

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7558201号
(P7558201)

(45)発行日 令和6年9月30日(2024.9.30)

(24)登録日 令和6年9月19日(2024.9.19)

(51)国際特許分類		F I	
C 0 7 H	1/00 (2006.01)	C 0 7 H	1/00
C 0 7 H	15/08 (2006.01)	C 0 7 H	15/08
C 0 7 H	21/00 (2006.01)	C 0 7 H	21/00
A 6 1 K	47/61 (2017.01)	A 6 1 K	47/61

請求項の数 24 (全43頁)

(21)出願番号	特願2021-569002(P2021-569002)	(73)特許権者	591003013
(86)(22)出願日	令和2年5月18日(2020.5.18)		エフ・ホフマン - ラ ロシュ アーゲー
(65)公表番号	特表2022-533220(P2022-533220 A)		F . HOFFMANN - LA ROCH E AKTIENGESELLSCHA FT
(43)公表日	令和4年7月21日(2022.7.21)		スイス・シーエイチ - 4 0 7 0 パーゼル
(86)国際出願番号	PCT/EP2020/063749		・グレンツアーヘルストラツセ 1 2 4
(87)国際公開番号	WO2020/234208	(74)代理人	100102978
(87)国際公開日	令和2年11月26日(2020.11.26)		弁理士 清水 初志
審査請求日	令和5年5月16日(2023.5.16)	(74)代理人	100160923
(31)優先権主張番号	19175309.4		弁理士 山口 裕孝
(32)優先日	令和1年5月20日(2019.5.20)	(74)代理人	100119507
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)		弁理士 刑部 俊
		(74)代理人	100142929
			弁理士 井上 隆一

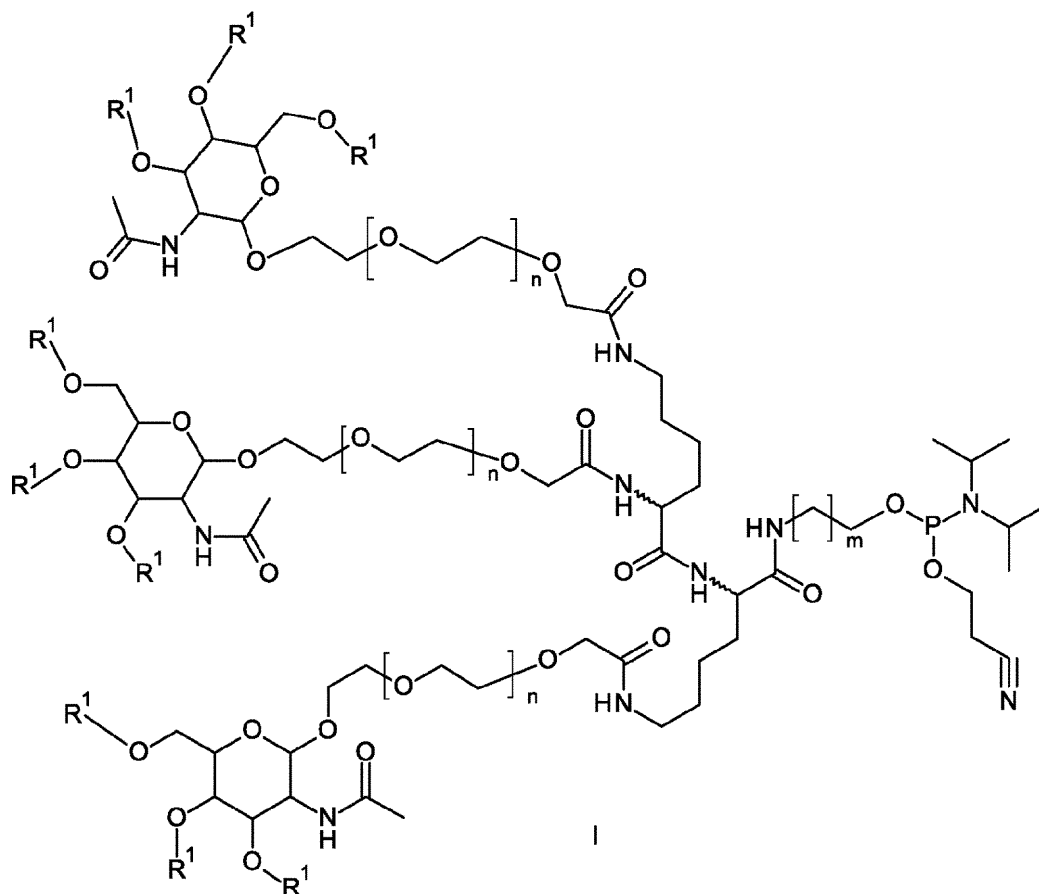
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 G a l N A c ホスホラミダイトエピマーを調製するための方法

(57)【特許請求の範囲】

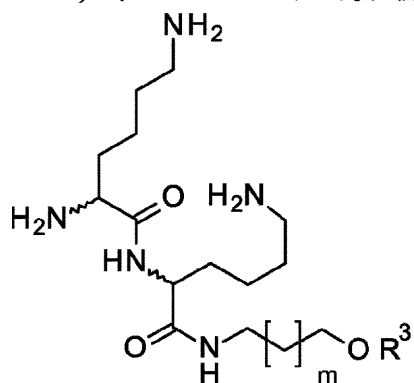
【請求項 1】

式 I のエピマー的に純粋な G a l N A c ホスホラミダイトエピマー



(式中、 R^1 は、ヒドロキシ保護基であり、 n は、 $0 \sim 10$ の整数であり、 m は、 $0 \sim 20$ の整数である)、その対応するエナンチオマーおよび/または光学異性体を調製するための方法であって、

a) 式 I I のエピマー的に純粋な化合物



(式中、 R^3 は、ヒドロキシ保護基であり、 m は、式 I に定義される通りである)、またはその塩を、

式 I I I a の GalNAc 部分

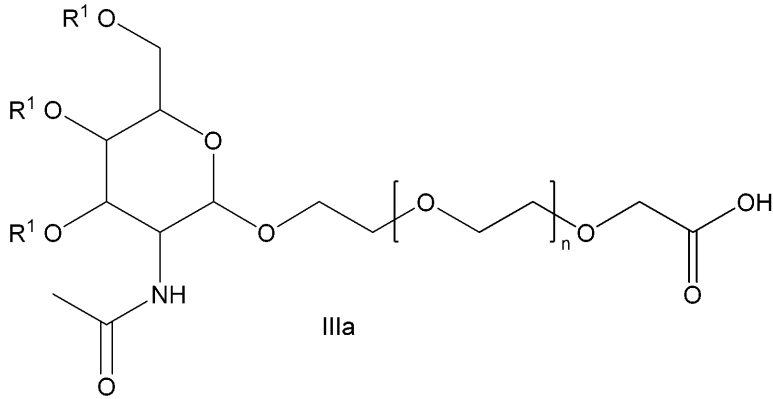
10

20

30

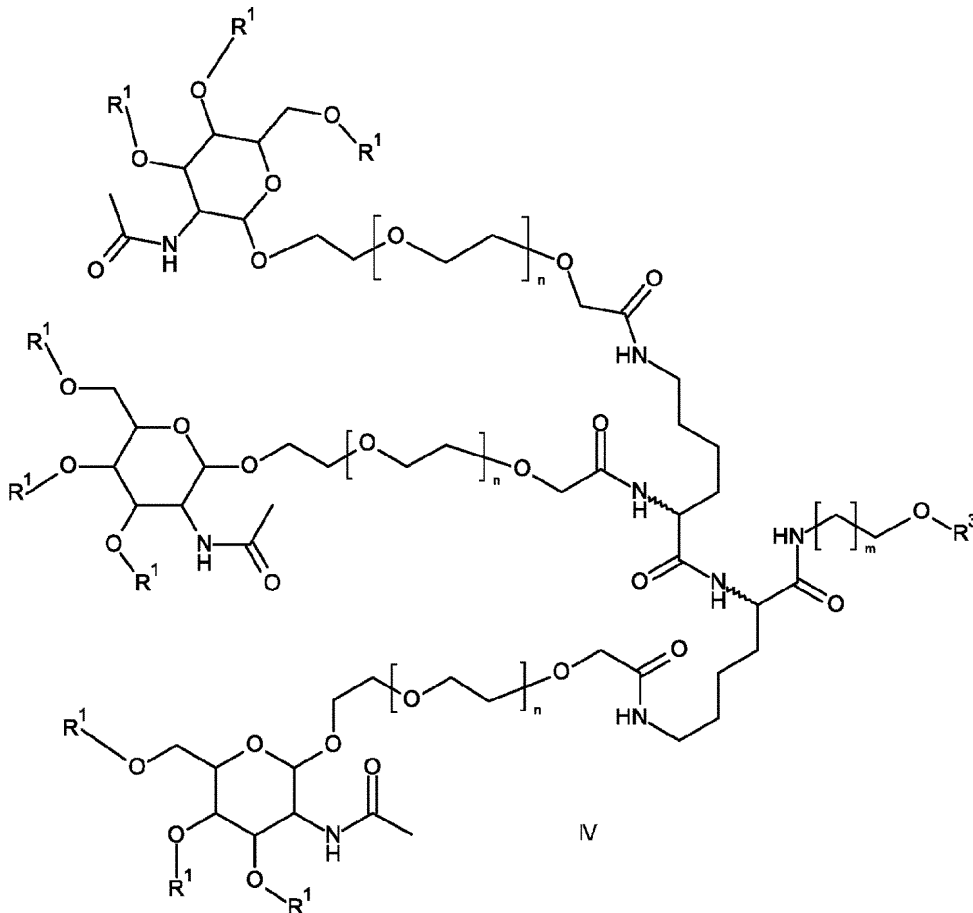
40

50



10

(式中、 R^1 および n は、式 I に定義される通りである) とカップリングして、式 IV の GalNAc アミド



20

30

(式中、 R^1 、 n 、および m は、式 I に定義される通りであり、 R^3 は式 II に定義される通りである) を形成することによって、式 IV 中のアミノ基が波線で結合する 2 個の不斉炭素の各々の立体配置は、式 II 中の対応する不斉炭素の立体配置と同一である、前記形成することと、

40

b) ヒドロキシル保護基 R^3 を除去して、式 IV の GalNAc アミドの遊離アルコールを形成することと、

c) 式 IV の GalNAc アミドの遊離アルコールを、ホスホロアミデート化剤と反応させて、式 I の GalNAc ホスホラミダイトエピマーを形成することによって、式 I 中のアミノ基が波線で結合する 2 個の不斉炭素の各々の立体配置は、式 IV 中の対応する不斉炭素の立体配置と同一である、前記形成することと

50

を含む、方法。

【請求項 2】

R¹ が、アシル基である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

R¹ が、C₁-6-アルキルまたはフェニルによって置換されていてもよい C₁-6-アルキルカルボニル基である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

n が、0 ~ 5 の整数であり、m が、0 ~ 10 の整数である、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

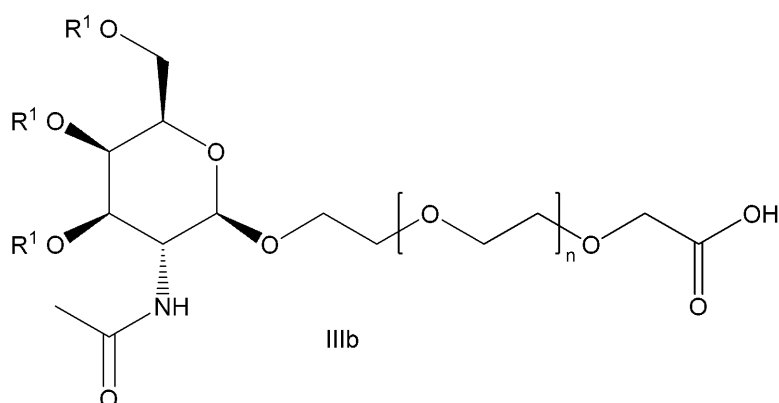
R¹ がアセチルであり、n が 2 であり、m が 5 である、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

R³ がベンジルである、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

G a l N A c 部分が式 I I I b



を有し、式中の R¹ および n は、式 I に定義される通りである、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

式 I が、以下の式 I b ~ I e :

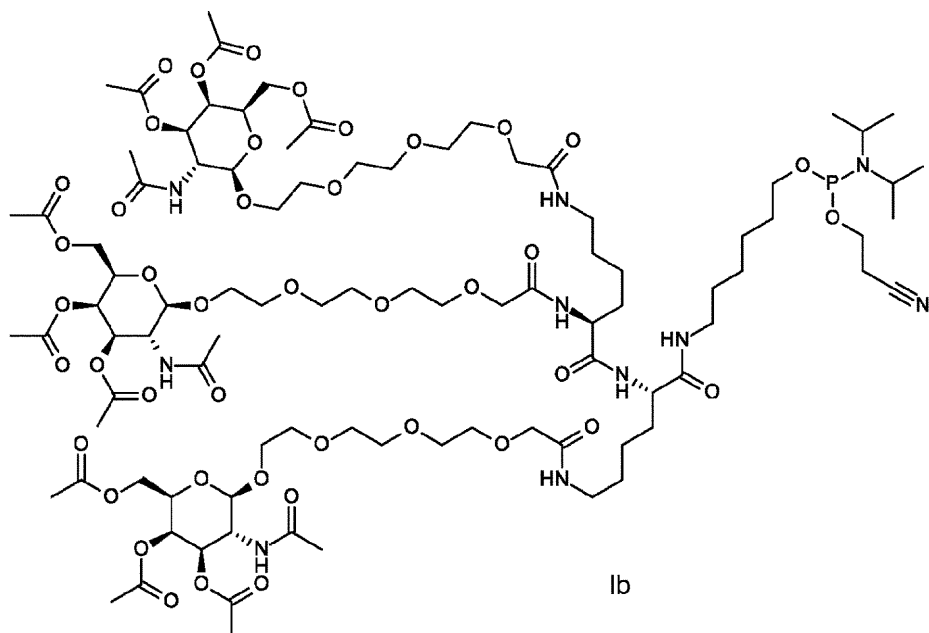
10

20

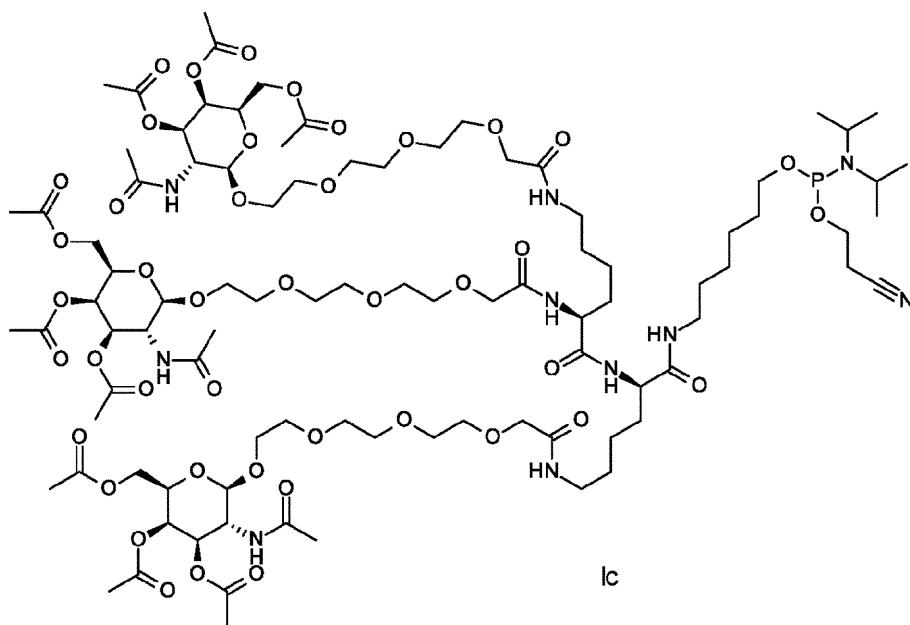
30

40

50



10

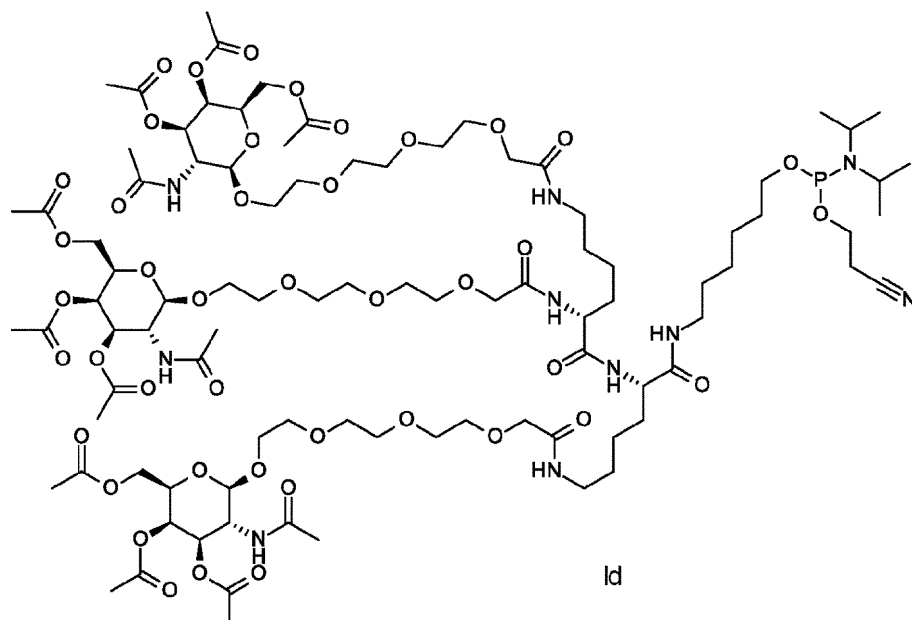


20

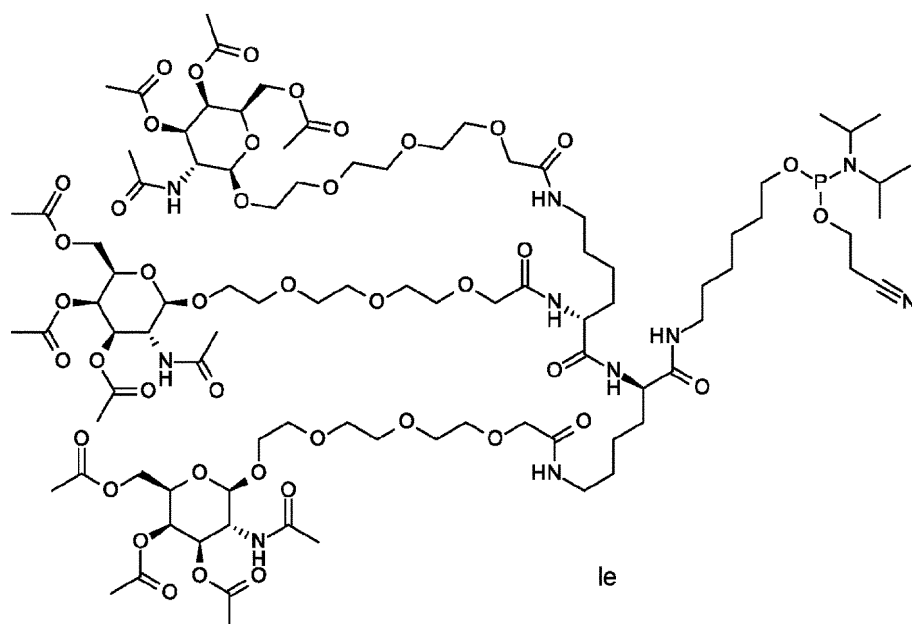
30

40

50



10



20

30

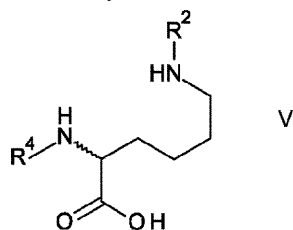
から選択される GalNAc ホスホラミダイトエピマーである、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

