

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2022-510346

(P2022-510346A)

(43)公表日 令和4年1月26日(2022.1.26)

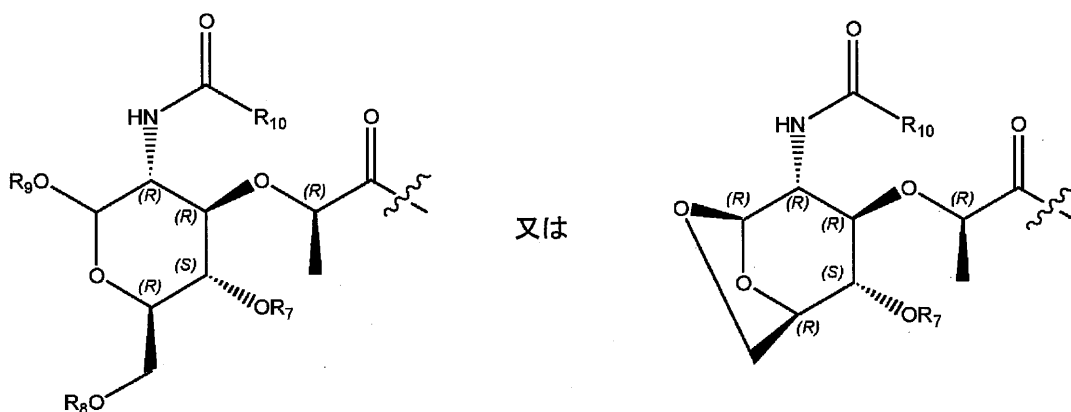
(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/113 (2010.01)	C 1 2 N	15/113	Z Z N A	4 C 0 7 6
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00		4 C 0 8 4
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00		4 C 0 8 6
A 6 1 P	31/04 (2006.01)	A 6 1 P	31/04		
A 6 1 K	31/7088(2006.01)	A 6 1 K	31/7088		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全98頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2021-531369(P2021-531369)	(71)出願人	521234869		
(86)(22)出願日	令和1年11月27日(2019.11.27)		ペダニウス・セラビューティクス・リミテッド		
(85)翻訳文提出日	令和3年7月28日(2021.7.28)		イギリス・S K 1 0・4 T G・チェシャ		
(86)国際出願番号	PCT/GB2019/053354		ー・マックルズフィールド・アルダリー		
(87)国際公開番号	WO2020/109792		・パーク・バイオハブ		
(87)国際公開日	令和2年6月4日(2020.6.4)	(74)代理人	100108453		
(31)優先権主張番号	1819399.5		弁理士 村山 靖彦		
(32)優先日	平成30年11月28日(2018.11.28)	(74)代理人	100110364		
(33)優先権主張国・地域又は機関	英国(GB)		弁理士 実広 信哉		
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA, RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR, GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く	(74)代理人	100133400		
			弁理士 阿部 達彦		
		(72)発明者	マーティン・キベル		
			イギリス・S K 1 0・4 T G・チェシャ		
			ー・マックルズフィールド・アルダリー		
			最終頁に続く		

(54)【発明の名称】 抗菌アンチセンス剤

(57)【要約】

本発明は、グラム陰性菌感染の処置のための改善されたアンチセンス剤に関する。本発明の化合物は、増強された透過性を介して細菌細胞への流入を改善するために、抗生物質補助転移；A A Tプラットフォームを利用し、アンチセンス剤の改善された細胞内曝露及び感染の優れた処置を提供する。

【化 3】



10

R₁ 及び R₆ は、それぞれ独立して：

H、C₁－6 アルキル、C₁－6 置換アルキル、C₃－8 シクロアルキル、C₃－8 置換シクロアルキル、フェニル及びベンジルからなる群から選択され；

R₂ 及び R₃ は、それぞれ独立して：

H、C₁－6 アルキル、C₁－6 置換アルキル、C₃－8 シクロアルキル、C₃－8 置換シクロアルキル、フェニル及びベンジルからなる群から選択され、又は両方はそれらが結合する炭素原子と一緒に、3、4、5又は6個の炭素原子を含む環を形成し；

20

R₄ 及び R₅ は、それぞれ独立して：

H、C₁－6 アルキル、C₁－6 置換アルキル、C₃－8 シクロアルキル、C₃－8 置換シクロアルキル、フェニル及びベンジルからなる群から選択され、又は両方はそれらが結合する炭素原子と一緒に、3、4、5又は6個の炭素原子を含む環を形成し；

あるいは

R₂ 及び R₄ は、それらが結合する隣接する炭素原子と一緒に、3、4、5又は6個の炭素原子を含む環を形成し；R₃ 及び R₅ は、それぞれ独立して、H、C₁－6 アルキル、C₁－6 置換アルキル、C₃－8 シクロアルキル、C₃－8 置換シクロアルキル、フェニル及びベンジルからなる群から選択され、又は両方はそれらが結合する炭素原子と一緒に、3、4、5又は6個の炭素原子を含む環を形成し；

30

R₇、R₈ 及び R₉ は、それぞれ独立して：

H、アセチル、ベンゾイルからなる群から選択され；

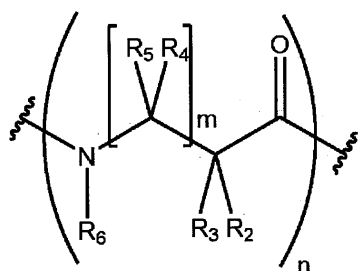
R₁₀ は：

メチル、エチル、プロピルからなる群から選択され；

m は、0 又は 1 又は 2 であり；

n は、0 又は 1 又は 2 又は 3 又は 4 であり、n が 2、3 又は 4 である場合、各

【化 4】



40

残基は、独立して選択され；

p は、0 又は 1 であり；

50

q は、0 又は 1 である)。

【請求項 2】

前記アンチセンスが、ホスホロジアミデートモルホリノオリゴヌクレオチド (PMO) 又はペプチド核酸 (PNA) である、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 3】

p が 1 である、請求項 1 又は請求項 2 に記載の化合物。

【請求項 4】

R₁ が、H、C₁ - 6 アルキル、及び C₁ - 6 置換アルキルからなる群から選択される、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 5】

R₁ が H である、請求項 3 に記載の化合物。

【請求項 6】

R₁ が Me である、請求項 3 に記載の化合物。

【請求項 7】

p が 0 である、請求項 1 又は請求項 2 に記載の化合物。

【請求項 8】

n が 1 である、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 9】

R₂ 及び R₃ の一方が H であり、他方が C₁ - 6 アルキルである、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の化合物。

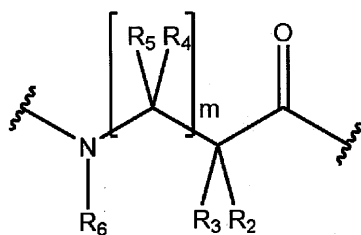
【請求項 10】

m が 0 であり、R₄ 及び R₅ が存在しない、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 11】

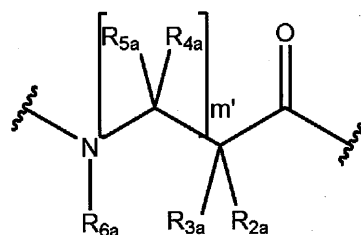
n が 2 であり、1 つの

【化 5】



残基が

【化 6】



であり、R_{2a}、R_{3a}、R_{4a}、R_{5a}、R_{6a} 及び m' が、請求項 1 に記載されるような部分 R₂、R₃、R₄、R₅、R₆ 及び m と同じそれぞれの定義を有する、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 12】

R₂ 及び R₃ の一方は H であり、他方は C₁ - 6 アルキルであり、R_{2a} 及び R_{3a} が、それぞれ H である、請求項 11 に記載の化合物。

【請求項 13】

m が 0 である、請求項 11 又は請求項 12 に記載の化合物。

【請求項 14】

m' が 2 である、請求項 11 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 15】

R_{4a} 及び R_{5a} が H である、請求項 11 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 16】

R_{6a} が H である、請求項 11 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の化合物。

10

【請求項 17】

R₆ が H である、請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の化合物。

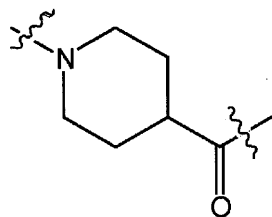
【請求項 18】

q が 1 である、請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 19】

L₂ が構造：

【化 7】



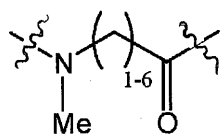
20

を有する、請求項 1 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 20】

L₂ が構造：

【化 8】



30

を有する、請求項 1 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 21】

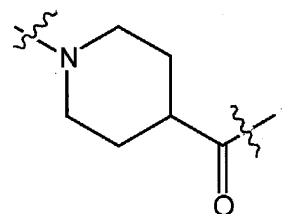
q が 0 である、請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 22】

n が 1 であり、m が 0 であり、R₆ が H であり、R₂ が H であり、R₃ が Me であり、p が 1 であり、R₁ が H 又は Me であり、q が 1 であり、L₂ が構造：

40

【化 9】



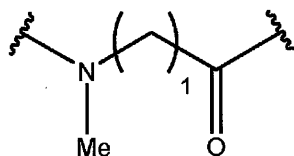
50

を有する、請求項 1 又は請求項 2 に記載の化合物。

【請求項 2 3】

n が 1 であり、 m が 0 であり、 R_6 が H であり、 R_2 が H であり、 R_3 が Me であり、 p が 1 であり、 R_1 が H 又は Me であり、 q が 1 であり、 L_2 が構造：

【化 1 0】



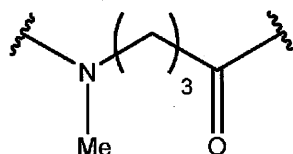
10

を有する、請求項 1 又は請求項 2 に記載の化合物。

【請求項 2 4】

n が 1 であり、 m が 0 であり、 R_6 が H であり、 R_2 が H であり、 R_3 が Me であり、 p が 1 であり、 R_1 が H 又は Me であり、 q が 1 であり、 L_2 が構造：

【化 1 1】



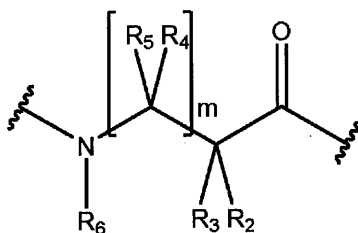
20

を有する、請求項 1 又は請求項 2 に記載の化合物。

【請求項 2 5】

p が 0 であり、 n が 2 であり、 q が 0 であり、1 つの

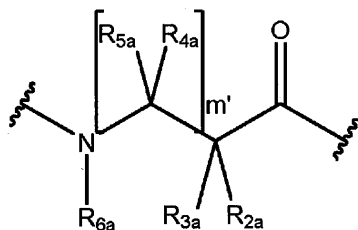
【化 1 2】



30

残基が

【化 1 3】



40

であり、 R_{2a} 、 R_{3a} 、 R_{4a} 、 R_{5a} 、 R_{6a} 及び m' が、請求項 1 に記載されるような部分 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 及び m と同じそれぞれの定義を有する、請求項 1

50

又は請求項 2 に記載の化合物。

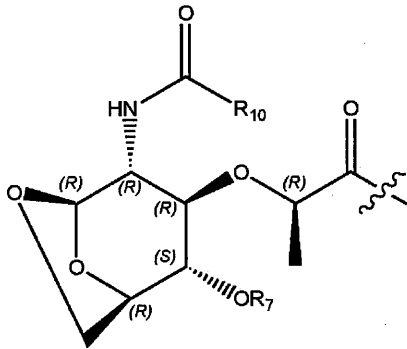
【請求項 26】

R₂ 及び R₃ が、それぞれ独立して、H 及び C₁ – 6 アルキルからなる群から選択され、R_{2a} 及び R_{3a} が、それぞれ H であり、R₄、R₅、R_{4a} 及び R_{5a} が、それぞれ H であり、m が 0 であり、m' が 2 であり、R₆ が H であり、R_{6a} が H である、請求項 25 に記載の化合物。

【請求項 27】

前記糖が

【化 14】



である、請求項 1 ～ 26 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 28】

前記アンチセンスが、以下からなる群から選択される配列を含む、請求項 1 ～ 27 のいずれか 1 項に記載の化合物。

10

20

30

40

50

【表 1】

表1A: 例示的な抗生物質耐性標的配列		
標的遺伝子	アンチセンス配列(5'-3')	配列ID
NDM-1	TCA AGT TTT CC	1
NDM-1	TCC TTT TAT TC	2
NDM-1	CCA TCA AGT TT	3
NDM-1	GGC AAT TCC AT	4
adeA	ATA CTG TCC AA	5
OmpA	CAT GGA TAT CC	6
AcrA	ATG TAA ACC TC	7
AcrA	GTT CAT ATG TA	8
AcrA	ACC CCT CTG TT	9
AcrA	TGT TCA TAT GT	10
AcrB	GTC TTA ACG GC	11
AcrB	AGG CAT GTC TT	12
AcrB	TAG GCA TGT CT	13
AcrR	TAT GTT CGT GA	14
TolC	TTC ATT TGC AT	15
TolC	ATT CCT TGT GG	16
TolC	TTT GCA TTC CT	17
KPC	GAT ACA GTG AC	18
KPC 1-4	AAC GAT ATT CC	19

10

20

30

40

50

【表 2】

表1B; 例示的なバイオフィーム形成標的配列		
標的遺伝子	アンチセンス配列(5'-3')	配列ID
cepl	AAG GTC TGC AT	20
cepl	TCG GAT CTG TG	21
cepl	CAT GGA TGT CC	22
cepl	CGT GAA CGA AG	23
cepl	CGT GTG GCA AC	24
cepl	GCC CGA GAT CC	25
cepl	CTT TCG TTC GC	26
suhB	ATG CAT GAG CC	27
suhB	GGA TGC ATG AG	28
CsuE	TTA TAT TCA TGG	29
CsuE	TCA TGG CAA AG	30
CsuE	TTT CCT GTC AA	31
SecA	TTG CCA ACA TG	32
PglL	CAT TAC CCA AG	33
PilU1	TTA AAA TCC AT	34
AlgZ	TAG GCA TCG AC	35
AlgU	AAA GCT CCT CT	36
LasR	AGG CCA TAG CG	37
FleR	TTA CTC CTG AA	38
PelF	TTC GGT CAT GT	39

10

20

30

40

50

【表 3】

表1C: 例示的な脂肪酸生成関連標的配列		
標的遺伝子	アンチセンス配列(5'-3')	配列ID
acpP	GTC CAT TAC CC	40
acpP	CAT TAC CCC TC	41
acpP	CCA TTA CCC CT	42
acpP	TCC ATT ACC CC	43
acpP	TGT CCA TTA CC	44
acpP	TTG TCC ATT AC	45
acpP	GTT GTC CAT TA	46
acpP	TGT TGT CCA TT	47
acpP	ATG TTG TCC AT	48
acpP	TTT ACA AGT GC	49
acpP	CCT CCG AGG GA	50
acpP	ACA CGT TGT TC	51
acpP	AGT TCA GCG AC	52
acpP	CTC ATA CCT TG	53
acpP	TGC TCA TAC TC	54
acpP	CTC ATA CTC T	55
acpP	CTC ATA CTA T	56
acpP	CTT CGA TAG TG	57
acpP	ATA TCG CTC AC	58
acpP	ATT CTC CTC AT	59
acpP	CAC AGG AAT TC	60
acpP	CAT TGC TTG TG	61
acpP	CAT ACC TTG TT	62
acpS	TTG CCA TTA GC	63
acp-E	CTG TAG TGA TTT CAC CA	64
fabA	TTA TCT ACC AT	65
fabB	CGT TTC ATT AA	66
fabB	GCA CGT TTC AT	67
fabI	AGA AAA CCC AT	68
fabI	GCT TTA ATC C	69
fabI	CCC ATA GCT T	70
fabI	CAT GTA AGA T	71
fabI	AGA TAA CTC C	72
gapA	TTG ATA GTC AT	73
accA	GCT TTT TTC AT	74
accA	AGG CTT CCG TC	75
fabD	GTC ATG TTT T	76
inhA	GTC ATT TGG T	77
inhA	CAT TTG GTG ACT	78

10

20

30

40

50

【表 4】

表1D; 他の経路又は細胞プロセスに関連した例示的な標的配列		
標的遺伝子	アンチセンス配列(5'-3')	配列ID
RpoD	TCA TCT TTG CT	79
RpoD	TTT TGC TCC AT	80
PoiB	AGT AAC TCC AC	81
murA	TTT ATC CAT TG	82
rpsJ	GCA TTT GAC CT	83
rpsJ	TAG ACA TAC CA	84
rpsJ	TAC CAG TAA AC	85
rpsJ	TGG TTC TGC AT	86
rpsJ	CCT CAG ACT CC	87
rpsJ	GCA TTT GAC CT	88
ftsZ	AGT TTC TCT CC	89
ftsZ	GTT CAA ACA TA	90
ftsZ	TCA AAT GAG GC	91
ftsZ	AAT GAG GCC AT	92
ftsZ	ATA GTT TCT CTC C	93
gyrA	CGC TCA TCT AA	94
gyrA	CTA TAC ATA GAC	95
gyrA	GCC ATC TCG GAC ATC	96
gyrA	ATA CCA GGT GTT ATC T	97
dnaB	TTC CTG CCA TA	98
LpxC	TTT GAT CAT CG	99
LpxC	TGT TTG ATC AT	100
LpxC	TGT TTC ACC AT	101
LpxC	GTT GTT TGA TC	102
23S rRNA	AGT GCT CTA CC	103
23S rRNA	GCC TGT TAT CC	104
16S rRNA	CCA TGC AGC AC	105
16S rRNA	TTG CGC TCG TT	106
16S rRNA	GGC TGC TGG CA	107
fmbB	CCA TGA AAA A	108
polA	TTC ATG CCT GT	109
murA	ATC CAT TTA GT	110
murA	CAT TTA GTT TG	111
murA	AAT TTA TCC AT	112
murA	AAA TTT ATC CA	113
rpmB	ACT CGG GAC AT	114
rpmB	CTA TTC TCC AA	115
rpmB	GGC AGA CTC GG	116
rpmB	CTT AGA CAT GG	117
adk	ATG ATA CGC AT	118
adk	AGT GCC CTC C	119
infA	TCT TTG GCC AT	120

【表 5】

表1D; 他の経路又は細胞プロセスに関連した例示的な標的配列		
標的遺伝子	アンチセンス配列(5'-3')	配列ID
aroC	TTT CCA GCC AT	121
aroC	TTC CCT GCC AT	122
murF	ACG CTA ATC AT	123
murF	ACC TCC CAG GC	124
kdtA	AAT TCG AGC AT	125
boxA	TGT TTA AGA GC	126
boxA	CTC TTA ATG AT	127
boxC	ATC CAC CAC AG	128
rpoD-E	CTT GTA ACC ACA CCA	129
rpoD-E	TCC ACC AAG TCA CCA	130
pryC	GGT GCA GTC AT	131
pryC	AGA GTT CAA GG	132
pryA	GAC TTA ATC AA	133
lgt	CTA CTG GTC AT	134
folA	CAT TGA GAT TT	135
infB	ACA TCT GTC AT	136
nrdA	TTC TGA TTC AT	137
nrdB	GTA TAT GCC AT	138
zipA	TCC TGC ATC AT	139
caoA	ATA TAC CTC AT	140
gyrA-E	GTT ACC CTG ACC GAC CA	141
gyrA-E	GTT ACC CTG ACC ACC A	142
mrdA	TGT TTC ATA CG	143
LpxB	GGT TTG CCA AG	144
LpxB	TAA TCC GTC AG	145
carA	GGT GCT CAA AC	146
adeA	ATA CTG TAA AA	147
blaT	CTC TTC CTT TT	148
crml	TCC TTC TGA TT	149
folP	ATG TTA TCC C	150
fmhB	CCA TGA TTT A	151
hmrB	TCC ACG TCG A	152
rpmB	GTC TAT TCT CC	153
rpmB	GAC ATG TCT AT	154
hmrB	TCC ACG TCG A	155
FabG	TTC TCT CCT TT	156
RpmB	CTC TAG ACA TG	157
WaaC	AGC ACC CTC AT	158
MryA	TGA CTC TCC TC	159
MurC	CCA CCT CCA GG	160
LpxA	ATC AAA CTC AT	161
WaaG	GCC AGG GTC AT	162
WaaA	GTACGG TTC AT	163
murB	CAG TCG CCC CT	164
murE	AGG CTC ATA GG	165
AccB	CTA GCA CTC CC	166
FabZ	ATG TCC ATC AT	167
MurG	GCA AAG TCC TC	168
AmpR	GTC GAA CCA AT	169
LepB	ATT GAG TGT CAT	170
LptD	TGC CAT CTT GTT	171
MraY	CAG GAG CAT TAG	172

10

20

30

40

【請求項 29】

医薬として使用するための、請求項 1～28 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 30】

請求項 1～28 のいずれか 1 項に記載の化合物と、薬学的に許容されるか又は獣医学的に許容される希釈剤、賦形剤及び／又は担体とを含む、医薬組成物又は獣医学組成物。

【請求項 31】

細菌感染の処置に使用するための、請求項 1～28 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 32】

多剤耐性 (MDR) 感染の処置に使用するための、請求項 1～28 のいずれか 1 項に記載

50

の化合物。

【請求項 33】

グラム陰性菌感染の処置に使用するための、請求項 1～28 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 34】

有効量の任意の他の抗生物質と組み合わせて治療薬として使用するための、請求項 1～28 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、細菌感染、特にグラム陰性菌感染における毒性、抗生物質耐性、バイオフィルム形成又は必須の増殖及び生存プロセスに寄与する遺伝子を標的とするアンチセンスオリゴマーを含む化合物に関する。本発明は、細菌感染の単剤療法処置において、又は既知の抗生物質との組み合わせの使用を通じて、細菌感染に対する改善された臨床的に意味のある活性（最小阻害濃度；MIC）を付与するのに有用なアンチセンスオリゴマーを含む化合物に関する。特定の理論に束縛されるものではないが、本発明の化合物は、細菌細胞において、アンチセンスオリゴマーの細胞内濃度が、アンチセンスオリゴマー単独の使用によって達成され得るものよりも高くなり得る。本発明の化合物は、増強された透過性を介して細菌細胞への増加した流入を付与する抗生物質補助転位（AAT）部分を含む。本発明の化合物は、アンチセンスオリゴマーを単独で投与することによって達成される細胞内曝露と比較して、アンチセンスオリゴマーの細胞内曝露を改善し得る。本発明の化合物は、アンチセンスオリゴマー単独での処置と比較して、細菌感染の処置を改善し得る。

【背景技術】

【0002】

薬剤耐性菌感染は、既に世界的で毎年かなりの数の死亡の原因となっており、新しい治療アプローチと新しい抗菌薬の開発がますます緊急の要求となっている。これらの薬剤耐性感染のうち、エンテロバクター（Enterobacter）種、アシネトバクター・バウマンニ（Acinetobacter baumannii）、シュードモナス・エルジノーサ（Pseudomonas aeruginosa）及びクレブシエラ・ニューモニエ（Klebsiella pneumoniae）のようなMDRグラム陰性病原体によって引き起こされるものは、最も深刻な健康上の脅威の1つである。現在、多くのグラム陰性菌は、かなりの数の古い及び現在の抗生物質に耐性であり、処置が困難な感染を引き起こす可能性がある。

【0003】

ヒト疾患及び感染の処置に対する新しい治療アプローチは、プラスの治療エンドポイントを提供するために、遺伝子レベルでタンパク質生合成を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチド（ASO）の使用によるものである。これらの原理に基づいた多くの製品、例えば、ホミビルセン（登録商標）（免疫不全患者のサイトメガロウイルス網膜炎（CMV）の処置に使用されたアンチセンス抗ウイルス薬）、キナムロ（登録商標）（ホモ接合性家族性高コレステロール血症の処置に使用された）、及びアリカフォルセン（登録商標）（ヒトICAM-1タンパク質の産生のためのmRNAを標的とし、肺炎に適應される）が、使用について承認されている。

【0004】

細菌の増殖、生存、又は耐性機構の発達に不可欠な遺伝子産物を標的とするASOの使用による細菌感染の処置は、莫大な潜在能力を保持している（例えば、（i）Bai, H. et al., Curr. Drug Disc. Tech., 7, 76-85, 2010；（ii）Hatamoto, M. et al., Appl. Microbiol. Technol., 86, 397-402, 2010；（iii）Geller, B. L. et al., J. Infec. Dis., 208, 1553-1560, 2013；（iv）Good, L. & Stach, E. M., Frontier microbiol.,

10

20

30

40

50

2, 185, 2011; (v) Hansen, A. M. et al., *Bioconj. Chem.* 27 (4), 863–7, 2016; (vi) Sully, E. K. & Geller, B. L. *Curr. Opin. Microbiol.*, 33, 47–55, 2016; (vii) Hegarty, J. P. & Stewart Sr, D. B. *Appl. Microbiol. & Biotech.* 102 (3), 1055–65, 2018; (viii) Geller, B. L. et al., *J. Antimicrob. Chemotherapy*, 73, 1611–1619, 2018; (ix) Howard, J. J. et al., *Antimicrob. Agents & Chemotherapy*, 61 (4), 2017; (x) 国際公開第2015/032968号パンフレット; (xi) 国際公開第2015/175977号パンフレット; (xii) 国際公開第2015/179249号パンフレット; (xiii) 国際公開第2016/108930号パンフレット; (xiv) 国際公開第2017/112885号パンフレット; (xv) 国際公開第2017/112888号パンフレットを参照されたい)。

10

20

30

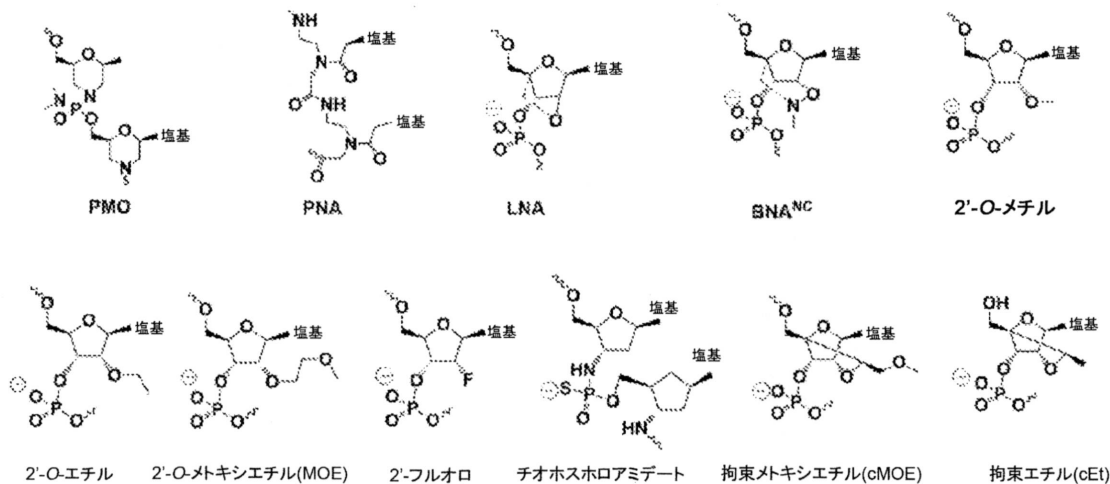
40

50

【0005】

天然オリゴヌクレオチドは、エンドヌクレアーゼ及びエキソヌクレアーゼによって全身循環において迅速に分解される。したがって、ASOの技術は、天然オリゴヌクレオチド糖の修飾及び各モノマー単位内の結合を介してヌクレアーゼに対するそれらの安定性を改善するために、多くの反復（世代）を通して進化してきた（スキーム1参照）。細菌ASOの分野では、PMO（ホスホロジアミデートモルホリノ）及びPNA（ペプチド核酸）修飾オリゴヌクレオチドが広く探求されている。

【化1】



スキーム1. ASO配列に利用される修飾オリゴヌクレオチドモノマー単位

【0006】

その治療効果を発揮するためには、細菌ASOは、細菌の膜を浸透し、細胞質に通過する必要がある。細菌は、真核細胞とは異なり、核膜を有さない細菌核様体に位置する二本鎖DNAを有する。細菌におけるRNA転写及びタンパク質合成は、細胞質においてプロセシングされ、したがって、この細胞内コンパートメントに到達するアンチセンスオリゴマーは、それらの効果を発揮し得る。天然及び修飾ASOは、これを達成するために必要とされる生理化学的特性を有しておらず、現在、ASOの実質的に全ての細胞内送達は、細胞浸透ペプチド(CPP)シグナルの付着を必要とする。歴史的に、CPPは、ショウジョウバエアンテナペディア(*Drosophila Antennapedia*)遺伝子に由来する16残基ペプチドであるHIV-TATタンパク質又はペネトラチン由来の起源を有する小さな高度に荷電したペプチドシグナル(長さ6~20+アミノ酸)である(例えば、(i) McClorey, G & Banerjee, S., *Biomedicin*

es, 6 (2), E51, 2018; (ii) Shiraiishi, T and Nielsen, P. E. Methods Mol. Biol., 1050, 193-205, 2014を参照されたい)。効果的ではあるが、一般に、CPPは、非判別的であり、CPPに付着したアンチセンスカーゴは、多くの組織及び細胞に送達され、対象となる疾患に対する毒性及び低い治療ウィンドウをもたらす。したがって、CPP-ASOに対する毒性の機構は、非意図的RNAの相補的領域へのASOの結合により潜在的に生じ得る、健康な細胞におけるハイブリダイゼーション依存性のオフターゲット効果である。このオフターゲット毒性は、相補的領域の数が許容されるミスマッチと共に劇的に増加するので、さらに重要な考慮事項となる（例えば、Yoshida, T. et al., Gene Cells, 23 (6), 448-455, 2018を参照されたい）。したがって、健康なヒト細胞への細胞内曝露を最小限に抑え、それによって望ましくないオフターゲット効果の可能性を有意に低減しながら、バクテリアへの細菌ASOの優先的な送達を改善する方法は、最新技術に大きな進歩をもたらすであろう。

10

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0007】

本明細書に詳述される細菌取込み機構は、天然に存在する糖、即ち、乳酸及びN-アセチルグルコサミンのエーテルであり、グラム陰性菌の細胞壁ペプチドグリカンの骨格を形成する際の重要な要素であるN-アセチルD-ムラミン酸 (MurNAc)、並びに環状変異体、即ち1, 6-アンヒドロ-N-アセチルムラミン酸 (anhMurNAc) を利用する。直接的又はリンカーを介して間接的にこれらの糖をASOに化学的に付着させることにより、本明細書で「AAT ASO」又は「AATアンチセンス剤」と呼ばれる本発明の化合物が提供される。AATアンチセンス剤は、親ASOを放出するために細菌内の細胞質に基づく酵素を必要とするため、低いレベルの親ASOのみ末梢循環中に存在する。また、CPPシグナルペプチドは本明細書で使用されないので、本明細書に詳述されるAAT ASOは、健康な哺乳動物細胞への非常に限定された浸透を有し、したがって有益な毒性プロファイルのための劇的に改善された機会を有する。最も有効なAATアンチセンス剤は、主に細菌内でASOの細胞内曝露を提供することを目的とするので、これは本発明の重要な局面である。

20

【0008】

細菌アンチセンス配列は、糖部分に直接的又はリンカーを介して間接的にコンジュゲートされ（即ち、化学的に結合され）、それによってAATアンチセンス剤を提供する。AATアンチセンス剤は、グラム陰性菌の細胞質への細菌膜を横切る選択的取込みを示す可能性がある。AATアンチセンス剤の設計に依存して、親アンチセンスオリゴマーは、続いて、選択的リガーゼ及び／又はアミダーゼによって触媒される細菌酵素プロセスによって切断され、そして放出され得る。あるいは、完全なAAT ASO構築物が無傷のままであり、そして類似又は同等のアンチセンス活性を誘発し得る（例えば、Bai, H. et al.の同書を参照されたい（ここで、CPP-ASOは、親ASOに対して完全な効力を保持した））。

30

【0009】

本発明のAAT ASO化合物は、細菌の増殖及び生存に必須であるタンパク質産物を産生する遺伝子を標的とする場合、固有の抗菌活性を有し得る。あるいは、本発明のAAT ASOは、さもなければ有効な抗菌薬に対する耐性機構として進化したタンパク質産物を産生する細菌遺伝子を標的とし得る。この例では、AAT ASOと既存の抗生物質との併用投与は、細菌の耐性機構のアンチセンス阻害を同時に行うことにより、抗生物質の抗菌活性を改善する可能性がある。

40

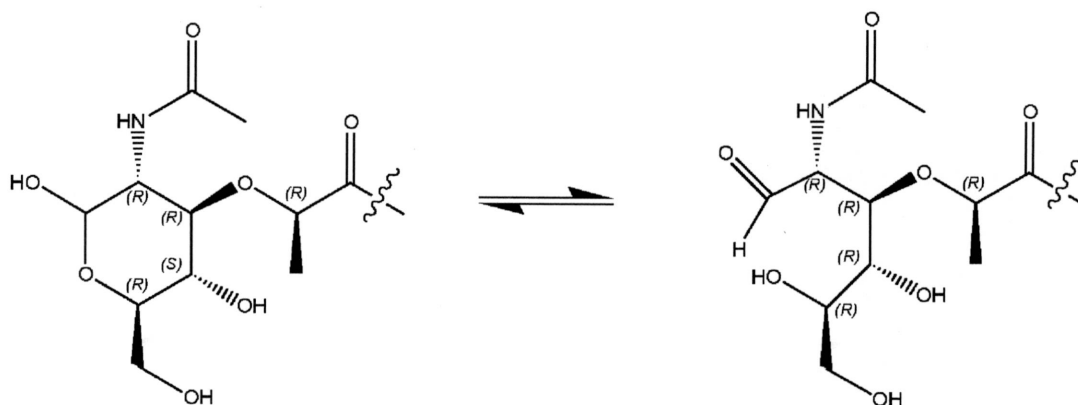
【0010】

本発明の化合物（AAT ASO剤）の糖部分は、開放又は環状（閉鎖）形態を含む、糖の任意の互変異性 (tautomeric) 形態であり得る。溶液中で糖基がそれらの開放鎖非環状形態と閉鎖環状形態との間で平衡状態で存在することが当業者には理解され

50

るであろう。例えば、本発明における目的の1つの糖であるN-アセチルムラミン酸は、互変異性平衡に示される形態で存在する（スキーム2）。本発明の範囲内には、開放環状又は閉鎖環状形態の両方、又は2つの形態の間の平衡状態にある化合物が含まれる。A A T A S O 剤が一方の形態で示される場合、他方の互変異性形態、並びに平衡状態にある開放及び閉鎖形態の両方を含むことが意図される。

