mL、0.50mmol）を室温で添加する。溶液を2時間攪拌し、次いで飽和 $\text{NaHCO}_3$ （40mL）で希釈し、DCM（4×40mL）で抽出する。合わせた有機相を $\text{MgSO}_4$ で乾燥し、濾過し、蒸発させる。粗生成物をCC（EtOAc、+0.5%Et<sub>3</sub>N）によって精製して、19（177mg、2つの異性体の混合物、71%）を白色フォームとして得る。

## 【0277】

19のデータ： $R_f=0.38$ 、0.44（EtOAc）：

$^1\text{H}$  NMR（400 MHz、 $\text{CDCl}_3$ ） $\delta$  9.05（br、1H、NH）、8.7

0、8.70 (2s, 1H, H-C (2))、8.47、8.46 (2s, 1H, H-C (8))、7.97 (d, J=7.5 Hz, 2H, H-arom)、7.57-7.50 (m, 1H, H-arom)、7.49-7.41 (m, 4H, H-arom)、7.39-7.31 (m, 4H, H-arom)、7.24-7.17 (m, 5.4 Hz, 2H, H-arom)、7.13 (dt, J=12.5, 6.2 Hz, 1H, H-arom)、6.83-6.70 (m, 4H, H-arom)、6.14-5.97 (m, 1H, H-C (1'))、4.14 (ddd, J=11.1, 7.8, 3.4 Hz, 1H, H-C (5'))、3.91-3.74 (m, 2H, H-(4'))、H-C (7'))、3.71、3.70 (2s, 6H, MeO)、3.65-3.50 (m, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN)、3.37 (ddq, J=13.9, 10.2, 6.8 Hz, 2H, (Me<sub>2</sub>CH)<sub>2</sub>N)、2.90-2.76 (m, 1H, H-C (2'))、2.75-2.60 (m, 1H, H-C (3'))、2.47、2.42 (2t, J=6.3 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN)、2.11 (dt, J=12.7, 6.1 Hz, 1H, H-C (2'))、1.73 (ddt, J=13.6, 10.4, 5.1 Hz, 1H, H-C (6'))、1.39 (ddd, J=50.2, 13.4, 6.2 Hz, 1H, H-C (6'))、1.10-0.89 (m, 12H, (Me<sub>2</sub>CH)<sub>2</sub>N)。

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 164.66 (CONH)、158.57 (MeO-C-arom)、152.46 (C (2))、151.32、151.26 (C (4))、149.45、149.43 (C (6))、145.60、145.59 (C-arom)、141.52、141.47 (C (8))、136.88、136.83、136.81、133.78 (C-arom)、132.75、132.73、130.22、130.21、130.19、130.17、128.87、128.17、127.87、126.82、126.80 (CH-arom)、123.59 (C (5))、117.53、117.50 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN)、113.17 (CH-arom)、87.10、87.07 (C (Ph)<sub>3</sub>)、86.72、86.68 (C (1'))、83.36、83.25 (C (4'))、76.55、75.81 (C (7'))、74.63、74.60 (C (5'))、58.24、57.86 (J<sub>C</sub>, p=19.1, 19.2 Hz OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN)、55.25、55.21 (MeO-DMTr)、49.29、49.08 (J<sub>C</sub>, p=2.6, 4.7 Hz, C (3'))、43.12、43.00 (J<sub>C</sub>, p=2.4, 2.3 Hz (Me<sub>2</sub>CH)<sub>2</sub>N)、38.27、38.23 (C (2'))、37.41、37.22 (J<sub>C</sub>, p=5.3, 3.5 Hz, C (6'))、24.56、24.53、24.49、24.47、24.43、24.41、24.36、24.33 (8s, Me<sub>2</sub>CH)<sub>2</sub>N)、20.36、20.25 (J<sub>C</sub>, p=7.2, 7.0 Hz, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN)。

<sup>31</sup>P NMR (122 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 147.64、146.87。

C<sub>49</sub>H<sub>55</sub>O<sub>7</sub>N<sub>7</sub> ([M+H]<sup>+</sup>) についてのESI<sup>+</sup>-HRMS m/z 計算値 884.3895、実測値 884.3898。

【0278】

(3'R, 5'R, 7'R)-2-アミノ-6-クロロ-9-{5'-O-アセチル-7'-[(tert-ブチルジフェニルシリル)オキシ]-2', 3'-ジデオキシ-3', 5'-エタノール-α, β-D-リボフラノシル} プリン (20)

【化68】



乾燥MeCN (20mL) 中の糖7 (1.75g、3.85mmol) および2-アミ

10

20

30

50

ノー６－クロロプリン（１．０５ｇ、６．１７ｍｍｏｌ）の懸濁液に、ＢＳＡ（３．８０ｍＬ、１５．４ｍｍｏｌ）を室温で添加する。懸濁液を５５℃に加熱し、３０分間攪拌する。次いで、ＴＭＳＯＴｆ（１．０５ｍＬ、５．７８ｍｍｏｌ）を滴下して添加し、溶液を５５℃でさらに５０分間攪拌する。溶液を室温に冷却し、飽和ＮａＨＣＯ<sub>3</sub>（１０ｍＬ）を添加してクエンチし、ＥｔＯＡｃ（５０ｍＬ）で希釈し、ＳｉＯ<sub>2</sub>のショートパッドを通して濾過する。ＳｉＯ<sub>2</sub>を追加のＥｔＯＡｃで洗浄した。次いで、混合物を飽和ＮａＨＣＯ<sub>3</sub>（２×８０ｍＬ）で洗浄し、水相を合わせ、ＥｔＯＡｃ（３×５０ｍＬ）で抽出する。合わせた有機相をＭｇＳＯ<sub>4</sub>で乾燥し、濾過し、蒸発させる。粗生成物をＣＣ（ＤＣＭ中２．５％ＭｅＯＨ）によって精製して、アノマー比α／β

【化６９】

≈

７：３の２０（１．７７ｇ、７７％）の混合物を白色フォームとして得る。

【０２７９】

２０のデータ：Ｒ<sub>f</sub>＝０．５４（ＥｔＯＡｃ／ヘキサン５：１）：

<sup>1</sup>H NMR（３００ MHz、ＣＤＣｌ<sub>3</sub>）δ ７．８６（s、０．３H、H－C（８））、７．６９（s、０．７H、H－C（８））、７．６８－７．６０（m、４H、H－a r o m）、７．４７－７．３４（m、６H、H－a r o m）、６．０４（dd、J＝６．９、３．０ Hz、０．７H、H－C（１'））、５．８７（dd、J＝８．０、６．２ Hz、０．３H、H－C（１'））、５．３７（dt、J＝１４．２、４．６ Hz、１H、H－C（５'））、５．１６（br、２H、NH<sub>2</sub>）、４．９１（dd、J＝６．５、５．１ Hz、０．７H、H－C（４'））、４．７９（dd、J＝６．９、５．２ Hz、０．３H、H－C（４'））、４．１３（br、０．３H、H－C（７'））、４．０６（d、J＝４．０ Hz、０．７H、H－C（７'））、２．９５（dd、J＝１６．３、６．６ Hz、０．７H、H－C（３'））、２．８１（dd、J＝１７．０、７．４ Hz、０．３H、H－C（３'））、２．４９－２．３０（m、１H、H－C（２'））、２．１４（dd、J＝１３．１、６．７ Hz、１H、H－C（６'））、２．０８（s、２．１H、MeCO<sub>2</sub>）、２．０２（s、０．９H、MeCO<sub>2</sub>）、２．０２－１．９１（m、１H、H－C（６'））、１．８０（td、J＝１３．４、６．８ Hz、１H、H－C（２'））、１．０７、１．０６（2 s、９H、（CH<sub>3</sub>）<sub>3</sub>－C－Si）。

<sup>13</sup>C NMR（７５ MHz、ＣＤＣｌ<sub>3</sub>）δ １７０．５５、１７０．４４（MeCO<sub>2</sub>）、１５８．９８、１５８．９１（C（２））、１５３．１８、１５２．９５（C（４））、１５１．４０、１５１．３４（C（６））、１４０．３８、１４０．１４（C（８））、１３５．７３、１３５．７０（CH－a r o m）、１３３．７８、１３３．６２、１３３．２４、１３３．１７（C－a r o m）、１３０．０３、１３０．００、１２７．８８、１２７．８６（CH－a r o m）、１２５．６５、１２５．５７（C（５））、８６．５９、８５．７４（C（１'））、８２．９３、８０．９９（C（４'））、７６．５７、７６．１４（C（７'））、７４．３４、７４．３２（C（５'））、５１．１５、５１．１０（C（３'））、３７．１９、３６．９９（C（６'））、３６．７０、３６．２５（C（２'））、２６．８７（CH<sub>3</sub>）<sub>3</sub>－C－Si）、２０．９５、２０．８６（MeCO<sub>2</sub>）、１９．００（CH<sub>3</sub>）<sub>3</sub>－C－Si）。

C<sub>30</sub>H<sub>35</sub>O<sub>4</sub>N<sub>5</sub>ClSi（[M+H]<sup>+</sup>）についてのESI<sup>+</sup>－HRMS m/z 計算値５９２．２１４１、実測値５９２．２１５８。

【０２８０】

（３'R，５'R，７'R）－２－アミノ－６－クロロ－９－{７'－[（tert－ブチルジフェニルシリル）オキシ]－２'，３'－ジデオキシ－３'，５'－エタノ－β－D－リボフラノシル} プリン（２２b）

10

20

30

40

50

## 10



30

## 40

50

50

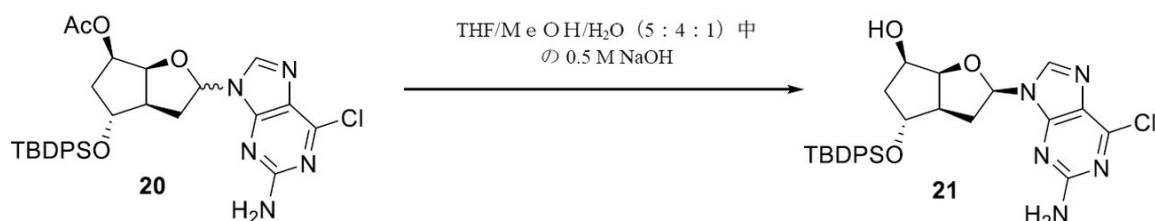
50

50

## 50

50

## 50



ロキシプロピオニトリル (0.22 mL、3.23 mmol) の溶液に、1, 5, 7-トリアザビシクロ [4.4.0] デス-5-エン (400 mg、2.87 mmol) を 0℃ で添加する。溶液を 0℃ で 3 時間攪拌し、次いで室温で 2 日間攪拌する。シリカを添加することにより反応を停止させる。溶媒を蒸発させた後、SiO<sub>2</sub> 粉末を濾過し、MeOH で洗浄し、溶媒を蒸発させて、褐色フォームを得る。

【0283】

粗生成物を乾燥 DMF (5 mL) に溶解し、N, N-ジメチルホルムアミドジメチルアセタール (0.43 mL、3.2 mmol) を添加する。溶液を 55℃ で 2 時間攪拌し、次いで溶媒を減圧下で除去する。粗生成物を CC (DCM 中 6% MeOH) によって精製して、23 (274 mg、73%) を黄色がかったフォームとして得る。

【0284】

22 のデータ:  $R_f = 0.45$  (DCM 中 12% MeOH) :

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.52 (s, 1H, NH)、8.46 (s, 1H, NCHN(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)、7.63 (dd, J=7.7, 1.5 Hz, 4H, H-arom)、7.50 (s, 1H, H-C(8))、7.44-7.30 (m, 6H, H-arom)、5.83 (dd, J=9.3, 6.0 Hz, 1H, H-C(1'))、4.61 (dd, J=8.7, 5.0 Hz, 1H, H-C(4'))、4.43-4.32 (m, 1H, H-C(5'))、4.29 (dd, J=7.0, 4.8 Hz, 1H, H-C(7'))、3.95 (d, J=5.1 Hz, 1H, OH)、2.98 (s, 6H, NCHN(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)、2.79 (dd, J=18.0, 7.0 Hz, 1H, H-C(3'))、2.20 (dt, J=12.8, 5.4 Hz, 1H, H-C(6'))、2.09-1.88 (m, 3H, H-C(6'), H-C(2'))、1.05 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-Si)。

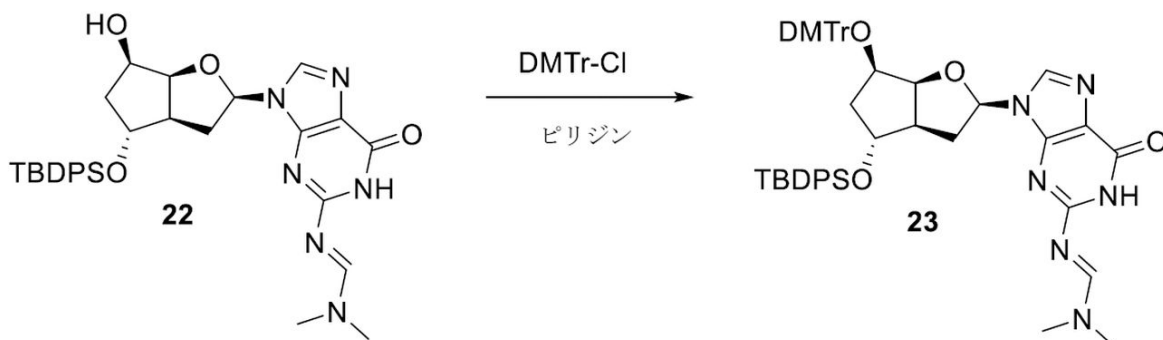
<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 158.73 (C(2))、157.79 (C(6))、156.91 (NCHN(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)、149.84 (C(4))、137.00 (C(8))、135.70、135.67 (CH-arom)、133.78、133.60 (C-arom)、129.93、129.86、127.78、127.72 (CH-arom)、121.61 (C(5))、88.04 (C(1'))、82.21 (C(4'))、77.49 (C(7'))、71.94 (C(5'))、50.13 (C(3'))、42.23 (C(6'))、41.20 (NCHN(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)、35.50 (C(2'))、34.97 (NCHN(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)、26.87 (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-Si、19.02 (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-Si。

C<sub>31</sub>H<sub>38</sub>O<sub>4</sub>N<sub>6</sub>Si ([M+H]<sup>+</sup>) についての ESI<sup>+</sup>-HRMS m/z 計算値 586.2718、実測値 586.2703。

【0285】

(3'R, 5'R, 7'R)-2-N(N, N-ジメチルホルムアミジノ)-9-{7'-[(tert-ブチルジフェニルシリル)オキシ]-2', 3'-ジデオキシ-3', 5'-エタノ-5'-O-[(4, 4'-ジメトキシトリフェニル)メチル]-β-D-リボフラノシル} グアニン (23)

【化72】



乾燥ピリジン (2 mL) 中の 22 (139 mg、0.237 mmol) の溶液に、DM Tr-Cl (240 mg、0.708 mmol) を室温で3時間にわたって6回に分けて添加する。一晚攪拌した後、オレンジ色の溶液を飽和 NaHCO<sub>3</sub> (20 mL) で希釈し、DCM (3×20 mL) で抽出する。合わせた有機相を MgSO<sub>4</sub> で乾燥し、濾過し、蒸発させる。粗生成物を CC (DCM 中 4% MeOH、+0.5% Et<sub>3</sub>N) によって精製して、23 (148 mg、70%) を黄色がかったフォームとして得る。

【0286】

23 のデータ: R<sub>f</sub> = 0.52 (DCM 中 10% MeOH) :

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.49 (s, 1H, NH)、8.38 (s, 1H, NCHN (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)、7.80 (s, 1H, C(8))、7.50–7.43 (m, 2H, H-arom)、7.42–7.27 (m, 10H, H-arom)、7.26–7.15 (m, 6H, H-arom)、7.14–7.08 (m, 1H, H-arom)、6.77–6.68 (m, 4H, H-arom)、5.78 (dd, J = 8.2, 5.9 Hz, 1H, H-C(1'))、4.25 (dt, J = 11.0, 5.6 Hz, 1H, H-C(5'))、4.14–4.03 (m, 1H, H-C(4'))、3.70–3.64 (m, 7H, MeO, H-C(7'))、3.00 (s, 3H, NCHN (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)、2.97 (s, 3H, NCHN (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)、2.43 (dd, J = 16.7, 7.5 Hz, 1H, H-C(3'))、2.24 (ddd, J = 13.3, 10.1, 5.8 Hz, 1H, H-C(2'))、1.62 (td, J = 13.1, 4.3 Hz, 1H, H-C(6'))、1.43 (dt, J = 13.5, 8.0 Hz, 1H, H-C(2'))、0.99 (dd, J = 13.3, 6.2 Hz, 1H)、0.86 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-Si)。

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 158.51, 158.49 (MeO-C-arom)、158.04 (C(2))、157.91 (C(6))、156.60 (NCHN (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)、149.76 (C(4))、145.83, 137.12, 136.94 (C-arom)、136.01 (C(8))、135.60, 135.59 (CH-arom)、133.81, 133.47 (C-arom)、130.32, 130.26, 129.77, 128.24, 127.82, 127.65, 127.62, 126.67 (CH-arom)、120.65 (C(5))、113.13, 113.09 (CH-arom)、86.82 (C(Ph)<sub>3</sub>)、85.01 (C(1'))、82.26 (C(4'))、76.14 (C(7'))、74.61 (C(5'))、55.19 (MeO-DMTr)、50.18 (C(3'))、41.29 (NCHN (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)、38.01 (C(6'))、37.76 (C(2'))、35.14 (NCHN (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) 26.81 87 (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-Si、19.01 (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-Si)。

C<sub>52</sub>H<sub>57</sub>O<sub>6</sub>N<sub>6</sub>Si ([M+H]<sup>+</sup>) についての ESI<sup>+</sup>-HRMS m/z 計算値 889.4103、実測値 889.4128。

【0287】

(3'S, 5'R, 7'R)-2-N(N, N-ジメチルホルムアミジノ)-9-{2', 3'-ジデオキシ-3', 5'-エタノ-7'-ヒドロキシ-5'-O-[(4, 4'-ジメトキシトリフェニル)メチル]-β-D-リボフラノシル} グアニン (24)

10

20

30

Chemical reaction scheme showing the conversion of compound **23** to compound **24**. Compound **23** is a bicyclic molecule with a DMTrO group and a TBDPSO group. It reacts with TBAF in THF to form compound **24**, where the TBDPSO group is removed, replaced by a hydroxyl group.

10

24のデータ： $R_f = 0.44$ （DCM中10%MeOH）：

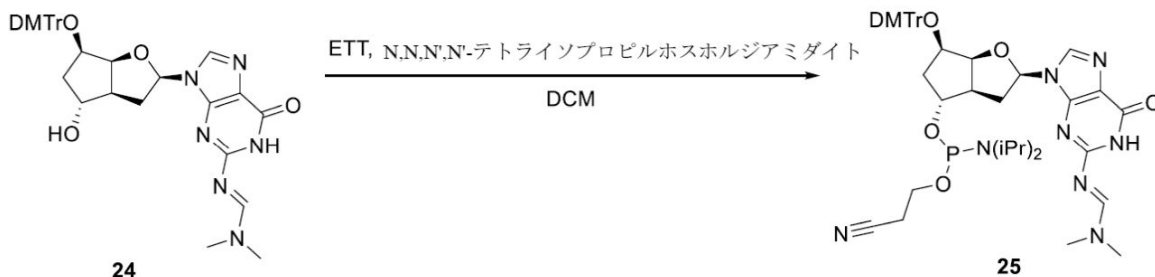
20

30

40

(3' R, 5' R, 7' R) <sup>2</sup>N (N, N-ジメチルホルムアミジノ) - 9 - {7' - O -  
[ (2-シアノエトキシ) - ジイソプロピルアミノホスファニル] - 2', 3' - ジデオキ  
シー - 3', 5' - エタノール - 5' - O - [ (4, 4' - ジメトキシトリフェニル) メチル] - β -  
D-リボフラノシル} グアニン (25)

## 【化 7 4】



乾燥 DCM (10 mL) 中のヌクレオシド 24 (143 mg、0.220 mmol) および 5-(エチルチオ)-1H-テトラゾール (43 mg、0.33 mmol) の溶液に、2-シアノエチル N, N, N', N'-テトライソプロピルホスホルジアミダイト (0.12 mL、0.38 mmol) を室温で滴下して添加する。50 分間攪拌した後、反応混合物を飽和 NaHCO<sub>3</sub> (20 mL) で希釈し、DCM (3×20 mL) で抽出する。合わせた有機相を MgSO<sub>4</sub> で乾燥し、濾過し、蒸発させる。粗生成物を CC (DCM 中 3.5% MeOH、+0.5% Et<sub>3</sub>N) によって精製して、25 (130 mg、2つの異性体の混合物、69%) を白色フォームとして得る。

## 【0290】

25 のデータ：R<sub>f</sub> = 0.60 (DCM 中 10% MeOH)：

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz、CDCl<sub>3</sub>) δ 9.54、9.47 (2 s、1H、NH)、8.54、8.52 (2 s、1H、NCHN(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)、8.02、8.00 (2 s、1H、H-C(8))、7.58–7.49 (m、2H、H-arom)、7.46–7.36 (m、4H、H-arom)、7.25 (dd、J = 11.0、3.5 Hz、2H、H-arom)、7.21–7.13 (m、1H、H-arom)、6.80 (dd、J = 8.8、2.2 Hz、4H、H-arom)、6.00–5.82 (m、1H、H-C(1'))、4.16 (dd、J = 10.7、5.4 Hz、1H、H-C(5'))、4.00–3.82 (m、2H、H-C(4')、H-C(7'))、3.77、3.77 (2 s、6H、MeO)、3.62 (dt、J = 12.2、6.1 Hz、2H、OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN)、3.51–3.33 (m、2H、(Me<sub>2</sub>CH)<sub>2</sub>N)、3.15、3.14 (2 s、3H、NCHN(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)、3.07 (s、3H、NCHN(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)、2.85–2.61 (m、2H、C(2')、C(3'))、2.59–2.44 (m、2H、OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN)、2.00–1.79 (m、2H、H-(C2')、H-C(6'))、1.53–1.26 (m、1H、H-C(6'))、1.10、1.01 (2 t、J = 6.4 Hz、12H、(Me<sub>2</sub>CH)<sub>2</sub>N)。

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz、CDCl<sub>3</sub>) δ 158.50 (MeO-C-arom)、158.04、158.00 (C(2))、157.93 (C(6))、156.61、156.60 (NCHN(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)、149.73、149.72 (C(4))、145.62、145.62、136.97、136.94 (C-arom)、136.14 (C(8))、130.27、130.24、130.22、128.26、127.81、126.73 (CH-arom)、120.81、120.76 (C(5))、117.67、117.56 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN)、113.10 (CH-arom)、86.88、86.85 (C(Ph)<sub>3</sub>)、85.58、85.37 (C(1'))、82.41、82.07 (C(4'))、77.08、76.01 (t、p = 37.0、15.1 Hz、C(7'))、74.52、74.46 (C(5'))、58.19、57.74 (J<sub>C</sub>、p = 18.9、19.0 Hz OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN)、55.25、55.21 (MeO-DMTr)、49.10、48.83 (J<sub>C</sub>、p = 2.2、4.8 Hz、C(3'))、43.12、43.00 ((Me<sub>2</sub>CH)<sub>2</sub>N)、41.34、41.33 (NCHN(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)、38.48、38.41 (C(2'))、37.23、36.92 (J<sub>C</sub>、p = 5.7、3.3 Hz C(6'))、35.17 ((Me<sub>2</sub>CH)<sub>2</sub>N)。

)、24.56、24.53、24.48、24.47、24.43、25.36、24.35 (7s、 $\text{Me}_2\text{CH})_2\text{N}$ )、20.39、20.28 ( $J_{\text{C}}, \rho=7.1, 6.9$  Hz、 $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$ ) .

$^{31}\text{P}$  NMR (122 MHz、 $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  147.69、146.37 .

$\text{C}_{45}\text{H}_{56}\text{O}_7\text{N}_8\text{P}$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) についてのESI $^+$ -HRMS  $m/z$  計算値 851.4004、実測値 851.4018 .

【0291】

(3'S, 5'R, 7'R) - 1 - {7' - [(tert-ブチルジフェニルシリル) オキシ] - 2', 3'-ジデオキシ-3', 5'-エタノール- $\beta$ -D-リボフラノシル} ウラシル (26) 【化75】

10

【化75】



乾燥DCM (13 mL) 中の糖6 (669 mg、1.62 mmol) の溶液に、2, 6-ルチジン (0.94 mL、8.10 mmol) を0℃で添加する。0℃で20分間攪拌した後、TMSOTf (0.89 mL、4.86 mmol) を滴下して添加し、次いで溶液を室温に温め、さらに3時間攪拌する。次いで、飽和 $\text{NaHCO}_3$  (20 mL) を添加することにより反応物をクエンチする。有機相を分離し、水相をさらにDCM (2 X 20 mL) で抽出する。合わせた有機相を $\text{MgSO}_4$ で乾燥し、濾過し、蒸発させる。

20

【0292】

粗生成物を乾燥DCM (12 mL) に溶解し、次いでウラシル (545 mg、4.86 mmol) およびBSA (1.8 mL、7.29 mmol) を室温で添加する。室温で60分間攪拌した後、得られた微細な懸濁液を0℃に冷却し、N-ヨードスクシンイミド (578 mg、2.52 mmol) を添加する。0℃で30分間および室温で4時間攪拌した後、反応混合物をEtOAc (50 mL) で希釈し、続いて $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  (30 mL) および飽和 $\text{NaHCO}_3$  (30 mL) の10%水溶液で洗浄する。水相を合わせ、DCM (2 X 20 mL) で抽出する。合わせた有機相を $\text{MgSO}_4$ で乾燥し、濾過し、蒸発させる。

30

【0293】

粗生成物を乾燥トルエン (15 mL) に溶解し、次いで、 $\text{Bu}_3\text{SnH}$  (0.65 mL、2.43 mmol) およびアゾイソブチロニトリル (AIBN、13 mg、0.081 mmol) を室温で添加する。95℃で2時間加熱した後、混合物を室温に冷却し、MeOH (7 mL) およびHCl (水中1 M、1.6 mL、1.6 mmol) を添加する。溶液をさらに15分間攪拌し、次いで飽和 $\text{NaHCO}_3$  (50 mL) で希釈し、DCM (3 X 50 mL) で抽出する。合わせた有機相を $\text{MgSO}_4$ で乾燥し、濾過し、蒸発させる。粗生成物をCC (EtOAc / ヘキサン4 : 1) により精製して、26 (490 mg、3工程で61%) を白色フォームとして得る。

40

【0294】

26のデータ： $R_f=0.15$  (EtOAc / ヘキサン2 : 1) :

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz、 $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.95 (br、1H、H-N (3))、7.69 (d、 $J=6.4$  Hz、4H、H-arom)、7.54-7.39 (m、7H、H-C (6)、H-arom)、5.98 (dd、 $J=9.3, 5.6$  Hz、1H、H-C (1'))、5.71 (d、 $J=8.1$  Hz、1H、H-C (5))、4.51 (dd、 $J=13.7, 6.3$  Hz、2H、H-C (4')、H-C (5'))、4.14 (br、1H、H-C (7'))、3.25 (br、1H、OH)、2.74 (dd、 $J$

50

=17.1、8.7 Hz、1H、H-C(3'))、2.26-1.87 (m、3H、H-C(2'))、H-C(6'))、1.49-1.19 (m、1H、H-C(2'))、1.12 (s、9H、(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-Si)。  
<sup>13</sup>C NMR (75 MHz、CDCl<sub>3</sub>) δ 163.65 (C(4))、150.46 (C(2))、139.85 (C(6))、135.69、135.66 (CH-arom)、133.71、133.42 (C-arom)、129.98、129.93、127.85、127.81 (CH-arom)、102.84 (C(5))、86.17 (C(1'))、81.83 (C(4'))、76.94 (C(7'))、72.45 (C(5'))、50.09 (C(3'))、40.93 (C(6'))、35.83 (C(2'))、26.91 (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-Si、19.03 (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-Si)。  
 C<sub>27</sub>H<sub>32</sub>O<sub>5</sub>N<sub>2</sub>NaSi ([M+Na]<sup>+</sup>) についてのESI<sup>+</sup>-HRMS m/z 計算値515.1973、実測値515.1963。

【0295】

(3'S, 5'R, 7'R)-1-{7'-[(tert-ブチルジフェニルシリル)オキシ]-2', 3'-ジデオキシ-3', 5'-エタノ-5'-O-[(4, 4'-ジメトキシトリフェニル)メチル]-β-D-リボフラノシル} ウラシル(27)

【化76】



乾燥ピリジン(7mL)中のヌクレオシド26(438mg、0.889mmol)の溶液に、DMTr-Cl(1.20g、3.55mmol)を室温で添加する。溶液を室温で1日間攪拌し、次いで飽和NaHCO<sub>3</sub>(30mL)で希釈し、DCM(3×40mL)で抽出する。合わせた有機相をMgSO<sub>4</sub>で乾燥し、濾過し、蒸発させる。粗生成物をCC(DCM中1.5%MeOH、+0.5%Et<sub>3</sub>N)によって精製して、27(601mg、80%)を黄色フォームとして得る。