式 I I のエピマー的に純粋な化合物が、

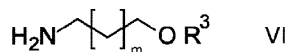
a 1) 式 V のリジン化合物

40

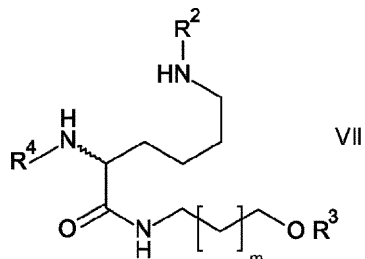


(式中、 R^2 および R^4 は、アミノ保護基である) を、
式 V I のアミン

50



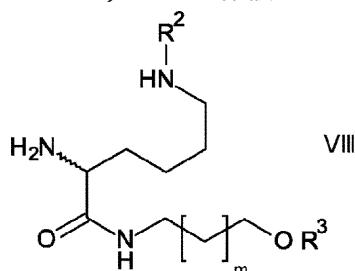
(式中、 R^3 および m は、請求項1に定義される通りである)
とカップリングして、
式VIIのカルボキサミド



10

(式中、 R^3 および m は、請求項1に定義される通りであり、 R^2 および R^4 は、式Vに定義される通りである)を形成することと、

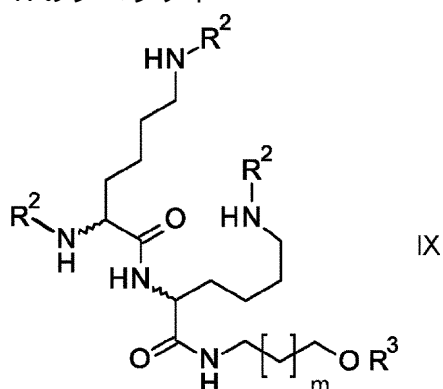
b1) アミノ保護基 R^4 を除去して、式VIIIのアミン



20

(式中、 R^3 、および m は、請求項1に定義される通りであり、 R^2 は、式Vに定義される通りである)を形成することと、

c1) 式VIIIのアミンを、アミノ基が保護されたリジンとカップリングして、式IXのジペプチド



30

(式中、 R^3 および m は、請求項1に定義される通りであり、 R^2 は、式Vに定義される通りである)を形成することと、

d1) アミノ保護基 R^2 を除去して、式IIの化合物を形成することと
によって調製される、請求項1から8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項10】

カップリング工程a1)およびc1)が、ペプチドカップリング剤、アミン塩基、および有機溶媒の存在下において行われる、請求項9に記載の方法。

【請求項11】

ペプチドカップリング剤がn-プロピルホスホン酸無水物であり、アミン塩基が第三級アミンであり、有機溶媒が極性非プロトン性溶媒である、請求項10に記載の方法。

40

50

【請求項 1 2】

カップリング工程 a 1) および c 1) が、20 ~ 70 の範囲の反応温度で行われる、請求項 9 ~ 1 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 3】

R⁴ が、塩基性条件下において切断可能なアミノ保護基である、請求項 9 から 1 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 4】

塩基性条件が、有機溶媒の存在下における、第二級脂肪族アミンでの処理を含む、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 5】

アミノ保護基 R² が、tert - ブチルオキシカルボニルである、請求項 9 から 1 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 6】

工程 d 1) において、アミノ保護基 R² が酸性条件下において除去され、それぞれの酸との式 I X のジペプチドの三アンモニウム塩が形成される、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 1 7】

酸が、スルホン酸である、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

工程 a) において式 I I の化合物を式 I I I a の G a l N A c 部分とカップリングすることが、ペプチドカップリング剤、アミン塩基、および有機溶媒の存在下において行われる、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 9】

ペプチドカップリング剤が n - プロピルホスホン酸無水物であり、アミン塩基が第三級アミンであり、有機溶媒が極性非プロトン性溶媒であり、反応温度が 20 ~ 70 から選択される、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 0】

工程 b) においてヒドロキシル保護基 R³ を除去して遊離アルコールを形成することが、水素化触媒の存在下において水素による接触水素化によって行われる、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 1】

工程 c) におけるホスホロアミデート化剤が、2 - シアノエチル - N , N - ジ - (2 - プロピル) クロロホスホロアミダイトまたは 2 - シアノエチル - N , N , N ' , N ' - テトラ (2 - プロピル) ホスホロジアミダイトから選択される、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 2】

工程 c) における反応が、- 20 ~ 50 の反応温度で、第二級アミンの酸性アンモニウム塩および極性非プロトン性溶媒の存在下において、2 - シアノエチル - N , N , N ' , N ' - テトラ (2 - プロピル) ホスホロジアミダイトを用いて行われる、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

請求項 1 から 2 2 のいずれか一項に記載の方法を含む、前記 G a l N A c 部分を単一のエピマーとして含む G a l N A c - クラスタールオリゴヌクレオチドコンジュゲートを調製するための方法。

【請求項 2 4】

a) 請求項 1 から 2 2 のいずれか一項に記載の方法に従って式 I の G a l N A c ホスホラミダイトエピマーを調製することと、

b) 固相オリゴヌクレオチド合成において、式 I の G a l N A c ホスホラミダイトエピマーを、所望の配列のヌクレオシドビルディングブロックと一緒に利用して、固体支持体に結合した所望の G a l N A c - クラスタールオリゴヌクレオチドコンジュゲートを形成することと、最後に

10

20

30

40

50

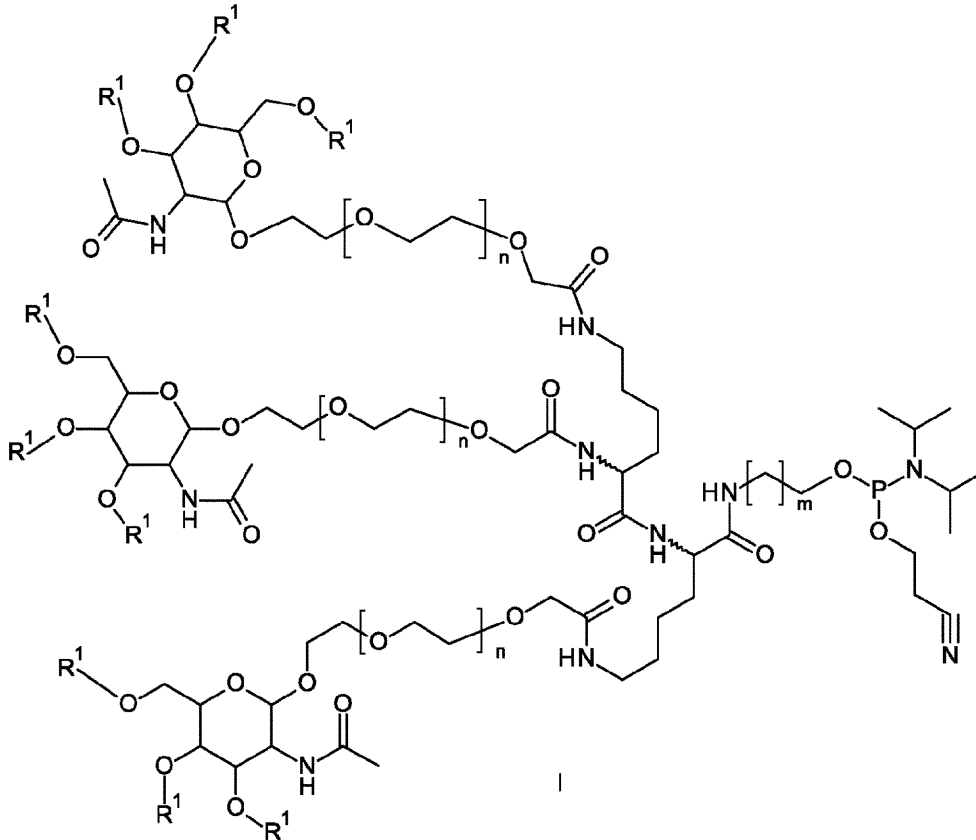
c) 固相支持体からGalNAc-クラスターオリゴヌクレオチドコンジュゲートを切断し、完全に脱保護し精製することを含む、請求項23に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、式Iのエピマー的に純粋なGalNAcホスホラミダイトエピマー



10

20

30

(式中、R¹は、ヒドロキシ保護基であり、nは、0～10の整数であり、mは、0～20の整数である)、その対応するエナンチオマーおよび/または光学異性体を調製するための新規な方法に関する。

【背景技術】

【0002】

式IのGalNAcホスホラミダイトは、GalNAc部分を含むコンジュゲートの標的化部分である、GalNAc部分を有する。GalNAc部分は、肝臓細胞上に位置するアシアロ糖タンパク質受容体に対するその親和性に起因して、肝臓細胞へのオリゴヌクレオチドコンジュゲートの機能的送達を可能にする。そのようなGalNAcクラスターコンジュゲートは、薬物動態モジュレーターとして作用する可能性を有し、したがって、例えば、PCT公開WO第2017/084987号(特許文献1)に記載されるような治療的に価値のある化合物である。

40

【0003】

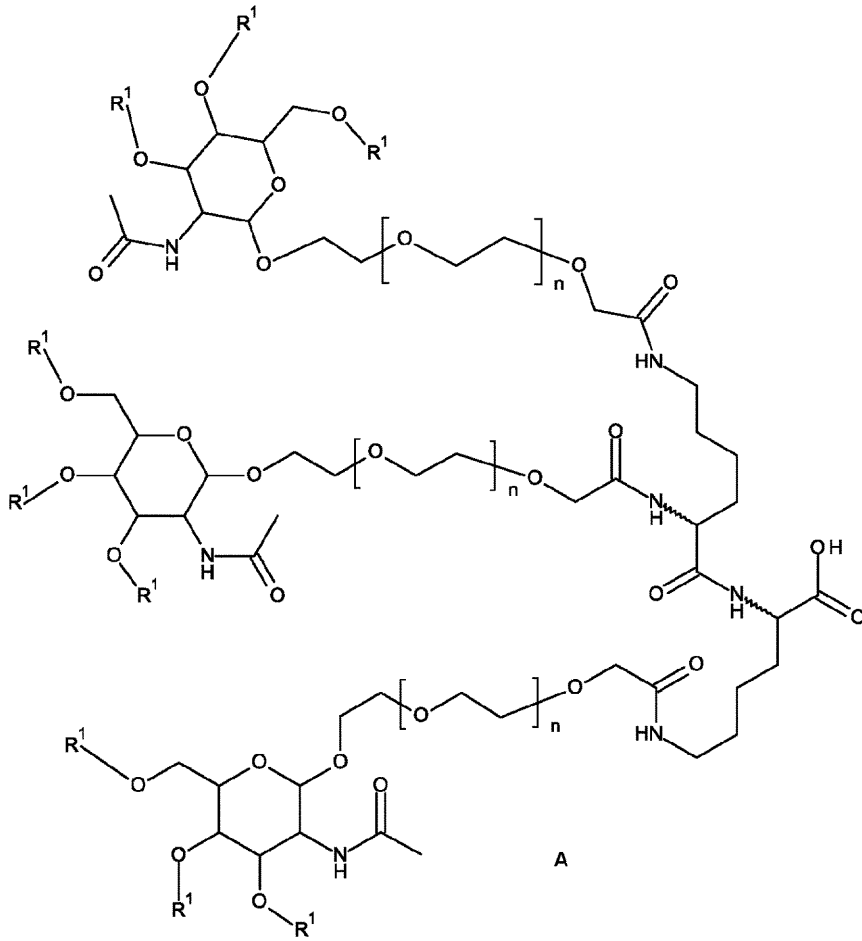
GalNAc部分とホスホラミダイトの固有な組み合わせに起因して、式IのGalNAcホスホラミダイトは、固相オリゴヌクレオチド合成において、ヌクレオシドビルディングブロックと一緒にビルディングブロックとして直接的に導入することができる。したがって、GalNAc部分を導入するための別個のコンジュゲーション工程を、回避することができる。

【0004】

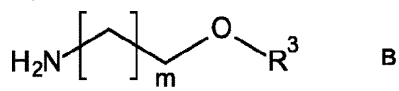
50

PCT公開WO第2017/084987号(特許文献1)に記載される現在の方法によると、式IのGalNAcホスホラミダイトは、

a) 式AのGalNAc酸誘導体



(式中、R¹は、ヒドロキシ保護基であり、nは、0~10の整数である)と、
式IVのアミン



(式中、R³は、ヒドロキシ保護基であり、mは、0~20の整数である)との反応によつて、式Cのアミド

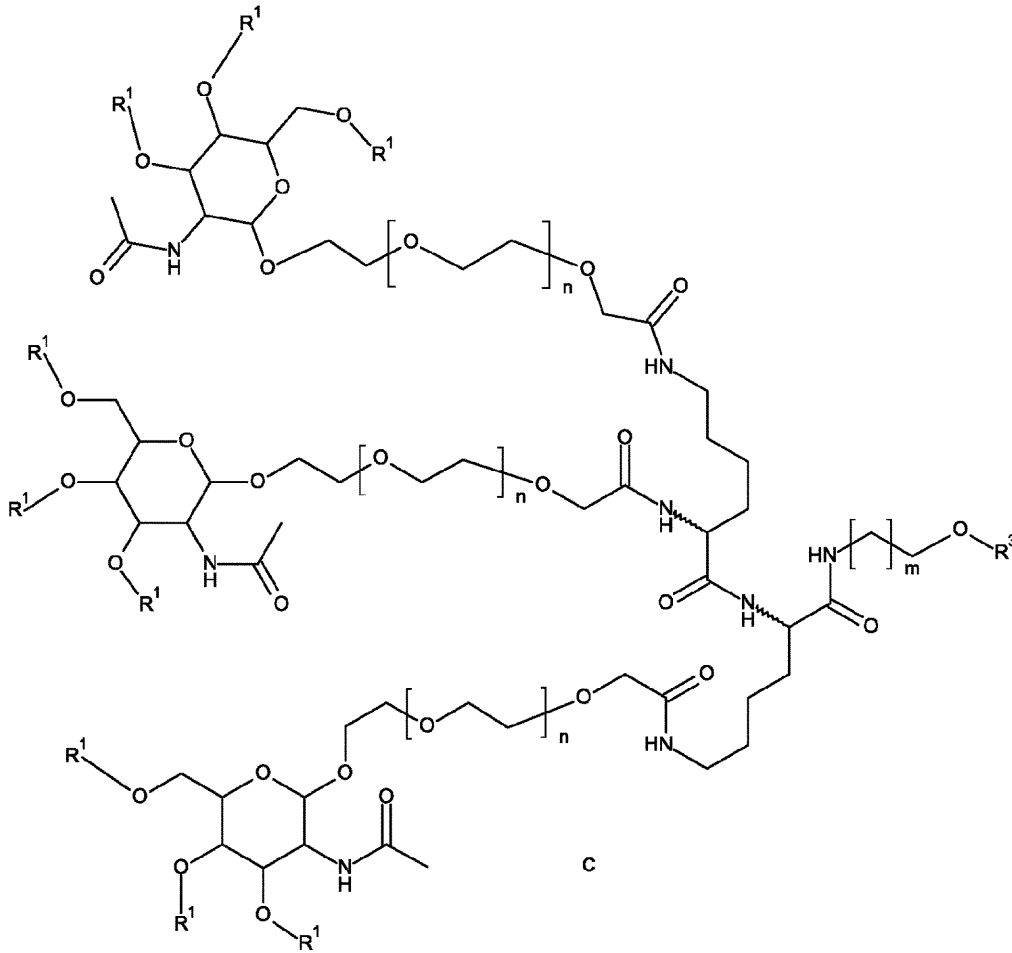
10

20

30

40

50



(式中、 R^1 、 R^3 、 n 、および m は、上述の通りである)を形成することと、
b) ヒドロキシ保護基 R^3 の除去により、式DのGalNAcアミド

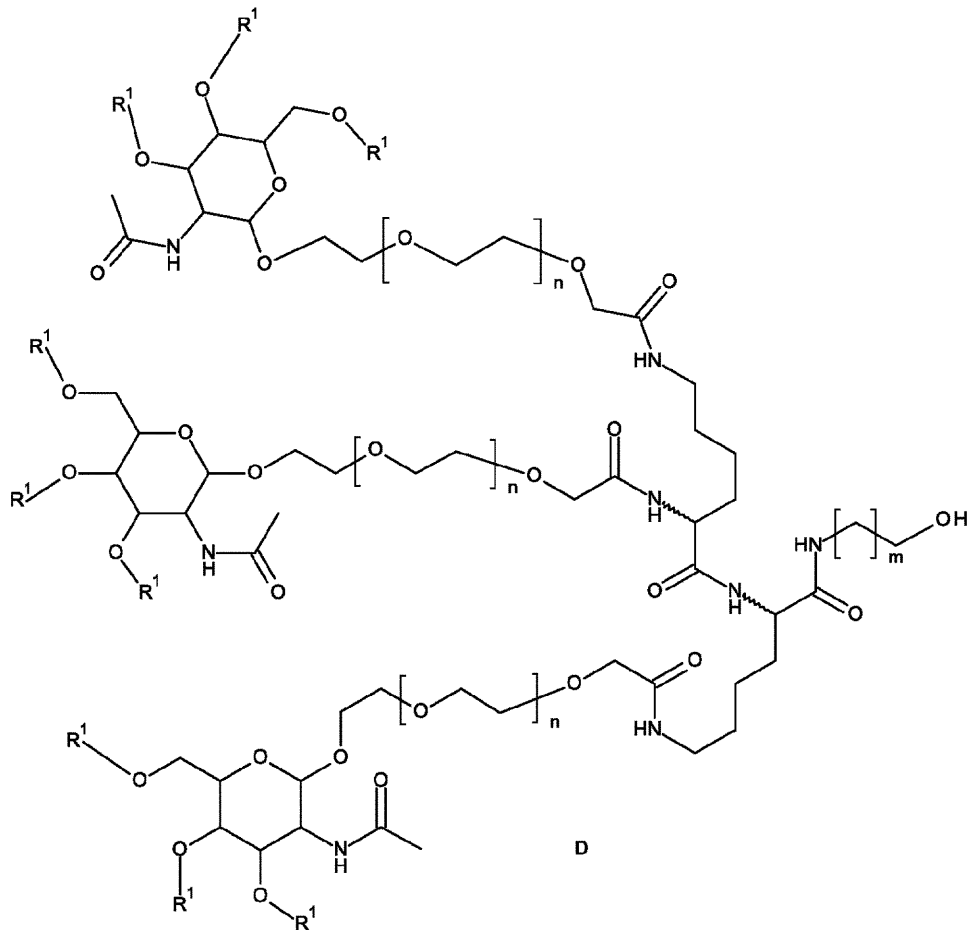
10

20

30

40

50



(式中、 R^1 、 n 、および m は、上述の通りである)を形成することと、

c) 式DのGalNAcアミドと、ホスホロアミデート化剤との反応により、式IのGalNAcホスホラミダイト誘導体を形成することと
 によって調製することができる。