【化2】



10

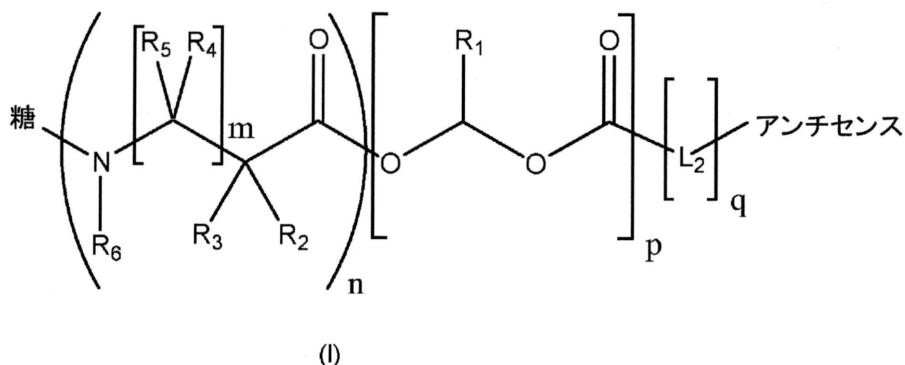
20

スキーム2

【0011】

本発明の第1の態様は、一般式（I）の化合物、及びその薬学的に許容される塩に関する。

【化3】



30

（式中、

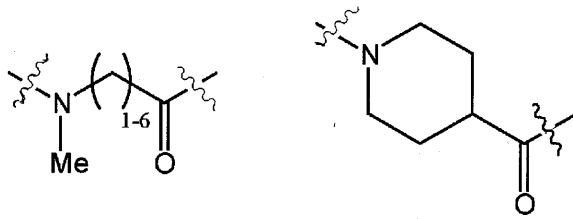
アンチセンスは、天然、人工及び／又は修飾核酸塩基を有するオリゴヌクレオチドであり、オリゴヌクレオチドは、ホスホジエステルオリゴヌクレオチド（PDO）、ホスホロチオエートオリゴヌクレオチド（PSO）、ホスホロジアミデートモルホリノオリゴヌクレオチド（PMO）、ペプチド核酸（PNA）、ロックド核酸（LNA）、2'-O-アルキルオリゴヌクレオチド（2'-O-Me、2'-O-Et、2'-O-メトキシエチル）及びそれらの組み合わせからなる群から選択され、オリゴヌクレオチドは、アンチセンス配列内に存在する末端アミノ基を介して式Iの分子の残りの部分に結合され；

40

L₂は、アンチセンス配列内に存在する末端アミノ基への化学結合及び式Iの分子の残りの部分の末端カルボニルへの第2の化学結合を形成するスペーサーであり、以下からなる群から選択され：

50

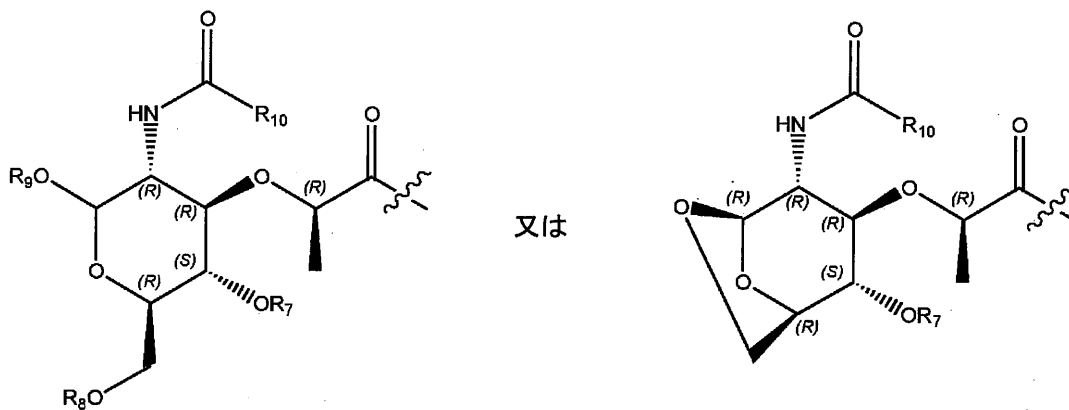
【化 4】



10

糖は、下記の構造を有する N-アシルムラミン酸又は 1,6-アンヒドロ-N-アシルムラミン酸のアシル断片の任意の互変異性形態であり：

【化 5】



20

R₁ 及び R₆ は、それぞれ独立して：

H、C₁ - 6 アルキル、C₁ - 6 置換アルキル、C₃ - 8 シクロアルキル、C₃ - 8 置換シクロアルキル、フェニル及びベンジルからなる群から選択され；

30

R₂ 及び R₃ は、それぞれ独立して：

H、C₁ - 6 アルキル、C₁ - 6 置換アルキル、C₃ - 8 シクロアルキル、C₃ - 8 置換シクロアルキル、フェニル及びベンジルからなる群から選択され、又は両方はそれらが結合する炭素原子と一緒にあって、3、4、5又は6個の炭素原子を含む環を形成し；

R₄ 及び R₅ は、それぞれ独立して：

H、C₁ - 6 アルキル、C₁ - 6 置換アルキル、C₃ - 8 シクロアルキル、C₃ - 8 置換シクロアルキル、フェニル及びベンジルからなる群から選択され、又は両方はそれらが結合する炭素原子と一緒にあって、3、4、5又は6個の炭素原子を含む環を形成し；

あるいは

R₂ 及び R₄ は、それらが結合する隣接する炭素原子と一緒にあって、3、4、5又は6個の炭素原子を含む環を形成し；R₃ 及び R₅ は、それぞれ独立して、H、C₁ - 6 アルキル、C₁ - 6 置換アルキル、C₃ - 8 シクロアルキル、C₃ - 8 置換シクロアルキル、フェニル及びベンジルからなる群から選択され、又は両方はそれらが結合する炭素原子と一緒にあって、3、4、5又は6個の炭素原子を含む環を形成し；

40

R₇、R₈ 及び R₉ は、それぞれ独立して：

H、アセチル、ベンゾイルからなる群から選択され；

R₁₀ は：

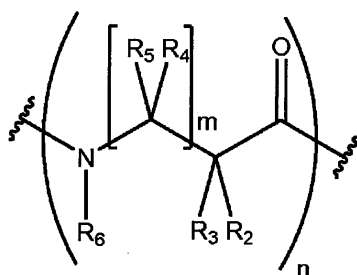
メチル、エチル、プロピルからなる群から選択され；

m は、0 又は 1 又は 2 であり；

n は、0 又は 1 又は 2 又は 3 又は 4 であり、n が 2、3 又は 4 である場合、各

50

【化 6】



10

残基は、独立して選択され；

p は、0 又は 1 であり；

q は、0 又は 1 である。）

【0012】

本発明の第 2 の態様は、医薬として使用するための本発明の化合物に関する。

【0013】

本発明の第 3 の態様は、本発明の化合物と、薬学的に許容され又は獣医学的に許容される希釈剤、賦形剤及び／又は担体とを含む、医薬又は獣医学的組成物に関する。

【0014】

20

本発明の第 4 の態様は、細菌感染の処置に使用するための本発明の化合物に関する。

【0015】

本発明の第 5 の態様は、多剤耐性（MDR）細菌感染の処置に使用するための本発明の化合物に関する。

【0016】

本発明の第 6 の態様は、グラム陰性菌感染の処置に使用するための本発明の化合物に関する。そのようなグラム陰性菌感染は、多剤耐性（MDR）グラム陰性菌感染である可能性がある。

【0017】

本発明の第 7 の態様は、任意の他の抗生物質と組み合わせて治療薬として使用するための本発明の化合物に関する。

30

【0018】

本発明の第 8 の態様は、治療有効量の本発明の化合物を、それを必要とする対象に投与することを含む、細菌感染を処置する方法に関する。

【0019】

本発明の第 9 の態様は、治療有効量の本発明の化合物を、それを必要とする対象に投与することを含む、多剤耐性（MDR）細菌感染を処置する方法に関する。

【0020】

本発明の第 10 の態様は、グラム陰性菌感染を処置する方法に関し、該方法は、治療有効量の本発明の化合物を、それを必要とする対象に投与することを含む。このようなグラム陰性菌感染は、多剤耐性（MDR）グラム陰性菌感染である可能性がある。

40

【0021】

本発明の第 11 の態様は、多剤耐性（MDR）細菌内（例えば、MDR グラム陰性菌内）でのアンチセンスオリゴヌクレオチドの優先的な蓄積を標的とするために本発明の化合物を使用することによって、アンチセンスオリゴヌクレオチドへの全身曝露に関連する有害な副作用を減少させる方法に関する。

【0022】

本発明の第 12 の態様は、治療有効量の本発明の化合物を対象に静脈内投与することを含む方法を提供する。

【0023】

50

本発明の第13の態様は、肝循環における通過及び代謝の前に、細菌感染組織への直接分布を提供する本発明の化合物の静脈内投与に関する。

【0024】

本発明の第14の態様は、他の哺乳動物細胞及び組織と比較した場合、グラム陰性病原体感染細胞における本発明の化合物の優先的な蓄積を提供する。

【0025】

本発明の第15の態様は、本発明による化合物を、既存の抗生物質と組み合わせて、さもないれば既存の抗生物質について観察される最適な薬物動態学的－薬力学的関係の有利な変化に向かって使用することに関する。

【図面の簡単な説明】

【0026】

【図1】参照化合物及び試験化合物による処置後のマウスにおける大腸菌（*E. coli*）（ATCC 25922）の $\text{Log}_{10}\text{CFU/g}$ 膀胱の散布図。縦棒及び横棒は、それぞれSD及び平均を表す。

【図2】参照化合物及び試験化合物による処置後のマウスにおける大腸菌（*E. coli*）（ATCC 25922）の $\text{Log}_{10}\text{CFU/g}$ 腎臓（左右腎臓プール）の散布図。縦棒及び横棒は、それぞれSD及び平均を表す。

【図3】参照化合物及び試験化合物による処置後のマウスにおける大腸菌（*E. coli*）（CFT073、ATCC（登録商標）700928（商標））の $\text{Log}_{10}\text{CFU/g}$ 膀胱の散布図。縦棒及び横棒は、それぞれSD及び平均を表す。

【図4】参照化合物及び試験化合物による処置後のマウスにおける大腸菌（*E. coli*）（CFT073、ATCC（登録商標）700928（商標））の $\text{Log}_{10}\text{CFU/g}$ 腎臓（左右腎臓プール）の散布図。縦棒及び横棒は、それぞれSD及び平均を表す。

【図5】参照化合物及び試験化合物による処置後のマウスにおける大腸菌（*E. coli*）（ATCC BAA-2340）の $\text{Log}_{10}\text{CFU/g}$ 膀胱の散布図。縦棒及び横棒は、それぞれSD及び平均を表す。

【図6】参照化合物及び試験化合物による処置後のマウスにおける大腸菌（*E. coli*）（ATCC BAA-2340）の $\text{Log}_{10}\text{CFU/g}$ 腎臓（左右腎臓プール）の散布図。縦棒及び横棒は、それぞれSD及び平均を表す。

【図7】参照化合物及び試験化合物による処置後のマウスにおける*A. baumannii*（ATCC 19606）の $\text{Log}_{10}\text{CFU/g}$ 肺の散布図。縦棒及び横棒は、それぞれSD及び平均を表す。

【発明を実施するための形態】

【0027】

定義：

本明細書で使用される場合、用語「アンチセンス」、「ASO」又は「オリゴマー」は、細菌の増殖、生存又は耐性機構の発達に必須であるタンパク質産物の産生を妨げるために、核酸塩基が核酸の構造を模倣し、且つ十分に特徴付けられたワトソン－クリック塩基対形成を介して細菌DNA又はRNAに結合することを可能にする、ヌクレオチド又はヌクレオチド類似体の線状配列を指す。用語「アンチセンス」、「ASO」又は「オリゴマー」はまた、5'-N-メチルグリシンアミドのような5'末端又は3'末端でコンジュゲートされた1つ以上の追加の部分を含む配列を包含する。典型的には、合成オリゴマーは、下記に示すようなPMO又はPNAと呼ばれる修飾配列である。

10

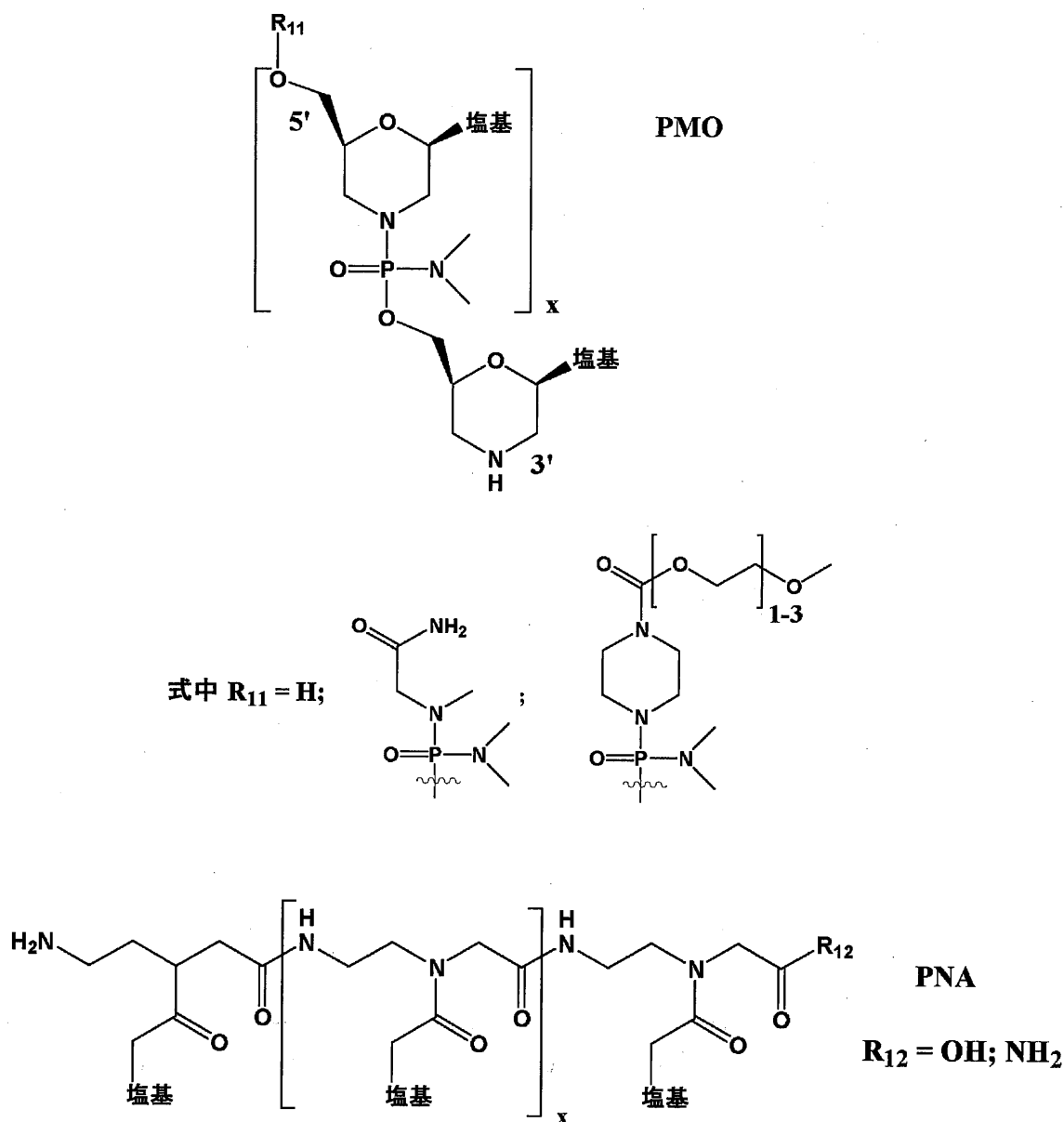
20

30

40

50

【化 7】



10

20

30

40

50

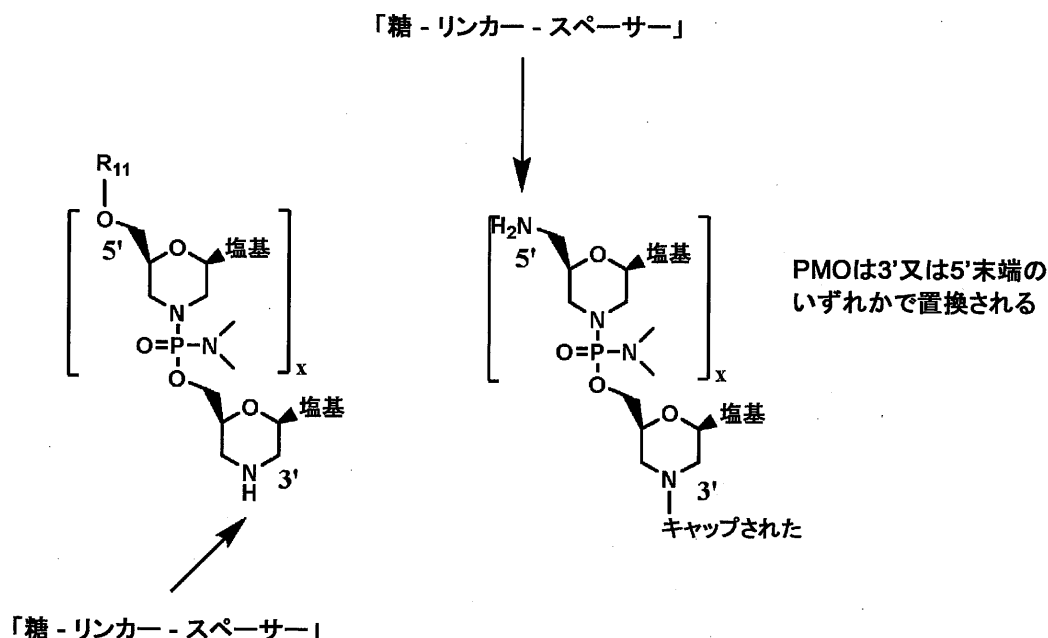
【0028】

当業者に明らかなように、アンチセンス配列は、従来の5' - 3' 方向で本明細書の表に提示される。アンチセンス配列の3' 末端又は5' 末端のいずれかは、末端アミノ基を介して本明細書に記載される分子（式Iの）の残りの部分に結合し得る。例えば、上記に示されたPMO構造において、モルホリノ基は、アンチセンス配列を本明細書に記載される分子の残りの部分に結合するために使用することができ、上記に示されたPNA構造において、左側末端アミノ基は、アンチセンス配列を本明細書に記載される分子の残りの部分に結合するために使用することができる。一実施形態では、末端アミノ基を介して本明細書に記載される（式Iの）分子の残りの部分に結合するのは、配列の3' 末端である。しかしながら、代替的な実施形態では、末端アミノ基を介して本明細書に記載される分子（式Iの）の残りの部分に結合するのは、配列の5' 末端である。5' 末端での結合を達成するために、5' - 第一級アミン（これは市販されている）で官能化されたASOを3' 末端でキャップして、3' 末端での反応を回避することができる。

【0029】

以下の概略図は、PMOが3' 末端又は5' 末端でどのように置換され得るかを示す：

【化 8】



10

20

【0030】

用語「抗生物質」、「抗菌剤 (antibacterial)」又は「抗菌剤 (antibacterial agent)」は、特に断らない限り、グラム陽性又はグラム陰性菌に対して抗菌活性を有する化合物のクラスのいずれかを指す。

【0031】

用語「スペーサー」は、特に断らない限り、「アンチセンス」を「リンカー」に化学的に結合する断片 (式 (I) の L_2) を指し、「リンカー」は、次に、化学結合が安定であり又は細胞内細菌酵素プロセスによって切断され得るように「糖」に結合される。

【0032】

用語「リンカー」は、特に断らない限り、「糖」を「スペーサー」に化学的に結合する断片を指し、「スペーサー」は、次に、化学結合が安定であり又は細胞内細菌酵素プロセスによって切断され得るように「アンチセンス」に結合される。

30

【0033】

用語「糖」は、特に断らない限り、「リンカー」に化学的に結合するアシル断片を指し、「リンカー」は、次に、化学結合が安定であり又は細胞内細菌酵素プロセスによって切断され得るように、「スペーサー」に化学的に結合し、「スペーサー」は、次に、「アンチセンス」に化学的に結合する。本明細書で、用語「糖」は、特に、N-アセチルD-ムラミン酸 (MurNAc)、1,6-アンヒドロ-N-アセチルD-ムラミン酸 (anhMurNAc)、及び一般式 I の範囲内のその単純なN-アシル変異体を指す。「糖」内の官能基の1つ以上は、保護され得る。適切なアミノ保護基としては、例えば、アセチル及びアジドが挙げられる。適切なヒドロキシ保護基としては、例えば、アセチル、ベンジル、ベンゾイル及びベンジリジンが挙げられる。

40

【0034】

用語「糖-リンカー」は、特に断らない限り、「糖」及び「リンカー」の化学結合によって形成され、次に「スペーサー-アンチセンス」に化学的に結合して、完全な「糖-リンカー-スペーサー-アンチセンス剤」を形成するアシル断片を指す。

【0035】

用語「糖-リンカー-スペーサー」は、特に断らない限り、「糖」及び「リンカー」及び「スペーサー」の化学結合によって形成されるアシル断片を指し、これは次に、「アンチセンス」に化学的に結合して、完全な「糖-リンカー-スペーサー-アンチセンス剤」を

50

形成する。

【0036】

本明細書で使用される場合、用語「アルキル」は、場合により置換されてもよい安定な直鎖及び分岐鎖脂肪族炭素鎖を含む。好ましい例としては、メチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピル、*n*-ブチル、イソブチル、*t*-ブチル、ペンチル、イソペンチル及びヘキシル並びにそれらの任意の単純な異性体が挙げられる。好ましくは、アルキル基は、C₁ - C₄ アルキル基である。アルキル基の置換基は、ハロゲン、例えばフッ素、塩素、臭素及びヨウ素、OH又はC₁ - C₄ アルコキシであってもよい。アルキル基の他の置換基を代わりに使用してもよい。アルキル基の他の置換基には、COOH及びNH₂（及びそれらの保護された類似体）が含まれる。

10

【0037】

本明細書で適用される「ハロゲン」又は「ハロ」は、F、Cl、Br、Iを包含する。

【0038】

本明細書で適用される「ヘテロ原子」は、O、S、P及びN、より好ましくは、O、S及びNを包含する。

【0039】

本明細書で使用される場合、用語「シクロアルキル」は、（一又は多）置換又は非置換であり得る環式アルキル基（即ち、炭素環式環）を指す。シクロアルキル基の置換基は、ハロゲン、例えば、フッ素、塩素、臭素及びヨウ素、OH、C₁ - C₄ アルキル又はC₁ - C₄ アルコキシであり得る。シクロアルキル基の他の置換基を代わりに使用してもよい。適切な置換基としては、例えば、1つ以上のハロ基が挙げられる。好ましくは、シクロアルキル基は、C₃ - C₆ シクロアルキルである。例としては、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシルなどが挙げられる。さらに、炭素環式環自体は、例えば、テトラヒドロフラン、ピロリジン、ピペリジン、ピペラジン又はモルホリンなどのヘテロシクロアルキル基を与えるために、1つ以上のヘテロ原子を場合により含んでもよい。

20

【0040】

芳香族基（例えば、フェニル及びベンジル）は、例えば、1つ以上のC₁ - C₆ アルコキシ、OH、COOH、COOMe、NH₂、NMe₂、NHMe、NO₂、CN、CF₃及び／又はハロ基によって場合により置換されてもよい。

30

【0041】

ヘテロ芳香族基は、例えば、1つ以上のC₁ - C₆ アルコキシ、OH、COOH、COOMe、NH₂、NMe₂、NHMe、NO₂、CN、CF₃及び／又はハロ基によって場合により置換されてもよい。

【0042】

本発明は、本発明の化合物の全ての塩、水和物、溶媒和物、複合体を含む。用語「化合物」は、文脈上別段の要求がない限り、そのような塩、水和物、溶媒和物、複合体及びプロドラッグの全てを含むことが意図される。

【0043】

本発明はまた、本発明の化合物の重水素類似体を含む（（a）Tung, R., “Deuterium medicinal chemistry comes of age”, Future Med. Chem., 8 (5), 491-4, 2016; (b) Uttamsingh, V. et al., “Altering metabolic profiles of drugs by precision deuteration”, J. Pharmacol. Exp. Ther., 354 (1), 43-54, 2015を参照されたい）。用語「化合物」は、文脈上別段の要求がない限り、全ての重水素類似体も含むことが意図される。

40

【0044】

Eur. J. Biochem., 158, 9-, 1984に記載されているように、IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical

50

Nomenclatureによって提示された一般的なガイドラインに従って、ペプチド及び化学分野で一般に使用される略語及び記号を本明細書で使用して、本発明の化合物を記載する。式(I)の化合物並びにそれらの調製に使用される中間体及び出発物質は、IUPAC命名規則に従って命名され、ここで、特徴的な基は、主な基としての引用の優先度が低下している。

【0045】

用語「AATアンチセンス剤」は、本明細書で使用される場合、表1A～表1Dに列挙されるアンチセンス配列を含む本発明の化合物を含むが、これに限定されず、「糖ーリンカーースペーサー」は、詳述される好ましい官能基を介して共有結合される。AATアンチセンス剤は、親アンチセンスを放出するために切断されるまで治療的に不活性であり得るか、又はそれ自体の固有の抗菌活性を保持し得る。

10

【0046】

用語「親アンチセンス」は、「糖ーリンカーースペーサー」を含まないAATアンチセンス剤のアンチセンスオリゴマー配列を指す。用語「親アンチセンス」、「親」及び「親化合物」は、本明細書では互換的に使用される。

【0047】

特に明記しない限り、用語「天然に存在する」は、天然に、例えば、細菌又は哺乳動物（例えば、ヒト）に存在することを指す。

【0048】

一実施形態において、用語「薬学的に許容される塩」は、アルカリ金属塩を形成し、遊離酸又は遊離塩基の付加塩を形成するために一般に使用される塩を包含する。塩の性質は、それが薬学的に許容されるならば重要ではない。適切な薬学的に許容される酸付加塩は、無機酸又は有機酸から調製され得る。このような無機酸の例は、塩酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、硝酸、炭酸、硫酸及びリン酸である。適切な有機酸は、脂肪族、脂環式、芳香族、芳香族、芳香脂肪族、複素環式、カルボン酸及びスルホン酸クラスの有機酸から選択することができ、その例は、ギ酸、酢酸（例えば、トリフルオロ酢酸）、プロピオン酸、コハク酸、グリコール酸、グルコン酸、乳酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸、アスコルビン酸、グルクロン酸、マレイン酸、フマル酸、ピルビン酸、アスパラギン酸、グルタミン酸、安息香酸、アントラニル酸、メシル酸、4-ヒドロキシ安息香酸、フェニル酢酸、マンデル酸、エンボン酸（パモ酸）、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、パントテン酸、2-ヒドロキシエタンスルホン酸、トルエンスルホン酸、スルファニル酸、シクロヘキシルアミノスルホン酸、ステアリン酸、アルギン酸、β-ヒドロキシ酪酸、サリチル酸、ガラクトール酸及びガラクトン酸である。適切な薬学的に許容される塩基付加塩としては、アルミニウム、カルシウム、リチウム、マグネシウム、カリウム、ナトリウム及び亜鉛から作製される金属塩、又はN,N'-ジベンジルエチレンジアミン、クロロプロカイン、コリン、ジエタノールアミン、エチレンジアミン、メグルミン（N-メチルグルカミン）及びプロカインから作製される有機塩が挙げられる。これらの塩は、例えば、別の実施形態では、適切な酸又は塩基を化合物と反応させることによって調製され得る。

20

30

【0049】

一実施形態では、用語「薬学的に許容される担体」は、0.01～0.1M、好ましくは、0.05Mリン酸緩衝液、又は別の実施形態では、0.8%生理食塩水を含むが、これらに限定されない。さらに、このような薬学的に許容される担体は、別の実施形態では、水性又は非水性の溶液、懸濁液、及びエマルジョンであり得る。非水性溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油などの植物油、及びオレイン酸エチルなどの注射用有機エステルである。水性担体には、生理食塩水、緩衝性媒体を含む、アルコール性／水性溶液、エマルジョン又は懸濁液が含まれる。一実施形態では、薬学的に許容される担体として使用されるリン酸緩衝液のレベルは、約0.01～約0.1M、又は別の実施形態では、約0.01～約0.09M、又は別の実施形態では、約0.01～約0.08M、又は別の実施形態では、約0.01～約0.07M、又は別の実施形

40

50

態では、約 0.01～約 0.06 M、又は別の実施形態では、約 0.01～約 0.05 M、又は別の実施形態では、約 0.01～約 0.04 M、又は別の実施形態では、約 0.01～約 0.03 M、又は別の実施形態では、約 0.01～約 0.02 M、又は別の実施形態では、約 0.01～約 0.015 である。

【0050】

本明細書で使用される用語「全身投与」は、経口、舌下、頬側、経鼻、経皮、直腸、筋肉内、静脈内、脳室内、髄腔内、及び皮下経路を指す。

【0051】

用語「静脈内投与」は、静脈内投与の注射及び他の様式を含む。

【0052】

化合物の「投与」又は化合物を「投与する」という用語は、治療的に有用な形態及び治療的に有用な量で個体の体内に導入することができる形態で、処置を必要とする個体に本発明の化合物を提供することを指し、これには、錠剤、カプセル、シロップ、懸濁液などの経口剤形；IV、IM、又はIPなどの注射用剤形；クリーム、ゼリー、粉末、又はパッチを含む経皮剤形；頬側剤形；吸入粉末、スプレー、懸濁液など；及び直腸坐剤が含まれるが、これらに限定されない。

【0053】

本発明を使用して有用な剤形を作製するための技術及び組成物は、以下の参考文献の1つ以上に記載されている：Ansel, Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms 2nd Edition (1976)；Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed. (Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985)；Advances in Pharmaceutical Sciences (David Ganderton, Trevor Jones, Eds., 1992)；Advances in Pharmaceutical Sciences Vol 7. (David Ganderton, Trevor Jones, James McGinity, Eds., 1995)；Aqueous Polymeric Coatings for Pharmaceutical Dosage Forms (Drugs and the Pharmaceutical Sciences, Series 36 (James McGinity, Ed., 1989)；Pharmaceutical Particulate Carriers: Therapeutic Applications: Drugs and the Pharmaceutical Sciences, Vol 61 (Alain Rolland, Ed., 1993)；Drug Delivery to the Gastrointestinal Tract (Ellis Horwood Books in the Biological Sciences. Series in Pharmaceutical Technology；J. G. Hardy, S. S. Davis, Clive G. Wilson, Eds.)；Modern Pharmaceuticals Drugs and the Pharmaceutical Sciences, Vol 40 (Gilbert S. Banker, Christopher T. Rhodes, Eds.) など、それぞれの関連部分は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0054】

用語「対象」は、ヒトなどの哺乳動物、ネコ又はイヌ対象などの飼育慣らされた動物、ウシ、ウマ、ヤギ、ヒツジ、及びブタ対象などであるがこれらに限定されない農用動物、野生動物（野生内であっても動物園内であっても）、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ブタ、イヌ、及びネコなどの研究動物、ニワトリ、シチメンチョウ、及び鳴鳥類などの鳥類種を指す。好ましくは、対象はヒトである。対象は、例えば、青少年などの子供、又は成人であり得る。

【0055】

用語「処置」は、哺乳動物、特にヒトにおける病的状態の任意の処置を指し、(i) その

10

20

30

40

50

状態にかかりやすいかもしれないが、その状態と未だ診断されておらず、したがって、その処置が、疾患状態の予防的処置を構成する対象において該病的状態の発生を予防すること；(i i) 病的状態を阻害し、即ち、その発達を停止させること；(i i i) 病的状態を軽減し、即ち、病的状態の退行を引き起こすこと；又は(i v) 病的状態によって媒介される状態を軽減することを含む。

【0056】

用語「治療有効量」は、そのような処置を必要とする哺乳動物に投与された場合に、上記で定義したような処置を達成するのに十分な本発明の化合物の量を指す。治療有効量は、処置される対象及び疾患状態、対象の体重及び年齢、疾患状態の重症度、投与の様式などに応じて変化し、これは当業者によって容易に決定され得る。

10

【0057】

医薬組成物：

医薬組成物は、滑沢剤（ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸亜鉛、粉末化ステアリン酸、水素化植物油、タルク、ポリエチレングリコール、及び鉱油など）、着色剤、結合剤（スクロース、ラクトース、ゼラチン、デンプンペースト、アカシア、トラガント、ポビドン、ポリエチレングリコール、プルラン、及びトウモロコシシロップなど）、流動化剤（コロイド状二酸化ケイ素及びタルクなど）界面活性剤（ラウリル硫酸ナトリウム、ジオクチルスルホコハク酸ナトリウム、トリエタノールアミン、ポリオキシエチレンソルビタン、ポロキサール、及び第四級アンモニウム塩など）、保存剤、安定剤、接着剤（粘膜接着剤など）、崩壊剤、充填物質（b u l k i n g s u b s t a n c e）、香料、甘味料、薬学的に許容される担体、並びに他の賦形剤（ラクトース、マンニトール、グルコース、フルクトース、キシロース、ガラクトース、スクロース、マルトース、キシリトール、ソルビトール、塩化物、カリウム、ナトリウム及びマグネシウムの硫酸塩及びリン酸塩など）を含むがこれらに限定されない、1つ以上の賦形剤を含むことができる。

20

【0058】

本発明のA A Tアンチセンス剤は、当技術分野で公知の方法によって経口剤形（錠剤及びカプセルなど）に製剤化することができる。剤形の例は、限定されるものではないが、チュアブル錠剤、速溶性錠剤、発泡性錠剤、再構成可能な粉末、エリキシル剤、液剤、溶液、懸濁液、エマルジョン、錠剤、多層錠剤、二層錠剤、カプセル、軟ゼラチンカプセル、硬ゼラチンカプセル、カプレット、トローチ、ロゼンジ、チュアブルロゼンジ、ビーズ、粉末、顆粒、粒子、微粒子、分散性顆粒、カシェ剤、薄いストリップ、経口フィルム、経皮パッチ、及びそれらの組み合わせを含む。

30

【0059】

本発明のA A Tアンチセンス剤は、本明細書に引用される技術及び組成物の参考文献に詳述されている任意の適切な方法によって、静脈内剤形に製剤化することができる。

【0060】

本発明のA A Tアンチセンス剤は、本明細書に引用される技術及び組成物の参考文献に詳述される任意の適切な方法によって、鼻腔内（経鼻）剤形に製剤化され得る。

【0061】

提示の錠剤、カプセル及び静脈内製剤は、本発明のA A Tアンチセンス剤の1つ以上の1日用量又はその適切な小部分を都合よく含有する別個の単位で提供される。例えば、単位は、約1 m g ~ 約1 0 0 0 m g、あるいは約5 m g ~ 約5 0 0 m g、あるいは約5 m g ~ 約2 5 0 m g、あるいは約1 0 m g ~ 約1 0 0 m gの本発明のA A Tアンチセンス剤又は組み合わせの1つ以上を含有する可能性がある。