【0296】

27のデータ：R<sub>f</sub>=0.48(EtOAc/ヘキサン2:1)：

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz、CDCl<sub>3</sub>) δ 9.26 (br、1H、H-N(3))、7.84 (d、J=8.1 Hz、1H、H-C(6))、7.40-7.08 (m、19H、H-arom)、6.69 (dd、J=8.8、4.9 Hz、4H、H-arom)、5.70 (dd、J=7.8、5.8 Hz、1H、H-C(1'))、5.49 (dd、J=8.1、1.5 Hz、1H、H-C(5))、4.24-4.11 (m、1H、H-C(5'))、4.05-3.95 (m、1H、H-C(4'))、3.65 (d、J=1.7 Hz、6H、MeO)、3.62 (d、J=3.0 Hz、1H、H-C(7'))、2.41 (dd、J=17.2、8.5 Hz、1H、H-C(3'))、2.24 (ddd、J=13.5、10.2、5.7 Hz、1H、H-C(2'))、1.39-1.24 (m、1H、H-C(6'))、1.04 (dd、J=13.1、5.7 Hz、1H、H-C(6'))、0.89 (dt、J=13.8、8.3 Hz、1H、H-C(2'))、0.81 (s、9H、(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-Si)。

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz、CDCl<sub>3</sub>) δ 163.58 (C(4))、158.66 (MeO-C-arom)、150.38 (C(2))、145.61 (C-arom)、139.92 (C(6))、136.71、136.56 (C-arom)、135.61、135.55 (CH-arom)、133.55、133.41 (C-arom)

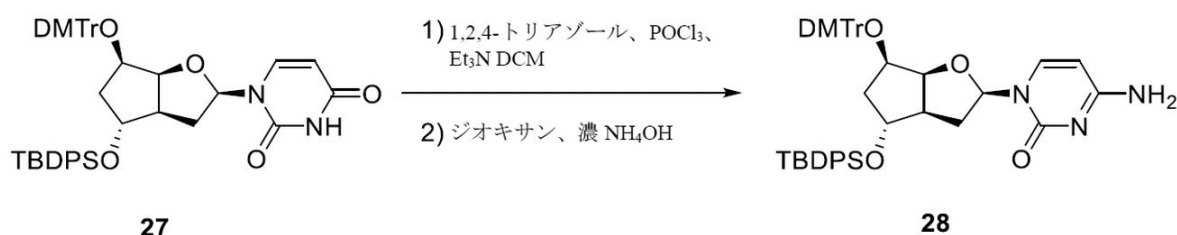
)、130.30、129.92、129.84、128.16、127.90、127.74、127.67、126.90、113.19、113.15 (CH-arom)、102.12 (C(5))、87.41 (C(Ph)<sub>3</sub>)、86.80 (C(1'))、82.32 (C4')、75.54 (C(7'))、74.41 (C(5'))、55.23 (MeO-DMTr)、50.05 (C(3'))、38.49 (C(6'))、37.53 (C(2'))、26.81 (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-Si、18.99 (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-Si)。

C<sub>48</sub>H<sub>50</sub>O<sub>7</sub>N<sub>2</sub>NaSi ([M+Na]<sup>+</sup>) についてのESI<sup>+</sup>-HRMS m/z 計算値817.3279、実測値817.3286。

【0297】

(3'S, 5'R, 7'R) - 1 - {7' - [(tert-ブチルジフェニルシリル) オキシ] - 2', 3'-ジデオキシ-3', 5'-エタノ-5'-O-[(4,4'-ジメトキシトリフェニル) メチル] - β-D-リボフラノシル} シトシン (28)

【化77】



乾燥MeCN (70mL) 中の1, 2, 4-トリアゾール (1.83g、26.5mmol) の懸濁液に、POCl<sub>3</sub> (0.57mL、6.05mmol) を0℃で添加し、続いてEt<sub>3</sub>N (4.2mL、30.2mmol) を添加する。懸濁液を0℃で30分間攪拌し、次いで乾燥MeCN (4mL) 中のヌクレオシド27 (601mg、0.756mmol) の溶液を0℃で添加する。室温で4時間攪拌した後、飽和NaHCO<sub>3</sub> (20mL) を添加して反応物をクエンチし、MeCNを減圧下で除去し、得られた混合物を飽和NaHCO<sub>3</sub> (30mL) で希釈し、DCM (3×60mL) で抽出した。合わせた有機相をMgSO<sub>4</sub>で乾燥し、濾過し、蒸発させる。

【0298】

次いで、粗生成物を1, 4-ジオキサン (18mL) および濃NH<sub>4</sub>OH (18mL) の混合物に溶解する。室温で3時間攪拌した後、混合物を真空中で体積の半分に減少させ、飽和NaHCO<sub>3</sub> (30mL) で希釈し、DCM (3×30mL) で抽出する。合わせた有機相をMgSO<sub>4</sub>で乾燥し、濾過し、蒸発させる。粗生成物をCC (DCM中5%MeOH、+0.5%Et<sub>3</sub>N) によって精製して、28 (520mg、87%) を白色フォームとして得る。

【0299】

28のデータ：R<sub>f</sub> = 0.41 (DCM中10%MeOH)：  
<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.96 (d, J = 7.4 Hz, 1H, H-C(6))、7.45 (d, J = 7.4 Hz, 2H, H-arom)、7.38-7.08 (m, 17H, H-arom)、6.73 (dd, J = 8.7, 4.7 Hz, 4H, H-arom)、5.73 (t, J = 8.6 Hz, 2H, H-C(5), H-C(1'))、4.32-4.16 (m, 1H, H-C(5'))、4.03 (t, J = 5.6 Hz, 1H, H-C(4'))、3.66 (d, J = 0.9 Hz, 6H, MeO)、3.61 (d, J = 2.9 Hz, 1H, H-C(7'))、2.50-2.33 (m, 2H, H-C(2'), H-C(3'))、1.47-1.28 (m, 1H, H-C(6'))、1.03 (dd, J = 12.9, 5.6 Hz, 1H, H-C(6'))、0.92-0.75 (m, 10H, H-C(2'), (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-Si)。

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  165.78 (C(4)), 158.59 (MeO-C-arom), 155.94 (C(2)), 145.88 (C-arom), 140.68 (C(6)), 136.93, 136.78 (C-arom), 135.59, 135.53 (CH-arom), 133.60, 133.54 (C-arom), 130.31, 129.86, 129.77, 128.15, 127.88, 127.71, 127.64, 126.79, 113.18, 113.14 (CH-arom), 94.53 (C(5)), 87.55 (C(Ph)<sub>3</sub>), 87.22 (C(1')), 82.23 (C(4')), 75.76 (C(7')), 74.68 (C(5')), 55.21 (MeO-DMTr), 50.18 (C(3')), 38.25 (C(6')), 38.08 (C(2')), 26.83 ( $\text{CH}_3$ )<sub>3</sub>-C-Si, 19.00 ( $\text{CH}_3$ )<sub>3</sub>-C-Si).

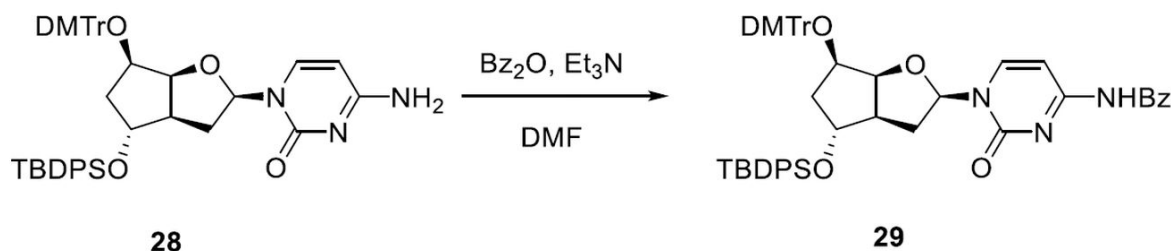
10

$\text{C}_{48}\text{H}_{52}\text{O}_6\text{N}_3\text{Si}$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) についてのESI<sup>+</sup>-HRMS  $m/z$  計算値794.3620、実測値794.3649。

【0300】

(3'S, 5'R, 7'R) 4-Nベンゾイル-1-{7'-[(tert-ブチルジフェニルシリル)オキシ]-2', 3'-ジデオキシ-3', 5'-エタノ-5'-O-[(4, 4'-ジメトキシトリフェニル)メチル]-β-D-リボフラノシル} シトシン (29)

【化78】



20

乾燥DMF (15 mL) 中のヌクレオシド28 (519 mg、0.653 mmol) の溶液に、 $\text{Et}_3\text{N}$  (110  $\mu\text{L}$ 、0.784 mmol) を室温で添加し、続いて $\text{Bz}_2\text{O}$  (370 mg、1.633 mmol) を添加し、溶液を一晩攪拌する。次いで、飽和 $\text{NaHCO}_3$  (60 mL) を注意深く添加することにより溶液をクエンチし、DCM (3×70 mL) で抽出する。合わせた有機相を $\text{MgSO}_4$ で乾燥し、濾過し、蒸発させる。粗生成物をCC (ヘキサン/ $\text{EtOAc}$  2:3、+0.5%  $\text{Et}_3\text{N}$ ) によって精製して、29 (580 mg、99%) を白色フォームとして得る。

30

【0301】

29のデータ： $R_f=0.51$  ( $\text{EtOAc}$ ) :

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.61 (d,  $J=7.4$  Hz, 1H, H-C(6)), 7.81 (d,  $J=7.5$  Hz, 2H, H-arom), 7.49-7.13 (m, 24H, H-arom, H-C(5)), 6.77 (dd,  $J=8.5$ , 4.4 Hz, 4H, H-arom), 5.73 (t,  $J=6.4$  Hz, 1H, H-C(1')), 4.39-4.20 (m, 1H, H-C(5')), 4.05 (t,  $J=6.1$  Hz, 1H, H-C(4')), 3.70 (s, 6H, MeO), 3.63 (d,  $J=2.3$  Hz, 1H, H-C(7')), 2.72-2.55 (m, 1H, H-C(2')), 2.48 (dd,  $J=16.0$ , 8.4 Hz, 1H, H-C(3')), 1.42-1.29 (m, 1H, H-C(6')), 1.19-1.11 (m, 1H, H-C(6')), 1.07-0.96 (m, 1H, H-C(2')), 0.85 (s, 9H, ( $\text{CH}_3$ )<sub>3</sub>-C-Si).

40

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  166.64 (CONH), 162.25 (C(4)), 158.70 (MeO-C-arom), 154.84 (C(2)), 145.71 (C-arom), 144.84 (C(6)), 136.74, 136.67 (C-arom), 135.59, 135.51 (CH-arom), 133.52,

50

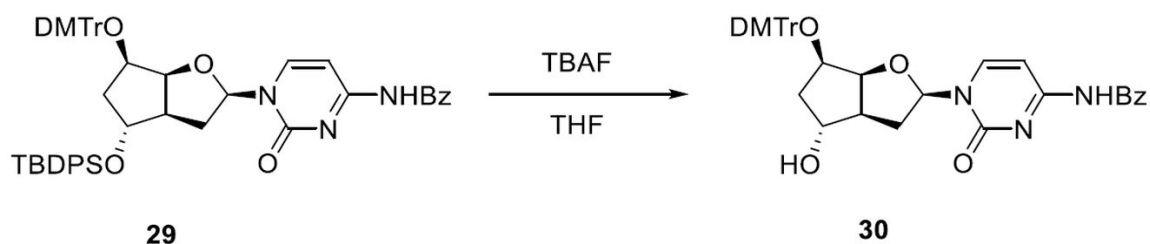
133.42、133.24 (C-arom)、133.11、130.30、129.92、129.85、129.02、128.12、127.97、127.76、127.68、127.61、126.94、113.25、113.22 (CH-arom)、96.22 (C(5))、89.07 (C(Ph)<sub>3</sub>)、87.53 (C(1'))、83.46 (C(4'))、75.59 (C(7'))、74.71 (C(5'))、55.24 (MeO-DMTr)、50.35 (C(3'))、38.61 (C(6'))、38.15 (C(2'))、26.82 (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-Si)、19.00 (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-Si)。

C<sub>55</sub>H<sub>56</sub>O<sub>7</sub>N<sub>3</sub>Si ([M+H]<sup>+</sup>) についてのESI<sup>+</sup>-HRMS m/z 計算値898.3882、実測値898.3898。

【0302】

(3'S, 5'R, 7'R) 4-Nベンゾイル-1-{ -2', 3'-ジデオキシ-3', 5'-エタノ-7'-ヒドロキシ-5'-O-[(4, 4'-ジメトキシトリフェニル)メチル]-β-D-リボフラノシル} シトシン (30)

【化79】



乾燥THF (14 mL) 中の29 (580 mg、0.648 mmol) の溶液に、TBAF (THF中1M、3.25 mL、3.25 mmol) を室温で添加する。溶液を1日間攪拌し、次いで飽和NaHCO<sub>3</sub> (50 mL) で希釈し、DCM (3×40 mL) で抽出する。合わせた有機相をMgSO<sub>4</sub>で乾燥し、濾過し、蒸発させる。粗生成物をCC (DCM中3% MeOH、+0.5% Et<sub>3</sub>N) によって精製して、30 (366 mg、85%) を白色フォームとして得る。

【0303】

30のデータ: R<sub>f</sub> = 0.31 (DCM中5% MeOH) :

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz、CDCl<sub>3</sub>) δ 8.90 (br、1H、NH)、8.73 (d、J=7.5 Hz、1H、H-C(6))、7.82 (d、J=7.3 Hz、2H、H-arom)、7.55-7.31 (m、10H、H-arom、H-C(5))、7.28-7.09 (m、3H、H-arom)、6.76 (dd、J=8.8、1.7 Hz、4H、H-arom)、5.73 (t、J=6.3 Hz、1H、H-C(1'))、4.28-4.13 (m、1H、H-C(5'))、3.83 (t、J=6.0 Hz、1H、H-C(4'))、3.75 (d、J=3.6 Hz、1H、H-C(7'))、3.70 (s、6H、MeO)、2.86 (d、J=14.7 Hz、1H、H-C-(2'))、2.54 (dd、J=17.4、7.4 Hz、1H、H-C(3'))、1.68-1.55 (m、1H、H-C(6'))、1.45-1.13 (m、3H、H-C(2')、H-C(6')、OH)。

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz、CDCl<sub>3</sub>) δ 166.63 (CONH)、162.34 (C(4))、158.65 (MeO-C-arom)、155.00 (C(2))、145.62 (C-arom)、145.11 (C(6))、136.72、136.64、133.16 (C-arom)、130.25、129.02、128.12、127.93、127.61、126.95、113.20 (CH-arom)、96.24 (C(5))、89.20 (C(Ph)<sub>3</sub>)、87.48 (C(1'))、83.40 (C(4'))、74.50、(C(5')) 73.90 (C(7'))、55.25 (MeO-DMTr)、50.05 (C(3'))、38.90 (C(6'))、38.40 (C(2')、

10

20

30

40

50

)) .

$C_{39}H_{38}O_7N_3$  ( $[M+H]^+$ ) についてのESI<sup>+</sup>-HRMS  $m/z$  計算値 660.2704、実測値 660.2707。

【0304】

(3'S, 5'R, 7'R) 4-Nベンゾイル-1-{7'-O-[(2-シアノエトキシ)-ジイソプロピルアミノホスファニル]-2', 3'-ジデオキシ-3', 5'-エタノ-5'-O-[(4,4'-ジメトキシトリフェニル)メチル]-β-D-リボフラノシル} シトシン (31)

【化80】



10

乾燥DCM (3 mL) 中のヌクレオシド30 (67 mg、0.101 mmol) および5-(エチルチオ)-1H-テトラゾール (22 mg、0.17 mmol) の溶液に、2-シアノエチルN, N, N', N'-テトライソプロピルホスホルジアミダイト (65 μL、0.20 mmol) を室温で滴下して添加する。40分間攪拌した後、反応混合物をDCM (20 mL) で希釈し、飽和NaHCO<sub>3</sub> (2 X 15 mL) および飽和NaCl (15 mL) で洗浄する。水相を合わせ、DCM (20 mL) で抽出する。合わせた有機相をMgSO<sub>4</sub>で乾燥し、濾過し、蒸発させる。粗生成物をCC (EtOAc、+0.5% Et<sub>3</sub>N) によって精製して、31 (75 mg、2つの異性体の混合物、86%) を白色フォームとして得る。

20

【0305】

31のデータ：R<sub>f</sub> = 0.67 (DCM中4% MeOH) :

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.88 (s, 1H, NH)、8.79 (d, J = 7.5 Hz, 1H, H-C (6))、7.93 (d, J = 7.5 Hz, 2H、H-arom)、7.67-7.40 (m, 10H, H-arom、H-C (5))、7.39-7.22 (m, 3H, H-arom)、6.93-6.79 (m, 4H, H-arom)、5.97-5.77 (m, 1H, H-C (1'))、4.22 (dt, J = 14.5、5.6 Hz, 1H, H-(5'))、3.98-3.84 (m, 2H, H-C (4'))、H-C (7'))、3.82 (s, 6H, MeO)、3.66 (ddd, J = 16.8、13.5、6.7 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN)、3.53-3.37 (m, 2H, (Me<sub>2</sub>CH)<sub>2</sub>N)、3.14-2.93 (m, 1H, H-C (2'))、2.84-2.66 (m, 1H, H-C (3'))、2.53 (dt, J = 12.4、6.3 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN)、1.83-1.56 (m, 2H, H-C (6'))、1.46 (td, J = 14.1、7.0 Hz, 1H, H-C (2'))、1.18-0.97 (m, 12H, (Me<sub>2</sub>CH)<sub>2</sub>N)。

30

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 166.70 (CONH)、162.32、162.28 (C (4))、158.68 (MeO-C-arom)、154.93 (C (2))、145.53 (C-arom)、144.95、144.89 (C (6))、136.69、136.63、136.56、136.52、133.24 (C-arom)、133.10、130.24、130.20、129.01、128.10、127.94、127.60、126.96 (CH-arom)、117.53 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN)、113.20 (CH-arom)、96.24 (C (5))、89.15、89.10 (C (Ph)<sub>3</sub>)、87.55、87.54 (C (1'))、83.11、83.04 (C (4'))、75.93、75.37 (J、p = 16.7、15.5 H

40

50

z、C (7') )、74.48 (C (5') )、58.25、57.99 (C<sub>p</sub>=17.9、18.1 Hz OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN)、55.27、55.24 (MeO-DMTr)、49.27、49.03 (J<sub>C, p</sub>=3.1、4.8 Hz、C (3') )、43.15、42.98 ((Me<sub>2</sub>CH)<sub>2</sub>N)、38.89、38.80 (C (2') )、37.44、37.24 (J<sub>C, p</sub>=5.2、3.2 Hz、C (6') )、24.58、24.54、24.48、24.45、24.35 (5s、Me<sub>2</sub>CH)<sub>2</sub>N)、20.33、20.24 (J<sub>C, p</sub>=5.8、5.7 Hz、OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN)。

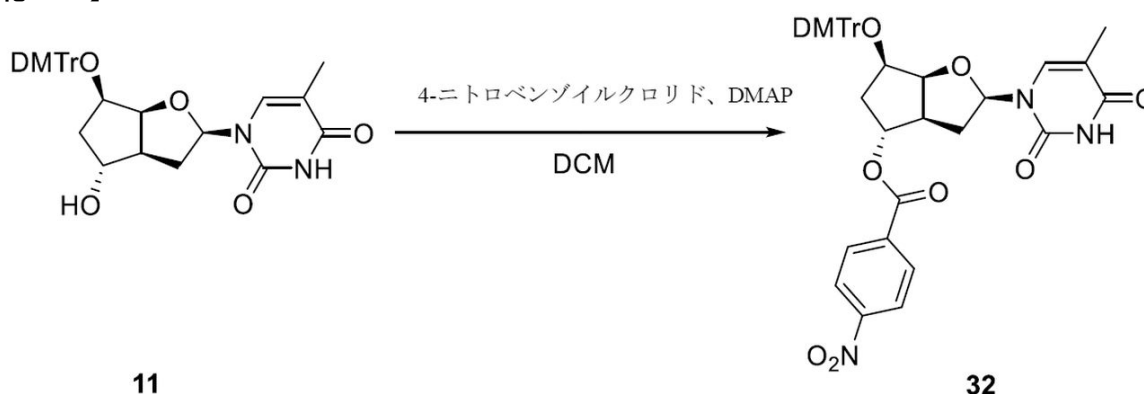
<sup>31</sup>P NMR (121 MHz、CDCl<sub>3</sub>) δ 147.19、146.94。

C<sub>48</sub>H<sub>55</sub>O<sub>8</sub>N<sub>5</sub>P ([M+H]<sup>+</sup>) についてのESI<sup>+</sup>-HRMS m/z 計算値 860.3783、実測値 860.3791。

【0306】

(3'S, 5'R, 7'R) - 1 - {2', 3'-ジデオキシ-3', 5'-エタノ-7'-O-(4-ニトロベンゾイル)-5'-O-[(4,4'-ジメトキシトリフェニル)メチル]-β-D-リボフラノシル} チミン (32)

【化81】



乾燥DCM (8 mL) 中のヌクレオシド11 (100 mg、0.175 mmol) および4-ジメチルアミノピリジン (26 mg、0.21 mmol) の溶液に、4-ニトロベンゾイルクロリド (59 mg、0.315 mmol) を室温で添加する。6時間攪拌した後、飽和NaHCO<sub>3</sub> (5 mL) を添加することにより反応物をクエンチする。次いで、混合物を飽和NaHCO<sub>3</sub> (15 mL) で希釈し、DCM (3×15 mL) で抽出する。合わせた有機相をMgSO<sub>4</sub>で乾燥し、濾過し、蒸発させる。粗生成物をCC (DCM中2.5% MeOH、+0.5% Et<sub>3</sub>N) によって精製して、32 (98 mg、78%) を微量のEt<sub>3</sub>Nを含む白色フォームとして得る。

【0307】

32のデータ：R<sub>f</sub>=0.42 (DCM中5% MeOH)：

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz、CDCl<sub>3</sub>) δ 8.26 (t、J=7.3 Hz、3H、H-arom、HN (3))、8.00 (d、J=8.9 Hz、2H、H-arom)、7.72 (d、J=1.0 Hz、1H、H-C (6))、7.55 (d、J=6.9 Hz、2H、H-arom)、7.44 (dd、J=8.8、6.6 Hz、4H、H-arom)、7.35-7.18 (m、3H、H-arom)、6.83 (dd、J=9.0、2.6 Hz、4H、H-arom)、6.01 (dd、J=8.2、5.2 Hz、1H、H-C (1'))、4.96 (d、J=3.3 Hz、1H、H-C (7'))、4.33-4.24 (m、1H、H-C (4'))、4.24-4.13 (m、1H、H-C (5'))、3.78 (d、J=0.9 Hz、6H、MeO)、2.92-2.72 (m、2H、H-C (3')、H-C (2'))、1.81 (d、J=0.6 Hz、3H、Me-C (5))、1.79-1.62 (m、2H、H-C (6'))、1.22 (d、J=5.9 Hz、1H、H-C (2'))。

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz、CDCl<sub>3</sub>) δ 164.05、163.84 (C (4)、CO<sub>2</sub>R)、158.81 (MeO-C-arom)、150.64、150.52 (

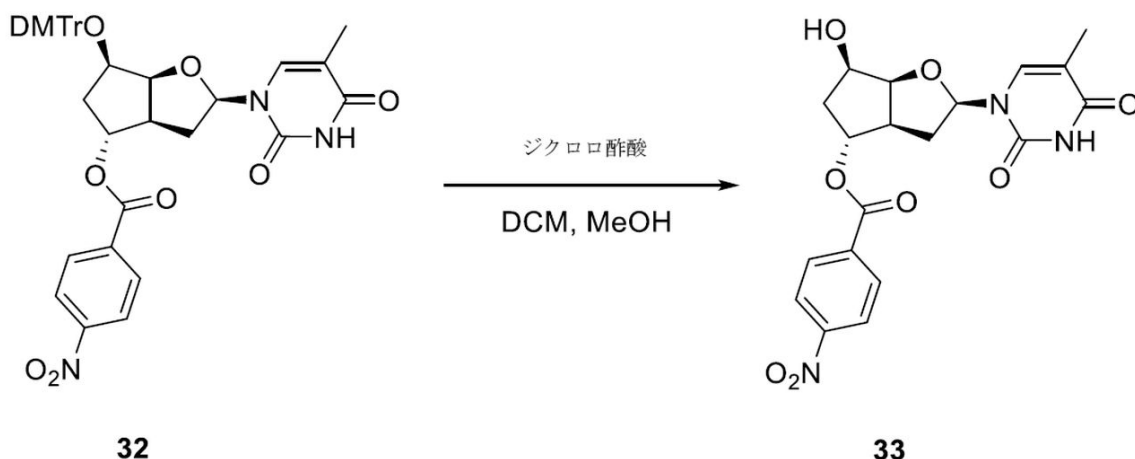
$O_2N-C-arom$ 、 $C(2)$ )、145.29、136.43、136.34 ( $C-arom$ )、135.18 ( $C(6)$ )、130.62、130.20、130.17、128.16、128.01、127.15、123.58、113.30、113.27 ( $C-arom$ )、111.17 ( $C(5)$ )、87.53 ( $C(Ph)_3$ )、86.29 ( $C(1')$ )、81.59 ( $C(4')$ )、78.65 ( $C(7')$ )、74.16 ( $C(5')$ )、55.26 ( $MeO-DMTr$ )、47.07 ( $C(3')$ )、37.35 ( $C(2')$ )、35.71 ( $C(6')$ )、12.51 ( $Me-C(5)$ )。

$C_{40}H_{37}O_{10}N_3Na$  ( $[M+Na]^+$ ) についての  $ESI^+-HRMS$   $m/z$  計算値 742.2371、実測値 742.2375

【0308】

((3'S, 5'R, 7'R) - 1 - {2', 3'-ジデオキシ-3', 5'-エタノ-7'-O-(4-ニトロベンゾイル) -  $\beta$ -D-リボフラノシル} チミン (33)

【化82】



乾燥 DCM (1 mL) および MeOH (0.4 mL) の混合物中の 32 (60 mg、0.083 mmol) の溶液に、ジクロロ酢酸 (0.2 mL) を室温で滴下して添加する。3 時間攪拌した後、混合物を飽和  $NaHCO_3$  (15 mL) で希釈し、DCM (3 × 10 mL) で抽出する。合わせた有機相を  $MgSO_4$  で乾燥し、濾過し、蒸発させる。粗生成物を CC (DCM 中 5% MeOH) によって精製して、33 (29 mg、84%) を白色フォームとして得る。X 線分析に好適な結晶を、 $H_2O/MeOH$  の混合物中の再結晶によって得る。

【0309】

33 のデータ:  $R_f = 0.18$  (DCM 中 5% MeOH) :

$^1H$  NMR (400 MHz, DMSO)  $\delta$  11.33 (s, 1H, H-N(3))、8.34 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H, H-arom)、8.27–8.13 (m, 2H, H-arom)、7.78 (s, 1H, H-C(6))、5.96 (dd,  $J = 9.3, 5.6$  Hz, 1H, H-C(1'))、5.18 (t,  $J = 3.8$  Hz, 1H, H-C(7'))、5.12 (d,  $J = 6.0$  Hz, 1H, OH)、4.33 (dd,  $J = 7.3, 4.7$  Hz, 1H, H-C(4'))、4.27 (td,  $J = 10.5, 5.5$  Hz, 1H, H-C(5'))、2.90 (dd,  $J = 17.2, 8.5$  Hz, 1H, H-C(3'))、2.58–2.46 (m, 1H, H-C(2'))、2.30 (ddd,  $J = 13.8, 8.8, 5.3$  Hz, 1H, H-C(6'))、2.03 (dd,  $J = 9.6, 4.2$  Hz, 1H, H-C(6'))、1.92–1.76 (m, 4H, H-C(2'), Me-C(5))。

$^{13}C$  NMR (101 MHz, DMSO)  $\delta$  164.33、164.23 ( $C(4)$ 、 $CO_2R$ )、150.91、150.75 ( $O_2N-C-arom$ 、 $C(2)$ )、136.79 ( $C-arom$ )、135.69 ( $C(6)$ )、131.20、124.32 (

CH-arom)、109.89 (C (5))、85.31 (C (1'))、81.48 (C (4'))、80.07 (C (7'))、71.72 (C (5'))、47.18 (C (3'))、37.77 (C (6'))、35.48 (C (2'))、12.66 12.58 (Me-C (5))。

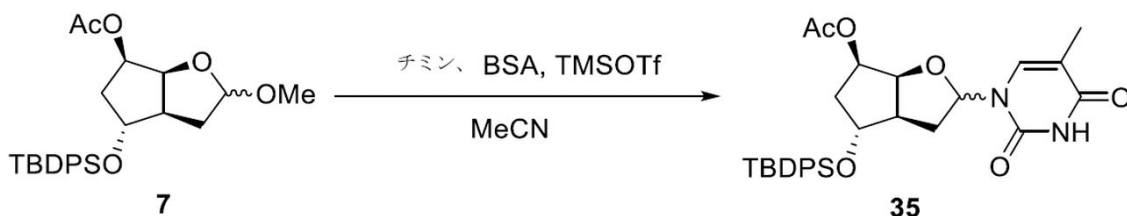
C<sub>19</sub>H<sub>20</sub>O<sub>8</sub>N<sub>3</sub> ([M+H]<sup>+</sup>) についてのESI<sup>+</sup>-HRMS m/z 計算値 418.1245、実測値 418.1242。