【0005】

この方法は、カップリング工程a)において、指定のキラル中心(以下の式Iにおける矢印)でラセミ化をもたらすことが見出された。

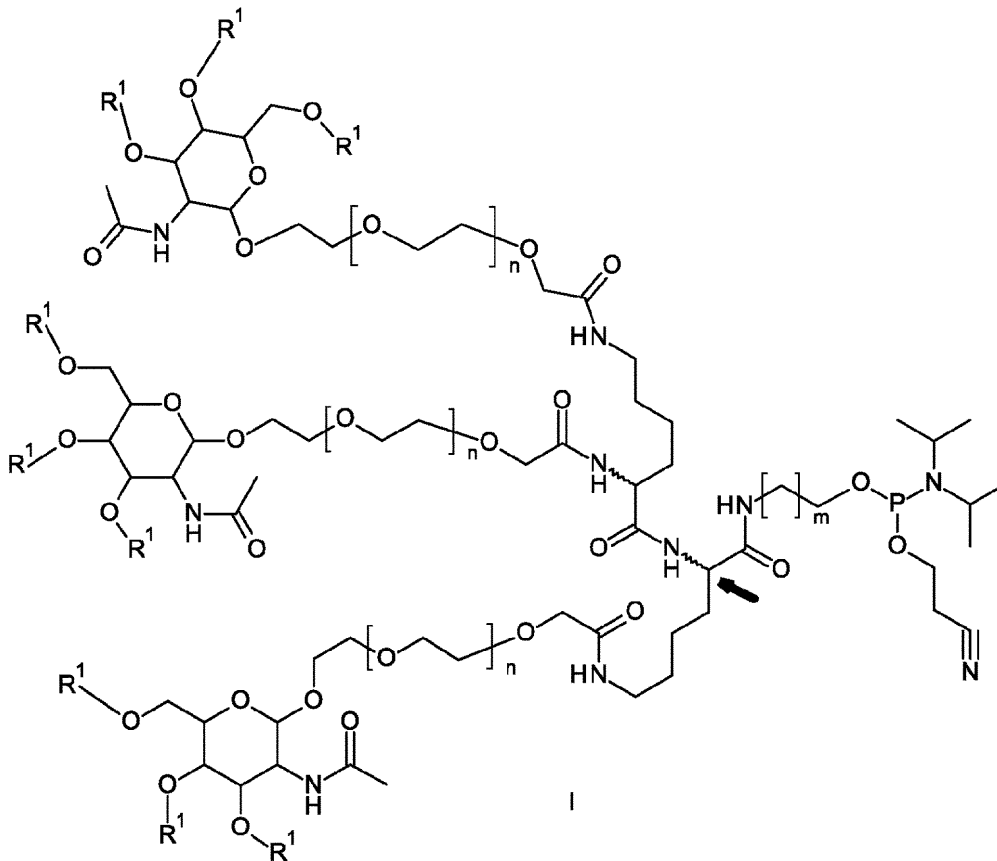
10

20

30

40

50



【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【文献】PCT公開WO第2017/084987号

【発明の概要】

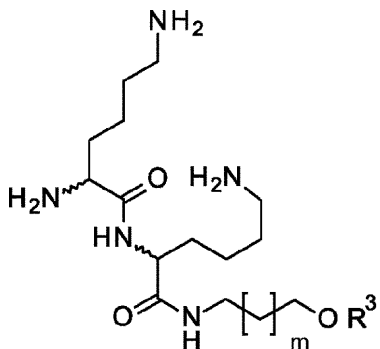
【0007】

したがって、本発明の目的は、エピマー的に純粋な形態で、ビルディングブロックを生成するための新規な方法を提供することであった。

【0008】

この目的は、式Iのエピマー的に純粋なGalNAcホスホラミダイトエピマーを調製する新規な方法であって、

a) 式IIの化合物



(式中、R³は、ヒドロキシ保護基であり、mは、上述の通りである)、またはその塩を、式IIIのGalNAc部分

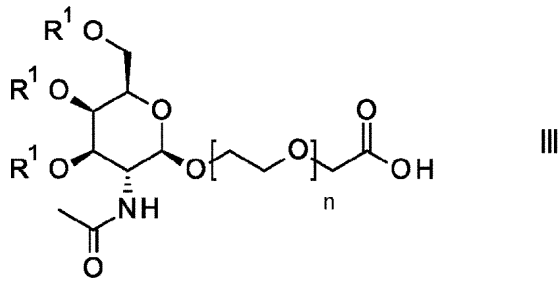
10

20

30

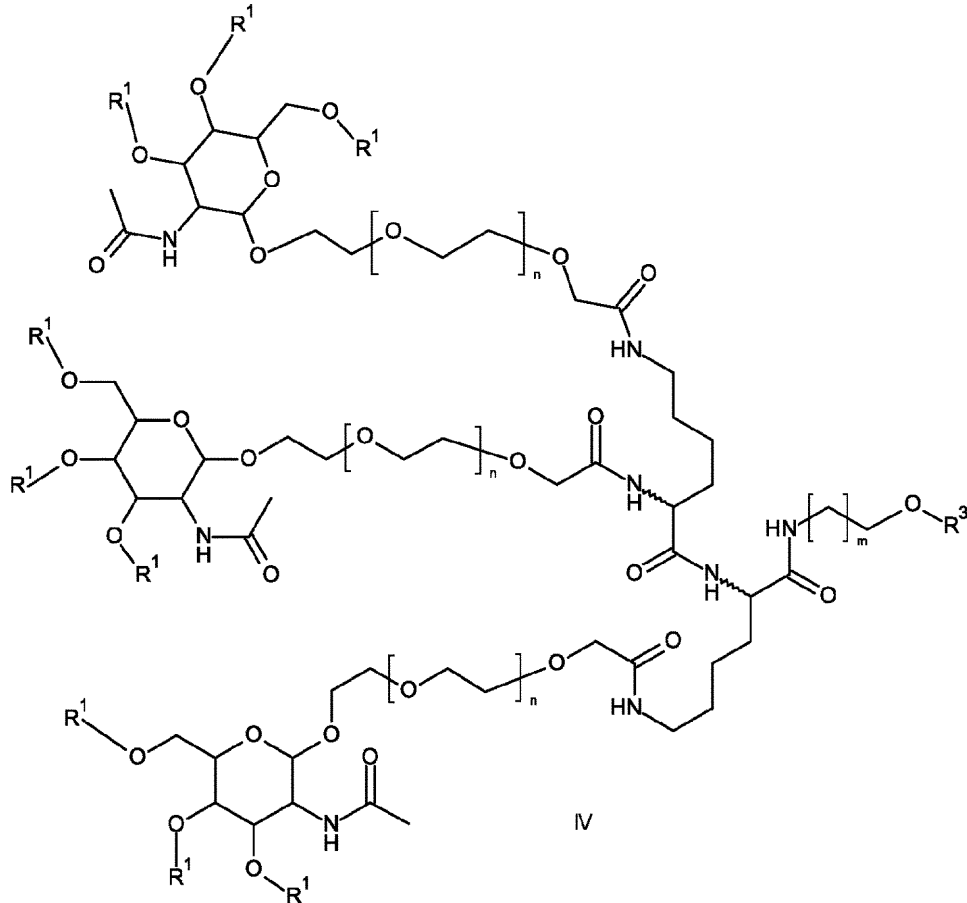
40

50



(式中、 R^1 および n は、上述の通りである) とカップリングして、式 IV の GalNAc アミド

10



20

30

(式中、 R^1 、 R^3 、 n 、および m は、上述の通りである) を形成することと、

b) ヒドロキシル保護基 R^3 を除去して、式 IV の GalNAc アミドの遊離アルコールを形成することと、

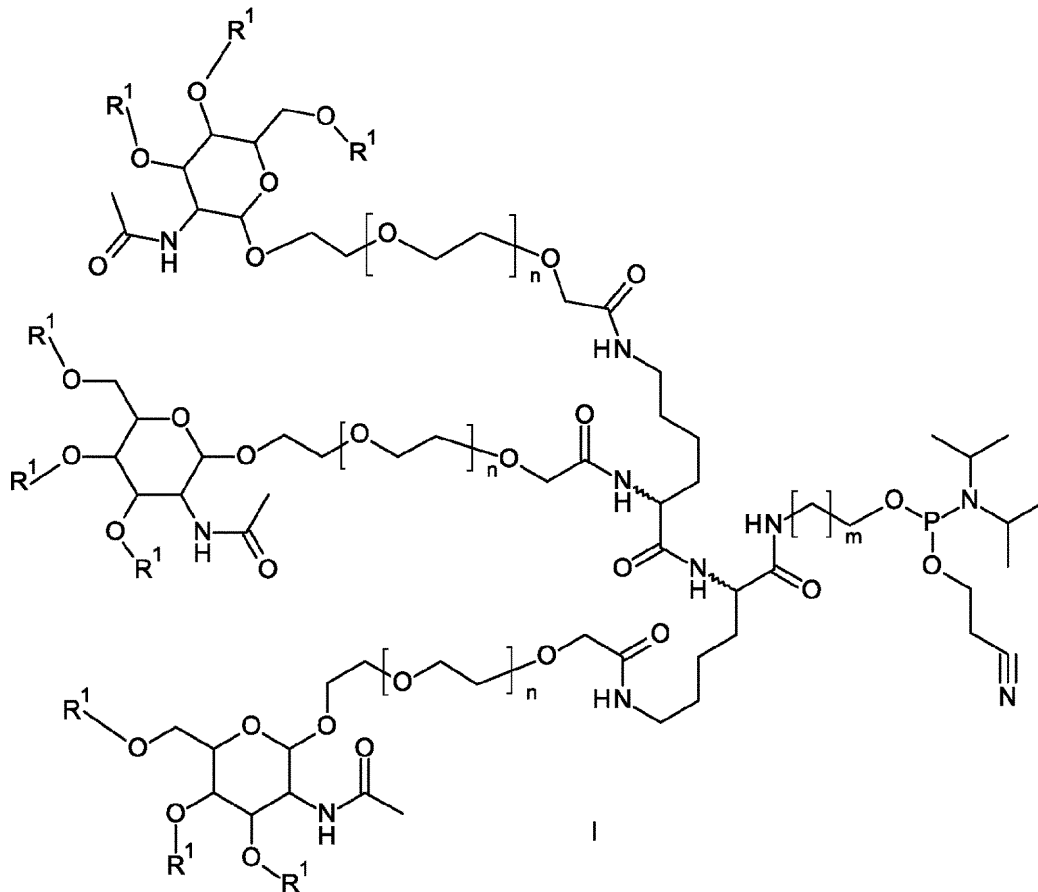
c) 式 IV の GalNAc アミドの遊離アルコールを、ホスホロアミデート化剤と反応させて、式 I の GalNAc ホスホラミダイトエピマーを形成することとを含む、方法によって達成することができる。

40

[本発明1001]

式 I のエピマー的に純粋な GalNAc ホスホラミダイトエピマー

50

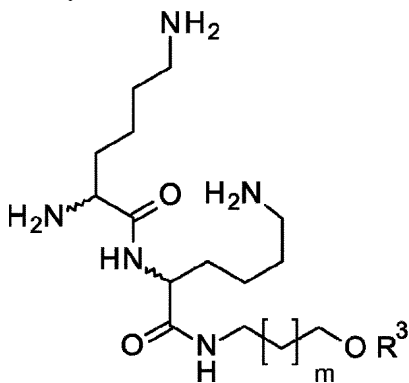


10

20

(式中、 R^1 は、ヒドロキシ保護基であり、 n は、0~10の整数であり、 m は、0~20の整数である)、その対応するエナンチオマーおよび/または光学異性体を調製するための方法であって、

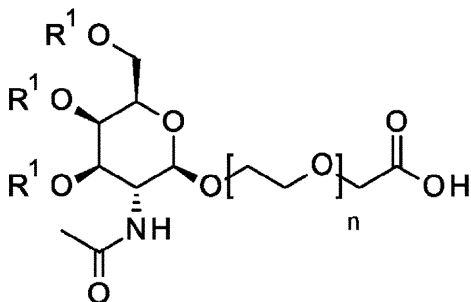
a) 式 I I の化合物



30

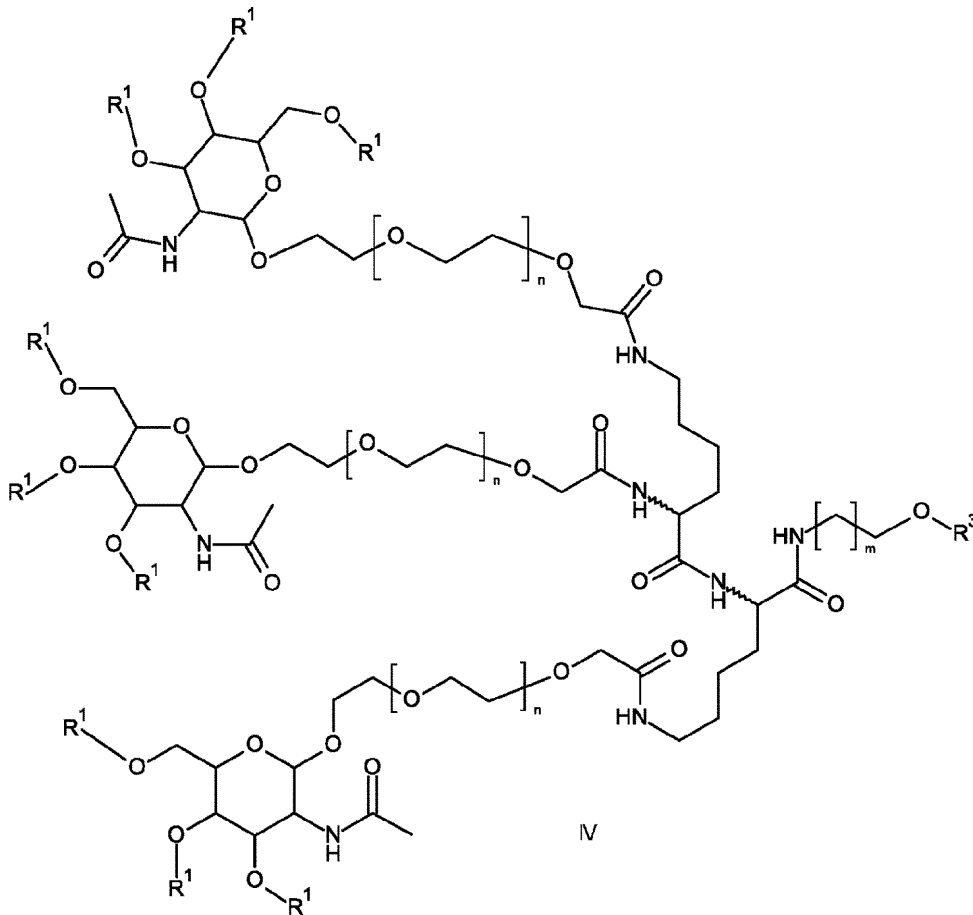
40

(式中、 R^3 は、ヒドロキシ保護基であり、 m は、上述の通りである)、またはその塩を、式 I I I の G a l N A c 部分



50

(式中、 R^1 および n は、上述の通りである)とカップリングして、式IVのGalNAcアミド



10

20

(式中、 R^1 、 R^3 、 n 、および m は、上述の通りである)を形成することと、

b) ヒドロキシル保護基 R^3 を除去して、式IVのGalNAcアミドの遊離アルコールを形成することと、

30

c) 式IVのGalNAcアミドの遊離アルコールを、ホスホロアミデート化剤と反応させて、式IのGalNAcホスホラミダイトエピマーを形成することとを含む、方法。

[本発明1002]

R^1 が、アシル基である、本発明1001の方法。

[本発明1003]

R^1 が、 C_{1-6} -アルキルまたはフェニルによって置換されていてもよい C_{1-6} -アルキルカルボニル基である、本発明1001または1002の方法。

[本発明1004]

n が、0~5の整数であり、 m が、0~10の整数である、本発明1001から1003のいずれかの方法。

40

[本発明1005]

R^1 がアセチルであり、 n が2であり、 m が5である、本発明1001から1004のいずれかの方法。

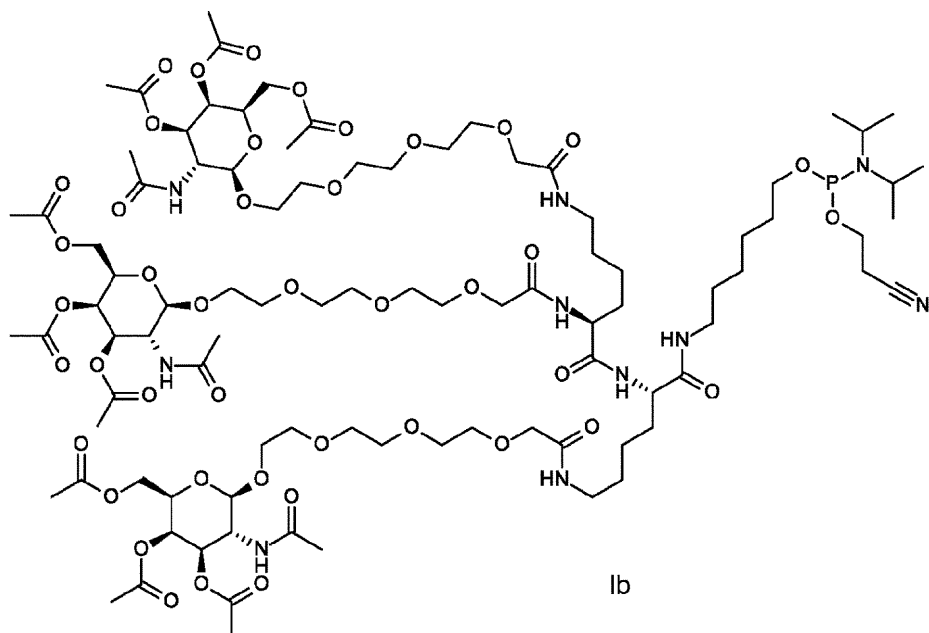
[本発明1006]