40

【0062】

処置方法：

本発明のA A Tアンチセンス剤及び医薬組成物は、単独で、又は他の抗生物質と組み合わせて、グラム陰性及び／又はグラム陽性細菌によって引き起こされる細菌感染を処置するために投与され得る。より好ましくは、本発明のA A Tアンチセンス剤及び医薬組成物は

50

、単独で、又は他の抗生物質と組み合わせて、グラム陰性菌によって引き起こされる細菌感染を処置するために投与され得る。

【0063】

典型的には、治療有効量のAATアンチセンス剤又は医薬組成物は、感染を処置するために投与される。

【0064】

成人又は小児のヒトに対する用量範囲は、患者の年齢、体重及び状態を含む多くの因子に依存するであろう。本発明のAATアンチセンス剤の適切な経口投与量は、約1mg～約2000mgの範囲であり得る。

【0065】

AATアンチセンス剤、又は抗菌剤とAATアンチセンス剤との組み合わせは、1日1回、又は1日2回若しくは3回以上投与され得る。好ましくは、AATアンチセンス剤又は組み合わせは、1日1回から1日4回の静脈内注入によって投与され、好ましくは、各注入は、30～60分間継続する。

【0066】

多形体

本発明はさらに、種々の結晶形態、多形形態及び（無水）含水形態の本発明の化合物に関する。化学化合物は、そのような化合物の合成調製において使用される溶媒からの精製及び／又は単離の方法をわずかに変化させることによって、そのような形態のいずれかで単離され得ることが、製薬産業内で十分に確立されている。

【0067】

異なる構造異性体が存在し、及び／又は1つ以上のキラル中心が存在する場合、全ての異性体形態が包含されることが意図される。エナンチオマーは、そのキラル中心の絶対配置によって特徴付けられ、Cahn、Ingold及びPrelogのR及びS配列決定規則によって記載される。このような慣習は、当技術分野で周知である（例えば、‘Advanced Organic Chemistry’, 3rd edition, ed. March, J., John Wiley and Sons, New York, 1985を参照されたい）。任意の水素原子が重水素原子で置換されている一般式（I）の化合物を含むことも意図される。

【0068】

オリゴヌクレオチド

本明細書で使用される用語「オリゴヌクレオチド」は、2つ以上の共有結合ヌクレオシドを含む分子として当業者によって一般に理解されるように定義される。このような共有結合ヌクレオシドはまた、核酸分子又はオリゴマーと呼ばれ得る。オリゴヌクレオチドは、一般に、固相合成と、その後の精製によって実験室で製造される。オリゴヌクレオチドの配列を参照する場合、共有結合ヌクレオチド又はヌクレオシドの核酸塩基部分の配列若しくは順序、又はその修飾について参照し、これは5'末端で開始し、3'末端で終了する（オリゴヌクレオチドのバックボーンにかかわらず）。本発明のオリゴヌクレオチドは、人工であり、化学的に合成され、典型的には、精製又は単離される。本発明のオリゴヌクレオチドは、1つ以上の修飾ヌクレオシド又はヌクレオチドを含み得る。

【0069】

アンチセンスオリゴヌクレオチド

本明細書で使用される用語「アンチセンスオリゴヌクレオチド」は、標的核酸、特に標的核酸上の連続配列にハイブリダイズすることによって標的遺伝子の発現を調節することができるオリゴヌクレオチドとして定義される。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、本質的に二本鎖ではなく、したがってsiRNA又はshRNAではない。好ましくは、本発明の化合物に使用されるアンチセンスオリゴヌクレオチドは、一本鎖である。本発明の化合物に使用される一本鎖オリゴヌクレオチドは、内部又は相互（inter）自己相補性の程度がオリゴヌクレオチドの全長の50%未満である限り、ヘアピン又は分子間二重鎖構造（同じオリゴヌクレオチドの2つの分子間の二重鎖）を形成し得ることが理解される

10

20

30

40

50

。

【0070】

用語「アンチセンス」は、特定の核酸配列の「センス」鎖に相補的な核酸配列を含む任意の組成物を指す、一旦細胞に導入されると、相補的ヌクレオチドは、細胞によって産生される天然配列と結合して二重鎖を形成し、転写又は翻訳のいずれかをブロックし、それによって遺伝子発現を変化させ、及び／又は転写後RNAプロセッシング（例えば、スプライシング、マイクロRNA調節など）を妨害する。名称「負」又は「マイナス」は、アンチセンス鎖を指し、名称「正」又は「プラス」は、センス鎖を指すことができる。

【0071】

「アンチセンスオリゴマー」、「アンチセンスオリゴヌクレオチド」又は「ASO」は、少なくとも約10ヌクレオチド長のオリゴマーを含むアンチセンス分子又は抗遺伝子剤を指す。特定の実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、少なくとも15、18、20、25、30、35、40、又は50ヌクレオチドを含む。ASOは、当該分野で公知の標準的な方法によって合成され得る。例として、ホスホロチオエートオリゴマーは、Stein et al. (1988) Nucleic Acids Res. 16, 3209-3211の方法によって合成され得、メチルホスホネートオリゴマーは、制御された細孔ガラスポリマー支持体の使用によって調製され得る (Sarin et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85, 7448-7451)。モルホリノオリゴマーは、Summerton及びWellerの米国特許第5,217,866号明細書及び第5,185,444号明細書の方法によって合成され得る。

【0072】

本発明のAAT ASOに含まれるアンチセンスオリゴマーは、細菌における毒性、抗生物質耐性、バイオフィーム形成又は必須の増殖及び生存プロセスに寄与する遺伝子を標的とし得る。本発明のAAT ASOに含まれるアンチセンスオリゴマーは、細菌感染の単独療法処置において有用であり、又は公知の抗生物質との組み合わせの使用を介して、細菌感染に対する改善された、そして臨床的に意味のある活性（最小阻害濃度；MIC）を付与するのに有用であり得る。

【0073】

式(I)の好ましい下位構造

一実施形態では、pは1である。

【0074】

一実施形態では、R₁は、H、C₁-6アルキル、C₁-6置換アルキル、C₃-8シクロアルキル及びC₃-8置換シクロアルキルからなる群から選択される。

【0075】

一実施形態では、R₁は、H、C₁-6アルキル及びC₁-6置換アルキルからなる群から選択される。

【0076】

一実施形態では、R₁はHである。

【0077】

一実施形態では、R₁は、C₁-6アルキルである。好ましくは、R₁は、C₁-4アルキルである。より好ましくは、R₁はMeである。

【0078】

一実施形態では、pは0である。

【0079】

一実施形態では、nは1である。

【0080】

一実施形態では、nは2である。

【0081】

一実施形態では、R₂及びR₃は、それぞれ独立して、H、C₁-6アルキル、C₁-6置換アルキル、C₃-8シクロアルキル及びC₃-8置換シクロアルキルからなる群から

選択される。

【0082】

一実施形態では、 R_2 及び R_3 は、それぞれ独立して、 H 、 C_1-6 アルキル及び C_1-6 の置換アルキルからなる群から選択される。

【0083】

一実施形態では、 R_2 及び R_3 は、それぞれ独立して、 H 及び C_1-6 アルキルからなる群から選択される。

【0084】

一実施形態では、 R_2 及び R_3 の一方は H であり、他方は C_1-6 アルキルである。好ましくは、 R_2 及び R_3 の一方は H であり、他方は C_1-4 アルキルである。より好ましくは、 R_2 及び R_3 の一方は H であり、他方は Me である。

10

【0085】

一実施形態では、 R_2 及び R_3 は、それぞれ H である。

【0086】

一実施形態では、 R_4 及び R_5 は、それぞれ独立して、 H 、 C_1-6 アルキル、 C_1-6 置換アルキル、 C_3-8 シクロアルキル及び C_3-8 置換シクロアルキルからなる群から選択される。

【0087】

一実施形態では、 R_4 及び R_5 は、それぞれ独立して、 H 、 C_1-6 アルキル及び C_1-6 の置換アルキルからなる群から選択される。

20

【0088】

一実施形態では、 R_4 及び R_5 は、それぞれ独立して、 H 及び C_1-6 アルキルからなる群から選択される。

【0089】

一実施形態では、 R_4 及び R_5 の一方は H であり、他方は C_1-6 アルキルである。好ましくは、 R_4 及び R_5 の一方は H であり、他方は C_1-4 アルキルである。より好ましくは、 R_4 及び R_5 の一方は H であり、他方は Me である。

【0090】

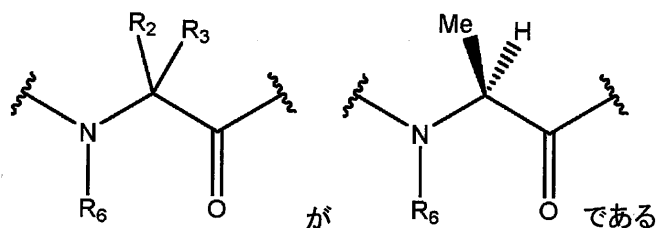
一実施形態では、 R_4 及び R_5 は、それぞれ H である。

【0091】

一実施形態では、 m は 0 であり、 R_4 及び R_5 は存在しない。一実施形態では、 m は 0 であり、 R_4 及び R_5 は存在せず、 R_2 及び R_3 の一方は H であり、他方は C_1-6 アルキルである。好ましくは、 m は 0 であり、 R_4 及び R_5 は存在せず、 R_2 及び R_3 の一方は H であり、他方は C_1-4 アルキルである。より好ましくは、 m は 0 であり、 R_4 及び R_5 は存在せず、 R_2 及び R_3 の一方は H であり、他方は Me である。最も好ましくは、 m は 0 であり、 R_4 及び R_5 は存在せず、 R_2 及び R_3 基は、部分：

30

【化9】



40

ように選択される。

【0092】

一実施形態では、 m は 2 であり、 R_4 及び R_5 は H である。一実施形態では、 m は 0 であり、 R_4 及び R_5 は H であり、 R_2 及び R_3 は H である。

50

【0093】

一実施形態では、 R_6 は、 H 、 $C_1 - 6$ アルキル、 $C_1 - 6$ 置換アルキル、 $C_3 - 8$ シクロアルキル及び $C_3 - 8$ 置換シクロアルキルからなる群から選択される。

【0094】

一実施形態では、 R_6 は、 H 、 $C_1 - 6$ アルキル及び $C_1 - 6$ 置換アルキルからなる群から選択される。

【0095】

一実施形態では、 R_6 は H である。

【0096】

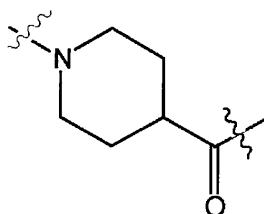
一実施形態では、 q は 1 である。

10

【0097】

一実施形態では、 q は 1 であり、 L_2 は、下記の構造を有する：

【化10】

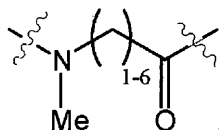


20

【0098】

一実施形態では、 q は 1 であり、 L_2 は、下記の構造を有する：

【化11】

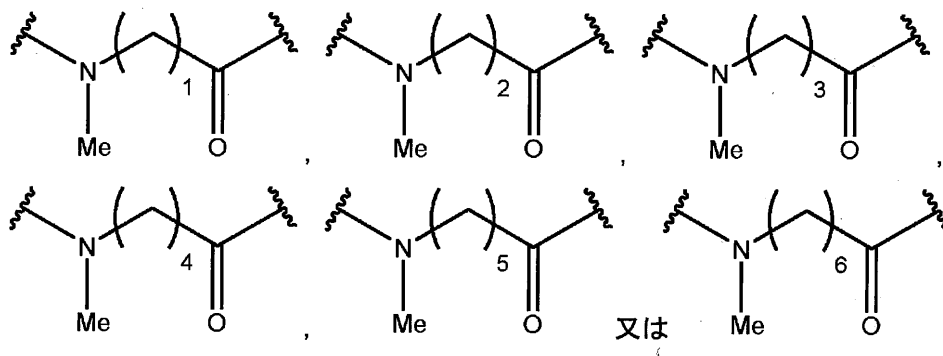


30

【0099】

一実施形態では、 q は 1 であり、 L_2 は、下記の構造を有する：

【化12】



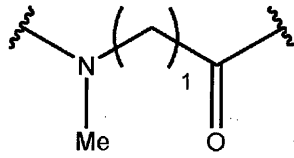
40

【0100】

一実施形態では、 q は 1 であり、 L_2 は、下記の構造を有する：

50

【化 1 3】

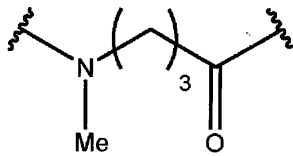


【0101】

一実施形態では、 q は 1 であり、 L_2 は、下記の構造を有する：

10

【化 1 4】



【0102】

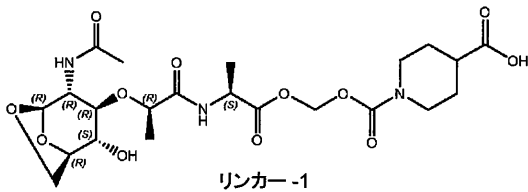
一実施形態では、 q は 0 である。

20

【0103】

リンカー-1：

【化 1 5】



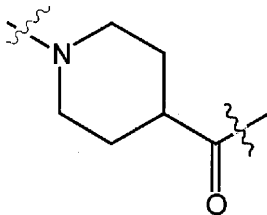
30

一実施形態では、 p は 1 であり、 n は 1 であり、 q は 1 である。

【0104】

一実施形態では、 p は 1 であり、 n は 1 であり、 q は 1 であり、 R_1 は H であり、 R_2 及び R_3 の一方は H であり、他方は C_{1-6} アルキルであり、 m は 0 であり、 R_4 及び R_5 は存在せず、 R_6 は H であり、 L_2 は、下記の構造を有する：

【化 1 6】



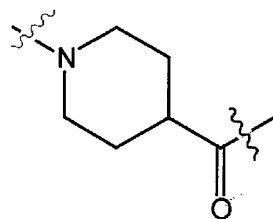
40

【0105】

一実施形態では、 p は 1 であり、 n は 1 であり、 q は 1 であり、 R_1 は H であり、 R_2 及び R_3 の一方は H であり、他方は Me であり、 m は 0 であり、 R_4 及び R_5 は存在せず、 R_6 は H であり、 L_2 は、下記の構造を有する：

50

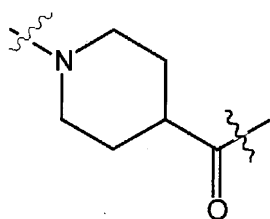
【化 1 7】



【 0 1 0 6 】

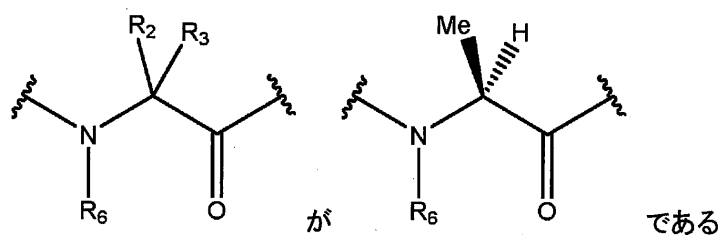
一実施形態では、 p は 1 であり、 n は 1 であり、 q は 1 であり、 R_1 は H であり、 R_2 及び R_3 の一方は H であり、他方は Me であり、 m は 0 であり、 R_4 及び R_5 は存在せず、 R_6 は H であり、 L_2 は、下記の構造を有し：

【化 1 8】



R₂ 及び R₃ 基は、部分：

【化 19】

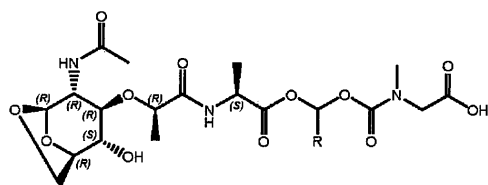


ように選択される。

【 0 1 0 7 】

リンカー - 2 :

【化 2 0】



リンカー-2 (R = H)
リンカー-3 (R = Me)

リンカー 3 (R = Me)

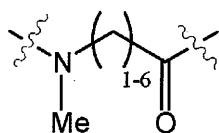
一実施形態では、 p は 1 であり、 n は 1 であり、 q は 1 である。

【 0 1 0 8 】

一実施形態では、 p は 1 であり、 n は 1 であり、 q は 1 であり、 R_1 は H であり、 R_2 及び R_3 の一方は H であり、他方は C_{1-6} アルキルであり、 m は 0 であり、 R_4 及び R_5

は存在せず、 R_6 はHであり、 L_2 は、下記の構造を有する：

【化21】

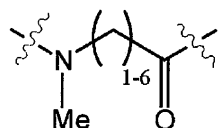


【0109】

一実施形態では、 p は1であり、 n は1であり、 q は1であり、 R_1 はHであり、 R_2 及び R_3 の一方はHであり、他方はMeであり、 m は0であり、 R_4 及び R_5 は存在せず、 R_6 はHであり、 L_2 は、下記の構造を有する：

10

【化22】

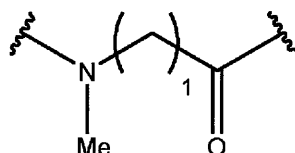


【0110】

一実施形態では、 p は1であり、 n は1であり、 q は1であり、 R_1 はHであり、 R_2 及び R_3 の一方はHであり、他方は C_{1-6} アルキルであり、 m は0であり、 R_4 及び R_5 は存在せず、 R_6 はHであり、 L_2 は、下記の構造を有する：

20

【化23】

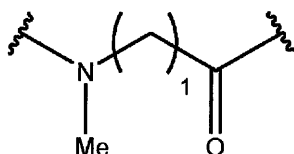


30

【0111】

一実施形態では、 p は1であり、 n は1であり、 q は1であり、 R_1 はHであり、 R_2 及び R_3 の一方はHであり、他方はMeであり、 m は0であり、 R_4 及び R_5 は存在せず、 R_6 はHであり、 L_2 は、下記の構造を有する：

【化24】



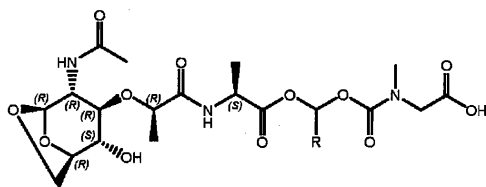
40

【0112】

リンカー-3：

50

【化 2 5】



リンカー-2 (R = H)
リンカー-3 (R = Me)

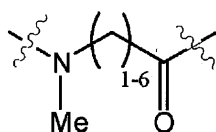
10

一実施形態では、 p は 1 であり、 n は 1 であり、 q は 1 である。

【0 1 1 3】

一実施形態では、 p は 1 であり、 n は 1 であり、 q は 1 であり、 R_1 は C 1 - 6 アルキルであり、 R_2 及び R_3 の一方は H であり、他方は C 1 - 6 アルキルであり、 m は 0 であり、 R_4 及び R_5 は存在せず、 R_6 は H であり、 L_2 は、下記の構造を有する：

【化 2 6】

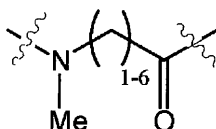


20

【0 1 1 4】

一実施形態では、 p は 1 であり、 n は 1 であり、 q は 1 であり、 R_1 は C 1 - 6 アルキルであり、 R_2 及び R_3 の一方は H であり、他方は Me であり、 m は 0 であり、 R_4 及び R_5 は存在せず、 R_6 は H であり、 L_2 は、下記の構造を有する：

【化 2 7】

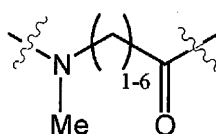


30

【0 1 1 5】

一実施形態では、 p は 1 であり、 n は 1 であり、 q は 1 であり、 R_1 は Me であり、 R_2 及び R_3 の一方は H であり、他方は C 1 - 6 アルキルであり、 m は 0 であり、 R_4 及び R_5 は存在せず、 R_6 は H であり、 L_2 は、下記の構造を有する：

【化 2 8】



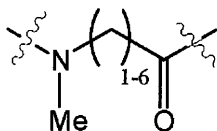
40

【0 1 1 6】

一実施形態では、 p は 1 であり、 n は 1 であり、 q は 1 であり、 R_1 は Me であり、 R_2 及び R_3 の一方は H であり、他方は Me であり、 m は 0 であり、 R_4 及び R_5 は存在せず、 R_6 は H であり、 L_2 は、下記の構造を有する：

50

【化 2 9】

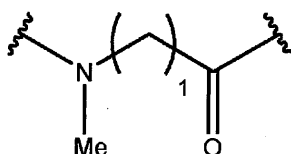


【0117】

一実施形態では、 p は 1 であり、 n は 1 であり、 q は 1 であり、 R_1 は C_{1-6} アルキルであり、 R_2 及び R_3 の一方は H であり、他方は C_{1-6} アルキルであり、 m は 0 であり、 R_4 及び R_5 は存在せず、 R_6 は H であり、 L_2 は、下記の構造を有する：

10

【化 3 0】

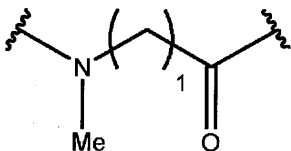


【0118】

一実施形態では、 p は 1 であり、 n は 1 であり、 q は 1 であり、 R_1 は Me であり、 R_2 及び R_3 の一方は H であり、他方は Me であり、 m は 0 であり、 R_4 及び R_5 は存在せず、 R_6 は H であり、 L_2 は、下記の構造を有する：

20

【化 3 1】

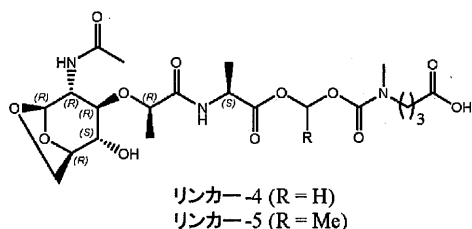


30

【0119】

リンカー - 4 :

【化 3 2】



40

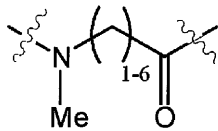
一実施形態では、 p は 1 であり、 n は 1 であり、 q は 1 である。

【0120】

一実施形態では、 p は 1 であり、 n は 1 であり、 q は 1 であり、 R_1 は H であり、 R_2 及び R_3 の一方は H であり、他方は C_{1-6} アルキルであり、 m は 0 であり、 R_4 及び R_5 は存在せず、 R_6 は H であり、 L_2 は、下記の構造を有する：

50

【化 3 3】

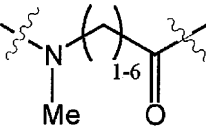


【0 1 2 1】

一実施形態では、 p は 1 であり、 n は 1 であり、 q は 1 であり、 R_1 は H であり、 R_2 及び R_3 の一方は H であり、他方は Me であり、 m は 0 であり、 R_4 及び R_5 は存在せず、 R_6 は H であり、 L_2 は、下記の構造を有する：

10

【化 3 4】

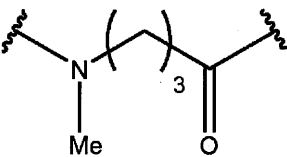


【0 1 2 2】

一実施形態では、 p は 1 であり、 n は 1 であり、 q は 1 であり、 R_1 は H であり、 R_2 及び R_3 の一方は H であり、他方は C_{1-6} アルキルであり、 m は 0 であり、 R_4 及び R_5 は存在せず、 R_6 は H であり、 L_2 は、下記の構造を有する：

20

【化 3 5】

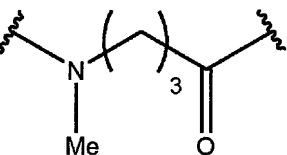


30

【0 1 2 3】

一実施形態では、 p は 1 であり、 n は 1 であり、 q は 1 であり、 R_1 は H であり、 R_2 及び R_3 の一方は H であり、他方は Me であり、 m は 0 であり、 R_4 及び R_5 は存在せず、 R_6 は H であり、 L_2 は、下記の構造を有する：

【化 3 6】



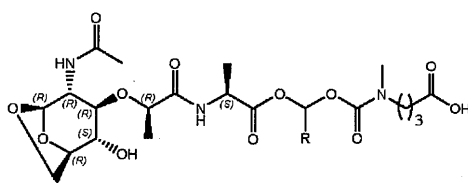
40

【0 1 2 4】

リンカー 5：

50

【化 3 7】



リンカー-4 (R = H)
リンカー-5 (R = Me)

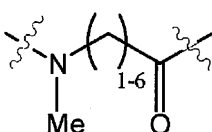
10

一実施形態では、 p は 1 であり、 n は 1 であり、 q は 1 である。

【0 1 2 5】

一実施形態では、 p は 1 であり、 n は 1 であり、 q は 1 であり、 R_1 は C 1 - 6 アルキルであり、 R_2 及び R_3 の一方は H であり、他方は C 1 - 6 アルキルであり、 m は 0 であり、 R_4 及び R_5 は存在せず、 R_6 は H であり、 L_2 は、下記の構造を有する：

【化 3 8】

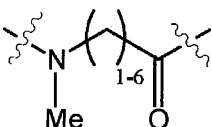


20

【0 1 2 6】

一実施形態では、 p は 1 であり、 n は 1 であり、 q は 1 であり、 R_1 は C 1 - 6 アルキルであり、 R_2 及び R_3 の一方は H であり、他方は Me であり、 m は 0 であり、 R_4 及び R_5 は存在せず、 R_6 は H であり、 L_2 は、下記の構造を有する：

【化 3 9】

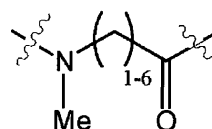


30

【0 1 2 7】

一実施形態では、 p は 1 であり、 n は 1 であり、 q は 1 であり、 R_1 は Me であり、 R_2 及び R_3 の一方は H であり、他方は C 1 - 6 アルキルであり、 m は 0 であり、 R_4 及び R_5 は存在せず、 R_6 は H であり、 L_2 は、下記の構造を有する：

【化 4 0】



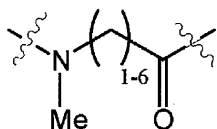
40

【0 1 2 8】

一実施形態では、 p は 1 であり、 n は 1 であり、 q は 1 であり、 R_1 は Me であり、 R_2 及び R_3 の一方は H であり、他方は Me であり、 m は 0 であり、 R_4 及び R_5 は存在せず、 R_6 は H であり、 L_2 は、下記の構造を有する：

50

【化 4 1】

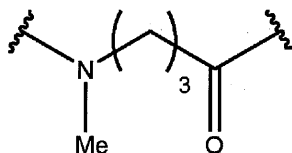


【0 1 2 9】

一実施形態では、 p は 1 であり、 n は 1 であり、 q は 1 であり、 R_1 は C_{1-6} アルキルであり、 R_2 及び R_3 の一方は H であり、他方は C_{1-6} アルキルであり、 m は 0 であり、 R_4 及び R_5 は存在せず、 R_6 は H であり、 L_2 は、下記の構造を有する：

10

【化 4 2】

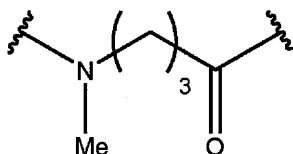


【0 1 3 0】

一実施形態では、 p は 1 であり、 n は 1 であり、 q は 1 であり、 R_1 は Me であり、 R_2 及び R_3 の一方は H であり、他方は Me であり、 m は 0 であり、 R_4 及び R_5 は存在せず、 R_6 は H であり、 L_2 は、下記の構造を有する：

20

【化 4 3】

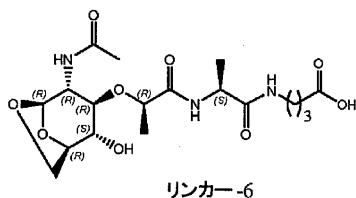


30

【0 1 3 1】

リンカー - 6 :

【化 4 4】

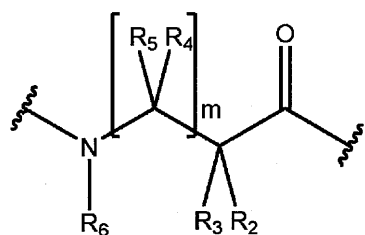


40

一実施形態では、 p は 0 であり、 n は 2 であり、 q は 0 であり、1 つの

50

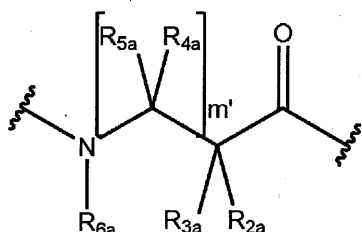
【化 4 5】



10

残基は、

【化 4 6】



20

であり、 R_{2a} 、 R_{3a} 、 R_{4a} 、 R_{5a} 、 R_{6a} 及び m' は、（本明細書の任意の実施形態に記載されるような）部分 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 及び m と同じそれぞれの定義を有するが、それらから独立して選択されてもよい。

【0132】

一実施形態では、 p は0であり、 n は2であり、 q は0であり、 R_2 及び R_3 は、それぞれ独立して、 H 及び C_{1-6} アルキルから選択され、 R_{2a} 及び R_{3a} は、それぞれ H であり、 R_4 、 R_5 、 R_{4a} 及び R_{5a} は、それぞれ H であり、 m は0であり、 m' は2であり、 R_6 は H であり、 R_{6a} は H である。

【0133】

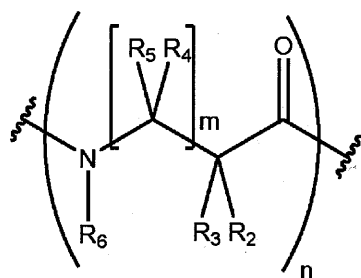
一実施形態では、 p は0であり、 n は2であり、 q は0であり、 R_2 及び R_3 は、それぞれ独立して、 H 及び Me からなる群から選択され、 R_{2a} 及び R_{3a} は、それぞれ H であり、 R_4 、 R_5 、 R_{4a} 及び R_{5a} は、それぞれ H であり、 m は0であり、 m' は2であり、 R_6 は H であり、 R_{6a} は H である。

30

【0134】

一実施形態では、

【化 4 7】

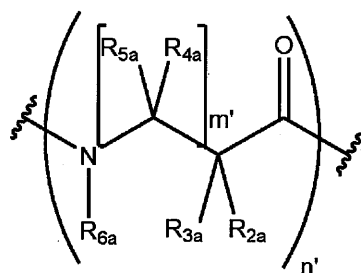


40

は、左側の糖部分に結合され、

50

【化 48】



10

は、右側のアンチセンス部分に結合される。

【0135】

一実施形態では、 R_1 は、H、 C_1-6 アルキル、 C_1-6 置換アルキル、 C_3-8 シクロアルキル、 C_3-8 置換シクロアルキルからなる群から選択され； R_2 及び R_3 は、それぞれ独立して、H、 C_1-6 アルキル、 C_1-6 置換アルキル、 C_3-8 シクロアルキル及び C_3-8 置換シクロアルキルからなる群から選択され； R_4 及び R_5 は、それぞれ独立して、H、 C_1-6 アルキル、 C_1-6 置換アルキル、 C_3-8 シクロアルキル及び C_3-8 置換シクロアルキルからなる群から選択され； R_6 は、H、 C_1-6 アルキル、 C_1-6 置換アルキル、 C_3-8 シクロアルキル及び C_3-8 置換シクロアルキルからなる群から選択される。

20

【0136】

一実施形態では、 R_1 は、H、 C_1-6 アルキル及び C_1-6 置換アルキルからなる群から選択され； R_2 及び R_3 は、それぞれ独立して、H、 C_1-6 アルキル及び C_1-6 置換アルキルからなる群から選択され； R_4 及び R_5 は、それぞれ独立して、H、 C_1-6 アルキル及び C_1-6 置換アルキルからなる群から選択され； R_6 は、H、 C_1-6 アルキル及び C_1-6 置換アルキルからなる群から選択される。

【0137】

一実施形態では、 R_1 はHであり； R_2 及び R_3 は、それぞれ独立して、H及び C_1-6 アルキルからなる群から選択され； R_4 及び R_5 は、それぞれ独立して、H及び C_1-6 アルキルからなる群から選択され； R_6 はHである。

30

【0138】

一実施形態では、 R_1 はHであり； R_2 及び R_3 の一方はHであり、他方は C_1-6 アルキルであり、好ましくは、 R_2 及び R_3 の一方はHであり、他方は C_1-4 アルキルであり； R_4 及び R_5 の一方はHであり、他方は C_1-6 アルキルであり、好ましくは、 R_4 及び R_5 の一方はHであり、他方は C_1-4 アルキルであり； R_6 はHである。

【0139】

一実施形態では、 R_1 は、H、 C_1-6 アルキル、 C_1-6 置換アルキル、 C_3-8 シクロアルキル及び C_3-8 置換シクロアルキルからなる群から選択され； R_2 及び R_3 は、それぞれ独立して、H、 C_1-6 アルキル、 C_1-6 置換アルキル、 C_3-8 シクロアルキル及び C_3-8 置換シクロアルキルからなる群から選択され； m は0であり； R_6 は、H、 C_1-6 アルキル、 C_1-6 置換アルキル、 C_3-8 シクロアルキル及び C_3-8 置換シクロアルキルからなる群から選択される。

40

【0140】

一実施形態では、 R_1 は、H、 C_1-6 アルキル及び C_1-6 置換アルキルからなる群から選択され； R_2 及び R_3 は、それぞれ独立して、H、 C_1-6 アルキル及び C_1-6 置換アルキルからなる群から選択され； m は0であり； R_6 は、H、 C_1-6 アルキル及び C_1-6 置換アルキルからなる群から選択される。

【0141】

一実施形態では、 R_1 はHであり； R_2 及び R_3 は、それぞれ独立して、H及び C_1-6

50

アルキルからなる群から選択され；mは0であり；R₆はHである。

【0142】

一実施形態では、R₁はHであり；R₂及びR₃の一方はHであり、他方はC₁－6アルキルであり、好ましくは、R₂及びR₃の一方はHであり、他方はC₁－4アルキルであり；mは0であり；R₆はHである。

【0143】

一実施形態では、R₁はC₁－6アルキルであり；R₂及びR₃は、それぞれ独立して、H及びC₁－6アルキルからなる群から選択され；R₄及びR₅は、それぞれ独立して、H及びC₁－6アルキルからなる群から選択され；R₆はHである。

【0144】

一実施形態では、R₁は、C₁－6アルキル、好ましくはC₁－4アルキルであり；R₂及びR₃の一方はHであり、他方はC₁－6アルキルであり、好ましくは、R₂及びR₃の一方はHであり、他方はC₁－4アルキルであり；R₄及びR₅の一方はHであり、他方はC₁－6アルキルであり、好ましくは、R₄及びR₅の一方はHであり、他方はC₁－4アルキルであり；R₆はHである。

【0145】

一実施形態では、R₁はC₁－6アルキルであり；R₂及びR₃は、それぞれ独立して、H及びC₁－6アルキルからなる群から選択され；mは0であり；R₆はHである。

【0146】

一実施形態では、R₁はC₁－6アルキル、好ましくはC₁－4アルキルであり；R₂及びR₃の一方はHであり、他方はC₁－6アルキルであり、好ましくは、R₂及びR₃の一方はHであり、他方はC₁－4アルキルであり；mは0であり；R₆はHである。