【0310】

(3'R, 5'R, 7'R) - 1 - {5'-O-アセチル-7'-[(tert-ブチルジフェニルシリル)オキシ] - 2', 3'-ジデオキシ-3', 5'-エタノ-α, β-D-リボフラノシル} チミン (35)

10

【化83】



乾燥MeCN (12mL) 中の糖7 (933mg、2.05mmol) およびチミン (372mg、3.08mmol) の溶液に、BSA (1.5mL、6.15mmol) を室温で滴下して添加する。室温で50分間攪拌した後、溶液を0℃に冷却し、TMSOTf (0.45mL、2.5mmol) を滴下して添加する。さらに0℃で3時間および室温で15時間攪拌した後、反応混合物を飽和NaHCO<sub>3</sub> (100mL) で希釈し、DCM (4×40mL) で抽出する。合わせた有機相をMgSO<sub>4</sub>で乾燥し、濾過し、蒸発させる。粗生成物をCC (DCM中2.5%イソプロパノール) によって精製して、アノマー比α/β

20

【化84】

≈

85:15の35 (924mg、82%) の混合物を白色フォームとして得る。

30

【0311】

35のデータ: R<sub>f</sub> = 0.56 (DCM中7%MeOH) :

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.14 (br, 1H, H-N (3))、7.53 (dd, J = 7.7, 1.6 Hz, 4H, H-arom)、7.39-7.23 (m, 6H, H-arom)、7.09 (d, J = 1.0 Hz, 0.15 H, H-C (6))、6.87 (d, J = 1.0 Hz, 0.85 H, H-C (6))、5.83 (t, J = 6.2 Hz, 0.85 H, H-C (1'))、5.80-5.70 (m, 0.15 H, H-C (1'))、5.36-5.04 (m, 1H, H-C (5'))、4.89 (dd, J = 6.3, 5.2 Hz, 1H, H-C (4'))、4.62 (dd, J = 7.1, 5.6 Hz, 0.15 H, H-C (4'))、4.01-3.85 (m, 1H, H-C (7'))、2.76-2.55 (m, 1H, H-C (3'))、2.09-1.91 (m, 4H, H-C (6')、MeCO<sub>2</sub>)、1.90-1.58 (m, 6H, H-C (6')、H-C (2')、Me-C (5))、0.96 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-Si)

40

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 170.70 (MeCO<sub>2</sub>)、163.87 (C (4))、150.29 (C (2))、135.69、135.67 (CH-arom)、134.99 (C (6))、133.58、133.18 (C-arom)、130.03、127.87 (CH-arom)、111.05 (C (5))、87.56 (C (1'))、82.85 (C (4'))、76.50 (C (7'))、74.76 (C (5'))、50.72 (C (3'))、37.79 (C (6'))、36.94 (C (2'))

50

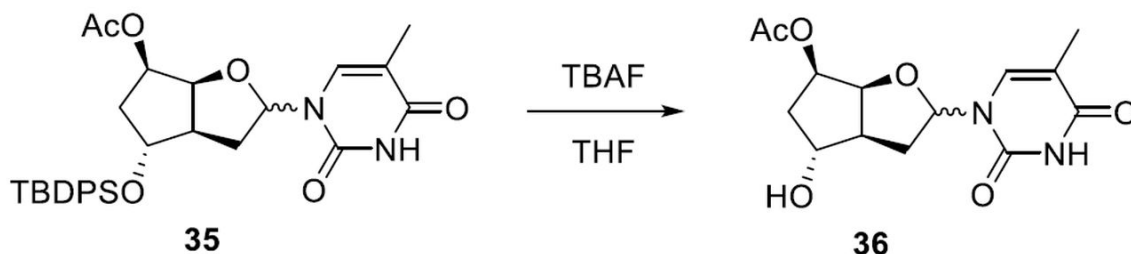
)、26.88 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-Si)、20.95 (MeCO<sub>2</sub>)、19.01 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-Si)、12.63 (Me-C(5))。

C<sub>30</sub>H<sub>37</sub>O<sub>6</sub>N<sub>2</sub>Si ([M+H]<sup>+</sup>) についてのESI<sup>+</sup>-HRMS m/z 計算値549.2415、実測値549.2401。

【0312】

(3'S, 5'R, 7'R) - 1 - {5'-O-アセチル-2', 3'-ジデオキシ-3', 5'-エタノ-7'-ヒドロキシ-α, β-D-リボフラノシル} チミン (36)

【化85】



10

乾燥THF (10 mL) 中のヌクレオシド35 (924 mg、1.68 mmol) の溶液に、TBAF (THF中1 M、3.4 mL、3.4 mmol) を室温で添加する。室温で2時間攪拌した後、反応混合物を飽和NaHCO<sub>3</sub> (80 mL) で希釈し、EtOAc (3×80 mL) およびDCM (2×80 mL) で抽出する。合わせた有機相をMgSO<sub>4</sub>で乾燥し、濾過し、蒸発させる。粗生成物をCC (DCM中5% MeOH) によって精製して、36 (391 mg、75%) のアノマー混合物を得る。

20

【0313】

36のデータ: R<sub>f</sub> = 0.24 (DCM中7% MeOH) :

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.66 (br, 0.15 H, H-N(3)), 9.63 (br, 0.85 H, H-N(3)), 7.27 (d, J = 1.0 Hz, 0.15 H, H-C(6)), 7.06 (d, J = 1.0 Hz, 0.85 H, H-C(6)), 6.00 (t, J = 6.1 Hz, 0.85 H, H-C(1')), 5.91 (dd, J = 8.8, 5.5 Hz, 0.15 H, H-C(1')), 5.26-5.10 (m, 1 H, H-C(5')), 4.92 (dd, J = 6.5, 5.3 Hz, 0.85 H, H-C(4')), 4.65 (dd, J = 6.9, 5.7 Hz, 0.15 H, H-C(4')), 4.19-4.03 (m, 1 H, H-C(7')), 2.91-2.72 (m, 2 H, H-C(3')), OH), 2.64 (ddd, J = 13.3, 9.8, 5.5 Hz, 0.15 H, H-C(2')), 2.25-2.15 (m, 1.70 H, H-C(2')), 2.05 (s, 0.45 H, MeCO<sub>2</sub>), 2.04 (s, 2.55 H, MeCO<sub>2</sub>), 2.03-1.89 (m, 2 H, H-C(6')), 1.88 (d, J = 0.7 Hz, 0.45 H, Me-C(5)), 1.85 (d, J = 0.6 Hz, 2.55 H, Me-C(5)), 1.42-1.28 (m, 0.15 H, H-C(2'))。

30

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 170.87 (MeCO<sub>2</sub>), 164.26 (C(4)), 150.66 (C(2)), 135.54 (C(6)), 111.22 (C(5)), 87.97 (C(1')), 82.97 (C(4')), 75.08 (C(7')), 74.52 (C(5')), 50.07 (C(3')), 37.81 (C(2')), 37.23 (C(6')), 21.02 (MeCO<sub>2</sub>), 12.67 (Me-C(5))。

40

C<sub>14</sub>H<sub>19</sub>O<sub>6</sub>N<sub>2</sub> ([M+H]<sup>+</sup>) についてのESI<sup>+</sup>-HRMS m/z 計算値311.1238、実測値311.1234。

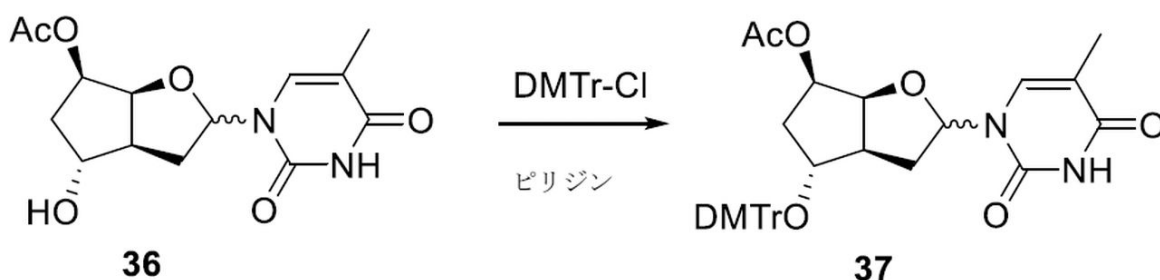
【0314】

(3'S, 5'R, 7'R) - 1 - {5'-O-アセチル-2', 3'-ジデオキシ-3', 5'-エタノ-7'-O-[(4,4'-ジメトキシトリフェニル)メチル]-α, β-D-リボ

50

## フラノシル} チミン (37)

【化86】



10

乾燥ピリジン (7 mL) 中のヌクレオシド 36 (364 mg、1.17 mmol) の溶液に、DMTr-Cl (1.19 g、3.51 mmol) を室温で添加する。溶液を 1 日間攪拌し、次いで飽和 NaHCO<sub>3</sub> (50 mL) で希釈し、DCM (3×50 mL) で抽出する。合わせた有機相を MgSO<sub>4</sub> で乾燥し、濾過し、蒸発させる。粗生成物を CC (EtOAc/ヘキサン 2:1、+0.5% Et<sub>3</sub>N) によって精製して、37 (690 mg、96%) のアノマー混合物を黄色フォームとして得る。

【0315】

37 のデータ: R<sub>f</sub> = 0.70 (DCM 中 8% MeOH):  
<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.17 (br, 0.85H, H-N (3)), 8.56 (br, 0.15H, H-N (3)), 7.38–7.32 (m, 2H, H-arom), 7.29–7.15 (m, 7H, H-arom), 6.82 (d, J = 1.1 Hz, 1H, H-C (6)), 6.76 (d, J = 8.9 Hz, 4H, H-arom), 5.86 (t, J = 6.0 Hz, 0.85H, H-C (1')), 5.71 (dd, J = 8.9, 5.4 Hz, 0.15H, H-C (1')), 5.25 (dd, J = 10.2, 5.6 Hz, 0.15H, H-C (5')), 5.21–5.11 (m, 0.85H, H-(C5')), 4.78 (dd, J = 6.7, 4.8 Hz, 0.85H, H-C (4')), 4.49 (dd, J = 7.1, 5.3 Hz, 0.15H, H-C (4')), 3.84 (br, 1H, H-C (7')), 3.72, 3.71 (2s, 6H, MeO), 2.34–2.23 (m, 1H, H-C (3')), 2.01, 1.99 (2s, 3H, MeCO<sub>2</sub>), 1.82 (d, J = 0.5 Hz, Me-C (5)), 1.80–1.56 (m, 4H, H-C (2'), H-C (6')).

20

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 170.69 (MeCO<sub>2</sub>), 163.91 (C (4)), 158.82 (MeO-C-arom), 150.33 (C (2)), 145.34, 136.64, 136.58 (C-arom), 135.00 (C (6)), 130.25, 128.39, 128.07, 127.15, 113.41 (CH-arom), 111.04 (C (5)), 87.70 (C (Ph)<sub>3</sub>), 87.31 (C (1')), 83.15 (C (4')), 77.16 (C (7')), 74.96 (C (5')), 55.37 (MeO-DMTr), 49.12 (C (3')), 37.55 (C (2')), 36.82 (C (6')), 21.07 (MeC<sub>2</sub>O), 12.66 (Me-C (5)).

30

40

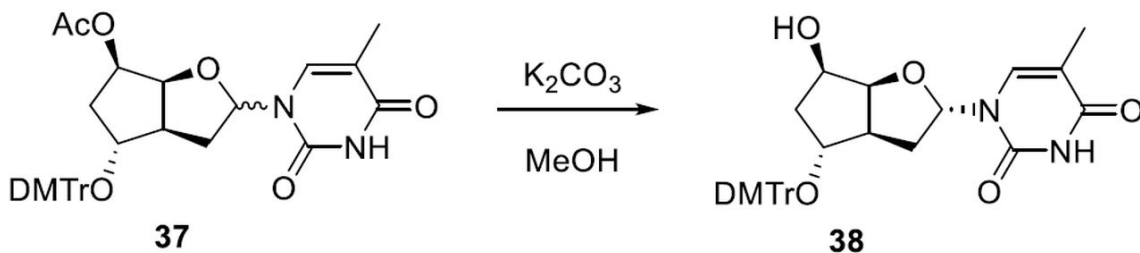
C<sub>35</sub>H<sub>36</sub>O<sub>8</sub>N<sub>2</sub> ([M+H]<sup>+</sup>) についての ESI<sup>+</sup>-HRMS m/z 計算値 612.2466、実測値 612.2453。

【0316】

(3'S, 5'R, 7'R) - 1 - {2', 3'-ジデオキシ-3', 5'-エタノ-7'-O-[(4, 4'-ジメトキシトリフェニル)メチル] - α-D-リボフラノシル} チミン (38)

50

## 【化 8 7】



10

乾燥 MeOH (10 mL) 中のヌクレオシド 37 (690 mg、1.12 mmol) の溶液に、 $\text{K}_2\text{CO}_3$  (467 mg、3.36 mmol) を室温で添加する。溶液を 3 時間攪拌し、次いで飽和 NaCl (60 mL) で希釈し、DCM ( $3 \times 60$  mL) で抽出する。合わせた有機相を  $\text{MgSO}_4$  で乾燥し、濾過し、蒸発させる。粗生成物を CC (Et<sub>2</sub>O 中の 3% イソプロパノール、+ 0.5% Et<sub>3</sub>N) によって精製して、 $\alpha$ -アノマーである 38 (550 mg、86%) を白色固体として得る。

## 【0317】

38 のデータ:  $R_f = 0.39$  (DCM 中 5% MeOH) :

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  9.37 (br, s, 1H, H-N (3)), 7.39–7.31 (m, 2H, H-arom), 7.25 (d,  $J = 8.3$  Hz, 4H, H-arom), 7.20 (t,  $J = 7.7$  Hz, 2H, H-arom), 7.16–7.08 (m, 1H, H-arom), 6.78 (d,  $J = 1.1$  Hz, 1H, H-C (6)), 6.74 (d,  $J = 8.8$  Hz, 4H, H-arom), 5.91 (dd,  $J = 6.5, 4.9$  Hz, 1H, H-C (1')), 4.57 (dd,  $J = 7.2, 4.4$  Hz, 1H, H-C (4')), 4.35–4.18 (m, 1H, H-C (5')), 3.86 (d,  $J = 4.7$  Hz, 1H, H-C (7')), 3.69 (s, 6H, MeO), 2.53 (br, 1H, OH), 2.22 (dd,  $J = 15.3, 6.3$  Hz, 1H, H-C (3')), 1.85–1.69 (m, 5H, Me-C (5), H-C (2'), H-C (6')), 1.66–1.49 (m, 2H, H-C (2'), H-C (6'))).

20

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  163.98 (C (4)), 158.67 (MeO-C-arom), 150.47 (C (2)), 145.48, 136.80, 136.75 (C-arom), 134.94 (C (6)), 130.19, 130.18, 128.35, 127.97, 127.01, 113.31 (CH-arom), 111.04 (C (5)), 87.82 (C (Ph)<sub>3</sub>), 87.05 (C (1')), 85.74 (C (4')), 78.26 (C (7')), 73.33 (C (5')), 55.31 (MeO-DMTr), 48.81 (C (3')), 40.21 (C (6')), 37.68 (C (2')), 12.65 (Me-C (5)).

30

$\text{C}_{33}\text{H}_{35}\text{O}_7\text{N}_2$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) についての ESI<sup>+</sup>-HRMS  $m/z$  計算値 571.2439、実測値 571.2421。

40

## 【0318】

(3' S, 5' R, 7' R) - 1 - {5' - O - [(2-シアノエトキシ) - ジイソプロピルアミノホスファニル] 2', 3' - ジデオキシ - 3', 5' - エタノール - 7' - O - [(4, 4' - ジメトキシトリフェニル) メチル] -  $\alpha$ -D-リボフラノシル} チミン (39)

50

10

## 20

30

40

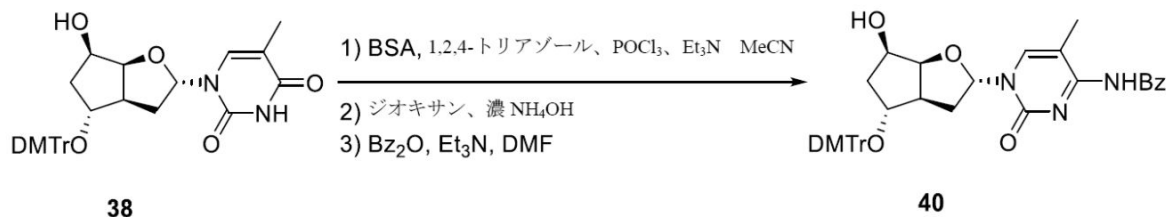
50

$C_{42}H_{52}O_8N_4P$  ( $[M+H]^+$ ) についてのESI<sup>+</sup>-HRMS  $m/z$  計算値 771.3517、実測値 771.3517。

【0320】

(3', S, 5', R, 7', R) <sup>4</sup>Nベンゾイル-1-{2', 3'-ジデオキシ-3', 5'-エタノ-7'-O-[(4, 4'-ジメトキシトリフェニル)メチル]-α-D-リボフラノシル}-5-メチルシトシン (40)

【化89】



乾燥MeCN (5 mL) 中のヌクレオシド38 (268 mg、0.470 mmol) の溶液に、BSA (0.28 mL、1.13 mmol) を0℃で滴下して添加し、次いで、溶液を室温で一晩攪拌する。別のフラスコ中で、乾燥MeCN (50 mL) 中の1, 2, 4-トリアゾール (1.14 g、16.5 mmol) の懸濁液を0℃に冷却し、POCl<sub>3</sub> (0.35 mL、3.8 mmol)、続いてEt<sub>3</sub>N (2.62 mL、18.8 mmol) を添加する。懸濁液を0℃で30分間攪拌し、次いで、事前に調製したシリル化合物38の溶液を懸濁液に添加し、混合物をさらに室温で7時間攪拌する。飽和NaHCO<sub>3</sub> (10 mL) を添加することにより反応物をクエンチし、MeCNを減圧下で除去し、得られた混合物を飽和NaHCO<sub>3</sub> (30 mL) で希釈し、DCM (3×30 mL) で抽出する。合わせた有機相をMgSO<sub>4</sub>で乾燥し、濾過し、蒸発させる。

【0321】

次いで、粗生成物を1, 4-ジオキサン (10 mL) および濃NH<sub>4</sub>OH (10 mL) の混合物に溶解する。室温で3時間攪拌した後、混合物を真空中でその体積の半分に減少させ、飽和NaHCO<sub>3</sub> (25 mL) で希釈し、DCM (4×30 mL) で抽出する。合わせた有機相をMgSO<sub>4</sub>で乾燥し、濾過し、蒸発させる。

【0322】

次いで、粗生成物を乾燥DMF (10 mL) に溶解する。Et<sub>3</sub>N (80 μL、0.56 mmol)、続いてBz<sub>2</sub>O (266 mg、1.18 mmol) を室温で添加し、溶液を一晩攪拌する。得られた褐色がかった溶液を、飽和NaHCO<sub>3</sub> (40 mL) を注意深く添加することによりクエンチし、DCM (4×40 mL) で抽出する。合わせた有機相をMgSO<sub>4</sub>で乾燥し、濾過し、蒸発させる。粗生成物をCC (EtOAc/ヘキサン1:1、+0.5% Et<sub>3</sub>N) によって精製して、40 (263 mg、83%) を白色フォームとして得る。

【0323】

40のデータ:  $R_f = 0.53$  (EtOAc/ヘキサン3:1):  
<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 13.11 (br, 1H, NH)、8.30–8.10 (m, 2H, H-arom)、7.47–7.29 (m, 5H, H-arom)、7.28–7.06 (m, 7H, H-arom)、7.00 (d, J=0.8 Hz, 1H, H-C(6))、6.74 (d, J=8.6 Hz, 4H, H-arom)、5.89 (dd, J=6.3, 4.6 Hz, 1H, H-C(1'))、4.61 (dd, J=7.2, 4.5 Hz, 1H, H-C(4'))、4.33–4.20 (m, 1H, H-C(5'))、3.87 (br, 1H, H-C(7'))、3.69 (s, 6H, MeO)、2.32–2.13 (m, 2H, H-C(3')), OH)、1.99 (s, 3H, Me-C(5))、1.87–1.73 (m, 2H, H-C(2')), H-C(6'))、1.66–1.47 (m, 2H, H-C(2')), H-C(6'))。  
<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 179.61 (CONH)、159.7

$C_{40}H_{40}O_7N_3$  ( $[M+H]^+$ ) についてのESI<sup>+</sup>-HRMS  $m/z$  計算値 674.2861、実測値 674.2877。

10

【化 9 0】



30

41のデータ：R<sub>f</sub> = 0.57 (EtOAc／ヘキサン1：1)：

40

50

97 (C (4))、158.76 (MeO-C-arom)、147.81、147.70 (C (2))、145.54 (C-arom)、137.34、136.83 (C (6))、136.77、136.72、136.65、136.55 (C-arom)、132.45、130.22、130.20、129.96、128.34、128.31、128.18、128.00、127.04 (CH-arom)、117.89、117.71 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN)、113.35 (CH-arom)、111.60、111.36 (C (5))、89.24、89.01 (C (Ph)<sub>3</sub>)、87.16、87.12 (C (1'))、85.78、85.62 (J、p=4.3、3.2 Hz、C (4'))、78.20、77.98 (C (7'))、74.68、74.37 (J、p=13.4、18.2 Hz、C (5'))、58.70、58.44 (J、p=18.5、20.0 Hz、(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN))、55.36、55.33 (MeO-DMTr)、48.65、48.44 (C (3'))、43.27、43.14 (J、p=12.4、12.3 Hz (Me<sub>2</sub>CH)<sub>2</sub>N)、39.87、39.64 (J<sub>C</sub>、p=3.4、3.7 Hz (C (6'))、38.30、38.22 (C (2'))、24.80、24.72、24.70、24.67、24.63 (Me<sub>2</sub>CH)<sub>2</sub>N)、20.39、20.37 (J<sub>C</sub>、p=7.2、6.8 Hz、OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN)、13.72 (Me-C (5))。

10

<sup>31</sup>P NMR (121 MHz、CDCl<sub>3</sub>) δ 148.18、147.96。

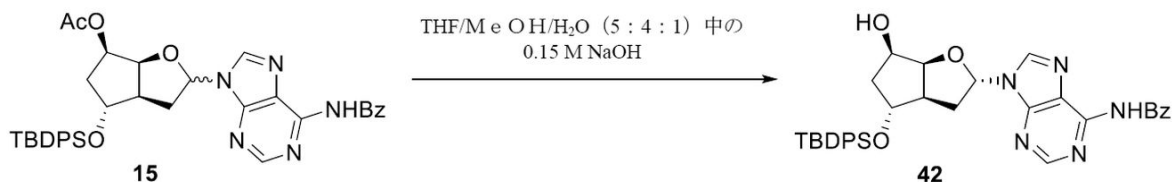
C<sub>49</sub>H<sub>57</sub>O<sub>8</sub>N<sub>5</sub>P ([M+H]<sup>+</sup>) についてのESI<sup>+</sup>-HRMS m/z 計算値 874.3939、実測値 874.3946。

20

【0326】

(3'R, 5'R, 7'R) 6-Nベンゾイル-9-{7'-[(tert-ブチルジフェニルシリル)オキシ]-2', 3'-ジデオキシ-3', 5'-エタノ-α-D-リボフラノシル} アデニン (42)

【化91】



30

ヌクレオシド15 (1.74 g、2.64 mmol) をTHF/MeOH/H<sub>2</sub>O (5:4:1、80 mL) 中の0.15 M NaOHに0℃で溶解する。反応物を20分間攪拌し、NH<sub>4</sub>Cl (1.06 g) を添加することによりクエンチする。次いで、溶媒を減圧下で除去し、生成物をCC (DCM中5%イソプロパノール) によって精製して、42 (α-アノマー、836 mg、51%) および16 (β-アノマー、287 mg、18%) を白色フォームとして得る。

【0327】

42のデータ：R<sub>f</sub>=0.35 (DCM中5% MeOH)：

40

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz、CDCl<sub>3</sub>) δ 9.34 (s、1H、NH)、8.71 (s、1H、H-C (2))、8.02 (d、J=7.4 Hz、2H、H-arom)、7.92 (s、1H、H-C (8))、7.68-7.58 (m、4H、H-arom)、7.58-7.31 (m、9H、H-arom)、6.23 (dd、J=6.7、2.4 Hz、1H、H-C (1'))、4.74 (dd、J=6.6、4.9 Hz、1H、H-C (4'))、4.49 (dt、J=12.5、6.3 Hz、1H、H-C (5'))、4.10 (br、1H、H-C (7'))、3.07 (d、J=6.7 Hz、1H、OH)、2.92 (dd、J=15.4、7.3 Hz、1H、H-C (3'))、2.52-2.35 (m、1H、H-C (2'))、2.10-1.97 (m、1H、H-C (6'))、1.94-1.77 (m、2H、H-C (2')、H-C (6'))、1.06 (

50

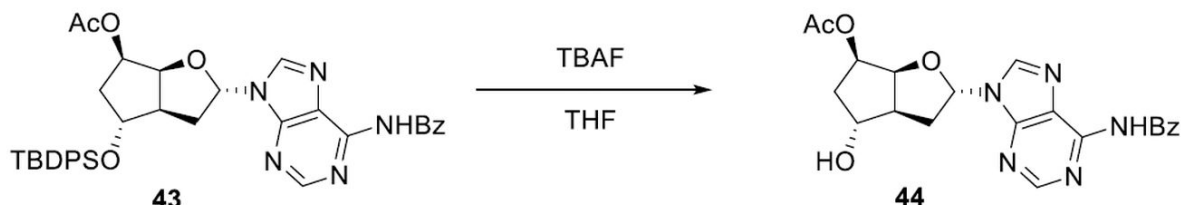


、128.99、128.02、127.99、127.97 (CH-arom)、123.64 (C(5))、87.37 (C(1'))、83.37 (C(4'))、76.63 (C(7'))、74.51 (C(5'))、51.19 (C(3'))、37.44 (C(2'))、37.32 (C(6'))、27.01 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-Si)、21.08 (MeCO<sub>2</sub>)、19.14 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-Si)。

C<sub>37</sub>H<sub>40</sub>O<sub>5</sub>N<sub>5</sub>Si ([M+H]<sup>+</sup>) についてのESI<sup>+</sup>-HRMS m/z 計算値662.2793、実測値662.2787。

【0330】

(3'S, 5'R, 7'R) 6-Nベンゾイル-9-{5'-O-アセチル-2', 3'-ジデオキシ-3', 5'-エタノ-7'-ヒドロキシ-α-D-リボフラノシル} アデニン(44) 10  
【化93】



乾燥THF(50mL)中のヌクレオシド43(990mg、1.50mmol)の溶液に、TBAF(THF中1M、3.0mL、3.0mmol)を室温で添加する。室温で3.5時間攪拌した後、溶液をEtOAc(30mL)で希釈し、THFを減圧下で除去する。次いで、混合物を飽和NaHCO<sub>3</sub>(50mL)で希釈し、DCM(4×50mL)で抽出する。合わせた有機相をMgSO<sub>4</sub>で乾燥し、濾過し、蒸発させる。粗生成物をCC(DCM中6%MeOH)によって精製して、44(570mg、90%)を微量のTBAFを含む白色フォームとして得る。

【0331】

44のデータ：R<sub>f</sub>=0.33(DCM中10%MeOH)：

<sup>1</sup>H NMR(400 MHz、CDCl<sub>3</sub>) δ 9.60(br、1H、NH)、8.67(s、1H、H-C(2))、8.09(s、1H、H-C(8))、7.96(d、J=7.4 Hz、2H、H-arom)、7.51(t、J=7.4 Hz、1H、H-arom)、7.42(t、J=7.5 Hz、2H、H-arom)、6.33(dd、J=6.7、3.1 Hz、1H、H-C(1'))、5.25(ddd、J=9.7、6.4、5.3 Hz、1H、H-C(5'))、4.92(dd、J=6.4、5.4 Hz、1H、H-C(1'))、4.14(br、2H、H-C(7'))、OH、3.06(dd、J=16.0、6.6 Hz、1H、H-C(3'))、2.87(ddd、J=13.2、9.9、3.0 Hz、1H、H-C(2'))、2.26-2.17(m、1H、H-C(2'))、2.10-1.98(m、5H、H-C(6'))、MeCO<sub>2</sub>。

<sup>13</sup>C NMR(75 MHz、CDCl<sub>3</sub>) δ 170.64(MeCO<sub>2</sub>)、165.27(CONH)、152.49(C(2))、151.26(C(4))、149.58(C(6))、141.64(C(8))、133.60(C-arom)、132.82、128.76、128.06(CH-arom)、123.30(C(5))、87.30(C(1'))、83.17(C(4'))、74.67(C(7'))、74.20(C(5'))、50.41(C(3'))、37.43(C(2'))、36.92(C(6'))、20.96(MeCO<sub>2</sub>)。