R^3 がベンジルである、本発明1001から1005のいずれかの方法。

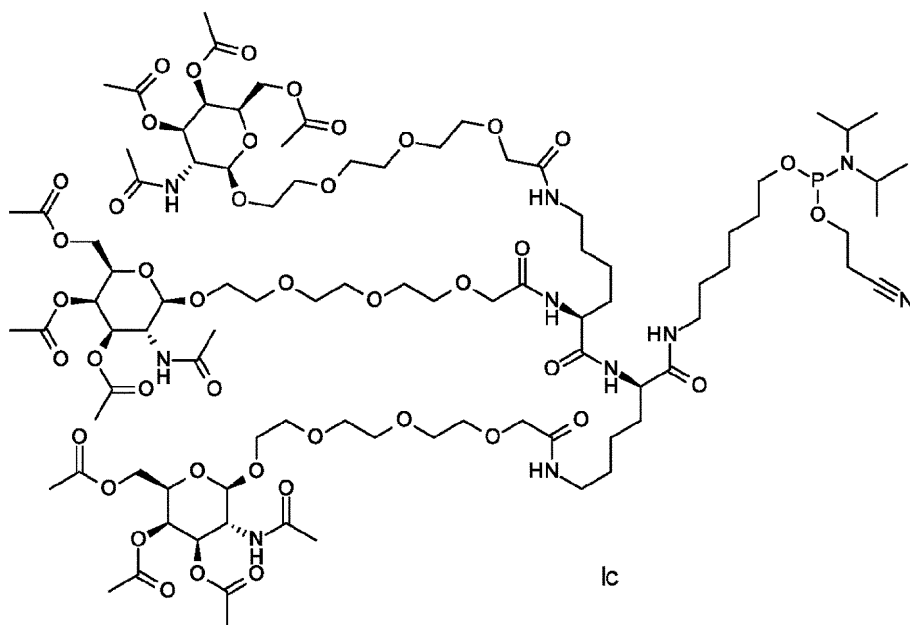
[本発明1007]

式Iが、以下の式Ib~Ie:

50



10

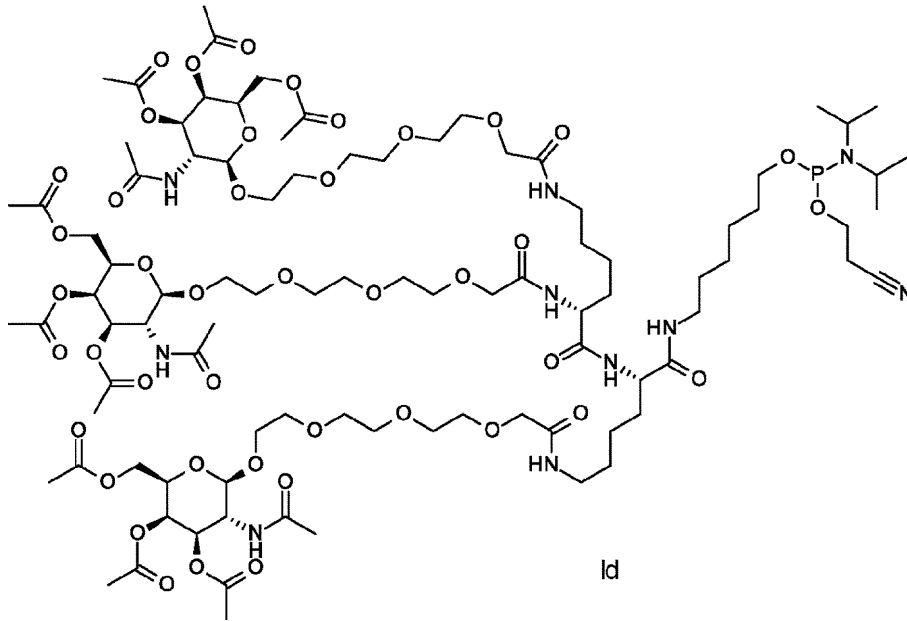


20

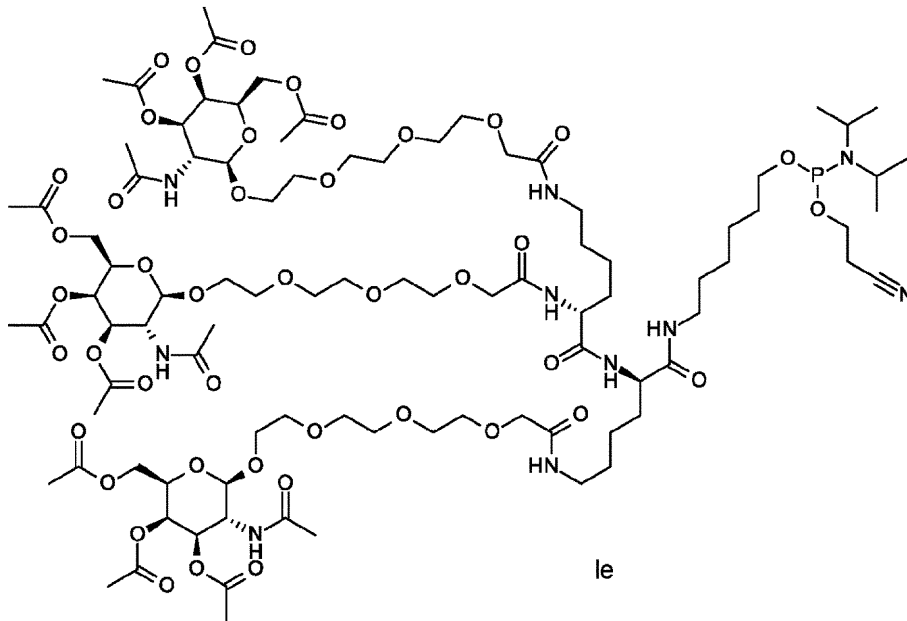
30

40

50



10



20

30

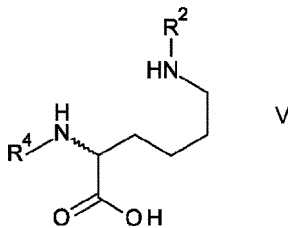
のGalNAcホスホラミダイトエピマーを含む、本発明1001から1006のいずれかの方法。

[本発明1008]

式I Iの化合物が、

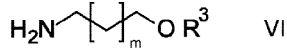
a 1) 式Vのリジン化合物

40

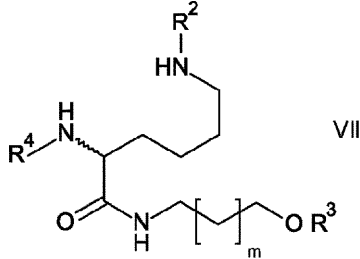


(式中、R²およびR⁴は、アミノ保護基である)を、
式VIのアミン

50

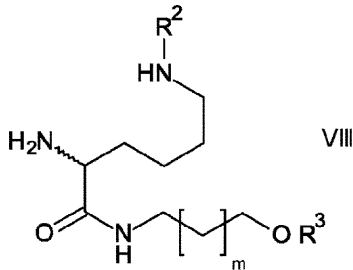


(式中、 R^3 および m は、上述の通りである)
とカップリングして、
式VIIのカルボキサミド



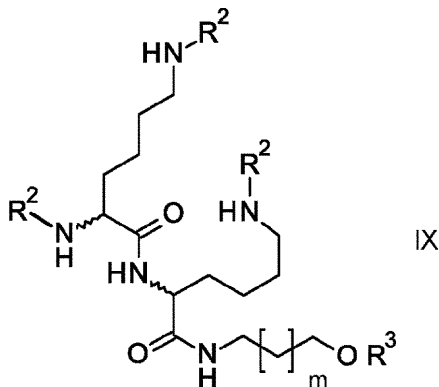
10

(式中、 R^2 、 R^3 、 R^4 、および m は、上述の通りである)を形成することと、
b1) アミノ保護基 R^4 を除去して、式VIIIのアミン



20

(式中、 R^2 、 R^3 、および m は、上述の通りである)を形成することと、
c1) 式VIIIのアミンを、アミノ基が保護されたリジンとカップリングして、式IX
のジペプチド



30

(式中、 R^2 および R^3 および m は、上述の通りである)を形成することと、
d1) アミノ保護基 R^2 を除去して、式Iの化合物を形成することと
によって調製される、本発明1001から1007のいずれかの方法。

40

[本発明1009]

カップリング工程a1)およびc1)が、ペプチドカップリング剤、アミン塩基、および有機溶媒の存在下において行われる、本発明1008の方法。

[本発明1010]

ペプチドカップリング剤がn-プロピルホスホン酸無水物であり、アミン塩基が第三級アミンであり、有機溶媒が極性非プロトン性溶媒であり、反応温度が20 ~ 70 から選択される、本発明1008または1009の方法。

[本発明1011]

R^4 が、塩基性条件下において切断可能なアミノ保護基、好ましくはFMO Cである、本

50

発明1008から1010のいずれかの方法。

[本発明1012]

塩基性条件が、有機溶媒の存在下における、第二級脂肪族アミン、好ましくはジエチルアミンでの処理を含む、本発明1011の方法。

[本発明1013]

アミノ保護基 R^2 が、tert-ブチルオキシカルボニルである、本発明1008から1012のいずれかの方法。

[本発明1014]

工程d1)において、アミノ保護基 R^2 が酸性条件下において除去され、それぞれの酸との式IXのジペプチドの三アンモニウム塩が形成される、本発明1008の方法。

[本発明1015]

酸が、スルホン酸、好ましくはメタンスルホン酸である、本発明1014の方法。

[本発明1016]

工程a)において式IIの化合物を式IIIのGalNAc部分とカップリングすることが、ペプチドカップリング剤、アミン塩基、および有機溶媒の存在下において行われる、本発明1001から1007のいずれかの方法。

[本発明1017]

ペプチドカップリング剤がn-プロピルホスホン酸無水物であり、アミン塩基が第三級アミンであり、有機溶媒が極性非プロトン性溶媒であり、反応温度が20 ~ 70 から選択される、本発明1016の方法。

[本発明1018]

工程b)においてヒドロキシル保護基 R^3 を除去して遊離アルコールを形成することが、水素化触媒の存在下において水素による接触水素化によって行われる、本発明1001から1007のいずれかの方法。

[本発明1019]

工程c)におけるホスホロアミデート化剤が、2-シアノエチル-N,N-ジ-(2-プロピル)クロロホスホロアミダイトまたは2-シアノエチル-N,N,N',N'-テトラ(2-プロピル)ホスホロジアミダイトから選択される、本発明1001から1007のいずれかの方法。

[本発明1020]

工程c)における反応が、-20 ~ 50 の反応温度で、第二級アミンの酸性アンモニウム塩および極性非プロトン性溶媒の存在下において、2-シアノエチル-N,N,N',N'-テトラ(2-プロピル)ホスホロジアミダイトを用いて行われる、本発明1019の方法。

[本発明1021]

前記GalNAc部分を単一のエピマーとして含むGalNAc-クラスターオリゴヌクレオチドコンジュゲートの調製のための方法における、本発明1001から1020のいずれかの方法の使用。

[本発明1022]

GalNAc-クラスターオリゴヌクレオチドコンジュゲートの調製が、

a) 本発明1001から1020のいずれかの式IのGalNAcホスホラミダイトエピマーを調製することと、

b) 固相オリゴヌクレオチド合成において、式IのGalNAcホスホラミダイトエピマーを、所望の配列の所望のヌクレオシドビルディングブロックと一緒に利用して、固体支持体に結合した所望のGalNAc-クラスターオリゴヌクレオチドコンジュゲートを形成することと、最後に

c) 固相支持体からGalNAc-クラスターオリゴヌクレオチドコンジュゲートを切断し、完全に脱保護し精製することと

を含む、本発明1021の使用。

【発明を実施するための形態】

【0009】

10

20

30

40

50

以下の定義は、本明細書において本発明を説明するための使用される様々な用語の意味および範囲を例示し、定義するために記載されている。

【0010】

キラル炭素が化学構造内に存在する場合は常に、そのキラル炭素と関連するすべての立体異性体が、純粋な立体異性体ならびにその混合物として、その構造によって包含されることが意図される。

【0011】

エピマーという用語は、立体異性体の対のうち的一方を指し、ここで、異性体は、1つの不斉中心のみにおいて構造が異なり、分子内のすべての他の立体中心は同じである。

【0012】

「 C_{1-12} -アルキル」という用語は、1~12個の炭素原子の一価の直鎖または分岐鎖の飽和炭化水素基を指し、「 C_{1-6} -アルキル」という用語は、1~6個の炭素原子の一価の直鎖または分岐鎖の飽和炭化水素基を指す。

【0013】

「 C_{1-12} -アルキル」または「 C_{1-6} -アルキル」の例としては、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、*n*-ブチル、イソ-ブチル、*sec*-ブチル、*tert*-ブチル、ならびにペンチルおよびヘキシルがその異性体とともに挙げられる。

【0014】

「アシル」という用語は、アルキル基に連結されたカルボニル基を指す。この用語は、具体的には、 C_{1-12} -アルキルカルボニル基、より具体的には、 C_{1-6} -アルキルカルボニル基を表し、これは、 C_{1-6} -アルキルによって置換されていてもよく、またはフェニルによって置換されていてもよい。アシル基の例としては、アセチル、ピバロイル、またはベンゾイルがある。フェニルと置換されていてもよいものとしては、ハロゲン、例えば、塩素、臭素、またはヨウ素、または上記に定義されている C_{1-6} -アルキル基がある。アシルは、好ましくは、アセチルを表す。

【0015】

「ヒドロキシ保護基」という用語は、ヒドロキシ基を保護することが意図される基を指し、これには、エステルおよびエーテル形成基、具体的には、テトラヒドロピラニル、アシル（例えば、ベンゾイル、アセチル、カルバモイル）、ベンジル、およびシリルエーテル（例えば、TBS、TBDPS）基が挙げられる。これらの基のさらなる例は、T. W. Greene and P. G. M. Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis", 2nd ed., John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, 1991, chapters 2-3, E. Haslam, "Protective Groups in Organic Chemistry", J. G. W. McOmie, Ed., Plenum Press, New York, NY, 1973, Chapter 5, およびT.W. Greene, "Protective Groups in Organic Synthesis", John Wiley and Sons, New York, NY, 1981に見出される。

【0016】

「アミノ保護基」という用語は、アミノ基を保護することが意図される基を指し、これには、ベンゾイル、ベンジルオキシカルボニル、カルボベンジルオキシ（CBZもしくはZ）、9-フルオレニルメチルオキシカルボニル（FMOC）、*p*-メトキシベンジルオキシカルボニル、*p*-ニトロベンジルオキシカルボニル、*tert*-ブトキシカルボニル（BOC）、およびトリフルオロアセチルが挙げられる。これらの基のさらなる例は、T. W. Greene and P. G. M. Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis", 2nd ed., John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, 1991, chapters 7, E. Haslam, "Protective Groups in Organic Chemistry", J. G. W. McOmie, Ed., Plenum Press, New York, NY, 1973, Chapter 5, およびT.W. Greene, "Protective Groups in Organic Synthesis", John Wiley and Sons, New York, NY, 1981に見出される。

【0017】

式IのGalNAcホスホラミダイトエピマーは、好ましくは、 R^1 が、 C_{1-6} -アルキルまたはフェニルで置換されていてもよい C_{1-6} -アルキルカルボニル基であり、*n*が、0~5の整数であり、*m*が、0~10の整数であるものであり、より好ましくは、 R^1