【0147】

一実施形態では、pは0であり、nは0である。

【0148】

一実施形態では、pは1であり、nは1であり、2、3又は4であり、qは1である。一実施形態では、pは1であり、nは1であり、qは1である。

【0149】

一実施形態では、pは1であり、nは0であり、qは1である。

【0150】

一実施形態では、pは0であり、nは0であり、qは1である。

【0151】

一実施形態では、R₇はHである。一実施形態では、R₇はアセチルである。一実施形態では、R₇はベンゾイルである。

【0152】

一実施形態では、R₈はHである。一実施形態では、R₈はアセチルである。一実施形態では、R₈はベンゾイルである。

【0153】

一実施形態では、R₉はHである。一実施形態では、R₉はアセチルである。一実施形態では、R₉はベンゾイルである。

【0154】

一実施形態では、R₁₀はメチルである。一実施形態では、R₁₀はエチルである。一実施形態では、R₁₀はプロピルである。

【0155】

例として、本発明による化合物は、以下の好ましい下位構造を含むが、これらに限定されない：

10

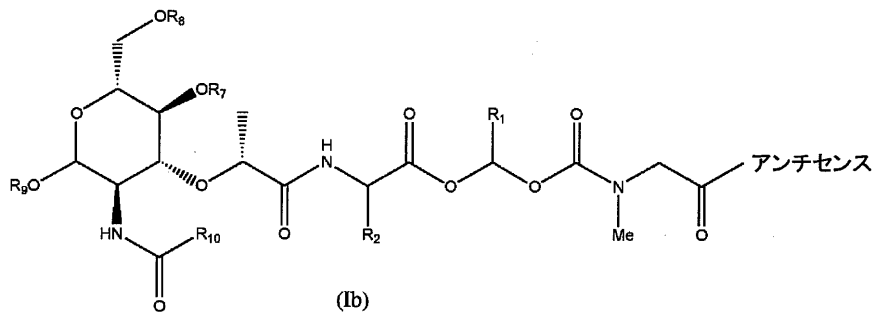
20

30

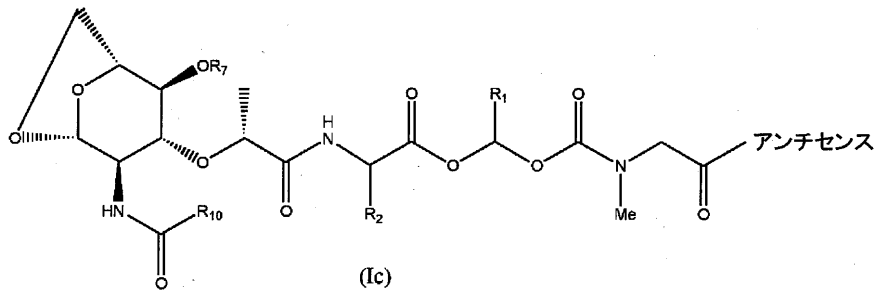
40

50

【化 4 9】



10

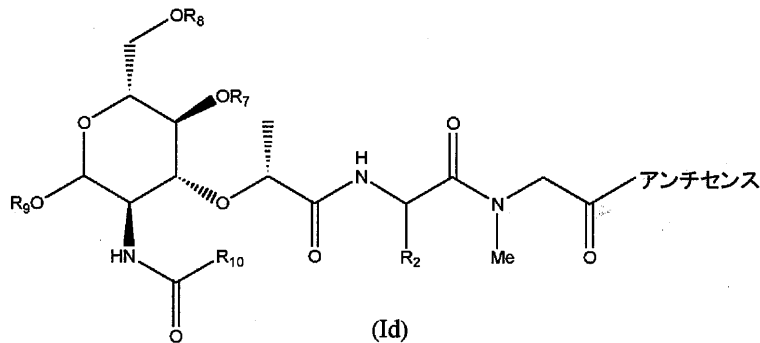


20

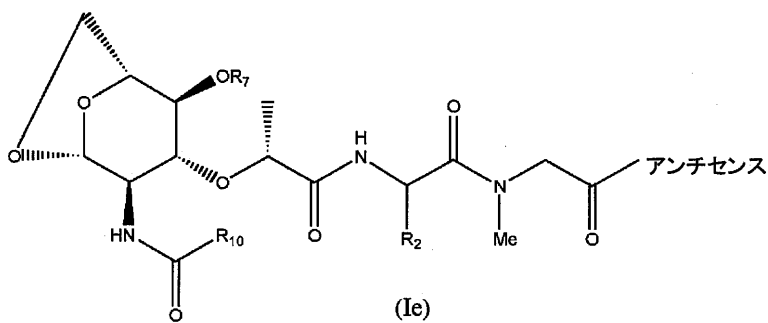
ここで、mは「0」として選択され、nは「1」として選択され、pは「1」として選択され、qは「1」として選択され、R₃はHであり、R₆はHであり、「スペーサー」は、N-メチルグリシンであり、R₁、R₂、R₇、R₈、R₉及びR₁₀は、上記で定義された通りである；

又は

【化 5 0】



30



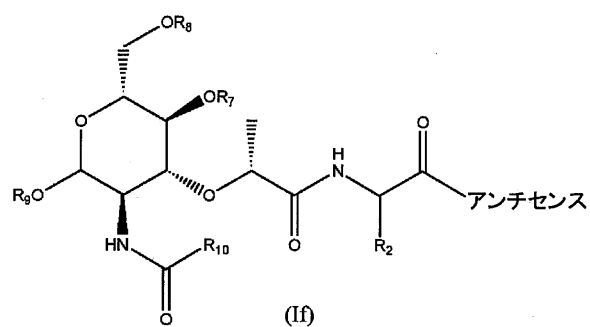
40

ここで、mは「0」として選択され、nは「1」として選択され、pは「0」として選択

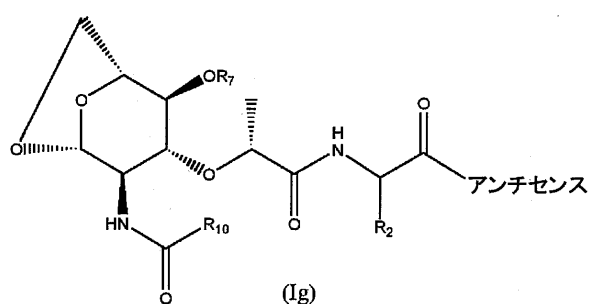
50

され、 q は「1」として選択され、 R_3 はHであり、 R_6 はHであり、「スペーサー」は、N-メチルグリシンであり、 R_2 、 R_7 、 R_8 、 R_9 及び R_{10} は、上記で定義された通りである；又は

【化51】



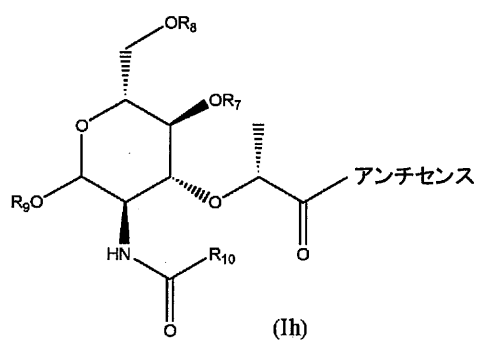
10



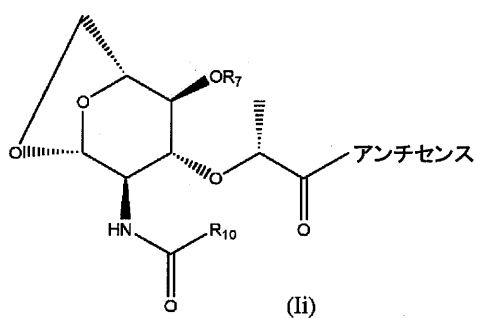
20

ここで、 m は「0」として選択され、 n は「1」として選択され、 p は「0」として選択され、 q は「0」として選択され、 R_3 はHであり、 R_2 、 R_7 、 R_8 、 R_9 及び R_{10} は、上記で定義された通りである；又は

【化52】



30



40

ここで、 n は「0」として選択され、 p は「0」として選択され、 q は「0」として選択

50

され、R₇、R₈、R₉及びR₁₀は、上記で定義された通りである；

好ましい実施形態では、構造（I c）、（I e）、（I g）、及び（I i）が選択される。

【0156】

さらにより好ましい実施形態では、構造（I c）及び（I g）が選択される。

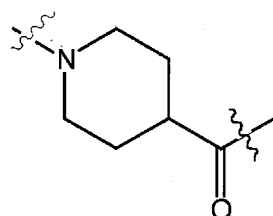
【0157】

例として、本発明による化合物は、以下の特徴の組み合わせを含むが、それらに限定されない：

・ nは1であり、mは0であり、R₆はHであり、R₂はHであり、R₃はMeであり、pは1であり、R₁はH又はMeであり、L₂は、下記の構造を有する：

10

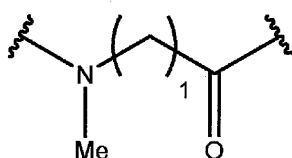
【化53】



20

・ nは1であり、mは0であり、R₆はHであり、R₂はHであり、R₃はMeであり、pは1であり、R₁はH又はMeであり、L₂は、下記の構造を有する：

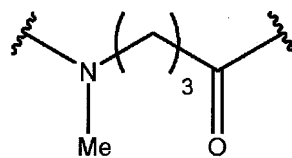
【化54】



30

・ nは1であり、mは0であり、R₆はHであり、R₂はHであり、R₃はMeであり、pは1であり、R₁はH又はMeであり、L₂は、下記の構造を有する：

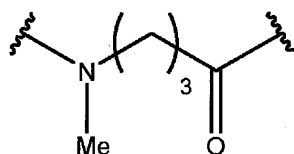
【化55】



40

・ nは1であり、mは0であり、R₆はHであり、R₂はHであり、R₃はMeであり、pは0であり、L₂は、下記の構造を有する：

【化56】



50

【0158】

好ましいアンチセンス剤

アンチセンス剤は、一般式（I）の分子を提供するために、分子の残りの部分との化学結合形成のための末端アミノ官能基を含む。以下の表1A、1B、1C、1Dは、潜在的なアンチセンス標的の網羅的なリストであることを意図するものではなく、アンチセンス剤が含み得る塩基の配列を詳述する。

【0159】

好ましいASOは、細菌の生存及び増殖に必須である生化学的経路及び／又は細胞プロセスにおけるタンパク質をコードする細菌核酸標的に特異的にハイブリダイズするのに十分な長さ及び相補性のものである。このような生化学的経路又は細胞プロセスの一般的な例には、細胞分裂、ムレイン生合成、包括的調節機構、脂肪酸生合成、DNA複製、リボソームタンパク質、転写、翻訳開始、リボ多糖生合成、核酸生合成、バイオフィーム成長及び中間代謝が含まれる。生化学的経路及び細胞プロセスにおける遺伝子の特定の例には、RpsJ及びRpmB（リボソームタンパク質）；LpxC、WaaC、WaaG、WaaA、WaaF、LpxA、LpxB（リボ多糖生合成）；murA、mraY、murB、murC、murE、murF、murG（ムレインペプチドグリカン生合成）；acpP、accA、accB、fabG、fabZ（脂肪酸生合成）；acpS（アシル担体タンパク質合成酵素）；fabI（エノイルーアシル担体タンパク質レダクターゼ）；fabD（マロニルコエンザイムAアシル担体タンパク質トランスシクラーゼ）；folP（ジヒドロプテロイン酸合成酵素）；fmhB（グリシン結合におけるタンパク質）；gyrA（DNAジャイレースサブユニット）；adk（アデニル酸キナーゼ）、細胞エネルギーホメオスタシス）；infA（タンパク質生合成）；ftsZ（細胞分裂）；rpoD（RNA合成）；aroC（芳香族化合物生合成）；inhA（エノイルーアシル担体タンパク質レダクターゼ）；ompA（外膜タンパク質A）；blaT、cml、adeA（抗生物質耐性関連遺伝子）；cepL、cepR、suhB、CsuE、SecA、PglL、PilU1、AlgZ、AlgU、LasR、FleR、PelF（バイオフィーム形成関連）が含まれる。

【0160】

10

20

30

40

50

【表 1】

表1A; 例示的な抗生物質耐性標的配列		
標的遺伝子	アンチセンス配列(5'-3')	配列ID
NDM-1	TCA AGT TTT CC	1
NDM-1	TCC TTT TAT TC	2
NDM-1	CCA TCA AGT TT	3
NDM-1	GGC AAT TCC AT	4
adeA	ATA CTG TCC AA	5
OmpA	CAT GGA TAT CC	6
AcrA	ATG TAA ACC TC	7
AcrA	GTT CAT ATG TA	8
AcrA	ACC CCT CTG TT	9
AcrA	TGT TCA TAT GT	10
AcrB	GTC TTA ACG GC	11
AcrB	AGG CAT GTC TT	12
AcrB	TAG GCA TGT CT	13
AcrR	TAT GTT CGT GA	14
TolC	TTC ATT TGC AT	15
TolC	ATT CCT TGT GG	16
TolC	TTT GCA TTC CT	17
KPC	GAT ACA GTG AC	18
KPC 1-4	AAC GAT ATT CC	19

【 0 1 6 1 】

【表 2】

表1B; 例示的なバイオフィルム形成標的配列		
標的遺伝子	アンチセンス配列(5'-3')	配列ID
cepl	AAG GTC TGC AT	20
cepl	TCG GAT CTG TG	21
cepl	CAT GGA TGT CC	22
cepl	CGT GAA CGA AG	23
cepl	CGT GTG GCA AC	24
cepl	GCC CGA GAT CC	25
cepl	CTT TCG TTC GC	26
suhB	ATG CAT GAG CC	27
suhB	GGA TGC ATG AG	28
CsuE	TTA TAT TCA TGG	29
CsuE	TCA TGG CAA AG	30
CsuE	TTT CCT GTC AA	31
SecA	TTG CCA ACA TG	32
PglL	CAT TAC CCA AG	33
PilU1	TTA AAA TCC AT	34
AlgZ	TAG GCA TCG AC	35
AlgU	AAA GCT CCT CT	36
LasR	AGG CCA TAG CG	37
FleR	TTA CTC CTG AA	38
PelF	TTC GGT CAT GT	39

【 0 1 6 2 】

【表 3】

表1C; 例示的な脂肪酸合成関連標的配列		
標的遺伝子	アンチセンス配列(5'-3')	配列ID
acpP	GTC CAT TAC CC	40
acpP	CAT TAC CCC TC	41
acpP	CCA TTA CCC CT	42
acpP	TCC ATT ACC CC	43
acpP	TGT CCA TTA CC	44
acpP	TTG TCC ATT AC	45
acpP	GTT GTC CAT TA	46
acpP	TGT TGT CCA TT	47
acpP	ATG TTG TCC AT	48
acpP	TTT ACA AGT GC	49
acpP	CCT CCG AGG GA	50
acpP	ACA CGT TGT TC	51
acpP	AGT TCA GCG AC	52
acpP	CTC ATA CCT TG	53
acpP	TGC TCA TAC TC	54
acpP	CTC ATA CTC T	55
acpP	CTC ATA CTA T	56
acpP	CTT CGA TAG TG	57
acpP	ATA TCG CTC AC	58
acpP	ATT CTC CTC AT	59
acpP	CAC AGG AAT TC	60
acpP	CAT TGC TTG TG	61
acpP	CAT ACC TTG TT	62
acpS	TTG CCA TTA GC	63
acp-E	CTG TAG TGA TTT CAC CA	64
fabA	TTA TET ACC AT	65
fabB	CGT TTC ATT AA	66
fabB	GCA CGT TTC AT	67
fabI	AGA AAA CCC AT	68
fabI	GCT TTA ATC C	69
fabI	CCC ATA GCT T	70
fabI	CAT GTA AGA T	71
fabI	AGA TAA CTC C	72
gapA	TTG ATA GTC AT	73
accA	GCT TTT TTC AT	74
accA	AGG CTT CCG TC	75
fabD	GTC ATG TTT T	76
inhA	GTC ATT TGG T	77
inhA	CAT TTG GTG ACT	78

10

20

30

40

【 0 1 6 3 】

50

【表 4】

表1D; 他の経路又は細胞プロセスに関連した例示的な標的配列		
標的遺伝子	アンチセンス配列(5'-3')	配列ID
RpoD	TCA TCT TTG CT	79
RpoD	TTT TGC TCC AT	80
PoiB	AGT AAC TCC AC	81
murA	TTT ATC CAT TG	82
rpsJ	GCA TTT GAC CT	83
rpsJ	TAG ACA TAC CA	84
rpsJ	TAC CAG TAA AC	85
rpsJ	TGG TTC TGC AT	86
rpsJ	CCT CAG ACT CC	87
rpsJ	GCA TTT GAC CT	88
ftsZ	AGT TTC TCT CC	89
ftsZ	GTT CAA ACA TA	90
ftsZ	TCA AAT GAG GC	91
ftsZ	AAT GAG GCC AT	92
ftsZ	ATA GTT TCT CTC C	93
gyrA	CGC TCA TCT AA	94
gyrA	CTA TAC ATA GAC	95
gyrA	GCC ATC TCG GAC ATC	96
gyrA	ATA CCA GGT GTT ATC T	97
dnaB	TTC CTG CCA TA	98
LpxC	TTT GAT CAT CG	99
LpxC	TGT TTG ATC AT	100
LpxC	TGT TTC ACC AT	101
LpxC	GTT GTT TGA TC	102
23S rRNA	AGT GCT CTA CC	103
23S rRNA	GCC TGT TAT CC	104
16S rRNA	CCA TGC AGC AC	105
16S rRNA	TTG CGC TCG TT	106
16S rRNA	GGC TGC TGG CA	107
fmhB	CCA TGA AAA A	108
polA	TTC ATG CCT GT	109
murA	ATC CAT TTA GT	110
murA	CAT TTA GTT TG	111
murA	AAT TTA TCC AT	112
murA	AAA TTT ATC CA	113
rpmB	ACT CGG GAC AT	114
rpmB	CTA TTC TCC AA	115
rpmB	GGC AGA CTC GG	116
rpmB	CTT AGA CAT GG	117
adk	ATG ATA CGC AT	118
adk	AGT GCC CTC C	119
infA	TCT TTG GCC AT	120

【 0 1 6 4 】

【表 5】

表1D; 他の経路又は細胞プロセスに関連した例示的な標的配列		
標的遺伝子	アンチセンス配列(5'-3')	配列ID
aroC	TTT CCA GCC AT	121
aroC	TTC CCT GCC AT	122
murF	ACG CTA ATC AT	123
murF	ACC TCC CAG GC	124
kdtA	AAT TCG AGC AT	125
boxA	TGT TTA AGA GC	126
boxA	CTC TTA ATG AT	127
boxC	ATC CAC CAC AG	128
rpoD-E	CTT GTA ACC ACA CCA	129
rpoD-E	TCC ACC AAG TCA CCA	130
pryC	GGT GCA GTC AT	131
pryC	AGA GTT CAA GG	132
pryA	GAC TTA ATC AA	133
lgt	CTA CTG GTC AT	134
folA	CAT TGA GAT TT	135
infB	ACA TCT GTC AT	136
nrdA	TTC TGA TTC AT	137
nrdB	GTA TAT GCC AT	138
zipA	TCC TGC ATC AT	139
caoA	ATA TAC CTC AT	140
gyrA-E	GTT ACC CTG ACC GAC CA	141
gyrA-E	GTT ACC CTG ACC ACC A	142
mrdA	TGT TTC ATA CG	143
LpxB	GGT TTG CCA AG	144
LpxB	TAA TCC GTC AG	145
carA	GGT GCT CAA AC	146
adeA	ATA CTG TAA AA	147
blaT	CTC TTC CTT TT	148
crml	TCC TTC TGA TT	149
folP	ATG TTA TCC C	150
fmhB	CCA TGA TTT A	151
hmrB	TCC ACG TCG A	152
rpmB	GTC TAT TCT CC	153
rpmB	GAC ATG TCT AT	154
hmrB	TCC ACG TCG A	155
FabG	TTC TCT CCT TT	156
RpmB	CTC TAG ACA TG	157
WaaC	AGC ACC CTC AT	158
MryA	TGA CTC TCC TC	159
MurC	CCA CCT CCA GG	160
LpxA	ATC AAA CTC AT	161
WaaG	GCC AGG GTC AT	162
WaaA	GTACGG TTC AT	163
murB	CAG TCG CCC CT	164
murE	AGG CTC ATA GG	165
AccB	CTA GCA CTC CC	166
FabZ	ATG TCC ATC AT	167
MurG	GCA AAG TCC TC	168
AmpR	GTC GAA CCA AT	169
LepB	ATT GAG TGT CAT	170
LptD	TGC CAT CTT GTT	171
MraY	CAG GAG CAT TAG	172

10

20

30

40

【0165】

当業者は、表1A、1B、1C及び1Dに列挙される配列が標的化アンチセンス配列を記載し、これらは5'末端及び3'末端のいずれか又は両方への追加のモノマー単位の付加によって長さが増加され得ることを認識するであろう。また、表1A、1B、1C及び1Dに列挙される標的化配列は、1、2又は3モノマー単位だけ異なってもよく、それでもなお目的の細菌核酸に結合する能力を保持する。

【0166】

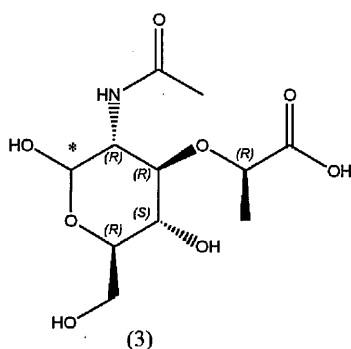
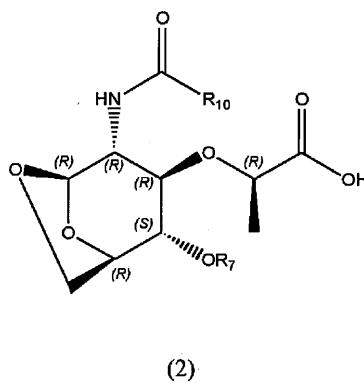
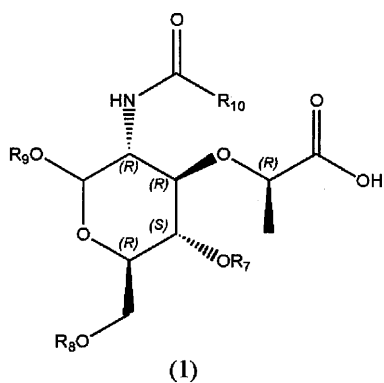
好ましい「糖試薬」

本発明の「糖」は、「糖試薬」の利用により調製される。「糖試薬」の利用は、「糖試薬

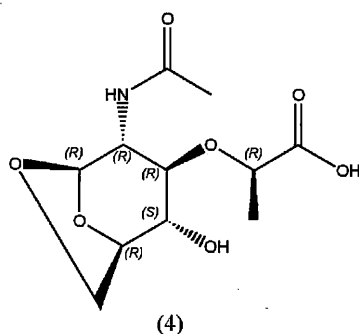
50

」の末端カルボン酸の α -カルボニルと一般式Ⅰの分子の残りの部分との間の化学結合の化学選択的形成（主にアミド結合形成）を提供する。「糖試薬」の末端カルボン酸が「糖」のラクチル残基の α -カルボニルである場合、以下が知られており、これらの工程に好ましい試薬（２～６）である；

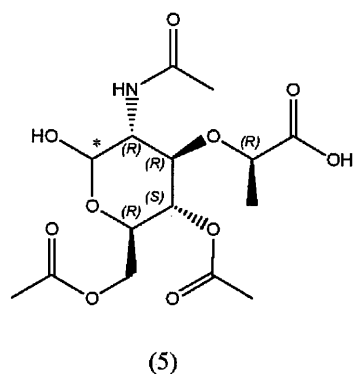
【化５７】



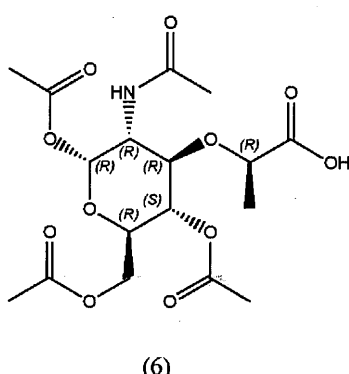
*アノマー (S); *アノマー (R);
CAS 61633-77-8 CAS 61665-31-4



CAS 104430-66-2



CAS 25605-74-7
*アノマー (S); CAS 149713-67-7



CAS 149622-52-6

【０１６７】

これらの試薬は、市販されているか、又は完全な合成手順が文献に記載されている（例えば、（３）については、市販されており、Merten, H and Brossmer, R., Carbohydrate Res., 191 (1), 144-9, 1991を参照されたい；（４）については、Paulsen, H et al., Liebigs Annalen der Chemie, 4, 664-74, 1986; Heseck, D. et al., JACS, 131 (14), 5187-93, 2009; Wang, Q. et al., Org. Biomol. Chem. 14 (3), 1013-23, 20

10

20

30



これらの試薬は、文献に記載されている完全な合成手順を有するか、又は単純な適応によって入手可能である（例えば、（7）については、Chaturvedi, N. C. *Atal, J. Med. Chem.*, 9, 971-3, 1966; Klatic, B. *Carbohydrate Res.*, 110 (2), 320-5, 1982を参照されたい；（8）については、Bacic, A. and Pecar, S. *Tet. Assym.*, 19, 2265-71, 2008を参照されたい；（9b）については、国際公開第2014/002039号パンフレット、cpd17 pg87を参照されたい（ここで、（S）-アンフェタミンは、単にL-アラニンベンジルエステルで置換することができ、合成は市販のCAS 55682-47-8（2S, 3R, 4R）-4-アジド-2-（ベンジルオキシ）-6, 8-ジオキサビシクロ[3.2.1]オクタン-3-オールから開始する）。また、N-アセチル試薬（7～9b）のN-アシル変異体への経路が詳述されている国際公開第2016/172615号パンフレットを参照されたい。

「n」が1として選択されるさらなる変形において、リンカー—スペーサー—アンチセン

ス中間体を調製し、次いで（１～４）のような試薬を利用することが有利であり得る。

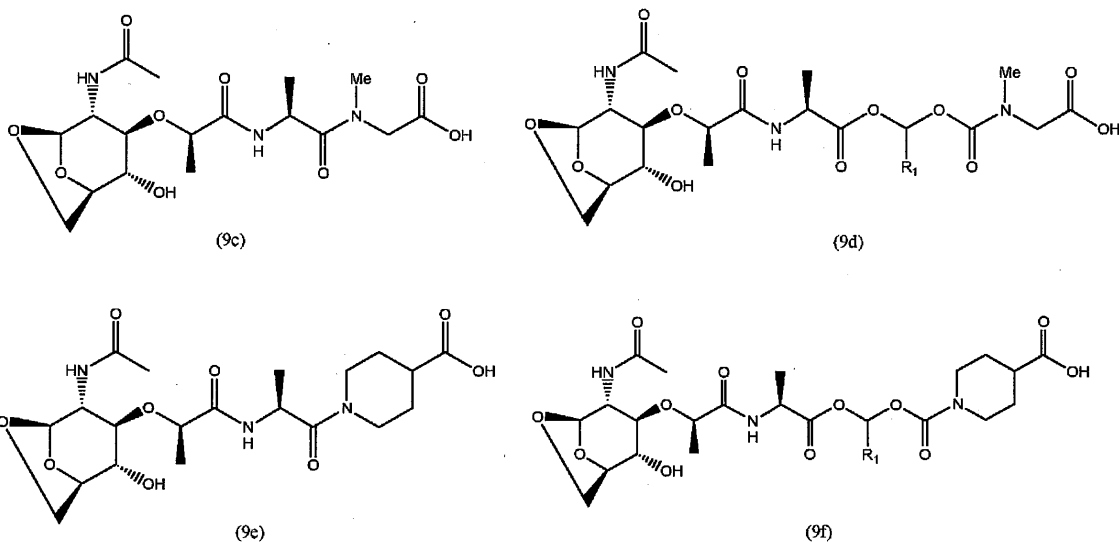
【０１７１】

「*n*」が１として選択されるさらなる変形において、スペーサー－アンチセンス中間体を調製し、次いで（７～９ｂ）のような試薬を利用することが有利であり得る。

【０１７２】

なおさらなる変形において、アンチセンス中間体を調製し、次いで（１～４、７～９ｂ又は９ｃ～ｆ）のような試薬を利用することが有利であり得る。

【化５９】



10

20

【０１７３】

「*n*」が２、３又は４として選択されるさらなる変形において、「糖試薬」（７～９ｂ）を延長し、細菌細胞壁ペプチド（*N*Ac-Mur-L-Ala-D-Glu-メソ-DAP-D-Ala）の完全な構造に対する増加した類似性を含むこれらのさらなる中間体を、その後の反応において使用することが有利であり得る。この戦術的変形においては、以下がこれらの工程に好ましい試薬（１０～１８）である。試薬１０～１８は、当業者に周知の標準的なペプチド合成方法によって、１～９などの試薬から調製することができる。

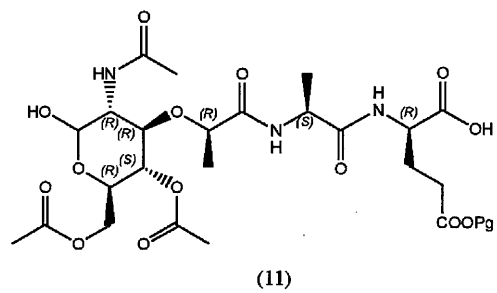
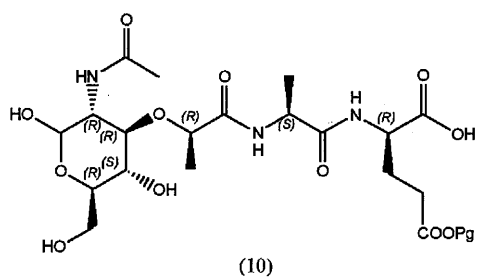
30

「糖試薬」１０～１８の末端α-カルボン酸との化学選択的反応を提供するために、D-グルタミン酸の側鎖カルボン酸官能基、及び存在する場合、メソ-ジアミノピメリン酸（DAP）の側鎖カルボン酸官能基及び側鎖アミノ官能基は、保護基Pgで保護される。好ましい保護基は、ベンジル又はtert-ブチルエステル並びにベンジルオキシカルボニル（Cbz）及びtert-ブトキシカルボニル（Boc）ウレタンである。

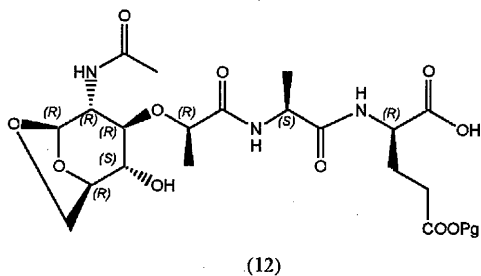
40

50

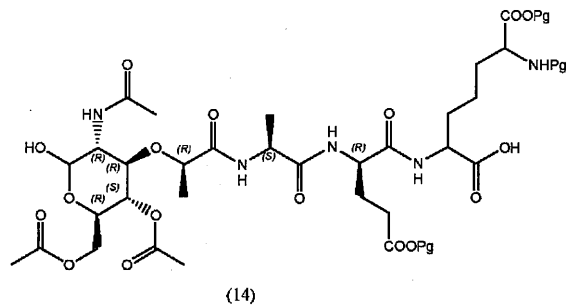
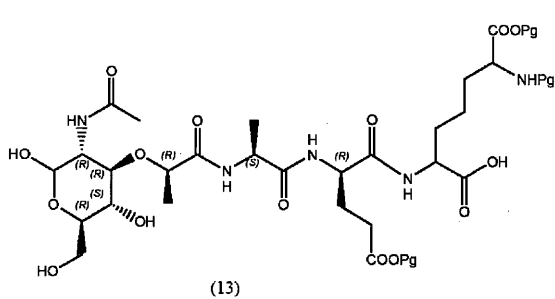
【化 6 0】



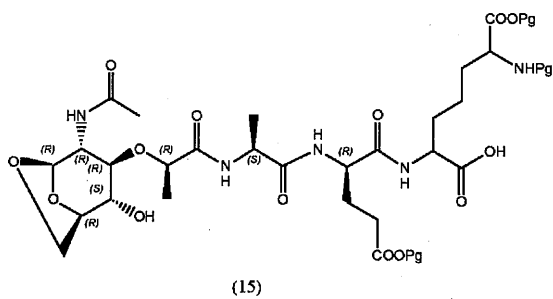
10



20



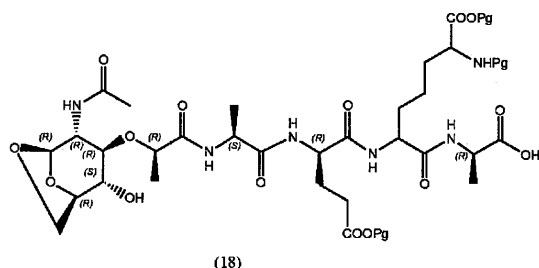
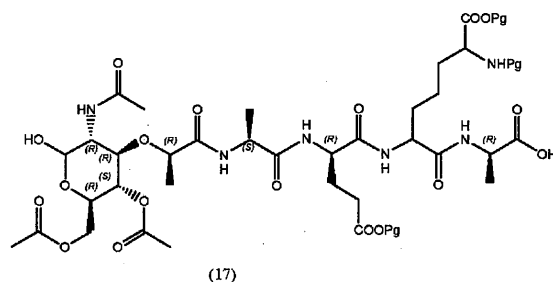
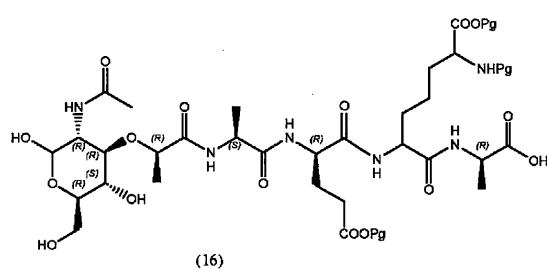
30