C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>O<sub>5</sub>N<sub>5</sub> ([M+H]<sup>+</sup>) についてのESI<sup>+</sup>-HRMS m/z 計算値424.1615、実測値424.1623。

【0332】

(3'S, 5'R, 7'R) 6-Nベンゾイル-9-{5'-O-アセチル-2', 3'-ジデオキシ-3', 5'-エタノ-7'-O-[(4,4'-ジメトキシトリフェニル)メチル]-α-D-リボフラノシル} アデニン(45)

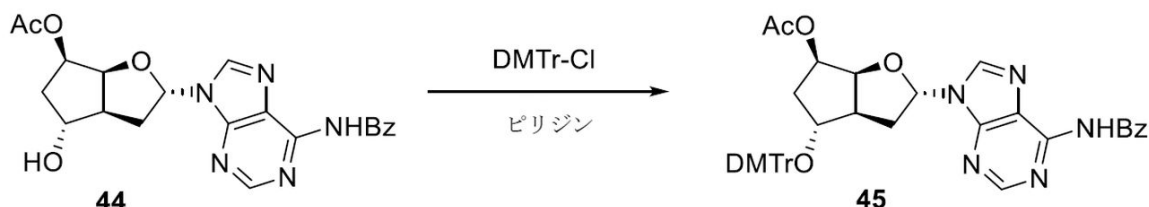
20

30

40

50

## 【化 9 4】



乾燥ピリジン（16 mL）中のヌクレオシド 44（570 mg、1.35 mmol）の溶液に、DMTr-Cl（1.37 g、4.04 mmol）を室温で添加する。溶液を1日間攪拌し、次いで飽和 NaHCO<sub>3</sub>（100 mL）で希釈し、DCM（3×80 mL）で抽出する。合わせた有機相を MgSO<sub>4</sub> で乾燥し、濾過し、蒸発させる。粗生成物を C C（DCM 中 2% MeOH、+0.5% Et<sub>3</sub>N）によって精製して、45（876 mg、89%）を黄色フォームとして得る。

## 【0333】

45 のデータ：R<sub>f</sub> = 0.81（DCM 中 5% MeOH）：

<sup>1</sup>H NMR（300 MHz、CDCl<sub>3</sub>）δ 9.42（d、J = 14.6 Hz、1 H、NH）、8.73（s、1 H、H-C（2'））、8.03（d、J = 7.6 Hz、2 H、H-arom）、7.93（s、1 H、H-C（8'））、7.66–7.55（m、1 H、H-arom）、7.55–7.45（m、4 H、H-arom）、7.45–7.22（m、7 H、H-arom）、6.87（d、J = 8.7 Hz、4 H、H-arom）、6.25（dd、J = 6.6、2.4 Hz、1 H、H-C（1'））、5.47–5.33（m、1 H、H-C（5'））、4.89（dd、J = 6.7、4.9 Hz、1 H、H-C（4'））、4.02（d、J = 2.5 Hz、1 H、H-C（7'））、3.79（s、6 H、MeO）、2.58（dd、J = 16.0、6.9 Hz、1 H、H-C（3'））、2.38（ddd、J = 12.7、10.0、2.4 Hz、1 H、H-C（2'））、2.11（s、3 H、MeCO<sub>2</sub>）、2.09–1.87（m、3 H、H-C（2'）、H-C（6'））。

<sup>13</sup>C NMR（75 MHz、CDCl<sub>3</sub>）δ 170.40（MeCO<sub>2</sub>）、164.84（CONH）、158.66（MeO-C-arom）、152.45（C（2'））、151.22（C（4'））、149.51（C（6'））、145.23（C-arom）、141.23（C（8'））、136.51、133.65（C-arom）、132.68、130.12、128.75、128.33、127.95、127.90、127.03（CH-arom）、123.55（C（5'））、113.27（CH-arom）、87.19（C（Ph）<sub>3</sub>）、87.12（C（1'））、83.25（C（4'））、77.16（C（7'））、74.41（C（5'））、55.23（MeO-DMTr）、49.23（C（3'））、37.61（C（2'））、36.22（C（6'））、20.98（MeCO<sub>2</sub>）。

C<sub>42</sub>H<sub>40</sub>O<sub>7</sub>N<sub>5</sub>（[M+H]<sup>+</sup>）についての ESI<sup>+</sup>-HRMS m/z 計算値 726.2922、実測値 726.2905。

## 【0334】

（3'S, 5'R, 7'R）<sup>6</sup>N-ベンゾイル-9-〔2', 3'-ジデオキシ-3', 5'-エタノー-7'-O-〔（4, 4'-ジメトキシトリフェニル）メチル〕-α-D-リボフラノシル〕アデニン（46）

10

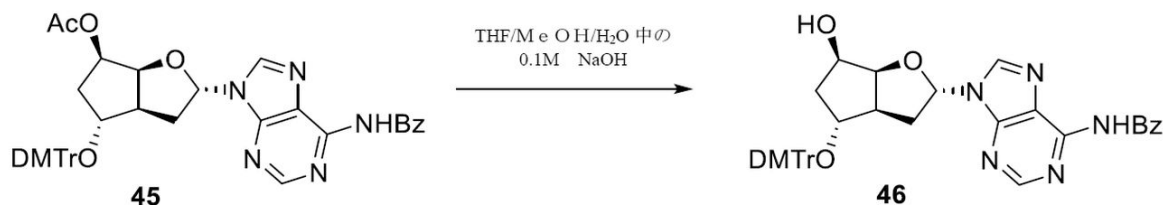
20

30

40

50

## 【化 9 5】



ヌクレオシド 45 (870mg、1.20mmol) を、THF 中 0.1M NaOH / MeOH / H<sub>2</sub>O (5:4:1、50mL) に 0℃ で溶解する。反応物を 0℃ で 30 分間攪拌し、次いで NH<sub>4</sub>Cl (321mg) を添加することによりクエンチする。溶液を飽和 NaHCO<sub>3</sub> (100mL) で希釈し、DCM (4×80mL) で抽出する。合わせた有機相を MgSO<sub>4</sub> で乾燥し、濾過し、蒸発させる。粗生成物を CC (DCM 中 3% MeOH、+0.5% Et<sub>3</sub>N) によって精製して、46 (777mg、94%) を白色フォームとして得る。

## 【0335】

46 のデータ: R<sub>f</sub> = 0.26 (DCM 中 5% MeOH) :

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.39 (s, 1H, NH)、8.61 (s, 1H, H-C(2))、7.93 (d, J = 7.4 Hz, 2H, H-arom)、7.75 (s, 1H, H-C(8))、7.46 (t, J = 7.3 Hz, 1H, H-arom)、7.40–7.31 (m, 4H, H-arom)、7.29–7.16 (m, 6H, H-arom)、7.11 (t, J = 7.2 Hz, 1H, H-arom)、6.73 (d, J = 8.7 Hz, 4H, H-arom)、6.12 (dd, J = 6.5、1.9 Hz, 1H, H-C(1'))、4.53 (dd, J = 7.5、4.5 Hz, 1H, H-C(4'))、4.32 (br, 1H, H-C(5'))、3.90 (t, J = 4.5 Hz, 1H, H-C(7'))、3.66、3.65 (2s, 6H, MeO)、3.31 (br, 1H, OH)、2.36 (dd, J = 16.5、8.1 Hz, 1H, H-C(3'))、2.04 (ddd, J = 12.0、9.9、2.0 Hz, 1H, H-C(2'))、1.92–1.69 (m, 3H, H-C(2')、H-C(6'))。

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 164.92 (CONH)、158.64 (MeO-C-arom)、152.60 (C(2))、151.28 (C(4))、149.61 (C(6))、145.44 (C-arom)、140.71 (C(8))、136.77、133.65 (C-arom)、132.72、130.15、130.12、128.73、128.39、128.04、127.96、127.02 (CH-arom)、123.27 (C(5))、113.28 (CH-arom)、87.11 (C(1'))、87.01 (C(Ph)<sub>3</sub>)、85.60 (C(4'))、78.16 (C(7'))、72.72 (C(5'))、55.28 (MeO-DMTr)、48.89 (C(3'))、39.93 (C(6'))、37.55 (C(2'))。

C<sub>40</sub>H<sub>38</sub>O<sub>6</sub>N<sub>5</sub> ([M+H]<sup>+</sup>) についての ESI<sup>+</sup>-HRMS m/z 計算値 684.2817、実測値 684.2800。

## 【0336】

(3'S, 5'R, 7'R) 6-Nベンゾイル-9-{5'-O-[(2-シアノエトキシ)-ジイソプロピルアミノホスファニル]-2', 3'-ジデオキシ-3', 5'-エタノー7'-O-[(4, 4'-ジメトキシトリフェニル)メチル]-α-D-リボフラノシル} アデニン (47)

10

20

30

40

50

## 【化 9 6】



乾燥DCM (7 mL) 中のヌクレオシド46 (199 mg、0.290 mmol) および5-(エチルチオ)-1H-テトラゾール (57 mg、0.44 mmol) の溶液に、2-シアノエチルN, N, N', N'-テトライソプロピルホスホルジアミダイト (0.16 mL、0.49 mmol) を室温で滴下して添加する。60分間攪拌した後、反応混合物を飽和NaHCO<sub>3</sub> (20 mL) で希釈し、DCM (3×20 mL) で抽出する。合わせた有機相をMgSO<sub>4</sub>で乾燥し、濾過し、蒸発させる。粗生成物をCC (EtOAc、+0.5% Et<sub>3</sub>N) によって精製して、47 (197 mg、2つの異性体の混合物、77%) を白色フォームとして得る。

## 【0337】

47のデータ：R<sub>f</sub> = 0.75 (DCM中5% MeOH)：

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz、CDCl<sub>3</sub>) δ 8.98 (br、1H、NH)、8.68、8.67 (2s、1H、C(2))、7.94 (d、J=7.6 Hz、2H、H-arom)、7.90、7.84 (2s、1H、C(8))、7.56-7.49 (m、1H、H-arom)、7.48-7.34 (m、4H、H-arom)、7.30-7.10 (m、7H、H-arom)、6.80-6.69 (m、4H、H-arom)、6.21、6.15 (2dd、J=6.8、2.2 Hz、1H、H-C(1'))、4.69、4.59 (2dd、J=7.3、4.5 Hz、1H、H-C(4'))、4.44 (tt、J=12.3、6.3 Hz、1H、H-C(5'))、3.90 (dd、J=9.0、3.8 Hz、1H、H-C(5'))、3.82-3.63 (m、8H、MeO、OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN)、3.59-3.43 (m、2H、(Me<sub>2</sub>CH)<sub>2</sub>N)、2.61-2.49 (m、2H、OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN)、2.47-2.07 (m、2H、H-C(3'))、H-C(2'))、1.98-1.66 (m、3H、H-C(2'))、H-C(6'))、1.15-1.03 (m、12H、(Me<sub>2</sub>CH)<sub>2</sub>N)。

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz、CDCl<sub>3</sub>) δ 164.67 (CONH)、158.77 (MeO-C-arom)、152.58 (C(2))、151.34、151.29 (C(4))、149.46 (C(6))、145.55、145.54 (C-arom)、141.58、141.50 (C(8))、136.87、136.85、136.84、133.85 (C-arom)、132.85、130.26、130.23、130.20、128.97、128.47、128.43、128.02、127.96、127.08 (CH-arom)、123.62、123.58 (C(5))、117.91、117.70 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN)、113.37 (CH-arom)、87.80、87.67 (C(1'))、87.20、87.14 (C(Ph)<sub>3</sub>)、85.29、85.22 (J<sub>C</sub>、p=4.2、3.1 Hz、C(4'))、78.16、77.96 (C(7'))、74.28、73.98 (J<sub>C</sub>、p=14.8、18.4 Hz、C(5'))、58.80、58.61 (J<sub>C</sub>、p=16.2、17.3 Hz OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN)、55.37、55.35 (MeO-DMTr)、49.02、48.91 (C(3'))、43.29、43.16 (J<sub>C</sub>、p=8.9、9.0 Hz、(Me<sub>2</sub>CH)<sub>2</sub>N)、39.09 (C(6'))、37.99、37.95 (C(2'))、24.82、24.77、24.74、24.70、24.64 ((Me<sub>2</sub>CH)<sub>2</sub>N)、20.43、20.42 (J<sub>C</sub>、p=1.4、1.9 Hz、OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN)。

<sup>31</sup>P NMR (121 MHz、CDCl<sub>3</sub>) δ 148.14、148.11。

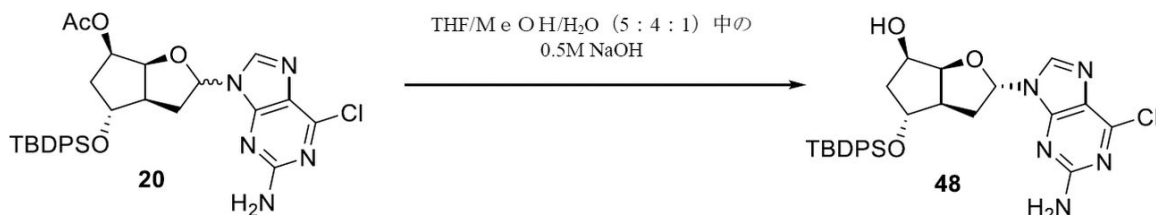
C<sub>45</sub>H<sub>56</sub>O<sub>7</sub>N<sub>8</sub>P ([M+H]<sup>+</sup>) についてのESI<sup>+</sup>-HRMS m/z 計算値

884.3895、実測値884.3904。

【0338】

(3' R, 5' R, 7' R) - 2 - アミノ - 6 - クロロ - 9 - {7' - [(tert-ブチルジフェニルシリル) オキシ] - 2', 3' - ジデオキシ - 3', 5' - エタノ - α - D - リボフラノシル} プリン (48)

【化97】



10

ヌクレオシド20 (1.78 g、3.01 mmol) を、THF/MeOH/H<sub>2</sub>O (5:4:1、15 mL) 中の0.5 M NaOHに0℃で溶解する。反応物を0℃で20分間攪拌し、NH<sub>4</sub>Cl (484 mg) の添加によりクエンチする。次いで、懸濁液を飽和NaHCO<sub>3</sub> (100 mL) で希釈し、DCM (4×75 mL) で抽出する。合わせた有機相をMgSO<sub>4</sub>で乾燥し、濾過し、蒸発させる。粗生成物をCC (DCM中3% MeOH) によって精製して、48 (α-アノマー、992 mg、60%) および21 (β-アノマー、428 mg、25%) を白色フォームとして得る。

20

【0339】

48のデータ：R<sub>f</sub> = 0.34 (DCM中5% MeOH)：

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz、CDCl<sub>3</sub>) δ 7.71–7.60 (m、5H、H-arom、H-(C(8))、7.49–7.34 (m、6H、H-arom)、6.08 (dd、J=6.9、2.6 Hz、1H、H-C(1'))、5.26 (s、2H、NH<sub>2</sub>)、4.70 (dd、J=7.5、4.8 Hz、1H、H-C(4'))、4.47 (dt、J=10.0、5.1 Hz、1H、H-C(5'))、4.11 (t、J=3.3 Hz、1H、H-C(7'))、2.87 (dd、J=16.5、7.7 Hz、1H、H-C(3'))、2.57 (br、1H、OH)、2.27 (ddd、J=14.0、9.9、2.6 Hz、1H、H-C(2'))、2.10–2.01 (m、1H、H-C(6'))、1.92–1.76 (m、2H、H-C(2')、H-C(6'))、1.06 (s、9H、(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-Si)。

30

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz、CDCl<sub>3</sub>) δ 159.09 (C(2))、153.05 (C(4))、151.46 (C(6))、139.91 (C(8))、135.71 (CH-arom)、133.96、133.27 (C-arom)、130.00、129.96、127.86、127.83 (CH-arom)、125.52 (C(5))、86.46 (C(1'))、84.92 (C(4'))、77.40 (C(7'))、72.63 (C(5'))、50.55 (C(3'))、40.92 (C(6'))、36.78 (C(2'))、26.88 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-Si)、19.01 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-Si)。

40

C<sub>28</sub>H<sub>33</sub>O<sub>3</sub>N<sub>5</sub>ClSi ([M+H]<sup>+</sup>) についてのESI<sup>+</sup>-HRMS m/z 計算値550.2036、実測値550.2019。

【0340】

(3' R, 5' R, 7' R) - 9 - {7' - [(tert-ブチルジフェニルシリル) オキシ] - 2', 3' - ジデオキシ - 3', 5' - エタノ - α - D - リボフラノシル} グアニン (49)

50

## 【化 9 8】



乾燥 DCM (15 mL) 中のヌクレオシド 48 (610 mg、1.03 mmol) の溶液に、3-ヒドロキシプロピオニトリル (0.28 mL、4.12 mmol)、続いて 1, 5, 7-トリアザビシクロ [4.4.0] デス-5-エン (287 mg、2.06 mmol) を室温で添加する。室温で 4 時間攪拌した後、3-ヒドロキシプロピオニトリル (0.28 mL、3.23 mmol) の第 2 の部分、続いて 1, 5, 7-トリアザビシクロ [4.4.0] デス-5-エン (287 mg、2.06 mmol) を添加する。反応物をさらに 2 日間攪拌し、次いで CC (DCM 中 10% MeOH) によって直接精製して、49 (500 mg、87%) を白色フォームとして得る。

## 【0341】

49 のデータ:  $R_f = 0.30$  (DCM 中 10% MeOH) :

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz、MeOD)  $\delta$  7.73–7.61 (m、5H、H-arom、H-C(8))、7.53–7.32 (m、6H、H-arom)、6.06 (dd、 $J = 6.9, 3.7$  Hz、1H、H-C(1'))、4.74 (dd、 $J = 7.0, 4.6$  Hz、1H、H-C(4'))、4.46–4.36 (m、1H、H-C(5'))、4.11 (br、1H、H-C(7'))、2.91 (dd、 $J = 16.2, 6.6$  Hz、1H、H-C(3'))、2.31 (ddd、 $J = 13.8, 10.0, 3.7$  Hz、1H、H-C(2'))、1.98–1.78 (m、3H、H-C(2')、H-C(3'))、1.07 (s、9H、(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-Si)。

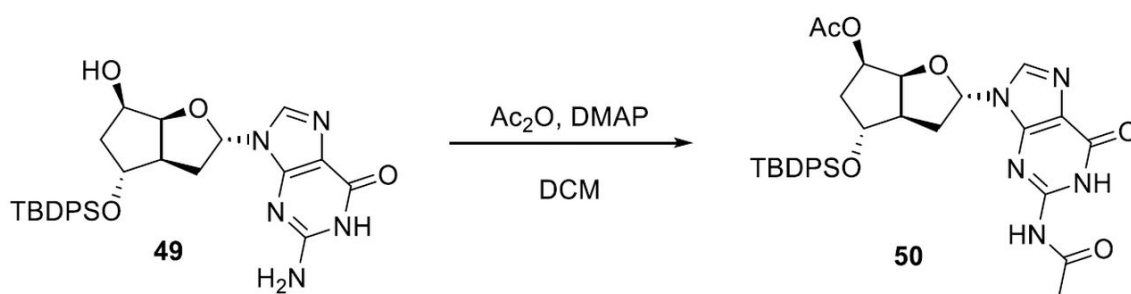
$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz、MeOD)  $\delta$  159.30 (C(2))、155.14 (C(6))、152.38 (C(4))、137.28 (C(8))、136.93、136.88 (CH-arom)、135.13、134.78 (C-arom)、131.07、131.06、128.91、128.89 (CH-arom)、117.98 (C(5))、87.72 (C(1'))、86.25 (C(4'))、79.21、(C(7')) 73.87 (C(5'))、52.13 (C(3'))、41.44 (C(6'))、38.35 (C(2'))、27.42 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-Si)、19.82 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-Si)。

C<sub>28</sub>H<sub>34</sub>O<sub>4</sub>N<sub>5</sub>Si ([M+H]<sup>+</sup>) についての ESI<sup>+</sup>-HRMS  $m/z$  計算値 532.2386、実測値 532.2367。

## 【0342】

(3'R, 5'R, 7'R)-N2-アセチル-9-{5'-O-アセチル-7'-[(tert-ブチルジフェニルシリル)オキシ]-2', 3'-ジデオキシ-3', 5'-エタノ- $\alpha$ -D-リボフラノシル} グアニン (50)

## 【化 9 9】



10

20

30

40

50

乾燥DCM (15 mL) 中のヌクレオシド49 (500 mg、0.940 mmol) および4-ジメチルアミノピリジン (276 mg、2.4 mmol) の溶液に、無水酢酸 (1.0 mL、10.3 mmol) を室温で添加する。2日間攪拌した後、飽和NaHCO<sub>3</sub> (30 mL) を添加することにより反応物をクエンチする。次いで、混合物をDCM (3×30 mL) で抽出する。合わせた有機相をMgSO<sub>4</sub>で乾燥し、濾過し、蒸発させる。粗生成物をCC (DCM中3.5% MeOH) によって精製して、50 (441 mg、76%) を白色フォームとして得る。

【0343】

50のデータ：R<sub>f</sub> = 0.62 (DCM中10% MeOH)：

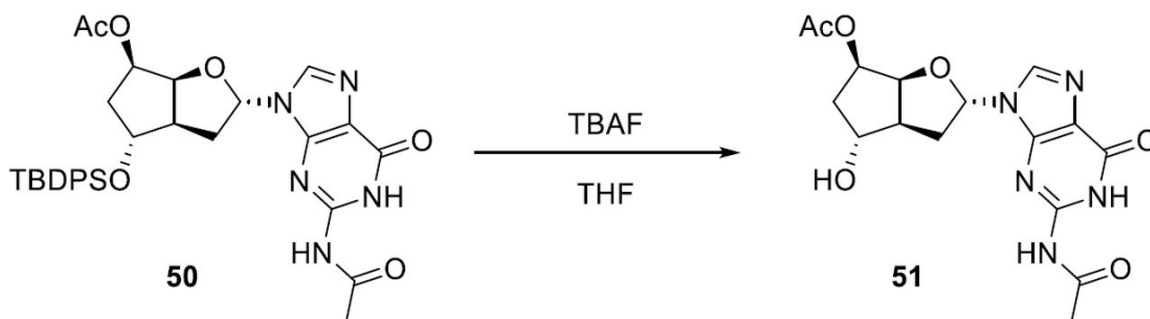
<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 12.11 (br, 1H, NH-C(4)), 9.94 (br, 1H, H-N(1)), 7.62 (d, J = 6.7 Hz, 5H, H-arom, H-C(8)), 7.46–7.31 (m, 6H, H-arom), 6.03 (dd, J = 6.7, 2.7 Hz, 1H, H-C(1')), 5.31 (dt, J = 10.3, 5.2 Hz, 1H, H-(C5')), 4.99–4.81 (m, 1H, H-C(4')), 4.02 (d, J = 3.8 Hz, 1H, H-C(7')), 2.88 (dd, J = 16.0, 6.6 Hz, 1H, H-C(3')), 2.44–2.20 (m, 4H, MeCONH, H-C(2')), 2.12–1.73 (m, 6H, MeCO<sub>2</sub>, H-C(6')), H-C(2')), 1.04 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-Si).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 172.73 (MeCONH), 170.46 (MeCO<sub>2</sub>), 155.87 (C(6)), 148.09 (C(4)), 147.47 (C(2)), 137.13 (C(8)), 135.74 (CH-arom), 133.62, 133.29 (C-arom), 130.13, 130.09, 127.96, 127.93 (CH-arom), 121.54 (C(5)), 86.47 (C(1')), 82.81 (C(4')), 76.60 (C(7')), 74.37 (C(5')), 51.23 (C(3')), 37.04, 37.01, (C(2')), C(6')), 26.92 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-Si), 24.46 (MeCONH), 21.00 (MeCO<sub>2</sub>), 19.05 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-Si).

C<sub>32</sub>H<sub>38</sub>O<sub>6</sub>N<sub>5</sub>Si ([M+H]<sup>+</sup>) についてのESI<sup>+</sup>-HRMS m/z 計算値616.2586、実測値616.2580。

【0344】

(3'S, 5'R, 7'R)-2-Nアセチル-9-{5'-O-アセチル-2', 3'-ジデオキシ-3', 5'-エタノ-7'-ヒドロキシ-α-D-リボフラノシル} グアニン (51)  
【化100】



乾燥THF (5 mL) 中のヌクレオシド50 (440 mg、0.714 mmol) の溶液に、TBAF (THF中1M、1.1 mL、1.1 mmol) を室温で添加する。溶液を室温で4時間攪拌し、次いでCC (DCM中13% MeOH) によって直接精製して、51 (235 mg、87%) を白色フォームとして得る。X線分析に好適な結晶を、H<sub>2</sub>O/MeOHの混合物からの再結晶によって得る。

【0345】

51のデータ：R<sub>f</sub> = 0.25 (DCM中13% MeOH)：

10

20

30

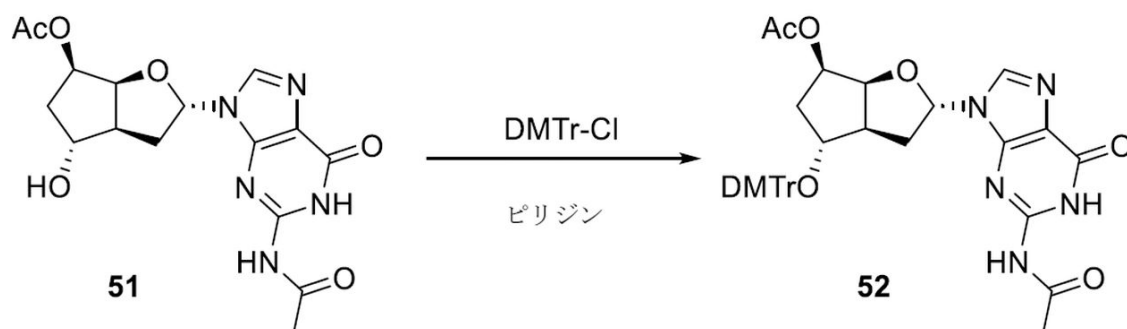
40

50

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, MeOD) δ 174.95 (MeCONH), 172.32 (MeCO<sub>2</sub>), 157.50 (C(6)), 149.96 (C(4)), 149.38 (C(2)), 139.66 (C(8)), 121.76 (C(5)), 88.23 (C(1')), 84.23 (C(4')), 75.83 (C(5')), C(7')), 51.65 (C(3')), 38.04, 37.93 (C(2')), C(6')), 23.83 (MeCONH), 20.71 (MeCO<sub>2</sub>).

**【 0 3 4 6 】**

【化 1 0 1】



**【 0 3 4 7 】**

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 12.05 (br, 1H, NH-C (4))、9.90 (br, 1H, H-N (1))、7.40 (s, 1H, H-C (8))、7.38-7.31 (m, 2H, H-arom)、7.28-7.08 (m, 7H, H-arom)、6.75 (dd, J=9.0、2.7 Hz, 4H, H-arom)、5.95-5.85 (m, 1H, H-C (1'))、5.30-5.10 (m, 1H, H-C (5'))、4.70-4.58 (m, 1H, H-C (4'))、3.81 (br, 1H, H-C (7'))、3.68、3.68 (2s, 6H, MeO)、2.25-2.07 (m, 5H, MeCONH, H-C (3')、H-C (2'))、1.96-1.79 (m, 5H, MeCO<sub>2</sub>, H-C (2')、H-C (6'))、1.74-1.59 (m, 1H, H-C

(6')) .