10

20

30

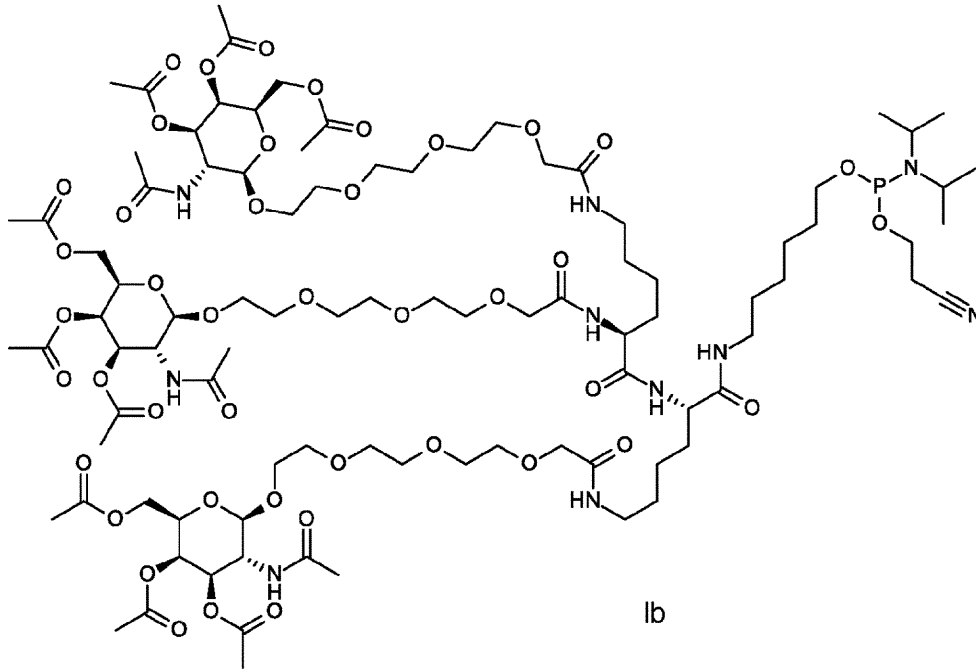
40

50

がアセチルであり、nが2であり、mが5であるものである。

【0018】

より好ましい実施形態において、式IのGalNAcホスホラミダイトエピマーは、式Ib~Ieの化合物を含む。



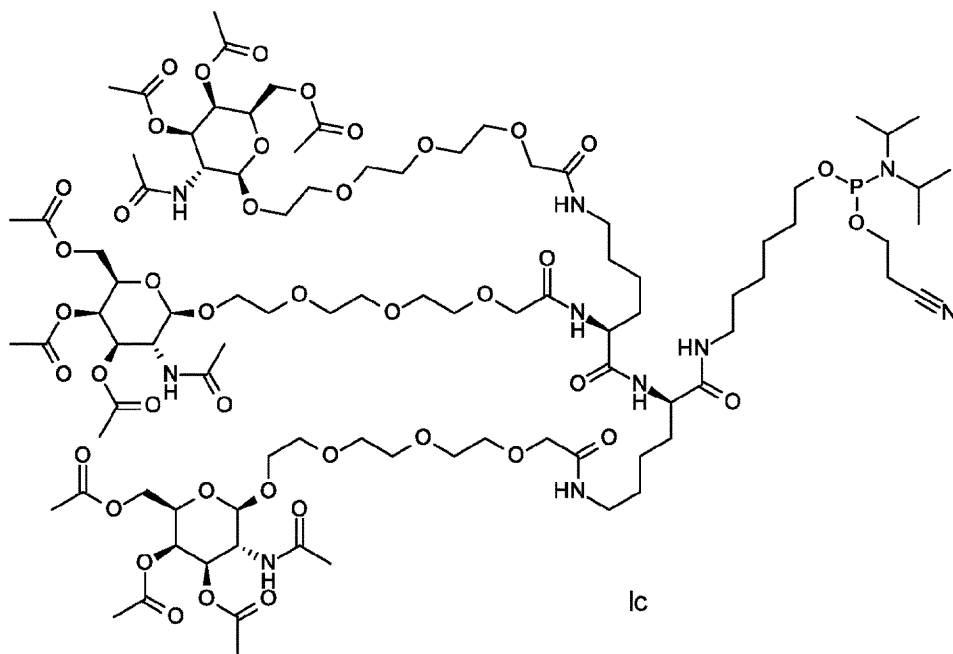
10

20

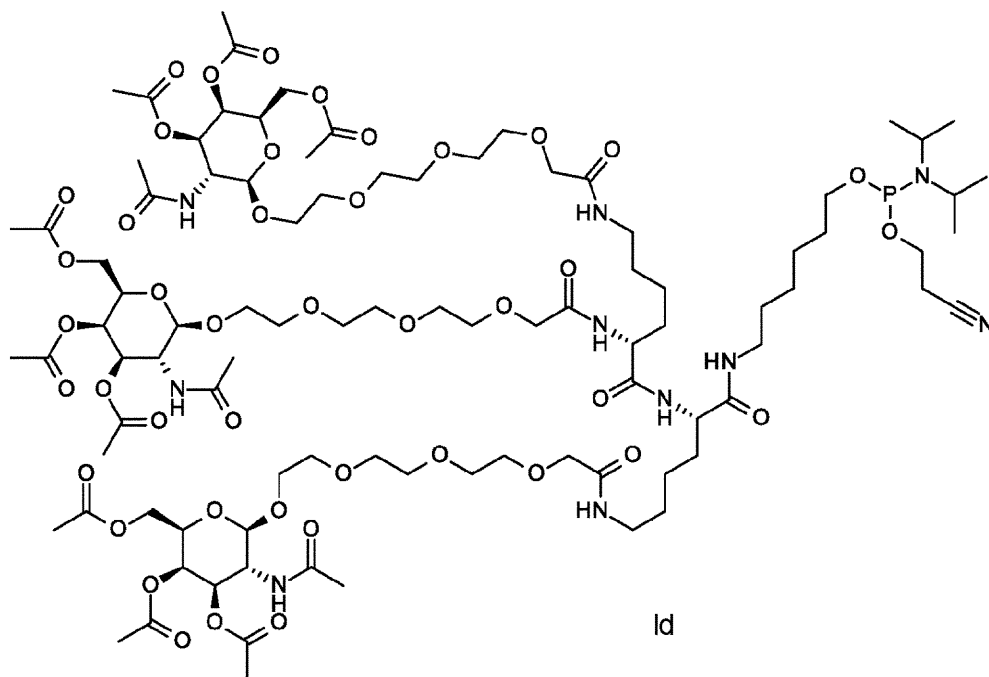
30

40

50



10

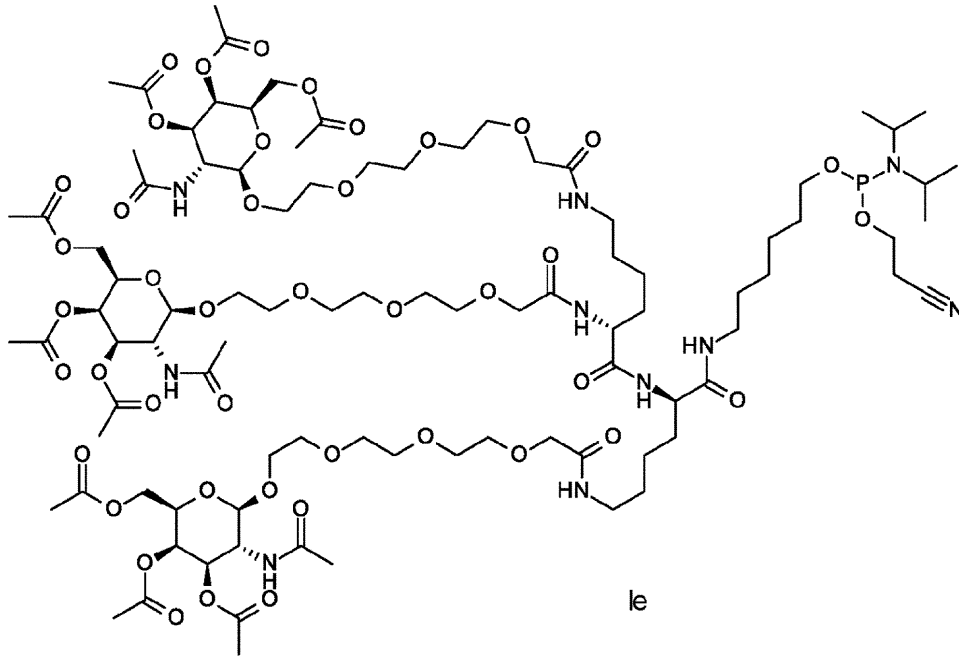


20

30

40

50



10

【 0 0 1 9 】

式 I b および I c のエピマーが、さらにより好ましい。

【 0 0 2 0 】

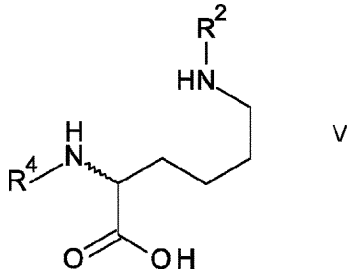
工程 a)

工程 a) は、式 I I の化合物またはその塩の、式 I I I の G a l N A c 部分とのカップリングにより、式 I V の G a l N A c アミドを形成することによって特徴づけられる。

【 0 0 2 1 】

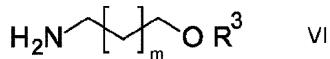
式 I I の化合物またはその塩は、

a 1) 式 V のリジン化合物



30

(式中、 R^2 および R^4 は、アミノ保護基である) を、式 V I のアミン

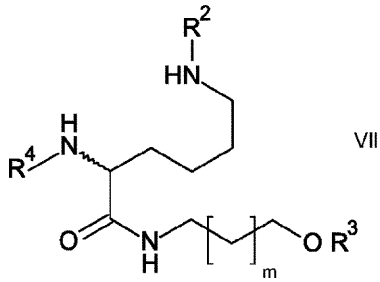


40

(式中、 R^3 は、ヒドロキシル保護基であり、 m は、上述の通りである) とカップリングして、

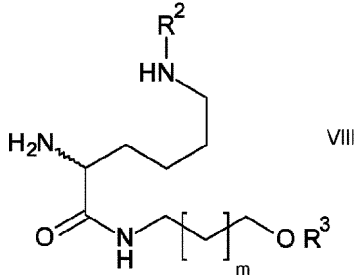
式 V I I のカルボキサミド

50



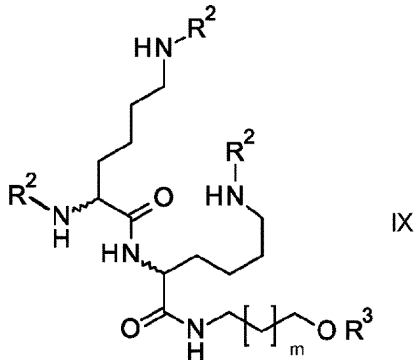
(式中、 R^2 、 R^3 、 R^4 、および m は、上述の通りである)を形成することと、

b 1) アミノ保護基 R^4 を除去して、式VII I Iのアミン



(式中、 R^2 および R^3 および m は、上述の通りである)を形成することと、

c 1) 式VII I Iのアミンを、アミノ基が保護されたリジンとカップリングして、式I Xのジペプチド



(式中、 R^2 および R^3 および m は、上述の通りである)を形成することと、

d 1) アミノ保護基 R^2 を除去して、式I Iの化合物を形成することと
によって調製することができる。

【0022】

好ましい実施形態において、カップリング工程a 1)およびc 1)は、ペプチドカップリング剤、アミン塩基、および有機溶媒の存在下において行われる。

【0023】

カップリングは、カルボジイミドカップリング剤、例えば、DCC(N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド)もしくはEDC(N-(N'', N''-ジメチルアミノプロピル-N'-エチルカルボジイミド)を、HOBt(1-ヒドロキシベンゾトリアゾール)もしくはHOSu(N-ヒドロキシスクシンイミド)、TBTU(N, N, N', N'-テトラメチル-O-(ベンゾトリアゾール-1-イル)ウロニウムテトラフルオロボレート、HBTU(2-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1, 1, 3, 3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート)、もしくはHOAt(1-ヒドロキシ-7-アザベンゾトリアゾール、およびこれらの一般的な組み合わせ、例えば、TBTU/HOBtまたはHBTU/HOAtなどの添加剤ありまたはなしで使用し、当業者に既知の古典的

10

20

30

40

50

な方法に従い得る。

【0024】

好ましい実施形態において、*n*-プロピルホスホン酸無水物(T3P)が、カップリング剤として、トリエチルアミン、*N*-メチルモルホリン、または*N*-ジイソプロピルエチルアミンなどであるが、好ましくは*N*-ジイソプロピルエチルアミンである、アミン塩基としての第三級アミンとともに選択される。

【0025】

カップリング反応は、通常、極性非プロトン性溶媒、例えば、アセトニトリル、酢酸エチル、もしくはテトラヒドロフラン、またはこれらの混合物において、20 ~ 70 の範囲、好ましくは20 ~ 40 の範囲の反応温度で行われる。

10

【0026】

カップリング工程 a 1) および c 1) による生成物は、当業者に既知の方法を適用して、例えば、有機相の洗浄およびそれに続くエバポレーションによる溶媒の除去によって、反応混合物の有機層から得ることができる。

【0027】

アミノ保護基 R⁴ は、典型的に、塩基性条件下において切断可能なアミノ保護基である。FMOC が、もっとも好ましいアミノ保護基である。塩基性条件は原則として、有機溶媒の存在下における、第二級脂肪族アミン、例えば、ピペリジン、4-メチルピペリジン、ピロリジン、またはジエチルアミンでの、しかし好ましくはジエチルアミンでの、処理を含む。好適な溶媒は、極性非プロトン性溶媒、例えば、アセトニトリルもしくはテトラヒドロフラン、またはこれらの混合物である。

20

【0028】

アミノ保護基 R² は、典型的に、酸性条件下において切断可能なアミノ保護基、好ましくは *tert*-ブチルオキシカルボニル(Boc) である。

【0029】

アミノ保護基 R² の除去は、したがって、極性非プロトン性溶媒、例えば、アセトニトリル中で、例えば、塩酸、トリフルオロ酢酸、スルホン酸、例えば、*p*-トルエンスルホン酸またはメタンスルホン酸から選択される好適な酸を用いて行われ得る。

【0030】

好ましい実施形態において、メタンスルホン酸が適用される。

30

【0031】

酸性処理により、それぞれの酸との式 IX のジペプチドの三アンモニウム塩が形成され、好ましい実施形態については、メタンスルホン酸との式 IX のジペプチドの三アンモニウム塩が形成される。

【0032】

式 IX のジペプチドの三アンモニウム塩は、当業者に既知の方法、例えば、結晶化を適用することによって単離することができるか、または工程 b) において式 III の GalNAc 部分とのカップリングに直接的に適用される。

【0033】

式 III の GalNAc 部分は、PCT 国際公開 WO 第 2017/084987 号における開示に従って、特に、その実施例 7 に従って、調製することができる。

40

【0034】

式 III の化合物またはその塩、例えば、式 IX のジペプチドの三アンモニウム塩の、式 III の GalNAc 部分との最終的なカップリングは、上述のカップリング条件下において行うことができる。また、上記で報告された好ましい反応条件を、このカップリング反応に適用することができる。

【0035】

式 IV の GalNAc アミドは、逆相クロマトグラフィーによってさらに精製することができ、生成物を含有する画分を、例えば、凍結乾燥させて、精製された式 IV の GalNAc アミドを得ることができる。

50

【 0 0 3 6 】

工程 b)

工程 b) は、ヒドロキシ保護基 R^3 の除去により、式 I V の G a l N A c アミドの遊離アルコールを形成することを必要とする。

【 0 0 3 7 】

除去条件を、ヒドロキシ保護基 R^3 は切断されるがヒドロキシ保護基 R^1 は影響を受けないように選択することができるように、ヒドロキシ保護基 R^3 がヒドロキシ保護基 R^1 とは化学的に異なることが重要である。

【 0 0 3 8 】

好適なヒドロキシ保護基 R^3 は、ハロゲンもしくは C_{1-6} - アルキルで置換されていて
もよいベンジルであるか、またはベンズヒドリルもしくはトリチル、すなわち、水素化分解によって切断することができる基である。

10

【 0 0 3 9 】

好ましい実施形態において、 R^3 は、ベンジルであり、水素化分解は、好適な水素化触媒の存在下における水素による接触水素化である。

【 0 0 4 0 】

ベンジル基の除去に好適な水素化触媒は、パラジウム炭素 (P d / C) である。

【 0 0 4 1 】

反応は、通常、脂肪族アルコール、例えば、2 - プロパノールなどの極性プロトン性溶媒、または T H F もしくは酢酸エチルなどの極性非プロトン性溶媒の存在下において、
0 ~ 4 0 、好ましくは 1 0 ~ 3 0 の反応温度で、1 0 パール ~ 1 0 0 パール、好ましくは 3 0 パール ~ 8 0 パールの水素圧において、行われる。

20

【 0 0 4 2 】

式 I V の G a l N A c アミドの遊離アルコールは、触媒を濾別し、真空中でのエバポレーションによって濾液を濃縮することによって、得ることができる。

【 0 0 4 3 】

工程 c)

工程 c) は、式 I V の G a l N A c 酸アミドの遊離アルコールを、ホスホロアミデート化剤と反応させて、式 I の G a l N A c ホスホラミダイトエピマーを形成することを必要とする。

30

【 0 0 4 4 】

ホスホロアミデート化剤は、2 - シアノエチル - N , N - ジ - (2 - プロピル) クロロホスホロアミダイトまたは 2 - シアノエチル - N , N , N ' , N ' - テトラ (2 - プロピル) ホスホロジアミダイトから選択することができる。

【 0 0 4 5 】

好ましい実施形態において、ホスホロアミデート化剤は、活性化剤と組み合わせた 2 - シアノエチル - N , N , N ' , N ' - テトラ (2 - プロピル) ホスホロジアミダイトである。

【 0 0 4 6 】

活性化剤は、第二級アミン、好ましくは第二級脂肪族アミン、例えば、ジイソプロピルアミンの酸性アンモニウム塩、好ましくはジイソプロピルアンモニウムテトラゾリドから
選択され得る。あるいは、他のテトラゾール種の活性化剤、例えば、テトラゾール、5 - (エチルチオ) - 1 H - テトラゾール、5 - (ベンジルチオ) - 1 H - テトラゾール、または 4 , 5 - ジシアノイミダゾールを使用してもよい。

40

【 0 0 4 7 】

反応は、極性非プロトン性溶媒、例えば、ジクロロメタン、テトラヒドロフラン、またはアセトニトリルにおいて、
- 2 0 ~ 5 0 、好ましくは 1 0 ~ 3 0 の反応温度で行うことができる。

【 0 0 4 8 】

反応混合物からの生成物の単離は、エバポレーションによって行うことができる。しかしながら、原則として、生成物は、溶液中に残り、分取クロマトグラフィーによってさら

50

に精製される。

【0049】

あるいは、上述のホスホロアミデート化反応の反応混合物を、固相オリゴヌクレオチド合成のために、クロマトグラフィー精製なしで直接的に使用することができる。

【0050】

好ましい実施形態において、クロマトグラフィーにより精製した生成物である式 I の $G a l N A c$ ホスホラミダイトエピマーは、極性非プロトン性溶媒、例えば、ジクロロメタンもしくはアセトニトリルまたはそれらの混合物中に溶解され、 $G a l N A c$ - クラスタ-オリゴヌクレオチドコンジュゲートの調製に直接的に適用される。あるいは、生成物溶液を、分子篩 (3 もしくは 4)、無水 K_2CO_3 、塩基性活性アルミナ、 $CaCl_2$ もしくは CaH_2 、好ましくは CaH_2 、または 3 の分子篩などの乾燥剤で乾燥させてもよい。

10

【0051】

$G a l N A c$ - クラスタ-オリゴヌクレオチドコンジュゲートの調製は、

a) 式 I の $G a l N A c$ ホスホラミダイトエピマーを調製すること、

b) 固相オリゴヌクレオチド合成において、式 I の $G a l N A c$ ホスホラミダイトエピマーを、所望の配列の所望のヌクレオシドビルディングブロックと一緒に利用して、固体支持体に結合した所望の $G a l N A c$ - クラスタ-オリゴヌクレオチドコンジュゲートを形成すること、および最後に

c) 固相支持体から $G a l N A c$ - クラスタ-オリゴヌクレオチドコンジュゲートを切断し、完全に脱保護し精製することを含む。

20

【0052】

オリゴヌクレオチドという用語は、本明細書で使用される場合、当業者によって一般的に理解されるように、2つ以上の共有結合的に連結されたヌクレオシドを含む分子として定義される。治療的に価値のあるオリゴヌクレオチドとして使用するために、オリゴヌクレオチドは、典型的に、7~30個のヌクレオチドの長さとして合成される。オリゴヌクレオチドは、通常、固相化学合成と、それに続く精製によって実験室内で作製される。オリゴヌクレオチドの配列に言及する場合、共有結合的に連結されたヌクレオチドまたはヌクレオシドの核酸塩基部分、またはその修飾物の配列または順序に対して言及される。本発明のオリゴヌクレオチドは、人工のものであり、化学的に合成され、かつ典型的には、精製または単離される。本発明のオリゴヌクレオチドは、1つまたは複数の修飾されたヌクレオシドまたはヌクレオチドを含んでもよい。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、アンチセンスオリゴヌクレオチドである。

30

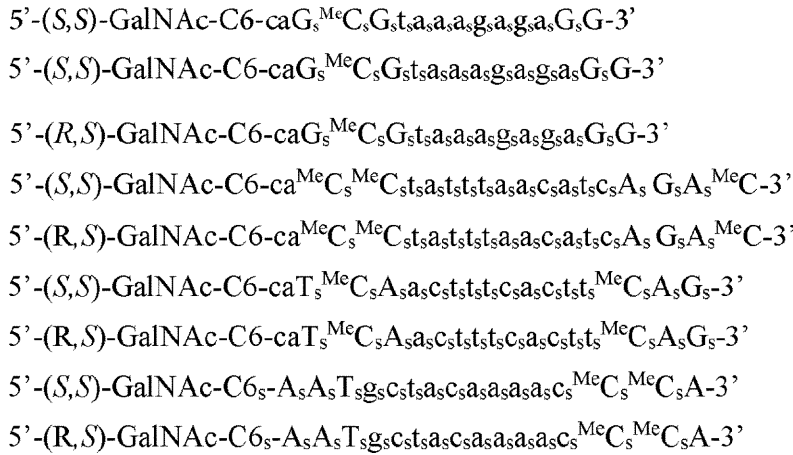
【0053】

オリゴヌクレオチドは、DNA、RNA、修飾されたRNA、もしくはLNAヌクレオシドモノマー、またはこれらの組み合わせからなり得る。LNAヌクレオシドモノマーは、ヌクレオチドのリボース糖環のC2'とC4'との間のリンカー基(ビラジカル(bi-radicle)または架橋と称される)を含む、修飾されたヌクレオシドである。これらのヌクレオシドは、文献において、架橋核酸または二環式核酸(BNA)とも称される。