40

50

【化 6 1】

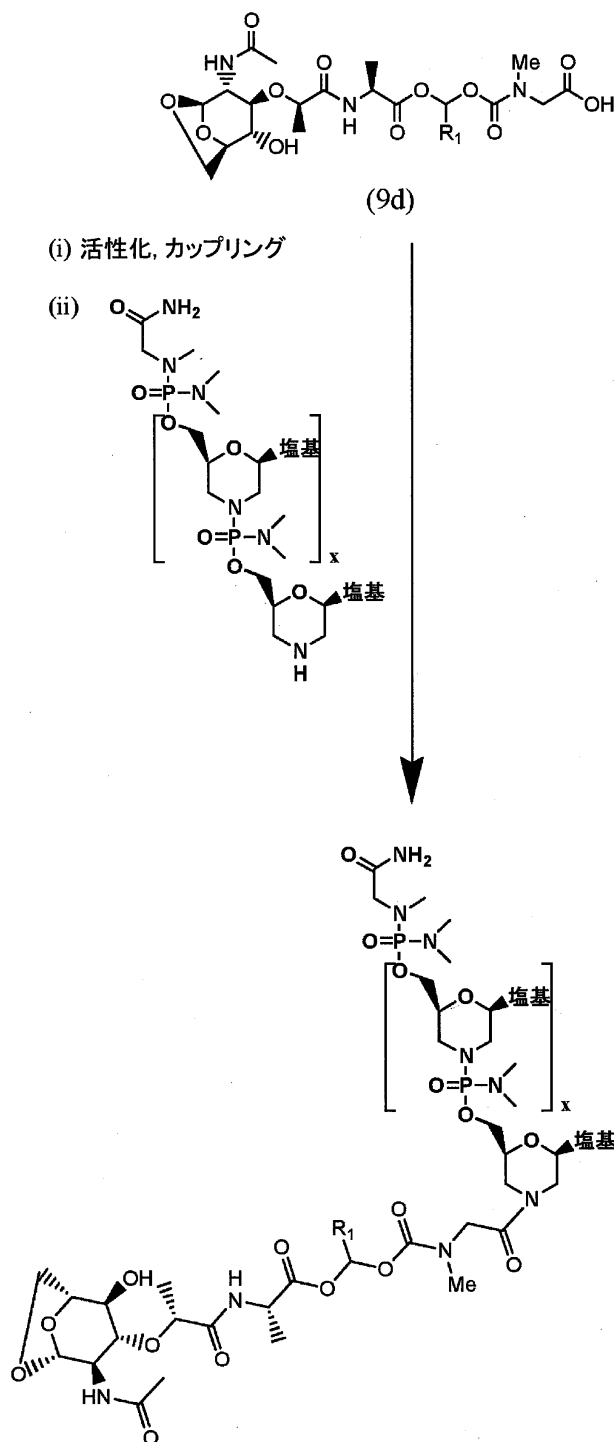


【0174】

本発明の「糖－リンカー－スパーサー－アンチセンス剤」の調製

本発明の化合物は、本明細書に提供され、スキーム3及び4に詳述される一般的な方法によって調製される。当業者は、これらの方法が決して網羅的な記載ではなく、他の経路が類似の化合物を作製するために利用可能であり得ることを認めるであろう。当業者はまた、アンチセンス剤の大部分が、化学反応に参与し得る2つ以上の官能基を含むことを認識するであろう。したがって、スキーム内で、「アンチセンス」は、核酸塩基が合成中に一時的に保護される中間体を指す。全てのスキームにおける最終工程として、保護基「PG」の選択的除去は、一般式(I)の化合物を提供する。PNAの合成例の説明については、Lee, H. et al., Org. Lett. 9 (17), 3291-3, 2007を参照されたい。PMOの合成例の説明については、Summerton, J. and Weller, D. Antisense & Nucl. Acid Drug Dev., 7, 187-195, 1997を参照されたい。PMOへの結合の例の説明については、O'Donovan, L. et al., Nucl. Acid Ther., 25 (1), 1-10, 2015を参照されたい。

【化 6 2】



【0175】

スキーム 3. 「アンチセンス」が、糖-リンカー-スパーサーによって 3' 末端でコンジュゲートされた PMO である式 (I) の化合物の一般的合成。類似の様式において、糖試薬 (9d) は、1~18 のような糖試薬によって容易に置換されて、式 (I) 内の定義の範囲をカバーする変異体を提供することができる。

10

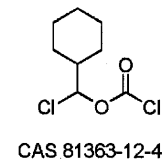


30

40

50

50



【 0 1 7 9 】

以下の実施例は、上述の本発明の製造方法及び使用方法をより完全に説明するのに役立つ。これらの実施例は、決して本発明の真の範囲を限定するのに役立たず、例示の目的で提示されることが理解される。

【 0 1 8 0 】

合成化学

以下の実施例及び合成スキームにおいて、以下の略語は以下の意味を有する。略語が定義されていない場合、それは、一般に受け入れられている意味を有する。

A c O H 酢酸

A c ₂ O 無水酢酸

10

a q 水性

B O C (B o c) N - t e r t - ブトキシカルボニル又は t e r t - ブチルオキシカルボニル

C B z カルボキシベンジル

D C E ジクロロエタン

D C M ジクロロメタン

D C M / E A ジクロロメタン / エタノール

D I P E A (o r D I E A) N , N - ジイソプロピルエチルアミン、又はヒューニッヒ塩基

20

D M E ジメトキシエタン

D M F ジメチルホルムアミド

D M P デスマーチンペルヨージン

D M S O - d 6 重水素化ジメチルスルホキシド

D M S O ジメチルスルホキシド

E C 5 0 5 0 % 有効濃度

E D T A エチレンジアミン四酢酸

E t エチル

E t ₂ O ジエチルエーテル

E t O H エタノール

E t O A c , E A , A c O E t 酢酸エチル

30

h 時間

H P L C 高速液体クロマトグラフィー

I C 5 0 5 0 % 阻害濃度

i P r O H イソプロピルアルコール又はイソプロパノール

L C M S 液体クロマトグラフィー質量分析

L D A リチウムジイソプロピルアミド

M e メチル

M e O H メタノール

N a B H (O A c) ₃ トリアセトキシホウ水素化ナトリウム

N M R 核磁気共鳴スペクトル測定法

40

P d ₂ (d b a) ₃ トリス (ジベンジリデンアセトン) ジパラジウム (0)

P E 石油エーテル又は石油

P P h ₃ トリフェニルホスフィン

P r プロピル

S F C 超臨界流体クロマトグラフィー

T 3 P 1 - プロパンホスホン酸無水物溶液、2 , 4 , 6 - トリプロピル - 1 , 3 , 5 , 2 , 4 , 6 - トリオキサトリホスホリナン - 2 , 4 , 6 - トリオキシド

T F A トリフルオロ酢酸

T H F テトラヒドロフラン

u v 紫外線

50

【0181】

1: LC-MS方法

器具: Agilent 6130 単一四重極質量分析を伴う Agilent 1260 infinity HPLC。

カラム: Phenomenex Kinetex XB-C18、50 x 4.6 mm、2.6 μm

溶出プロファイル: 下記の表を参照されたい

【0182】

【表6】

時間(分)	%水性(A) (水中 0.1% 甲酸)	%有機(B) (100% アセトニトリル)
0	95	5
1.37	2	98
1.60	2	98
1.83	95	5
2.25	95	5

10

20

【0183】

流量: 2 ml / 分; 検出器波長: 225 ± 50 nm 帯域幅; カラム温度: 40 °C

注入容量: 1 μl。

【0184】

時折、同じ条件を使用するが10分を超えるより長い勾配も使用した。

【0185】

質量分析パラメーター: ES+ / & APCI で 70 ~ 1000 m/z にわたって走査; 針

洗浄: バイアル4内での MeOH 洗浄、5回の針洗浄を行うように設定されたオートサンプラー (サンプルを注入する前に針の外側を洗浄するため; サンプル調製: 溶解度に関するサンプルの性質に応じてアセトニトリル又はDMSOのいずれか中 0.5 ~ 1.0 mg / ml)。

30

【0186】

2: 分析用NMR方法

Ultrashield マグネット & B-ACS-60 オートサンプラーを伴う Bruker Avance III 400 MHz。¹H 及び ¹³C NMR スペクトルを CDCl₃、DMSO-d₆ 及び D₂O 中で記録した。化学シフトは、Me₃Si を内部基準として使用して ppm (δ) で報告した。

【0187】

3: 分取HPLC精製

カラム Phenomenex Gemini C18、15 x 21.2 mm Security Guard を伴う Phenomenex Gemini C18、5 μm、100 x 21.2 mm。

流量 20 ml / 分 (0 ~ 14.0 分、次いで 1 ml / 分)

注入容量 500 μl の濃度約 25 mg / ml の DMSO 溶液

移動相 A: 水中 0.1% TFA

B: アセトニトリル

実行時間 14 分

勾配

40

50

【 0 1 8 8 】

【 表 7 】

時間(分)	%A	%B
0	90	10
0.6	90	10
9.0	60	40
10.5	0	100
12.0	0	100
12.2	90	10
14.0	90	10
14.4	90	10
14.5	90	10

10

【 0 1 8 9 】

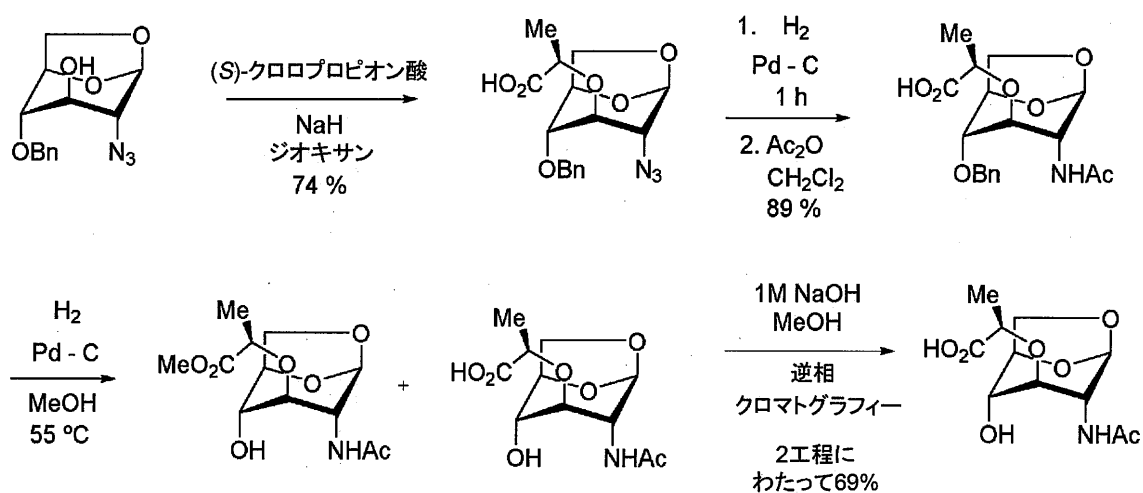
20

4. 凍結乾燥

凍結乾燥は、Mechatech LyoDry Compact (−55℃コンデンサー) 凍結乾燥機で行った。

【 0 1 9 0 】

第1部：1, 6-アンヒドロ-N-アセチルムラミン酸の合成
【化65】



30

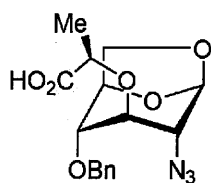
40

スキーム5. 1, 6-アンヒドロ-N-アセチルムラミン酸の合成

工程1. (R) - 2 - (((1R, 2S, 3R, 4R, 5R) - 4-アジド-2-(ベンジルオキシ) - 6, 8-ジオキサビシクロ [3. 2. 1] オクタン-3-イル) オキシ) プロパン酸の調製

50

【化 6 6】



(1R, 2S, 3R, 4R, 5R)-4-アジド-2-(ベンジルオキシ)-6, 8-ジ
 オキサビシクロ[3. 2. 1]オクタン-3-オール(200mg、0. 72mmol)
 の無水1, 4-ジオキサン(4mL)溶液に水素化ナトリウム(油中60%分散液; 19
 1mg、4. 76mmol)を加え、混合物を45℃で10分間加熱した。懸濁液を室温
 に冷却し、(S)-2-クロロプロピオン酸(188mg、148μL、1. 73mmol)
 を加え、混合物を90℃で2時間加熱した。褐色懸濁液を室温に冷却し、濃縮して淡
 褐色固体を得た。この材料を水(10mL)で慎重にクエンチし、溶液を濃塩酸でpH3
 に酸性化した。水性懸濁液をジクロロメタン(7×10mL)で抽出した。合わせた有機
 層を水(25mL)で洗浄し、乾燥(MgSO₄)、濃縮して緑色油を得た。この材料
 を、Biotage Isolera自動クロマトグラフィーシステムを使用して、順相
 条件(シリカカラム、ジクロロメタン中の0~100%メタノールの勾配)下で精製し、
 254nmで検知して、表題の酸(185mg、74%)を緑色油として得た。R_f=0
 . 40(メタノール-ジクロロメタン、8:92v/v)

10

20

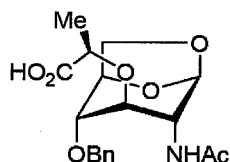
¹H NMR(400MHz, CDCl₃) δ 7. 38(m, 5H, 5×ArH), 5.
 57(m, 1H, CH), 4. 69(m, 3H, CH及びベンジルCH₂), 4. 00
 (m, 2H, 2×CH), 3. 76(dd, J=7. 5, 5. 6Hz, 1H, CH), 3.
 63(m, 1H, CH), 3. 38(m, 1H, CH), 3. 31(m, 1H, CH)
 , 1. 40(d, J=6. 9Hz, 3H, CH₃).

【0191】

工程2. (R)-2-((1R, 2S, 3R, 4R, 5R)-4-アセトアミド-2-
 -(ベンジルオキシ)-6, 8-ジオキサビシクロ[3. 2. 1]オクタン-3-イル)
 オキシ)プロパン酸の調製

30

【化 6 7】



窒素下で10% Pd-C(19mg、10% w/w)の無水メタノール(1mL)懸
 濁液に、工程1の酸(185mg、0. 53mmol)の無水メタノール(3mL)溶液
 を加え、反応混合物を水素雰囲気下で1時間15分間攪拌した。懸濁液をセライトを通し
 て濾過し、濾液を濃縮して白色固体(172mg)を得た。この材料を無水ジクロロメタ
 ン(3. 8mL)に溶解し、無水酢酸(1. 56mL)を加え、反応混合物を室温で一晩
 攪拌した。溶液を濃縮し、残留物をジクロロメタン(10mL)と水との間で分配した。
 層を分離し、水層をジクロロメタン(2×10mL)で抽出した。合わせた有機層を飽和
 ブライン(25mL)で洗浄し、乾燥(MgSO₄)し、濃縮して無色油を得た。この材
 料を、Biotage Isolera自動クロマトグラフィーシステムを使用して、順
 相条件(シリカカラム、ジクロロメタン中0~100%メタノールの勾配)下で精製し、
 254nmで検知して、標題の酸(173mg、89%)を白色泡状物として得た。

40

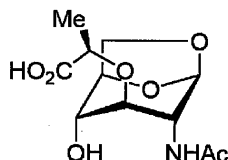
50

LCMS $r.t. = 7.5 \text{ min}$, ESI-MS (m/z): 364 $[M-H]^-$
 $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.34 (m, 5H, $5 \times \text{ArH}$), 6.17 (d, $J = 6.9 \text{ Hz}$, 1H, NH), 5.34 (m, 1H, CH), 4.61 (m, 3H, CH及びベンジル CH_2), 4.23 (q, $J = 6.8 \text{ Hz}$, 1H, CH), 4.12 (m, 2H, $2 \times \text{CH}$), 3.72 (dd, $J = 7.3, 5.9 \text{ Hz}$, 1H, CH), 3.47 (m, 1H, CH), 3.39 (m, 1H, CH), 1.94 (s, 3H, CH_3), 1.41 (d, $J = 6.9 \text{ Hz}$, 3H, CH_3).

【0192】

工程3. 1, 6-アンヒドロ-N-アセチルムラミン酸の調製

【化68】



窒素下で10% Pd-C (26 mg、15% w/w) のメタノール (1 mL) 懸濁液に、工程2の酸 (171 mg、0.47 mmol) のメタノール (3 mL) 溶液を加え、反応混合物を水素雰囲気下、55℃で4時間加熱した。この懸濁液を室温に冷却し、セラライトを通して濾過し、濾液を濃縮して白色固体 (136 mg、1, 6-アンヒドロ-N-アセチルムラミン酸と1, 6-アンヒドロ-N-アセチルムラミン酸メチルエステルの混合物) を得た。この材料をメタノール (4 mL) に溶解し、NaOH (4 mL) の1 M水溶液を加え、混合物を室温で1時間攪拌した。メタノールを除去し、水溶液を濃塩酸でpH3に酸性化した。この材料を、Biotage Isolera自動クロマトグラフィースystemを使用して逆相条件下 (C18カラム、水中10~100%アセトニトリルの勾配) で精製し、210 nmで検知して、1, 6-アンヒドロ-N-アセチルムラミン酸 (87 mg、67%) を白色固体として得た。

LCMS $r.t. = 1.3 \text{ min}$ ESI-MS (m/z): 276.00 $[M+H]^+$
 $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CD_3CN) δ 6.76 (d, $J = 8.7 \text{ Hz}$, 1H, NH), 5.51 (m, 1H, CH), 4.68 (m, 1H, CH), 4.44 (q, $J = 6.9 \text{ Hz}$, 1H, CH), 4.30 (dd, $J = 7.4, 1.0 \text{ Hz}$, 1H, CH), 4.05 (m, 1H, CH), 3.85 (m, 2H, $2 \times \text{CH}$), 3.56 (m, 1H, CH), 2.10 (s, 3H, CH_3), 1.56 (d, $J = 6.9 \text{ Hz}$, 3H, CH_3).

【0193】

第2部: ((R)-2-(((1R, 2S, 3R, 4R, 5R)-4-アセトアミド-2-ヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ[3.2.1]オクタン-3-イル)オキシ)プロパノイル)-L-アラニン; (1, 6-アンヒドロ-N-アセチルムラミン酸-L-アラニン) の合成

10

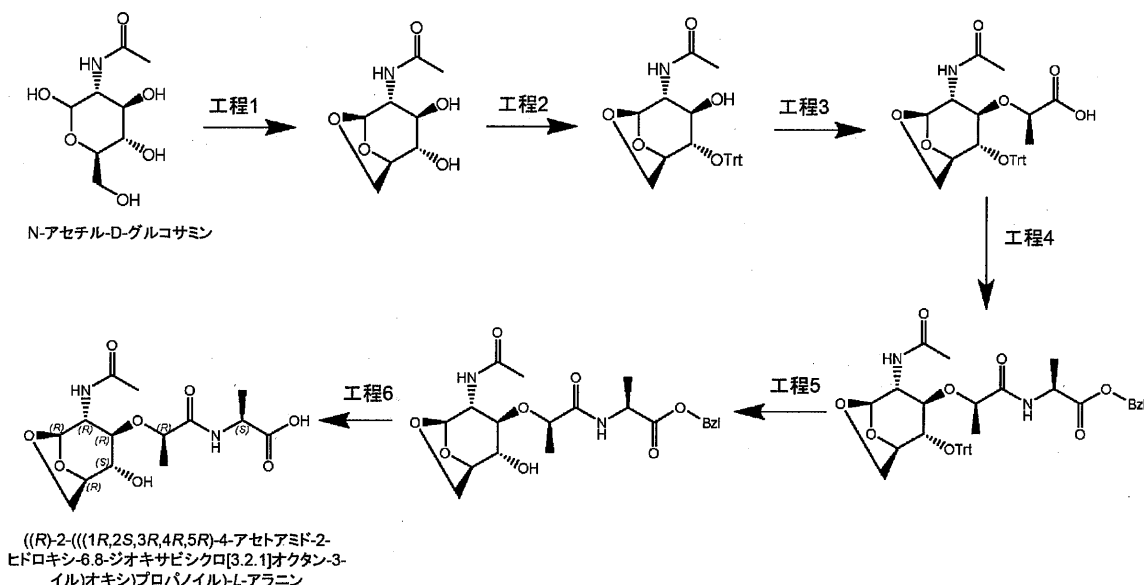
20

30

40

50

【化 6 9】



10

20

30

40

50

スキーム 6. 1, 6-アンヒドロ-N-アセチルムラミン酸-L-アラニンの合成

工程 1. N-((1R, 2S, 3R, 4R, 5R)-2, 3-ジヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ[3. 2. 1]オクタン-4-イル)アセトアミドの調製

0～5℃のピリジン(300ml)中のN-アセチル-D-グルコサミン(30.0g、136mmol)の攪拌懸濁液に、4-tert-ブチルエンシルホニルクロリド(31.0g、163mmol)のピリジン(200ml)溶液を1時間かけて滴加した。反応物を0～5℃で4時間攪拌した。MeOH(20ml)を一度に加え、溶媒を真空中で除去した。得られた褐色の粘稠な油をエタノール(1L)に取り、DBU(52.5ml、407mmol)を一度に加えた。この混合物を室温で一晩攪拌した後、真空中で濃縮した(水浴温度<50℃)。褐色の粘稠な油状残留物を、シリカ上のフラッシュクロマトグラフィー(溶離液: EtOAc中5%、次いで10% MeOH)によって2つの等しいバッチで精製した。主に所望の生成物を含む画分(TLCにより判定)を合わせ、真空中で濃縮して、灰白色固体を得た。NMRは、この材料が少量の芳香族不純物を含むことを示す。この材料をMeOHから再結晶した。氷浴中で冷却した後、標題化合物を真空濾過によって白色固体として単離し、少量の冷MeOHで洗浄し、真空オーブン中で40℃で3時間乾燥した(13.8g、収率50.6%)。

¹H NMR(400MHz, メタノール-d₄) δ 5.25(s, 1H), 4.48(d, J=5.6Hz, 1H), 4.18(dd, J=7.2, 0.8Hz, 1H), 3.83(s, 1H), 3.68(dd, J=7.2, 6.0Hz, 1H), 3.56-3.54(m, 2H), 1.98(s, 3H)

【0194】

工程 2. N-((1R, 2S, 3R, 4R, 5R)-3-ヒドロキシ-2-(トリチルオキシ)-6, 8-ジオキサビシクロ[3. 2. 1]オクタン-4-イル)アセトアミドの調製

工程 1 のアミド(8.5g、41.8mmol)のDCM(300ml)懸濁液に、室温で2, 4, 6-トリメチルピリジン(10.15g、83.5mmol)を一度に加えた。トリフェニルメタノール(16.3g、62.5mmol)のDCM(200ml)溶液に、窒素下でTMSOTf(12.1ml、62.5mmol)を一度に加えた。得られた橙色/褐色溶液を、窒素雰囲気下で攪拌しながら、15分間かけてアミド溶液に滴加した。1時間後、反応物をピリジン(10ml)、続いてメタノール(20ml)でクエンチし、クロロホルム(800ml)を加えた。この溶液を水(300ml)、1M H

Cl (300 mL × 2)、飽和 NaHCO₃ 溶液 (300 mL)、及び水 (300 mL) で抽出した。有機相を硫酸ナトリウム上で乾燥し、濾過し、真空中で濃縮して、灰白色固体を得た。これをシリカ上のフラッシュカラムクロマトグラフィー (溶離液 1 : 1 EtOAc - ヘキサン、生成物による TrOH の溶離まで、次いで 100 % EtOAc) によって精製した。純粋な画分 (TLC で判断) を合わせ、真空中で濃縮して、白色泡状物を得た。

【0195】

この手順を同一の様式で繰り返し、生成物を合わせた。

【0196】

合わせた生成物を 1 : 1 ジエチルエーテル - ヘキサン (100 mL) で粉碎して、標題化合物を白色粉末固体として得、これを真空濾過によって単離し、40 °C 真空オーブン中で一晩乾燥した (16.8 g、2 つのバッチにわたって収率 45 %)

¹H NMR (400 MHz, アセトン-d₆) δ 7.57 - 7.54 (m, 6 H), 7.38 - 7.33 (m, 6 H), 7.31 - 7.27 (m, 3 H), 6.66 (d, J = 8.5 Hz, 1 H), 5.18 (s, 1 H), 4.08 (d, J = 4.4 Hz, 1 H), 3.93 (dd, J = 7.2, 0.8 Hz, 1 H), 3.75 - 3.71 (m, 2 H), 3.66 (s, 1 H), 3.35 - 3.34 (m, 1 H), 3.29 (dd, J = 6.8, 6.0 Hz, 1 H), 1.95 (s, 3 H)

【0197】

工程 3. (R) - 2 - (((1 R, 2 S, 3 R, 4 R, 5 R) - 4 - アセトアミド - 2 - (トリチルオキシ) - 6, 8 - ジオキサビシクロ [3.2.1] オクタン - 3 - イル) オキシ) プロパン酸の調製

工程 2 のアミド (4.00 g、8.98 mmol) の無水ジオキサン (60 mL) 中の攪拌溶液に、室温で NaH (分散油中 60 %) (2.32 g、60.6 mmol) を少量ずつ、窒素雰囲気下で 15 分かけて加えた。得られた懸濁液を 45 °C に 10 分間加熱し、室温に冷却させた。(2 S) - 2 - クロロプロパン酸 (2.06 mL、22.4 mmol) を、10 分間かけて注射器で窒素下で滴加した。次いで、混合物を 90 °C に 1.5 時間加熱し、室温に冷却させた。溶媒を真空中で除去した。残留物に氷冷水 (100 mL) を発泡が停止するまで最初に滴加した。得られた溶液を 2 M HCl 溶液で pH 3 に酸性化し、濃厚な白色固体を沈殿させた。これを EtOAc (2 × 100 mL) 中に抽出した。抽出物を硫酸ナトリウム上で乾燥し、濾過し、真空中で濃縮して、灰白色泡状固体を得た。粗生成物をシリカ上のフラッシュカラムクロマトグラフィー (溶離液 EtOAc 中 5 % MeOH + 0.1 % AcOH) により精製した。純粋な画分 (TLC 分析により判定) を合わせ、減圧濃縮して白色泡状物を得、これをヘキサン中の 5 % ジエチルエーテルで粉碎して、標題化合物を白色粉末固体 (3.98 g、収率 85 %) として得た。[α]_D = -51.3 ° (クロロホルム中 c = 0.0115, 20.8 °C)。

LCMS: 純度 96.7 %; RT = 1.720 min; C₃₀H₃₁NO₇ [M - H]⁻ の m/z 計算値 516, 実測値 516

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 12.14 (s, 1 H), 7.60 (br d, J = 6.4 Hz, 1 H), 7.48 - 7.46 (m, 6 H), 7.37 - 7.27 (m, 9 H), 5.22 (s, 1 H), 3.74 - 3.68 (m, 3 H), 3.59 (d, J = 6.0 Hz, 1 H), 3.49 (s, 1 H), 3.32 (s, 1 H), 3.25 - 3.33 (m, 1 H, 溶媒水ピークにより不明瞭), 1.93 (s, 3 H), 1.06 (d, J = 6.8 Hz, 3 H);

【0198】

工程 4. ベンジル ((R) - 2 - (((1 R, 2 S, 3 R, 4 R, 5 R) - 4 - アセトアミド - 2 - (トリチルオキシ) - 6, 8 - ジオキサビシクロ [3.2.1] オクタン - 3 - イル) オキシ) プロパノイル) - L - アラニネートの調製

工程 3 の酸 (8.00 g、15.5 mmol) 及び L - アラニン - OBzl (3.67 g、17.0 mmol) を室温で DMF (150 mL、0.1 M) に溶解した。次いで、D

10

20

30

40

50

IEA (8.88 mL、51.0 mmol) 及び HATU (6.47 g、17.0 mmol) を加え、混合物を室温で 18 時間攪拌した。この反応混合物を氷水 (2 L) に加え、得られた白色沈殿をエーテル中の 20% EtOAc (3×300 mL) で抽出した。合わせた抽出物をブライン (2×300 mL) で洗浄し、硫酸ナトリウム上で乾燥し、濾過し、真空中で濃縮して、白色泡状物を得た。これをシリカ上のフラッシュカラムクロマトグラフィー (溶離液: ヘキサン中 50%~75% EtOAc 勾配) により精製した。TLC による純粋な画分を合わせ、真空中で濃縮した。白色泡状体生成物をジエチルエーテル中の 10% EtOAc で粉碎し、真空濾過により単離して、表題化合物を白色固体 (9.13 g、87%) として得た。

LCMS: 純度 100%; RT=6.55 min; $C_{40}H_{42}N_2O_8$ [M-H]⁻ の m/z 計算値 677, 実測値 677

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.85 (d, J=8.0 Hz), 7.50-7.47 (m, 6H), 7.36-7.29 (m, 14H), 5.37 (s, 1H), 5.15-5.07 (m, 2H), 4.64-4.56 (1H, m), 4.04 (d, J=7.6 Hz, 1H), 3.98 (d, J=9.2 Hz, 1H), 3.78-3.73 (m, 2H), 3.68 (s, 1H), 3.45 (dd, J=7.6 Hz 及び 6.0 Hz, 1H), 3.12 (s, 1H), 2.01 (s, 3H), 1.39 (d, J=7.2 Hz, 3H), 1.15 (d, J=6.8 Hz, 3H)

【0199】

工程 5. ベンジル ((R)-2-((1R, 2S, 3R, 4R, 5R)-4-アセトアミド-2-ヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ [3.2.1] オクタン-3-イル) オキシ) プロパノイル)-L-アラニネートの調製

工程 4 のエステル (8.50 g、12.5 mmol) の DCM (165 mL) 溶液に、TFA (9.30 mL、125 mmol) を室温で一度に加えた。この溶液を室温で 3 時間攪拌した。溶液を攪拌濃 NaHCO₃ 溶液 (500 mL) に非常にゆっくりと加え、DCM (2×250 mL) で抽出した。粗生成物をシリカ上のフラッシュカラムクロマトグラフィー (溶離液: EtOAc 中 5~10% MeOH) により精製した。純粋な画分 (TLC により判定) を合わせて、表題化合物を白色泡状物 (5.05 g、収率 92%) として得た。

LCMS: 純度 98.1%; RT=1.402 min; $C_{21}H_{28}N_2O_8$ [M+H]⁺ の m/z 計算値 437, 実測値 437

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.84 (d, J=8.0 Hz, 1H), 7.37-7.31 (m, 5H), 6.22 (d, J=9.2 Hz, 1H), 5.41 (s, 1H), 5.20-5.12 (m, 2H), 4.67-4.59 (1H, m), 4.52 (d, J=5.2 Hz, 1H), 4.26 (d, J=7.2 Hz, 1H), 4.17-4.05 (m, 2H), 3.99 (d, J=9.2 Hz, 1H), 3.76-3.73 (m, 2H), 3.44 (s, 1H), 2.86 (br s, 1H), 1.98 (s, 3H), 1.44 (d, J=7.2 Hz, 3H), 1.38 (d, J=6.8 Hz, 3H)

【0200】

工程 6. ((R)-2-((1R, 2S, 3R, 4R, 5R)-4-アセトアミド-2-ヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ [3.2.1] オクタン-3-イル) オキシ) プロパノイル)-L-アラニンの調製

工程 5 のエステル (3.58 g、8.20 mmol) の EtOH (100 mL) 溶液に、4 滴の水で湿らせた Pd/C (10.0%、0.437 g、0.410 mmol) を加えた。この混合物を水素 (50 PSI) 下、室温で一晩、スチールオートクレーブ中で攪拌した。反応混合物をセライトの短いパッドを通して濾過し、フィルターケーキをエタノールで洗浄した。濾液を真空中で濃縮して、無色の粘稠なガラス固体を得た。この材料をジエチルエーテルで粉碎 (超音波処理) した。沈殿を真空濾過により単離し、40℃真空オーブン中で一定量まで乾燥して、表題化合物を白色粉末固体 (2.62 g、92%) とし

て得た。[α] = -49.4° (MeOH中、 c = 0.0115、20.8°C)。
 LCMS：純度100%；RT = 0.963 min； $C_{14}H_{22}N_2O_8$ [M+H]⁺
 の m/z 計算値347；¹H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12.54
 (br s, 1H), 7.70 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.63 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 5.29 (s, 1H), 5.24 (br s, 1H), 4.48 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 4.29–4.23 (m, 1H), 4.12–4.02 (m, 2H), 3.69 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 3.61 (dd, J = 7.2 Hz 及び 6.0 Hz, 1H), 3.53 (s, 1H), 3.26 (シグナルは溶媒水ピークにより不明瞭), 1.98 (s, 3H), 1.29 (d, J = 7.2 Hz, 3H), 1.24 (d, J = 6.8 Hz, 3H)。実測値 347

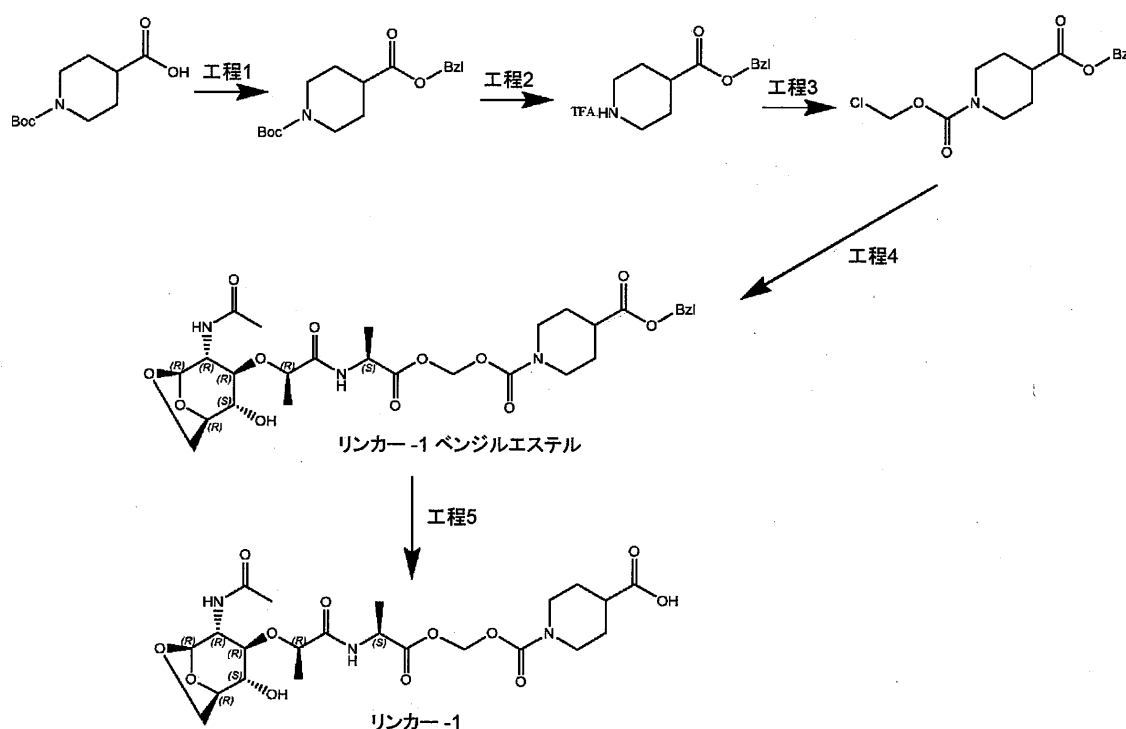
10

【0201】

第3部：リンカーの調製

(a) リンカー-1の合成

【化70】



20

30

スキーム7. リンカー-1の合成

工程1. 4-ベンジル 1-(tert-ブチル)ピペリジン-1,4-ジカルボキシレートの調製

1-tert-ブトキシカルボニルピペリジン-4-カルボン酸 (7.00 g、30.5 mmol) のDMF (70 mL) 懸濁液に、 K_2CO_3 (11.0 g、79.4 mmol)、続いて塩化ベンジル (5.02 g、39.7 mmol) を加えた。反応物を室温で4日間攪拌した。混合物を冷水 (1.5 L) に注ぎ、ジエチルエーテル (2×300 mL) で抽出した。抽出物をブラインで洗浄し、真空中で濃縮して、無色油を得た。粗生成物をシリカ上のフラッシュカラムクロマトグラフィー (溶離液：ヘキサン中10～50% EtOAc 勾配) により精製して、標題化合物を無色油 (9.50 g、収率97%) として得た。