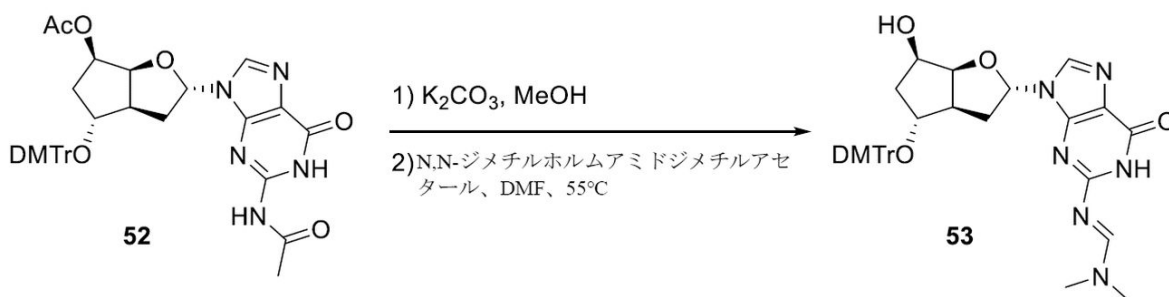
$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  172.65 (MeCONH)、170.42 (MeCO<sub>2</sub>)、158.73、158.70 (MeO-C-arom)、155.86 (C(6))、147.96 (C(4))、147.43 (C(2))、145.31 (C-arom)、137.17 (C(8))、136.69、136.44 (C-arom)、130.32、130.21、128.29、128.05、127.09 (CH-arom)、121.53 (C(5))、113.38、113.35 (CH-arom)、87.25 (C(Ph)<sub>3</sub>)、86.73 (C(1'))、82.77 (C(4'))、77.19 (C(7'))、74.37 (C(5'))、55.38 (MeO-DMTr)、49.28 (C(3'))、37.25 (C(2'))、36.06 (C(6'))、24.40 (MeCONH)、21.01 (MeCO<sub>2</sub>) . 10

$\text{C}_{37}\text{H}_{38}\text{O}_8\text{N}_5$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) についてのESI<sup>+</sup>-HRMS  $m/z$  計算値 680.2715、実測値 680.2718。

【0348】

(3'S, 5'R, 7'R) - N<sub>2</sub> - (N, N-ジメチルホルムアミジノ) - 9 - {2', 3'-ジデオキシ-3', 5'-エタノ-7'-O-[(4, 4'-ジメトキシトリフェニル)メチル] -  $\alpha$ -D-リボフラノシル} グアニン (53)

【化102】



乾燥MeOH (10 mL) 中のヌクレオシド52 (333 mg、0.490 mmol) の溶液に、 $\text{K}_2\text{CO}_3$  (305 mg、2.20 mmol) を室温で添加する。懸濁液を室温で7時間攪拌し、次いで $\text{NH}_4\text{Cl}$  (78 mg、1.46 mmol) を添加し、得られた混合物を $\text{SiO}_2$ のショートパッドを通して濾過する。 $\text{SiO}_2$ を追加のMeOHで洗浄した後、溶媒を蒸発させる。 30

【0349】

粗生成物を乾燥DMF (10 mL) に溶解し、N, N-ジメチルホルムアミドジメチルアセタール (0.33 mL、2.5 mmol) を添加する。溶液を55°Cで2時間攪拌し、次いで溶媒を減圧下で除去する。粗生成物をCC (DCM中7% MeOH、+ 0.5% Et<sub>3</sub>N) によって精製して、53 (245 mg、77%) を微量のEt<sub>3</sub>Nを含む白色フォームとして得る。

【0350】

53のデータ： $R_f = 0.32$  (DCM中12% MeOH) :

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.75 (br, 1H, H-N(1))、8.25 (s, 1H, NCHN(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)、7.37 (d,  $J = 7.3$  Hz, 2H, H-arom)、7.29-7.08 (m, 8H, H-arom, H-C(8))、6.74 (d,  $J = 8.1$  Hz, 4H, H-arom)、6.03 (dd,  $J = 6.7$ 、2.8 Hz, 1H, H-C(1'))、4.57 (dd,  $J = 7.5$ 、4.6 Hz, 1H, H-C(4'))、4.37-4.26 (m, 1H, H-C(5'))、3.89 (t,  $J = 3.9$  Hz, 1H, H-C(7'))、3.67、3.67 (2s, 6H, MeO)、3.24 (br, 1H, OH)、2.94 (s, 3H, NCHN(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)、2.87 (s, 3H, NCHN(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)、2.35 (dd,  $J = 15.9$ 、7.6 H 40

z、1H、H-C (3')、1.94-1.68 (m、4H、H-C (2')、H-C (6'))。

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz、 $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  158.61 (MeO-C-arom)、158.28 (C (2))、157.92 (NCHN ( $\text{CH}_3$ )<sub>2</sub>)、156.69 (C (6))、149.90 (C (4))、145.52、136.86、136.77 (C-arom)、135.50 (C (8))、130.15、128.32、127.92、126.95 (CH-arom)、120.27 (C (5))、113.24 (CH-arom)、86.92 (C (Ph)<sub>3</sub>)、85.57 (C (1'))、85.12 (C (4'))、78.31 (C (7'))、72.69 (C (5'))、55.28 (MeO-DMTr)、49.28 (C (3'))、41.38 (NCHN ( $\text{CH}_3$ )<sub>2</sub>)、39.77 (C (6'))、37.58 (C (2'))、35.04 (NCHN ( $\text{CH}_3$ )<sub>2</sub>)。

10

$\text{C}_{36}\text{H}_{39}\text{O}_6\text{N}_6$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) についてのESI<sup>+</sup>-HRMS  $m/z$  計算値 651.2926、実測値 651.2921。

【0351】

(3'S, 5'R, 7'R)-2-N(N,N-ジメチルホルムアミジノ)-9-{5'-O-[(2-シアノエトキシ)-ジイソプロピルアミノホスファニル]-2', 3'-ジデオキシ-3', 5'-エタノ-7'-O-[(4,4'-ジメトキシトリフェニル)メチル]- $\alpha$ -D-リボフラノシル} グアニン (54)

【化103】



20

乾燥DCM (15 mL) 中のヌクレオシド53 (245 mg、0.377 mmol) および5-(エチルチオ)-1H-テトラゾール (74 mg、0.57 mmol) の溶液に、2-シアノエチルN,N,N',N'-テトライソプロピルホスホロジアミダイト (0.20 mL、0.64 mmol) を室温で滴下して添加する。50分間攪拌した後、反応混合物を飽和 $\text{NaHCO}_3$  (25 mL) で希釈し、DCM (3×25 mL) で抽出する。合わせた有機相を $\text{MgSO}_4$ で乾燥し、濾過し、蒸発させる。粗生成物をCC (DCM中3% MeOH、+0.5%  $\text{Et}_3\text{N}$ ) によって精製して、54 (212 mg、2つの異性体の混合物、67%) を白色フォームとして得る。

30

【0352】

54のデータ： $R_f = 0.42$  (DCM中7% MeOH)：

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz、 $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.35 (br、1H、H-N (1))、8.51、8.49 (2s、1H、NCHN ( $\text{CH}_3$ )<sub>2</sub>)、7.41-7.10 (m、10H、H-arom、H-C (8))、6.83-6.70 (m、4H、H-arom)、6.15-6.00 (m、1H、H-C (1'))、4.64-4.36 (m、2H、H-C (4'))、H-C (5'))、3.90-3.82 (m、1H、H-C (7'))、3.80-3.62 (m、8H、MeO、 $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$ )、3.59-3.43 (m、2H、( $\text{Me}_2\text{CH}$ )<sub>2</sub>N)、3.04、3.02 (2s、6H、NCHN ( $\text{CH}_3$ )<sub>2</sub>)、2.67-2.48 (m、2H、 $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$ )、2.32 (ddd、 $J = 24.1, 15.1, 6.7$  Hz、1H、H-C (3'))、2.02-1.63 (m、4H、H-C (2'))、H-C (6'))、1.14-1.03 (m、12H、( $\text{Me}_2\text{CH}$ )<sub>2</sub>N)。

40

50



6 H、H-arom)、5.65–5.47 (m、1 H、H-C (6))、4.97 (dd、J=9.2、5.6 Hz、1 H、H-C (2))、4.87 (t、J=5.8 Hz、1 H、H-C (6a))、4.18 (d、J=5.0 Hz、0.2 H、H-C (4))、3.98 (d、J=3.5 Hz、0.8 H、H-C (4))、3.21 (d、J=15.1 Hz、3 H、MeO)、2.88 (dd、J=16.6、7.9 Hz、0.8 H、H-C (3a))、2.75–2.62 (m、0.2 H、H-C (3a))、2.49–2.34 (m、0.2 H、H-C (5))、2.24–1.83 (m、2.8 H、H-(5)、H-C (3))、1.28 (ddd、J=13.0、7.9、4.9 Hz、1 H、H-C (3))、1.09 (s、9 H、(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-Si)。

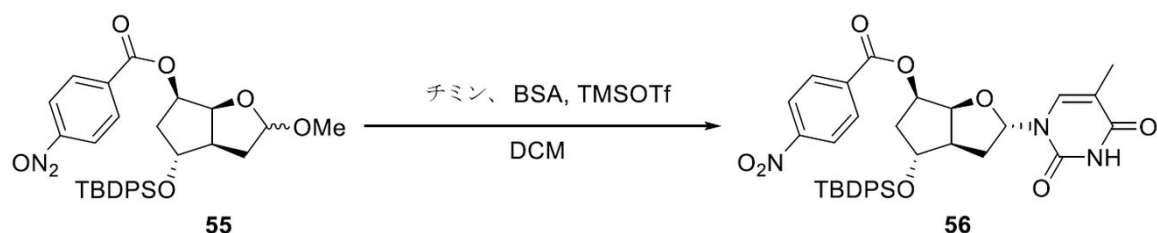
<sup>13</sup>C NMR (75 MHz、CDCl<sub>3</sub>) δ 164.46、164.41 (CO<sub>2</sub>R)、150.63 (O<sub>2</sub>N-C-arom)、135.87、135.82 (CH-arom)、134.07、133.75、133.69 (CH-arom)、130.98、130.89、129.98、129.96、129.91、127.89、127.87、127.85、123.59 (CH-arom)、106.49、106.39 (C (2))、83.21、79.87 (C (6a))、76.54 (C (4))、76.09 (C (6))、54.55、54.47 (MeO)、51.69、50.30 (C (3a))、38.07 (C (3))、37.17、36.65 (C (5))、27.04、26.99 90 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-Si)、19.14 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-Si)。

C<sub>31</sub>H<sub>35</sub>O<sub>7</sub>NaSi ([M+Na]<sup>+</sup>) についてのESI<sup>+</sup>-HRMS m/z 計算値584.2075、実測値584.2085。

【0355】

(3' R, 5' R, 7' R) - 1 - {7' - [(tert-ブチルジフェニルシリル) オキシ] - 2', 3' - ジデオキシ - 3', 5' - エタノ - 5' - O - (4 - ニトロベンゾエート) - α, β - D - リボフラノシル} チミン (56)

【化106】



乾燥MeCN (3 mL) 中の糖55 (260 mg、0.463 mmol) およびチミン (84 mg、0.695 mmol) の溶液に、BSA (0.34 mL、1.4 mmol) を室温で滴下して添加する。室温で30分間攪拌した後、溶液を0℃に冷却し、TMSOTf (0.10 mL、1.3 mmol) を滴下して添加する。さらに0℃で2時間および室温で18時間攪拌した後、反応混合物を飽和NaHCO<sub>3</sub> (30 mL) で希釈し、DCM (4×40 mL) で抽出する。合わせた有機相をMgSO<sub>4</sub>で乾燥し、濾過し、蒸発させる。粗生成物をCC (DCM中2% MeOH) によって精製して、アノマー比α/β

【化107】

≈

88:12の56 (240 mg、79%) の混合物を白色フォームとして得る。

【0356】

56のデータ: R<sub>f</sub> = 0.56 (DCM+3% MeOH) :

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz、CDCl<sub>3</sub>) δ 9.38 (br、1 H、(s、1 H、H-N (3))、8.32–8.23 (m、2 H、H-arom)、8.22–8.11 (m、2 H、H-arom)、7.65 (dd、J=7.7、1.5 Hz、4 H、H-arom)、7.50–7.36 (m、6 H、H-arom)、6.95 (d、J=0.9

Hz、1H、H-C(6))、5.96 (t、J=6.3 Hz、1H、H-C(1'))、5.55 (dt、J=9.9、6.0 Hz、1H、H-C(5'))、5.13 (dd、J=6.4、5.4 Hz、1H、H-C(4'))、4.20-4.05 (m、1H、H-C(7'))、2.94-2.78 (m、1H、H-C(3'))、2.22 (dd、J=13.3、6.4 Hz、1H、H-C(6'))、2.09-1.73 (m、6H、H-C(6'))、H-C(2')、Me-C(5))、1.09 (s、9H、(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-Si)。

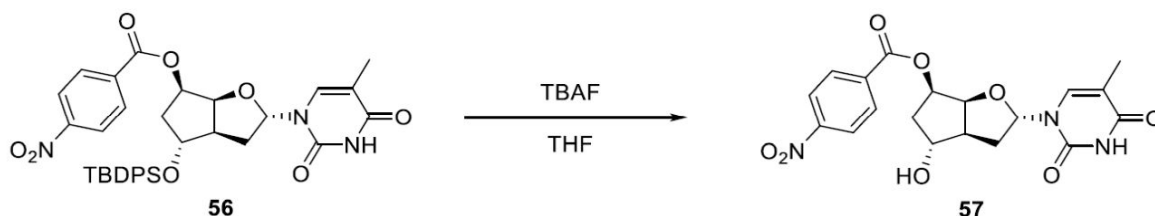
<sup>13</sup>C NMR (75 MHz、CDCl<sub>3</sub>) δ 164.32、163.79 (C(4)、CO<sub>2</sub>R)、150.65、150.39 (O<sub>2</sub>N-C-arom、C(2))、135.70、135.68 (CH-arom)、135.13 (C-arom)、134.83 (C(6))、133.46、133.10 (C-arom)、130.91、130.73、130.11、127.93、123.60 (CH-arom)、111.30 (C(5))、87.26 (C(1'))、82.44 (C(4'))、76.40 (C(7'))、76.07 (C(5'))、50.76 (C(3'))、37.94 (C(6'))、36.68 (C(2'))、26.89 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-Si)、19.03 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-Si)、12.62 (Me-C(5))。

C<sub>35</sub>H<sub>37</sub>O<sub>8</sub>N<sub>3</sub>NaSi ([M+Na]<sup>+</sup>) についてのESI<sup>+</sup>-HRMS m/z 計算値678.2242、実測値678.2254。

【0357】

(3'R, 5'R, 7'R)-1-{2', 3'-ジデオキシ-3', 5'-エタノ-7'-ヒドロキシ-5'-O-(4-ニトロベンゾイル)-α, β-D-リボフラノシル} チミン (57)

【化108】



乾燥THF (2mL) 中のヌクレオシド56 (220mg、0.335mmol) の溶液に、TBAF (THF中1M、0.84mL、0.84mmol) を室温で添加する。室温で4時間攪拌した後、反応混合物を飽和NaHCO<sub>3</sub> (20mL) で希釈し、EtOAc (3×20mL) およびDCM (2×80mL) で抽出する。合わせた有機相をMgSO<sub>4</sub>で乾燥し、濾過し、蒸発させる。粗生成物をCC (DCM中5%MeOH) によって精製して、57 (101mg、72%) のアノマー混合物を得る。X線分析に好適な結晶を、EtOAc中の再結晶によって得る。

【0358】

57のデータ：R<sub>f</sub>=0.50 (DCM+7%MeOH)：

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz、CDCl<sub>3</sub>) δ 8.96 (br、1H、H-N(3))、8.34-8.17 (m、4H、H-arom)、7.07 (d、J=1.1 Hz、1H、H-C(6))、6.11 (t、J=6.3 Hz、1H、H-C(1'))、5.57-5.45 (m、1H、H-C(5'))、5.15 (dd、J=6.6、5.4 Hz、1H、H-C(4'))、4.38-4.23 (m、1H、H-C(7'))、2.96 (dd、J=13.5、6.9 Hz、1H、H-C(3'))、2.26 (ddd、J=13.1、10.3、5.4 Hz、4H、H-C(2')、H-C(6'))、1.91 (d、J=0.9 Hz、3H、Me-C(5))。

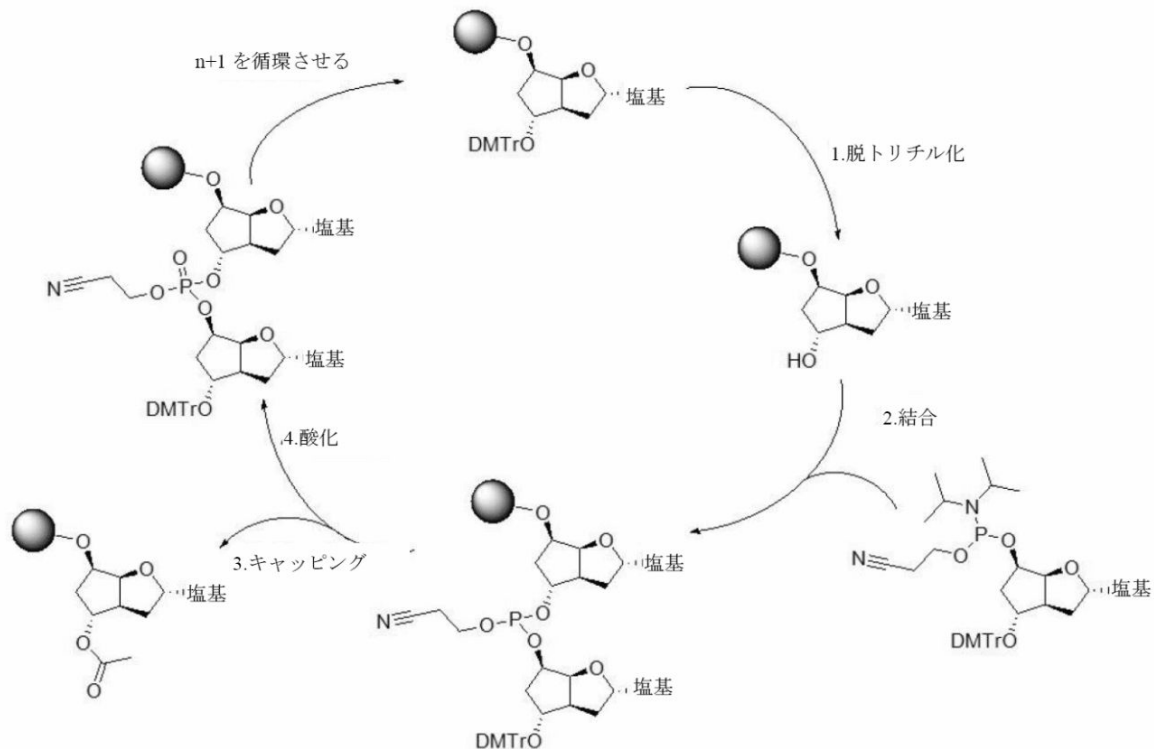
C<sub>19</sub>H<sub>19</sub>O<sub>8</sub>N<sub>3</sub>Na ([M+Na]<sup>+</sup>) についてのESI<sup>+</sup>-HRMS m/z 計算値440.1064、実測値440.1072。

【0359】

### アルファアノマーオリゴヌクレオチドの合成、脱保護、および精製のプロセス

ホスホジエステル結合によって結合された少なくとも2個のアルファアノマービシクロDNA (abc-DNA) 残基を含むオリゴヌクレオチドは、当該技術分野で周知の方法に従い、以下に説明するように、合成装置、例えば、Pharmac i-Gene-As s e m b l e r-Pl u s DNA合成装置で合成することができる。本発明のabc-DNAオリゴヌクレオチドの合成の工程を以下に示す：

【化109】



【0360】

オリゴヌクレオチド合成は、Gene Assemblerの製造元が推奨するプロトコルに従い、Pharmac i-Gene-As s e m b l e r-Pl u s DNA合成装置で1.3  $\mu$ molスケールで行われる。天然DNAホスホルアミダイト (dT、dC 4bz、dG 2DMF、dA 6Bz) および固体支持体 (Glen Unysupport 500) をGlen Researchから購入する。天然DNAホスホルアミダイトをMeCN中の0.1M溶液として調製し、4分間の工程を使用して結合する。abc-DNAホスホルアミダイトを1,2-ジクロロエタン中の0.1M溶液として調製し、結合剤として5-(エチルチオ)-1H-テトラゾール (MeCN中0.25M) を使用して12分の伸長工程を使用して結合する。修飾ヌクレオシドの脱トリチル化を、ジクロロエタン中の5%ジクロロ酢酸の溶液を使用して行う。酸化は、MeCN/水/コリジン (32:3:15) 中の0.01Mヨウ素の溶液中で、1分の反応時間で行う。硫化は、MeCN/ピリジン (1:1) 中の0.2Mフェニルアセチルジスルフィドの溶液を使用し、3.5分の反応時間で行う。キャッピングは、標準状態を使用して行う。固体支持体からの切断およびオリゴヌクレオチドの脱保護は、55℃で16時間にわたる濃アンモニアでの処理によって達成される。遠心分離後、上清を回収し、ビーズをさらにH<sub>2</sub>O (0.5mL X 2) で洗浄し、得られた溶液を蒸発乾固させる。粗オリゴヌクレオチドを、イオン交換HPLC (Dionex-DNA PacPA200) によって精製する。H<sub>2</sub>O、pH 8.0中の25mM Trizmaの緩衝液を移動相「A」として使用し、H<sub>2</sub>O、pH 8.0中の25mM Trizma、1.25M NaClを移動相「B」として使用した。ホスホロチオエート鎖については、H<sub>2</sub>O、pH 12.0中の10mM NaO

Hの緩衝液を移動相「A」として使用し、H<sub>2</sub>O、pH12.0中の10mM NaOH、2.50M NaClを移動相「B」として使用した。次いで、精製されたオリゴヌクレオチドをSepapak C-18カートリッジで脱塩する。対応する天然DNAオリゴヌクレオチドの減衰係数を使用し、Nanodrop分光光度計で260nmの吸光度を測定することによって、濃度を決定する。オリゴヌクレオチドの特徴付けは、ESI-質量分析またはLC-MSによって行う。

#### 【0361】

##### 医薬組成物

特定の実施形態では、本発明は、本発明のオリゴヌクレオチドを含む医薬組成物を提供する。オリゴヌクレオチド試料は、試料の十分な部分が細胞に入り、効果、例えば、エクソスキッピングを誘発することを可能にする任意の手段によって、適切に製剤化され、細胞の環境に導入することができる。特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、アルブミンに事前に装填され、オリゴヌクレオチド-アルブミン複合体として投与される。オリゴヌクレオチドの多くの製剤は、当該技術分野で既知であり、オリゴヌクレオチドが標的細胞に侵入して作用できる限り、使用することができる。例えば、本発明のオリゴヌクレオチド剤は、リン酸緩衝生理食塩水などの緩衝液、リポソーム、ミセル構造、およびキャプシド中で製剤化することができる。カチオン性脂質を含むオリゴヌクレオチド剤の製剤は、細胞へのオリゴヌクレオチド剤のトランスフェクションを促進するために使用することができる。例えば、リポフェクチン（米国特許第5,705,188号）などのカチオン性脂質、カチオン性グリセロール誘導体、およびポリリジン（公開されたPCT国際出願第WO97/30731号）などのポリカチオン性分子を使用することができる。好適な脂質には、オリゴフェクタミン、リポフェクタミン（Life Technologies）、NC388（Ribozyme Pharmaceuticals Inc., コロラド州ボルダー）、またはFuGene 6（Roche）が含まれ、これらはすべて製造元の説明書に従って使用することができる。

#### 【0362】

そのような組成物は、典型的には、核酸分子および薬学的に許容される担体を含む。本明細書で使用する場合、「薬学的に許容される担体」という用語には、医薬投与と適合する、生理食塩水、溶媒、分散媒体、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤などが含まれる。補助活性化合物も、組成物に組み込むことができる。

#### 【0363】

医薬組成物は、意図した投与経路に適合するように製剤化される。投与経路の例には、非経口、例えば、静脈内、皮内、皮下、経口、鼻腔内、経皮（局所）、経粘膜、髄腔内、脳室内、腹腔内、および直腸投与が含まれる。非経口、皮内、または皮下投与に使用される溶液または懸濁液には、以下の成分：滅菌希釈液、例えば、注射用水、生理食塩水溶液、固定油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールまたは他の合成溶媒；抗菌剤、例えば、ベンジルアルコールまたはメチルパラベン；抗酸化剤、例えば、アスコルビン酸または亜硫酸水素ナトリウム；キレート剤、例えば、エチレンジアミン四酢酸；緩衝液、例えば、酢酸塩、クエン酸塩、またはリン酸塩な、および張性調整剤、例えば、塩化ナトリウムまたはデキストロースが含まれ得る。pHは、塩酸または水酸化ナトリウムなどの酸または塩基で調整することができる。非経口製剤は、ガラスもしくはプラスチック製のアンプル、使い捨て可能な注射器、または複数回投与バイアルに入れることができる。

#### 【0364】

注射可能な使用に好適な医薬組成物には、滅菌水溶液（水溶性の場合）または分散液、および注射可能な滅菌溶液または分散液の即時調製のための滅菌粉末が含まれる。静脈内投与の場合、好適な担体には、生理食塩水、静菌水、Cremophor EL, TM.（BASF、ニュージャージー州パーシッパニー）、またはリン酸緩衝生理食塩水（PBS）が含まれる。すべての場合において、組成物は、無菌でなければならず、容易な注射可能性（syringability）が存在する程度まで流動性でなければならない。

製造および保存条件下で安定している必要があり、細菌および真菌などの微生物の汚染作用から保護する必要がある。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど）、およびそれらの好適な混合物を含む、溶媒または分散媒体であり得る。好適な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングの使用、分散の場合に必要な粒子サイズの維持、および界面活性剤の使用によって維持することができる。微生物の作用の防止は、様々な抗菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサルなどによって達成することができる。多くの場合、等張剤、例えば、糖、多価アルコール、例えば、マンニトール、ソルビトール、および塩化ナトリウムを組成物に含めることが好ましいであろう。注射可能な組成物の長期吸収は、吸収を遅らせる薬剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを組成物に含めることによってもたすことができる。

10

#### 【0365】

注射可能な滅菌溶液は、必要に応じて、上記に列挙した成分のうちの1つまたは組み合わせを含む適切な溶媒中に必要な量の活性化化合物を組み込み、続いて濾過滅菌することによって調製することができる。一般に、分散液は、塩基性分散媒体および上記で列挙されたものからの必要な他の成分を含む滅菌ビヒクルに、活性化化合物を組み込むことによって調製される。注射可能な滅菌溶液を調製するための無菌粉末の場合、好ましい調製方法は、真空乾燥および凍結乾燥であり、これらにより、活性成分の粉末、および以前に滅菌濾過された溶液からの任意の追加の所望の成分が得られる。

20

#### 【0366】

経口組成物は、一般に、不活性希釈剤または食用担体を含む。経口治療投与の目的のために、活性化化合物は、賦形剤と共に組み込まれ、錠剤、トローチ剤、またはカプセル剤、例えば、ゼラチンカプセルの形態で使用され得る。うがい薬として使用するための流体担体を使用して、経口組成物を調製することもできる。医薬的に適合する結合剤および／または補助物質を、組成物の一部として含めることができる。錠剤、丸剤、カプセル剤、トローチ剤などは、以下の成分のいずれか、または同様の性質の化合物を含むことができる：結合剤、例えば、微結晶性セルロース、トラガカントガム、もしくはゼラチン、賦形剤、例えば、デンプンもしくはラクトース、崩壊剤、例えば、アルギン酸、プリモゲル、もしくはコーンスターチ、潤滑剤、例えば、ステアリン酸マグネシウムもしくはステロテス、流動促進剤、例えば、コロイド状二酸化ケイ素、甘味料、例えば、ショ糖もしくはサッカリン、またはフレーバー剤、ペパーミント、サリチル酸メチル、オレンジフレーバー。

30

#### 【0367】

吸入による投与の場合、化合物は、好適な推進剤、例えば、二酸化炭素などのガスを含む加圧容器もしくはディスペンサー、またはネブライザーからエアロゾルスプレーの形態で送達される。そのような方法には、米国特許第6,468,798号に記載される方法が含まれる。

#### 【0368】

全身投与はまた、経粘膜的または経皮的手段によることができる。経粘膜または経皮投与の場合、浸透するバリアに適した浸透剤が製剤に使用される。そのような浸透剤は、当該技術分野で一般に既知であり、例えば、経粘膜投与用の場合、界面活性剤、胆汁酸塩、およびフシジン酸誘導体が含まれる。経粘膜投与は、点鼻薬または坐剤の使用により行うことができる。経皮投与の場合、活性化化合物は、当該技術分野で一般に既知であるように軟膏（o i n t m e n t s）、軟膏（s a l v e s）、ゲル、またはクリームに製剤化される。

40

#### 【0369】

本発明はまた、乾燥粉末送達方法を提供する。

#### 【0370】

化合物はまた、直腸送達のための坐剤（例えば、カカオバターおよび他のグリセリドなどの従来の坐剤ベースを用いて）または保持浣腸の形態で調製することができる。

50

## 【0371】

化合物はまた、McCaffrey et al. (2002), Nature, 418 (6893), 38-9 (hydrodynamic transfection); Xia et al. (2002), Nature Biotechnol., 20 (10) 1006-10 (viral-mediated delivery); または Putnam (1996), Am. J. Health Syst. Pharm. 53 (2), 151-160, erratum at Am. J. Health Syst. Pharm. 53 (3), 325 (1996) に記載される方法を含むがこれらに限定されない、当該技術分野で既知の方法を使用するトランスフェクションまたは感染によって投与することができる。

10

## 【0372】

化合物はまた、DNA ワクチンなどの核酸剤の投与に好適な任意の方法によって投与することができる。これらの方法には、遺伝子銃、バイオインジェクター、皮膚パッチ、ならびに米国特許第 6, 194, 389 号に開示されている微粒子 DNA ワクチン技術などの注射針を使わない方法、および米国特許第 6, 168, 587 号に開示されている粉末形態ワクチンによる哺乳動物の注射針を使わない経皮ワクチン接種が含まれる。さらに、特に、Hamajima et al. (1998), Clin. Immunol. Immunopathol., 88 (2), 205-10 に記載されるような、鼻腔内送達が可能である。リポソーム（例えば、米国特許第 6, 472, 375 号に記載される）およびマイクロカプセル化も使用することができる。生分解性の標的化可能な微粒子送達システム（例えば、米国特許第 6, 471, 996 号に記載される）も使用することができる。

20

## 【0373】

一実施形態では、活性化合物は、インプラントおよびマイクロカプセル化送達システムを含む制御放出製剤などの身体からの急速な排除から化合物を保護する担体を用いて調製される。エチレン酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸などの生分解性かつ生体適合性ポリマーを使用することができる。このような製剤は、標準的な技術を使用して調製することができる。これらの材料はまた、Alza Corporation および Nova Pharmaceuticals, Inc. から商業的に入手することができる。リポソーム懸濁液（ウイルス抗原に対するモノクローナル抗体を用いた感染細胞を標的とするリポソームを含む）も、製薬上許容される担体として使用することができる。これらは、例えば、米国特許第 4, 522, 811 号に記載されるような当業者に既知の方法に従って調製することができる。

30

## 【0374】

このような化合物の毒性および治療有効性は、例えば、LD<sub>50</sub>（集団の 50% に対する致死用量）および ED<sub>50</sub>（集団の 50% に治療有効用量）を決定するために、細胞培養または実験動物における標準的な薬学的手順によって決定することができる。毒性効果および治療効果の間の用量比は、治療指数であり、比 LD<sub>50</sub>/ED<sub>50</sub> として表すことができる。高い治療指数を示す化合物が好ましい。毒性副作用を示す化合物を使用することもできるが、感染していない細胞への潜在的な損傷を最小限に抑え、それによって副作用を減らすために、罹患組織の部位にそのような化合物を標的とする送達システムを設計するように注意する必要がある。

40

## 【0375】

細胞培養アッセイおよび動物実験から得られたデータは、ヒトで使用するための投与量範囲を策定するのに使用することができる。そのような化合物の投与量は、毒性がほとんどないかまたは全くなく、ED<sub>50</sub> を含む循環濃度の範囲内にあることが好ましい。投与量は、使用される剤形および利用される投与経路に応じて、この範囲内で変動し得る。本発明の方法で使用される任意の化合物について、治療有効用量は、最初に細胞培養アッセイから推定することができる。細胞培養において決定される IC<sub>50</sub>（すなわち、症状の最大阻害の半分を達成する試験化合物の濃度）を含む循環血漿濃度範囲を達成するために、用量を動物モデルにおいて処方し得る。そのような情報は、ヒトでの有用な用量をより

50

正確に決定するために使用することができる。血漿中のレベルは、例えば、高速液体クロマトグラフィーによって測定し得る。

【0376】

本明細書で定義するように、治療有効量の核酸分子（すなわち、有効投与量）は、選択された核酸に依存する。例えば、約1 pg～1000 mgの範囲の単回投与量を投与し得、いくつかの実施形態では、10、30、100、もしくは1000 pg、または10、30、100、もしくは1000 ng、または10、30、100、もしくは1000 μg、または10、30、100、もしくは1000 mgを投与し得る。いくつかの実施形態では、1～5 gの組成物を投与することができる。組成物は、1日おきにまたは1ヶ月に1回以上を含む、1日に1回以上～週に1回以上で投与することができる。当業者は、疾患または障害の重症度、以前の処置、対象の全身の健康および／または年齢、ならびに他の存在する他の疾患などを含むがこれらに限定されない、特定の要因が対象を効果的に処置するために必要な投与量およびタイミングに影響を及ぼし得ることを理解するであろう。さらに、治療有効量の本発明のオリゴヌクレオチドによる対象の処置は、単一の処置を含むことができ、または好ましくは一連の処置を含むことができる。

10

【0377】

特定の実施形態では、本発明によるオリゴヌクレオチドの投与量は、5 mg/kg/週～500 mg/kg/週、例えば、5 mg/kg/週、10 mg/kg/週、15 mg/kg/週、20 mg/kg/週、25 mg/kg/週、30 mg/kg/週、35 mg/kg/週、40 mg/kg/週、45 mg/kg/週、50 mg/kg/週、55 mg/kg/週、60 mg/kg/週、65 mg/kg/週、70 mg/kg/週、75 mg/kg/週、80 mg/kg/週、85 mg/kg/週、90 mg/kg/週、95 mg/kg/週、100 mg/kg/週、150 mg/kg/週、200 mg/kg/週、250 mg/kg/週、300 mg/kg/週、350 mg/kg/週、400 mg/kg/週、450 mg/kg/週、および500 mg/kg/週の範囲である。特定の実施形態では、本発明によるオリゴヌクレオチドの投与量は、10 mg/kg/週～200 mg/kg/週、20 mg/kg/週～150 mg/kg/週、または25 mg/kg/週～100 mg/kg/週の範囲である。特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、2週間～6ヶ月の期間、例えば、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、7週間、8週間、9週間、10週間、11週間、12週間、13週間、26週間、6ヶ月、8ヶ月、10ヶ月、または1年以上にわたり、週に1回投与される。特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、週に2回投与される。他の実施形態では、オリゴヌクレオチドは隔週で投与される。特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドは静脈内投与される。

20

30

【0378】

オリゴヌクレオチド剤を細胞の環境に導入する方法は、細胞の種類およびその環境の構成に依存することが理解され得る。例えば、細胞が液体内に見出される場合、1つの好ましい製剤は、リポフェクタミンなどの脂質製剤であり、オリゴヌクレオチド剤は、細胞の液体環境に直接添加することができる。脂質製剤はまた、静脈内、筋肉内、もしくは腹腔内注射などによって、または経口的に、または吸入により、または当該技術分野で既知の他の方法により、動物に投与することができる。製剤が哺乳動物、より具体的にはヒトなどの動物への投与に好適である場合、製剤はまた薬学的に許容される。オリゴヌクレオチドを投与するための薬学的に許容される製剤が、既知であり、使用することができる。いくつかの場合では、卵母細胞を用いた研究のように、緩衝液または生理食塩水中でオリゴヌクレオチド剤を製剤化し、製剤化されたオリゴヌクレオチド剤を細胞に直接注射することが好ましいことがあり得る。オリゴヌクレオチドの直接注射を行ってもよい。

40

【0379】

好適な量のオリゴヌクレオチド剤を導入する必要がある、これらの量は、標準的な方法を使用して経験的に決定することができる。典型的には、細胞環境における個々のオリゴヌクレオチド剤種の有効濃度は、約50ナノモル以下、10ナノモル以下、または約1ナノモル以下の濃度を使用することができる組成物であろう。別の実施形態では、約200

50

ピコモル以下の濃度、さらには約50ピコモル以下、約20ピコモル以下、約10ピコモル以下、または約5ピコモル以下の濃度を利用する方法を多くの状況で使用することができる。

#### 【0380】

方法は、オリゴヌクレオチド剤組成物が、十分な量のオリゴヌクレオチド剤が細胞に入ってその効果を発揮することができるように製剤化されるという条件で、細胞が生きることができる任意の細胞外マトリックスにオリゴヌクレオチド剤組成物を添加することによって実施することができる。例えば、方法は、液体培養物または細胞増殖培地などの液体中、組織外植片、または哺乳動物、特にヒトなどの動物を含む全生物に存在する細胞での使用に適している。

#### 【0381】

オリゴヌクレオチド剤は、薬理学的有効量のオリゴヌクレオチド剤および薬学的に許容される担体を含む医薬組成物として製剤化することができる。薬理学的有効量または治療有効量は、意図された薬理学的、治療的、または予防的結果を生ずるのに有効なオリゴヌクレオチド剤の量を指す。「薬理学的有効量」および「治療的有效量」または単に「有効量」という語句は、意図された薬理学的、治療的、または予防的結果を生ずるのに有効なオリゴヌクレオチドの量を指す。例えば、疾患または障害に関連する測定可能なパラメータが少なくとも20%減少したときに、所与の臨床処置が有効であるとみなされる場合、その疾患または障害の処置のための薬剤の治療有効量は、そのパラメータを少なくとも20%減少するのに必要な量である。

#### 【0382】

好適に製剤化された本発明の医薬組成物は、静脈内、筋肉内、腹腔内、皮下、経皮、気道（エアロゾル）、直腸、膣、および局所（口腔および舌下を含む）投与を含む、非経口経路などの当該技術分野で既知の任意の手段によって投与することができる。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、静脈内または非経口注入もしくは注射によって投与される。

#### 【0383】

一般に、オリゴヌクレオチドの好適な投与量単位は、1日あたりレシピエントの体重1キログラムあたり0.001~0.25ミリグラムの範囲、もしくは1日あたり体重1キログラムあたり0.01~20マイクログラムの範囲、もしくは1日あたり体重1キログラムあたり0.01~10マイクログラム、もしくは1日あたり体重1キログラムあたり0.10~5マイクログラムの範囲、または1日あたり体重1キログラムあたり0.1~2.5マイクログラムの範囲であろう。特定の実施形態では、投与量は、1日あたり0.1mg/kg体重~1日あたり5mg/kg体重の範囲、例えば、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、および5mg/kg体重の範囲である。オリゴヌクレオチドを含む医薬組成物は、1日1回投与することができる。しかしながら、治療剤はまた、1日を通して適切な間隔で投与される2、3、4、5、6またはそれ以上のサブ用量を含む投与量単位で投与され得る。その場合、各サブ用量に含まれるオリゴヌクレオチドは、1日の総投与単位を達成するために、相応して小さくする必要がある。投与単位はまた、例えば、数日間にわたってオリゴヌクレオチドの持続的で一貫した放出を提供する従来の持続放出製剤を使用して、数日間にわたる単回投与のために配合することができる。徐放性製剤は、当該技術分野で周知である。この実施形態では、投与量単位は、対応する1日用量の倍数を含む。製剤に関係なく、医薬組成物は、活性である、例えば、処置される動物またはヒトにおいてエクソンススキッピングを引き起こし、または標的遺伝子の発現を阻害するのに十分な量のオリゴヌクレオチドを含む必要がある。組成物は、オリゴヌクレオチドの複数ユニットの合計と一緒に十分な用量を含むように配合することができる。

#### 【0384】

データを細胞培養アッセイおよび動物実験から取得して、ヒトでの好適な投与量範囲を策定することができる。本発明の組成物の投与量は、毒性がほとんどないかまたは全くない、ED<sub>50</sub>（既知の方法によって決定される）を含む循環濃度の範囲内である。投与量

10

20

30

40

50

は、使用される剤形および利用される投与経路に応じて、この範囲内で変動し得る。本発明の方法で使用される任意の化合物について、処置上有効な用量は、最初に細胞培養アッセイから推定することができる。細胞培養で決定されるように、 $IC_{50}$ （すなわち、症状の最大の半分の阻害を達成する試験化合物の濃度）を含む化合物の循環血漿濃度範囲を達成するために、用量を動物モデルで処方することができる。このような情報は、ヒトの有用な用量をより正確に決定するために使用することができる。血漿中のオリゴヌクレオチドのレベルは、標準的な方法、例えば、高速液体クロマトグラフィーによって測定し得る。

#### 【0385】

医薬組成物は、投与説明書と共にキット、容器、パック、またはディスペンサーに含めることができる。

#### 【0386】

##### 処置方法

本発明は、標的RNAの発現および／またはそのような標的RNAの存在によって全体的または部分的に引き起こされる疾患または障害のリスクがある（またはそれらにかかりやすい）対象を処置する、予防的および治療的方法の両方を提供する。

#### 【0387】

本明細書で使用される「処置」または「処置すること」は、治療剤（例えば、オリゴヌクレオチド剤もしくはベクターまたはそれらをコードする導入遺伝子）を患者に適用または投与すること、あるいは治療剤を、疾患もしくは障害、疾患もしくは障害の症状、または疾患もしくは障害に対する素因を治療する、治療する、和らげる、緩和する、変化させる、治す、良くする、改善する、または影響を与えることを目的として、疾患もしくは障害、疾患もしくは障害の症状、または疾患もしくは障害に対する素因を有する患者から分離された組織または細胞株に適用または投与することとして定義される。

#### 【0388】

一態様では、本発明は、治療剤（例えば、オリゴヌクレオチド剤またはそれをコードするベクターもしくは導入遺伝子）を対象に投与することによって、対象において上記の疾患または障害を予防するための方法を提供する。疾患のリスクのある対象は、例えば、本明細書に記載の診断または予後アッセイのいずれかまたは組み合わせによって同定することができる。予防剤の投与は、疾患もしくは障害が予防されるか、あるいはその進行が遅れるように、対象における例えばウイルス粒子の検出前、または疾患もしくは障害に特徴的な症状の発現前に行うことができる。

#### 【0389】

本発明の別の態様は、対象を治療的に処置する方法、すなわち、疾患または障害の症状の発症を変化させる方法に関する。これらの方法は、インビトロで（例えば、細胞をオリゴヌクレオチド剤と共に培養することによって）、またはインビボで（例えば、オリゴヌクレオチド剤を対象に投与することによって）行うことができる。

#### 【0390】

予防的および治療的処置方法の両方に関して、そのような処置は、ファーマコゲノミクスの分野から得られた知識に基づいて特定の調整または修正され得る。本明細書で使用される「ファーマコゲノミクス」は、ゲノミクス技術、例えば、遺伝子配列決定、統計遺伝学、および遺伝子発現分析を臨床開発中および上市の薬物への適用することを指す。より具体的には、この用語は、患者の遺伝子が薬物に対する応答をどのように決定するか（例えば、患者の「薬物応答表現型」または「薬物応答遺伝子型」）の研究を指す。ファーマコゲノミクスにより、臨床医または医師は、処置から最も恩恵を受ける患者に対して、予防的または治療的処置を標的化し、毒性の薬物関連副作用を経験する患者の処置を回避することができる。

#### 【0391】

治療剤は、適切な動物モデルで試験することができる。例えば、本明細書に記載のオリゴヌクレオチド剤（またはそれをコードする発現ベクターまたは導入遺伝子）を動物モデ

10

20

30

40

50

ルで使用して、薬剤による処置の有効性、毒性、または副作用を決定することができる。あるいは、治療剤を動物モデルで使用して、そのような薬剤の作用機序を決定することができる。例えば、薬剤を動物モデルで使用して、そのような薬剤による処置の有効性、毒性、または副作用を決定することができる。あるいは、薬剤を動物モデルで使用して、そのような薬剤の作用機序を決定することができる。

【0392】

さらに、 $abc$ -DNA脂質基コンジュゲートオリゴヌクレオチドの治療効果は、筋肉機能、握力、呼吸機能、MRIによる心臓機能、筋肉生理学を評価することによって決定される。補体の活性化および血液凝固がまた、オリゴヌクレオチドの負の副作用を調べるために決定される。

【0393】

疾患

本発明のオリゴヌクレオチドは、異常なレベルのmRNAまたは非コードRNAに基づく疾患の処置または予防のために、転写、翻訳、スプライシング、および／もしくは分解を妨害することにより、ならびに／または非コードRNAの機能を阻害することにより、遺伝子発現を調節するのに有用である。本発明の細胞の投与後に1つ以上の疾患症状が減少または排除される場合、対象は、疾患について処置されると言われる。

【0394】

本発明の $abc$ -DNA脂質基コンジュゲートオリゴヌクレオチドは、標的RNAのレベルまたは活性を調節することができる。標的RNAのレベルまたは活性は、当該技術分野で現在既知であるか、または後に開発される任意の好適な方法によって決定することができる。標的RNAおよび／または標的RNAの発現を測定するために使用される方法は、標的RNAの性質に依存し得ることが理解され得る。例えば、標的RNAがタンパク質をコードする場合、「発現」という用語は、標的RNAに由来するタンパク質またはRNA／転写物を指すことができる。そのような場合、標的RNAの発現は、標的RNAに対応するRNAの量を測定することによって、またはタンパク質産物の量を測定することによって決定することができる。タンパク質は、染色もしくはイムノブロットティングなどのタンパク質アッセイにより、またはタンパク質が測定することができる反応を触媒する場合には反応速度を測定することにより、測定することができる。そのような方法はすべて、当該技術分野で既知であり、使用することができる。標的RNAレベルを測定する場合、RNAレベルを検出するための当該技術分野で認められている任意の方法（例えば、RT-PCR、ノーザンブロットティングなど）を使用することができる。上記の測定のいずれも、細胞、細胞抽出物、組織、組織抽出物、または任意の他の好適な供給源材料に対して行うことができる。

【0395】

本発明の $abc$ -DNA脂質基コンジュゲートオリゴヌクレオチドは、mRNA発現を調節するマイクロRNAまたは他の非コードRNAの発現を調節するために使用される。

【0396】

マイクロRNAは、遺伝子発現の転写後調節を指示する小さな非コードRNAであり、長さは約20～25ヌクレオチドである。それらは、メッセンジャーRNAの3'非翻訳領域への配列特異的ハイブリダイゼーションを介して複数の標的遺伝子の発現を調節する。これらのマイクロRNAは、翻訳をブロックすることができ、または標的メッセンジャーRNAを直接分解することができる。

【0397】

目的のmiRNAに結合する本発明の $abc$ -DNA脂質基コンジュゲートオリゴヌクレオチドが合成される。これらのオリゴヌクレオチドは、miRNAに結合し、miRNAがその標的mRNAに結合するのを防止するように設計されている。上記の例で説明したように、 $abc$ -DNA脂質基コンジュゲートオリゴヌクレオチドは、インビトロおよびインビボでmiRNA結合を調節するために使用することができる。

【0398】

10

20

30

40

50

長鎖非コードRNA (lncRNA) は、タンパク質をコードしない (または100アミノ酸超のオープンリーディングフレームを欠く) タンパク質をコードしない、200ヌクレオチド超の長さを有する、大きく多様なクラスの転写されたRNA分子である。lncRNAは、遺伝子発現の重要な調節因子であり、lncRNAは、細胞および発生プロセスにおいて広範な機能を有すると考えられている。lncRNAは、様々な機序を介して遺伝子阻害および遺伝子活性化の両方を行い得る。lncRNAの検証された機能は、lncRNAが、遺伝子発現の主要調節因子であり、しばしば、クロマチン構造を調節することによってエピジェネティックな機序を介して影響を与えることを示唆している。

【0399】

目的の標的lncRNAに相補的な本発明のabc-DNA脂質基コンジュゲートオリゴヌクレオチドが合成される。核内では、それらは標的とされるlncRNAとハイブリダイズしてヘテロ二本鎖を形成する。

【0400】

本発明は、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、脊髄性筋萎縮症 (SMN2遺伝子におけるエクソン7含入)、筋強直性ジストロフィー症 (CAG<sub>n</sub>を有する標的CUGexp-DMPK転写物)、ハンチントン病 (CAG三塩基伸長を標的とする対立遺伝子選択的および非選択的アプローチ)、筋萎縮性側索硬化症 (いくつかの原因遺伝子による遺伝的に不均一な障害)、およびポンペ病 (すべての白人患者の半数超に見られる、標的スプライス変異c.-32IVS1-13T>G) を含むがこれらに限定されない、疾患の処置または予防を提供する。

【0401】

配列

本発明は、主にリン酸ヌクレオシド間結合、1つまたは2つのリンカー、および脂質基を有する任意のabc-DNAオリゴヌクレオチドを提供する。配列は、任意の標的に対して設計できる。本発明の例示的なabc-DNAオリゴヌクレオチドの配列を以下に提供する。

【0402】

特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、10ヌクレオチド、11ヌクレオチド、12ヌクレオチド、13ヌクレオチド、14ヌクレオチド、15ヌクレオチド、16ヌクレオチド、17ヌクレオチド、18ヌクレオチド、19ヌクレオチド、20ヌクレオチド以上、例えば21~50ヌクレオチド、例えば、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、および50ヌクレオチドの長さを有する。一実施形態では、オリゴヌクレオチドは、14ヌクレオチド、15ヌクレオチド、16ヌクレオチド、17ヌクレオチド、18ヌクレオチド、または19ヌクレオチドの長さを有する。一実施形態では、オリゴヌクレオチドは、15ヌクレオチドの長さを有する。一実施形態では、オリゴヌクレオチドは、16ヌクレオチドの長さを有する。一実施形態では、オリゴヌクレオチドは、17ヌクレオチドの長さを有する。一実施形態では、オリゴヌクレオチドは、18ヌクレオチドの長さを有する。一実施形態では、オリゴヌクレオチドは、19ヌクレオチドの長さを有する。

【0403】

DMD標的化オリゴヌクレオチド

デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) は、新生児男児の3500人に1人に罹患し、ベッカー型筋ジストロフィー (BMD) は20,000人に1人に罹患する。DMDおよびBMDはどちらも、X染色体上に位置し、かつ、ジストロフィンをコードするDM D遺伝子の変異によって引き起こされる。DMD患者は、進行性の筋力低下を患い、13歳未満で車椅子に拘束され、しばしば30歳より前に死亡する。BMDは、一般的により軽度であり、患者は、DMD患者と比較して、40年超にわたって歩行可能であり、平均余命が長いことがよくある。

【0404】

10

20

30

40

50

ジストロフィンは、ジストロフィン-糖タンパク質複合体（DGC）の必須成分である。特に、DGCは、筋線維の膜の安定性を維持する。DMD遺伝子におけるフレームシフト変異は、筋肉細胞でのジストロフィン欠損症を引き起こし、これは、他のDGCタンパク質のレベルの低下を伴い、DMD患者に見られる重度の表現型をもたらす。リーディングフレームを無傷に保つDMD遺伝子での変異は、より短いが部分的に機能的なジストロフィンを生成し、重症度が低いBMDに関連する。デュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）患者では、DMD遺伝子のフレームシフト変異により、フレーム外（out-of-frame）mRNAが生成され、切断型非機能的ジストロフィンタンパク質が生成される。このインフレーム成熟mRNAは、未だ部分的に機能し、より穏やかなベッカー型筋ジストロフィー（BMD）表現型をもたらすインフレームジストロフィンタンパク質をコードする。

10

## 【0405】

特定の実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチドは、DMD遺伝子の部分、例えば、エクソン51、エクソン53、およびエクソン45に相補的である。

## 【0406】

エクソン51

DMD遺伝子のエクソン51の配列（配列番号401）を以下に示す：

## 配列表1

```
ttttttttt tcttctttt tcctttttgc aaaaacccaa aatatttttag CTCCTACTCA GACTGTTACT CTGGTGACAC
AACCTGTGGT TACTAAGGAA ACTGCCATCT CCAAAGTAGA AATGCCATCT TCCTTGATGT
TGGAGGTACC TGCTCTGGCA GATTTCAACC GGGCTTGGAC AGAACTTACC GACTGGCTTT
CTCTGCTTGA TCAAGTTATA AAATCACAGA GGGTGATGGT GGGTGACCTT GAGGATATCA
ACGAGATGAT CATCAAGCAG AAGgtatgag aaaaaatgat aaaagttggc agaagttttt ctttaaaatg aag
```

20

## 【0407】

強調表示された部分の対応する転写配列は次の通りである。

5' CC AAA CTA GAA ATG CCA TCT TCC TTG ATG T  
3'（配列番号402）。

## 【0408】

本発明に従って有用なDMD遺伝子のエクソン51に相補的なオリゴヌクレオチドには、以下が含まれるが、これらに限定されない：

5' GG TTT GAT CTT TAC GGT AGA AGG AAC TAC A  
7'（配列番号403）および表3に提供されるオリゴヌクレオチド：

30

40

50

## 【表 3 - 1】

表 3-エクソン 5 1

| 配列 (5' から 7' )     | 配列番号 |
|--------------------|------|
| GGTTTGATCTTTACGGTA | 1    |
| GTTTGATCTTTACGGTAG | 2    |
| TTTGATCTTTACGGTAGA | 3    |
| TTGATCTTTACGGTAGAA | 4    |
| TGATCTTTACGGTAGAAG | 5    |
| GATCTTTACGGTAGAAGG | 6    |
| ATCTTTACGGTAGAAGGA | 7    |
| TCTTTACGGTAGAAGGAA | 8    |
| CTTTACGGTAGAAGGAAC | 9    |
| TTTACGGTAGAAGGAACT | 10   |
| TTACGGTAGAAGGAACTA | 11   |
| TACGGTAGAAGGAACTAC | 12   |
| ACGGTAGAAGGAACTACA | 13   |
| GGTTTGATCTTTACGGT  | 14   |
| GTTTGATCTTTACGGTA  | 15   |
| TTTGATCTTTACGGTAG  | 16   |
| TTGATCTTTACGGTAGA  | 17   |
| TGATCTTTACGGTAGAA  | 18   |
| GATCTTTACGGTAGAAG  | 19   |
| ATCTTTACGGTAGAAGG  | 20   |
| TCTTTACGGTAGAAGGA  | 21   |
| CTTTACGGTAGAAGGAA  | 22   |
| TTTACGGTAGAAGGAAC  | 23   |
| TTACGGTAGAAGGAACT  | 24   |
| TACGGTAGAAGGAACTA  | 25   |
| ACGGTAGAAGGAACTAC  | 26   |
| CGGTAGAAGGAACTACA  | 27   |
| GGTTTGATCTTTACGG   | 28   |
| GTTTGATCTTTACGGT   | 29   |
| TTTGATCTTTACGGTA   | 30   |
| TTGATCTTTACGGTAG   | 31   |
| TGATCTTTACGGTAGA   | 32   |
| GATCTTTACGGTAGAA   | 33   |
| ATCTTTACGGTAGAAG   | 34   |
| TCTTTACGGTAGAAGG   | 35   |
| CTTTACGGTAGAAGGA   | 36   |
| TTTACGGTAGAAGGAA   | 37   |
| TTACGGTAGAAGGAAC   | 38   |
| TACGGTAGAAGGAACT   | 39   |
| ACGGTAGAAGGAACTA   | 40   |
| CGGTAGAAGGAACTAC   | 41   |

10

20

30

40

50

【表 3 - 2】

|                  |     |
|------------------|-----|
| GGTAGAAGGAACTACA | 4 2 |
| GGTTTGATCTTTACG  | 4 3 |
| GTTTGATCTTTACGG  | 4 4 |
| TTTGATCTTTACGGT  | 4 5 |
| TTGATCTTTACGGTA  | 4 6 |
| TGATCTTTACGGTAG  | 4 7 |
| GATCTTTACGGTAGA  | 4 8 |
| ATCTTTACGGTAGAA  | 4 9 |
| TCTTTACGGTAGAAG  | 5 0 |
| CTTTACGGTAGAAGG  | 5 1 |
| TTTACGGTAGAAGGA  | 5 2 |
| TTACGGTAGAAGGAA  | 5 3 |
| TACGGTAGAAGGAAC  | 5 4 |
| ACGGTAGAAGGAACT  | 5 5 |
| CGGTAGAAGGAACTA  | 5 6 |
| GGTAGAAGGAACTAC  | 5 7 |
| GTAGAAGGAACTACA  | 5 8 |
| GGTTTGATCTTTAC   | 5 9 |
| GTTTGATCTTTACG   | 6 0 |
| TTTGATCTTTACGG   | 6 1 |
| TTGATCTTTACGGT   | 6 2 |
| TGATCTTTACGGTA   | 6 3 |
| GATCTTTACGGTAG   | 6 4 |
| ATCTTTACGGTAGA   | 6 5 |
| TCTTTACGGTAGAA   | 6 6 |
| CTTTACGGTAGAAG   | 6 7 |
| TTTACGGTAGAAGG   | 6 8 |
| TTACGGTAGAAGGA   | 6 9 |
| TACGGTAGAAGGAA   | 7 0 |
| ACGGTAGAAGGAAC   | 7 1 |
| CGGTAGAAGGAACT   | 7 2 |
| GGTAGAAGGAACTA   | 7 3 |
| GTAGAAGGAACTAC   | 7 4 |
| TAGAAGGAACTACA   | 7 5 |

## 【0 4 0 9】

一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号 1～75 からなる群から選択される配列を含む。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号 1～75 からなる群から選択される配列を含み、オリゴヌクレオチドは、14～20 ヌクレオチドの長さを有する。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号 1～75 からなる群から選択される配列を含み、オリゴヌクレオチドは、14～19 ヌクレオチドの長さを有する。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、14～19 ヌクレオチドの長さを有する。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、14 ヌクレオチドの長さを有する。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、15 ヌクレオチドの長さを有する。一実施形

態では、上記オリゴヌクレオチドは、16ヌクレオチドの長さを有する。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、17ヌクレオチドの長さを有する。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、18ヌクレオチドの長さを有する。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、19ヌクレオチドの長さを有する。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、20ヌクレオチドの長さを有する。

#### 【0410】

一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号1～75からなる群から選択される配列を含み、上記オリゴヌクレオチドは、19ヌクレオチドの長さを有する。そのような実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは19量体である。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列5'CTTTACGGTAGAAGGAAC7'（配列番号404；19量体）を含む。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号404の配列からなる。

#### 【0411】

一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号1～75からなる群から選択される配列を含み、上記オリゴヌクレオチドは、18ヌクレオチドの長さを有する。そのような実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは18量体である。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号1～13からなる群から選択される配列を含む。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号1～13からなる群から選択される配列からなる。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号4または配列番号5の配列を含む。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号4の配列を含む。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号5の配列を含む。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号4または配列番号5の配列からなる。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号5の配列からなる。

#### 【0412】

一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号1～75からなる群から選択される配列を含み、上記オリゴヌクレオチドは、17ヌクレオチドの長さを有する。そのような実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは17量体である。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号14～27からなる群から選択される配列を含む。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号14～27からなる群から選択される配列からなる。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号22、配列番号23、または配列番号24の配列を含む。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号22の配列を含む。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号23の配列を含む。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号24の配列を含む。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号22、配列番号23、または配列番号24の配列からなる。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号22の配列からなる。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号23の配列からなる。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号24の配列からなる。

#### 【0413】

一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号1～75からなる群から選択される配列を含み、上記オリゴヌクレオチドは、16ヌクレオチドの長さを有する。そのような実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは16量体である。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号28から42からなる群から選択される配列を含む。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号28～42からなる群から選択される配列からなる。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号36、配列番号37、配列番号38、または配列番号39の配列を含む。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号36の配列を含む。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号37の配列を含む。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号38の配列を含む。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号39の配列を含む。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号36、配列番号37、配列番号

38、または配列番号39の配列からなる。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号36の配列からなる。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号37の配列からなる。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号38の配列からなる。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号39の配列からなる。

#### 【0414】

一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号1～75からなる群から選択される配列を含み、上記オリゴヌクレオチドは、15ヌクレオチドの長さを有する。そのような実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは15量体である。一実施形態では、前記オリゴヌクレオチドは、配列番号43から58からなる群から選択される配列を含む。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号43～58からなる群から選択される配列からなる。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号51、配列番号52、配列番号53、配列番号54または配列番号55の配列を含む。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号51の配列を含む。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号52の配列を含む。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号53の配列を含む。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号54の配列を含む。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号55の配列を含む。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号51、配列番号52、配列番号53、配列番号54、または配列番号55の配列からなる。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号51の配列からなる。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号52の配列からなる。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号53の配列からなる。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号54の配列からなる。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号55の配列からなる。

#### 【0415】

一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号1～75からなる群から選択される配列を含み、上記オリゴヌクレオチドは、14ヌクレオチドの長さを有する。そのような実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは14量体である。一実施形態では、前記オリゴヌクレオチドは、配列番号59から75からなる群から選択される配列を含む。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号59～75からなる群から選択される配列からなる。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号67、配列番号68、配列番号69、または配列番号70の配列を含む。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号67の配列を含む。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号68の配列を含む。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号69の配列を含む。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号70の配列を含む。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号67、配列番号68、配列番号69、または配列番号70の配列からなる。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号67の配列からなる。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号68の配列からなる。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号69の配列からなる。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号70の配列からなる。

#### 【0416】

一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号4、5、22～24、36～39、51～55、67～70、および配列番号404からなる群から選択される配列を含む。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号4、5、22～24、36～39、51～55、67～70、および配列番号404からなる群から選択される配列を含み、残基のすべては、a b c-DNA残基である。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号4、5、22～24、36～39、51～55、67～70、および配列番号404からなる群から選択される配列からなる。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号4、5、22～24、36～39、51～55、67～70、および配列番号404からなる群から選択される配列からなり、残基のすべては、a b c-DNA残基である。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号4、5、22

～24、36～39、51～55、および配列番号404からなる群から選択される配列を含む。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号4、5、22～24、36～39、51～55、および配列番号404からなる群から選択される配列を含み、残基のすべては、a b c - DNA 残基である。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号4、5、22～24、36から39、51～55、および配列番号404からなる群から選択される配列からなる。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号4、5、22～24、36～39、51～55、および配列番号404からなる群から選択される配列からなり、残基のすべては、a b c - DNA 残基である。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号417および配列番号418からなる群から選択される配列を含む。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号417の配列を含む。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号418の配列を含む。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号417および配列番号418からなる群から選択される配列からなる。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号417の配列からなる。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号418の配列からなる。

【0417】

### エクソン53

DMD遺伝子のエクソン53の配列（配列番号405）を以下に示す：

配列表2

#### エクソン53

|            |                   |                   |                   |                   |                   |
|------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 1          | cctccagact        | agcatttact        | actatatatt        | tattttttcct       | ttttattctag       |
|            | TTGAAAGAAT        | TCAGAAATCAG       | TGGGATGAAG        | <b>TACAAGAACA</b> | <b>CCTTCAGAAC</b> |
| <b>101</b> | <b>CGGAGGCAAC</b> | <b>AGTTGAATGA</b> | <b>AATGTTAAAG</b> | GATTCAACAC        | AATGGCTGGA        |
|            | AGCTAAGGAA        | GAAGCTGAGC        | AGGTCTTAGG        | ACAGGCCAGA        | GCCAAGCTTG        |
| 201        | AGTCATGGAA        | GGAGGGTCCC        | TATACAGTAG        | ATGCAATCCA        | AAAGAAAATC        |
|            | ACAGAAACCA        | AGgttagtat        | caaagatacc        | ttttttaaatt       | aaaataactgg       |
| 301        | ttacatttga        | ta                |                   |                   |                   |

【0418】

強調表示された部分の対応する転写配列は次の通りである。

配列表3

5' GTA CAA GAA CAC CTT CAG AAC CGG AGG CAA CAG TTG AAT GAA ATG  
TTA A（配列番号406）

【0419】

本発明に従って有用なDMD遺伝子のエクソン53に相補的なオリゴヌクレオチドには、以下が含まれるが、これらに限定されない：

5' CAT GTT CTT GTG GAA GTC TTG GCC TCC GTT  
GTC AAC TTA CTT TAC AAT 7'（配列番号407）および表4に提供されているオリゴヌクレオチド。

## 【表 4－1】

表4－エクソン5 3

| 配列（5' から7'）        | 配列番号  |
|--------------------|-------|
| CATGTTCTTGTGGAAGTC | 7 6   |
| ATGTTCTTGTGGAAGTCT | 7 7   |
| TGTTCTTGTGGAAGTCTT | 7 8   |
| GTTCTTGTGGAAGTCTTG | 7 9   |
| TTCTTGTGGAAGTCTTGG | 8 0   |
| TCTTGTGGAAGTCTTGGC | 8 1   |
| CTTGTGGAAGTCTTGGCC | 8 2   |
| TTGTGGAAGTCTTGGCCT | 8 3   |
| TGTGGAAGTCTTGGCCTC | 8 4   |
| GTGGAAGTCTTGGCCTCC | 8 5   |
| TGGAAGTCTTGGCCTCCG | 8 6   |
| GGAAGTCTTGGCCTCCGT | 8 7   |
| GAAGTCTTGGCCTCCGTT | 8 8   |
| AAGTCTTGGCCTCCGTTG | 8 9   |
| AGTCTTGGCCTCCGTTGT | 9 0   |
| GTCTTGGCCTCCGTTGTC | 9 1   |
| TCTTGGCCTCCGTTGTCA | 9 2   |
| CTTGGCCTCCGTTGTCAA | 9 3   |
| TTGGCCTCCGTTGTCAAC | 9 4   |
| TGGCCTCCGTTGTCAACT | 9 5   |
| GGCCTCCGTTGTCAACTT | 9 6   |
| GCCTCCGTTGTCAACTTA | 9 7   |
| CCTCCGTTGTCAACTTAC | 9 8   |
| CTCCGTTGTCAACTTACT | 9 9   |
| TCCGTTGTCAACTTACTT | 1 0 0 |
| CCGTTGTCAACTTACTTT | 1 0 1 |
| CGTTGTCAACTTACTTTA | 1 0 2 |
| GTTGTCAACTTACTTTAC | 1 0 3 |
| TTGTCAACTTACTTTACA | 1 0 4 |
| TGTCAACTTACTTTACAA | 1 0 5 |
| GTCAACTTACTTTACAAT | 1 0 6 |
| CATGTTCTTGTGGAAGT  | 1 0 7 |
| ATGTTCTTGTGGAAGTC  | 1 0 8 |
| TGTTCTTGTGGAAGTCT  | 1 0 9 |
| GTTCTTGTGGAAGTCTT  | 1 1 0 |
| TTCTTGTGGAAGTCTTG  | 1 1 1 |
| TCTTGTGGAAGTCTTGG  | 1 1 2 |
| CTTGTGGAAGTCTTGGC  | 1 1 3 |
| TTGTGGAAGTCTTGGCC  | 1 1 4 |
| TGTGGAAGTCTTGGCCT  | 1 1 5 |
| GTGGAAGTCTTGGCCTC  | 1 1 6 |

10

20

30

40

50

【表 4－2】

|                   |     |
|-------------------|-----|
| TGGAAGTCTTGGCCTCC | 117 |
| GGAAGTCTTGGCCTCCG | 118 |
| GAAGTCTTGGCCTCCGT | 119 |
| AAGTCTTGGCCTCCGTT | 120 |
| AGTCTTGGCCTCCGTTG | 121 |
| GTCTTGGCCTCCGTTGT | 122 |
| TCTTGGCCTCCGTTGTC | 123 |
| CTTGGCCTCCGTTGTCA | 124 |
| TTGGCCTCCGTTGTCAA | 125 |
| TGGCCTCCGTTGTCAAC | 126 |
| GGCCTCCGTTGTCAACT | 127 |
| GCCTCCGTTGTCAACTT | 128 |
| CCTCCGTTGTCAACTTA | 129 |
| CTCCGTTGTCAACTTAC | 130 |
| TCCGTTGTCAACTTACT | 131 |
| CCGTTGTCAACTTACTT | 132 |
| CGTTGTCAACTTACTTT | 133 |
| GTTGTCAACTTACTTTA | 134 |
| TTGTCAACTTACTTTAC | 135 |
| TGTCAACTTACTTTACA | 136 |
| GTCAACTTACTTTACAA | 137 |
| TCAACTTACTTTACAAT | 138 |
| CATGTTCTTGTGGAAG  | 139 |
| ATGTTCTTGTGGAAGT  | 140 |
| TGTTCTTGTGGAAGTC  | 141 |
| GTTCTTGTGGAAGTCT  | 142 |
| TTCTTGTGGAAGTCTT  | 143 |
| TCTTGTGGAAGTCTTG  | 144 |
| CTTGTGGAAGTCTTGG  | 145 |
| TTGTGGAAGTCTTGGC  | 146 |
| TGTGGAAGTCTTGGCC  | 147 |
| GTGGAAGTCTTGGCCT  | 148 |
| TGGAAGTCTTGGCCTC  | 149 |
| GGAAGTCTTGGCCTCC  | 150 |
| GAAGTCTTGGCCTCCG  | 151 |
| AAGTCTTGGCCTCCGT  | 152 |
| AGTCTTGGCCTCCGTT  | 153 |
| GTCTTGGCCTCCGTTG  | 154 |
| TCTTGGCCTCCGTTGT  | 155 |
| CTTGGCCTCCGTTGTC  | 156 |
| TTGGCCTCCGTTGTCA  | 157 |
| TGGCCTCCGTTGTCAA  | 158 |
| GGCCTCCGTTGTCAAC  | 159 |

10

20

30

40

50

【表 4－3】

|                  |     |
|------------------|-----|
| GCCTCCGTTGTCAACT | 160 |
| CCTCCGTTGTCAACTT | 161 |
| CTCCGTTGTCAACTTA | 162 |
| TCCGTTGTCAACTTAC | 163 |
| CCGTTGTCAACTTACT | 164 |
| CGTTGTCAACTTACTT | 165 |
| GTTGTCAACTTACTTT | 166 |
| TTGTCAACTTACTTTA | 167 |
| TGTCAACTTACTTTAC | 168 |
| GTCAACTTACTTTACA | 169 |
| TCAACTTACTTTACAA | 170 |
| CAACTTACTTTACAAT | 171 |
| CATGTTCTTGTGGAA  | 172 |
| ATGTTCTTGTGGAAG  | 173 |
| TGTTCTTGTGGAAGT  | 174 |
| GTTCTTGTGGAAGTC  | 175 |
| TTCTTGTGGAAGTCT  | 176 |
| TCTTGTGGAAGTCTT  | 177 |
| CTTGTGGAAGTCTTG  | 178 |
| TTGTGGAAGTCTTGG  | 179 |
| TGTGGAAGTCTTGGC  | 180 |
| GTGGAAGTCTTGGCC  | 181 |
| TGGAAGTCTTGGCCT  | 182 |
| GGAAGTCTTGGCCTC  | 183 |
| GAAGTCTTGGCCTCC  | 184 |
| AAGTCTTGGCCTCCG  | 185 |
| AGTCTTGGCCTCCGT  | 186 |
| GTCTTGGCCTCCGTT  | 187 |
| TCTTGGCCTCCGTTG  | 188 |
| CTTGGCCTCCGTTGT  | 189 |
| TTGGCCTCCGTTGTC  | 190 |
| TGGCCTCCGTTGTCA  | 191 |
| GGCCTCCGTTGTCAA  | 192 |
| GCCTCCGTTGTCAAC  | 193 |
| CCTCCGTTGTCAACT  | 194 |
| CTCCGTTGTCAACTT  | 195 |
| TCCGTTGTCAACTTA  | 196 |
| CCGTTGTCAACTTAC  | 197 |
| CGTTGTCAACTTACT  | 198 |
| GTTGTCAACTTACTT  | 199 |
| TTGTCAACTTACTTT  | 200 |
| TGTCAACTTACTTTA  | 201 |
| GTCAACTTACTTTAC  | 202 |

10

20

30

40

50

【表 4 - 4】

|                 |     |
|-----------------|-----|
| TCAACTTACTTTACA | 203 |
| CAACTTACTTTACAA | 204 |
| AACTTACTTTACAAT | 205 |
| CATGTTCTTGTGGA  | 206 |
| ATGTTCTTGTGGAA  | 207 |
| TGTTCTTGTGGAAG  | 208 |
| GTTCTTGTGGAAGT  | 209 |
| TTCTTGTGGAAGTC  | 210 |
| TCTTGTGGAAGTCT  | 211 |
| CTTGTGGAAGTCTT  | 212 |
| TTGTGGAAGTCTTG  | 213 |
| TGTGGAAGTCTTGG  | 214 |
| GTGGAAGTCTTGGC  | 215 |
| TGGAAGTCTTGGCC  | 216 |
| GGAAGTCTTGGCCT  | 217 |
| GAAGTCTTGGCCTC  | 218 |
| AAGTCTTGGCCTCC  | 219 |
| AGTCTTGGCCTCCG  | 220 |
| GTCTTGGCCTCCGT  | 221 |
| TCTTGGCCTCCGTT  | 222 |
| CTTGGCCTCCGTTG  | 223 |
| TTGGCCTCCGTTGT  | 224 |
| TGGCCTCCGTTGTCT | 225 |
| GGCCTCCGTTGTCA  | 226 |
| GCCTCCGTTGTCAA  | 227 |
| CCTCCGTTGTCAAC  | 228 |
| CTCCGTTGTCAACT  | 229 |
| TCCGTTGTCAACTT  | 230 |
| CCGTTGTCAACTTA  | 231 |
| CGTTGTCAACTTAC  | 232 |
| GTTGTCAACTTACT  | 233 |
| TTGTCAACTTACTT  | 234 |
| TGTCAACTTACTTT  | 235 |
| GTCAACTTACTTTA  | 236 |
| TCAACTTACTTTAC  | 237 |
| CAACTTACTTTACA  | 238 |
| AACTTACTTTACAA  | 239 |
| ACTTACTTTACAAT  | 240 |

10

20

30

40

## 【0420】

一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号76～240からなる群から選択される配列を含む。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号76～240からなる群から選択される配列を含み、オリゴヌクレオチドは、14～20ヌクレオチドの長さを有する。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号76～240からなる群から選択される配列を含み、オリゴヌクレオチドは、14～19ヌクレオチドの長さを有する。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、14ヌクレオチドの長さを有する。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、15ヌクレオチドの長さを有する。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、16ヌクレオチドの長さを有する。一

50

実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、17ヌクレオチドの長さを有する。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、18ヌクレオチドの長さを有する。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、19ヌクレオチドの長さを有する。

【0421】

一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号76～240からなる群から選択される配列を含み、上記オリゴヌクレオチドは、18ヌクレオチドの長さを有する。そのような実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは18量体である。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号76～106からなる群から選択される配列を含む。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号76～106からなる群から選択される配列からなる。

10

【0422】

一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号76～240からなる群から選択される配列を含み、上記オリゴヌクレオチドは、17ヌクレオチドの長さを有する。そのような実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは17量体である。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号107～138からなる群から選択される配列を含む。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号107～138からなる群から選択される配列からなる。

【0423】

一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号76～240からなる群から選択される配列を含み、上記オリゴヌクレオチドは、16ヌクレオチドの長さを有する。そのような実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは16量体である。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号139～171からなる群から選択される配列を含む。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号139～171からなる群から選択される配列からなる。

20

【0424】

一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号76～240からなる群から選択される配列を含み、上記オリゴヌクレオチドは、15ヌクレオチドの長さを有する。そのような実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは15量体である。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号172～205からなる群から選択される配列を含む。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号172～205からなる群から選択される配列からなる。

30

【0425】

一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号76～240からなる群から選択される配列を含み、上記オリゴヌクレオチドは、14ヌクレオチドの長さを有する。そのような実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは14量体である。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号206～240からなる群から選択される配列を含む。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号206～240からなる群から選択される配列からなる。

【0426】

エクソン45

40

DMD遺伝子のエクソン45の配列（配列番号408）を以下に示す：

配列表4

50

エクソン 4 5

|     |                   |                   |                   |                    |             |
|-----|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|-------------|
| 1   | taaaaagaca        | tggggccttca       | tttttggtttt       | gcctttttgg         | tatcttacag  |
|     | <b>GAACTCCAGG</b> | <b>ATGGCATTGG</b> | <b>GCAGCGGCAA</b> | <b>ACTGT</b> TGTCA | GAACATTGAA  |
| 101 | TGCAACTGGG        | GAAGAAATAA        | TTCAGCAATC        | CTCAAAAACA         | GATGCCAGTA  |
|     | TTCTACAGGA        | AAAATTGGGA        | AGCCTGAATC        | TGCGGTGGCA         | GGAGGTCTGC  |
| 201 | AAACAGCTGT        | CAGACAGAAA        | AAAGAGgtag        | ggcgacagat         | ctaataaggaa |
|     | tgaaaacatt        | ttagcagact        | ttttaa            |                    |             |

10

#### 【 0 4 2 7 】

強調表示された部分の対応する転写配列は次の通りである。

配列表 5

5' GG TATCTTACAG GAACTCCAGG ATGGCATTGG GCAGCGGCAA ACTGT 3'

(配列番号 4 0 9)

#### 【 0 4 2 8 】

本発明に従って有用な DMD 遺伝子のエクソン 4 5 に相補的なオリゴヌクレオチドには、以下が含まれるが、これらに限定されない：

5' CC ATAGAATGTC CTTGAGGTCC TACCGTAACC CGTC  
GCCGTT TGACA 7' (配列番号 4 1 0) および表 5 に示されている配列のいずれか 1 つ。

20

30

40

50

## 【表 5 - 1】

表 5-エクソン 4 5

| 配列 (5' から 7')       | 配列番号  |
|---------------------|-------|
| CCATAGAATGTCCTTGAG  | 2 4 1 |
| CATAGAATGTCCTTGAGG  | 2 4 2 |
| ATAGAATGTCCTTGAGGT  | 2 4 3 |
| TAGAATGTCCTTGAGGTC  | 2 4 4 |
| AGAATGTCCTTGAGGTCC  | 2 4 5 |
| GAATGTCCTTGAGGTCCCT | 2 4 6 |
| AATGTCCTTGAGGTCCTA  | 2 4 7 |
| ATGTCCTTGAGGTCCTAC  | 2 4 8 |
| TGTCCTTGAGGTCCTACC  | 2 4 9 |
| GTCCTTGAGGTCCTACCG  | 2 5 0 |
| TCCTTGAGGTCCTACCGT  | 2 5 1 |
| CCTTGAGGTCCTACCGTA  | 2 5 2 |
| CTTGAGGTCCTACCGTAA  | 2 5 3 |
| TTGAGGTCCTACCGTAAC  | 2 5 4 |
| TGAGGTCCTACCGTAACC  | 2 5 5 |
| GAGGTCCTACCGTAACCC  | 2 5 6 |
| AGGTCCTACCGTAACCCG  | 2 5 7 |
| GGTCCTACCGTAACCCGT  | 2 5 8 |
| GTCCTACCGTAACCCGTC  | 2 5 9 |
| TCCTACCGTAACCCGTCG  | 2 6 0 |
| CCTACCGTAACCCGTCGC  | 2 6 1 |
| CTACCGTAACCCGTCGCC  | 2 6 2 |
| TACCGTAACCCGTCGCCG  | 2 6 3 |
| ACCGTAACCCGTCGCCGT  | 2 6 4 |
| CCGTAACCCGTCGCCGTT  | 2 6 5 |
| CGTAACCCGTCGCCGTTT  | 2 6 6 |
| GTAACCCGTCGCCGTTTG  | 2 6 7 |
| TAACCCGTCGCCGTTTGA  | 2 6 8 |
| AACCCGTCGCCGTTTGAC  | 2 6 9 |
| ACCCGTCGCCGTTTGACA  | 2 7 0 |
| CCATAGAATGTCCTTGA   | 2 7 1 |
| CATAGAATGTCCTTGAG   | 2 7 2 |
| ATAGAATGTCCTTGAGG   | 2 7 3 |
| TAGAATGTCCTTGAGGT   | 2 7 4 |
| AGAATGTCCTTGAGGTC   | 2 7 5 |
| GAATGTCCTTGAGGTCC   | 2 7 6 |
| AATGTCCTTGAGGTCCCT  | 2 7 7 |
| ATGTCCTTGAGGTCCTA   | 2 7 8 |
| TGTCCTTGAGGTCCTAC   | 2 7 9 |
| GTCCTTGAGGTCCTACC   | 2 8 0 |
| TCCTTGAGGTCCTACCG   | 2 8 1 |

10

20

30

40

50

【表 5 - 2】

|                   |     |
|-------------------|-----|
| CCTTGAGGTCCTACCGT | 282 |
| CTTGAGGTCCTACCGTA | 283 |
| TTGAGGTCCTACCGTAA | 284 |
| TGAGGTCCTACCGTAAC | 285 |
| GAGGTCCTACCGTAACC | 286 |
| AGGTCCTACCGTAACCC | 287 |
| GGTCCTACCGTAACCCG | 288 |
| GTCCTACCGTAACCCGT | 289 |
| TCCTACCGTAACCCGTC | 290 |
| CCTACCGTAACCCGTCG | 291 |
| CTACCGTAACCCGTCGC | 292 |
| TACCGTAACCCGTCGCC | 293 |
| ACCGTAACCCGTCGCCG | 294 |
| CCGTAACCCGTCGCCGT | 295 |
| CGTAACCCGTCGCCGTT | 296 |
| GTAACCCGTCGCCGTTT | 297 |
| TAACCCGTCGCCGTTTG | 298 |
| AACCCGTCGCCGTTTGA | 299 |
| ACCCGTCGCCGTTTGAC | 300 |
| CCCGTCGCCGTTTGACA | 301 |
| CCATAGAATGTCCTTG  | 302 |
| CATAGAATGTCCTTGA  | 303 |
| ATAGAATGTCCTTGAG  | 304 |
| TAGAATGTCCTTGAGG  | 305 |
| AGAATGTCCTTGAGGT  | 306 |
| GAATGTCCTTGAGGTC  | 307 |
| AATGTCCTTGAGGTCC  | 308 |
| ATGTCCTTGAGGTCC   | 309 |
| TGTCCTTGAGGTCC    | 310 |
| GTCCTTGAGGTCC     | 311 |
| TCCTTGAGGTCC      | 312 |
| CCTTGAGGTCC       | 313 |
| CTTGAGGTCC        | 314 |
| TTGAGGTCC         | 315 |
| TGAGGTCC          | 316 |
| GAGGTCC           | 317 |
| AGGTCC            | 318 |
| GGTCC             | 319 |
| GTCCTACCGTAACCCG  | 320 |
| TCCTACCGTAACCCGT  | 321 |
| CCTACCGTAACCCGTC  | 322 |
| CTACCGTAACCCGTCG  | 323 |
| TACCGTAACCCGTCGC  | 324 |

10

20

30

40

50

【表 5 - 3】

|                  |       |
|------------------|-------|
| ACCGTAACCCGTCGCC | 3 2 5 |
| CCGTAACCCGTCGCCG | 3 2 6 |
| CGTAACCCGTCGCCGT | 3 2 7 |
| GTAACCCGTCGCCGTT | 3 2 8 |
| TAACCCGTCGCCGTTT | 3 2 9 |
| AACCCGTCGCCGTTTG | 3 3 0 |
| ACCCGTCGCCGTTTGA | 3 3 1 |
| CCCGTCGCCGTTTGAC | 3 3 2 |
| CCGTCGCCGTTTGACA | 3 3 3 |
| CCATAGAATGTCCTT  | 3 3 4 |
| CATAGAATGTCCTTG  | 3 3 5 |
| ATAGAATGTCCTTGA  | 3 3 6 |
| TAGAATGTCCTTGAG  | 3 3 7 |
| AGAATGTCCTTGAGG  | 3 3 8 |
| GAATGTCCTTGAGGT  | 3 3 9 |
| AATGTCCTTGAGGTC  | 3 4 0 |
| ATGTCCTTGAGGTCC  | 3 4 1 |
| TGTCCTTGAGGTCCCT | 3 4 2 |
| GTCCTTGAGGTCCCTA | 3 4 3 |
| TCCTTGAGGTCCCTAC | 3 4 4 |
| CCTTGAGGTCCCTACC | 3 4 5 |
| CTTGAGGTCCCTACCG | 3 4 6 |
| TTGAGGTCCCTACCGT | 3 4 7 |
| TGAGGTCCCTACCGTA | 3 4 8 |
| GAGGTCCCTACCGTAA | 3 4 9 |
| AGGTCCCTACCGTAAC | 3 5 0 |
| GGTCCTACCGTAACC  | 3 5 1 |
| GTCCTACCGTAACCC  | 3 5 2 |
| TCCTACCGTAACCCG  | 3 5 3 |
| CCTACCGTAACCCGT  | 3 5 4 |
| CTACCGTAACCCGTC  | 3 5 5 |
| TACCGTAACCCGTCG  | 3 5 6 |
| ACCGTAACCCGTCGC  | 3 5 7 |
| CCGTAACCCGTCGCC  | 3 5 8 |
| CGTAACCCGTCGCCG  | 3 5 9 |
| GTAACCCGTCGCCGT  | 3 6 0 |
| TAACCCGTCGCCGTT  | 3 6 1 |
| AACCCGTCGCCGTTT  | 3 6 2 |
| ACCCGTCGCCGTTTG  | 3 6 3 |
| CCCGTCGCCGTTTGA  | 3 6 4 |
| CCGTCGCCGTTTGAC  | 3 6 5 |
| CGTCGCCGTTTGACA  | 3 6 6 |
| CCATAGAATGTCCT   | 3 6 7 |

10

20

30

40

50

【表 5 - 4】

|                |       |
|----------------|-------|
| CATAGAATGTCCTT | 3 6 8 |
| ATAGAATGTCCTTG | 3 6 9 |
| TAGAATGTCCTTGA | 3 7 0 |
| AGAATGTCCTTGAG | 3 7 1 |
| GAATGTCCTTGAGG | 3 7 2 |
| AATGTCCTTGAGGT | 3 7 3 |
| ATGTCCTTGAGGTC | 3 7 4 |
| TGTCCTTGAGGTCC | 3 7 5 |
| GTCCTTGAGGTCCT | 3 7 6 |
| TCCTTGAGGTCCTA | 3 7 7 |
| CCTTGAGGTCCTAC | 3 7 8 |
| CTTGAGGTCCTACC | 3 7 9 |
| TTGAGGTCCTACCG | 3 8 0 |
| TGAGGTCCTACCGT | 3 8 1 |
| GAGGTCCTACCGTA | 3 8 2 |
| AGGTCCTACCGTAA | 3 8 3 |
| GGTCCTACCGTAAC | 3 8 4 |
| GTCCTACCGTAACC | 3 8 5 |
| TCCTACCGTAACCC | 3 8 6 |
| CCTACCGTAACCCG | 3 8 7 |
| CTACCGTAACCCGT | 3 8 8 |
| TACCGTAACCCGTC | 3 8 9 |
| ACCGTAACCCGTCG | 3 9 0 |
| CCGTAACCCGTCGC | 3 9 1 |
| CGTAACCCGTCGCC | 3 9 2 |
| GTAACCCGTCGCCG | 3 9 3 |
| TAACCCGTCGCCGT | 3 9 4 |
| AACCCGTCGCCGTT | 3 9 5 |
| ACCCGTCGCCGTTT | 3 9 6 |
| CCCGTCGCCGTTTG | 3 9 7 |
| CCGTCGCCGTTTGA | 3 9 8 |
| CGTCGCCGTTTGAC | 3 9 9 |
| GTCGCCGTTTGACA | 4 0 0 |

## 【0 4 2 9】

一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号 2 4 1 ~ 4 0 0 からなる群から選択される配列を含む。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号 2 4 1 ~ 2 7 0 からなる群から選択される配列を含み、オリゴヌクレオチドは、1 4 ~ 2 0 ヌクレオチドの長さを有する。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号 2 4 1 ~ 4 0 0 からなる群から選択される配列を含み、オリゴヌクレオチドは、1 4 ~ 1 9 ヌクレオチドの長さを有する。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、1 4 ヌクレオチドの長さを有する。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、1 5 ヌクレオチドの長さを有する。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、1 6 ヌクレオチドの長さを有す

る。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、17ヌクレオチドの長さを有する。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、18ヌクレオチドの長さを有する。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、19ヌクレオチドの長さを有する。

【0430】

一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号241～400からなる群から選択される配列を含み、上記オリゴヌクレオチドは、18ヌクレオチドの長さを有する。そのような実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは18量体である。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号241～270からなる群から選択される配列を含む。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号241～270からなる群から選択される配列からなる。

10

【0431】

一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号241～400からなる群から選択される配列を含み、上記オリゴヌクレオチドは、17ヌクレオチドの長さを有する。そのような実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは17量体である。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号271～301からなる群から選択される配列を含む。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号271～301からなる群から選択される配列からなる。

【0432】

一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号241～400からなる群から選択される配列を含み、上記オリゴヌクレオチドは、16ヌクレオチドの長さを有する。そのような実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは16量体である。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号302～333からなる群から選択される配列を含む。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号302～333からなる群から選択される配列からなる。

20

【0433】

一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号241～400からなる群から選択される配列を含み、上記オリゴヌクレオチドは、15ヌクレオチドの長さを有する。そのような実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは15量体である。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号334～366からなる群から選択される配列を含む。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号334～366からなる群から選択される配列からなる。

30

【0434】

一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号241～400からなる群から選択される配列を含み、上記オリゴヌクレオチドは、14ヌクレオチドの長さを有する。そのような実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは14量体である。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号367～240からなる群から選択される配列を含む。一実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号367～240からなる群から選択される配列からなる。

【0435】

本発明はまた、脊髄性筋萎縮症におけるイントロンスプライシングサイレンサー (intronic splicing silencer) N1 (ISS-N1) に相補的なオリゴヌクレオチド、例えば、TCACTTTCATAATGCTGG (配列番号411) を提供する。

40

【0436】

本発明の実施は、別段で明記しない限り、当該技術分野の技術範囲内である、化学、分子生物学、微生物学、組換えDNA、遺伝学、免疫学、細胞生物学、細胞培養、およびトランスジェニック生物学の従来技術を使用する。例えば、Maniatis et al., 1982, Molecular Cloning (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.); Sambrook et al., 1989, Molecular Clonin

50

g, 2nd Ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor N. Y.) ; Sambrook and Russell, 2001, Molecular Cloning, 3rd Ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.) ; Ausubel et al., 1992), Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons including periodic updates) ; Glover, 1985, DNA Cloning (IRL Press Oxford) ; Anand, 1992 ; Guthrie and Fink, 1991 ; Harlow and Lane, 1988, Antibodies, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.) ; Jakoby and Pastan, 1979 ; Nucleic Acid Hybridization (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984) ; Transcription And Translation (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984) ; Culture Of Animal Cells (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987) ; Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986) ; B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984) ; the treatise, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N. Y.) ; Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. H. Miller and M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory) ; Methods In Enzymology, Vols. 154 and 155 (Wu et al. eds.), Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987) ; Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds., 1986) ; Riott, Essential Immunology, 6th Edition, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1988 ; Hogan et al., Manipulating the Mouse Embryo (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. 1986) ; Westerfield, M., The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio), (4th Ed., Univ. of Oregon Press, Eugene, 2000) を参照のこと。

#### 【0437】

別段で定義しない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書に記載のものと同様または同等の方法および材料を本発明の実施または試験に使用することができるが、適切な方法および材料を以下に記載する。本明細書で言及されるすべての刊行物、特許出願、特許、および他の参考文献は、それらの全体が参照により組み込まれる。矛盾する場合、定義を含む本明細書が優先する。

#### 【0438】

さらに、材料、方法、および例は、単なる例示であり、本明細書に記載の本発明の様々な実施形態に限定することを意図するものではない。

#### 【実施例】

#### 【0439】

#### 実施例 1

## 相補的パラレルRNA (parallel RNA) に対するアルファアノマーオリゴヌクレオチドの親和性

相補的パラレルRNAに対する親和性を、UV融解実験により、いくつかのアルファアノマーオリゴヌクレオチドについて評価した(表1)。

### 【0440】

融解温度は、53.3℃～77.0℃の範囲であり、RNA相補体に対するアルファアノマーオリゴヌクレオチドの良好な親和性を示している。

### 【表6】

表1. 相補的パラレルRNAとの二本鎖中のアルファアノマーオリゴヌクレオチドのUV融解曲線(260NM)からのT<sub>m</sub>データ。

| エントリ               | 配列番号 | 配列 <sup>a</sup>                     | T <sub>m</sub> (°C) 対パラレルRNA |
|--------------------|------|-------------------------------------|------------------------------|
| ON1 <sup>b,c</sup> | 412  | 5'-(tccattcggtccaa*paln)-7'         | 76.2                         |
| ON2 <sup>b,c</sup> | 413  | 5'-(t*c*c*a*t*t*c*g*g*c*t*c*c*a)-7' | 77.0                         |
| ON3 <sup>d</sup>   | 414  | 5'-(gatctttacggtagaagg)-7'          | 72.5                         |
| ON4 <sup>d</sup>   | 415  | 5'-(atctttacggtagaagga)-7'          | 70.2                         |
| ON5 <sup>d</sup>   | 416  | 5'-(tctttacggtagaaggaa)-7'          | 69.1                         |
| ON6 <sup>d</sup>   | 417  | 5'-(ctttacggtagaaggaaac)-7'         | 68.7                         |
| ON7 <sup>d</sup>   | 418  | 5'-(tttacggtagaaggaaact)-7'         | 69.3                         |
| ON8 <sup>d</sup>   | 419  | 5'-(ttacggtagaaggaaacta)-7'         | 70.8                         |
| ON9 <sup>d</sup>   | 420  | 5'-(tacggtagaaggaaactac)-7'         | 71.0                         |
| ON10 <sup>d</sup>  | 421  | 5'-(aactagtccaatatattta)-7'         | 53.3                         |
| ON11 <sup>d</sup>  | 422  | 5'-(ctagtccaatatatttagt)-7'         | 54.7                         |
| ON12 <sup>d</sup>  | 423  | 5'-(agttccaatatatttagtgt)-7'        | 57.4                         |
| ON13 <sup>d</sup>  | 424  | 5'-(ttccaatatatttagtgtct)-7'        | 54.7                         |
| ON14 <sup>d</sup>  | 425  | 5'-(caatatatttagtgtctcc)-7'         | 60.4                         |

<sup>a</sup> a, g, t, cは、それぞれ、abc-DNA修飾アデニン、グアニン、チミン、メチルシトシンに対応し、\*は、ホスホロチオエート結合を示し、palnは、アルキルリンカーを介してオリゴヌクレオチドにコンジュゲートしたパルミチン酸に対応する。

<sup>b</sup> 10mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、150mM NaCl、pH7.0中の鎖の総濃度2μM

<sup>c</sup> 未修飾二本鎖、DNA/RNAのT<sub>m</sub>: 67.4℃

<sup>d</sup> 10mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、75mM NaCl、pH7.0中の鎖の総濃度2μM

### 【0441】

#### 実施例2

#### 酸性条件におけるアルファアノマーオリゴヌクレオチドの安定性

ON1を酢酸緩衝液(0.1M、pH=4.5)で10μMに希釈し、得られた溶液を37℃で24時間インキュベートすることによって、ON1の酸性安定性を評価した。未処理のON1を参照として使用した。ON1の完全性をLC-MSによって測定した。未処理ON1のクロマトグラムおよび断片化パターン(図1A、図1B)と、酸性条件で24時間処理したON1のクロマトグラムおよび断片化パターン(図1C、図1D)と、の間に違いは見られない。この実験は、例えば細胞のリソソーム区画で遭遇し得る酸性条件におけるアルファアノマーオリゴヌクレオチドの安定性を示している。

### 【0442】

#### 実施例3

#### アルファアノマーオリゴヌクレオチドの熱安定性

ON1をPBS溶液(137mM NaCl、2.7mM KCl、10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、1.8mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、pH=7.4)で10μMに希釈し、得られた溶液を95℃で60分間インキュベートすることによって、ON1の熱安定性を評価した。未処理のON1を参照として使用した。ON1の完全性をLC-MSによって測定した。未処理ON1のクロマトグラムおよび断片化パターン(図2A、図2B)と、95℃で加熱し

たON1のクロマトグラムおよび断片化パターン（図2C、図2D）と、の間に違いは見られない。この実験は、水溶液中のアルファアノマーオリゴヌクレオチドの化学的安定性を示している。

【0443】

#### 実施例4

##### アルファアノマーオリゴヌクレオチドの生体安定性

ON1およびその対応する天然オリゴヌクレオチドを、H<sub>2</sub>Oおよびマウス血清（Sigma）の1：1混合液で10μMに希釈した。反応は20μLスケールで行い、37℃でインキュベートした。H<sub>2</sub>O中の10μMのオリゴヌクレオチドを37℃で24時間インキュベートすることにより、対照反応を行った。ホルムアミド（20μL）の添加により、特定の時間（1時間、2時間、4時間、および24時間）に反応を停止させた。得られた混合物を-20℃で保存した後、90℃で5分間熱変性させ、次いで20%変性PAGEによって分析した（図3）。標準的なプロトコルに従い、ステインスオール（stains-all）溶液の染色により視覚化を行った。実験結果は、天然DNA鎖が4時間後にはすでに完全に消化され、ON1が24時間後でも完全に安定していることを示している。

【0444】

#### 実施例5

##### 脂質基にコンジュゲートしたアルファアノマーオリゴヌクレオチドの、アルブミンへの結合

ON1のアルブミンへの結合を移動度シフトアッセイによって評価した（図4）。0、0.1、0.2、0.3、0.5、0.7、1.0、および1.5アルブミン当量（マウス血清由来のアルブミン、凍結乾燥粉末、96%以上（Sigma-Aldrich））を含むPBS溶液（137mM NaCl、2.7mM KCl、10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、1.8mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、pH=7.4）中、40μMでON1を37℃で1時間、インキュベートすることによって、試験溶液を調製した。10μLの各試料を10%ネイティブPAGE（40V、170分、7℃で実行）で分析した。標準的なプロトコルに従い、すべての溶液の染色により視覚化を行った。下のバンドは複合体を形成していないON1の存在を示し、上のバンドはアルブミンと複合体を形成したON1の存在を示す。この実験は、ON1が0.3当量以上のアルブミン濃度でアルブミンに効率的に結合できることを示している。

【0445】

ON1のアルブミン結合の定量化を限外濾過実験によって評価した（図5）。簡潔に述べると、0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.4、0.6、および0.7アルブミン当量（マウス血清由来のアルブミン、凍結乾燥粉末、96%以上（Sigma-Aldrich））を含むPBS溶液（137mM NaCl、2.7mM KCl、10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、1.8mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、pH=7.4）中、55μMでON1を37℃で1時間インキュベートすることによって、試験溶液を調製した。次いで、溶液をSpin Column（Amicon Ultra-0.5 Centrifugal Filter Unit（Sigma-Aldrich））で濾過した。濾液中のON1の吸光度をNanodrop分光光度計で測定し、0当量のアルブミンを含む溶液を参照することにより、複合体を形成していないON1の割合を計算した。実験結果は、0.3当量のアルブミンでは、わずか14%のオリゴヌクレオチドが溶液中で複合体を形成していないことを示している。

【0446】

マウス血清（Sigma-Aldrich）中のアルブミンへのON1の結合を、移動度シフトアッセイによって評価した（図6）。25%グリセロールならびに0%、1.25%、5.0%、12.5%、および25.0%マウス血清を含むPBS溶液（137mM NaCl、2.7mM KCl、10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、1.8mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、pH=7.4）中、40μMでON1を37℃で1時間インキュベートすることによって、試験溶液を調製した。25%グリセロールおよび80μMマウスアルブミンを含むPB

S 溶液中、 $40\text{ }\mu\text{M}$ でON1を $37^{\circ}\text{C}$ で1時間インキュベートすることによって、対照溶液を調製した。 $10\text{ }\mu\text{L}$ の各試料を15%ネイティブPAGE（60V、260分）で分析した。標準的なプロトコルに従い、すべての溶液の染色により視覚化を行った。下のバンドは複合体を形成していないON1の存在を示し、上のバンドはアルブミンと複合体を形成したON1の存在を示す。実験の結果は、ON1が血清中のアルブミンに効率的に結合できることを示している。

【0447】

#### 実施例6

##### 凝集体の存在および溶解

凝集体の形成および溶解をZetasizer Nano ZSで分析した（図7）。ON1を、 $7.5\text{ mg/mL}$ の濃度で、PBS溶液（ $137\text{ mM NaCl}$ 、 $2.7\text{ mM KCl}$ 、 $10\text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$ 、 $1.8\text{ mM KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{pH}=7.4$ ）に溶解した。ナノ粒子の最初の存在を記録した（0分）。次いで、溶液を $95^{\circ}\text{C}$ に加熱し、10分、20分、および30分の加熱後にナノ粒子の存在を記録した。次いで、溶液を室温で24時間放置し、次いで、ナノ粒子の存在を再び記録した。最初は、約 $1000\text{ nm}$ のサイズを有する粒子について強い信号を測定することができる。溶液を加熱することにより、シグナルが消える。実験結果は、親油性部分にコンジュゲートしたオリゴヌクレオチドが水溶液中で凝集体を形成することを示している。しかしながら、溶液を $95^{\circ}\text{C}$ で少なくとも20分間加熱することにより、確実に凝集体が分散する。室温で24時間放置した後、凝集体は再び出現しない。

【0448】

#### 実施例7

##### エクソンスキッピング効率の決定

エクソンスキッピングは、1つ以上のエクソンを成熟mRNAから除去するために、アンチセンスオリゴヌクレオチドの使用を含む。エクソンスキッピングを使用することにより、1つ以上のエクソンを成熟mRNAから除去し、インフレームである成熟mRNAを得ることができる。エクソンのスキッピングは、スプライス部位の一方もしくは両方、または内部エクソン配列を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドの結合によって誘導することができる。エクソンは、両方のスプライス部位がスプライセオソーム複合体によって認識される場合においてのみmRNAに含まれるため、スプライス部位は、アンチセンスオリゴヌクレオチドの明らかな標的である。

【0449】

本発明のabc-DNA脂質基コンジュゲートオリゴヌクレオチドが、目的の遺伝子のプレmRNAのエクソンスキッピングを引き起こすかどうかを決定するために、細胞を、所与のエクソンを標的とするオリゴヌクレオチド結合体と共に、一定期間インキュベートする。特定の実施形態では、細胞をリポフェクタミンでトランスフェクトする。エクソンスキッピングは、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）またはDNAシーケンシングを使用することにより検出される。全RNAを細胞から抽出し、RT-PCRを標的エクソン全体について行い、RT-PCR産物のサイズをゲル電気泳動によって評価する。エクソンスキッピングが生じた場合、生成物は標的とされたエクソンを含まれず、この生成物のサイズは、対象のエクソンを含む生成物と比較して、予想どおりに短くなる。同様に、標的エクソン全体で成熟mRNAを配列決定して、標的エクソンの配列が成熟mRNAに存在しないかどうかを決定することができる。

【0450】

本発明のabc-DNA脂質基コンジュゲートオリゴヌクレオチドの効果をさらに決定するために、ジストロフィン回復は、筋肉生検から採取された試料のウェスタンブロットによって検証され、%ジストロフィン陽性筋線維は顕微鏡検査によって決定される。

【0451】

特定のエクソンを標的を絞ってスキッピングすることにより、DMD表現型をより穏やかなBMD表現型に変換できる。エクソンスキッピングは、分化したヒト筋芽細胞、DM

10

20

30

40

50

D患者または健康な患者に由来する筋細胞をDMD遺伝子のプレmRNAに結合するアンチセンスabc-DNA脂質基コンジュゲートオリゴヌクレオチドとインキュベートすることによって検出される。あるいは、この実施例にも記載されているように、細胞は、DMDのマウスモデルであるMDXマウスに由来する。正常細胞のエクソンスキッピングのレベルをDMD細胞のエクソンスキッピングのレベルと比較することに加えて、DMD患者またはMDXマウスに由来する細胞のエクソンスキッピングのレベルを、abc-DNA脂質基コンジュゲートオリゴヌクレオチドの欠如したエクソンスキッピングのレベルと比較する。特定の実施形態では、目的のabc-DNA脂質基コンジュゲートオリゴヌクレオチドの活性は、エテプリルセンまたはドリサペルセンの投与後のエクソンスキッピングのレベルと比較される。

#### 【0452】

この例では、アンチセンスオリゴヌクレオチドの濃度は、260nmで希釈されたアリコートの吸光度を測定することによって推定された。次いで、特定量のアンチセンスオリゴヌクレオチド(AON)を、以下に説明するように、インビトロアッセイでエクソンスキッピングを誘導するそれらの能力について試験した。

#### 【0453】

簡単に説明すると、実験は、マウス対照の不死化筋芽細胞培養物(C2C12)またはヒト対照の不死化筋芽細胞培養物(KM155)で実施された。標準的な培養技術を使用して、細胞を増殖させ、筋管に分化させた。トランスフェクション試薬として、マウス細胞培養用のリポフェクタミンおよびヒト細胞培養用のオリゴフェクタミンを使用することにより、細胞にAONをトランスフェクトした。2'-OMe-ホスホロジチオエート(2OMePS)骨格とスクランブル(非機能)2OMePS AONを備えた相補的AONを、それぞれ正の対照と負の対照として使用した。

#### 【0454】

24時間後、全RNAを抽出し、分子分析を行なった。ジストロフィンプレmRNAまたは誘導されたエクソン再配列の標的領域を研究するために、2段階(ネステッド)PCR反応を使用した逆転写酵素増幅(RT-PCR)を行った。

#### 【0455】

エクソン23のスキッピングを誘導することを目的としたAONを分析するために、RT-PCRをエクソン23にまたがる領域で実施した。cDNA合成後、マウスエクソン21および26(領域21-26)で特定のプライマーを使用して1回目のPCRを実行し、マウスエクソン22および24(領域22-24)で特定のプライマーを使用して2回目のPCRを実行した。

#### 【0456】

エクソン51のスキッピングを誘発することを目的としたAONを分析するために、RT-PCRをエクソン51にまたがる領域で実施した。cDNA合成後、ヒトエクソン48および53(領域48-53)で特定のプライマーを使用して第1ラウンドのPCRを実施し、ヒトエクソン49および52(領域49-52)で特定のプライマーを使用して第2ラウンドのPCRを実施した。

#### 【0457】

スキッピングされていない製品とスキッピングされた製品の予想製品サイズを計算した。反応生成物の強度は、サイズ標準を含むアガロースゲルで推定した。これにより、潜在的なバイアスを考慮する必要がある。これは、短い製品またはエクソンスキッピングされた製品は、大きな製品よりも効率的に増幅される傾向があり、スキッピング効率の過大評価につながるためである。エクソンスキッピング産物を示すバンドは、マウス細胞(図8)またはヒト細胞(図9A、図9B)で測定できる。実験の結果は、インビトロで遺伝子発現を調節するアルファアノマーオリゴヌクレオチドの能力を示している。本発明のコンジュゲートのエクソンスキッピング能力は、筋ジストロフィーのmdxマウスモデルにおいてインビボで確認されている。これにより、mdx23マウスは、配列番号412を含む配列を有する本発明のabc-DNA脂質基コンジュゲートオリゴヌクレオチドの12

10

20

30

40

50

週間の静脈内注射（50 mg / kg / 週）を受けた。処置後、横隔膜と腓腹筋の組織を分離し、エクソンスキッピングを測定した。

【0458】

#### 実施例 8

##### hDMD del 52 / mdx マウスモデルでのエクソンスキッピング

エクソンスキッピングの有効性は、筋ジストロフィーの hDMD del 52 / mdx マウスモデルで決定される。マウスは、配列番号 418、対応するホスホロジアミデートモルホリノオリゴマー（PMO）または生理食塩水を含む配列を有する abc-DNA 脂質基コンジュゲートオリゴヌクレオチドの静脈内注射を受ける。マウスは、オリゴヌクレオチドの週 12 回の注射（50 mg / kg / 週）を受ける。処置後、次の組織が分離される：心臓、横隔膜、前脛骨筋、腓腹筋、大腿四頭筋、上腕三頭筋、脳、肝臓、腎臓、およびエクソンスキッピングが決定される。特定の実施形態では、マウスは、abc-DNA 脂質基コンジュゲートオリゴヌクレオチドの代わりにエチプラーセンまたはドリサペルセンで処置される。エクソンスキッピングは、RT-PCR、ウエスタンブロット、免疫蛍光および／またはデジタル PCR によって決定される。

10

20

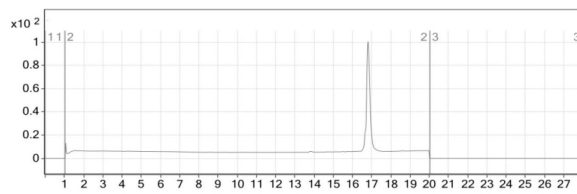
30

40

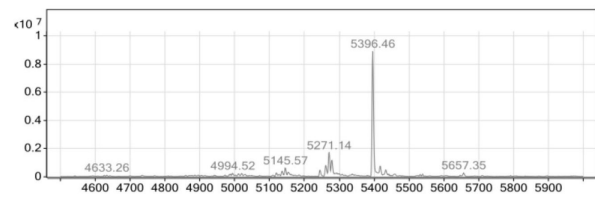
50

【図面】

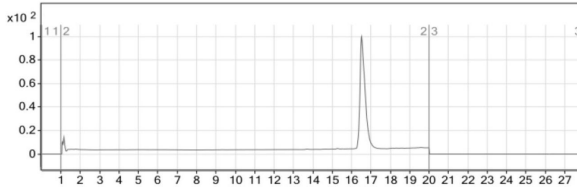
【図 1 A】



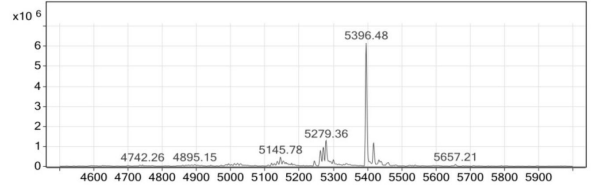
【図 1 B】



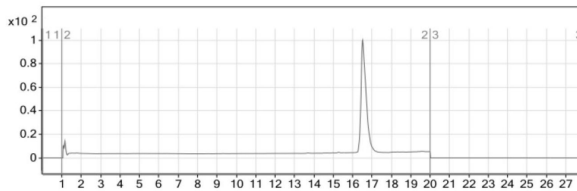
【図 1 C】



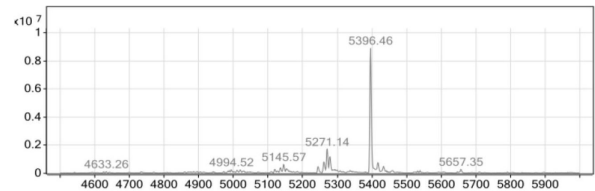
【図 1 D】



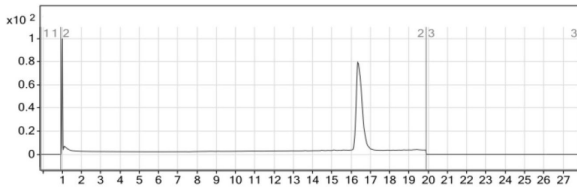
【図 2 A】



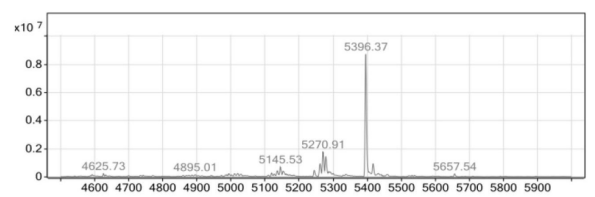
【図 2 B】



【図 2 C】



【図 2 D】



10

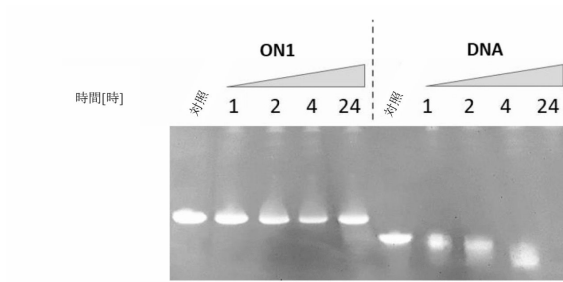
20

30

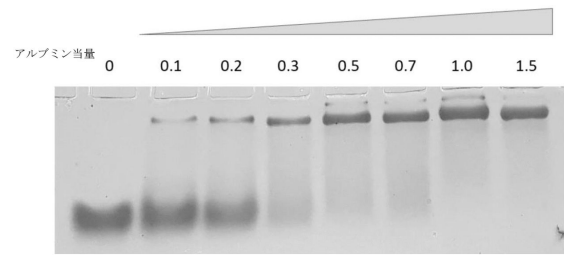
40

50

【図 3】

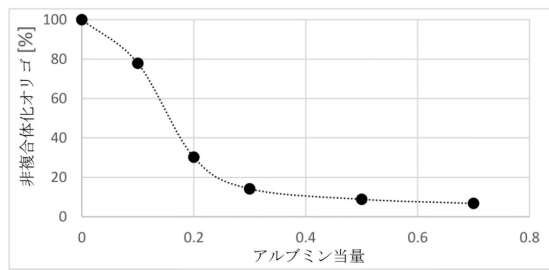


【図 4】

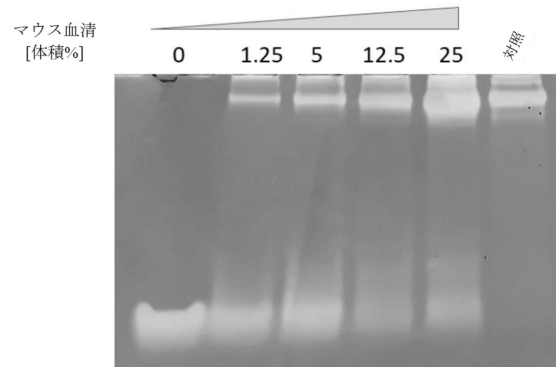


10

【図 5】



【図 6】



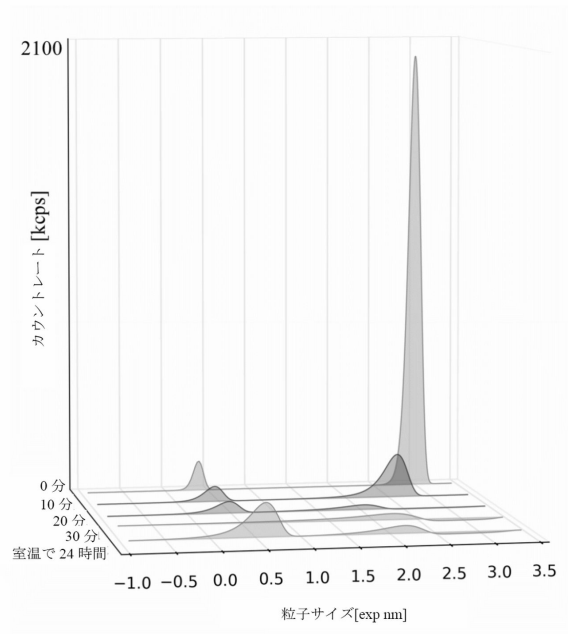
20

30

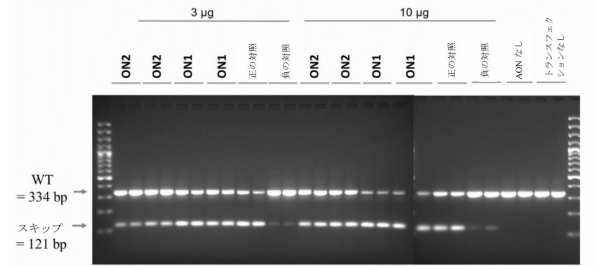
40

50

【図 7】

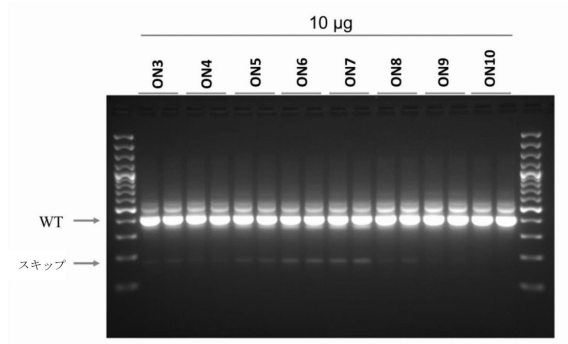


【図 8】

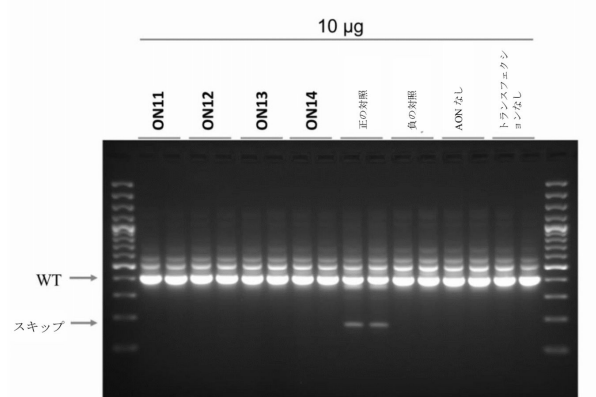


10

【図 9 A】



【図 9 B】



30

40

50

【配列表】  
0007665509000001.app

10

20

30

40

50

---

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

F I

C 1 2 N 5/10

(56)参考文献

国際公開第2018/099946 (WO, A1)

特表2020-502072 (JP, A)

国際公開第2010/036698 (WO, A1)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 1 2 N

A 6 1 K

A 6 1 P

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)