40

【0054】

非限定的な実施形態において、 $G a l N A c$ - クラスタ-オリゴヌクレオチドコンジュゲートは、



10

からなる群から選択することができ、式中、大文字は、ベータ - D - オキシ - L N A 単位を表し、小文字は、D N A 単位を表し、下付き文字「s」は、ホスホロチオエート連結を表し、上付き文字 Me は、5 - メチルシトシン塩基を含有する D N A またはベータ - D - オキシ - L N A 単位を表し、C 6 は、6 - アミノヘキシル - 1 - ホスフェート連結を表す。

【 0 0 5 5 】

固相合成後に、G a l N A c - クラスターオリゴヌクレオチドコンジュゲートは、依然として、固体支持体に結合しており、依然として、ヒドロキシ保護基 R ¹ などの保護基を有する。

20

【 0 0 5 6 】

支持体からの切断および脱保護は、当業者に既知であり Wincott et al.; Nucl. Acids Res. (1995) 23 (14): 2677-2684 などの文献に記載されている方法を使用して行うことができる。通常、G a l N A c - クラスターオリゴヌクレオチドコンジュゲートは、好適な塩、例えば、アンモニウム塩、またはアルカリ金属塩、例えば、ナトリウム塩もしくはカリウム塩の形態で得られる。

【 0 0 5 7 】

本明細書において開示される化合物は、配列番号 1、2、3、および 4 からなる群から選択される核酸塩基配列を有する。

30

配列番号 1: cagcgtaaagagagg

配列番号 2: cacctatttaacatcagac

配列番号 3: catcaactttcacttcag

配列番号 4: aatgctacaaaacca

【 実施例 】

【 0 0 5 8 】

略語

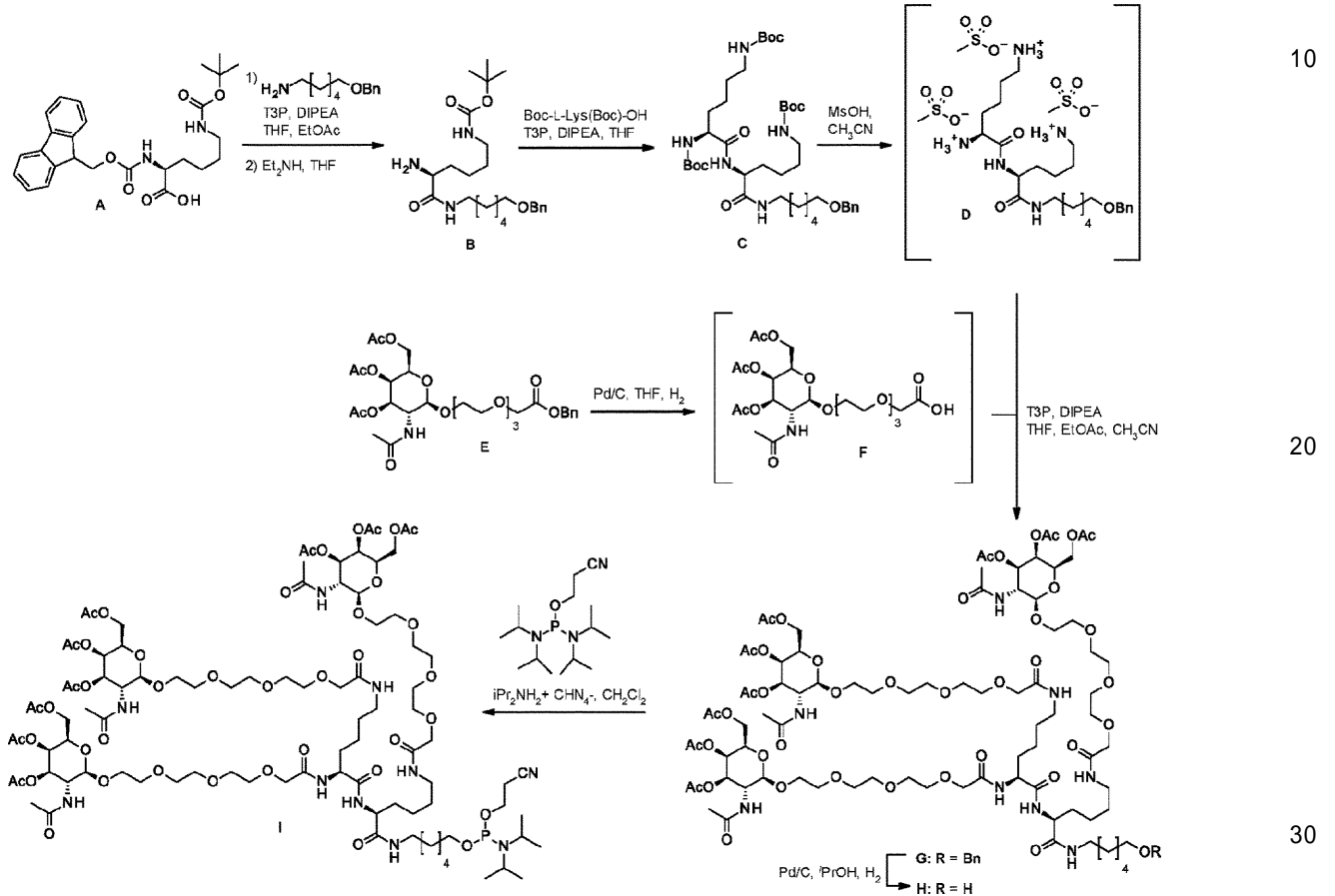
- D I P E A ジイソプロピルエチルアミン
- D M A P 4 - (ジメチルアミノ) - ピリジン
- E S I エレクトロスプレーイオン化 (Electron Spry Ionization)
- E t O A c 酢酸エチル
- E t O H エタノール
- H R M S 高分解能質量分析
- H S Q C - N M R 異核種単一量子コヒーレンス - 核磁気共鳴
- M e O H メタノール
- M S 分子篩

40

50

MsOH メタンスルホン酸
 Rt 室温 (20 ~ 25)
 SPOS 固相オリゴヌクレオチド合成
 T3P n - プロピルホスホン酸無水物
 THF テトラヒドロフラン
 TBME メチルtert. - ブチルエーテル
 【 0 0 5 9 】

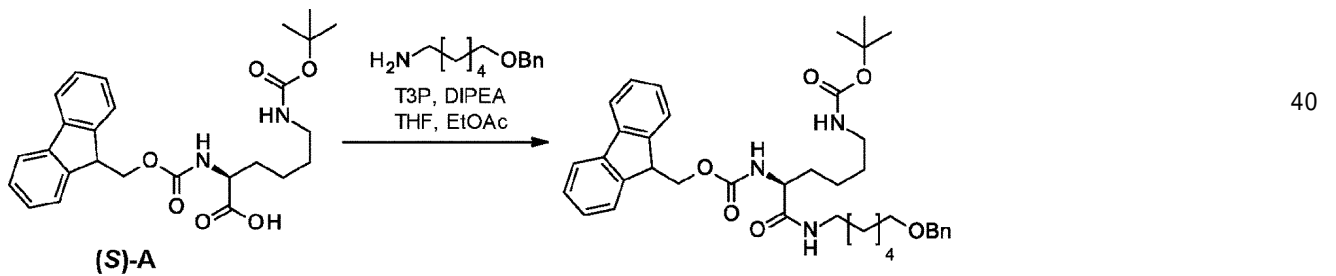
方法スキーム :



【 0 0 6 0 】

実施例 1 a

(2 S) - 6 - (tert - ブトキシカルボニルアミノ) - 2 - (9 H - フルオレン - 9 - イルメトキシカルボニルアミノ) ヘキサン酸



THF (540 ml) 中の Fmoc - L - Lys (Boc) - OH (54 g、115 mmol)、6 - ベンジルオキシヘキシル - 1 - アミン塩酸塩 (WO 第 2017084987 A1 号に従って調製) (29.5 g、121 mmol)、および N - エチルジイソプロピルアミン (78.4 ml、461 mmol) の溶液に、n - プロピルホスホン酸無水物 (EtOAc 中、環状三量体 50%、122 ml、207 mmol) を、20 ~ 25 で

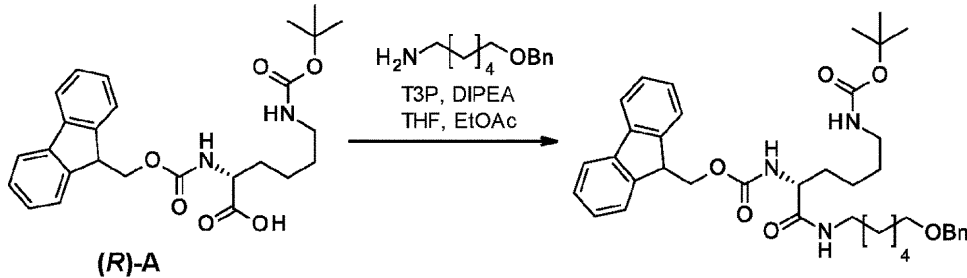
50

30秒間添加した。得られた明黄色のpH7~8の溶液を、20~25で1時間撪拌した。水(540ml)、TBME(135ml)、およびn-ヘプタン(540ml)を、反応混合物に順に添加し、二相混合物を抽出した。有機層を、濃縮し、真空中で濃縮して、目的の(S)-アミド(79g)を得、これを、さらなる精製なしに使用した。HRMS(ESI): C₃₉H₅₁N₃O₆(MH⁺)の計算値: 657.3778、実測値: 657.3781。

【0061】

実施例1b

(2R)-6-(tert-ブトキシカルボニルアミノ)-2-(9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ)ヘキサン酸

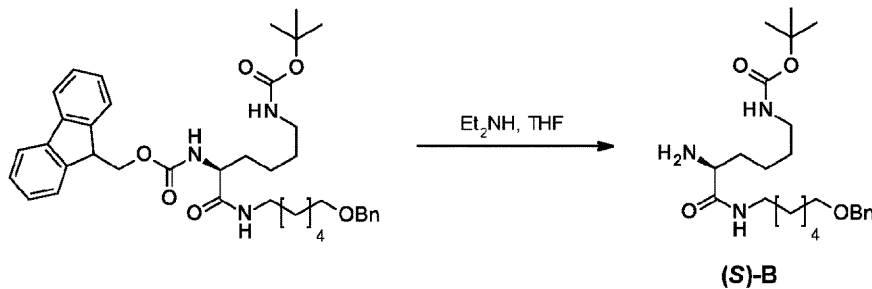


実施例1aと同じように、粗(R)-アミドを白色の固体として得、さらなる精製なしに使用した。HRMS(ESI): C₃₉H₅₁N₃O₆(MH⁺)の計算値: 657.3778、実測値: 657.3789。

【0062】

実施例2a

tert-ブチルN-[(5S)-5-アミノ-6-(6-ベンジルオキシヘキシルアミノ)-6-オキソ-ヘキシル]カルバメート



THF(237ml)中の上記の粗アミド(79g、120mmol)の溶液に、ジエチルアミン(251ml、2.4mol)を添加し、無色の溶液を、20~25で1.5時間撪拌した。次いで、反応混合物を濃縮し、真空中で乾燥させて、明黄色の油を得、これを、TBME(521ml)および水(521ml)中に再溶解させた。メタンスルホン酸(7.02ml、108mmol)を、pH4まで添加し、層を分離した。水層を、TBME(521ml)で再抽出し、次いで、水酸化ナトリウム(水中32%、12.9ml、139mmol)で、pH14まで塩基性にした。水性相を、TBME(521ml)で抽出し、有機層を分離させ、硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過し、濃縮し、真空中で乾燥させて、(S)-Bを無色の油として得た(48.5g、2工程で収率97%)。HRMS(ESI): C₂₄H₄₁N₃O₆(MH⁺)の計算値: 435.3097、実測値: 435.3121。

【0063】

実施例2b

tert-ブチルN-[(5R)-5-アミノ-6-(6-ベンジルオキシヘキシルアミノ)-6-オキソ-ヘキシル]カルバメート

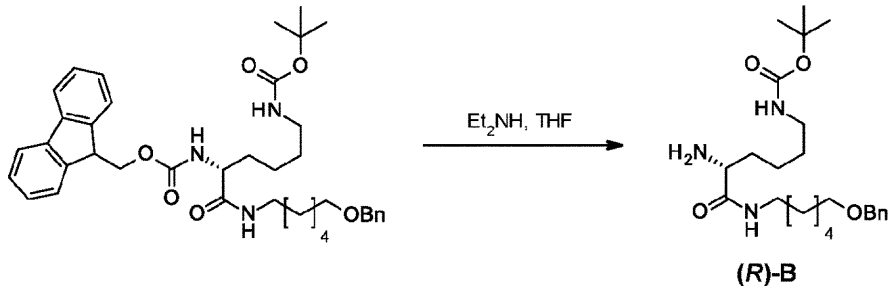
10

20

30

40

50

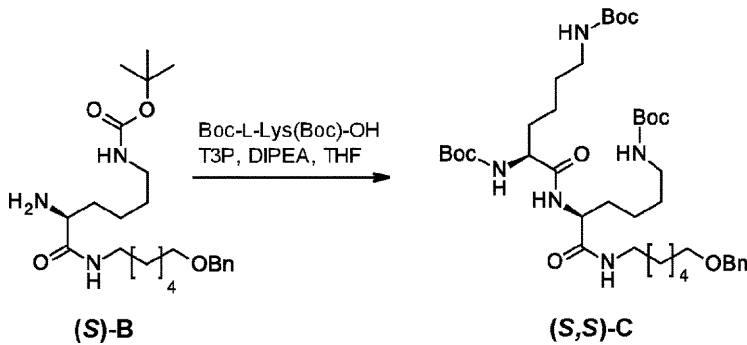


実施例 2 a と同じように、(R) - B を、明黄色の油として得た (9 2 3 m g 、 2 工程で 8 5 %) 。 HRMS (ESI) : C₂₄H₄₁N₃O₆ (MH⁺) の計算値 : 4 3 5 . 3 0 9 7 、 実測値 : 4 3 5 . 3 1 1 3 。

【 0 0 6 4 】

実施例 3 a

tert - ブチル N - [(5 S) - 6 - (6 - ベンジルオキシヘキシルアミノ) - 6 - オキソ - 5 - [[(2 S) - 2 , 6 - ビス (tert - ブトキシカルボニルアミノ) ヘキサノイル] アミノ] ヘキシル] カルバメート



THF (4 8 0 m l) 中の (S) - B (4 8 g 、 1 1 0 m m o l) 、 DIPEA (7 5 m l 、 4 4 1 m m o l) 、 および Boc - L - Lys (Boc) - OH (4 5 . 8 g 、 1 3 2 m m o l) の溶液に、 T 3 P (酢酸エチル中 5 0 % 、 9 7 . 4 m l 、 1 6 5 m m o l) を、 2 0 ~ 2 5 °C で 3 0 秒間にわたって添加し、無色の溶液を 4 5 分間攪拌した。次いで、水 (4 8 0 m l) を添加し、二相混合物を 5 分間攪拌した。n - ヘプタン (4 8 0 m l) を添加し、層を分離した。有機層を、水中 0 . 5 M HCl (2 3 0 m l) 、 0 . 5 M NaOH (2 3 0 m l) で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥させ、濾過し、濃縮した。粗生成物を、EtOH (4 5 m l) 中に溶解させ、n - ヘプタン (4 2 8 m l) を添加した。得られた白色の懸濁液を、20 ~ 25 °C で 1 6 時間攪拌した。懸濁液を濾過し、ケーキを EtOH / n - ヘプタン (0 . 5 / 9 . 5 、 5 0 m l) で洗浄し、白色の固体を真空中で乾燥させて、(S , S) - C (6 3 . 3 g 、 収率 7 5 %) を白色の結晶性固形物として得た。HRMS (ESI) : C₄₀H₆₉N₅O₉ (MH⁺) の計算値 : 7 6 3 . 5 0 9 5 、 実測値 : 7 6 3 . 5 0 9 8 。

【 0 0 6 5 】

実施例 3 b

tert - ブチル N - [(5 R) - 6 - (6 - ベンジルオキシヘキシルアミノ) - 6 - オキソ - 5 - [[(2 S) - 2 , 6 - ビス (tert - ブトキシカルボニルアミノ) ヘキサノイル] アミノ] ヘキシル] カルバメート

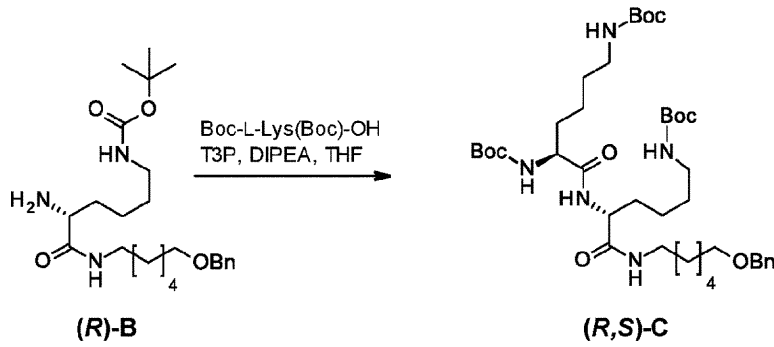
10

20

30

40

50



10

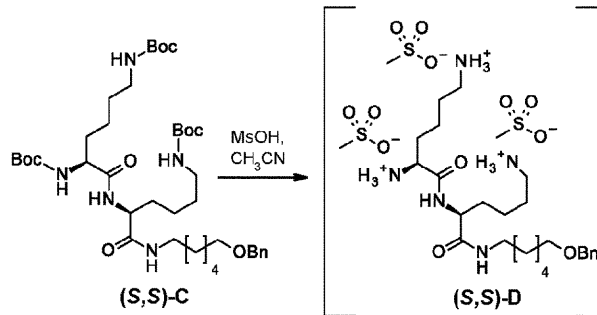
実施例 3 a と同じように、(R, S) - C を、白色の固体として得た (16.4 g、71%)。HRMS (ESI) : C₄₀H₆₉N₅O₉ (MH⁺) の計算値 : 763.5095、実測値 : 763.5076。

【0066】

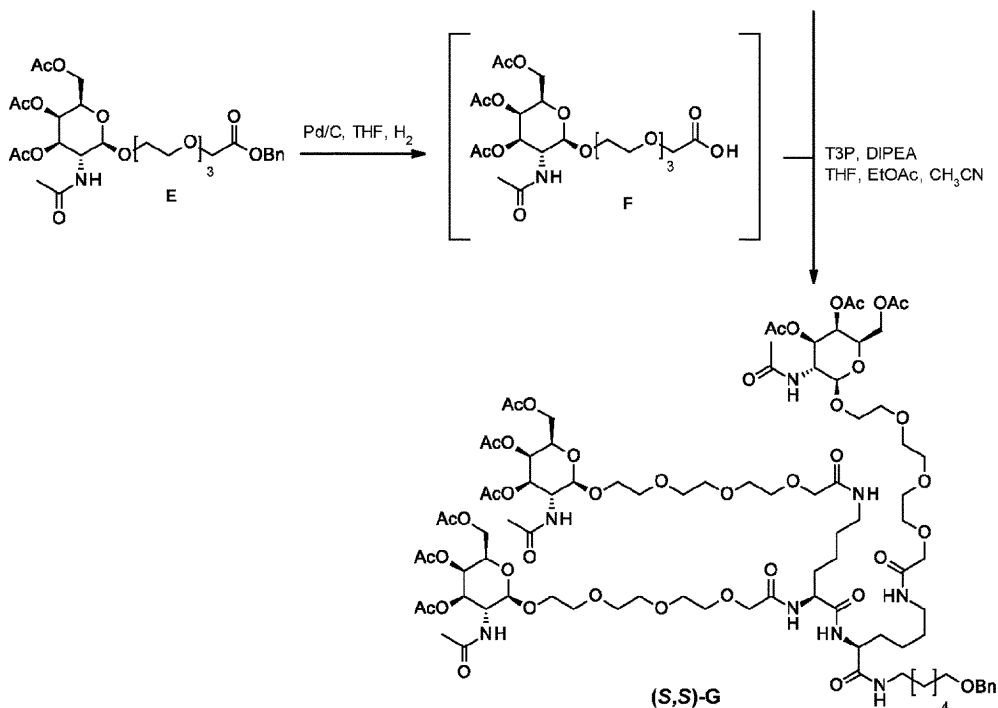
実施例 4 a

(2S) - 2, 6 - ビス [[2 - [2 - [2 - [2 - [(2R, 3R, 4S, 5R, 6R) - 3 - アセトアミド - 6 - エチル - 4, 5 - ジメチル - テトラヒドロピラン - 2 - イル] オキシエトキシ] エトキシ] エトキシ] アセチル] アミノ] - N - [(1S) - 1 - (6 - ベンジルオキシヘキシルカルバモイル) - 5 - [[2 - [2 - [2 - [2 - [(2R, 3R, 4S, 5R, 6R) - 3 - アセトアミド - 6 - エチル - 4, 5 - ジメチル - テトラヒドロピラン - 2 - イル] オキシエトキシ] エトキシ] エトキシ] アセチル] アミノ] ペンチル] ヘキササンアミド

20



30



40

50

(S, S) - C (36.1 g、47.3 mmol) を、アセトニトリル (366 ml) 中に懸濁させ、メタンスルホン酸 (15.4 ml、237 mmol) を添加した。結果として得られた黄色がかった濁った溶液を、55 ~ 60 に加熱した。20分後に、追加のアセトニトリル (366 ml) を添加して、撹拌させた。2時間後に油浴を除去し、白色のスラリーをカップリングに使用した。DIPEA (137 ml、804 mmol) および F の溶液 (WO 第 2017084987 A 号に従って調製したもの (7.6% 重量/重量、1.35 kg、191 mmol) を、上記の反応混合物に添加し、明黄色の溶液を、40 ~ 45 に温めた。次いで、T3P (酢酸エチル中 50%、139 ml、237 mmol) を、5分間にわたって添加し、無色の溶液を、40 ~ 45 で撹拌した。30分後に、反応混合物を 20 ~ 25 に冷却し、真空中でおよそ 500 g まで濃縮した。この粗溶液を、1 M 重炭酸ナトリウム (236 ml、236 mmol) 中に溶解し、少量ずつ 4 回に分けて、逆相クロマトグラフィー (Redisep Rf C18、360 g、H₂O / アセトニトリル 100 : 0 から 70 : 30 から 60 : 40 から 10 : 90) によって精製した。生成物を含有する画分を、真空中で濃縮して、アセトニトリルを除去し、次いで、凍結乾燥させて、白色の泡沫体を得、これをアセトニトリル (2x) と共沸混合して、部分的に脱アセチル化された (S, S) - G (77.1 g) を白色の泡沫体として得た。

【0067】

再アセチル化：

上記で得られた (S, S) - G (77.1 g) を、アセトニトリル (231 ml) 中に取り、20 ~ 25 で 1 時間、DMAP (465 mg、3.81 mmol)、DIPEA (4.86 ml、28.6 mmol)、および無水酢酸 (2.51 ml、26.7 mmol) で処理した。水 (1.0 l) で希釈した後、この溶液を、少量ずつ 5 回に分けて、逆相クロマトグラフィー (Redisep Rf C18、360 g、H₂O / アセトニトリル 100 : 0 から 70 : 30 から 65 : 35 から 0 : 100) によって再度精製した。生成物を含有する画分を、真空中で濃縮して、白色の泡沫体を得、これをアセトニトリルと共沸混合して、(S, S) - G (67.0 g、87%) を白色の泡沫体として得た。HRMS (ESI) : C₉₁H₁₄₄N₈O₄₂ ((M + 2H) / 2²⁺) の計算値 : 1011.4762、実測値 : 1011.4761。

【0068】

実施例 4 b

(2S) - 2, 6 - ビス[[2 - [2 - [2 - [2 - [(2R, 3R, 4S, 5R, 6R) - 3 - アセトアミド - 6 - エチル - 4, 5 - ジメチル - テトラヒドロピラン - 2 - イル]オキシエトキシ]エトキシ]エトキシ]アセチル]アミノ] - N - [(1R) - 1 - (6 - ベンジルオキシヘキシルカルバモイル) - 5 - [[2 - [2 - [2 - [2 - [(2R, 3R, 4S, 5R, 6R) - 3 - アセトアミド - 6 - エチル - 4, 5 - ジメチル - テトラヒドロピラン - 2 - イル]オキシエトキシ]エトキシ]エトキシ]アセチル]アミノ]ペンチル]ヘキサナムド

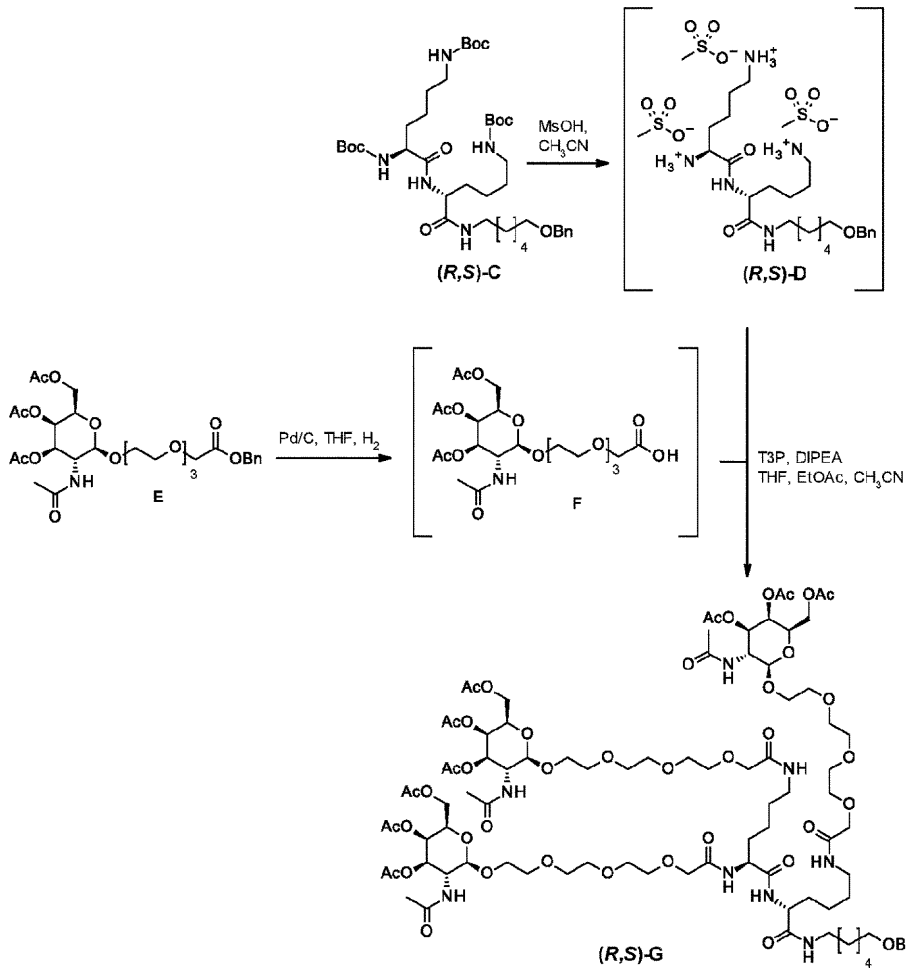
10

20

30

40

50



10

20

実施例 4 a と同じようにあるが再アセチル化手順は行わずに、(R, S) - G を、白色の泡沫体として得た (29.1 g、66%)。HRMS (EI) : C₉₁H₁₄₄N₈O₄₂ (M⁺) 計算値 : 2020.9378、実測値 : 2020.9365。

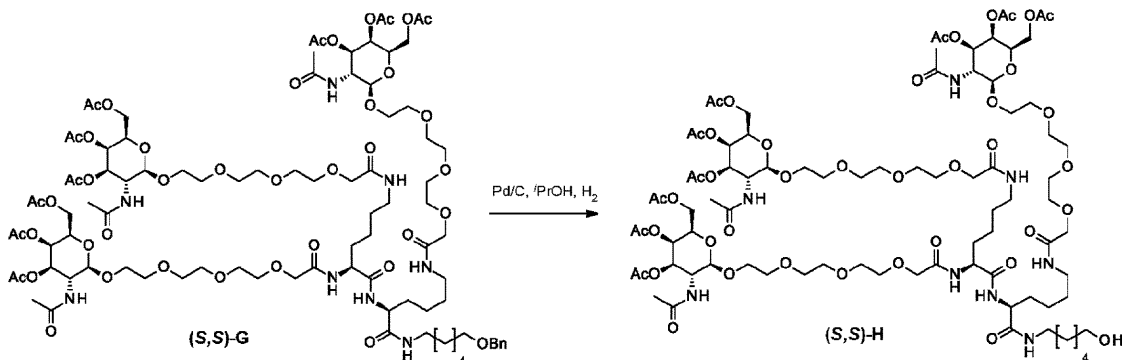
30

【0069】

実施例 5 a

(2S) - 2, 6 - ビス [[2 - [2 - [2 - [2 - [(2R, 3R, 4S, 5R, 6R) - 3 - アセトアミド - 6 - エチル - 4, 5 - ジメチル - テトラヒドロピラン - 2 - イル] オキシエトキシ] エトキシ] エトキシ] アセチル] アミノ] - N - [(1S) - 1 - (6 - ヒドロキシヘキシルカルバモイル) - 5 - [[2 - [2 - [2 - [2 - [(2R, 3R, 4S, 5R, 6R) - 3 - アセトアミド - 6 - エチル - 4, 5 - ジメチル - テトラヒドロピラン - 2 - イル] オキシエトキシ] - エトキシ] エトキシ] アセチル] アミノ] ペンチル] ヘキサナムイド

40



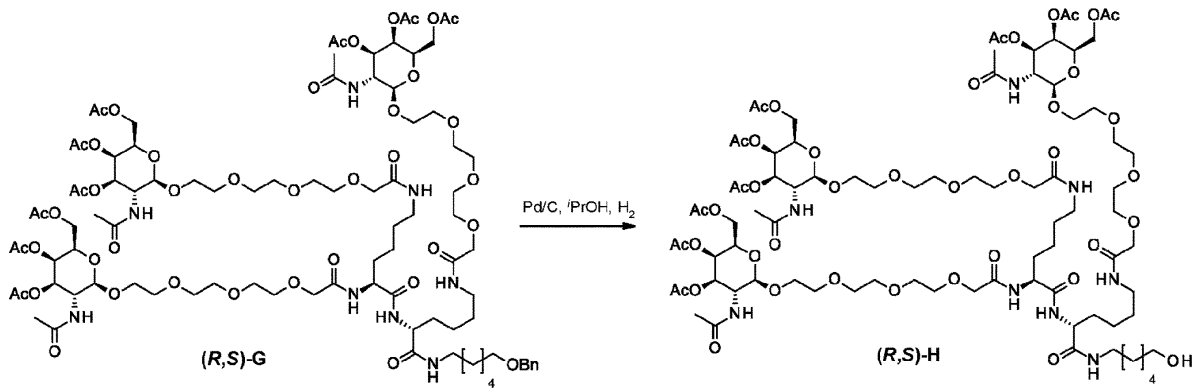
50

(S, S) - G (67.0 g、33.1 mmol) を、2 - プロパノール (670 ml) 中に溶解し、パラジウム炭素 10% (3.8 g、3.57 mmol) を添加した。混合物を、60 巴ールの H₂ 下において、2 時間、20 で加圧反応装置において水素化した。懸濁液を、濾過し、フィルタを、2 - プロパノール (150 ml) で洗浄した。結果として得られた無色の溶液を、真空中で濃縮し、残留物を、アセトニトリル (3 × 500 ml) と共沸混合して、粗 (S, S) - H (61.1 g、95%) を白色の泡沫体として得、これを、さらなる精製なしに使用し、20 で保管した。HRMS (ESI) : C₈₄H₁₃₉N₈O₄₂ (MH⁺) の計算値 : 1930.8908、実測値 : 1931.9004。

【0070】

実施例 5 b

(2S) - 2, 6 - ビス[[2 - [2 - [2 - [2 - [(2R, 3R, 4S, 5R, 6R) - 3 - アセトアミド - 6 - エチル - 4, 5 - ジメチル - テトラヒドロピラン - 2 - イル] オキシエトキシ] エトキシ] エトキシ] アセチル] アミノ] - N - [(1R) - 1 - (6 - ヒドロキシヘキシルカルバモイル) - 5 - [[2 - [2 - [2 - [2 - [(2R, 3R, 4S, 5R, 6R) - 3 - アセトアミド - 6 - エチル - 4, 5 - ジメチル - テトラヒドロピラン - 2 - イル] オキシエトキシ] - エトキシ] エトキシ] アセチル] アミノ] ペンチル] ヘキサナムイド



実施例 5 a と同じように、粗 (R, S) - H を、白色の泡沫体として得た (29.1 g、定量的収率)。LC - MS (ESI) : C₈₄H₁₃₉N₈O₄₂ (MH⁺) の計算値 : 1931.9、実測値 : 1931.5。

【0071】

実施例 6 a

(2S) - 2, 6 - ビス[[2 - [2 - [2 - [2 - [rac - (2R, 3R, 4S, 5R, 6R) - 3 - アセトアミド - 6 - エチル - 4, 5 - ジメチル - テトラヒドロピラン - 2 - イル] オキシエトキシ] エトキシ] エトキシ] アセチル] アミノ] - N - [(1S) - 1 - [6 - [2 - シアノエトキシ - (ジイソプロピルアミノ) ホスファニル] オキシヘキシルカルバモイル] - 5 - [[2 - [2 - [2 - [2 - [(2R, 3R, 4S, 5R, 6R) - 3 - アセトアミド - 6 - エチル - 4, 5 - ジメチル - テトラヒドロピラン - 2 - イル] オキシエトキシ] エトキシ] エトキシ] アセチル] - アミノ] ペンチル] ヘキサナムイド

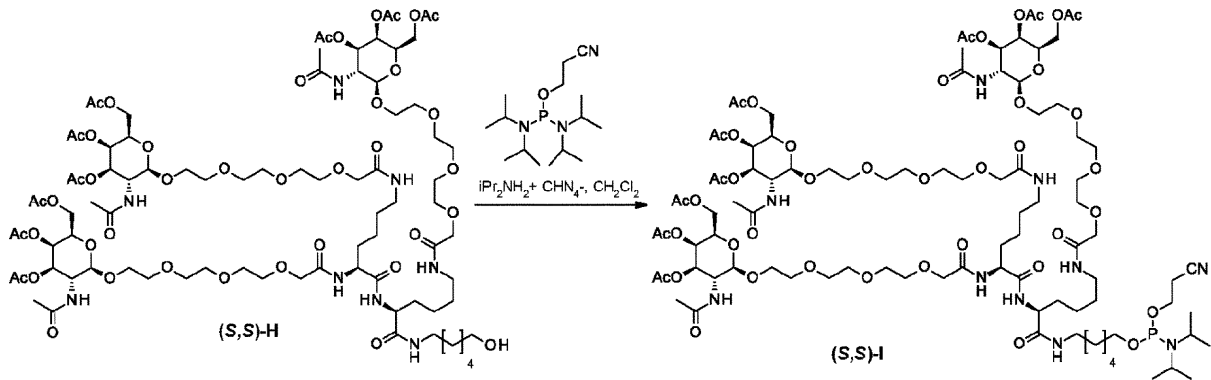
10

20

30

40

50



10

無水ジクロロメタン (20 ml) 中の (S, S) - H (3.4 g、1.76 mmol) の溶液に、3 - ((ビス(ジイソプロピルアミノ)ホスフィノ)オキシ)プロパンニトリル (902 mg、2.99 mmol) およびジイソプロピル - アンモニウムテトラゾリド (151 mg、0.88 mmol) を添加した。明黄色の溶液を、20 ~ 25 で1時間攪拌した。反応混合物を、TBMEで希釈し、分取クロマトグラフィー (Redisep R_f Gold Cyano、275 g、TBME (1%体積/体積のNEt₃を含有) / アセトニトリル90 : 10から70 : 30) によって直接精製した。生成物を含む画分を、真空中で濃縮して、(S, S) - I (3.0 g、80%) を白色の泡沫体として得た。³¹P NMR (162 MHz、DMSO - d₆) : ppm 146.32 ; HRMS (無水CHCl₃からのナノスプレー) : C₉₁H₁₄₄N₈O₄₂の計算値 ((M + 2H) / 2⁺) : 1066.5066 ; 実測値 : 1066.5078。

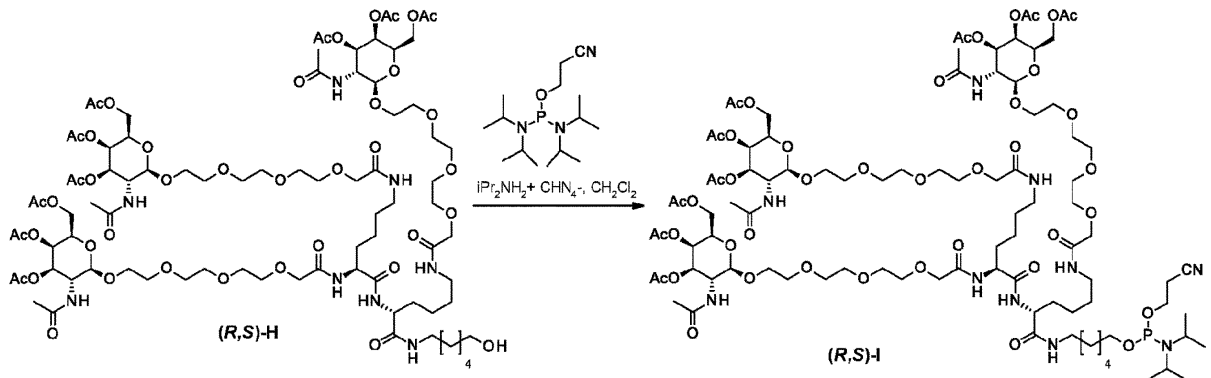
20

【0072】

実施例 6 b

(2S) - 2, 6 - ビス[[2 - [2 - [2 - [2 - [(2R, 3R, 4S, 5R, 6R) - 3 - アセトアミド - 6 - エチル - 4, 5 - ジメチル - テトラヒドロピラン - 2 - イル]オキシエトキシ]エトキシ]エトキシ]アセチル]アミノ] - N - [(1R) - 1 - [6 - [2 - シアノエトキシ - (ジイソプロピルアミノ)ホスファニル]オキシヘキシルカルバモイル] - 5 - [[2 - [2 - [2 - [2 - [(2R, 3R, 4S, 5R, 6R) - 3 - アセトアミド - 6 - エチル - 4, 5 - ジメチル - テトラヒドロピラン - 2 - イル]オキシエトキシ]エトキシ]エトキシ]アセチル] - アミノ]ペンチル]ヘキサンアミド

30



40

アセトニトリル (20 ml、CaH₂で乾燥) 中の (R, S) - H (2.5 g、1.29 mmol) の溶液に、3 - ((ビス(ジイソプロピルアミノ)ホスフィノ)オキシ)プロパンニトリル (624 mg、2.07 mmol) およびジイソプロピル - アンモニウムテトラゾリド (44.3 mg、0.26 mmol) を添加した。無色の溶液を、20 ~ 25 で1.5時間攪拌した。反応混合物を、真空中で12 mlの体積まで濃縮し、分取クロマトグラフィー (Redisep R_f Gold Cyano、275 g、TBME / アセトニトリル95 : 5から75 : 25) を適用した。生成物を含む画分を、真空中で濃縮して、(R, S) - I (2.1 g、76%) を無色のワックスとして得た。³¹P

50

NMR (162 MHz, DMSO-d₆): ppm 146.83.

【0073】

固相オリゴヌクレオチド合成(SPOS)のために、(S,S)-Iおよび(R,S)-Iのいずれかを、無水MeCNまたはCH₂Cl₂中に溶解して、0.1~0.2Mの溶液を得た。この溶液を、4 MS、3 MS、無水K₂CO₃、塩基性活性アルミナ、CaCl₂、またはCaH₂上で1時間乾燥させ、次いで、オリゴヌクレオチド合成装置で直接使用した。

【0074】

固相オリゴヌクレオチド合成

GalNAc-クラスター修飾LNA/DNAを、BioAutomation Mermade 12において1もしくは20 μmolのスケールで、または0.2、0.95、もしくは1.9 mmolのスケールでAKTA Oligopilot 100 (GE Healthcare, Freiburg, Germany)を使用して、固相における標準的なホスホラミダイト化学(WO第2017084987A1号および同第2018215391A1号を参照されたい)によって生成した。使用される固体支持体としては、Primer Support 5G Unylinker 200 (GE Healthcare, Freiburg, Germany)、Primer Support 5G Unylinker 350 (GE Healthcare, Freiburg, Germany)、またはKinovate NittoPhase HL Unylinker 400が挙げられる。2-OCH₂-4架橋ヌクレオチド(Sigma-Aldrich、S A F C、Hamburg, Germany)およびDNA(Sigma-Aldrich、S A F C、Hamburg, Germany)を含有するオリゴヌクレオチドを、対応するホスホラミダイトを用いて生成した。上記のように調製したMeCNまたはCH₂Cl₂中のGalNAc-クラスターホスホラミダイト(S,S)-Iおよび(R,S)-Iの溶液を、標準的なSPOS活性化因子、例えば、4,5-ジシアノイミダゾール(N-メチルイミダゾールありおよびなし)またはテトラゾール活性化因子、例えば、5-(ベンジルチオ)-1H-テトラゾールもしくはActivator 42とともに、1.5~4.0当量のホスホラミダイトを、30/70~40/60のアミダイト対活性化因子の比で、10~30分間のカップリング時間で用いて、使用した。酸化は、ピリジン/H₂O(9:1)中の有機酸化剤、例えば、カンファースルホニルオキサジリジン、クメンヒドロペルオキシド、tert-ブチル過酸化水素、またはヨウ素によって行う。チオール化は、SPOSに使用される標準的なチオール化試薬、例えば、3-アミノ-1,2,3-ジチアゾール-5-チオン(キサンタン水素化物)、3-ジメチルアミノ-1,2,3-ジチアゾール-5-チオン、3-エトキシ-1,2,4-ジチアゾリン-5-オン、Beaucage試薬、またはフェニル酢酸ジスルフィドを、それぞれの溶媒に入れたものによって実行することができる。カップリング工程は、GalNAc-クラスターホスホラミダイトのカップリングには用いなかった。切断および脱保護は、当業者に既知の方法(Wincott F. et al. Nucleic Acid Research, 1995, 23,14, 2677-84)、例えば、25~55の温度における濃縮NH₄OH(28~33%)によって達成した。脱保護し乾燥させた、アンモニウム塩としての粗GalNAc-クラスター修飾LNAを、特徴づけ、同一性を、イオン対合HPLC-MSにより確認した。それらは、オリゴヌクレオチドの標準的な精製方法によって精製することができる(例えば、WO第2018215391A1号を参照されたい)。

【0075】

(大文字は、ベータ-D-オキシ-LNA単位を表し、小文字は、DNA単位を表し、下付き文字「s」は、ホスホロチオエート連結を表し、上付き文字Meは、5-メチルシトシン塩基を含有するDNAまたはベータ-D-オキシ-LNA単位を表し、AM-C6は、6-アミノヘキシル-1-ホスフェート連結を表す)。

【0076】

実施例7a:

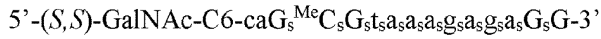
10

20

30

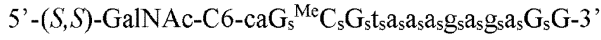
40

50



の合成

上述の標準的なSPOS条件に従って、(*S,S*)-Iを使用して、標題生成物を、AKTA Oligopilot 100 (GE Healthcare、Freiburg、Germany)において1.9mmolのスケールで合成した。脱保護し濃縮したアンモニウム塩としての粗オリゴヌクレオチドを、逆相HPLCによって精製し、限外濾過/ダイアフィルトレーションおよび凍結乾燥した後に、



10

のナトリウム塩(1.7g、87.0a%のHPLC純度)を、白色の凍結乾燥物として得た。IP-RP-HPLC-HRMS(ESI):C₂₂₀H₃₀₃N₇₆O₁₁₁P₁₅S₁₂(M⁻)の計算値:6633.3115、実測値:6633.3089。エピマー純度は、¹H-¹³C-HSQC-NMRによって、95%を上回ると決定した(LOD)。加えて、6M HClにおける加水分解、遊離アミノ酸の誘導體化、およびCHIRASIL VALにおけるリジンエナンチオマーのガスクロマトグラフィー分離により、99.8%のエピマー純度が示された。

【0077】

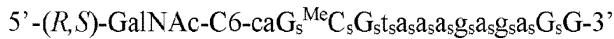
実施例7b



20

の合成

上述の標準的なSPOS条件に従って、(*R,S*)-Iを使用して、標題生成物を、AKTA Oligopilot 100 (GE Healthcare、Freiburg、Germany)において1.9mmolのスケールで合成した。脱保護し濃縮したアンモニウム塩としての粗オリゴヌクレオチドを、逆相HPLCによって精製し、限外濾過/ダイアフィルトレーションおよび凍結乾燥した後に、



のナトリウム塩(1.6g、91.6a%のHPLC純度)を、白色の凍結乾燥物として得た。IP-RP-HPLC-HRMS(ESI):C₂₂₀H₃₀₃N₇₆O₁₁₁P₁₅S₁₂(M⁻)の計算値:6633.3115、実測値:6633.3134。エピマー純度は、¹H-¹³C-HSQC-NMRによって、95%を上回ると決定した(LOD)。加えて、6M HClにおける加水分解、遊離アミノ酸の誘導體化、およびCHIRASIL VALにおけるリジンエナンチオマーのガスクロマトグラフィー分離により、95.6%未満のエピマー純度が示された。

【0078】

実施例8a



40

の合成

上述の標準的なSPOS条件に従って、(*S,S*)-Iを使用して、標題生成物を、AKTA Oligopilot 100 (GE Healthcare、Freiburg、Germany)において0.2mmolのスケールで合成した。脱保護し濃縮したアンモニウム塩としての粗オリゴヌクレオチドを、IEX-MPLCによって精製し、限外濾過/ダイアフィルトレーションおよび凍結乾燥した後に、



のナトリウム塩(350mg、79.1a%のHPLC純度)を、白色の凍結乾燥物として得た。IP-RP-HPLC-HRMS(ESI):C₂₅₉H₃₅₉N₇₆O₁₃₅P₁

50

9 S 1 6 (M ⁻) の計算値：7 7 9 3 . 4 1 0 9、実測値：7 7 9 3 . 4 1 2 7。エピマー純度は、¹H - ¹³C - H S Q C - N M Rによって、9 6 %を上回ると決定した (L O D)。加えて、6 M H C lにおける加水分解、遊離アミノ酸の誘導体化、およびC H I R A S I L V A Lにおけるリジンエナンチオマーのガスクロマトグラフィー分離により、9 9 . 8 %のエピマー純度が示された。

【 0 0 7 9 】

実施例 8 b



の合成

10

上述の標準的なS P O S条件に従って、(R , S) - Iを使用して、標題生成物を、A K T A O l i g o p i l o t 1 0 0 (G E H e a l t h c a r e、F r e i b u r g、G e r m a n y)において0 . 2 m m o lのスケールで合成し生成した。脱保護し濃縮したアンモニウム塩としての粗オリゴヌクレオチドを、I E X - M P L Cによって精製し、限外濾過 / ダイアフィルトレーションおよび凍結乾燥した後に、



のナトリウム塩 (6 3 0 m g、8 2 . 9 a %のH P L C) を、白色の凍結乾燥物として得た。I P - R P - H P L C - H R M S (E S I) : C 2 5 9 H 3 5 9 N 7 6 O 1 3 5 P 1 9 S 1 6 (M ⁻) の計算値：7 7 9 3 . 4 1 0 9、実測値：7 7 9 3 . 4 1 2 7。エピマー純度は、¹H - ¹³C - H S Q C - N M Rによって、9 6 %を上回ると決定した (L O D)。加えて、6 M H C lにおける加水分解、遊離アミノ酸の誘導体化、およびC H I R A S I L V A Lにおけるリジンエナンチオマーのガスクロマトグラフィー分離により、9 5 . 4 %を上回るエピマー純度が示された。

20

【 0 0 8 0 】

実施例 9 a



の合成

30

上述の標準的なS P O S条件に従って、(S , S) - Iを使用して、標題生成物を、A K T A O l i g o p i l o t 1 0 0 (G E H e a l t h c a r e、F r e i b u r g、G e r m a n y)において2 * 1 . 9 m m o lのスケールで合成した。脱保護し濃縮したアンモニウム塩としての粗オリゴヌクレオチドを、I E X - M P L Cによって、それに続いて逆相H P L Cによって精製し、限外濾過 / ダイアフィルトレーションおよび凍結乾燥した後に、



のナトリウム塩 (1 2 . 5 g、9 2 . 7 a %のH P L C純度) を、白色の凍結乾燥物として得た。I P - R P - H P L C - H R M S (E S I) : C 2 4 8 H 3 4 6 N 6 8 O 1 3 3 P 1 8 S 1 5 (M ⁻) の計算値：7 4 4 1 . 3 4 9 0、実測値：7 4 4 1 . 3 7 3 0。エピマー純度は、¹H - ¹³C - H S Q C - N M Rによって、9 8 %を上回ると決定した (L O D)。加えて、6 M H C lにおける加水分解、遊離アミノ酸の誘導体化、およびC H I R A S I L V A Lにおけるリジンエナンチオマーのガスクロマトグラフィー分離により、9 9 . 6 %のエピマー純度が示された。

40

【 0 0 8 1 】

実施例 9 b



の合成

50

上述の標準的なS P O S条件に従って、(R , S) - Iを使用して、標題生成物を、A

KTA Oligopilot 100 (GE Healthcare, Freiburg, Germany) において 1.9 mmol のスケールで合成し生成した。脱保護し濃縮したアンモニウム塩としての粗オリゴヌクレオチドを、逆相 HPLC によって精製し、限外濾過 / ダイアフィルトレーションおよび凍結乾燥した後に、
 $5'-(R,S)\text{-GalNAc-C6-caT}_s^{\text{Me}}\text{C}_s\text{A}_s\text{C}_s\text{t}_s\text{t}_s\text{t}_s\text{C}_s\text{a}_s\text{C}_s\text{t}_s\text{t}_s^{\text{Me}}\text{C}_s\text{A}_s\text{G}_s\text{-3}'$

のナトリウム塩 (6.0 g, 82.0 a% の HPLC) を、白色の凍結乾燥物として得た。IP-RP-HPLC-HRMS (ESI): $\text{C}_{248}\text{H}_{346}\text{N}_{68}\text{O}_{133}\text{P}_{18}\text{S}_{15}$ (M^-) の計算値: 7441.3490、実測値: 7441.3508。エピマー純度は、 $^1\text{H} - ^{13}\text{C} - \text{HSQC} - \text{NMR}$ によって、98% を上回ると決定した (LOD)。加えて、6M HCl における加水分解、遊離アミノ酸の誘導体化、および CHIRASIL VAL におけるリジンエナンチオマーのガスクロマトグラフィー分離により、97.0% を上回るエピマー純度が示された。

【0082】

実施例 10a

$5'-(S,S)\text{-GalNAc-C6}_s\text{-A}_s\text{A}_s\text{T}_s\text{g}_s\text{C}_s\text{t}_s\text{a}_s\text{C}_s\text{a}_s\text{a}_s\text{a}_s\text{C}_s^{\text{Me}}\text{C}_s^{\text{Me}}\text{C}_s\text{A-3}'$

の合成

上述の標準的な SPOS 条件に従って、(S, S) - I を使用して、標題生成物を、AKTA Oligopilot 100 (GE Healthcare, Freiburg, Germany) において 0.95 mmol のスケールで合成した。脱保護し濃縮したアンモニウム塩として粗オリゴヌクレオチドを、逆相 HPLC によって精製し、限外濾過 / ダイアフィルトレーションおよび凍結乾燥した後に、
 $5'-(S,S)\text{-GalNAc-C6}_s\text{-A}_s\text{A}_s\text{T}_s\text{g}_s\text{C}_s\text{t}_s\text{a}_s\text{C}_s\text{a}_s\text{a}_s\text{a}_s\text{C}_s^{\text{Me}}\text{C}_s^{\text{Me}}\text{C}_s\text{A-3}'$

のナトリウム塩 (1.6 g, 87.7 a% の HPLC 純度) を、白色の凍結乾燥物として得た。IP-RP-HPLC-HRMS (ESI): $\text{C}_{229}\text{H}_{318}\text{N}_{72}\text{O}_{113}\text{P}_{16}\text{S}_{16}$ (M^-) の計算値: 6891.2684、実測値: 6891.2714。エピマー純度は、 $^1\text{H} - ^{13}\text{C} - \text{HSQC} - \text{NMR}$ によって、94% を上回ると決定した (LOD)。加えて、6M HCl における加水分解、遊離アミノ酸の誘導体化、および CHIRASIL VAL におけるリジンエナンチオマーのガスクロマトグラフィー分離により、99.6% のエピマー純度が示された。

【0083】

実施例 10b

$5'-(R,S)\text{-GalNAc-C6}_s\text{-A}_s\text{A}_s\text{T}_s\text{g}_s\text{C}_s\text{t}_s\text{a}_s\text{C}_s\text{a}_s\text{a}_s\text{a}_s\text{C}_s^{\text{Me}}\text{C}_s^{\text{Me}}\text{C}_s\text{A-3}'$

の合成

上述の標準的な SPOS 条件に従って、(R, S) - I を使用して、標題生成物を、AKTA Oligopilot 100 (GE Healthcare, Freiburg, Germany) において 0.95 mmol のスケールで合成し生成した。脱保護し濃縮したアンモニウム塩として粗オリゴヌクレオチドを、逆相 HPLC によって精製し、限外濾過 / ダイアフィルトレーションおよび凍結乾燥した後に、
 $5'-(R,S)\text{-GalNAc-C6}_s\text{-A}_s\text{A}_s\text{T}_s\text{g}_s\text{C}_s\text{t}_s\text{a}_s\text{C}_s\text{a}_s\text{a}_s\text{a}_s\text{C}_s^{\text{Me}}\text{C}_s^{\text{Me}}\text{C}_s\text{A-3}'$

のナトリウム塩 (2.0 g, 88.0 a% の HPLC) を、白色の凍結乾燥物として得た。IP-RP-HPLC-HRMS (ESI): $\text{C}_{229}\text{H}_{318}\text{N}_{72}\text{O}_{113}\text{P}_{16}\text{S}_{16}$ (M^-) の計算値: 6891.2684、実測値: 6891.2715。エピマー純度は、 $^1\text{H} - ^{13}\text{C} - \text{HSQC} - \text{NMR}$ によって、95% を上回ると決定した (LOD)。加えて、6M HCl における加水分解、遊離アミノ酸の誘導体化、および CHIRASIL VAL におけるリジンエナンチオマーのガスクロマトグラフィー分離により、99.4%

のエピマー純度が示された。

【配列表】

0007558201000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

- (74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光
- (74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
- (74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
- (74)代理人 100205707
弁理士 小寺 秀紀
- (74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
- (74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥
- (72)発明者 ブライトラー サイモン アドルフ
スイス 4070 バーゼル グレンツァーヘルストラツセ 124 エフ・ホフマン - ラ ロシュ
アーゲー内
- (72)発明者 ブエンテナー クルト
スイス 4070 バーゼル グレンツァーヘルストラツセ 124 エフ・ホフマン - ラ ロシュ
アーゲー内
- 審査官 谷尾 忍
- (56)参考文献 特表2018-532764(JP,A)
国際公開第2018/215391(WO,A1)
特表2018-523643(JP,A)
Isaiah CEDILLO et al., Synthesis of 5'-GalNAc-Conjugated Oligonucleotides: A Comparison
of Solid and Solution-Phase Conjugation Strategies, MOLECULES, 2017年, vol.22, no.8,
p.1356(1/12-12/12)
- (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
C07H 1/00
C12N 15/11
A61K 47/61
C07H 15/08
C07H 21/00
Caplus/REGISTRY(STN)
CASREACT(STN)