40

LCMS：純度95%；RT = 6.20 min； $C_{18}H_{25}NO_4$ [M+H-Boc]⁺
 の m/z 計値220；¹H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.38–7.32 (m, 5H), 5.12 (s, 2H), 4.01 (br d, J = 10.4 Hz, 2

50

H), 2.82 (t, J=12 Hz, 2H), 2.53–2.46 (m, 1H), 1.88 (m, 2H), 1.69–1.59 (m, 2H), 1.45 (s, 9H)

【0202】

工程2. ベンジルピペリジン-4-カルボキシレートトリフルオロ酢酸塩の調製

DCM (120 mL) 中の工程1のエステル (9.40 g、29.4 mmol) の攪拌溶液に、TFA (13.1 mL、177 mmol) を一度に加えた。得られた黄色溶液を18時間攪拌した。溶媒を真空中で除去し、残留物をトルエン (2×50 mL) と共蒸発させて、TFA 痕跡量を除去した。表題化合物 (淡黄色粘稠油、11.8 g、120%) を精製せずに次の工程で使用した。

LCMS: 純度83%; RT=2.81 min; 遊離塩基 C₁₃H₁₇NO₂ [M+H]⁺ の m/z 計算値220, 実測値220

10

【0203】

工程3. 4-ベンジル1-(クロロメチル)ピペリジン-1,4-ジカルボキシレートの調製

DCM (60 mL) 中の工程2の塩 (3.27 g、9.81 mmol) の攪拌溶液に、TEA (2.73 mL、19.6 mmol) を一度に加えた。得られた黄色溶液を氷/水浴中で冷却し、クロロメチルカルボノクロリデート (0.960 mL、10.8 mmol) を窒素雰囲気下で攪拌しながら15分間かけて滴加した。この混合物を室温に温め、18時間攪拌した。溶媒を真空中で除去し、残留物をDCM (150 mL) に取った。この溶液を1M HCl (50 mL) 及び濃重炭酸ナトリウム溶液 (50 mL) で洗浄し、硫酸ナトリウム上で乾燥した。溶液を真空中で濃縮して、標題化合物を無色粘稠油 (2.35 g、76%) として得た。

20

LCMS: 純度97%; RT=5.71 min; m/z 計算値 C₁₅H₁₈ClNO₄ [M+H]⁺ 312, 実測値312; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.38–7.30 (m, 5H), 5.16 (d, J=7.6 Hz, 2H), 5.13 (s, 2H), 4.13–3.99 (m, 2H), 3.10–2.91 (m, 2H), 2.60–2.50 (m, 1H), 2.03–1.85 (m, 2H), 1.85–1.61 (m, 2H)

【0204】

工程4. リンカー-1ベンジルエステルの調製

30

工程3のエステル (0.250 g, 0.722 mmol) 及び Cs₂CO₃ (0.259 g, 0.794 mmol) の無水DMF (4 mL) 懸濁液に、第2部の工程6の酸 ((R)-2-((1R,2S,3R,4R,5R)-4-アセタミド-2-ヒドロキシ-6,8-ジオキサビシクロ[3.2.1]オクタン-3-イル)オキシ)プロパノイル)-L-アラニン (0.225 g, 0.722 mmol) を一度に加えた。反応混合物を冷水 (100 mL) に注ぎ、EtOAc (3×30 mL) で抽出した。抽出物をブライン (2×50 mL) で洗浄し、硫酸ナトリウム上で乾燥した。粗生成物をシリカ上のフラッシュカラムクロマトグラフィー (溶離液: EtOAc 中の5~10% MeOH) によって精製して、標題化合物を無色粘稠油 (259 mg、57%) として得た。

LCMS: 純度100%; RT=4.85 min; m/z 計算値 C₂₉H₃₉N₃O₁₂ [M+H]⁺ 622, 実測値622; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.73 (d, J=7.6 Hz, 1H), 7.38–7.30 (m, 5H), 6.19 (d, J=9.2 Hz, 1H), 5.79 (br s, 1H), 5.72 (d, J=5.6 Hz, 1H), 5.41 (s, 1H), 5.12 (s, 2H), 4.57 (d, J=5.6 Hz, 1H), 4.50–4.42 (m, 1H), 4.28 (d, J=7.6 Hz, 1H), 4.09–4.02 (m, 4H), 3.81 (dd, J=7.2 Hz 及び 5.6 Hz, 1H), 3.74 (s, 1H), 3.46 (s, 1H), 3.15 (br d, J=10.4 Hz, 1H), 3.06–2.90 (m, 3H), 2.58–2.50 (m, 1H), 2.02–1.83 (m, 5H), 1.85–1.58 (m, 2H), 1.45 (d, J=7.2 Hz, 3H), 1.36 (d, J=6.8 Hz, 3H)

40

50

【0205】

工程5. リンカー-1の調製

工程4のエステル(0.220g、0.354mmol)のEtOH(10ml)溶液に、水滴で湿らせたPd/C(10.0%、0.0377g、0.0354mmol)を加えた。混合物を水素(50PSI)下、室温で18時間攪拌した。混合物をセライトのパッドを通して濾過し、濾過ケーキをEtOH(2×10ml)で洗浄した。濾液を真空中で濃縮し、残留物をEtOAc(5ml)で粉砕して、表題化合物を白色固体として得た(128mg、68%)

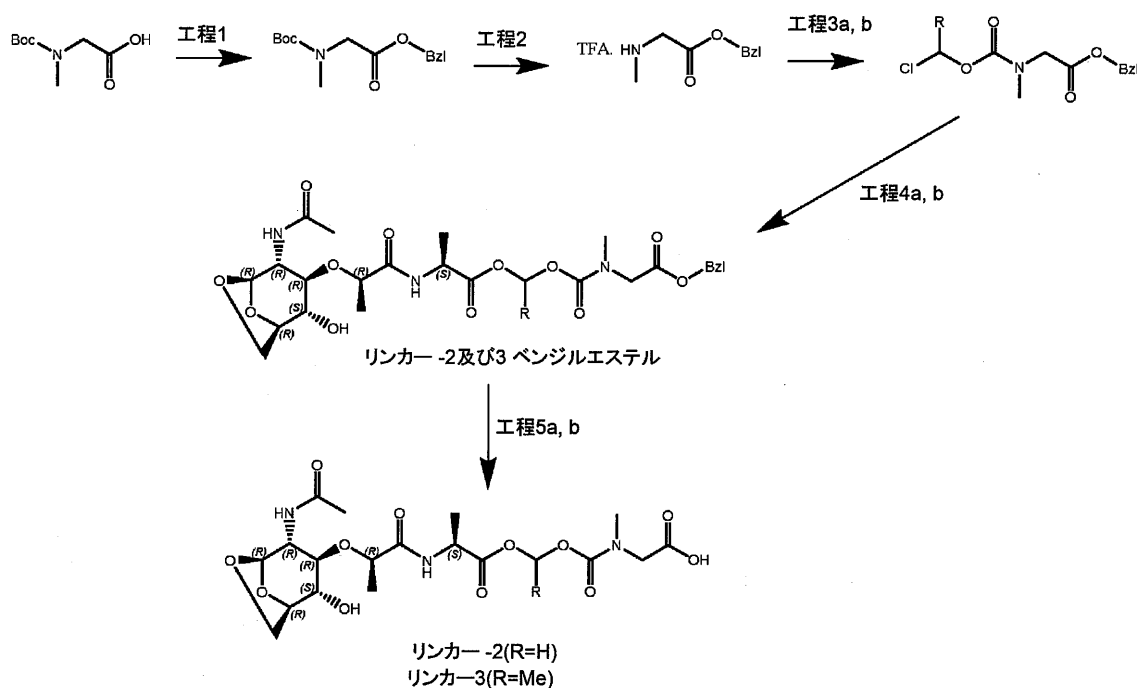
LCMS: 純度100%; RT=1.19min; m/z 計算値 C₂₂H₃₃N₃O₁₂ [M+H]⁺ 532, 実測値532

¹H NMR (400MHz, MeOD-d₄) δ 8.19 (d, J=7.6Hz, 1H), 5.88–5.73 (m, 2H), 5.39 (s, 1H), 4.56 (d, J=5.2Hz, 1H), 4.51–4.42 (m, 2H), 4.25 (d, J=7.2Hz, 1H), 4.20–4.15 (m, 1H), 4.00 (br d, J=13.6Hz, 2H), 3.09 (s, 1H), 3.72 (dd, J=7.6及び6.0Hz, 1H), 3.69 (d, J=1.2Hz, 1H), 3.41–3.40 (m, 1H), 2.57–2.49 (m, 1H), 1.90 (s, 3H), 2.00–1.82 (br s, 1H), 1.68–1.50 (m, 2H), 1.43 (d, J=7.2Hz, 3H), 1.35 (d, J=6.8Hz, 3H)

【0206】

(b) リンカー-2及びリンカー-3の合成

【化71】



スキーム8. リンカー-2及びリンカー-3の合成

工程1. ベンジルN-(tert-ブトキシカルボニル)-N-メチルグリシネートの調製

2-[tert-ブトキシカルボニル(メチル)アミノ]酢酸(7.00g、37.0mmol)のDMF(70mL)懸濁液に、K₂CO₃(13.3g、96.2mmol)、続いて臭化ベンジル(8.23g、48.1mmol)を加えた。反応物を室温で3日間攪拌した。この混合物を冷水(1.5L)に注ぎ、ジエチルエーテル(2×200ml

）で抽出した。抽出物をブラインで洗浄し、真空中で濃縮して、無色油を得た。粗生成物をシリカ上のフラッシュカラムクロマトグラフィー（溶離液：ヘキサン中10～50% EtOAc 勾配）により精製して、標題化合物を無色油（10.0 g、96.8%収率）として得た。

LCMS：純度100%；RT=1.77min； m/z 計算値 $C_{15}H_{21}NO_4$ [M+H-BoC]⁺ 180；¹H NMR（400MHz，CDCl₃） δ 7.42–7.29（m，5H），5.17（d，J=3.6Hz，2H），4.02（s，1H），3.93（s，1H），2.92（d，J=9.6Hz，3H），1.46–1.37（app d，9H）

【0207】

工程2. ベンジルメチルグリシネート・トリフルオロ酢酸塩の調製。

DCM（30ml）中の工程1のエステル（2.00g、7.16mmol）の攪拌溶液に、TFA（3.19ml、43.0mmol）を一度に加えた。得られた黄色溶液を18時間攪拌した。溶媒を真空中で除去し、残留物をトルエン（2×20ml）と共蒸発させて、TFA痕跡量を除去した。表題化合物を無色粘稠油（2.69g、128%）として、精製せずに次の工程で使用した。

LCMS：純度92.8%；RT=0.87min；遊離塩基 $C_{10}H_{13}NO_2$ [M+H]⁺ の m/z 計算値180，実測値 180；¹H NMR（400MHz，CDCl₃） δ 7.40–7.25（m，5H），5.20（s，2H），5.10–4.00（br s，2H），3.87（s，2H），2.80（s，3H）

【0208】

工程3a. ベンジルN-（（クロロメトキシ）カルボニル）-N-メチルグリシネートの調製

DCM（30ml）中の工程2の塩（2.10g、7.16mmol）の攪拌溶液に、TEA（2.00ml、14.3mmol）を一度に加えた。得られた黄色溶液を氷/水浴中で冷却し、クロロメチルカルボノクロリデート（0.700ml、7.88mmol）を窒素雰囲気下で攪拌しながら15分間かけて滴加した。混合物を室温に温め、18時間攪拌した。溶媒を真空中で除去し、残留物をDCM（150ml）に取った。この溶液を1M HCl（50ml）及び濃重炭酸ナトリウム溶液（50ml）で洗浄し、硫酸ナトリウム上で乾燥した。溶液を真空中で濃縮して、標題化合物を無色粘稠油（1.49g、76%）として得た。

LCMS：純度98.7%；RT=5.32min； $C_{12}H_{14}ClNO_4$ [M+H]⁺ の m/z 計算値272，実測値272；¹H NMR（400MHz，CDCl₃） δ 7.42–7.28（m，5H），5.79（s，1H），5.71（s，1H），5.18（d，J=2.4Hz，2H），4.10（s，1H），4.04（s，1H），3.02（d，J=8.8Hz，3H）。

【0209】

工程3b. ベンジルN-（（1-クロロエトキシ）カルボニル）-N-メチルグリシネートの調製

DCM（30ml）中の工程2のエステル（2.50g、8.95mmol）の攪拌溶液に、TFA（3.99ml、53.7mmol）を一度に加えた。得られた黄色溶液を18時間攪拌した。溶媒を真空中で除去し、残留物をトルエン（2×20ml）と共蒸発させて、TFA痕跡量を除去した。粗TFA塩生成物をDCM（50ml）に取り、TEA（2.49ml、17.9mmol）を一度に加えた。溶液を氷/水浴中で冷却し、1-クロロエチルカルボノクロリデート（1.06ml、9.84mmol）を窒素雰囲気下で攪拌しながら15分間かけて滴加した。混合物を室温に温め、18時間攪拌した。溶媒を真空中で除去し、残留物をDCM（150ml）に取った。この溶液を1M HCl（50ml）及び濃重炭酸ナトリウム溶液（50ml）で洗浄し、硫酸ナトリウム上で乾燥した。溶液を真空中で濃縮して、標題化合物を淡褐色の粘稠油（2.43g、95%）として得た。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.42–7.28 (m, 5H), 6.58–6.50 (m, 1H), 5.23–5.15 (m, 2H), 4.27–4.12 (m, 1H), 3.97–3.89 (m, 1H), 3.01 (d, $J=7.2\text{ Hz}$, 3H), 1.82 (d, $J=6.0\text{ Hz}$, 1.5H), 1.68 (d, $J=5.6\text{ Hz}$, 1.5H)

【0210】

工程4a. ((2-(ベンジルオキシ)-2-オキソエチル)(メチル)カルバモイル)オキシ)メチル((R)-2-(((1R, 2S, 3R, 4R, 5R)-4-アセトアミド-2-ヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ[3.2.1]オクタン-3-イル)オキシ)プロパノイル)-L-アラニレートの調製

第2部の工程6の酸(0.150g、0.43mmol)及び Cs_2CO_3 (0.155g、0.47mmol)の無水DMF(2.5mL)懸濁液に、工程3aの塩化物(0.129g、0.47mmol)を一度に加えた。懸濁液を室温で20時間攪拌した。反応混合物を冷水(60mL)に注ぎ、EtOAc(3×30mL)で抽出した。抽出物をブライン(2×50mL)で洗浄し、硫酸ナトリウム上で乾燥した。粗生成物をシリカ上のフラッシュカラムクロマトグラフィー(溶離液: EtOAc中の5~10% MeOH)によって精製して、標題化合物を無色粘稠油(168mg、66%)として得た。

LCMS 純度97.0%; RT=1.45min; $\text{C}_{26}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_{12}$ [M+H]⁺のm/z 計算値582, 実測値582; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.01 (br s, 1H), 7.75–7.33 (m, 5H), 6.19 (d, $J=9.2\text{ Hz}$, 0.5H), 6.12 (d, $J=9.2\text{ Hz}$, 0.5H), 5.79 (s, 1H), 5.72 (q, $J=5.6\text{ Hz}$, 1H), 5.41 (s, 1H), 5.18 (app d, $J=8.4\text{ Hz}$, 2H), 4.60–4.47 (m, 2H), 4.32–4.27 (m, 1H), 4.20–3.95 (m, 5H), 3.80 (dd, $J=7.6\text{ Hz}$ 及び 6.0 Hz , 1H), 3.74 (d, $J=7.6\text{ Hz}$, 1H), 3.44 (d, $J=8.4\text{ Hz}$, 1H), 2.99 (s, 3H), 2.78 (br s, 1H), 1.98 (s, 3H), 1.47–1.43 (m, 3H), 1.43–1.38 (m, 3H)

【0211】

工程4b. ((2-(ベンジルオキシ)-2-オキソエチル)(メチル)カルバモイル)オキシ)エチル((R)-2-(((1R, 2S, 3R, 4R, 5R)-4-アセトアミド-2-ヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ[3.2.1]オクタン-3-イル)オキシ)プロパノイル)-L-アラニレートの調製

第2部の工程6の酸(0.150g、0.433mmol)及び Cs_2CO_3 (0.169g、0.520mmol)の無水DMSO(0.5mL)懸濁液に、工程3bの塩化物(0.148g、0.520mmol)を一度に加えた。懸濁液を室温で20時間攪拌した。反応混合物を冷水(50mL)に注ぎ、EtOAc(4×30mL)で抽出した。抽出物をブライン(2×50mL)で洗浄し、硫酸ナトリウム上で乾燥した。粗生成物、褐色粘稠油を、シリカ上のフラッシュカラムクロマトグラフィー(溶離液、EtOAc中5~10% MeOH)によって精製して、黄褐色粘稠油(81mg、31%)を得た。

LCMS 純度97.1%; RT=1.48min; $\text{C}_{27}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_{12}$ [M+H]⁺のm/z 計算値596, 実測値 596; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.88–7.76 (m, 1H), 7.42–7.30 (m, 5H), 6.90–6.73 (m, 1H), 6.17 (d, $J=9.2\text{ Hz}$, 1H), 5.41 (s, 1H), 5.17 (dd, $J=8.8\text{ Hz}$ 及び 2.4 Hz , 2H), 4.62–4.45 (m, 2H), 4.38–4.30 (m, 2H), 4.22–4.08 (m, 2H), 4.08–3.90 (m, 2H), 3.85–3.73 (m, 2H), 3.44 (s, 1H), 2.70 (br s, 1H), 1.98 (s, 3H), 1.52 (app t, $J=5.6\text{ Hz}$, 2H), 1.44–1.37 (m, 8H)

【0212】

工程5a. リンカー-2の調製

工程 4 a のエステル (220 mg、0.378 mmol) の EtOH (10 ml) 溶液に、水滴で湿らせた Pd/C (10.0%、40 mg、0.0378 mmol) を加えた。混合物を水素 (50 PSI) 下で一晩攪拌した。次いで、混合物をセライトの短いパッドを通して濾過し、濾過ケーキを EtOH で洗浄した。濾液を真空中で濃縮して、標記化合物を無色ガラス状固体 (149 mg、80%) として得た。

LCMS ELS D による純度 100% ; RT = 1.13 min ; C₁₉H₂₉N₃O₁₂ [M+H]⁺ の m/z 計算値 492 , 実測値 492 ; ¹H NMR (400 MHz , MeOD-d₄) δ 5.88–5.72 (m, 2H) , 5.39 (s, 1H) , 4.56 (d, J = 5.2 Hz, 1H) , 4.51–4.43 (m, 1H) , 4.25 (d, J = 7.6 Hz, 1H) , 4.21–4.15 (m, 1H) , 4.01–4.00 (m, 2H) , 3.90 (s, 1H) , 3.75 (dd, J = 7.2 Hz 及び 5.6 Hz, 1H) , 3.69 (d, J = 1.2 Hz, 1H) , 3.40 (d, J = 1.6 Hz, 1H) , 2.97 (d, J = 5.6 Hz, 3H) , 1.97 (s, 3H) , 1.44 (dd, J = 7.6 及び 3.6 Hz, 3H) , 1.36 (d, J = 6.8 Hz, 3H)

10

【0213】

工程 5 b . リンカー 3 の調製

工程 4 b のエステル (0.190 g、0.319 mmol) の EtOH (10 ml) 溶液に、水滴で湿らせた Pd/C (10.0%、0.0339 g、0.0319 mmol) を加えた。混合物を水素 (50 PSI) 下で一晩攪拌し、次いでセライトの短いパッドを通して濾過した。濾過ケーキを EtOH (2×5 ml) で洗浄し、濾液を真空濃縮した。残留物をエーテル (5 ml) で粉碎して、標記化合物を灰白色固体 (131 mg、81%) として得た。

20

LCMS ELS D による純度 100% ; RT = 1.17 min ; C₂₀H₃₁N₃O₁₂ [M+H]⁺ の m/z 計算値 506 , 実測値 506 ; ¹H NMR (400 MHz , MeOD-d₄) δ 6.79–6.75 (m, 1H) , 5.38 (d, J = 1.6 Hz, 1H) , 4.56 (d, J = 2.8 Hz, 1H) , 4.52–4.35 (m, 1H) , 4.25 (d, J = 7.2 Hz, 1H) , 4.23–4.13 (m, 1H) , 4.12–3.85 (m, 3H) , 3.80–3.72 (m, 1H) , 3.69 (s, 1H) , 3.40 (s, 1H) , 2.98–2.95 (m, 3H) , 1.57–1.28 (m, 9H)

30

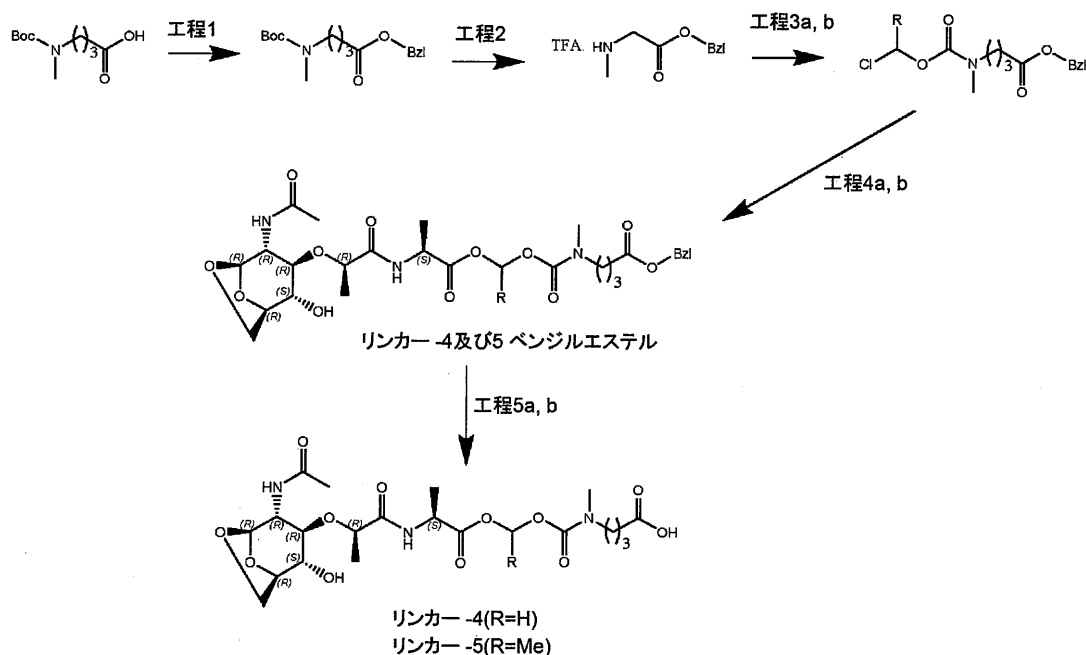
【0214】

(c) リンカー 4 及びリンカー 5 の合成

40

50

【化 7 2】



10

20

スキーム 9. リンカー-4 及びリンカー-5 の合成

工程 1. ベンジル 4-((tert-ブトキシカルボニル)(メチル)アミノ)ブタノエートの調製

4-[tert-ブトキシカルボニル(メチル)アミノ]ブタン酸(2.50 g、11.5 mmol)の DMF (25 mL) 懸濁液に、 K_2CO_3 (4.13 g、29.9 mmol)、続いて臭化ベンジル(2.56 g、15.0 mmol)を加えた。反応物を室温で 4 日間攪拌した。この混合物を冷水(0.5 L)に注ぎ、ジエチルエーテル(2×100 mL)で抽出した。抽出物をブラインで洗浄し、真空中で濃縮して、無色油を得た。粗生成物をシリカ上のフラッシュカラムクロマトグラフィー(溶離液:ヘキサン中 10~50% EtOAc 勾配)によって精製して、標題化合物を無色粘稠油として得た(3.29 g、10.7 mmol、収率:93.0%)。

30

LCMS: 純度 95.5%; RT=1.87 min; $C_{17}H_{25}NO_4$ [M+H-Boc]⁺ の m/z 計算値 208; ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.40–7.28 (m, 5H), 5.12 (s, 2H), 3.24 (app t, J=6.8 Hz, 2H), 2.82 (s, 3H), 2.36 (app t, J=7.2 Hz, 2H), 1.85 (dq, J=7.2 Hz, 2H), 1.44 (s, 9H)

【0215】

工程 2. ベンジル 4-(メチルアミノ)ブタノエートトリフルオロ酢酸塩の調製。

40

DCM (50 mL) 中の工程 1 のエステル(3.29 g、10.7 mmol)の攪拌溶液に、TFA (4.77 mL、64.2 mmol)を一度に加えた。得られた黄色溶液を 18 時間攪拌した。溶媒を真空中で除去し、残留物をトルエン(2×20 mL)と共蒸発させて、TFA 痕跡量を除去した。表題化合物(4.10 g、119%)を黄色油として得た。この材料を、精製又は特徴付けすることなく工程 3a 及び 3b で直接使用した。

【0216】

工程 3a. ベンジル 4-((クロロメトキシ)カルボニル)(メチル)アミノ)ブタノエートの調製

DCM (30 mL) 中の工程 2 の塩(1.72 g、5.35 mmol)の攪拌溶液に、TEA (2.24 mL、16.1 mmol)を一度に加えた。得られた黄色溶液を氷/水浴

50

中で冷却し、クロロメチルカルボノクロリデート（0.524 mL、5.89 mmol）を窒素雰囲気下で攪拌しながら15分間かけて滴加した。混合物を室温に温め、18時間攪拌した。溶媒を真空中で除去し、残留物をEtOAc（150 mL）に取った。この溶液を0.5 M HCl（50 mL）及び濃重炭酸ナトリウム溶液（50 mL）で洗浄し、硫酸ナトリウム上で乾燥した。この溶液を真空中で濃縮した。シリカ上のフラッシュカラムクロマトグラフィー（溶離液、ヘキサン中20～50% EtOAc 勾配）によって精製して、標題化合物を無色油（0.92 g、CR-0056からの2工程にわたって57%）として得た。

LCMS：純度95.2%；RT=1.74 min； $C_{14}H_{18}ClNO_4$ [M+H]⁺のm/z 計算値300，実測値300；¹H NMR（400 MHz，CDCl₃）δ 7.42–7.26（m，5H），5.71（d，J=16.0 Hz，2H），5.12（s，2H），3.50–3.20（m，2H），3.01–2.80（m，3H），2.42–2.28（m，2H），2.00–1.80（m，2H）

10

【0217】

工程3b. ベンジル4-（（（1-クロロエトキシ）カルボニル）（メチル）アミノ）ブタノエートの調製

DCM（20 mL）中の工程2の塩（1.33 g、4.13 mmol）の攪拌溶液に、DIEA（2.12 mL、12.4 mmol）を一度に加えた。得られた黄色溶液を氷／水浴中で冷却し、DCM（5 mL）中の1-クロロエチルカルボノクロリデート（0.407 mL、4.13 mmol）を窒素雰囲気下で攪拌しながら15分間かけて滴加した。混合物を室温に温め、18時間攪拌した。溶媒を真空中で除去し、残留物をDCM（150 mL）に取った。この溶液を水（100 mL）で洗浄し、硫酸ナトリウム上で乾燥した。粗生成物をシリカ上のフラッシュカラムクロマトグラフィー（溶離液：ヘキサン中10～50% EtOAc）により精製して、標題化合物（0.91 g、70%）を無色油として得た。

20

¹H NMR（400 MHz，CDCl₃）δ 7.42–7.28（m，5H），6.56（app dq，J=5.6 Hz，1H），5.12（s，2H），3.48–3.24（m，2H），2.91（app d，J=8.8 Hz，3H），2.44–2.30（m，2H），1.98–1.82（m，2H），1.78（app dd，J=13.2 Hz 及び 6.0 Hz，3H）

30

【0218】

工程4a. （（（（（（R）-2-（（（1R，2S，3R，4R，5R）-4-アセトアミド-2-ヒドロキシ-6，8-ジオキサビシクロ[3.2.1]オクタン-3-イル）オキシ）プロパノイル）-L-アラニル）オキシ）メトキシ）カルボニル）（メチル）アミノ）ブタノエートの調製

第2部の工程6の酸（0.150 g、0.433 mmol）及び工程3aの塩化物（0.260 g、0.866 mmol）の無水DMF（2 mL）懸濁液に、DIEA（0.156 mL、0.910 mmol）、続いてNaI（0.130 g、0.866 mmol）を一度に加えた。懸濁液を室温で48時間攪拌した。反応混合物を冷水（100 mL）に注ぎ、EtOAc（4×30 mL）で抽出した。抽出物をブライン（50 mL）及び5% LiCl溶液（50 mL）で洗浄し、硫酸ナトリウム上で乾燥した。粗生成物、褐色粘稠油をシリカ上のフラッシュカラムクロマトグラフィー（溶離液、EtOAc中5～10% MeOH）により精製して、標記化合物を無色粘稠油（181 mg、68%）として得た。

40

LCMS：純度99.3%；RT=1.49 min； $C_{28}H_{39}N_3O_{12}$ [M+H]⁺のm/z 計算値610，実測値610；¹H NMR（400 MHz，CDCl₃）δ 7.71（d，J=7.6 Hz，1H），7.42–7.28（m，5H），6.20–6.10（m，1H），5.82–5.66（m，2H），5.41（s，1H），5.12（s，2H），4.55（d，J=5.2 Hz，1H），4.52–4.42（m，1H），4.28（d，J=7.6 Hz，1H），4.10–3.98（m，2H），3

50

． 3 4 - 3 . 2 2 (m , 2 H) , 3 . 4 6 (s , 1 H) , 3 . 4 0 - 3 . 1 5 (m , 2 H) , 2 . 9 7 (d d , J = 1 6 . 5 H z 及 び 3 . 6 H z , 1 H) , 2 . 8 9 (d , J = 5 . 2 H z , 3 H) , 2 . 4 4 - 2 . 3 0 (m , 2 H) , 1 . 9 7 (s , 3 H) , 1 . 8 8 (d d , J = 7 . 2 H z 及 び 5 . 2 H z , 3 H) , 1 . 4 0 - 1 . 3 0 (m , 3 H) .

【 0 2 1 9 】

工程 4 b . ベンジル 4 - (((1 - ((((R) - 2 - ((((1 R , 2 S , 3 R , 4 R , 5 R) - 4 - アセトアミド - 2 - ヒドロキシ - 6 , 8 - ジオキサビシクロ [3 . 2 . 1] オクタン - 3 - イル) オキシ) プロパノイル) - L - アラニル) オキシ) エトキシ) カルボニル) (メチル) アミノ) ブタノエートの調製

第 2 部の工程 6 の酸 (0 . 2 0 0 g 、 0 . 5 7 7 m m o l) 及び工程 3 b の塩化物 (0 . 3 6 2 g 、 1 . 1 5 m m o l) の無水 DMF (3 m l) 懸濁液に、DIEA (0 . 2 0 8 m l 、 1 . 2 1 m m o l) 、続いて NaI (0 . 1 7 3 g 、 1 . 1 5 m m o l) を一度に加えた。懸濁液を室温で 2 4 時間攪拌した。反応混合物を冷水 (1 0 0 m l) に注ぎ、EtOAc (4 × 3 0 m l) で抽出した。抽出物をブライン (5 0 m l) 及び 5 % LiCl 溶液 (5 0 m l) で洗浄し、硫酸ナトリウム上で乾燥した。粗生成物、褐色粘稠油を、シリカ上のフラッシュカラムクロマトグラフィー (溶離液、EtOAc 中 5 ~ 1 0 % MeOH) によって精製して、標題化合物 (0 . 1 1 g 、 3 0 %) を淡黄色の粘稠油として得た。

LCMS : 純度 9 8 . 6 % ; R T = 1 . 5 3 m i n ; C ₂₉H₄₁N₃O₁₂ [M + H] ⁺ の m / z 計算値 6 2 4 , 実測値 6 2 4 ; ¹H NMR (4 0 0 M H z , C D C l ₃) δ 7 . 8 6 - 7 . 7 8 (m , 1 H) , 7 . 4 2 - 7 . 2 8 (m , 5 H) , 6 . 9 0 - 6 . 7 4 (m , 1 H) , 6 . 1 0 (d , J = 9 . 2 H z , 1 H) , 5 . 4 1 (d , J = 2 . 0 H z , 1 H) , 5 . 1 1 (s , 2 H) , 4 . 6 8 - 4 . 4 8 (m , 2 H) , 4 . 3 5 (a p p t , J = 7 . 6 H z , 1 H) , 4 . 1 8 - 4 . 1 0 (m , 1 H) , 3 . 9 9 (d , J = 9 . 2 H z , 1 H) , 3 . 8 6 - 3 . 7 4 (m , 2 H) , 3 . 4 4 (s , 1 H) , 3 . 4 0 - 3 . 1 6 (m , 2 H) , 2 . 8 7 (s , 3 H) , 2 . 4 9 - 2 . 3 5 (m , 3 H) , 1 . 9 9 (s , 3 H) , 1 . 9 4 - 1 . 8 0 (m , 2 H) , 1 . 5 1 - 1 . 4 4 (m , 3 H) , 1 . 4 4 - 1 . 3 6 (m , 6 H)

【 0 2 2 0 】

工程 5 a . リンカー 4 の調製

工程 4 a のエステル (1 7 0 m g 、 0 . 2 7 9 m m o l) の EtOH (1 0 m l) 溶液に、水滴で湿らせた Pd / C (1 0 . 0 % 、 3 3 . 9 m g 、 0 . 0 3 1 9 m m o l) を加えた。混合物を水素 (5 0 P S I) 下で一晩攪拌し、次いでセライトの短いパッドを通して濾過した。濾過ケーキを EtOH (2 × 5 m l) で洗浄し、濾液を真空濃縮した。残留物をエーテル (5 m l) で粉砕して、標記化合物を無色ガラス状固体 (1 2 7 m g 、 8 7 %) として得た。

LCMS : E L S D による純度 1 0 0 % ; R T = 1 . 1 8 m i n ; C ₂₁H₃₃N₃O₁₂ [M + H] ⁺ の m / z 計算値 5 2 0 , 実測値 5 2 0 ; ¹H NMR (4 0 0 M H z , M e O D - d ₄) δ 5 . 8 1 - 5 . 7 4 (m , 2 H) , 5 . 3 8 (s , 1 H) , 4 . 5 5 (d , J = 5 . 2 H z , 1 H) , 4 . 5 2 - 4 . 4 2 (m , 1 H) , 4 . 2 5 - 4 . 1 5 (m , 2 H) , 3 . 9 0 (s , 1 H) , 3 . 7 8 - 3 . 7 2 (m , 1 H) , 3 . 6 9 (s , 1 H) , 3 . 6 1 (d t , J = 6 . 0 H z , 1 H) , 3 . 4 0 (s , 1 H) , 3 . 3 8 - 3 . 2 5 (m , 溶媒水ピークにより不明瞭) , 2 . 9 2 (s , 3 H) , 2 . 2 9 (d t , J = 7 . 6 H z , 2 H) , 1 . 9 7 (s , 3 H) , 1 . 9 0 - 1 . 7 6 (m , 2 H) , 1 . 4 4 (d , J = 7 . 2 H z , 3 H) , 1 . 3 5 (d , J = 6 . 8 H z , 3 H)

【 0 2 2 1 】

工程 5 b . リンカー 5 の調製

工程 4 b のエステル (1 1 0 m g 、 0 . 1 7 6 m m o l) の EtOH (1 0 m l) 溶液に、水滴で湿らせた Pd / C (1 0 . 0 % 、 3 3 . 9 m g 、 0 . 0 3 1 9 m m o l) を加えた。混合物を水素 (5 0 P S I) 下で一晩攪拌し、次いでセライトの短いパッドを通して

濾過した。濾過ケーキをEtOH (2×5 ml) で洗浄し、濾液を真空濃縮した。残留物をエーテル (5 ml) で粉碎して、標題化合物を無色ガラス状固体 (90 mg、95%) として得た。

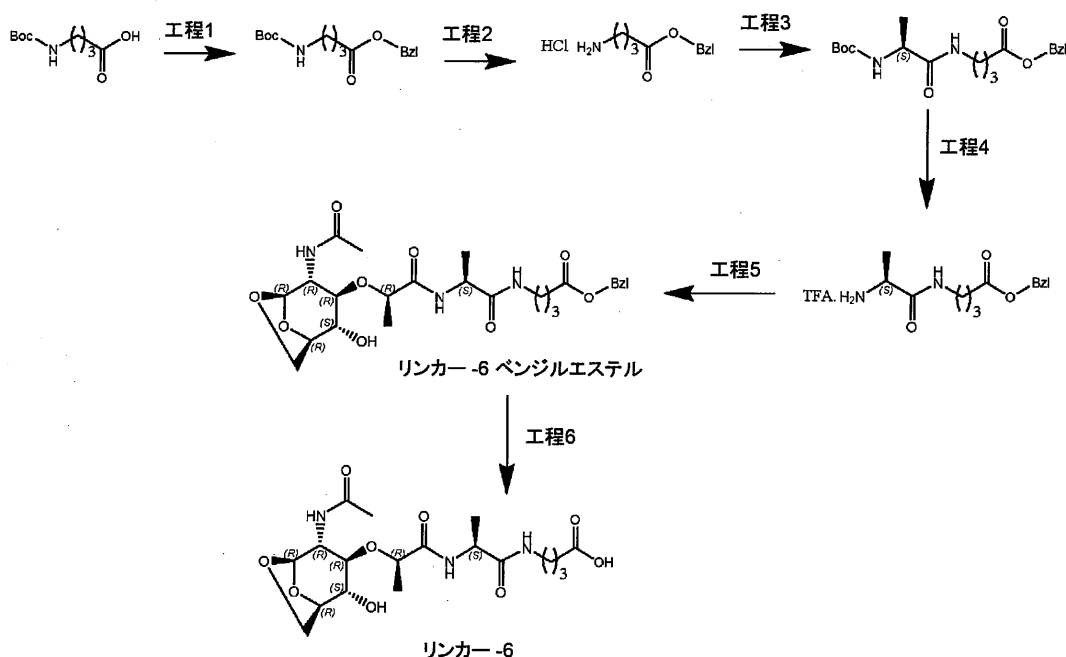
LCMS: ELS Dによる純度100%; RT=1.22 min; C₂₂H₃₅N₃O₁₂ [M+H]⁺のm/z計算値534, 実測値534; ¹H NMR (400 MHz, MeOD-d₄) δ 6.82–6.70 (m, 1H), 5.39 (s, 1H), 4.57 (d, J=5.6 Hz, 1H), 4.56–4.36 (m, 1H), 4.25 (d, J=7.2 Hz, 1H), 4.19 (dt, J=6.4 Hz, 1H), 3.89 (s, 1H), 3.80–3.72 (m, 1H), 3.69 (s, 1H), 3.40 (d, J=1.6 Hz, 1H), 3.38–3.23 (m, 溶媒水ピークにより不明瞭), 2.94–2.86 (m, 3H), 2.30–2.25 (m, 2H), 1.97 (s, 3H), 1.83 (qd, J=6.8 Hz, 2H), 1.50 (dd, J=5.6 Hz, 3H), 1.42 (dd, J=7.2 Hz 及び 3.2 Hz, 3H), 1.38–1.28 (m, 3H)

10

【0222】

(d) リンカー-6の合成

【化73】



20

30

スキーム10. リンカー-6の合成

工程1. ベンジル4-((tert-ブトキシカルボニル)アミノ)ブタノエートの調製
4-((tert-ブトキシカルボニル)アミノ)ブタン酸 (5.00 g、24.6 mmol) のDMF (50 mL) 懸濁液に、K₂CO₃ (8.84 g、64.0 mmol)、続いて臭化ベンジル (5.47 g、32.0 mmol) を加えた。反応物を室温で4日間攪拌した。この混合物を冷水 (1.5 L) に注ぎ、ジエチルエーテル (2×300 mL) で抽出した。抽出物をブラインで洗浄し、真空中で濃縮して、放置すると固化する無色油を得た。これをヘキサンで粉碎し、濾過により表題化合物を白色固体 (6.93 g、96%) として単離した。

40

LCMS: 純度96.5%; RT=1.76 min; C₁₆H₂₃NO₄ [M+H-Boc]⁺のm/z計算値194; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.40–7.31 (m, 5H), 5.12 (s, 2H), 4.59 (br s, 1H), 3.23–3.07 (m, 2H), 2.40 (app t, J=7.2 Hz, 2H), 1.83 (app q, J=6.8 Hz, 2H), 1.43 (s, 9H)

50

【0223】

工程2. ベンジル4-アミノブタノエート塩酸塩の調製。

ジオキサン(30ml)中の工程1のエステル(1.00g、3.41mmol)の攪拌溶液に、HCl(4Mのジオキサン溶液)(4.00M、12.8ml、51.1mmol)を加えた。得られた溶液を3時間攪拌した。溶媒を真空中で除去し、残留物をジオキサン(2×20ml)と共蒸発させて、HCl痕跡量を除去した。エーテルで粉碎し、濾過して、標題化合物を白色粉末(0.57g、72%)として得た。

LCMS: 純度99.0%; RT=1.05min; 遊離塩基 $C_{11}H_{15}NO_2$ [M+H]⁺のm/z計算値194; ¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆) δ 8.02(br s, 3H), 7.40–7.31(m, 5H), 5.12(s, 2H), 2.81(app t, J=7.6Hz, 2H), 2.55–2.45(m, 溶媒水ピークにより不明瞭), 1.85(app q, J=7.6Hz, 2H)

10

【0224】

工程3. ベンジル(S)-4-(2-(tert-ブトキシカルボニル)アミノ)プロパンアミド)ブタノエートの調製

工程2のHCl塩(0.500g、2.18mmol)及びN-Boc-L-アラニン-OH(0.487g、2.57mmol)を室温でDMF(15ml、0.1M)に溶解した。次いで、DIEA(1.25ml、7.18mmol)及びHATU(0.910g、2.39mmol)を加え、混合物を室温で18時間攪拌した。反応混合物を氷水(250ml)に加え、得られた白色沈殿をエーテル中の20% EtOAc(3×300ml)で抽出した。合わせた抽出物をブライン(2×300ml)で洗浄し、硫酸ナトリウム上で乾燥し、濾過し、真空中で濃縮して、無色油を得た。これを、Biotage Flashmasterシステム(溶離液: ヘキサン中10%~90% EtOAc勾配)を使用するフラッシュカラムクロマトグラフィーによって精製した。TLCによる純粋な画分を合わせ、真空中で濃縮して、標題化合物を無色粘稠油(0.541g、68.2%)として得た。

20

LCMS: 純度100%; RT=1.62min; $C_{19}H_{28}N_2O_5$ [M+H]⁺のm/z計算値365; ¹H NMR(400MHz, CDCl₃) δ 7.38–7.29(m, 5H), 6.31(br s, 1H), 5.11(s, 1H), 4.92(br s, 1H), 4.13–4.07(m, 1H), 3.32–3.27(m, 2H), 2.40(app t, J=7.2Hz, 2H), 1.85(app q, J=7.2Hz, 2H),

30

【0225】

工程4. ベンジル(S)-4-(2-アミノプロパンアミド)ブタノエートトリフルオロ酢酸塩の調製

工程3のエステル(0.540g、1.48mmol)のDCM(10ml)溶液に、TFA(1.10ml、14.8mmol)を室温で一度に加えた。溶液を室温で20時間攪拌した。溶媒を真空中で除去し、残留物をトルエン(10ml×3)と共蒸発させて残留TFAを除去した。標題化合物を無色油(0.75g、134%)として単離した。この材料を次の工程で直接使用した。

40

LCMS: 純度96.4%; RT=1.12min; 遊離塩基 $C_{14}H_{20}N_2O_3$ [M+H]⁺のm/z計算値265.

【0226】

工程5. ベンジル4-((S)-2-((R)-2-((1R, 2S, 3R, 4R, 5R)-4-アセトアミド-2-ヒドロキシ-6, 8-ジオキサビシクロ[3.2.1]オクタン-3-イル)オキシ)プロパンアミド)プロパンアミド)ブタノエートの調製

工程4の塩(366mg、0.966mmol)及び第1部の工程3の酸(1, 6-アンヒドロ-N-アセチルムラミン酸)(266mg、0.966mmol)を、室温でDMF(10ml、約0.1M)に溶解した。次いで、DIEA(0.673ml、3.87mmol)及びHATU(404mg、1.06mmol)を加え、混合物を室温で18

50

時間攪拌した。反応混合物を氷水（300ml）に加え、EtOAc（3×100ml）、次いで1：1クロロホルム－IPA（3×80ml）で抽出した。有機画分を合わせ、硫酸ナトリウム上で乾燥し、真空中で濃縮した。粗生成物をシリカ上のフラッシュカラムクロマトグラフィー（溶離液：DCM中5～10% MeOH勾配）により精製した。TLCによる純粋な画分を合わせ、真空中で濃縮した。DMFで汚染された画分を合わせ、真空中で濃縮した。残留物をEtOAc（200ml）に取り、5% LiCl水溶液（2×50ml）で洗浄した。有機溶液を硫酸ナトリウム上で乾燥し、真空中で濃縮した。粗生成物をシリカ上のフラッシュカラムクロマトグラフィー（溶離液：DCM中5～10% MeOH勾配）により精製した。TLCによる純粋な画分を最初の純粋なバッチと合わせて、標記化合物を無色粘稠油として得、これを静置すると白色結晶性固体（387mg、76%）に徐々に固化した。

10

LCMS：純度100%；RT=1.36min；C₂₅H₃₅N₃O₉ [M+H]⁺のm/z計算値522；¹H NMR（400MHz，CDCl₃）δ 7.76（d，J=7.2Hz，1H），7.35–7.31（m，5H），6.61（app t，J=5.6Hz，1H），6.25（d，J=9.2Hz，1H），5.41（s，1H），5.10（s，2H），4.52（d，J=5.2Hz，1H），4.39–4.36（m，1H），4.23（d，J=7.6Hz，1H），4.18–4.13（m，1H），3.98（d，J=9.2Hz，1H），3.82–3.78（m，1H），3.73（s，1H），3.43（s，1H），3.37–3.17（m，2H），2.38（app t，J=7.6Hz，2H），1.98（s，3H），1.84（app q，J=6.8Hz，2H），1.38–1.35（m，6H）
【0227】

20

工程6．リンカー6の調製

工程5のエステル（0.300g、0.575mmol）のEtOH（10ml）溶液に、水滴で湿らせたPd/C（10.0%、0.0612g、0.0575mmol）を加えた。混合物を水素（50PSI）下で一晩攪拌し、次いでセライトの短いパッドを通して濾過した。濾過ケーキをEtOH（2×5ml）で洗浄し、濾液を真空濃縮した。残留物をエーテル（5ml）で粉砕して、標記化合物を灰白色泡状固体（180mg、72%）として得た。

LCMS：純度100%；RT=1.00min；C₁₈H₂₉N₃O₉ [M+H]⁺のm/z計算値432；¹H NMR（400MHz，MeOD-d₆）δ 5.38（s，1H），4.55（d，J=5.6Hz，1H），4.37–4.34（m，1H），4.29（d，J=7.6Hz，1H），4.21–4.16（m，1H），3.87（s，1H），3.76（dd，J=7.6及び6.0Hz，1H），3.40（m，1H），3.25–2.22（m，2H），2.32（app t，J=7.2Hz，2H），1.97（s，3H），1.78（app q，J=7.2Hz，2H），1.38–1.35（m，6H）
【0228】

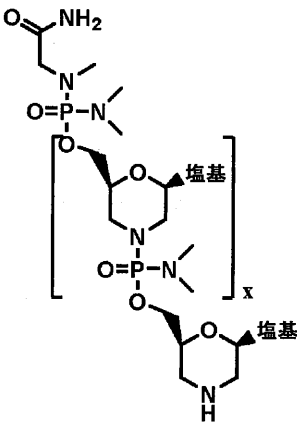
30

第4部．「糖－リンカー－スパーサー－アンチセンス剤」の調製

スキーム3に詳述された一般原理に従って、PMOアンチセンス配列を「リンカー1～6」と結合させて、一連の完全な「構築物」を提供した。PMOアンチセンス剤は、GeneTools Inc（<https://www.gene-tools.com/>を参照されたい）から、以下に詳述するような5'末端及び種々のリンカーの結合のための遊離モルホリノとしての3'末端を有するように予め調製したものを購入した。

40

【化 7 4】



10

【 0 2 2 9】

関連する配列IDに基づく以下の10個のPMOは、以下のようにそれらのPED番号によって参照される：

【 0 2 3 0】

20

【表 8】

PED 番号	配列(5' → 3')	配列 ID
PED-1	CTT CGA TAG TG	57
PED-2	TCA AAT GAG GC	91
PED-3	CGC TCA TCT AA	94
PED-4	ATT GAG TGT CAT	170
PED-5	TGC CAT CTT GTT	171
PED-6	GTT GTT TGA TC	102
PED-7	CAG GAG CAT TAG	172
PED-8	GTC TAT TCT CC	153
PED-9	CCT CAG ACT CC	87
PED-10	AGT GCT CTA CC	103

30

表 2. PMO、配列 ID、及び PED 名称

【 0 2 3 1】

(a) PMO PED-1 と結合したリンカー-1 ～ 6 の調製。

L1-PED-1 (PED-006) の調製

リンカー-1 (第 3 部 (a)、工程 5 の酸) (2.32 mg、4.36 μmol) の DMSO (127 μL) 溶液に、HBTU (DMSO 中 0.300 M、15.9 μL、4.76 μmol)、HOAt (DMSO 中 0.300 M、15.9 μL、4.76 μmol) 及び DIEA (DMSO 中 0.600 M、16.5 μL、9.91 μmol) を連続的に加えた。次いで、混合物を直ちに PED-1 (DMSO 中 0.01 M、396 μL、3.96 μmol) に加えた。活性化酸を収容するバイアルを DMSO (2×50 μL) で洗浄し、洗浄液を反応混合物に加えた。混合物を 40℃ で 2 時間攪拌した。粗混合物を LC

50

MSで分析したところ、所望の生成物が観察された。反応溶液を -25°C で一晩保存し、分取HPLCにより2回の等しい注入で精製した。これにより、それぞれ約10mlの2つの生成物画分を得た。これらを28mlガラスバイアル中で合わせ、凍結乾燥して、標題構築物を白色固体(9.1mg、53%)として得た

LCMS 純度(225nm+/−50)=100%, RT=1.109min; [M]
3+ のm/z 計算値1433.5, 実測値 1433.2

【0232】

L2-PED-1 (PED-007) の調製

リンカー-2 (第3部(b)、工程5aの酸) (2.14mg、4.36 μmol) のDMSO (127 μL) 溶液に、HB TU (DMSO中0.300M、15.9 μL 、4.76 μmol)、HOAt (DMSO中0.300M、15.9 μL 、4.76 μmol) 及びDIEA (DMSO中0.600M、16.5 μL 、9.91 μmol) を連続的に加えた。次いで、混合物を直ちにPED-1 (DMSO中0.01M、396 μL 、3.96 μmol) に加えた。活性化酸を収容するバイアルをDMSO (2 $\times$ 50 μL) で洗浄し、洗浄液を反応混合物に加えた。混合物を 40°C で2時間攪拌した。粗混合物をLCMSで分析したところ、所望の生成物が観察された。反応溶液を -25°C で一晩保存し、分取HPLCにより2回の等しい注入で精製した。これにより、それぞれ約10mlの2つの生成物画分を得た。これらを28mlガラスバイアル中で合わせ、凍結乾燥して、標題構築物を白色凍結乾燥固体(7.4mg、43%)として得た。

LCMS 純度(225nm+/−50)=98.8%, RT=1.100min; [M]
3+ のm/z 計算値1420.1, 実測値 1419.9

【0233】

L3-PED-1 (PED-008) の調製

リンカー-3 (第3部(b)、工程5bの酸) (2.20mg、4.36 μmol) のDMSO (127 μL) 溶液に、HB TU (DMSO中0.300M、15.9 μL 、4.76 μmol)、HOAt (DMSO中0.300M、15.9 μL 、4.76 μmol) 及びDIEA (DMSO中0.600M、16.5 μL 、9.91 μmol) を連続的に加えた。次いで、混合物を直ちにPED-1 (DMSO中0.01M、396 μL 、3.96 μmol) に加えた。活性化酸を収容するバイアルをDMSO (2 $\times$ 50 μL) で洗浄し、洗浄液を反応混合物に加えた。混合物を 40°C で2時間攪拌した。粗混合物をLCMSで分析したところ、所望の生成物が観察された。反応溶液を -25°C で一晩保存し、分取HPLCにより2回の等しい注入で精製した。これにより、それぞれ約10mlの2つの生成物画分を得た。これらを28mlガラスバイアル中で合わせ、凍結乾燥して、標題構築物を白色凍結乾燥固体(8.5mg、50%)として得た。

LCMS 純度(225nm+/−50)=96.6%; RT=1.109min; [M]
3+ のm/z 計算値1424.8, 実測値 1424.5

【0234】

L4-PED-1 (PED-009) の調製

リンカー-4 (第3部(c)、工程5aの酸) (2.27mg、4.36 μmol) のDMSO (127 μL) 溶液に、HB TU (DMSO中0.300M、15.9 μL 、4.76 μmol)、HOAt (DMSO中0.300M、15.9 μL 、4.76 μmol) 及びDIEA (DMSO中0.600M、16.5 μL 、9.91 μmol) を連続的に加えた。次いで、混合物を直ちにPED-1 (DMSO中0.01M、396 μL 、3.96 μmol) に加えた。活性化酸を収容するバイアルをDMSO (2 $\times$ 50 μL) で洗浄し、洗浄液を反応混合物に加えた。混合物を 40°C で2時間攪拌した。粗混合物をLCMSで分析したところ、所望の生成物が観察された。反応溶液を -25°C で一晩保存し、分取HPLCにより2回の等しい注入で精製した。これにより、それぞれ約10mlの2つの生成物画分を得た。これらを28mlガラスバイアル中で合わせ、凍結乾燥して、標題構築物を白色凍結乾燥固体(10.7mg、63%)として得た。

LCMS 純度(225nm+/−50)=98.5%, RT=1.111min; [M]

] 3+の m/z 計算値 1429.5, 実測値 1429.3

【0235】

L5-PED-1 (PED-010) の調製

リンカー-5 (第3部(c)、工程5bの酸) (2.33 mg、4.36 μmol) の DMSO (127 μL) 溶液に、HBTU (DMSO中0.300 M、15.9 μL 、4.76 μmol)、HOAt (DMSO中0.300 M、15.9 μL 、4.76 μmol) 及び DIEA (DMSO中0.600 M、16.5 μL 、9.91 μmol) を連続的に加えた。次いで、混合物を直ちに PED-1 (DMSO中0.01 M、396 μL 、3.96 μmol) に加えた。活性化酸を収容するバイアルを DMSO (2×50 μL) で洗浄し、洗浄液を反応混合物に加えた。混合物を 40℃で2時間攪拌した。粗混合物を LCMS で分析したところ、所望の生成物が観察された。反応溶液を -25℃で一晩保存し、分取 HPLC により2回の等しい注入で精製した。これにより、それぞれ約 10 ml の2つの生成物画分を得た。これらを 28 ml ガラスバイアル中で合わせ、凍結乾燥して、標題構築物を白色凍結乾燥固体 (11.2 mg、65%) として得た。

10

LCMS 純度 (225 nm+/-50) = 100%, RT = 1.119 min; [M] 3+の m/z 計算値 1434.2, 実測値 1434.0

【0236】

L6-PED-1 (PED-011) の調製

リンカー-6 (第3部(d)、工程6の酸) (無水 DMSO 溶液) (0.0350 M、109 μL 、3.81 μmol) に、HBTU (DMSO 溶液) (0.300 M、13.8 μL 、4.15 μmol)、HOAt (DMSO 溶液) (0.300 M、13.8 μL 、4.15 μmol) 及び DIEA (DMSO 溶液) (0.300 M、28.8 μL 、8.65 μmol) を連続的に加えた。次いで、混合物を直ちに PED-1 オリゴヌクレオチド (DMSO 溶液) (0.0100 M、346 μL 、3.46 μmol) に加えた。活性化酸を収容するバイアルを DMSO (2×50 μL) で洗浄し、洗浄液を反応混合物に加えた。混合物を 40℃で2時間攪拌した。粗混合物を LCMS で分析したところ、所望の生成物が観察された。反応溶液を -25℃で一晩保存し、分取 HPLC により2回の等しい注入で精製した。これにより、それぞれ約 10 ml の2つの生成物画分を得た。これらを 28 ml ガラスバイアル中で合わせ、凍結乾燥して、標題構築物を白色固体 (11.9 mg、2.84 μmol 、収率: 81.9%) として得た。

20

30

LCMS 純度 (225 nm+/-50) = 98.3%, RT = 1.114 min; [M] 3+の m/z 計算値 1400.1, 実測値 1399.9

【0237】

L6-PED-2 (PED-012) の調製

リンカー-6 (第3部(d)、工程6の酸) (無水 DMSO 溶液) (0.0350 M、106 μL 、3.70 μmol) に、HBTU (DMSO中0.300 M、13.5 μL 、4.04 μmol)、HOAt (DMSO中0.300 M、13.5 μL 、4.04 μmol) 及び DIEA (DMSO中0.300 M、28.1 μL 、8.42 μmol) を連続的に加えた。次いで、混合物を直ちに PED-2 オリゴヌクレオチド (DMSO中0.0100 M、337 μL 、3.37 μmol) に加えた。活性化酸を収容するバイアルを DMSO (2×50 μL) で洗浄し、洗浄液を反応混合物に加えた。混合物を 40℃で2時間攪拌した。粗混合物を LCMS で分析したところ、所望の生成物が観察された。反応溶液を -25℃で一晩保存し、分取 HPLC により2回の等しい注入で精製した。これにより、それぞれ約 10 ml の2つの生成物画分を得た。これらを 28 ml ガラスバイアル中で合わせ、凍結乾燥して、標題構築物を白色固体 (9.8 mg、69%) として得た。

40

LCMS 純度 (225 nm+/-50) = 97.3%, RT = 1.117 min; [M] 3+の m/z 計算値 1406.1, 実測値 1405.9

【0238】

L6-PED-3 (PED-013) の調製

リンカー-6 (第3部(d)、工程6の酸) (無水 DMSO 溶液) (0.0350 M、7

50

9.6 μL 、2.78 μmol) に、HBTU (DMSO 溶液) (0.300 M、10.1 μL 、3.04 μmol)、HOAt (DMSO 溶液) (0.300 M、10.1 μL 、3.04 μmol) 及び DIEA (DMSO 溶液) (0.300 M、21.1 μL 、6.33 μmol) を連続的に加えた。次いで、混合物を直ちに PED-3 オリゴヌクレオチド (DMSO 溶液) (0.0100 M、253 μL 、2.53 μmol) に加えた。活性化酸を収容するバイアルを DMSO (2 $\times$ 50 μL) で洗浄し、洗浄液を反応混合物に加えた。混合物を 40 $^{\circ}\text{C}$ で 2 時間攪拌した。粗混合物を LCMS で分析したところ、所望の生成物が観察された。反応溶液を -25 $^{\circ}\text{C}$ で一晩保存し、分取 HPLC により 2 回の等しい注入で精製した。これにより、それぞれ約 10 ml の 2 つの生成物画分を得た。これらを 28 ml ガラスバイアル中で合わせ、凍結乾燥して、標題構築物を白色固体 (9.30 mg、2.25 μmol 、収率：89.0%) として得た。

LCMS 純度 (225 nm+/-50) = 96.6%, RT = 1.107 min; [M] 3+ の m/z 計算値 1376.5, 実測値 1376.2

【0239】

L6-PED-4 (PED-014) の調製

リンカー-6 (第3部 (d)、工程6の酸) (無水 DMSO 溶液) (0.0350 M、86.7 μL 、3.03 μmol) に、HBTU (DMSO 溶液) (0.300 M、11.0 μL 、3.31 μmol)、HOAt (DMSO 溶液) (0.300 M、11.0 μL 、3.31 μmol) 及び DIEA (DMSO 溶液) (0.300 M、23.0 μL 、6.89 μmol) を連続的に加えた。次いで、混合物を直ちに PED-4 オリゴヌクレオチド (DMSO 溶液) (0.0100 M、276 μL 、2.76 μmol) に加えた。活性化酸を収容するバイアルを DMSO (2 $\times$ 50 μL) で洗浄し、洗浄液を反応混合物に加えた。混合物を 40 $^{\circ}\text{C}$ で 2 時間攪拌した。粗混合物を LCMS で分析したところ、所望の生成物が観察された。反応溶液を -25 $^{\circ}\text{C}$ で一晩保存し、分取 HPLC により 2 回の等しい注入で精製した。これにより、それぞれ約 10 ml の 2 つの生成物画分を得た。これらを 28 ml ガラスバイアル中で合わせ、凍結乾燥して、標題構築物を白色固体 (8.00 mg、1.76 μmol 、収率：63.7%) として得た。

LCMS 純度 (225 nm+/-50) = 96.5%, RT = 1.155 min; [M] 4+ の m/z 計算値 1138.9, 実測値 1139.9

【0240】

L6-PED-5 (PED-015) の調製

リンカー-6 (第3部 (d)、工程6の酸) (無水 DMSO 溶液) (0.0350 M、95.9 μL 、3.36 μmol) に、HBTU (DMSO 溶液) (0.300 M、12.2 μL 、3.66 μmol)、HOAt (DMSO 溶液) (0.300 M、12.2 μL 、3.66 μmol) 及び DIEA (DMSO 溶液) (0.300 M、25.4 μL 、7.63 μmol) を連続的に加えた。次いで、混合物を直ちに PED-5 オリゴヌクレオチド (DMSO 溶液) (0.0100 M、305 μL 、3.05 μmol) に加えた。活性化酸を収容するバイアルを DMSO (2 $\times$ 50 μL) で洗浄し、洗浄液を反応混合物に加えた。混合物を 40 $^{\circ}\text{C}$ で 2 時間攪拌した。粗混合物を LCMS で分析したところ、所望の生成物が観察された。反応溶液を -25 $^{\circ}\text{C}$ で一晩保存し、分取 HPLC により 2 回の等しい注入で精製した。これにより、それぞれ約 10 ml の 2 つの生成物画分を得た。これらを 28 ml ガラスバイアル中で合わせ、凍結乾燥して、標題構築物を白色固体 (8.70 mg、1.94 μmol 、収率：63.7%) として得た。

LCMS 純度 (225 nm+/-50) = 100%, RT = 1.152 min; [M] 3+ の m/z 計算値 1493.9, 実測値 1493.8

【0241】

L6-PED-6 (PED-016) の調製

リンカー-6 (第3部 (d)、工程6の酸) (無水 DMSO 溶液) (0.0350 M、78.8 μL 、2.76 μmol) に、HBTU (DMSO 溶液) (0.300 M、10.0 μL 、3.01 μmol) HOAt (DMSO 溶液) (0.300 M、10.0 μL 、3.01 μmol)

3.01 μmol) 及び DIEA (DMSO 溶液) (0.300 M、20.9 μL 、6.27 μmol) を連続的に加えた。次いで、混合物を直ちに PED-6 オリゴヌクレオチド (DMSO 溶液) (0.0100 M、251 μL 、2.51 μmol) に加えた。活性化酸を収容するバイアルを DMSO (2 $\times$ 50 μL) で洗浄し、洗浄液を反応混合物に加えた。混合物を 40 $^{\circ}\text{C}$ で 2 時間攪拌した。粗混合物を LCMS で分析したところ、所望の生成物が観察された。反応溶液を -25 $^{\circ}\text{C}$ で一晩保存し、分取 HPLC により 2 回の等しい注入で精製した。これにより、それぞれ約 10 ml の 2 つの生成物画分を得た。これらを 28 ml ガラスバイアル中で合わせ、凍結乾燥して、標題構築物を白色固体 (6.80 mg、1.62 μmol 、収率：64.5%) として得た。

LCMS 純度 (225 nm+/-50) = 95.4%, RT = 1.163 min; [M]
] 3+ の m/z 計算値 1402.1, 実測値 1402.0

10

【0242】

L6-PED-7 (PED-017) の調製

リンカー-6 (第3部 (d)、工程6の酸) (無水 DMSO 溶液) (0.0350 M、88.4 μL 、3.10 μmol) に、HBTU (DMSO 溶液) (0.300 M、11.3 μL 、3.38 μmol)、HOAt (DMSO 溶液) (0.300 M、11.3 μL 、3.38 μmol) 及び DIEA (DMSO 溶液) (0.300 M、23.5 μL 、7.04 μmol) を連続的に加えた。次いで、混合物を直ちに PED-7 オリゴヌクレオチド (DMSO 溶液) (0.0100 M、281 μL 、2.81 μmol) に加えた。活性化酸を収容するバイアルを DMSO (2 $\times$ 50 μL) で洗浄し、洗浄液を反応混合物に加えた。混合物を 40 $^{\circ}\text{C}$ で 2 時間攪拌した。粗混合物を LCMS で分析したところ、所望の生成物が観察された。反応溶液を -25 $^{\circ}\text{C}$ で一晩保存し、分取 HPLC により 2 回の等しい注入で精製した。これにより、それぞれ約 10 ml の 2 つの生成物画分を得た。これらを 28 ml のガラス中で合わせ、凍結乾燥して、標題構築物を白色固体 (7.00 mg、1.53 μmol 、収率：54.4%) として得た。

20

LCMS 純度 (225 nm+/-50) = 97.5%, RT = 1.104 min; [M]
] 4+ の m/z 計算値 1143.7, 実測値 1143.5

【0243】

L6-PED-8 (PED-018) の調製

リンカー-6 (第3部 (d)、工程6の酸) (無水 DMSO 溶液) (0.0350 M、94.4 μL 、3.30 μmol) に、HBTU (DMSO 溶液) (0.300 M、12.0 μL 、3.60 μmol)、HOAt (DMSO 溶液) (0.300 M、12.0 μL 、3.60 μmol) 及び DIEA (DMSO 溶液) (0.300 M、25.0 μL 、7.51 μmol) を連続的に加えた。次いで、混合物を直ちに PED-8 オリゴヌクレオチド (DMSO 溶液) (0.0100 M、300 μL 、3.00 μmol) に加えた。活性化酸を収容するバイアルを DMSO (2 $\times$ 50 μL) で洗浄し、洗浄液を反応混合物に加えた。混合物を 40 $^{\circ}\text{C}$ で 2 時間攪拌した。粗混合物を LCMS で分析したところ、所望の生成物が観察された。反応溶液を -25 $^{\circ}\text{C}$ で一晩保存し、分取 HPLC により 2 回の等しい注入で精製した。これにより、それぞれ約 10 ml の 2 つの生成物画分を得た。これらを 28 ml ガラスバイアル中で合わせ、凍結乾燥して、標題構築物を白色固体 (9.30 mg、2.26 μmol 、収率：75.4%) として得た。

30

LCMS 純度 (225 nm+/-50) = 95.3%, RT = 1.112 min; [M]
] 3+ の m/z 計算値 1370.4, 実測値 1370.3

40

【0244】

L6-PED-9 (PED-019) の調製

リンカー-6 (第3部 (d)、工程6の酸) (無水 DMSO 溶液) (0.0350 M、93.2 μL 、3.26 μmol) に、HBTU (DMSO 溶液) (0.300 M、11.9 μL 、3.56 μmol)、HOAt (DMSO 溶液) (0.300 M、11.9 μL 、3.56 μmol) 及び DIEA (DMSO 溶液) (0.300 M、24.7 μL 、7.42 μmol) を連続的に加えた。次いで、混合物を直ちに PED-9 オリゴヌクレオ

50

チド (DMSO 溶液) (0.0100 M、297 μ L、2.97 μ mol) に加えた。活性化酸を収容するバイアルを DMSO (2×50 μ L) で洗浄し、洗浄液を反応混合物に加えた。混合物を 40℃ で 2 時間攪拌した。粗混合物を LCMS で分析したところ、所望の生成物が観察された。反応溶液を -25℃ で一晩保存し、分取 HPLC により 2 回の等しい注入で精製した。これにより、それぞれ約 10 mL の 2 つの生成物画分を得た。これらを 28 mL ガラスバイアル中で合わせ、凍結乾燥して、標題構築物を白色固体 (8.20 mg、2.01 μ mol、収率：67.6%) として得た。

LCMS 純度 (225 nm+/-50) = 97%, RT = 1.080 min; [M]³⁺ の m/z 計算値 1363.4, 実測値 1363.4

【0245】

10

L6-PED-10 (PED-020) の調製

リンカー-6 (第3部 (d)、工程6の酸) (無水 DMSO 溶液) (0.0350 M、87.7 μ L、3.07 μ mol) に、HBTU (DMSO 溶液) (0.300 M、11.2 μ L、3.35 μ mol)、HOAt (DMSO 溶液) (0.300 M、11.2 μ L、3.35 μ mol) 及び DIEA (DMSO 溶液) (0.300 M、23.2 μ L、6.97 μ mol) を連続的に加えた。次いで、混合物を直ちに PED-10 オリゴヌクレオチド (DMSO 溶液) (0.0100 M、279 μ L、2.79 μ mol) に加えた。活性化酸を収容するバイアルを DMSO (2×50 μ L) で洗浄し、洗浄液を反応混合物に加えた。混合物を 40℃ で 2 時間攪拌した。粗混合物を LCMS で分析したところ、所望の生成物が観察された。反応溶液を -25℃ で一晩保存し、分取 HPLC により 2 回の等しい注入で精製した。これにより、それぞれ約 10 mL の 2 つの生成物画分を得た。これらを 28 mL ガラスバイアル中で合わせ、凍結乾燥して、標題構築物を白色固体 (8.20 mg、1.98 μ mol、収率：71.0%) として得た。

20

LCMS 純度 (225 nm+/-50) = 100%, RT = 1.100 min; [M]³⁺ の m/z 計算値 1381.8, 実測値 1381.7

【0246】

安定性試験手順

(i) 血漿安定性 (ヒト、マウス及び/又はラット)

試験化合物の 1 時間にわたる血漿中での分解を定量すること。血漿中でのインキュベーションを開始してから 0、30 及び 60 分後に存在する親化合物のパーセントを決定する。化合物を 10 mM DMSO ストック溶液から採取し、予め 37℃ でインキュベートした血漿に添加して、25 μ M の最終濃度を得、そして再インキュベートする。アリコート適切な時点で除去し、等容量の冷アセトニトリルでクエンチする。激しく混合した後、沈殿したタンパク質物質を濾過 (Multiscreen Solvinert フィルタープレート、Millipore、Bedford、MA、USA) により除去し、濾液を [M+H]⁺ 種の単一イオンモニターを用いて、質量分析検出を伴う逆相 HPLC により分析する。代謝回転は、インキュベーション前後の親のイオンクロマトグラムからのピーク面積の比較によって決定され、各時点で残存するパーセントとして表される。

30

【0247】

PED-1 及びリンカー-1～6 に由来する 6 つの完全コンジュゲートについての血漿安定性データを表 3 に詳述する。

40

【0248】

【表 9】

標的	グラム 陰性生物	アンチセンス オリゴヌクレオチド 配列	化合物	糖－スパーサー－リンカー	種	プラズマ安定性
						半減期(分)
AcpP	大腸菌 (<i>E. Coli</i>)	CCT CGA TAG TG (PED-1)	PED-006 {L1}	糖-L-Ala-OCH ₂ O-PIP-OH	マウス	161
					ヒト	133
			PED-007 {L2}	糖-L-Ala-OCH ₂ O-N-Me-Gly-OH	マウス	59
					ヒト	77
			PED-008 {L3}	糖-L-Ala-OCH(Me)O-N-Me-Gly-OH	マウス	136
					ヒト	83
			PED-009 {L4}	糖-L-Ala-OCH ₂ O-N-Me(CH ₂) ₃ COOH	マウス	6
					ヒト	47
			PED-010 {L5}	糖-L-Ala-OCH(Me)O-N-Me(CH ₂) ₃ COOH	マウス	26
					ヒト	101
			PED-011 {L6}	糖-L-Ala-NH(CH ₂) ₃ COOH	マウス	262
					ヒト	263

表3. 異なるリンカー構築物についての血漿安定性

【0249】

(i i) ミクロソーム代謝安定性 (ヒト、マウス及び／又はラット)

試験化合物 (3 μM) をプールした肝ミクロソームと共にインキュベートする。試験化合物を 45 分間の実験の過程にわたって 5 つの時点でインキュベートし、試験化合物を LC-MS/MS によって分析する。標準誤差を有する固有クリアランス値 (CL_{int}) と t_{1/2} 値を計算する。

【0250】

ミクロソーム (最終タンパク質濃度 0.5 mg/mL)、0.1 M リン酸緩衝液 pH 7.4 及び試験化合物 (最終基質濃度 3 μM; 最終 DMSO 濃度 0.25%) を、NADPH (最終濃度 1 mM) の添加前に 37 °C でプレインキュベートして反応を開始させる。最終インキュベーション容量は 50 μL である。試験した各化合物についてマイナス補因子対照インキュベーションを含ませ、ここで NADPH の代わりに 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) を添加する (マイナス NADPH)。2 つの対照化合物が各種と共に含まれる。全てのインキュベーションを、各試験化合物について単独で行う。各化合物を 0、5、15、30 及び 45 分間インキュベートする。対照 (マイナス NADPH) を 45 分間のみインキュベートする。20 μL のインキュベートを適切な時点で 60 μL のメタノールに移すことによって、反応を停止させる。終止プレートを、2,500 rpm で 20 分間、4 °C で遠心分離して、タンパク質を沈殿させる。タンパク質沈殿に続いて、サンプル上清を、4 つまでの化合物のカセット中で合わせ、一般的な LC-MS/MS 条件を用いて分析する。ln ピーク面積比 (化合物ピーク面積 / 内部基準ピーク面積) の時間に対するプロットから、線の勾配を決定する。続いて、半減期及び固有クリアランスを以下の式を用いて計算する：

消失速度定数 (k) = (－勾配)

【数 1】

10

20

30

40

50

$$\text{半減期}(t_{1/2}) (\text{分}) = \frac{0.693}{k}$$

$$\text{固有クリアランス}(CL_{int}) (\mu\text{L}/\text{分}/\text{mg タンパク質}) = \frac{V \times 0.693}{t_{1/2}}$$

式中、 V = インキュベーション容量 (μL) / ミクロソームタンパク質 (mg)

【0251】

関連対照化合物を評価し、固有クリアランス値が特定の限界内に入ることを確実にする。

【0252】

(iii) 肝細胞安定性 (ヒト、マウス及び／又はイヌ)

試験化合物 ($3 \mu\text{M}$) を凍結保存した肝細胞と共に懸濁液中でインキュベートする。60分間の実験の過程にわたって6つの時点でサンプルを除去し、LC-MS/MSによって試験化合物を分析する。標準誤差を有する固有クリアランス値 (CL_{int}) と半減期 ($t_{1/2}$) を計算する。凍結保存したプール肝細胞を、使用前に液体窒素中に保存する。2 mM L-グルタミン及び25 mM HEPESを補充したWilliams E培地及び試験化合物 (最終基質濃度 $3 \mu\text{M}$; 最終DMSO濃度 0.25%) を 37°C でプレインキュベートした後、凍結保存肝細胞の懸濁液 (2 mM L-グルタミン及び25 mM HEPESを補充したWilliams E培地中の最終細胞密度 0.5×10^6 生細胞/ mL) を添加して反応を開始させる。最終インキュベーション容積は $500 \mu\text{L}$ である。試験した各化合物について対照インキュベーションを含ませ、ここで、溶解した細胞を生細胞の代わりに添加する。2つの対照化合物が各種と共に含まれる。

【0253】

$50 \mu\text{L}$ のインキュベートを適切な時点で、内部基準を含有する $100 \mu\text{L}$ のメタノールに移すことによって反応を停止させる。対照 (溶解細胞) を60分間のみインキュベートする。終止プレートを 2500 rpm で30分間、 4°C で遠心分離して、タンパク質を沈殿させる。タンパク質沈殿に続いて、サンプル上清を、4つまでの化合物のカセット中で合わせ、一般的なLC-MS/MS条件を用いて分析する。 $\ln$ ピーク面積比 (化合物ピーク面積 / 内部基準ピーク面積) の時間に対するプロットから、線の勾配を決定する。続いて、半減期 ($t_{1/2}$) 及び固有クリアランス (CL_{int}) を以下の式を用いて計算する：

消失速度定数 (k) = (−勾配)

【数2】

$$\text{半減期}(t_{1/2}) (\text{分}) = \frac{0.693}{k}$$

$$\text{固有クリアランス}(CL_{int}) (\mu\text{L}/\text{分}/100\text{万細胞}) = \frac{V \times 0.693}{t_{1/2}}$$

式中、 V = インキュベーション容量 (μL) / 細胞数

【0254】

各種について2つの対照化合物をアッセイに含め、これらの化合物の値が特定の限界内にならない場合、結果を拒絶し、試験を繰り返す。

・ 結果；構築物 L6-PED-1 (PED-011) は、全て低 $CL_{int} < 10 \text{ mL}/\text{分}/10^6$ 細胞でヒト、マウス及びイヌの肝細胞安定性を示した

【0255】

(i v) 全ヒト血液安定性 (ヒト、マウス及び／又はラット)

試験化合物を、新鮮なヒト (男女混合) 血液と共に、5 時点で 60 分間にわたって 37℃ でインキュベートする。サンプルを LC-MS/MS によって分析し、残存する親化合物のパーセントを各時点について計算する。各時点で残存する親化合物のパーセントを決定する。

【0256】

新鮮なヒト (男女混合) 血液を使用する。血液中 1 μM の試験又は対照化合物濃度で、単一インキュベーションを 37℃ で行う。インキュベーションにおける最終 DMSO 濃度は、0.25% である。対照化合物を各種と共に含める。反応を、0、5、15、30 及び 60 分後に、アセトニトリル含有内部基準によって終了させる。サンプリングプレートを遠心分離し (3000 rpm、45 分、4℃)、各時点からの上清を LC-MS/MS によって親化合物について分析する。次いで、0 分サンプルに対する各時点で残存する親化合物のパーセンテージを、LC-MS/MS ピーク面積比 (化合物ピーク面積 / 内部基準ピーク面積) から計算する。

【0257】

(v) Log D 決定:

小型化「振盪フラスコ」方法を用いて 96 ウェルマイクロタイタープレート中で、Log D (PBS) 決定を行う。簡潔には、化合物を 10 mM DMSO ストック溶液から採取し、等容量のリン酸緩衝生理食塩水 (10 mM; pH 7.4) (PBS) 及び 1-オクタノール (Sigma-Aldrich、Poole、Dorset、UK) を含むウェルに添加して、50 μM の最終濃度を得る。次いで、プレートに蓋をし、マイクロタイタープレートシェーカー上で 1 時間激しく混合し、その後、それらを放置し、PBS とオクタノール相を分離させた。[M+H]⁺ 種の単一イオンモニターを使用して、質量分析検出を伴う逆相 HPLC によって PBS 層を分析する。Log D (PBS) は、PBS 相中の化合物のイオンクロマトグラムからのピーク面積と、アセトニトリル / 水 (50:50) に溶解した同じ化合物の 50 μM 基準のピーク面積とを比較することによって決定され、下記の式を用いて計算される:

【数 3】

$$\text{LogD} = \text{Log} \left[\frac{\text{AUC}_{\text{std}} - \text{AUC}_{\text{pbs}}}{\text{AUC}_{\text{pbs}}} \right]$$

式中、AUC_{std} 及び AUC_{pbs} は、それぞれ基準及び試験イオンクロマトグラムからのピーク面積である。また、アッセイの開始前に緩衝液の pH を 0.1 M の HCL で調整することにより、pH 6.9 及び 5.5 の PBS を用いて Log D (PBS) 決定を行った。

・ 結果; 構築物 L6-PED-1 (PED-011) Log D_{7.4} = 0.74

【0258】

pH の関数としての化学的安定性の決定

本発明の化合物の化学的安定性を、pH 対時間の関数として研究する。化合物の損失及び放出された親の形成を、適宜 RP-HPLC によって定量する。

【0259】

HPLC 安定性試験の一般手順

全ての化学的安定性試験 (0.2 ~ 2.0 mg/mL) は、以下の pH 緩衝溶液中の溶解度に応じて、共溶媒 (MeCN 又は DMSO) を用いて又は用いずに、37℃ で 2 回行う。結果は、最初及び最終時点で存在する化合物及び親抗菌剤の両方のモル%として示す (HPLC ピーク積分により測定)。形成された親抗菌剤の濃度を計算するために、吸光係数の差を考慮に入れるために純粋な基準を用いて HPLC を較正することが必要である。

【0260】

(i) pH 1.2 0.1 M 塩化物緩衝液

これは、NaCl (0.2 g) を 90 mL の蒸留水に溶解し、約 5 mL の 1 M 塩酸で pH を 1.2 に調整することによって調製される。容量を蒸留水で 100 mL にし、必要であれば、数滴の 1 M 塩酸で pH 1.2 に調整する。試験条件は 37℃であり、合計時間は 1 時間である。

【0261】

(ii) pH 3.0 0.1 M クエン酸緩衝液

これは、pH 3.0 が得られるまで、0.1 M クエン酸水溶液 100 mL に 1 M 水酸化ナトリウム (4~5 mL) を添加することによって調製される。試験条件は 20℃であり、合計時間は 2 時間である。

10

【0262】

(iii) pH 6.8 0.1 M リン酸緩衝液

これは、pH 6.8 が得られるまで、0.1 M リン酸二水素ナトリウム水溶液 100 mL に 1 M 水酸化ナトリウムを添加することによって調製される。試験条件は 37℃であり、合計時間は 2 時間である。

【0263】

(iv) pH 7.4 0.1 M リン酸緩衝液

これは、pH 7.4 が得られるまで、0.1 M リン酸二水素ナトリウム水溶液 100 mL に 1 M 水酸化ナトリウムを添加することによって調製される。試験条件は 37℃であり、合計時間は 2 時間である。

20

【0264】

(v) pH 8.0 0.1 M リン酸緩衝液

これは、pH 8.0 が得られるまで、0.1 M リン酸二水素ナトリウム水溶液 100 mL に 1 M 水酸化ナトリウムを添加することによって調製される。試験条件は 20℃であり、合計時間は 2 時間である。

【0265】

PED-1 及びリンカー-1~6 に由来する 6 つの完全コンジュゲートについての化学的安定性データを表 4 に詳述する：

【0266】

30

40

50

【表 10】

標的	グラム 陰性生物	アンチセンス オリゴヌクレオチド 配列	化合物	糖－スパーサー－リンカー	緩衝液 pH	化学的安定性
						半減期(分)
AcpP	大腸菌 (<i>E. coli</i>)	CTT CGA TAG TG {PED-1}	PED-006 {L1}	糖-L-Ala-OCH ₂ O-P3P-OH	3.0	143
					5.0	326
					7.4	275
			PED-007 {L2}	糖-L-Ala-GCH ₂ O-N-Me-Gly-OH	3.0	438
					5.0	>480
					7.4	>480
			PED-008 {L3}	糖-L-Ala-OCH(Me)O-N-Me-Gly-OH	3.0	>480
					5.0	303
					7.4	275
			PED-009 {L4}	糖-L-Ala-OCH ₂ O-N-Me(CH ₂) ₂ COOH	3.0	316
					5.0	275
					7.4	241
			PED-010 {L5}	糖-L-Ala-OC(HMe)O-N-Me(CH ₂) ₂ COOH	3.0	293
					5.0	>480
					7.4	>480
			PED-011 {L6}	糖-L-Ala-NH(CH ₂) ₂ COOH	3.0	365
					5.0	159
					7.4	>480

表4. 異なるリンカー構築物の化学的安定性

【0267】

In vivo 感染モデル研究

尿路感染マウスモデルにおける大腸菌 (*E. coli*) (ATCC 25922) に対する PED-011 の有効性

雌の BALB/c マウスに、約 5×10^8 CFU/動物の大腸菌 (*E. coli*) (ATCC 25922) を経尿道的に感染させた。感染から4時間後、動物をシプロフロキサシン 30 mg/kg で1日2回 (Q12h) 経口的に、並びに10及び30 mg/kg (u.i.d) の PED-011 の単回 IV 用量で処置した。各群の10匹の動物を処置後48時間で終了し、膀胱及び腎臓を収集して細菌量を決定した。

【0268】

【表 1 1】

群	処置	処置 期間	投与時間 PI (h)	組織中の 細菌計数の 時点(h) PI	動物/群の数
1	早期感染対照	NA	NA	4	10
2	ビヒクル対照(ビヒクル, PBS, IV, Q24 h, 1 用量)	48 h	4h	52*	10
3	シプロフロキサシン(30 mg/kg, p.o., b.i.d. Q12h)	48 h	4 h	52*	10
4	PED-011 (10 mg/kg, IV, Q24h, 1 用量)	48 h	4 h	52*	10
5	PED-011 (30 mg/kg, IV, Q24h, 1 用量)	48 h	4 h	52*	10

*処置後 48h

10

20

【0269】

シプロフロキサシンのビヒクルは0.25%のカルボキシメチルセルロース(CMC)(w/v)であり、PBSをPED-011に使用した。PED-011を2及び6mg/mLでPBSに溶解した。感染から4時間後、動物を、シプロフロキサシンの最初の経口用量及びPED-011の単回用量(10及び30mg/kg、IV、単回ボラス用量、5mL/kg用量容量)で処置した。動物は、投与スケジュールに従って経口シプロフロキサシンのさらなる用量を受けた。

【0270】

結果

シプロフロキサシン(30mg/kg、p.o.、Q12h)は、処置後48時間で4時間の対照及びビヒクル対照と比較した場合、膀胱及び腎臓で有意な抗菌作用を示した($p < 0.05$)(図1及び2)。

30

【0271】

PED-011(30mg/kg、IV、単回用量)は、処置後48時間で4時間のPI対照及びビヒクル対照と比較した場合、膀胱において有意な抗菌活性を示した($p < 0.05$)；PED-011(10mg/kg、IV、単回用量)は、処置後48時間で4時間及びビヒクル対照と比較した場合、有意に有効ではなかった。(図1)

【0272】

PED-011(30mg/kg、IV、単回投与)は、処置後48時間で4時間PI対照及びビヒクル対照と比較した場合、腎臓で有意な抗菌活性を示した($p < 0.05$)；PED-011(10mg/kg、IV、単回投与)は、処置後48時間で4時間PI対照及びビヒクル対照と比較した場合、腎臓で有意な抗菌活性を示した($p < 0.05$)。(図2)

40

【0273】

尿路感染マウスモデルにおける大腸菌(E.coli)(CFT073、ATCC(登録商標)700928(商標))に対するPED-011の有効性；尿路疾患性株によるチャレンジ

雌のBALB/cマウスに、約 5×10^8 CFU/動物の大腸菌(E.coli)(CFT073、ATCC(登録商標)700928(商標))を経尿道的に感染させた。感染から24時間後、動物をシプロフロキサシン30mg/kgで1日2回(Q12h)経口

50

的に、並びに3、10及び30 mg/kg (u. i. d) のPED-011の単回IV用量で処置した。各群の10匹の動物を処置後48時間（感染後72時間）で終了し、膀胱及び腎臓を収集して細菌量を決定した。

【0274】

【表12】

群	処置	処置期間	投与 時間 PI (h)	組織中の 細菌計数の 時点(h) PI	動物/群の数
1	早期感染対照	NA	NA	24	10
2	ビヒクル対照(ビヒクル, PBS, IV, Q24 h, 1用量)	48 h	24h	72*	10
3	シプロフロキサシン(30 mg/kg, p.o., b.i.d. Q12h)	48 h	24 h	72*	10
4	PED-011 (3 mg/kg, IV, 1用量)	48 h	24 h	72*	10
5	PED-011 (10 mg/kg, IV, 1用量)	48 h	24 h	72*	10
6	PED-011 (30 mg/kg IV, 1用量)	48 h	24 h	72*	10

*処置後48h; 感染後72h

10

20

【0275】

シプロフロキサシンのビヒクルは、0.25%のカルボキシメチルセルロース(CMC)(w/v)であり、PBSをPED-011に使用した。PED-011を0.6、2及び6 mg/mLでPBSに溶解した。感染から24時間後、動物を、シプロフロキサシンの最初の経口用量及びPED-011の単回用量(10及び30 mg/kg、IV、単回ボラス用量、5 mL/kg用量容量)で処置した。動物は、投与スケジュールに従って経口シプロフロキサシンのさらなる用量を受けた。

30

【0276】

結果

膀胱では、シプロフロキサシンは、72時間で、24時間のPI対照及びビヒクル対照と比較して有意な殺菌活性を示した($p < 0.05$) (図3)。腎臓では、シプロフロキサシンは、24時間のPI対照及びビヒクル対照と比較して有意な殺菌活性を示した($p < 0.05$) (図4)。

【0277】

膀胱では、PED-011(3、10及び30 mg/kg、IV、1用量)は、ビヒクル対照と比較して有意な抗菌作用を示さなかったが($p > 0.05$)、膀胱内細菌数の用量依存的な平均減少があるように思われた(図3)。腎臓では、PED-011(3、10及び30 mg/kg、IV、1用量)は、用量依存的な抗菌作用を示し、ビヒクル対照と比較すると30 mg/kgで有意な作用を示した($p < 0.05$) (図4)。

40

【0278】

尿路感染マウスモデルにおける大腸菌(E. coli)(ATCC BAA-2340)に対するPED-011の有効性; 耐性株によるチャレンジ

雌のBALB/cマウスに、約 5×10^8 CFU/動物の大腸菌(E. coli)(ATCC BAA-2340)を経尿道的に感染させた。感染から24時間後、動物をシプロフロキサシン30 mg/kgで1日2回(Q12h)経口的に、並びに10及び30 mg/kg(u. i. d)のPED-011を単回IV用量で処置した。各群の10匹の動物を処置後48時間で終了し、膀胱及び腎臓を収集して細菌量を決定した。

50

【0279】

【表13】

群	処置	処置期間	投与 時間 PI (h)	組織中の 細菌計数の 時点(h) PI	動物/群の数
1	早期感染対照	NA	NA	24	10
2	ビヒクル対照(ビヒクル, PBS, IV, Q24 h, 1 用量)	48 h	24h	72*	10
3	シプロフロキサシン(30 mg/kg, p.o., b.i.d. Q12h)	48 h	24 h	72*	10
4	PED-011 (10 mg/kg, IV, 1 用量)	48 h	24 h	72*	10
5	PED-011 (30 mg/kg, IV, 1 用量)	48 h	24 h	72*	10

*処置後 48h

10

20

【0280】

シプロフロキサシンのビヒクルは、0.25%のカルボキシメチルセルロース(CMC)(w/v)であり、PBSをPED-011に使用した。PED-011を2及び6mg/mLでPBSに溶解した。感染から24時間後、動物を、シプロフロキサシンの最初の経口用量及びPED-011の単回用量(10及び30mg/kg、IV、単回ボラス用量、5mL/kg用量容量)で処置した。動物は、投与スケジュールに従って経口シプロフロキサシンのさらなる用量を受けた。

【0281】

結果

シプロフロキサシン(30mg/kg、p.o.、Q12h)は、処置後48時間で24時間の対照及びビヒクル対照と比較した場合、膀胱及び腎臓で有意な抗菌作用を示した($p < 0.05$) (図5及び6)。

30

【0282】

PED-011(30mg/kg、IV、単回用量)は、処理後48時間で24時間PI対照及びビヒクル対照と比較した場合、膀胱において減少したが統計学的に有意ではない抗菌活性を示した($p < 0.05$)；PED-011(10mg/kg、IV、単回用量)は、処理後48時間で4時間及びビヒクル対照と比較した場合、有意に有効ではなかった。(図5)

【0283】

PED-011(30mg/kg、IV、単回用量)は、処理後48時間で24時間PI対照及びビヒクル対照と比較した場合、腎臓で有意な抗菌活性を示した($p < 0.05$)；PED-011(10mg/kg、IV、単回用量)は、処理48時間後で4時間PI対照及びビヒクル対照と比較した場合、腎臓で有意な抗菌活性を示した($p < 0.05$)。(図6)

40

【0284】

マウスの好中球減少性肺感染モデルにおけるA.バウマンニイ(A.baumannii)(ATCC19606)に対するPED-012の有効性

本研究の目的は、マウスの好中球減少性肺感染モデルにおいて、A.バウマンニイ(A.baumannii)(ATCC19606)に対する10及び30mg/kg用量レベルのPED-012の鼻腔内投与後の有効性を特徴付けることであった。

50

【0285】

雌のBALB/cマウスに、0.02ml（約 1×10^9 CFU/mlを含む）の接種材料を注射することにより感染させた；10 μ lのピペット（ $\sim 2 \times 10^7$ CFU/動物）を用いて、麻酔した動物の鼻腔内のそれぞれに10 μ lを注射した。2匹の動物の間で接種材料を穏やかに混合し、均一に分布させる。感染の4時間後、動物を、シプロフロキサシン30mg/kgで1日2回（Q12時間）経口的に、並びに10及び30mg/kg（PBS中）のPED-012の単回IN用量で処置した。各群の10匹の動物を処置後48時間で終了し、肺を収集して細菌量を決定した。

【0286】

【表14】

10

群	処置	処置期間	投与 時間 PI (h)	肺内の細菌 計数の時点 (h) PI	動物/群の数
1	早期感染対照	NA	NA	4	5
2	後期感染対照(ビヒクル, 単回用量, IN)	48 h	4 h	52*	5
3	シプロフロキサシン(10 mg/kg, po, b.i.d., Q12 h)	48 h	4 h	52*	5
4	試験化合物 PED-012 (10 mg/kg), IN, 単回用量	48 h	4 h	52*	5
5	試験化合物 PED-012 (30 mg/kg), IN, 単回用量	48 h	4 h	52*	5

20

*処置後 48h; IN: 鼻腔内

【0287】

結果

シプロフロキサシン（10mg/kg、po、Q12h）は、52時間ビヒクル対照と比較した場合、有意な抗細菌効果を示した（ $p < 0.05$ ）。

【0288】

PED-012 [30mg/kg、IN、単回用量] は、52時間ビヒクル対照と比較した場合、有意な抗菌活性を示した（ $p < 0.05$ ）；PED-012（10mg/kg、IN、単回用量）は、52時間PIでビヒクル対照と比較した場合、有意に有効ではなかった（ $p > 0.05$ ）。

30

40

50

【図面】

【図 1】

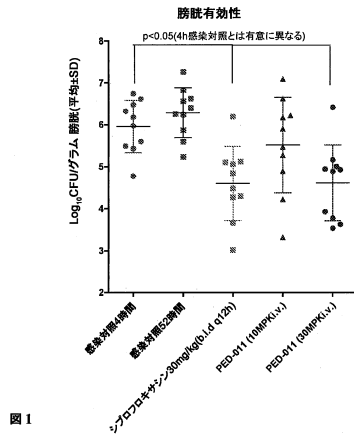


図 1

【図 2】

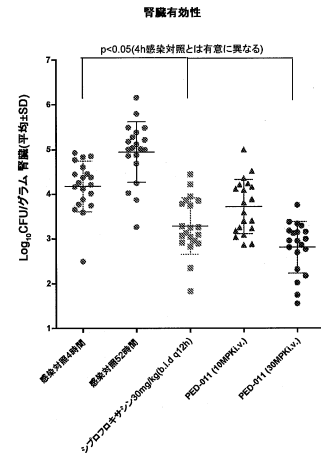


図 2

10

【図 3】

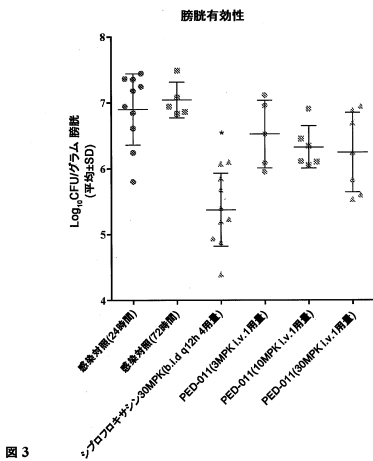


図 3

【図 4】

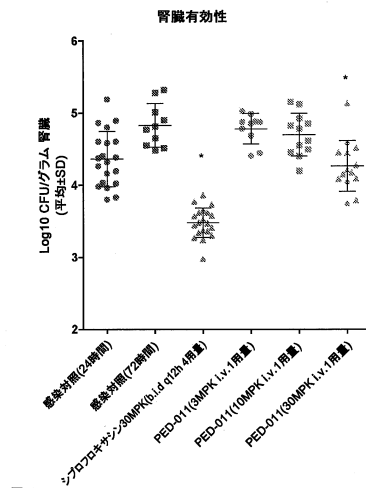


図 4

20

30

40

50

【図 5】

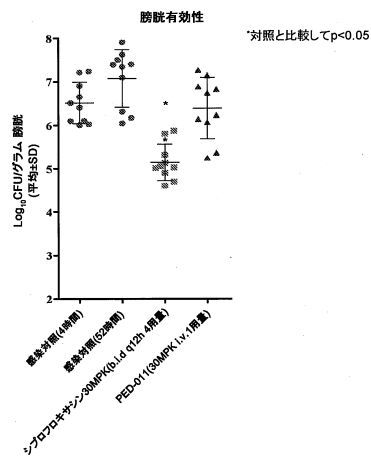


図 5

【図 6】

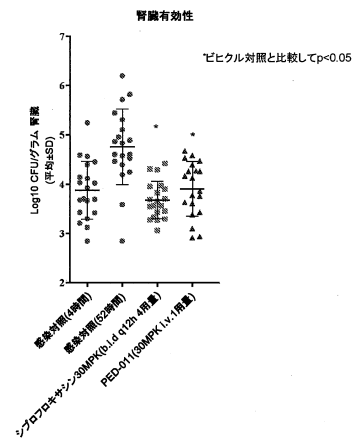


図 6

10

【図 7】

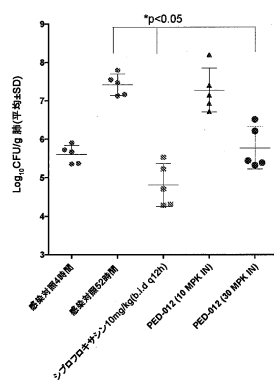


図 7

20

30

【配列表】

2022510346000001.app

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2019/053354

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N15/113 A61K31/7088 A61K47/54 A61P31/04 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N A61K A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, EMBL		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2006/104530 A1 (CELL WORKS THERAPEUTICS INC [US]; DUFF ROBERT [US]) 5 October 2006 (2006-10-05) claims 1,3,6,11	1-34
Y	WO 2014/002039 A1 (SHIRE AG [CH]) 3 January 2014 (2014-01-03) claims 1,4,7,8,37	1-34
A	WO 2015/006740 A2 (ALNYLAM PHARMACEUTICALS INC [US]) 15 January 2015 (2015-01-15) page 45 - page 46; claims 1-4	1-34
	----- -/--	
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 12 March 2020		Date of mailing of the international search report 20/03/2020
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040 Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Bucka, Alexander

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2019/053354

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HEGARTY JOHN P ET AL: "Advances in therapeutic bacterial antisense biotechnology", APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, SPRINGER BERLIN HEIDELBERG, BERLIN/HEIDELBERG, vol. 102, no. 3, 5 December 2017 (2017-12-05), pages 1055-1065, XP036390096, ISSN: 0175-7598, DOI: 10.1007/S00253-017-8671-0 [retrieved on 2017-12-05] figures 1,2; tables 1,3 -----	1-34
A	MATTHIEU FONVIELLE ET AL: "Electrophilic RNA for Peptidyl-RNA Synthesis and Site-Specific Cross-Linking with tRNA-Binding Enzymes", ANGEWANDTE CHEMIE, INTERNATIONAL EDITION, vol. 55, no. 43, 26 September 2016 (2016-09-26), pages 13553-13557, XP55675927, DE ISSN: 1433-7851, DOI: 10.1002/anie.201606843 scheme 2; figure 1 -----	1-34
A	EP 3 323 893 A1 (KYOWA HAKKO KIRIN CO LTD [JP]) 23 May 2018 (2018-05-23) paragraphs [0040], [0043]; claims 1-6 -----	1-34
A	GB 2 020 665 A (HIRAI Y; YAMAMURA Y; KISHIMOTO T; AZUMA I) 21 November 1979 (1979-11-21) claims 1-8 -----	1-34
A	XIAO-YAN XUE ET AL: "Advances in the delivery of antisense oligonucleotides for combating bacterial infectious diseases", NANOMEDICINE: NANOTECHNOLOGY, BIOLOGY AND MEDICINE, vol. 14, no. 3, 16 January 2018 (2018-01-16), pages 745-758, XP55676062, NL ISSN: 1549-9634, DOI: 10.1016/j.nano.2017.12.026 table 1 ----- -/--	1-34

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

page 2 of 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2019/053354

Q(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BRUCE L GELLER ET AL: "Morpholino oligomers tested in vitro, in biofilm and in vivo against multidrug-resistant <i>Klebsiella pneumoniae</i> ", JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY., vol. 73, no. 6, 1 March 2018 (2018-03-01), pages 1611-1619, XP55602138, GB ISSN: 0305-7453, DOI: 10.1093/jac/dky058 figure 1; table 1 -----	1-34
A	T. P. PRAKASH ET AL: "Targeted delivery of antisense oligonucleotides to hepatocytes using triantennary N-acetyl galactosamine improves potency 10-fold in mice", NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 42, no. 13, 3 July 2014 (2014-07-03), pages 8796-8807, XP55148318, ISSN: 0305-1048, DOI: 10.1093/nar/gku531 figures 1-3 -----	1-34
A	WO 2016/172615 A1 (UNIV DELAWARE [US]; GRIMES CATHERINE LEIMKUHLER [US] ET AL.) 27 October 2016 (2016-10-27) the whole document -----	1-34

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2019/053354

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2006104530 A1	05-10-2006	NONE	
WO 2014002039 A1	03-01-2014	US 2014073589 A1 WO 2014002039 A1	13-03-2014 03-01-2014
WO 2015006740 A2	15-01-2015	AU 2014287002 A1 CA 2917161 A1 EP 3019200 A2 JP 2016529230 A US 2016376585 A1 WO 2015006740 A2	11-02-2016 15-01-2015 18-05-2016 23-09-2016 29-12-2016 15-01-2015
EP 3323893 A1	23-05-2018	EP 3323893 A1 JP WO2017010575 A1 TW 201718030 A US 2018193471 A1 WO 2017010575 A1	23-05-2018 26-04-2018 01-06-2017 12-07-2018 19-01-2017
GB 2020665 A	21-11-1979	DE 2912865 A1 FR 2421178 A1 GB 2020665 A JP S54130516 A	18-10-1979 26-10-1979 21-11-1979 09-10-1979
WO 2016172615 A1	27-10-2016	US 2018298061 A1 WO 2016172615 A1	18-10-2018 27-10-2016

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

A 6 1 K 47/54 (2017.01)

F I

A 6 1 K 47/54

テーマコード (参考)

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,K
G,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,N
I,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,
TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

・パーク・バイオハブ・ペダニウス・セラピューティクス・リミテッド内

(72)発明者

ティモシー・シュルツ・ウーテルモール

イギリス・S K 1 0・4 T G・チェシャー・マックルズフィールド・アルダリー・パーク・バイオ
ハブ・ペダニウス・セラピューティクス・リミテッド内

(72)発明者

フレイザー・マリー

イギリス・S K 1 0・4 T G・チェシャー・マックルズフィールド・アルダリー・パーク・バイオ
ハブ・ペダニウス・セラピューティクス・リミテッド内

F ターム (参考)

4C076 AA95 CC32 CC41 EE59 FF70

4C084 AA13 AA17 NA14 ZB351 ZB352 ZC752

4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB35