

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2024-539093

(P2024-539093A)

(43)公表日 令和6年10月28日(2024.10.28)

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

C 0 7 H 21/02 (2006.01)

C 0 7 H 21/02

C S P 4 C 0 5 7

C 1 2 N 15/11 (2006.01)

C 1 2 N 15/11

Z Z N A

C 1 2 N 15/113 (2010.01)

C 1 2 N 15/113

Z

C 0 7 H 19/06 (2006.01)

C 0 7 H 19/06

C 0 7 H 19/16 (2006.01)

C 0 7 H 19/16

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全267頁)

(21)出願番号 特願2024-523413(P2024-523413)

(86)(22)出願日 令和4年10月19日(2022.10.19)

(85)翻訳文提出日 令和6年5月31日(2024.5.31)

(86)国際出願番号 PCT/US2022/047102

(87)国際公開番号 WO2023/069495

(87)国際公開日 令和5年4月27日(2023.4.27)

(31)優先権主張番号 63/257,289

(32)優先日 令和3年10月19日(2021.10.19)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(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,A

T,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

(71)出願人 505369158

アルナイラム ファーマシューティカル
ズ, インコーポレイテッドALNYLAM PHARMACEUT
ICALS, INC.アメリカ合衆国02142マサチューセ
ッツ州ケンブリッジ、ウエスト・ケンド
ール・ストリート675、ヘンリ・エイ
・ターミア・スクエア

(74)代理人 100102978

弁理士 清水 初志

(74)代理人 100205707

弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100160923

弁理士 山口 裕孝

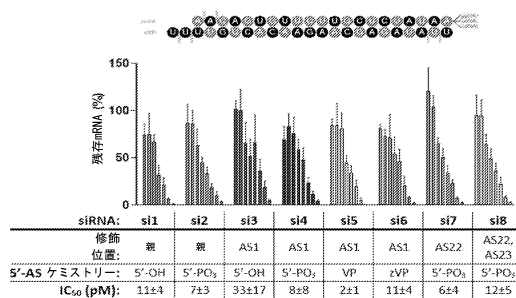
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 2'-デオキシ-2'-F-2'-C-メチルヌクレオチドを有するオリゴヌクレオチド

(57)【要約】

本開示は、概して、2'-ジェミナル置換ヌクレオチドおよび2'-ジェミナル置換ヌクレオチド、ならびにそのような2'-ジェミナル置換ヌクレオチドおよび2'-ジェミナル置換ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドおよびdsRNA分子に関する。

A)



A)

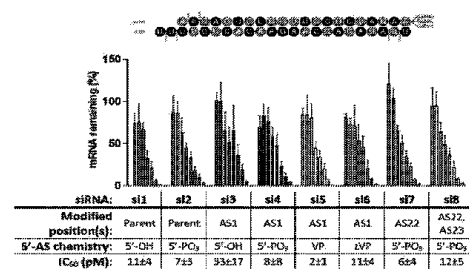


FIG. 17A

【特許請求の範囲】

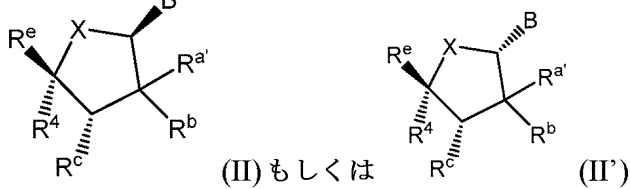
【請求項 1】

センス鎖と該センス鎖に相補的なアンチセンス鎖とを含む二本鎖RNA (dsRNA) であって、

該dsRNAが、少なくとも約15塩基対の二本鎖領域を有し、

該アンチセンス鎖が、(a) および (b) :

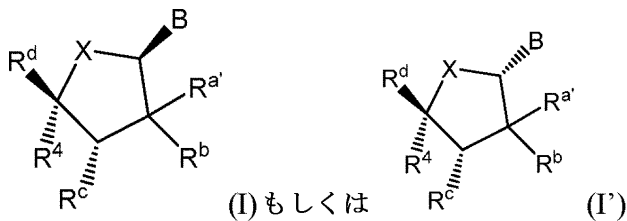
(a) 式 (II) もしくは (II') の2'-ジェミナル置換ヌクレオシドである、5末端ヌクレオシド:



10

ならびに

(b) 少なくとも、該アンチセンス鎖の5'端から数えて位置2~9 (例えば位置2、3、4、5、6、7、8および/もしくは9) のうちの1つにおける、式 (I) もしくは (I') の2'-ジェミナル置換ヌクレオシド:



20

のうちの一方または両方を含み、

式 (I)、(I')、(II) および (II') において、式中、

Xは、O、S、C (R^X)₂、またはN (R^{XN}) であり、

各 R^X は、独立して、水素、ハロゲン、置換されていてもよいC₁~4アルキル、C₁~4ハロアルキル、置換されていてもよいC₂~4アルケニル、または置換されていてもよいC₂~4アルキニルであるか、あるいは両方の R^X が全体として、=O、=S、=N (R^N)、または=CH₂を形成し、

R^{XN} は、水素、置換されていてもよいC₁~30アルキル、置換されていてもよいC₁~C₃₀アルコキシ、C₁~4ハロアルキル、置換されていてもよいC₂~4アルケニル、置換されていてもよいC₂~4アルキニル、置換されていてもよいC₁~30アルキル-CO₂H、または窒素保護基であり、

Bは、修飾されていてもよい核酸塩基であり、

R^{a1} は、ハロゲン、水素、-OR^{a2}、-SR^{a3}、置換されていてもよいC₁~30アルキル、C₁~30ハロアルキル、置換されていてもよいC₂~30アルケニル、置換されていてもよいC₂~30アルキニル、または置換されていてもよいC₁~30アルコキシ、アミノ (NH₂)、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、ジヘテロアリールアミノ、アミノ酸、-O (CH₂CH₂O)_mCH₂CH₂OR^{a4}、シアノ、アルキル-チオ-アルキル、チオアルコキシ、シクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、-NH (CH₂CH₂NH)_nCH₂CH₂-R^{a5}、NHC (O) R^{a4}、脂質、脂質に共有結合で取り付けられたリンカー、リガンド、リガンドに共有結合で取り付けられたリンカー、固形支持体、固形支持体に共有結合で取り付けられたリンカー、または後続のヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合であり、

R^{a2} は、水素またはヒドロキシル保護基であり、

R^{a3} は、水素または硫黄保護基であり、

30

40

50

R^{a4} は、出現ごとに独立して、H、 $C_1 \sim C_{30}$ アルキル、シクリル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アラルキル、糖または R^{a5} であり、

R^{a5} は、出現ごとに独立して、アミノ (NH_2)、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、またはジヘテロアリールアミノであり、

mは、1～50であり、

nは、1～50であり、

R^b は、置換されていてもよい $C_1 \sim C_{30}$ アルキル、置換されていてもよい $C_2 \sim C_{30}$ アルケニル、置換されていてもよい $C_2 \sim C_{30}$ アルキニル、またはハロゲンであり、

R^c は、後続のヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合、水素、ハロゲン、 $-OR^{c2}$ 、 $-SR^{c3}$ 、置換されていてもよい $C_1 \sim C_{30}$ アルキル、 $C_1 \sim C_{30}$ ハロアルキル、置換されていてもよい $C_2 \sim C_{30}$ アルケニル、置換されていてもよい $C_2 \sim C_{30}$ アルキニル、または置換されていてもよい $C_1 \sim C_{30}$ アルコキシ、アミノ (NH_2)、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、ジヘテロアリールアミノ、アミノ酸、 $-O(CH_2CH_2O)_rCH_2CH_2OR^{c4}$ 、シアノ、アルキル-チオ-アルキル、チオアルコキシ、シクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、 $-NH(CH_2CH_2NH)_sCH_2CH_2-R^{c5}$ 、 $NHC(O)R^{c4}$ 、脂質、脂質に共有結合で取り付けられたリンカー、リガンド、リガンドに共有結合で取り付けられたリンカー、固形支持体、または固形支持体に共有結合で取り付けられたリンカーであり、ここで、任意で、少なくとも R^c または R^{a1} は、後続のヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合であり、

R^{c2} は、水素またはヒドロキシル保護基であり、

R^{c3} は、水素または硫黄保護基であり、

R^{c4} は、出現ごとに独立して、H、 $C_1 \sim C_{30}$ アルキル、シクリル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アラルキル、糖または R^{c5} であり、

R^{c5} は、出現ごとに独立して、アミノ (NH_2)、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、またはジヘテロアリールアミノであり、

rは、1～50であり、

sは、1～50であり、

R^4 は、水素、置換されていてもよい $C_1 \sim C_6$ アルキル、置換されていてもよい $C_2 \sim C_6$ アルケニル、置換されていてもよい $C_2 \sim C_6$ アルキニル、または置換されていてもよい $C_1 \sim C_6$ アルコキシであるか、

あるいは、 R^4 および R^a は、全体として、 $4'-C(R^{a11}R^{a12})_v-Y-2'$ または $4'-Y-C(R^{a11}R^{a12})_v-2'$ であり、

Yは、 $-O-$ 、 $-CH_2-$ 、 $-CH(Me)-$ 、 $-C(CH_3)_2-$ 、 $-S-$ 、 $-N(R^{a13})-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-N(R^{a13})C(O)-$ 、または $-C(O)N(R^{a13})-$ であり、

R^{a11} および R^{a12} は、独立して、H、置換されていてもよい $C_1 \sim C_6$ アルキル、置換されていてもよい $C_2 \sim C_6$ アルケニルまたは置換されていてもよい $C_2 \sim C_6$ アルキニルであり、

R^{a13} は、水素、置換されていてもよい $C_1 \sim C_{30}$ アルキル、置換されていてもよい $C_1 \sim C_{30}$ アルコキシ、 $C_1 \sim C_4$ ハロアルキル、置換されていてもよい $C_2 \sim C_4$ アルケニル、置換されていてもよい $C_2 \sim C_4$ アルキニル、置換されていてもよい $C_1 \sim C_{30}$ アルキル- CO_2H 、または窒素保護基であり、

vは、1、2または3であるか、

あるいは、 R^4 および R^c は、それらが取り付けられている原子と共に全体として、置換されていてもよい $C_3 \sim 8$ シクロアルキル、置換されていてもよい $C_3 \sim 8$ シクロアルケニル、または置換されていてもよい3～8員ヘテロシクリルを形成し、

R^d は、 $-CH(R^{d1})-R^{d2}$ または $-C(R^{d1})=CHR^{d2}$ であり、

R^{d1} は、水素、置換されていてもよい $C_1 \sim C_{30}$ アルキル、置換されていてもよい $-C_2 \sim$

30 アルケニル、または置換されていてもよい-C₂~30アルキニルであり、

R^{d2}は、先行するヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合であり、

R^eは、置換されていてもよい-C₂~6アルケニル-R^{e1}、置換されていてもよいC₁~6アルキル-R^{e1}、または置換されていてもよい-C₂~6アルキニル-R^{e1}であり、

R^{e1}は、-P(O)(OR^{e4})₂、-OR^{e2}、-SR^{e3}、-P(S)(OR^{e4})₂、-P(S)(SR^{e5})(OR^{e4})₂、-P(S)(SR^{e5})₂、-OP(O)(OR^{e4})₂、-OP(S)(OR^{e4})₂、-OP(S)(SR^{e5})(OR^{e4})₂、-OP(S)(SR^{e5})₂、-SP(O)(OR^{e4})₂、-SP(S)(OR^{e4})₂、-SP(S)(SR^{e5})(OR^{e4})₂、または-SP(S)(SR^{e5})₂であり、

R^{e2}は、水素または酸素保護基であり、

R^{e3}は、水素または硫黄保護基であり、

各R^{e4}は、独立して、水素、置換されていてもよいC₁~30アルキル、置換されていてもよいC₂~30アルケニル、または置換されていてもよいC₂~30アルキニル、または酸素保護基であり、

および各R^{e5}は、独立して、水素、置換されていてもよいC₁~30アルキル、置換されていてもよいC₂~30アルケニル、または置換されていてもよいC₂~30アルキニル、または硫黄保護基である、

前記dsRNA。

【請求項2】

アンチセンス鎖の5'末端ヌクレオチドが式(II)の2'-ジェミナル置換ヌクレオチドである、前記請求項のいずれか一項記載のdsRNA。

【請求項3】

アンチセンス鎖がその5'端にビニルホスホネート（例えばE-ビニルホスホネート）基を含む、前記請求項のいずれか一項記載のdsRNA。

【請求項4】

アンチセンス鎖の5'末端ヌクレオチドが式(II)の2'-ジェミナル置換ヌクレオチドであり、式中、R^eはビニルホスホネートである（例えばR^eは、-CH=CHR^{e1}であり、R^{e1}は-P(O)(OR^{e4})₂である）、前記請求項のいずれか一項記載のdsRNA。

【請求項5】

アンチセンス鎖が、少なくとも、該アンチセンス鎖の5'端から数えて位置3に、式(I)のヌクレオシドを含む、前記請求項のいずれか一項記載のdsRNA。

【請求項6】

アンチセンス鎖が、少なくとも、該アンチセンス鎖の5'端から数えて位置4に、式(I)のヌクレオシドを含む、前記請求項のいずれか一項記載のdsRNA。

【請求項7】

アンチセンス鎖が、少なくとも、該アンチセンス鎖の5'端から数えて位置5に、式(I)のヌクレオシドを含む、前記請求項のいずれか一項記載のdsRNA。

【請求項8】

アンチセンス鎖が、少なくとも、該アンチセンス鎖の5'端から数えて位置6に、式(I)のヌクレオシドを含む、前記請求項のいずれか一項記載のdsRNA。

【請求項9】

アンチセンス鎖が、少なくとも、該アンチセンス鎖の5'端から数えて位置7に、式(I)のヌクレオシドを含む、前記請求項のいずれか一項記載のdsRNA。

【請求項10】

アンチセンス鎖が、少なくとも、該アンチセンス鎖の5'端から数えて位置8に、式(I)のヌクレオシドを含む、前記請求項のいずれか一項記載のdsRNA。

【請求項11】

アンチセンス鎖が、少なくとも、該アンチセンス鎖の5'端から数えて位置9に、式(I)のヌクレオシドを含む、前記請求項のいずれか一項記載のdsRNA。

【請求項12】

(i) 式(II)の2'-ジェミナル置換ヌクレオシドが、式(IIA)；

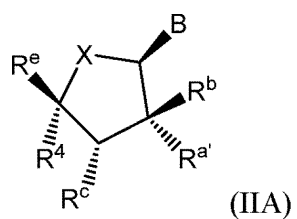
10

20

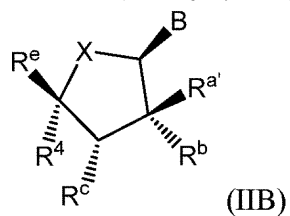
30

40

50



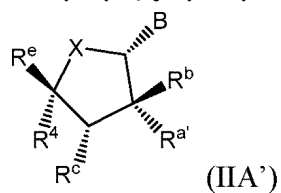
もしくは式 (IIB) :



10

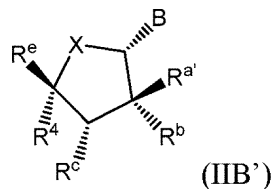
に従うか、
または

(ii) 式 (II') の 2'-ジェミナル置換ヌクレオシドが、式 (IIA') :



20

もしくは式 (IIB') :

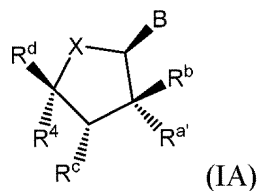


30

に従う、
前記請求項のいずれか一項記載の dsRNA。

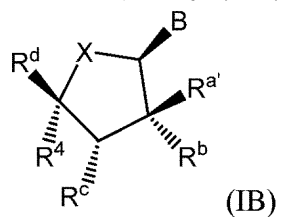
【請求項 13】

(i) 式 (I) の 2'-ジェミナル置換ヌクレオシドが式 (IA) :



40

もしくは式 (IB) :

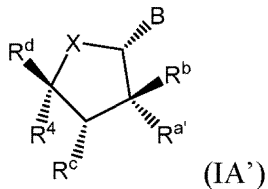


に従うか、

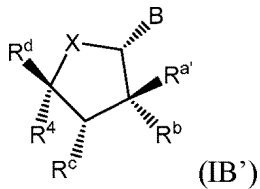
50

または

(ii) 式 (I') の 2'-ジェミナル置換ヌクレオシドが式 (IA') :



もしくは式 (IB') :



に従う、

前記請求項のいずれか一項記載の dsRNA。

【請求項 14】

X が 0 である、前記請求項のいずれか一項記載の dsRNA。

【請求項 15】

R^{a'} が、水素、ハロゲン、-OR^{a2}、置換されていてもよい C₁~C₃₀ アルキル、置換されていてもよい C₁~C₃₀ アルコキシ、-O(CH₂CH₂O)_mCH₂CH₂OR^{a4}、または-NH(CH₂CH₂NH)_nCH₂CH₂-R^{a5} である、前記請求項のいずれか一項記載の dsRNA。

【請求項 16】

R^{a'} が、ハロゲン、水素、-OR^{a2}、または置換されていてもよい C₁~C₃₀ アルコキシである、前記請求項のいずれか一項記載の dsRNA。

【請求項 17】

R^{a'} が、ハロゲン、-OR^{a2}、または置換されていてもよい C₁~C₃₀ アルコキシである、前記請求項のいずれか一項記載の dsRNA。

【請求項 18】

R^{a'} が、F、Cl、OH または置換されていてもよい C₁~C₃₀ アルコキシである（例えば R^{a'} が、F、Cl である）、前記請求項のいずれか一項記載の dsRNA。

【請求項 19】

R^{a'} が、アミノまたは C₁~C₆ アルコキシで置換されていてもよい、C₁~C₃₀ アルコキシである、前記請求項のいずれか一項記載の dsRNA。

【請求項 20】

R^b が、置換されていてもよい C₁~6 アルキル、C₁~6 ハロアルキル、置換されていてもよい C₂~6 アルケニル、置換されていてもよい C₂~6 アルキニルまたはハロゲンである、前記請求項のいずれか一項記載の dsRNA。

【請求項 21】

R^b が、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、t-ブチル、ビニル、エチニル、アリルまたはプロパルギルである、前記請求項のいずれか一項記載の dsRNA。

【請求項 22】

R^b が、メチル、ビニル、エチニル、アリルまたはプロパルギルである、前記請求項のいずれか一項記載の dsRNA。

【請求項 23】

R⁴ が、水素、置換されていてもよい C₁~6 アルキル、置換されていてもよい C₂~6 アルケニル、置換されていてもよい C₂~6 アルキニル、または置換されていてもよい C₁~6 アルコキシである、前記請求項のいずれか一項記載の dsRNA。

【請求項 2 4】

R^4 が水素である、前記請求項のいずれか一項記載のdsRNA。

【請求項 2 5】

R^d が $-CH(R^{d1})-X^d-R^{d2}$ である、前記請求項のいずれか一項記載のdsRNA。

【請求項 2 6】

X^d がOである、前記請求項のいずれか一項記載のdsRNA。

【請求項 2 7】

R^{d1} が水素または置換されていてもよい $C_1\sim C_6$ アルキルである、前記請求項のいずれか一項記載のdsRNA。

【請求項 2 8】

R^{d6} が水素である、前記請求項のいずれか一項記載のdsRNA。

【請求項 2 9】

R^e が $-C_2\sim_6$ アルケニル- R^{e1} または $C_1\sim_6$ アルキル- R^{e1} であり、 $C_1\sim_6$ アルキルおよび $C_2\sim_6$ アルケニルは置換されていてもよい、前記請求項のいずれか一項記載のdsRNA。

【請求項 3 0】

R^e が $-CH=CHR^{e1}$ である、前記請求項のいずれか一項記載のdsRNA。

【請求項 3 1】

R^{e1} が、 $-P(O)(OR^{e4})_2$ 、 $-OR^{e2}$ または $-OP(O)(OR^{e4})_2$ である、前記請求項のいずれか一項記載のdsRNA。

【請求項 3 2】

R^{e2} が水素または置換されていてもよい $C_1\sim C_6$ アルキルである、前記請求項のいずれか一項記載のdsRNA。

【請求項 3 3】

式 (I) または (I') の2'-ジェミナル置換ヌクレオシドが、少なくとも、アンチセンス鎖の5'端から数えて位置2、3、4、5、6、7、8、9または10のうちの1つにある、前記請求項のいずれか一項記載のdsRNA。

【請求項 3 4】

式 (I) の2'-ジェミナル置換ヌクレオシドがアンチセンス鎖の5'端から数えて位置7にある、前記請求項のいずれか一項記載のdsRNA。

【請求項 3 5】

アンチセンス鎖が、少なくとも1つの修飾ヌクレオシド間連結部をさらに含む、前記請求項のいずれか一項記載のdsRNA。

【請求項 3 6】

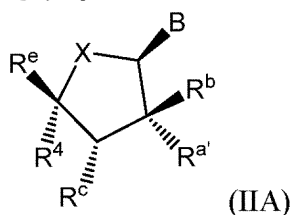
アンチセンス鎖が、少なくとも1つの修飾核酸塩基をさらに含む、前記請求項のいずれか一項記載のdsRNA。

【請求項 3 7】

アンチセンス鎖が、少なくとも1つの、2'位において修飾されたヌクレオシドをさらに含む、2'位において修飾された該ヌクレオシドが2'-ジェミナルヌクレオシドではない、前記請求項のいずれか一項記載のdsRNA。

【請求項 3 8】

式 (II) の2'-ジェミナル置換ヌクレオシドが、式 (IIA) の2'-ジェミナル置換ヌクレオシド:



であり、

式中、

Xは、Oであり、

$R^{a'}$ は、ハロゲン（例えばF、ClまたはBr）、ヒドロキシル、置換されていてもよい $C_1 \sim 30$ アルコキシ（例えば $-(CH_2)_nCH_3$ であって、ここで、 n は1~21、例えば1、16であるか、あるいは $-(CH_2)_m-NH_2$ であって、ここで、 m は2~10、例えば3または6であるか、あるいは $-(CH_2)_p-OMe$ であって、ここで、 p は1~21、例えば1または2である）、または後続のヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合であり、

R^b は、置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルキル（例えばメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、*t*-ブチル、ビニル、エチニル、アリルまたはプロパルギル、好ましくはメチル）またはハロゲン（例えばF、ClまたはBr）であり、

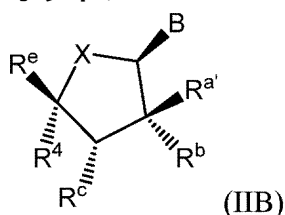
R^c は、後続のヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合またはヒドロキシルであり、ただし、 $R^{a'}$ および R^c のうちの1つだけが、後続のヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合であり、

R^4 は、水素であり、ならびに

R^e は、 $-CH=CHR^{e1}$ であり、ここで、 R^{e1} は $-P(O)(OR^{e4})_2$ である、
前記請求項のいずれか一項記載のdsRNA。

【請求項39】

式(II)の2'-ジェミナル置換ヌクレオシドが、式(IIB)の2'-ジェミナル置換ヌクレオシド:



であり、

式中、

Xは、Oであり、

$R^{a'}$ は、ハロゲン（例えばF、ClまたはBr）、ヒドロキシル、置換されていてもよい $C_1 \sim 30$ アルコキシ（例えば $-(CH_2)_nCH_3$ であって、ここで、 n は1~21、例えば1、16であるか、あるいは $-(CH_2)_m-NH_2$ であって、ここで、 m は2~10、例えば3または6であるか、あるいは $-(CH_2)_p-OMe$ であって、ここで、 p は1~21、例えば1または2である）、または後続のヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合であり、

R^b は、置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルキル（例えばメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、*t*-ブチル、ビニル、エチニル、アリルまたはプロパルギル、好ましくはメチル）またはハロゲン（例えばF、ClまたはBr）であり、

R^c は、後続のヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合またはヒドロキシルであり、ただし、 $R^{a'}$ および R^c のうちの1つだけが、後続のヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合であり、

R^4 は、水素であり、ならびに

R^e は、 $-CH=CHR^{e1}$ であり、ここで、 R^{e1} は $-P(O)(OR^{e4})_2$ である、
請求項1~38のいずれか一項記載のdsRNA。

【請求項40】

式(I)の2'-ジェミナル置換ヌクレオシドが、式(IA)の2'-ジェミナル置換ヌクレオシド:

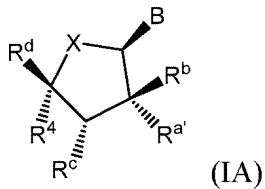
10

20

30

40

50



であり、

式中、

Xは、Oであり、

R^{a'}は、ハロゲン（例えばF、ClまたはBr）、ヒドロキシル、置換されていてもよいC₁～₃₀アルコキシ（例えば-(CH₂)_nCH₃であって、ここで、nは1～21、例えば1、16であるか、あるいは-(CH₂)_m-NH₂であって、ここで、mは2～10、例えば3または6であるか、あるいは-(CH₂)_p-OMeであって、ここで、pは1～21、例えば1または2である）、または後続のヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合であり、

R^bは、置換されていてもよいC₁～₆アルキル（例えばメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、t-ブチル、ビニル、エチニル、アリルまたはプロパルギル、好ましくはメチル）またはハロゲン（例えばF、ClまたはBr）であり、

R^cは、後続のヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合またはヒドロキシルであり、ただし、R^{a'}およびR^cのうちの1つだけが、後続のヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合であり、

R⁴は、水素であり、ならびに

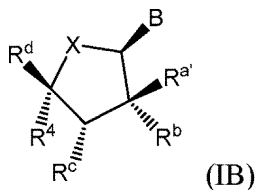
R^dは、先行するヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合であり、

ただし、R^{a'}およびR^cのうちの1つだけが、後続のヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合である、

前記請求項のいずれか一項記載のdsRNA。

【請求項41】

式(1)の2'-ジェミナル置換ヌクレオシドが、式(1B)の2'-ジェミナル置換ヌクレオシド:



であり、

式中、

Xは、Oであり、

R^{a'}は、ハロゲン（例えばF、ClまたはBr）、ヒドロキシル、置換されていてもよいC₁～₃₀アルコキシ（例えば-(CH₂)_nCH₃であって、ここで、nは1～21、例えば1、16であるか、あるいは-(CH₂)_m-NH₂であって、ここで、mは2～10、例えば3または6であるか、あるいは-(CH₂)_p-OMeであって、ここで、pは1～21、例えば1または2である）、または後続のヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合であり、

R^bは、置換されていてもよいC₁～₆アルキル（例えばメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、t-ブチル、ビニル、エチニル、アリルまたはプロパルギル、好ましくはメチル）またはハロゲン（例えばF、ClまたはBr）であり、

R^cは、後続のヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合またはヒドロキシルであり、ただし、R^{a'}およびR^cのうちの1つだけが、後続のヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合であり、

R⁴は、水素であり、ならびに

R^dは、先行するヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合であり、

ただし、 R^a および R^c のうちの1つだけが、後続のヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合である、

請求項1~39のいずれか一項記載のdsRNA。

【請求項42】

アンチセンス鎖が、少なくとも約17、例えば約18、約19、約20、約21、約22、約23、約24、約25、約26、約27、約28、約29、約30ヌクレオチド長またはそれ以上（例えば約17~42ヌクレオチド長）である、前記請求項のいずれか一項記載のdsRNA。

【請求項43】

アンチセンス鎖が、約19、約20、約21、約22、約23、約24、約25または約26ヌクレオチド長である、前記請求項のいずれか一項記載のdsRNA。

【請求項44】

アンチセンス鎖が、約22、約23、約24、または約25ヌクレオチド長である、前記請求項のいずれか一項記載のdsRNA。

【請求項45】

センス鎖が、少なくとも約15、約16、例えば約17、約18、約19、約20、約21、約22、約23、約24、約25、約26ヌクレオチド長またはそれ以上（例えば約15~40ヌクレオチド長）である、前記請求項のいずれか一項記載のdsRNA。

【請求項46】

センス鎖が、約19、約20、約21、約22、約23、約24または約25ヌクレオチド長である、前記請求項のいずれか一項記載のdsRNA。

【請求項47】

センス鎖が約21ヌクレオチド長である、前記請求項のいずれか一項記載のdsRNA。

【請求項48】

(a) センス鎖が15ヌクレオチド長であり、アンチセンス鎖が18、19、20、21、もしくは22（例えば20）ヌクレオチド長であるか、

(b) センス鎖が19ヌクレオチド長であり、アンチセンス鎖が19、20、もしくは21ヌクレオチド長であるか、

(c) センス鎖が20ヌクレオチド長であり、アンチセンス鎖が20、21、もしくは22ヌクレオチド長であるか、

(d) センス鎖が21ヌクレオチド長であり、アンチセンス鎖が21、22、もしくは23ヌクレオチド長であるか、または

(e) センス鎖が20~24（例えば22）ヌクレオチド長であり、アンチセンス鎖が34~38（例えば36）ヌクレオチド長である、

前記請求項のいずれか一項記載のdsRNA。

【請求項49】

少なくとも約15、例えば約16、約17、約18、約19、約20、約21、約22、約23、約24、約25塩基対またはそれ以上の二本鎖領域を有する、前記請求項のいずれか一項記載のdsRNA。

【請求項50】

約21塩基対の二本鎖領域を有する、前記請求項のいずれか一項記載のdsRNA。

【請求項51】

センス鎖が約21ヌクレオチド長であり、アンチセンス鎖が約21、約22、約23、約24または約25ヌクレオチド長であり、dsRNAが少なくとも18、例えば19、20または21塩基対の二本鎖領域を含む、前記請求項のいずれか一項記載のdsRNA。

【請求項52】

1~5ヌクレオチド（例えば1または2ヌクレオチド）を含む少なくとも1つの一本鎖オーバーハングを含む、前記請求項のいずれか一項記載のdsRNA。

【請求項53】

アンチセンス鎖がその3'端に一本鎖オーバーハングを含む、前記請求項のいずれか一項記載のdsRNA。

【請求項 5 4】

少なくとも1つの平滑端を含む、前記請求項のいずれか一項記載の dsRNA。

【請求項 5 5】

アンチセンス鎖がその 5' 端に平滑端を含む、前記請求項のいずれか一項記載の dsRNA。

【請求項 5 6】

アンチセンス鎖が、その 3' 端に一本鎖オーバーハングを含み、かつその 5' 端に平滑端を含む、前記請求項のいずれか一項記載の dsRNA。

【請求項 5 7】

少なくとも4個のホスホロチオエートヌクレオシド間連結部、例えば少なくとも6個のホスホロチオエートヌクレオシド間連結部または少なくとも8個のホスホロチオエート少なくとも10個のホスホロチオエートヌクレオシド間連結部を含む、前記請求項のいずれか一項記載の dsRNA。

10

【請求項 5 8】

アンチセンス鎖が、少なくとも2個の、例えば3、4、6個またはそれ以上の、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結部を含む、前記請求項のいずれか一項記載の dsRNA。

【請求項 5 9】

アンチセンス鎖が、該鎖の 3' 端から数えて位置 1 と 2 の間にホスホロチオエートヌクレオシド間連結部を含み、該鎖の 5' 端から数えて位置 1 と 2 の間にホスホロチオエートヌクレオシド間連結部を含む、前記請求項のいずれか一項記載の dsRNA。

20

【請求項 6 0】

アンチセンス鎖が、該鎖の 3' 端から数えて位置 1 と 2 の間および位置 2 と 3 の間にホスホロチオエートヌクレオシド間連結部を含み、該鎖の 5' 端から数えて位置 1 と 2 の間にホスホロチオエートヌクレオシド間連結部を含む、前記請求項のいずれか一項記載の dsRNA。

【請求項 6 1】

アンチセンス鎖が、該鎖の 3' 端から数えて位置 1 と 2 の間および位置 2 と 3 の間にホスホロチオエートヌクレオシド間連結部を含み、該鎖の 5' 端から数えて位置 1 と 2 の間および位置 2 と 3 の間にホスホロチオエートヌクレオシド間連結部を含む、前記請求項のいずれか一項記載の dsRNA。

【請求項 6 2】

アンチセンス鎖が、該鎖の 3' 端から数えて位置 1 と 2 の間、位置 2 と 3 の間および位置 3 と 4 の間にホスホロチオエートヌクレオシド間連結部を含み、該鎖の 5' 端から数えて位置 1 と 2 の間にホスホロチオエートヌクレオシド間連結部を含む、前記請求項のいずれか一項記載の dsRNA。

30

【請求項 6 3】

アンチセンス鎖が、該鎖の 3' 端から数えて位置 1 と 2 の間にホスホロチオエートヌクレオシド間連結部を含み、該鎖の 5' 端から数えて位置 1 と 2 の間および位置 2 と 3 の間にホスホロチオエートヌクレオシド間連結部を含む、前記請求項のいずれか一項記載の dsRNA。

【請求項 6 4】

アンチセンス鎖が、該鎖の 3' 端から数えて位置 1 と 2 の間にホスホロチオエートヌクレオシド間連結部を含み、該鎖の 5' 端から数えて位置 1 と 2 の間、位置 2 と 3 の間および位置 3 と 4 の間にホスホロチオエートヌクレオシド間連結部を含む、前記請求項のいずれか一項記載の dsRNA。

40

【請求項 6 5】

センス鎖が、少なくとも1個の、例えば2、3、4個またはそれ以上の、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結部を含む、前記請求項のいずれか一項記載の dsRNA。

【請求項 6 6】

センス鎖が、該鎖の 5' 端から数えて位置 1 と 2 の間にホスホロチオエートヌクレオシド間連結部を含む、前記請求項のいずれか一項記載の dsRNA。

【請求項 6 7】

50

センス鎖が、該鎖の5'端から数えて位置1と2の間および該鎖の3'端から数えて位置1と2の間にホスホロチオエートヌクレオシド間連結部を含む、前記請求項のいずれか一項記載のdsRNA。

【請求項68】

センス鎖が、該鎖の5'端から数えて位置1と2の間および位置2と3の間にホスホロチオエートヌクレオシド間連結部を含む、前記請求項のいずれか一項記載のdsRNA。

【請求項69】

センス鎖が、該鎖の5'端から数えて位置1と2の間および位置2と3の間、ならびに該鎖の3'端から数えて位置1と2の間および位置2と3の間に、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結部を含む、前記請求項のいずれか一項記載のdsRNA。

10

【請求項70】

リガンドを含む、前記請求項のいずれか一項記載のdsRNA。

【請求項71】

リガンドがセンス鎖に連結されている、請求項70記載のdsRNA。

【請求項72】

リガンドがセンス鎖の3'端に連結されている、請求項70または71記載のdsRNA。

【請求項73】

リガンドがセンス鎖の5'端に連結されている、請求項70または71記載のdsRNA。

【請求項74】

リガンドが、ペプチド、センチリン、抗体（例えば抗CD-4抗体および抗CD-117抗体）、抗体フラグメント、T細胞ターゲティングリガンド、B細胞ターゲティングリガンド、がん細胞ターゲティングリガンド（例えばDUPA、葉酸塩、およびRGD）、脾臓ターゲティング機能性、肺ターゲティング機能性、骨髄ターゲティング機能性、ファージディスプレイペプチド、細胞透過ペプチド（CPP）、インテグリンリガンド、多価アニオン性リガンド、多価カチオン性リガンド、一価および多価炭水化物（例えばGalNAc、マンノース、マンノース-6ホスフェート、ムコース（mucose）、およびムルコース（mlucose））、腎臓ターゲティングリガンド、BBB透過リガンド、脂質、ならびにアミノ酸（例えばL-アミノ酸、D-アミノ酸、およびβ-アミノ酸）からなる群より選択される、請求項70～73のいずれか一項記載のdsRNA。

20

【請求項75】

リガンドがGalNAcを含む、請求項70～74のいずれか一項記載のdsRNA。

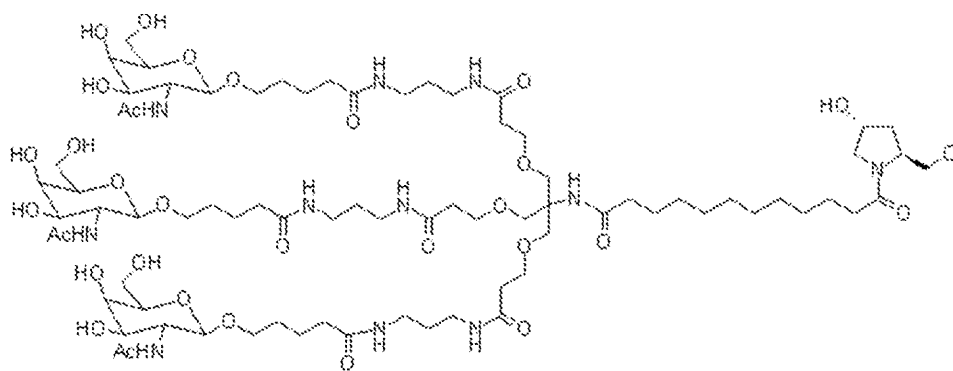
30

【請求項76】

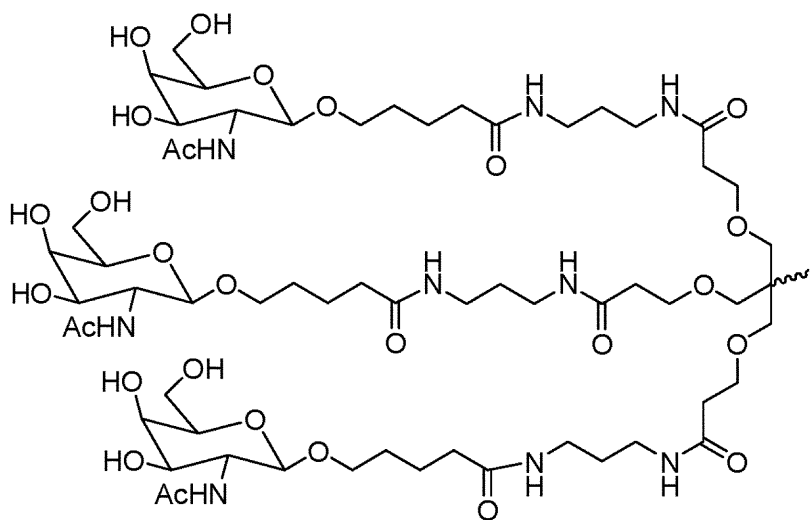
リガンドが、

40

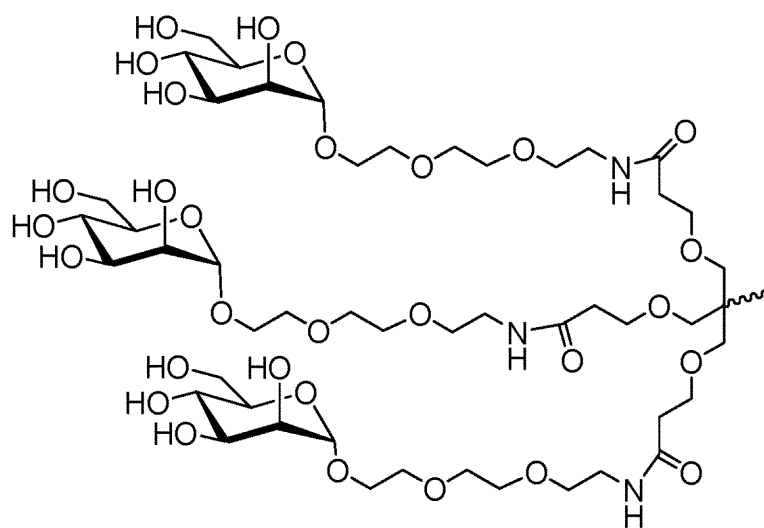
50



10



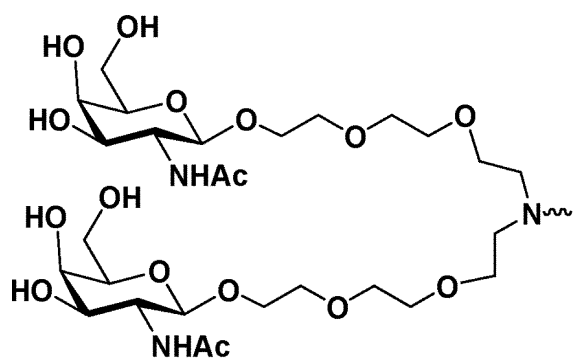
20



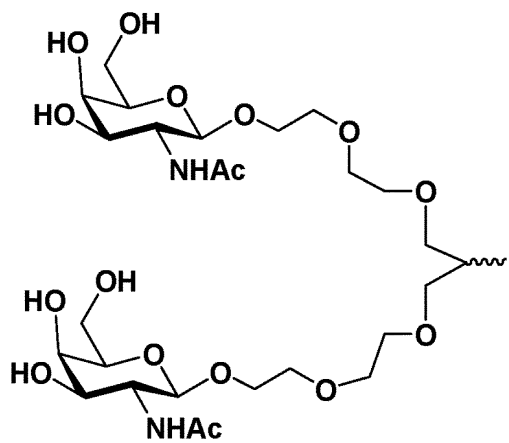
30

40

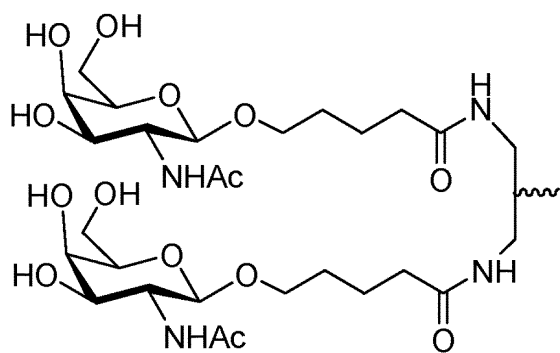
50



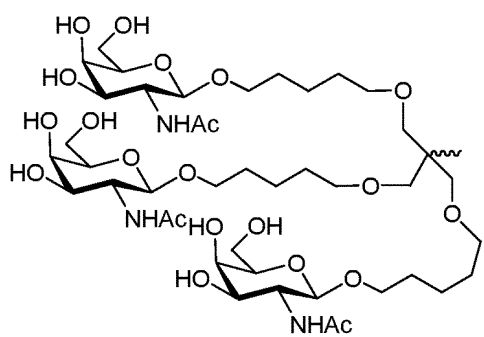
10



20



30



40

50

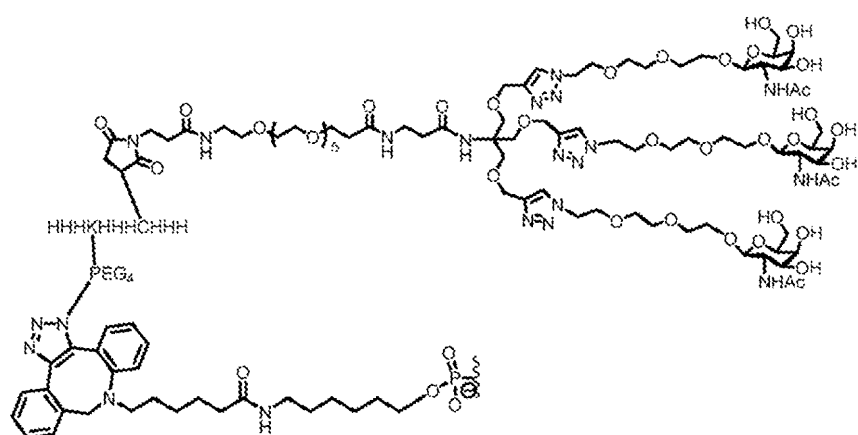




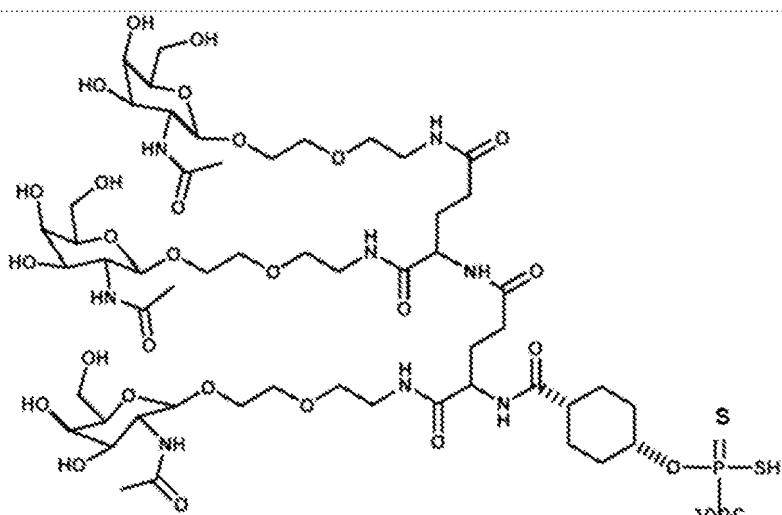
(ここで、 n は0~10であり、例えば n は1



40



10



20

30

40

50



,または



40

50

【請求項 8 2】

アンチセンス鎖が、該アンチセンス鎖の5'端から数えて位置2、6、8、9、14および16に2'-フルオロヌクレオチドを含む、前記請求項のいずれか一項記載のdsRNA。

【請求項 8 3】

アンチセンス鎖が、少なくとも1個の、例えば2、3、4、5個またはそれ以上の、2'-フルオロヌクレオチドを含む、前記請求項のいずれか一項記載のdsRNA。

【請求項 8 4】

センス鎖が、該センス鎖の5'端から数えて位置7、9および11、または該センス鎖の3'端から数えて位置11、13および15に、2'-フルオロヌクレオチドを含む、前記請求項のいずれか一項記載のdsRNA。

10

【請求項 8 5】

センス鎖が、該センス鎖の5'端から数えて位置7、9、10および11、または該センス鎖の3'端から数えて位置11、12、13および15に、2'-フルオロヌクレオチドを含む、前記請求項のいずれか一項記載のdsRNA。

【請求項 8 6】

センス鎖が、該センス鎖の5'端から数えて位置9、10、および11、または該センス鎖の3'端から数えて位置11、12、および13に、2'-フルオロヌクレオチドを含む、前記請求項のいずれか一項記載のdsRNA。

【請求項 8 7】

アンチセンス鎖が、少なくとも1個の、例えば2、3、4、5、6、7個またはそれ以上の、DNAヌクレオチドを含む、前記請求項のいずれか一項記載のdsRNA。

20

【請求項 8 8】

アンチセンス鎖が、該アンチセンス鎖の5'端から数えて位置2、5、7、および12にDNAヌクレオチドを含む、前記請求項のいずれか一項記載のdsRNA。

【請求項 8 9】

アンチセンス鎖が、該アンチセンス鎖の5'端から数えて位置2、5、7、12、および14にDNAヌクレオチドを含む、前記請求項のいずれか一項記載のdsRNA。

【請求項 9 0】

アンチセンス鎖が、該アンチセンス鎖の5'端から数えて位置2、5、7、12、14および16にDNAヌクレオチドを含む、前記請求項のいずれか一項記載のdsRNA。

30

【請求項 9 1】

アンチセンス鎖が、該アンチセンス鎖の5'端から数えて位置2、5、7、および12にDNAヌクレオチドを含み、該アンチセンス鎖の位置14に2'-フルオロヌクレオチドを含む、前記請求項のいずれか一項記載のdsRNA。

【請求項 9 2】

少なくとも1個の、例えば2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれ以上の、2'-OMeヌクレオチドを含む、前記請求項のいずれか一項記載のdsRNA。

【請求項 9 3】

アンチセンス鎖が、少なくとも1個の2'-OMeヌクレオチドを含む、前記請求項のいずれか一項記載のdsRNA。

40

【請求項 9 4】

アンチセンス鎖中の残りのヌクレオチドがすべて2'-OMeヌクレオチドである、前記請求項のいずれか一項記載のdsRNA。

【請求項 9 5】

センス鎖が少なくとも1個の2'-OMeヌクレオチドを含む、前記請求項のいずれか一項記載のdsRNA。

【請求項 9 6】

センス鎖中の残りのヌクレオチドがすべて2'-OMeヌクレオチドである、前記請求項のいずれか一項記載のdsRNA。

【請求項 9 7】

50

少なくとも1個の、例えば2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれ以上の、ロック核酸（LNA）ヌクレオチドまたは架橋核酸（BNA）ヌクレオチドを含む、前記請求項のいずれか一項記載のdsRNA。

【請求項98】

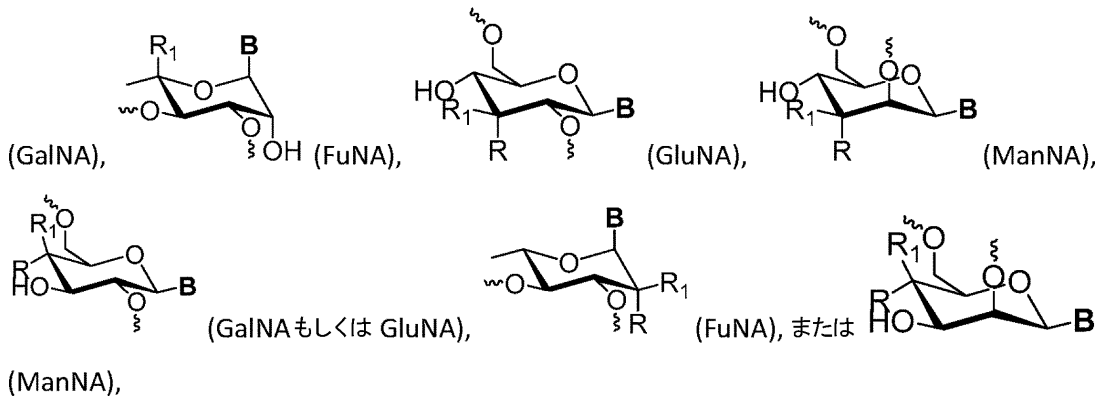
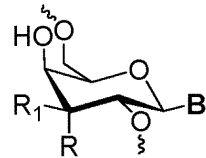
アンチセンス鎖が、少なくとも1個の、例えば2、3、4、5個またはそれ以上の、LNAまたはBNAヌクレオチドを含む、前記請求項のいずれか一項記載のdsRNA。

【請求項99】

センス鎖が、少なくとも1個の、例えば2、3、4、5個またはそれ以上の、LNAまたはBNAヌクレオチドを含む、前記請求項のいずれか一項記載のdsRNA。

【請求項100】

前記dsRNAが、少なくとも1個の、例えば2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれ以上の、シクロヘキセン核酸（CeNA）ヌクレオチドまたはその類似体を含み、任意で、該CeNAヌクレオチドまたはその類似体が、



であり、かつ/あるいは前記dsRNAの鎖が、

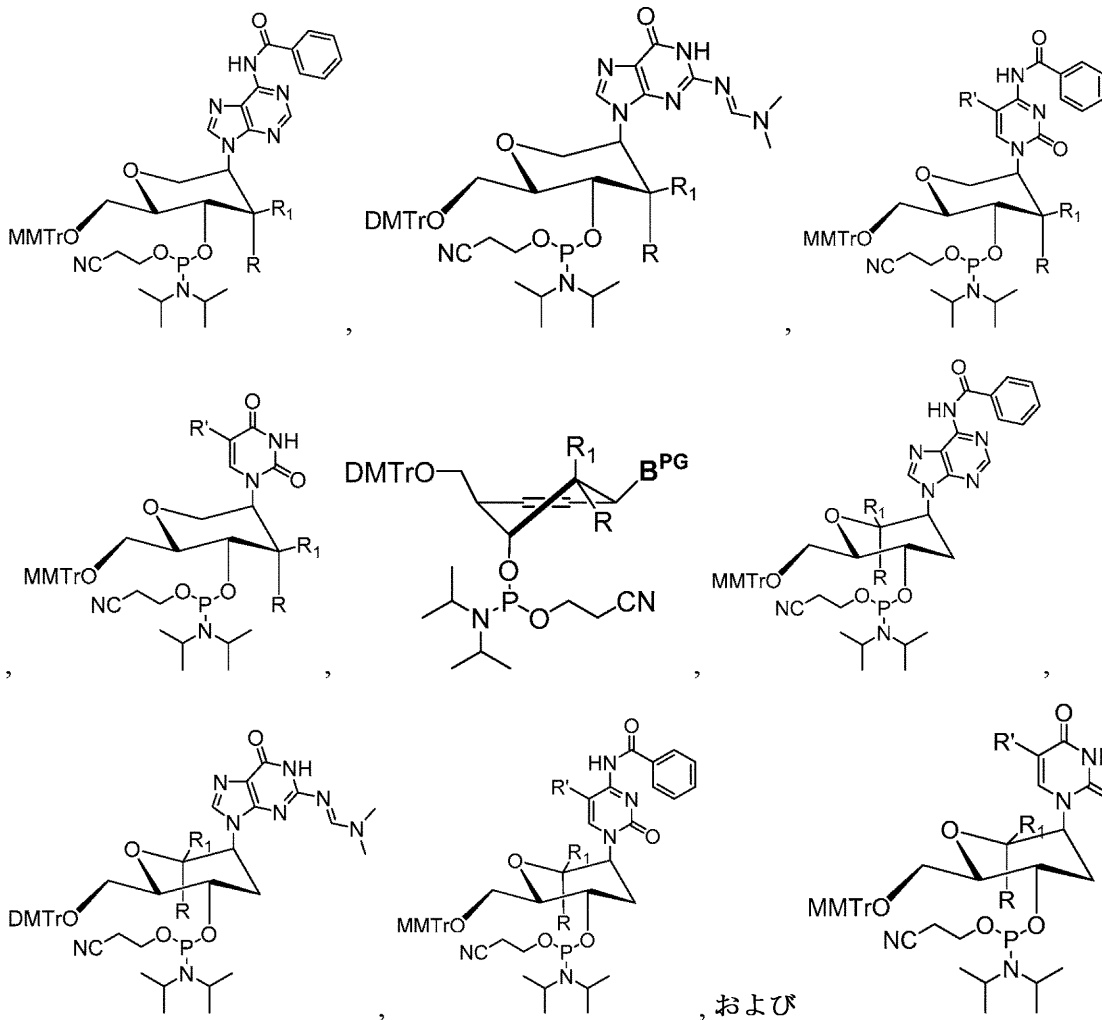
10

20

30

40

50



10

20

30

40

50

からなる群より選択されるモノマーを使って調製され、
ここで、

Bは、修飾されていてもよい核酸塩基であり、

Rは、F、Cl、Br、I、H、保護されたOH、OMe、F、O-MOE、O-アルキル、O-アルケン、O-アルキン、O-C₁₆、分岐脂質、または保護されたアミノアルキルであり、

R¹は、F、Cl、Br、I、H、保護されたOH、OMe、F、O-MOE、O-アルキル、O-アルケン、O-アルキン、O-C₁₆、分岐脂質、保護されたアミノアルキルであり、

R'は、HまたはCH₃であり、および

PGは、保護基である、

前記請求項のいずれか一項記載のdsRNA。

【請求項101】

アンチセンス鎖が、少なくとも1個の、例えば2、3、4、5個またはそれ以上の、CeNAヌクレオチドを含む、前記請求項のいずれか一項記載のdsRNA。

【請求項102】

センス鎖が、少なくとも1個の、例えば2、3、4、5個またはそれ以上の、CeNAヌクレオチドを含む、前記請求項のいずれか一項記載のdsRNA。

【請求項103】

少なくとも1個の、例えば2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれ以上の、熱安定化修飾を含む、前記請求項のいずれか一項記載のdsRNA。

【請求項104】

アンチセンス鎖が、少なくとも1個の、例えば2、3、4、5個またはそれ以上の、熱安定化修飾を含む、前記請求項のいずれか一項記載のdsRNA。

【請求項 105】

センス鎖が、少なくとも1個の、例えば2、3、4、5個またはそれ以上の、熱安定化修飾を含む、前記請求項のいずれか一項記載のdsRNA。

【請求項 106】

少なくとも1個の、例えば2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれ以上の、脱塩基ヌクレオチドを含む、前記請求項のいずれか一項記載のdsRNA。

【請求項 107】

アンチセンス鎖が、少なくとも1個の、例えば2、3、4、5個またはそれ以上の、脱塩基ヌクレオチドを含む、前記請求項のいずれか一項記載のdsRNA。

【請求項 108】

センス鎖が、少なくとも1個の、例えば2、3、4、5個またはそれ以上の、脱塩基ヌクレオチドを含む、前記請求項のいずれか一項記載のdsRNA。

【請求項 109】

少なくとも1個の、例えば2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれ以上の、2'-デオキシヌクレオチドを含む、前記請求項のいずれか一項記載のdsRNA。

【請求項 110】

アンチセンス鎖が、少なくとも1個の、例えば2、3、4、5個またはそれ以上の、2'-デオキシヌクレオチドを含む、前記請求項のいずれか一項記載のdsRNA。

【請求項 111】

センス鎖が、少なくとも1個の、例えば2、3、4、5個またはそれ以上の、2'-デオキシヌクレオチドを含む、前記請求項のいずれか一項記載のdsRNA。

【請求項 112】

少なくとも1個の、例えば2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれ以上の、非環式（例えばアンロックト核酸（UNA）またはグリコール核酸（GNA））ヌクレオチドを含む、前記請求項のいずれか一項記載のdsRNA。

【請求項 113】

アンチセンス鎖が、少なくとも1個の、例えば2、3、4、5個またはそれ以上の、非環式（例えばアンロックト核酸（UNA）またはグリコール核酸（GNA））ヌクレオチドを含む、前記請求項のいずれか一項記載のdsRNA。

【請求項 114】

センス鎖が、少なくとも1個の、例えば2、3、4、5個またはそれ以上の、非環式（例えばアンロックト核酸（UNA）またはグリコール核酸（GNA））ヌクレオチドを含む、前記請求項のいずれか一項記載のdsRNA。

【請求項 115】

少なくとも1個の熱不安定化修飾（例えば、脱塩基ヌクレオチド、2'-デオキシヌクレオチド、非環式ヌクレオチド（例えばアンロックト核酸（UNA）、グリコール核酸（GNA）または（S）-グリコール核酸（S-GNA））、2'-5'連結ヌクレオチド（3'-RNA）、トレオースヌクレオチド（TNA）、2' gem Me/Fヌクレオチド、または他方の鎖中の相対するヌクレオチドとのミスマッチである）を含む、前記請求項のいずれか一項記載のdsRNA。

【請求項 116】

アンチセンス鎖が、少なくとも1個の熱不安定化修飾を含む、前記請求項のいずれか一項記載のdsRNA。

【請求項 117】

アンチセンス鎖が、該アンチセンス鎖のシード領域（すなわち5'端から位置2～9）に少なくとも1個の熱不安定化修飾を含む、前記請求項のいずれか一項記載のdsRNA。

【請求項 118】

アンチセンス鎖が、少なくとも、該鎖の5'端から数えて位置6、7または8のうちの1つにおいて、熱不安定化修飾を含む、前記請求項のいずれか一項記載のdsRNA。

【請求項 119】

10

20

30

40

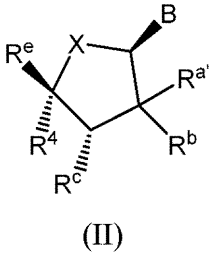
50

アンチセンス鎖が、該鎖の5'端から数えて位置7に熱不安定化修飾を含む、前記請求項のいずれか一項記載のdsRNA。

【請求項120】

(a) および (b) のうち的一方または両方を含む、オリゴヌクレオチド：

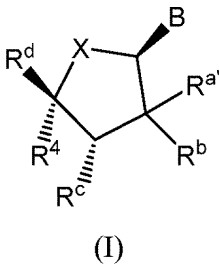
(b) 式 (II) の2'-ジェミナル置換ヌクレオシドである、5'末端ヌクレオシド：



10

および

(b) 少なくとも1つの、式 (I) の2'-ジェミナル置換ヌクレオシド：



20

式 (I) および式 (II) において、式中、

Xは、O、S、C (R^X)₂、またはN (R^X N) であり、

各 R^X は、独立して、水素、ハロゲン、置換されていてもよいC₁~4アルキル、C₁~4ハロアルキル、置換されていてもよいC₂~4アルケニル、または置換されていてもよいC₂~4アルキニルであるか、あるいは両方の R^X が全体として、=O、=S、=N (R^N)、または=CH₂を形成し、

R^X Nは、水素、置換されていてもよいC₁~30アルキル、置換されていてもよいC₁~C₃₀アルコキシ、C₁~4ハロアルキル、置換されていてもよいC₂~4アルケニル、置換されていてもよいC₂~4アルキニル、置換されていてもよいC₁~30アルキル-CO₂H、または窒素保護基であり、

30

Bは、修飾されていてもよい核酸塩基であり、

R^{a1} は、ハロゲン、水素、-OR^{a2}、-SR^{a3}、置換されていてもよいC₁~30アルキル、C₁~30ハロアルキル、置換されていてもよいC₂~30アルケニル、置換されていてもよいC₂~30アルキニル、または置換されていてもよいC₁~30アルコキシ、アミノ (NH₂)、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、ジヘテロアリールアミノ、アミノ酸、-O (CH₂CH₂O)_mCH₂CH₂OR^{a4}、シアノ、アルキル-チオ-アルキル、チオアルコキシ、シクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、-NH (CH₂CH₂NH)_nCH₂CH₂-R^{a5}、NHC (O) R^{a4}、脂質、脂質に共有結合で取り付けられたリンカー、リガンド、リガンドに共有結合で取り付けられたリンカー、固形支持体、固形支持体に共有結合で取り付けられたリンカー、または後続のヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合であり、

40

R^{a2} は、水素またはヒドロキシル保護基であり、

R^{a3} は、水素または硫黄保護基であり、

R^{a4} は、出現ごとに独立して、H、C₁~C₃₀アルキル、シクリル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アラルキル、糖またはR^{a5}であり、

R^{a5} は、出現ごとに独立して、アミノ (NH₂)、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、またはジヘテロアリー

50

ルアミノであり、

mは、1～50であり、

nは、1～50であり、

R^bは、置換されていてもよいC₁～30アルキル、置換されていてもよいC₂～30アルケニル、または置換されていてもよいC₂～30アルキニルであり、

R^cは、後続のヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合、水素、ハロゲン、-OR^{c2}、-SR^{c3}、置換されていてもよいC₁～30アルキル、C₁～30ハロアルキル、置換されていてもよいC₂～30アルケニル、置換されていてもよいC₂～30アルキニル、または置換されていてもよいC₁～30アルコキシ、アミノ(NH₂)、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、ジヘテロアリールアミノ、アミノ酸、-O(CH₂CH₂O)_rCH₂CH₂OR^{c4}、シアノ、アルキルチオ-アルキル、チオアルコキシ、シクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、-NH(CH₂CH₂NH)_sCH₂CH₂-R^{c5}、NHC(O)R^{c4}、脂質、脂質に共有結合で取り付けられたリンカー、リガンド、リガンドに共有結合で取り付けられたリンカー、固形支持体、または固形支持体に共有結合で取り付けられたリンカーであり、ここで、任意で、少なくともR^cまたはR^{a1}は、後続のヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合であり、

R^{c2}は、水素またはヒドロキシル保護基であり、

R^{c3}は、水素または硫黄保護基であり、

R^{c4}は、出現ごとに独立して、H、C₁～C₃₀アルキル、シクリル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アラルキル、糖またはR^{c5}であり、

R^{c5}は、出現ごとに独立して、アミノ(NH₂)、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、またはジヘテロアリールアミノであり、

rは、1～50であり、

sは、1～50であり、

R⁴は、水素、置換されていてもよいC₁～6アルキル、置換されていてもよいC₂～6アルケニル、置換されていてもよいC₂～6アルキニル、または置換されていてもよいC₁～6アルコキシであるか、

あるいは、R⁴およびR^aは、全体として、4'-C(R^{a11}R^{a12})_v-Y-2'または4'-Y-C(R^{a11}R^{a12})_v-2'であり、

Yは、-O-、-CH₂-、-CH(Me)-、-C(CH₃)₂-、-S-、-N(R^{a13})-、-C(O)-、-C(S)-、-S(O)-、-S(O)₂-、-OC(O)-、-C(O)O-、-N(R^{a13})C(O)-、または-C(O)N(R^{a13})-であり、

R^{a11}およびR^{a12}は、独立して、H、置換されていてもよいC₁～C₆アルキル、置換されていてもよいC₂～C₆アルケニルまたは置換されていてもよいC₂～C₆アルキニルであり、

R^{a13}は、水素、置換されていてもよいC₁～30アルキル、置換されていてもよいC₁～C₃₀アルコキシ、C₁～4ハロアルキル、置換されていてもよいC₂～4アルケニル、置換されていてもよいC₂～4アルキニル、置換されていてもよいC₁～30アルキル-CO₂H、または窒素保護基であり、

vは、1、2または3であるか、

あるいは、R⁴およびR^cは、それらが取り付けられている原子と共に全体として、置換されていてもよいC₃～8シクロアルキル、置換されていてもよいC₃～8シクロアルケニル、または置換されていてもよい3～8員ヘテロシクリルを形成し、

R^dは、-CH(R^{d1})-R^{d2}または-C(R^{d1})=CHR^{d2}であり、

R^{d1}は、水素、置換されていてもよいC₁～30アルキル、置換されていてもよいC₂～30アルケニル、または置換されていてもよいC₂～30アルキニルであり、

R^{d2}は、先行するヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合であり、

R^eは、置換されていてもよいC₂～6アルケニル-R^{e1}、置換されていてもよいC₁～6アルキル-R^{e1}、または置換されていてもよいC₂～6アルキニル-R^{e1}であり、

R^{e1} は、 $-P(O)(OR^{e4})_2$ 、 $-OR^{e2}$ 、 $-SR^{e3}$ 、 $-P(S)(OR^{e4})_2$ 、 $-P(S)(SR^{e5})(OR^{e4})$ 、 $-P(S)(SR^{e5})_2$ 、 $-OP(O)(OR^{e4})_2$ 、 $-OP(S)(OR^{e4})_2$ 、 $-OP(S)(SR^{e5})(OR^{e4})$ 、 $-OP(S)(SR^{e5})_2$ 、 $-SP(O)(OR^{e4})_2$ 、 $-SP(S)(OR^{e4})_2$ 、 $-SP(S)(SR^{e5})(OR^{e4})$ 、または $-SP(S)(SR^{e5})_2$ であり、

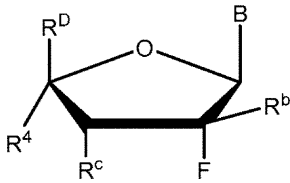
R^{e2} は、水素または酸素保護基であり、

R^{e3} は、水素または硫黄保護基であり、

各 R^{e4} は、独立して、水素、置換されていてもよい $C_1\sim 30$ アルキル、置換されていてもよい $C_2\sim 30$ アルケニル、または置換されていてもよい $C_2\sim 30$ アルキニル、または酸素保護基であり、

および、各 R^{e5} は、独立して、水素、置換されていてもよい $C_1\sim 30$ アルキル、置換されていてもよい $C_2\sim 30$ アルケニル、または置換されていてもよい $C_2\sim 30$ アルキニル、または硫黄保護基であり、

ただし、式(I)のヌクレオシドは、構造



のヌクレオシドではなく、

ここで、

R^b は、水素または置換もしくは無置換 $C_1\sim C_4$ アルキルであり、

R^c は、後続のヌクレオシドへのヌクレオチド間連結部への結合または $-OR^{1x}$ であり、

ここで、

R^{1x} は、 H 、 $-P(O)(OM)_2$ 、 $-P(O)(OM)-O-P(O)(OM)_2$ 、 $-P(O)(Oアルキル)_2$ 、 $-P(O)(Oアルキル)-O-P(O)(Oアルキル)_2$ 、 $-PO_3H_2$ 、 $-PO_3HM$ 、 $-PO_3M_2$ 、 $-PO_2SH_2$ 、 $-PO_2SHM$ 、 $-PO_2SM_2$ 、 $-PO_3M$ 、または $-PO_2SM$ 、保護基、リガンド、リガンド担持モノマー、 $-F$ 、 $-(C_rC_6)$ アルキル、 $-(C_2\sim C_6)$ アリル、 $-(C(R^3)_2)_nOR^3$ 、 $-(C(R^3)_2)_nSR^3$ 、 $-(C(R^3)_2)_nN(R^3)_2$ 、 $-(C(R^3)_2)_nC(O)N(R^3)_2$ 、 $-(C(R^3)_2)_nO(C_rC_6)$ アルキル、 $-(C(R^3)_2)_nS(C_rC_6)$ アルキル、 $-(C(R^3)_2)_nO(C(R^3)_2)_nN((C_i\sim C_6)$ アルキル) $_2$ 、 $-(C(R^3)_2)_nON((C_i\sim C_6)$ アルキル) $_2$ 、 $-C(O)R^3$ 、 $-C(O)R^3C(O)H$ 、 $-C(O)R^3C(O)OH$ 、 $-C(O)R^3C(O)R^3$ 、 $-C(O)R^3C(O)NR^3-PO_2$ 、 $-P(OR^3)_2$ 、 $-P(N(R^3)_2)_2$ 、 $-P(OR^3)N(R^3)_2$ 、またはリンカーであり、

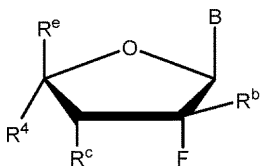
R^4 は、 H であり、

R^d は、先行するヌクレオシドへのヌクレオチド間連結部への結合であり、

M は、出現ごとに独立して、総電荷が $+1$ のアルカリ金属または遷移金属を表し、および

n は、 $1\sim 4$ の整数であり、ならびに

(i) 式(II)のヌクレオシドは、構造



のヌクレオシドではなく、

ここで、

R^b は、水素または置換もしくは無置換 $C_1\sim C_4$ アルキルであり、

R^c は、後続のヌクレオシドへのヌクレオチド間連結部への結合または $-OR^{1x}$ であり、

ここで、

R^{Ix} は、 H 、 $-P(O)(OM)_2$ 、 $-P(O)(OM)-O-P(O)(OM)_2$ 、 $-P(O)(Oアルキル)_2$ 、 $-P(O)(Oアルキル)-O-P(O)(Oアルキル)_2$ 、 $-PO_3H_2$ 、 $-PO_3HM$ 、 $-PO_3M_2$ 、 $-PO_2SH_2$ 、 $-PO_2SHM$ 、 $-PO_2SM_2$ 、 $-PO_3M$ 、または $-PO_2SM$ 、保護基、リガンド、リガンド担持モノマー、 $-F$ 、 $-(C_rC_6)$ アルキル、 $-(C_2\sim C_6)$ アリル、 $-(C(R^3)_2)_nOR^3$ 、 $-(C(R^3)_2)_nSR^3$ 、 $-(C(R^3)_2)_nN(R^3)_2$ 、 $-(C(R^3)_2)_nC(O)N(R^3)_2$ 、 $-(C(R^3)_2)_nO(C_rC_6)$ アルキル、 $-(C(R^3)_2)_nS(C_rC_6)$ アルキル、 $-(C(R^3)_2)_nO(C(R^3)_2)_nN(Ci-C_6)$ アルキル $_2$ 、 $-(C(R^3)_2)_nON(Ci-C_6)$ アルキル $_2$ 、 $-C(O)R^3$ 、 $-C(O)R^3C(O)H$ 、 $-C(O)R^3C(O)OH$ 、 $-C(O)R^3C(O)R^3$ 、 $-C(O)R^3C(O)NR^3-PO_2$ 、 $-P(OR^3)_2$ 、 $-P(N(R^3)_2)_2$ 、 $-P(OR^3)N(R^3)_2$ 、またはリンカーであり、

10

R^4 は、 H であり、

R^e は、 $-CH_2OR^{Ix}$ であり、ここで、

R^{Ix} は、 $-H$ 、 $-P(O)(OM)_2$ 、 $-P(O)(OM)-O-P(O)(OM)_2$ 、 $-P(O)(Oアルキル)_2$ 、 $-P(O)(Oアルキル)-O-P(O)(Oアルキル)_2$ 、 $-PO_3H_2$ 、 $-PO_3HM$ 、 $-PO_3M_2$ 、 $-PO_2SH_2$ 、 $-PO_2SHM$ 、 $-PO_2SM_2$ 、 $-PO_3M$ 、または $-PO_2SM$ 、保護基、リガンド、またはリガンド担持モノマーであり、

M は、出現ごとに独立して、総電荷が $+1$ のアルカリ金属または遷移金属を表し、および

20

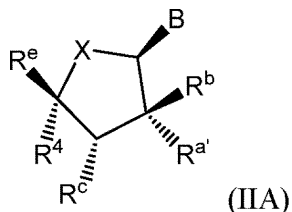
n は、 $1\sim 4$ の整数である。

【請求項121】

5'末端ヌクレオチドが式(II)または(II')の2'-ジェミナル置換ヌクレオチドである、前記請求項のいずれか一項記載のオリゴヌクレオチド。

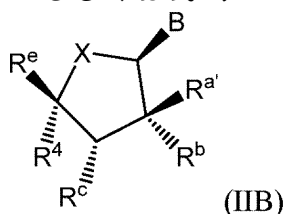
【請求項122】

(i) 式(II)の2'-ジェミナル置換ヌクレオシドが、式(IIA)：



30

もしくは式(IIB)：

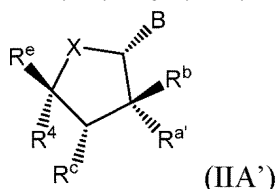


40

に従うか、

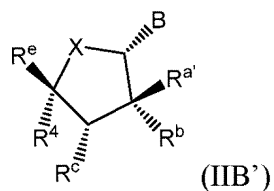
または

(ii) 式(II')の2'-ジェミナル置換ヌクレオシドが、式(IIA')：



もしくは式(IIB')：

50



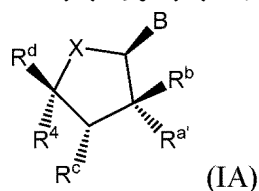
に従う、

前記請求項のいずれか一項記載のオリゴヌクレオチド。

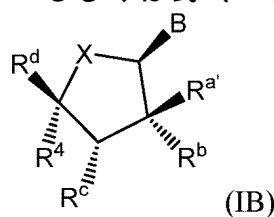
【請求項 1 2 3】

(i) 式 (I) の 2'-ジェミナル置換ヌクレオシドが、式 (IA) :

10



もしくは式 (IB) :

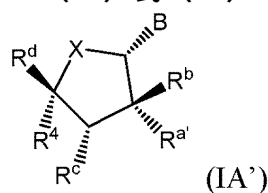


20

に従うか、

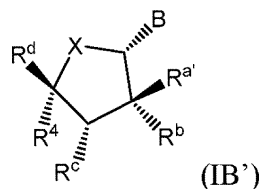
または

(ii) 式 (I') の 2'-ジェミナル置換ヌクレオシドが、式 (IA') :



30

もしくは式 (IB') :



40

に従う、

前記請求項のいずれか一項記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 1 2 4】

X が O である、前記請求項のいずれか一項記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 1 2 5】

R^{a'} が、水素、ハロゲン、-OR^{a2}、置換されていてもよい C₁~C₃₀ アルキル、置換されていてもよい C₁~C₃₀ アルコキシ、-O (CH₂CH₂O)_mCH₂CH₂OR^{a4}、または -NH (CH₂CH₂NH)_nCH₂CH₂-R^{a5} である、前記請求項のいずれか一項記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 1 2 6】

50

$R^{a'}$ が、ハロゲン、水素、 $-OR^{a2}$ 、または置換されていてもよい $C_1 \sim C_{30}$ アルコキシである、前記請求項のいずれか一項記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項127】

$R^{a'}$ が、ハロゲン、 $-OR^{a2}$ 、または置換されていてもよい $C_1 \sim C_{30}$ アルコキシである、前記請求項のいずれか一項記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項128】

$R^{a'}$ が、F、OHまたは置換されていてもよい $C_1 \sim C_{30}$ アルコキシである、前記請求項のいずれか一項記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項129】

$R^{a'}$ が、アミノまたは $C_1 \sim C_6$ アルコキシで置換されていてもよい、 $C_1 \sim C_{30}$ アルコキシである、前記請求項のいずれか一項記載のオリゴヌクレオチド。

10

【請求項130】

R^b が、置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルキル、 $C_1 \sim 6$ ハロアルキル、置換されていてもよい $C_2 \sim 6$ アルケニル、または置換されていてもよい $C_2 \sim 6$ アルキニルである、前記請求項のいずれか一項記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項131】

R^b が、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、t-ブチル、ビニル、エチニル、アリルまたはプロパルギルである、前記請求項のいずれか一項記載のオリゴヌクレオチド。

20

【請求項132】

R^b が、メチル、ビニル、エチニル、アリルまたはプロパルギルである、前記請求項のいずれか一項記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項133】

R^4 が、水素、置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルキル、置換されていてもよい $C_2 \sim 6$ アルケニル、置換されていてもよい $C_2 \sim 6$ アルキニル、または置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルコキシである、前記請求項のいずれか一項記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項134】

R^4 が水素である、前記請求項のいずれか一項記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項135】

R^d が $-CH(R^{d1})-X^d-R^{d2}$ である、前記請求項のいずれか一項記載のオリゴヌクレオチド。

30

【請求項136】

X^d がOである、前記請求項のいずれか一項記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項137】

R^{d1} が水素または置換されていてもよい $C_1 \sim C_6$ アルキルである、前記請求項のいずれか一項記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項138】

R^{d6} が水素である、前記請求項のいずれか一項記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項139】

R^e が $-C_2 \sim 6$ アルケニル- R^{e1} または $C_1 \sim 6$ アルキル- R^{e1} であり、 $C_1 \sim 6$ アルキルおよび $C_2 \sim 6$ アルケニルは置換されていてもよい、前記請求項のいずれか一項記載のオリゴヌクレオチド。

40

【請求項140】

R^e が $-CH=CHR^{e1}$ である、前記請求項のいずれか一項記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項141】

R^{e1} が、 $-P(O)(OR^{e4})_2$ 、 $-OR^{e2}$ 、または $-OP(O)(OR^{e4})_2$ である、前記請求項のいずれか一項記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項142】

R^{e2} が水素または置換されていてもよい $C_1 \sim C_6$ アルキルである、前記請求項のいずれか一項記載のオリゴヌクレオチド。

50

【請求項 1 4 3】

式 (I) の 2'-ジェミナル置換ヌクレオシドが、少なくとも、オリゴヌクレオチドの 5' 端から数えて位置 2、3、4、5、6、7、8、9 または 10 のうちの 1 つ、例えば少なくとも、位置 5、6、7 および / または 8 のうちの 1 つにある、前記請求項のいずれか一項記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 1 4 4】

式 (I) の 2'-ジェミナル置換ヌクレオシドがオリゴヌクレオチドの 5' 端から数えて位置 7 にある、前記請求項のいずれか一項記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 1 4 5】

前記オリゴヌクレオチドに連結されたリガンドをさらに含む、前記請求項のいずれか一項記載のオリゴヌクレオチド。

10

【請求項 1 4 6】

式 (I)、(I')、(II) および (II') の 2'-ジェミナル置換ヌクレオシドのみを含む、前記請求項のいずれか一項記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 1 4 7】

少なくとも 1 つの修飾ヌクレオシド間連結部をさらに含む、前記請求項のいずれか一項記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 1 4 8】

少なくとも 1 つの修飾核酸塩基をさらに含む、前記請求項のいずれか一項記載のオリゴヌクレオチド。

20

【請求項 1 4 9】

少なくとも 1 つの、2' 位において修飾されたヌクレオシドをさらに含み、2' 位において修飾された該ヌクレオチドが 2'-ジェミナルヌクレオシドではない、前記請求項のいずれか一項記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 1 5 0】

前記少なくとも 1 つの、2' 位において修飾されたヌクレオシドが、2'-F または 2'-OMe ヌクレオシドである、前記請求項のいずれか一項記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 1 5 1】

10～50 ヌクレオチド長である、前記請求項のいずれか一項記載のオリゴヌクレオチド。

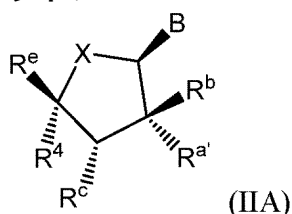
30

【請求項 1 5 2】

固形支持体に連結された、前記請求項のいずれか一項記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 1 5 3】

式 (II) の 2'-ジェミナル置換ヌクレオシドが式 (IIA) の 2'-ジェミナル置換ヌクレオシド:



40

であり、

式中、

X は、O であり、

R^{a'} は、ハロゲン（例えば F、Cl または Br）、ヒドロキシル、置換されていてもよい C₁～C₃₀ アルコキシ（例えば -(CH₂)_nCH₃ であって、ここで、n は 1～21、例えば 1、16 であるか、あるいは -(CH₂)_m-NH₂ であって、ここで、m は 2～10、例えば 3 または 6 であるか、あるいは -(CH₂)_p-OMe であって、ここで、p は 1～21、例えば 1 または 2 である）、または後続のヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合であり、

50

R^b は、置換されていてもよい $C_1\sim 6$ アルキル（例えばメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、*t*-ブチル、ビニル、エチニル、アリルまたはプロパルギル、好ましくはメチル）またはハロゲン（例えばF、ClまたはBr）であり、

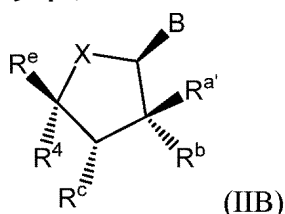
R^c は、後続のヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合またはヒドロキシルであり、ただし、 $R^{a'}$ および R^c のうちの1つだけが、後続のヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合であり、

R^4 は、水素であり、ならびに

R^e は、 $-CH=CHR^{e1}$ であり、ここで、 R^{e1} は $-P(O)(OR^{e4})_2$ である、
前記請求項のいずれか一項記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項154】

式(II)の2'-ジェミナル置換ヌクレオシドが式(IIB)の2'-ジェミナル置換ヌクレオシド:



であり、

式中、

Xは、Oであり、

$R^{a'}$ は、ハロゲン（例えばF）、ヒドロキシル、置換されていてもよい $C_1\sim 30$ アルコキシ（例えば $-(CH_2)_nCH_3$ であって、ここで、 n は1~21、例えば1、16であるか、あるいは $-(CH_2)_m-NH_2$ であって、ここで、 m は2~10、例えば3または6であるか、あるいは $-(CH_2)_p-OMe$ であって、ここで、 p は1~21、例えば1または2である）、または後続のヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合であり、

R^b は、置換されていてもよい $C_1\sim 6$ アルキル（例えばメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、*t*-ブチル、ビニル、エチニル、アリルまたはプロパルギル、好ましくはメチル）であり、

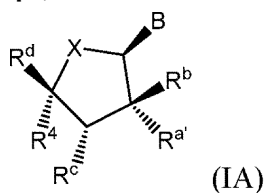
R^c は、後続のヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合またはヒドロキシルであり、ただし、 $R^{a'}$ および R^c のうちの1つだけが、後続のヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合であり、

R^4 は、水素であり、ならびに

R^e は、 $-CH=CHR^{e1}$ であり、ここで、 R^{e1} は $-P(O)(OR^{e4})_2$ である、
請求項120~152のいずれか一項記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項155】

式(I)の2'-ジェミナル置換ヌクレオシドが式(IA)の2'-ジェミナル置換ヌクレオシド:



であり、

式中、

Xは、Oであり、

$R^{a'}$ は、ハロゲン（例えばF、ClまたはBr）、ヒドロキシル、置換されていてもよい $C_1\sim 30$ アルコキシ（例えば $-(CH_2)_nCH_3$ であって、ここで、 n は1~21、例えば1、16

であるか、あるいは- (CH₂)_m-NH₂であって、ここで、mは2～10、例えば3または6であるか、あるいは- (CH₂)_p-OMeであって、ここで、pは1～21、例えば1または2である)、または後続のヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合であり、

R^bは、置換されていてもよいC₁～₆アルキル (例えばメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、t-ブチル、ビニル、エチニル、アリルまたはプロパルギル、好ましくはメチル) またはハロゲン (例えばF、ClまたはBr) であり、

R^cは、後続のヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合またはヒドロキシルであり、ただし、R^{a'}およびR^cのうちの1つだけが、後続のヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合であり、

R⁴は、水素であり、ならびに

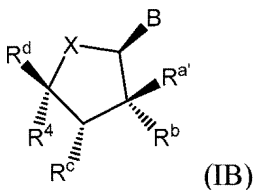
R^dは、先行するヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合であり、

ただし、R^{a'}およびR^cのうちの1つだけが、後続のヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合である、

前記請求項のいずれか一項記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項156】

式 (I) の2'-ジェミナル置換ヌクレオシドが式 (IB) の2'-ジェミナル置換ヌクレオシド:



であり、

式中、

Xは、Oであり、

R^{a'}は、ハロゲン (例えばF、ClまたはBr)、ヒドロキシル、置換されていてもよいC₁～₃₀アルコキシ (例えば- (CH₂)_nCH₃であって、ここで、nは1～21、例えば1、16であるか、あるいは- (CH₂)_m-NH₂であって、ここで、mは2～10、例えば3または6であるか、あるいは- (CH₂)_p-OMeであって、ここで、pは1～21、例えば1または2である)、または後続のヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合であり、

R^bは、置換されていてもよいC₁～₆アルキル (例えばメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、t-ブチル、ビニル、エチニル、アリルまたはプロパルギル、好ましくはメチル) またはハロゲン (例えばF、ClまたはBr) であり、

R^cは、後続のヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合またはヒドロキシルであり、ただし、R^{a'}およびR^cのうちの1つだけが、後続のヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合であり、

R⁴は、水素であり、ならびに

R^dは、先行するヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合であり、

ただし、R^{a'}およびR^cのうちの1つだけが、後続のヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合である、

請求項120～154のいずれか一項記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項157】

第1オリゴヌクレオチド鎖と該第1鎖に実質的に相補的な第2オリゴヌクレオチド鎖とを含み、該第1鎖および/または該第2鎖が請求項120～156のいずれか一項記載のオリゴヌクレオチドである、二本鎖核酸。

【請求項158】

第1鎖および第2鎖が、独立して、15～25ヌクレオチド長である、請求項157記載の二本鎖核酸。

【請求項159】

10

20

30

40

50

第1鎖および/または第2鎖がそれぞれの5'端または3'端に1~5ヌクレオチドのオーバーハングを有する、請求項157~158のいずれか一項記載の二本鎖核酸。

【請求項160】

第1鎖または第2鎖のうち的一方だけが、その5'端または3'端に2ヌクレオチドの一本鎖オーバーハングを有する、請求項157~159のいずれか一項記載の二本鎖核酸。

【請求項161】

一方の鎖だけがその3'端に2ヌクレオチドの一本鎖オーバーハンド (overhand) を有する、請求項157~160のいずれか一項記載の二本鎖核酸。

【請求項162】

第2鎖が、該第2鎖に連結されたりガンドを含む、請求項157~161のいずれか一項記載の二本鎖核酸。

【請求項163】

第1鎖が標的核酸に実質的に相補的であり、二本鎖核酸がRNA干渉を誘導することができる、請求項157~162のいずれか一項記載の二本鎖核酸。

【請求項164】

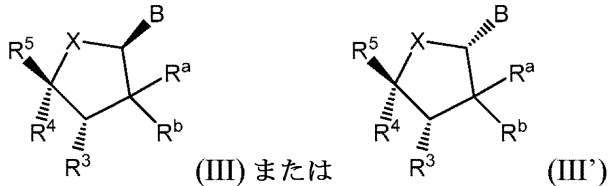
(i) 前記鎖が標的遺伝子に相補的である、請求項1~119のいずれか一項記載の二本鎖RNA、

(ii) 第1鎖 (例えばアンチセンス鎖) が標的遺伝子に相補的である、請求項157~163のいずれか一項記載の二本鎖RNA、または

(iii) 標的遺伝子に相補的である、請求項120~156のいずれか一項記載のオリゴヌクレオチド
のいずれかを対象に投与する工程を含む、対象における標的遺伝子の発現を低減する方法。

【請求項165】

式 (III) または (III') の化合物:



式中、

Xは、O、S、 $C(R^X)_2$ 、または $N(R^XN)$ であり、

各 R^X は、独立して、水素、ハロゲン、置換されていてもよい $C_1\sim 4$ アルキル、 $C_1\sim 4$ ハロアルキル、置換されていてもよい $C_2\sim 4$ アルケニル、または置換されていてもよい $C_2\sim 4$ アルキニルであるか、あるいは両方の R^X が全体として、 $=O$ 、 $=S$ 、 $=N(R^N)$ 、または $=CH_2$ を形成し、

R^XN は、水素、置換されていてもよい $C_1\sim 30$ アルキル、置換されていてもよい $C_1\sim C_{30}$ アルコキシ、 $C_1\sim 4$ ハロアルキル、置換されていてもよい $C_2\sim 4$ アルケニル、置換されていてもよい $C_2\sim 4$ アルキニル、置換されていてもよい $C_1\sim 30$ アルキル- CO_2H 、または窒素保護基であり、

Bは、修飾されていてもよい核酸塩基であり、

R^a は、ハロゲン、水素、 $-OR^{a2}$ 、 $-SR^{a3}$ 、置換されていてもよい $C_1\sim 30$ アルキル、 $C_1\sim 30$ ハロアルキル、置換されていてもよい $C_2\sim 30$ アルケニル、置換されていてもよい $C_2\sim 30$ アルキニル、または置換されていてもよい $C_1\sim 30$ アルコキシ、アミノ (NH_2)、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、ジヘテロアリールアミノ、アミノ酸、 $-O(CH_2CH_2O)_mCH_2CH_2OR^{a4}$ 、シアノ、アルキル-チオ-アルキル、チオアルコキシ、シクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、 $-NH(CH_2CH_2NH)_nCH_2CH_2-R^{a5}$ 、 $NHC(O)R^{a4}$ 、脂質、脂質に共有結合で取り付けられたリンカー、リガンド、リガンドに共有結合で取り付けら

れたリンカー、固形支持体、固形支持体に共有結合で取り付けられたリンカー、または反応性リン基であり、

R^{a2} は、水素またはヒドロキシル保護基であり、

R^{a3} は、水素または硫黄保護基であり、

R^{a4} は、出現ごとに独立して、H、 $C_1 \sim C_{30}$ アルキル、シクリル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アラルキル、糖または R^{a5} であり、

R^{a5} は、出現ごとに独立して、アミノ (NH_2)、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、またはジヘテロアリールアミノであり、

mは、1~50であり、

nは、1~50であり、

R^b は、置換されていてもよい $C_1 \sim C_{30}$ アルキル、置換されていてもよい $C_2 \sim C_{30}$ アルケニル、置換されていてもよい $C_2 \sim C_{30}$ アルキニル、またはハロゲンであり、

R^3 は、水素、ハロゲン、 $-OR^{c2}$ 、 $-SR^{c3}$ 、置換されていてもよい $C_1 \sim C_{30}$ アルキル、 $C_1 \sim C_{30}$ ハロアルキル、置換されていてもよい $C_2 \sim C_{30}$ アルケニル、置換されていてもよい $C_2 \sim C_{30}$ アルキニル、または置換されていてもよい $C_1 \sim C_{30}$ アルコキシ、アミノ (NH_2)、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、ジヘテロアリールアミノ、アミノ酸、 $-O(CH_2CH_2O)_rCH_2CH_2OR^{c4}$ 、シアノ、アルキル-チオ-アルキル、チオアルコキシ、シクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、 $-NH(CH_2CH_2NH)_sCH_2CH_2-R^{c5}$ 、 $NHC(O)R^{c4}$ 、脂質、脂質に共有結合で取り付けられたリンカー、リガンド、リガンドに共有結合で取り付けられたリンカー、固形支持体、固形支持体に共有結合で取り付けられたリンカー、または反応性リン基であり、

R^{c2} は、水素またはヒドロキシル保護基であり、

R^{c3} は、水素または硫黄保護基であり、

R^{c4} は、出現ごとに独立して、H、 $C_1 \sim C_{30}$ アルキル、シクリル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アラルキル、糖または R^{c5} であり、

R^{c5} は、出現ごとに独立して、アミノ (NH_2)、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、またはジヘテロアリールアミノであり、

rは、1~50であり、

sは、1~50であり、

R^4 は、水素、置換されていてもよい $C_1 \sim C_6$ アルキル、置換されていてもよい $C_2 \sim C_6$ アルケニル、置換されていてもよい $C_2 \sim C_6$ アルキニル、または置換されていてもよい $C_1 \sim C_6$ アルコキシであるか、

あるいは、 R^4 および R^a は、全体として、 $4'-C(R^{a11}R^{a12})_v-Y-2'$ または $4'-Y-C(R^{a11}R^{a12})_v-2'$ を形成し、

Yは、 $-O-$ 、 $-CH_2-$ 、 $-CH(Me)-$ 、 $-C(CH_3)_2-$ 、 $-S-$ 、 $-N(R^{a13})-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-N(R^{a13})C(O)-$ 、または $-C(O)N(R^{a13})-$ であり、

R^{a11} および R^{a12} は、独立して、H、置換されていてもよい $C_1 \sim C_6$ アルキル、置換されていてもよい $C_2 \sim C_6$ アルケニルまたは置換されていてもよい $C_2 \sim C_6$ アルキニルであり、

R^{a13} は、水素、置換されていてもよい $C_1 \sim C_{30}$ アルキル、置換されていてもよい $C_1 \sim C_{30}$ アルコキシ、 $C_1 \sim C_4$ ハロアルキル、置換されていてもよい $C_2 \sim C_4$ アルケニル、置換されていてもよい $C_2 \sim C_4$ アルキニル、置換されていてもよい $C_1 \sim C_{30}$ アルキル- CO_2H 、または窒素保護基であり、

vは、1、2または3であるか、

あるいは、 R^4 および R^c は、それらが取り付けられている原子と共に全体として、置換されていてもよい $C_3 \sim C_8$ シクロアルキル、置換されていてもよい $C_3 \sim C_8$ シクロアルケニ

10

20

30

40

50

ル、または置換されていてもよい3～8員ヘテロシクリルを形成し、

R^5 は、置換されていてもよい $-C_2\sim_6$ アルケニル- R^{5a} 、置換されていてもよい $C_1\sim_6$ アルキル- R^{5a} 、または置換されていてもよい $-C_2\sim_6$ アルキニル- R^{5a} であり、

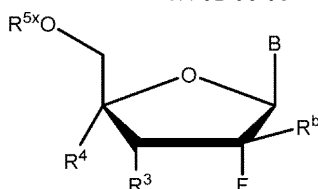
R^{5a} は、リン基、 $-OR^{5b}$ 、 $-SR^{5c}$ 、水素、保護されたリン(III)(phosphorous)基、固形支持体、または固形支持体へのリンカーであり、ただし、 R^{3a} 、 R^3 および R^5 のうちの1つだけが、固形支持体への連結部であり、

R^{5b} は、Hまたはヒドロシル保護基であり、ならびに

R^{5c} は、Hまたは硫黄保護基であり、

ただし、 R^a 、 R^3 、および R^{5a} のうちの1つだけが、固形支持体または固形支持体への連結部であり、

ただし、 R^a 、 R^3 および R^{5a} のうちの1つだけが、反応性リン(III)であり、ならびに
ただし、該化合物は、構造



の化合物ではなく、

ここで、

R^b は、水素または置換もしくは無置換 $C_1\sim_4$ アルキルであり、

R^c は、 $-OR^{1x}$ であり、ここで、

R^{1x} は、H、 $-P(O)(OM)_2$ 、 $-P(O)(OM)-O-P(O)(OM)_2$ 、 $-P(O)(Oアルキル)_2$ 、 $-P(O)(Oアルキル)-O-P(O)(Oアルキル)_2$ 、 $-PO_3H_2$ 、 $-PO_3HM$ 、 $-PO_3M_2$ 、 $-PO_2SH_2$ 、 $-PO_2SHM$ 、 $-PO_2SM_2$ 、 $-PO_3M$ 、または $-PO_2SM$ 、保護基、リガンド、リガンド担持モノマー、 $-F$ 、 $-(C_rC_6)$ アルキル、 $-(C_2\sim_6)$ アリル、 $-(C(R^3)_2)_nOR^3$ 、 $-(C(R^3)_2)_nSR^3$ 、 $-(C(R^3)_2)_nN(R^3)_2$ 、 $-(C(R^3)_2)_nC(O)N(R^3)_2$ 、 $-(C(R^3)_2)_nO(C_rC_6)$ アルキル、 $-(C(R^3)_2)_nS(C_rC_6)$ アルキル、 $-(C(R^3)_2)_nO(C(R^3)_2)_nN((C_i\sim_6)アルキル)_2$ 、 $-(C(R^3)_2)_nON((C_i\sim_6)アルキル)_2$ 、 $-C(O)R^3$ 、 $-C(O)R^3C(O)H$ 、 $-C(O)R^3C(O)OH$ 、 $-C(O)R^3C(O)R^3$ 、 $-C(O)R^3C(O)NR^3-PO_2$ 、 $-P(OR^3)_2$ 、 $-P(N(R^3)_2)_2$ 、 $-P(OR^3)N(R^3)_2$ 、またはリンカーであり、

R^4 は、Hであり、

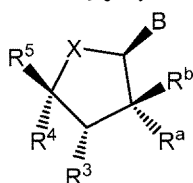
R^{5x} は、H、 $-P(O)(OM)_2$ 、 $-P(O)(OM)-O-P(O)(OM)_2$ 、 $-P(O)(Oアルキル)_2$ 、 $-P(O)(Oアルキル)-O-P(O)(Oアルキル)_2$ 、 $-PO_3H_2$ 、 $-PO_3HM$ 、 $-PO_3M_2$ 、 $-PO_2SH_2$ 、 $-PO_2SHM$ 、 $-PO_2SM_2$ 、 $-PO_3M$ 、または $-PO_2SM$ 、保護基、リガンド、またはリガンド担持モノマーであり、

Mは、出現ごとに独立して、総電荷が+1のアルカリ金属または遷移金属を表し、および

nは、1～4の整数である。

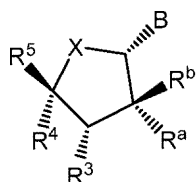
【請求項166】

a. 式(III)の化合物が式(IIIA)の化合物:



であるか、または

b. 式(III')の化合物が式(IIIA')の化合物:



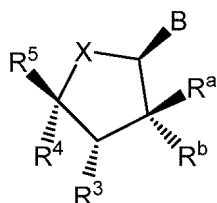
である、

請求項165記載の化合物。

【請求項167】

a. 式(III)の化合物が式(IIIB)の化合物:

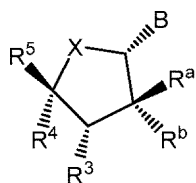
10



であるか、または

b. 式(III')の化合物が式(IIIB')の化合物:

20



である、

請求項165記載の化合物。

【請求項168】

反応性リン(III)基が、ホスホラミダイト、H-ホスホネート、アルキル-ホスホネート、またはホスフェートトリエステルである、前記請求項のいずれか一項記載の化合物。

30

【請求項169】

反応性リン(III)基が、 $-OP(OR^P)(NR^{P2})_2$ 、 $-OP(SR^P)(NR^{P2})_2$ 、 $-OP(O)(OR^P)(NR^{P2})_2$ 、 $-OP(S)(OR^P)(NR^{P2})_2$ 、 $-OP(O)(SR^P)(NR^{P2})_2$ 、 $-OP(O)(OR^P)H$ 、 $-OP(S)(OR^P)H$ 、 $-OP(O)(SR^P)H$ 、 $-OP(O)(OR^P)R^{P3}$ 、 $-OP(S)(OR^P)R^{P3}$ 、または $-OP(O)(SR^P)R^{P3}$ であり、ここで、

R^P は、置換されていてもよい $C_1\sim 6$ アルキルであり、および

各 R^{P2} は、独立して、置換されていてもよい $C_1\sim 6$ アルキルであるか、

または、両方の R^{P2} が、それらが取り付けられている窒素原子と共に全体として、置換されていてもよい3~8員ヘテロシクリルを形成するか、

または、 R^P と R^{P2} のうちの1つとが、それらが取り付けられている原子と共に全体として、置換されていてもよい4~8員ヘテロシクリルを形成し、

40

および

R^{P3} は、置換されていてもよい $C_1\sim C_{30}$ アルキル、置換されていてもよい $C_2\sim C_{30}$ アルケニル、または置換されていてもよい $C_2\sim C_{30}$ アルキニルである、

前記請求項のいずれか一項記載の化合物。

【請求項170】

反応性リン(III)基が $-OP(OR^P)(NR^{P2})_2$ である、前記請求項のいずれか一項記載の化合物。

【請求項171】

R^P が、シアノまたは $-SC(O)Ph$ で置換された、 $C_1\sim 6$ アルキルである、請求項169

50

または170記載の化合物。

【請求項172】

R^P が $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN}$ である、請求項169～171のいずれか一項記載の化合物。

【請求項173】

各 R^{P2} が、独立して、メチル、エチル、プロピル、またはイソプロピルである、請求項169～172のいずれか一項記載の化合物。

【請求項174】

各 R^{P2} がイソプロピルである、請求項169～173のいずれか一項記載の化合物。

【請求項175】

R^{P3} が、置換されていてもよい $\text{C}_1\sim\text{C}_6$ アルキルである、請求項169～174のいずれか一項記載の化合物。

10

【請求項176】

XがOである、前記請求項のいずれか一項記載の化合物。

【請求項177】

R^a が、ハロゲン、水素、 $-\text{OR}^{a2}$ 、または置換されていてもよい $\text{C}_1\sim\text{C}_{30}$ アルコキシである、前記請求項のいずれか一項記載の化合物。

【請求項178】

R^a が、ハロゲン、 $-\text{OR}^{a2}$ 、または置換されていてもよい $\text{C}_1\sim\text{C}_{30}$ アルコキシである、前記請求項のいずれか一項記載の化合物。

【請求項179】

R^a が、F、Cl、OHまたは置換されていてもよい $\text{C}_1\sim\text{C}_{30}$ アルコキシである、前記請求項のいずれか一項記載の化合物。

20

【請求項180】

R^a が、アミノまたは $\text{C}_1\sim\text{C}_6$ アルコキシで置換されていてもよい、 $\text{C}_1\sim\text{C}_{30}$ アルコキシである、前記請求項のいずれか一項記載の化合物。

【請求項181】

R^b が、置換されていてもよい $\text{C}_1\sim 6$ アルキル、 $\text{C}_1\sim 6$ ハロアルキル、置換されていてもよい $\text{C}_2\sim 6$ アルケニル、置換されていてもよい $\text{C}_2\sim 6$ アルキニル、またはハロゲンである、前記請求項のいずれか一項記載の化合物。

【請求項182】

R^b が、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、t-ブチル、ビニル、エチニル、アリルまたはプロパルギルである、前記請求項のいずれか一項記載の化合物。

30

【請求項183】

R^b が、メチル、ビニル、エチニル、アリルまたはプロパルギルである、前記請求項のいずれか一項記載の化合物。

【請求項184】

R^3 が、H、ハロゲン、 OR^{c2} 、反応性リン基、または固形支持体への連結部である、前記請求項のいずれか一項記載の化合物。

【請求項185】

R^3 が、反応性リン基であるかまたは固形支持体への連結部である、前記請求項のいずれか一項記載の化合物。

40

【請求項186】

R^3 が反応性リン(III)基である、前記請求項のいずれか一項記載の化合物。

【請求項187】

R^4 が、水素、置換されていてもよい $\text{C}_1\sim 6$ アルキル、置換されていてもよい $\text{C}_2\sim 6$ アルケニル、置換されていてもよい $\text{C}_2\sim 6$ アルキニル、または置換されていてもよい $\text{C}_1\sim 6$ アルコキシである、前記請求項のいずれか一項記載の化合物。

【請求項188】

R^4 が水素である、前記請求項のいずれか一項記載の化合物。

50

【請求項 189】

R^5 が、置換されていてもよい $-C_2\sim_6$ アルケニル- R^{5a} または $C_1\sim_6$ アルキル- R^{5a} である、前記請求項のいずれか一項記載の化合物。

【請求項 190】

R^5 が $-CH=CHR^{5a}$ である、前記請求項のいずれか一項記載の化合物。

【請求項 191】

R^{5a} がリン(III)基または $-OR^{5b}$ である、前記請求項のいずれか一項記載の化合物。

【請求項 192】

R^{5a} がリン(III)基である、前記請求項のいずれか一項記載の化合物。

【請求項 193】

R^{5a} が、 $-P(O)(OR^{e4})_2$ 、 $-P(S)(OR^{e4})_2$ 、 $-P(S)(SR^{e5})(OR^{e4})$ 、 $-P(S)(SR^{e5})_2$ 、 $-OP(O)(OR^{e4})_2$ 、 $-OP(S)(OR^{e4})_2$ 、 $-OP(S)(SR^{e5})(OR^{e4})$ 、 $-OP(S)(SR^{e5})_2$ 、 $-SP(O)(OR^{e4})_2$ 、 $-SP(S)(OR^{e4})_2$ 、 $-SP(S)(SR^{e5})(OR^{e4})$ 、または $-SP(S)(SR^{e5})_2$ であり、

R^{e2} が、水素または酸素保護基であり、

R^{e3} が、水素または硫黄保護基であり、

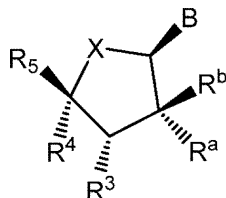
各 R^{e4} が、独立して、水素、置換されていてもよい $C_1\sim_{30}$ アルキル、置換されていてもよい $C_2\sim_{30}$ アルケニル、または置換されていてもよい $C_2\sim_{30}$ アルキニル、または酸素保護基であり、および

各 R^{e5} が、独立して、水素、置換されていてもよい $C_1\sim_{30}$ アルキル、置換されていてもよい $C_2\sim_{30}$ アルケニル、または置換されていてもよい $C_2\sim_{30}$ アルキニル、または硫黄保護基である、

前記請求項のいずれか一項記載の化合物。

【請求項 194】

式(IIIa)の化合物:



(IIIa)

であり、

式中、

Xは、Oであり、

R^a は、ハロゲン(例えばF)、ヒドロキシル、保護されたヒドロキシル、置換されていてもよい $C_1\sim_{30}$ アルコキシ(例えば $-(CH_2)_nCH_3$ であって、ここで、nは1~21、例えば1、16であるか、あるいは $-(CH_2)_m-NH_2$ であって、ここで、mは2~10、例えば3または6であるか、あるいは $-(CH_2)_p-OMe$ であって、ここで、pは1~21、例えば1または2である)、反応性リン(III)基、固形支持体、または固形支持体に共有結合で取り付けられたリンカーであり、

R^b は、置換されていてもよい $C_1\sim_6$ アルキル(例えばメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、t-ブチル、ビニル、エチニル、アリルまたはプロパルギル、好ましくはメチル)であり、

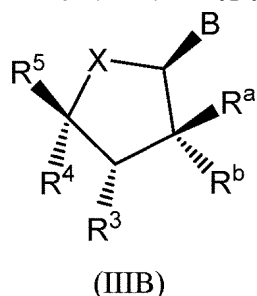
R^4 は、水素であり、

R^3 は、反応性リン(III)基、固形支持体、固形支持体に共有結合で取り付けられたリンカー、ヒドロキシル、または保護されたヒドロキシルであり、ただし、 R^a および R^3 のうちの1つだけが、反応性リン(III)基、固形支持体、または固形支持体に共有結合で取り付けられたリンカーであり、ならびに

R^5 は、 $-\text{CH}=\text{CHR}^{5a}$ であり、ここで、 R^{5a} は $-\text{P}(\text{O})(\text{OR}^{5e})_2$ であり、各 R^{5e} は、独立して、水素、または置換されていてもよい $\text{C}_{1\sim 30}$ アルキルである、請求項170記載の化合物。

【請求項195】

式(III)の化合物が式(IIIB)の化合物:



10

であり、

式中、

Xは、Oであり、

R^a は、ハロゲン（例えばF、Cl、Br）、ヒドロキシル、保護されたヒドロキシル、置換されていてもよい $\text{C}_{1\sim 30}$ アルコキシ（例えば $-(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ であって、ここで、nは1~21、例えば1、16であるか、あるいは $-(\text{CH}_2)_m\text{-NH}_2$ であって、ここで、mは2~10、例えば3または6であるか、あるいは $-(\text{CH}_2)_p\text{-OMe}$ であって、ここで、pは1~21、例えば1または2である）、反応性リン(III)基、固形支持体、または固形支持体に共有結合で取り付けられたリンカーであり、

20

R^b は、置換されていてもよい $\text{C}_{1\sim 6}$ アルキル（例えばメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、t-ブチル、ビニル、エチニル、アリルまたはプロパルギル、好ましくはメチル）またはハロゲン（例えばF、Cl、Br）であり、

R^4 は、水素であり、

R^3 は、反応性リン(III)基、固形支持体、固形支持体に共有結合で取り付けられたリンカー、ヒドロキシル、または保護されたヒドロキシルであり、ただし、 R^a および R^3 のうちの1つだけが、反応性リン(III)基、固形支持体、または固形支持体に共有結合で取り付けられたリンカーであり、ならびに

30

R^5 は、 $-\text{CH}=\text{CHR}^{5a}$ であり、ここで、 R^{5a} は $-\text{P}(\text{O})(\text{OR}^{5e})_2$ であり、各 R^{5e} は、独立して、水素、または置換されていてもよい $\text{C}_{1\sim 30}$ アルキルである、請求項165記載の化合物。

【請求項196】

R^3 が反応性リン(III)基である、請求項194または195記載の化合物。

【請求項197】

R^3 が、 $-\text{OP}(\text{OR}^p)\text{N}(\text{R}^{p2})_2$ 、 $-\text{OP}(\text{SR}^p)\text{N}(\text{R}^{p2})_2$ 、 $-\text{OP}(\text{O})(\text{OR}^p)\text{N}(\text{R}^{p2})_2$ 、 $-\text{OP}(\text{S})(\text{OR}^p)\text{N}(\text{R}^{p2})_2$ 、 $-\text{OP}(\text{O})(\text{SR}^p)\text{N}(\text{R}^{p2})_2$ 、 $-\text{OP}(\text{O})(\text{OR}^p)\text{H}$ 、 $-\text{OP}(\text{S})(\text{OR}^p)\text{H}$ 、 $-\text{OP}(\text{O})(\text{SR}^p)\text{H}$ 、 $-\text{OP}(\text{O})(\text{OR}^p)\text{R}^{p3}$ 、 $-\text{OP}(\text{S})(\text{OR}^p)\text{R}^{p3}$ 、または $-\text{OP}(\text{O})(\text{SR}^p)\text{R}^{p3}$ である、請求項194~196のいずれか一項記載の化合物。

40

【請求項198】

R^3 が $-\text{OP}(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN})\text{N}(\text{iPr})_2$ である、請求項194~197のいずれか一項記載の化合物。

【請求項199】

R^3 が、ヒドロキシルまたは保護されたヒドロキシルである、請求項194または195記載の化合物。

【請求項200】

R^3 が、固形支持体、または固形支持体に共有結合で取り付けられたリンカーである、

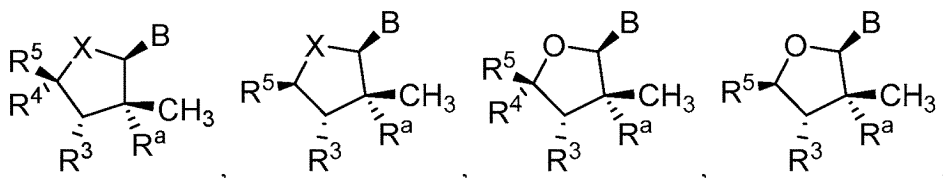
50

請求項194または195記載の化合物。

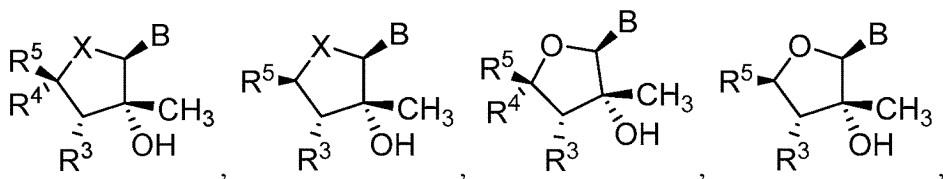
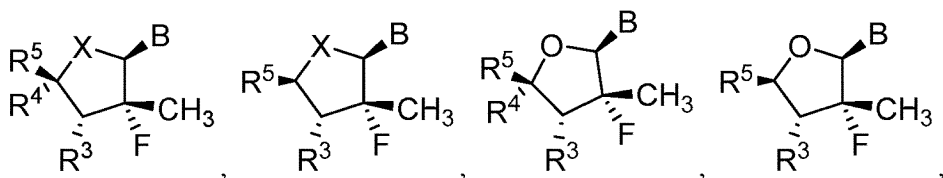
【請求項201】

R^a が、F、ヒドロキシル、保護されたヒドロキシル、または置換されていてもよい $C_1 \sim 30$ アルコキシ（例えば $-(CH_2)_nCH_3$ であって、ここで、 n は1~21、例えば1、16であるか、あるいは $-(CH_2)_m-NH_2$ であって、ここで、 m は2~10、例えば3または6であるか、あるいは $-(CH_2)_p-OMe$ であって、ここで、 p は1~21、例えば1または2である）である、請求項194~200のいずれか一項記載の化合物。

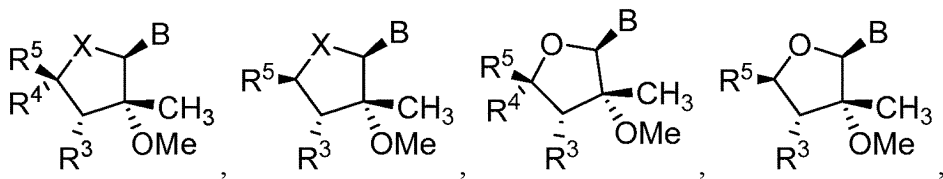
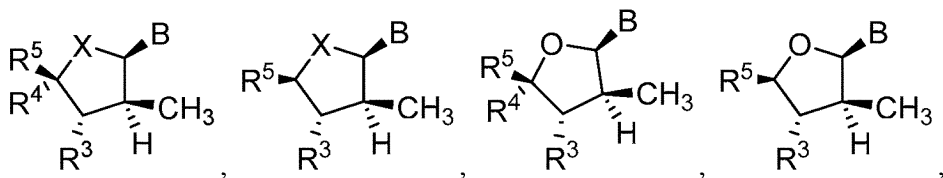
【請求項202】



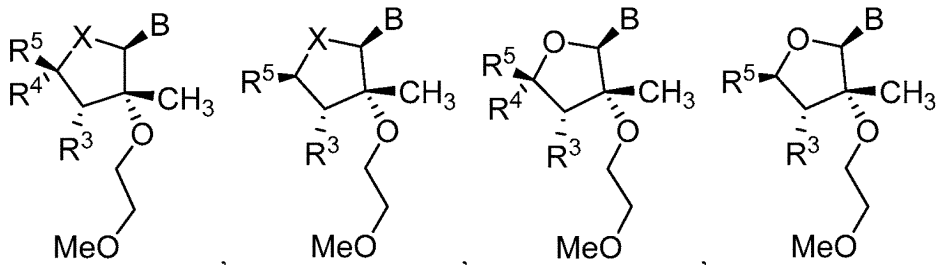
10



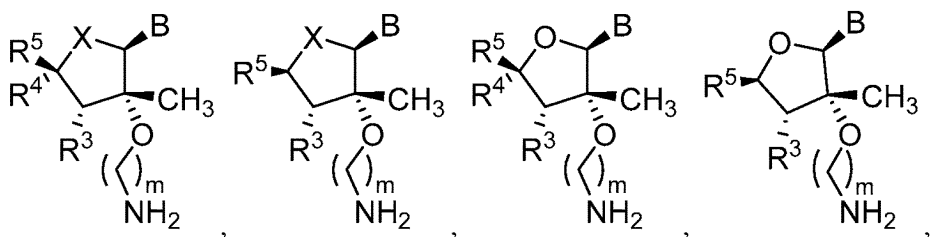
20



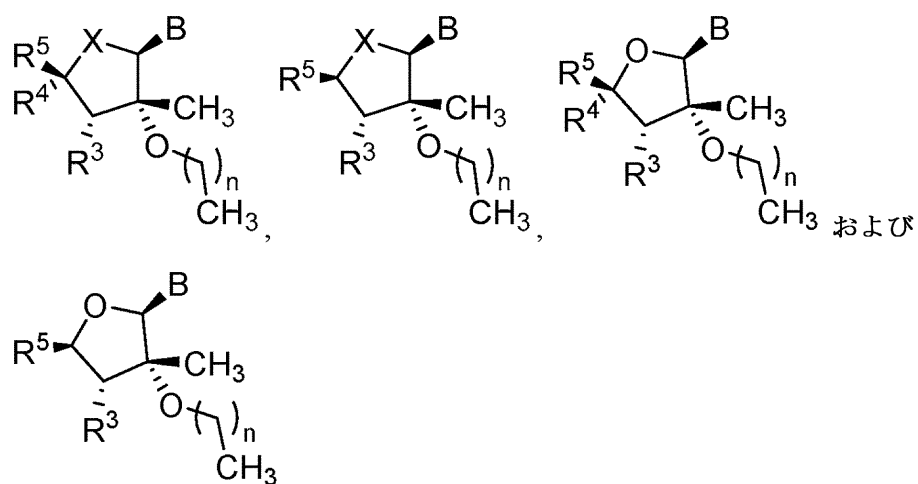
30



40



50

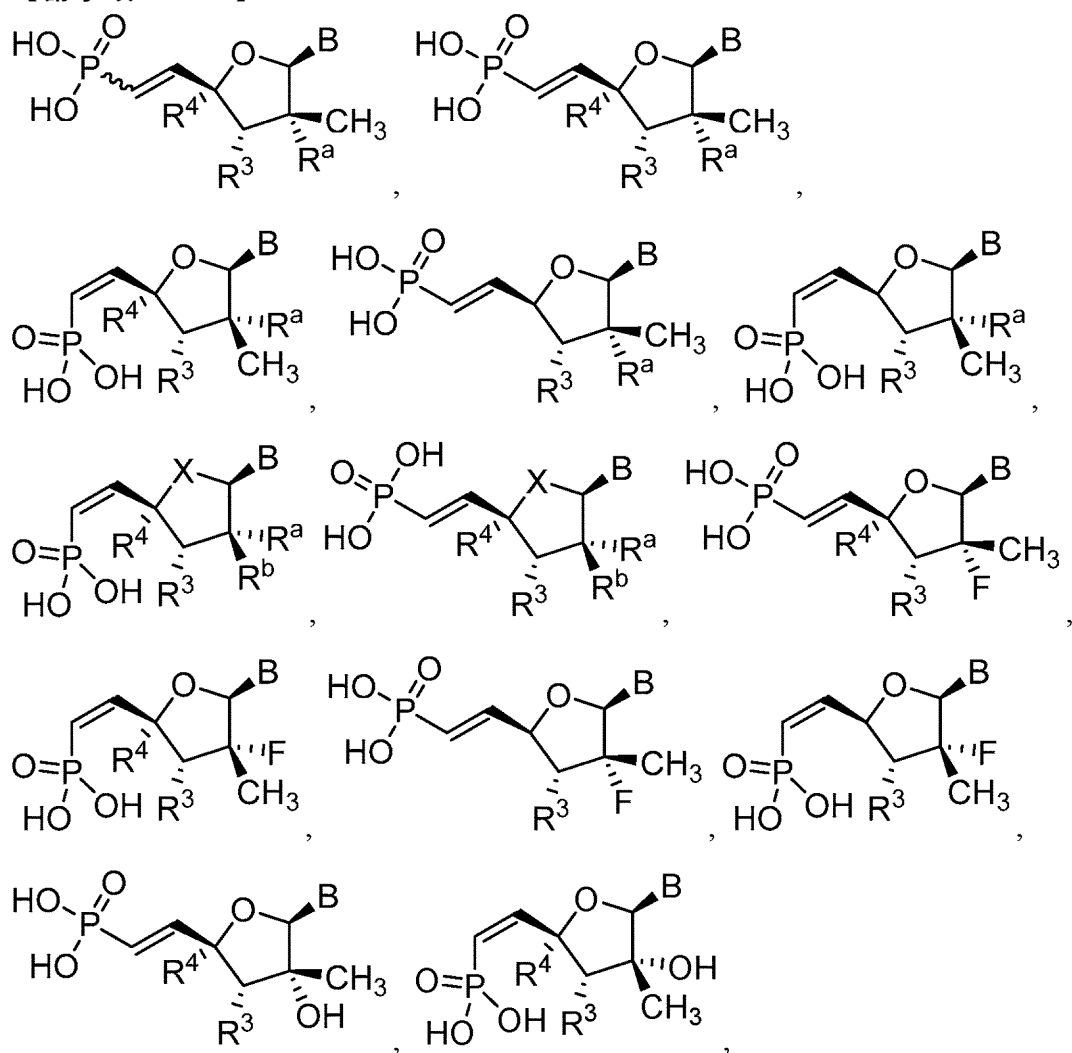


10

からなる群より選択され、

ここで、 m は2～10（例えば3、6）であり、 n は1～21（例えば1、16）である、請求項165記載の化合物。

【請求項203】

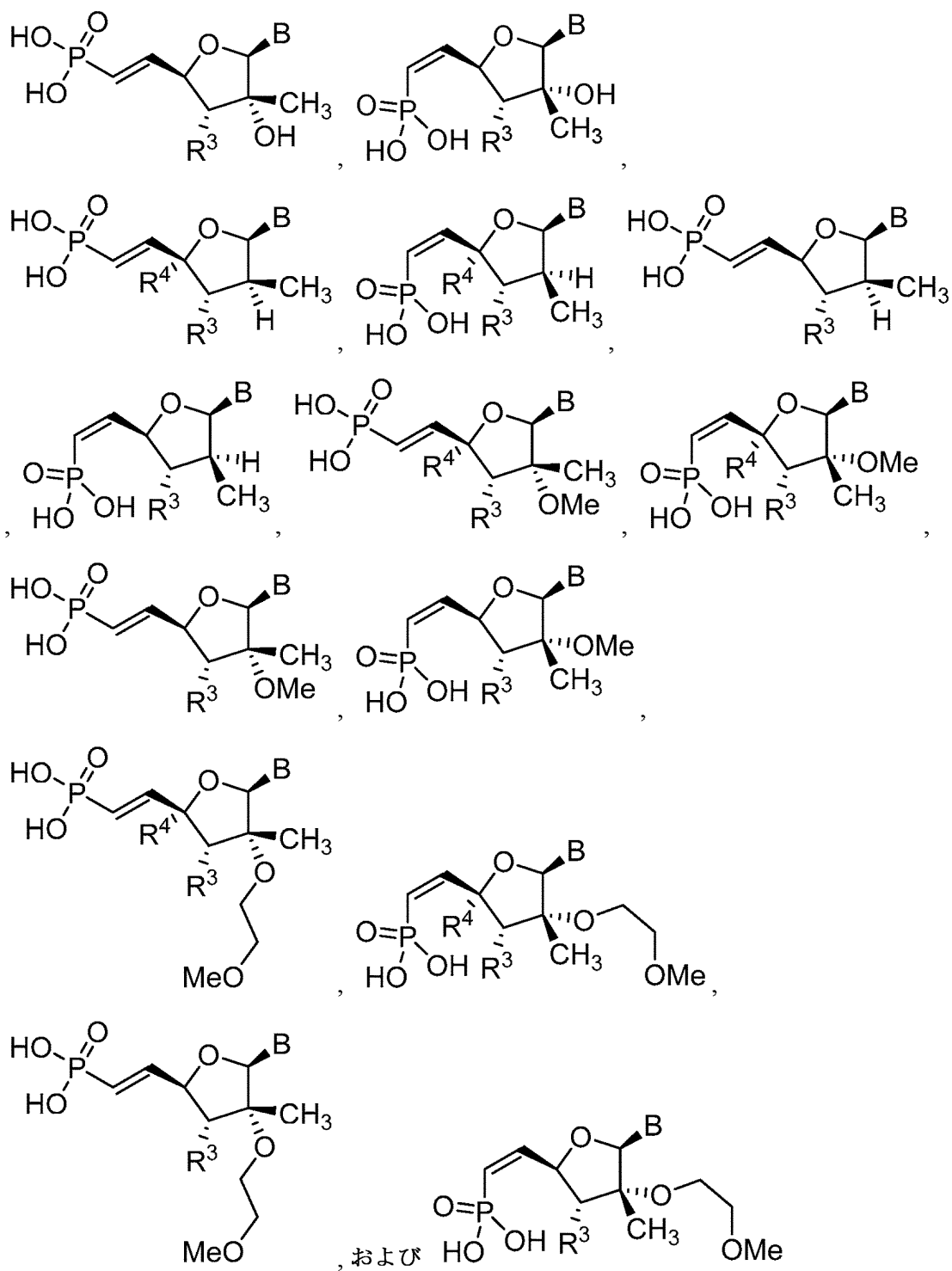


20

30

40

50



からなる群より選択される、請求項165記載の化合物。

【請求項204】

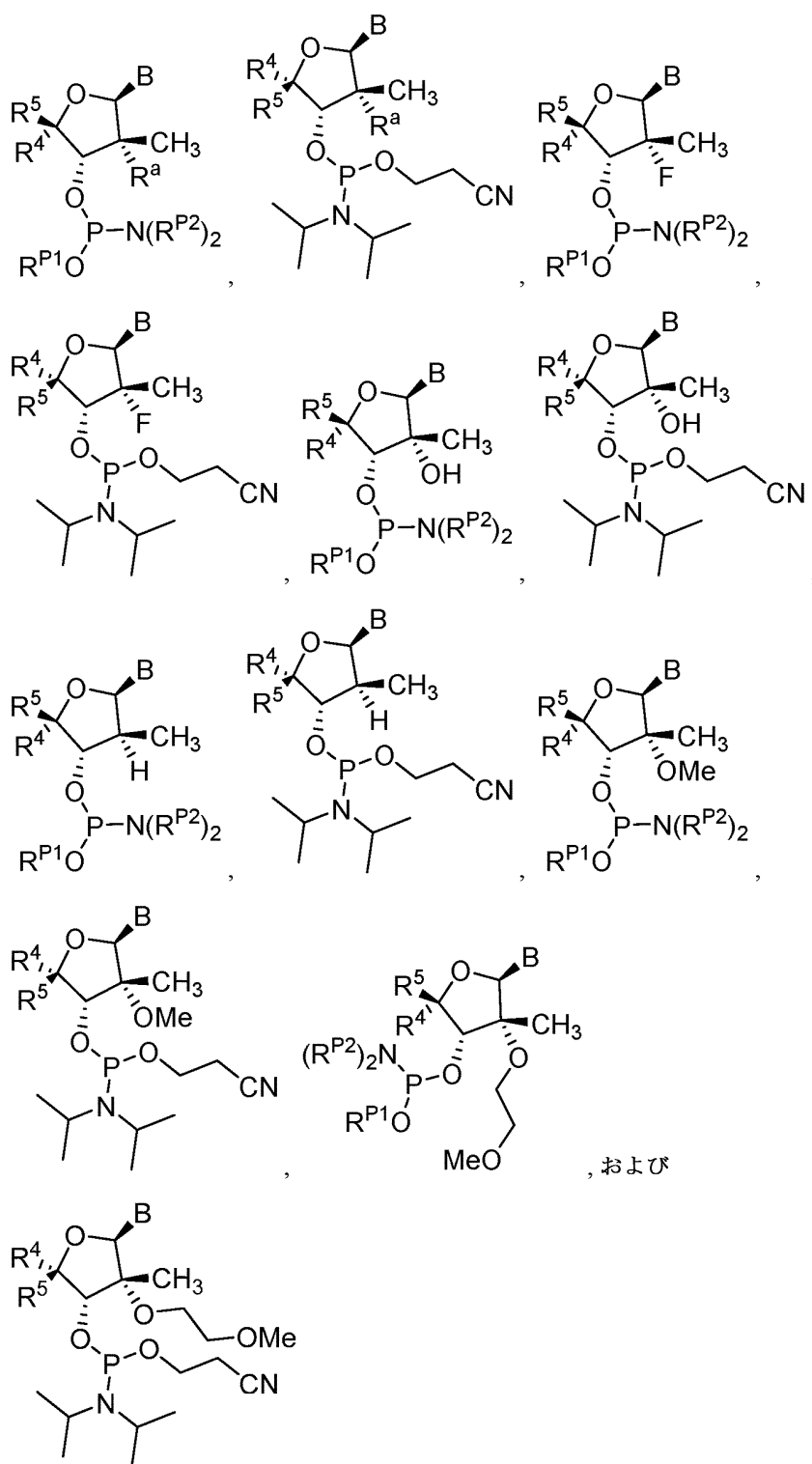
10

20

30

40

50



からなる群より選択される、請求項165記載の化合物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、第119条(e)に基づき、2021年10月19日に出願された米国仮出願第63/257,289号の恩典を主張し、この米国仮特許出願の内容は参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

【0002】

10

20

30

40

50

技術分野

本開示は、概して、2'-ジェミナル置換ヌクレオシド、それを含むオリゴヌクレオチドおよびdsRNA、ならびにそれらの使用に関する。

【背景技術】

【0003】

背景

RNA干渉、すなわち「RNAi」は、二本鎖RNAi (dsRNA) が遺伝子発現を遮断できるという観察を記述するために、Fireとその共同研究者らが最初に造語した用語である (Fire et al. (1998) Nature 391,806-811、Elbashir et al. (2001) Genes Dev.15,188-200 (非特許文献1))。短鎖dsRNAは、脊椎動物を含む多くの生物において遺伝子特異的な転写後サイレンシングを指示し、遺伝子機能を研究するための新しいツールになっている。RNAiは、サイレンシングトリガーに相同なメッセンジャーRNAを破壊する配列特異的な多成分ヌクレアーゼであるRNA誘導サイレンシング複合体 (RISC) によって媒介される。RISCが、二本鎖RNAトリガーに由来する短鎖RNA (およそ22ヌクレオチド) を含有することは公知であるが、この活性のタンパク質構成要素は不明なままだった。

10

【0004】

当技術分野では、標的遺伝子発現を阻害するのに有利な、dsRNA分子のための効果的なヌクレオチドまたは化学的修飾が、今なお必要とされている。本発明はその努力に向けられる。

20

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】 Fire et al. (1998) Nature 391,806-811、Elbashir et al. (2001) Genes Dev.15,188-200

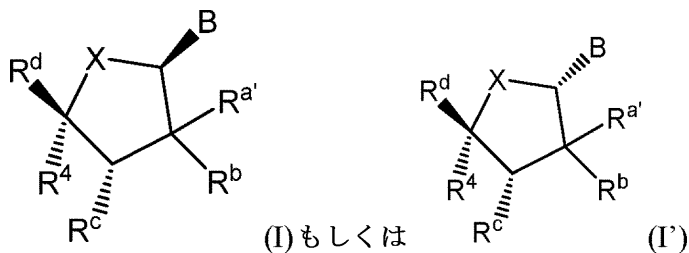
【発明の概要】

【0006】

概要

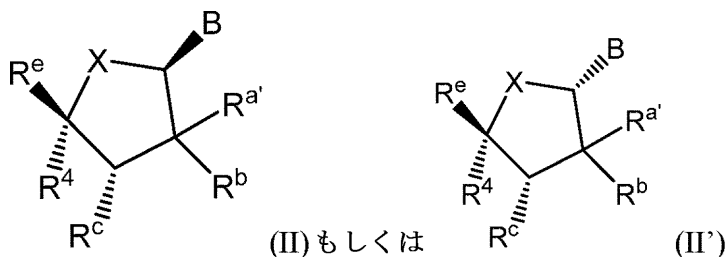
一局面において、本明細書では、(i) 少なくとも1つの、式 (I) もしくは (I') の2'-ジェミナル置換ヌクレオシド:

30



、および/または (ii) 5'末端ヌクレオチドにおける式 (II) もしくは (II') の2'-ジェミナル置換ヌクレオシド:

40



を含む、オリゴヌクレオチドが提供される。

【0007】

50

式 (I)、(I')、(II) および (II') において、式中、

Xは、O、S、C(R^X)₂、またはN(R^{XN})であり、

各R^Xは、独立して、水素、ハロゲン、置換されていてもよいC₁~₄アルキル、C₁~₄ハロアルキル、置換されていてもよいC₂~₄アルケニル、または置換されていてもよいC₂~₄アルキニルであるか、あるいは両方のR^Xが全体として、=O、=S、=N(R^N)、または=CH₂を形成し、

R^{XN}は、水素、置換されていてもよいC₁~₃₀アルキル、置換されていてもよいC₁~₃₀アルコキシ、C₁~₄ハロアルキル、置換されていてもよいC₂~₄アルケニル、置換されていてもよいC₂~₄アルキニル、置換されていてもよいC₁~₃₀アルキル-CO₂H、または窒素保護基であり、

Bは、修飾されていてもよい核酸塩基であり、

R^{a1}は、水素、ハロゲン、-OR^{a2}、-SR^{a3}、置換されていてもよいC₁~₃₀アルキル、C₁~₃₀ハロアルキル、置換されていてもよいC₂~₃₀アルケニル、置換されていてもよいC₂~₃₀アルキニル、または置換されていてもよいC₁~₃₀アルコキシ、アミノ(NH₂)、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、ジヘテロアリールアミノ、アミノ酸、-O(CH₂CH₂O)_mCH₂CH₂OR^{a4}、シアノ、アルキル-チオ-アルキル、チオアルコキシ、シクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、-NH(CH₂CH₂NH)_nCH₂CH₂-R^{a5}、NHC(O)R^{a4}、脂質、脂質に共有結合で取り付けられたリンカー、リガンド、リガンドに共有結合で取り付けられたリンカー、固形支持体、固形支持体に共有結合で取り付けられたリンカー、または後続のヌクレオチドへのヌクレオシド間連結部への結合であり、

R^{a2}は、水素またはヒドロキシル保護基であり、

R^{a3}は、水素または硫黄保護基であり、

R^{a4}は、出現ごとに独立して、H、C₁~₃₀アルキル、シクリル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アラルキル、糖またはR^{a5}であり、

R^{a5}は、出現ごとに独立して、アミノ(NH₂)、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、またはジヘテロアリールアミノであり、

mは、1~50であり、

nは、1~50であり、

R^bは、置換されていてもよいC₁~₃₀アルキル、置換されていてもよいC₂~₃₀アルケニル、置換されていてもよいC₂~₃₀アルキニル、またはハロゲンであり、

R^cは、後続のヌクレオチドへのヌクレオシド間連結部への結合、水素、ハロゲン、-OR^{c2}、-SR^{c3}、置換されていてもよいC₁~₃₀アルキル、C₁~₃₀ハロアルキル、置換されていてもよいC₂~₃₀アルケニル、置換されていてもよいC₂~₃₀アルキニル、または置換されていてもよいC₁~₃₀アルコキシ、アミノ(NH₂)、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、ジヘテロアリールアミノ、アミノ酸、-O(CH₂CH₂O)_rCH₂CH₂OR^{c4}、シアノ、アルキル-チオ-アルキル、チオアルコキシ、シクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、-NH(CH₂CH₂NH)_sCH₂CH₂-R^{c5}、NHC(O)R^{c4}、脂質、脂質に共有結合で取り付けられたリンカー、リガンド、リガンドに共有結合で取り付けられたリンカー、固形支持体、または固形支持体に共有結合で取り付けられたリンカーであって、任意で、少なくともR^cまたはR^bは、後続のヌクレオチドへのヌクレオシド間連結部への結合であり、

R^{c2}は、水素またはヒドロキシル保護基であり、

R^{c3}は、水素または硫黄保護基であり、

R^{c4}は、出現ごとに独立して、H、C₁~₃₀アルキル、シクリル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アラルキル、糖またはR^{c5}であり、

R^{c5}は、出現ごとに独立して、アミノ(NH₂)、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、またはジヘテロアリールアミノであり、

rは、1～50であり、

sは、1～50であり、

R⁴は、水素、置換されていてもよいC₁～₆アルキル、置換されていてもよいC₂～₆アルケニル、置換されていてもよいC₂～₆アルキニル、または置換されていてもよいC₁～₆アルコキシであるか、

あるいは、R⁴およびR^aは、全体として、4'-C(R^{a11}R^{a12})_v-Y-2'または4'-Y-C(R^{a11}R^{a12})_v-2'であり、

Yは、-O-、-CH₂-、-CH(Me)-、-C(CH₃)₂-、-S-、-N(R^{a13})-、-C(O)-、-C(S)-、-S(O)-、-S(O)₂-、-OC(O)-、-C(O)O-、-N(R^{a13})C(O)-、または-C(O)N(R^{a13})-であり、

R^{a11}およびR^{a12}は、独立して、H、置換されていてもよいC₁～₆アルキル、置換されていてもよいC₂～₆アルケニルまたは置換されていてもよいC₂～₆アルキニルであり、

R^{a13}は、水素、置換されていてもよいC₁～₃₀アルキル、置換されていてもよいC₁～₃₀アルコキシ、C₁～₄ハロアルキル、置換されていてもよいC₂～₄アルケニル、置換されていてもよいC₂～₄アルキニル、置換されていてもよいC₁～₃₀アルキル-CO₂H、または窒素保護基であり、

vは、1、2または3であるか、

あるいは、R⁴およびR^cは、それらが取り付けられている原子と共に全体として、置換されていてもよいC₃～₈シクロアルキル、置換されていてもよいC₃～₈シクロアルケニル、または置換されていてもよい3～8員ヘテロシクリルを形成し、

R^dは、-CH(R^{d1})-R^{d2}または-C(R^{d1})=CHR^{d2}であり、

R^{d1}は、水素、置換されていてもよいC₁～₃₀アルキル、置換されていてもよい-C₂～₃₀アルケニル、または置換されていてもよい-C₂～₃₀アルキニルであり、

R^{d2}は、先行するヌクレオチドへのヌクレオシド間連結部への結合であり、

R^eは、置換されていてもよいC₁～₆アルキル-R^{e1}、置換されていてもよい-C₂～₆アルケニル-R^{e1}、または置換されていてもよい-C₂～₆アルキニル-R^{e1}であり、

R^{e1}は、-OR^{e2}、-SR^{e3}、-P(O)(OR^{e4})₂、-P(S)(OR^{e4})₂、-P(S)(SR^{e5})(OR^{e4})₂、-P(S)(SR^{e5})₂、-OP(O)(OR^{e4})₂、-OP(S)(OR^{e4})₂、-OP(S)(SR^{e5})(OR^{e4})₂、-OP(S)(SR^{e5})₂、-SP(O)(OR^{e4})₂、-SP(S)(OR^{e4})₂、-SP(S)(SR^{e5})(OR^{e4})₂、または-SP(S)(SR^{e5})₂であり、

R^{e2}は、水素または酸素保護基であり、

R^{e3}は、水素または硫黄保護基であり、

各R^{e4}は、独立して、水素、置換されていてもよいC₁～₃₀アルキル、置換されていてもよいC₂～₃₀アルケニル、または置換されていてもよいC₂～₃₀アルキニル、または酸素保護基であり、

および、各R^{e5}は、独立して、水素、置換されていてもよいC₁～₃₀アルキル、置換されていてもよいC₂～₃₀アルケニル、または置換されていてもよいC₂～₃₀アルキニル、または硫黄保護基である。

【0008】

別の一局面において、本明細書では、第1鎖と第1鎖に実質的に相補的な第2鎖とを含む二本鎖核酸（例えばdsRNA）であって、第1鎖または第2鎖の少なくとも一方が、本明細書記載のオリゴヌクレオチド、例えば(i)少なくとも1つの、式(I)または(I')の2'-ジェミナル置換ヌクレオシド、および/または(ii)5'末端ヌクレオチドにおける式(II)または(II')の2'-ジェミナル置換ヌクレオシドを含む、オリゴヌクレオチドである、二本鎖核酸が提供される。いくつかの態様において、第1鎖は本明細書記載のオリゴヌクレオチドである。本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、(i)少なくとも1つの、式(I)の2'-ジェミナル置換ヌクレオシド、および/または(ii)5'末端ヌクレオチドにおける式(II)の2'-ジェミナル置換ヌクレオシドを含む。

【0009】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、二本鎖核酸（例えば dsRNA）はアンチセンス鎖とセンス鎖とを含み、ここでは、アンチセンス鎖とセンス鎖とが互いに相補的であって、二本鎖領域、例えば少なくとも15塩基対の二本鎖領域を形成する。アンチセンス鎖は、(a) 式 (II) または (II') の2'-ジェミナル置換ヌクレオシドである5'末端ヌクレオシド、および (b) 少なくとも、アンチセンス鎖の5'端から数えて位置2～9（例えば位置2、3、4、5、6、7、8および/または9）のうちの1つにおける、式 (I) または (I') の2'-ジェミナル置換ヌクレオシドのうち的一方または両方を含む。

【0010】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、アンチセンス鎖は、(i) 式 (II) の2'-ジェミナル置換ヌクレオシドである5'末端ヌクレオシド、および/または (ii) 少なくとも、アンチセンス鎖の5'端から数えて位置2～9（例えば位置2、3、4、5、6、7、8および/または9）のうちの1つにおける、式 (I) の2'-ジェミナル置換ヌクレオシドを含む。

【0011】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、アンチセンス鎖の5'末端ヌクレオチドは、式 (II) または (II') の2'-ジェミナル置換ヌクレオチドである。例えば、アンチセンス鎖の5'末端ヌクレオチドは、式 (II) の2'-ジェミナル置換ヌクレオチドである。

【0012】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、アンチセンス鎖は、その5'端にビニルホスホネート（例えばE-ビニルホスホネート）基を含む。例えば、アンチセンス鎖の5'末端ヌクレオチドは、式 (II) または (II') の2'-ジェミナル置換ヌクレオチドであって、式中、 R^e はビニルホスホネートである（例えば R^e は、 R^e は、 $-CH=CHR^{e1}$ であり、 R^{e1} は $-P(O)(OR^{e4})_2$ である）。本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、アンチセンス鎖の5'末端ヌクレオチドは式 (II) の2'-ジェミナル置換ヌクレオチドであって、式中、 R^e はビニルホスホネートである（例えば R^e は、 R^e は、 $-CH=CHR^{e1}$ であり、 R^{e1} は $-P(O)(OR^{e4})_2$ である）。

【0013】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、アンチセンス鎖は、少なくとも、アンチセンス鎖の5'端から数えて位置3、4、5、6、7、8または9に、式 (I) または (I') のヌクレオシドを含む。例えば、アンチセンス鎖は、少なくとも、アンチセンス鎖の5'端から数えて位置4に、式 (I) または (I') のヌクレオシドを含む。別の一例において、アンチセンス鎖は、少なくとも少なくとも、アンチセンス鎖の5'端から数えて位置5に、式 (I) または (I') のヌクレオシドを含む。さらなる別の一例において、アンチセンス鎖は、少なくとも少なくとも、アンチセンス鎖の5'端から数えて位置6に、式 (I) または (I') のヌクレオシドを含む。さらなる別の一例において、アンチセンス鎖は、少なくとも少なくとも、アンチセンス鎖の5'端から数えて位置7に、式 (I) または (I') のヌクレオシドを含む。さらなる別の一例において、アンチセンス鎖は、少なくとも少なくとも、アンチセンス鎖の5'端から数えて位置8に、式 (I) または (I') のヌクレオシドを含む。一例において、アンチセンス鎖は、少なくとも少なくとも、アンチセンス鎖の5'端から数えて位置9に、式 (I) または (I') のヌクレオシドを含む。

【0014】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、アンチセンス鎖は、少なくとも、アンチセンス鎖の5'端から数えて位置3、4、5、6、7、8または9に、式 (I) のヌクレオシドを含む。例えば、アンチセンス鎖は、少なくとも、アンチセンス鎖の5'端から数えて位置4に、式 (I) のヌクレオシドを含む。別の一例において、アンチセンス鎖は、少なくとも少なくとも、アンチセンス鎖の5'端から数えて位置5に、式 (I) のヌクレオシドを含む。さらなる別の一例において、アンチセンス鎖は、少なくとも少なく

10

20

30

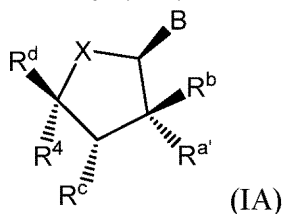
40

50

とも、アンチセンス鎖の5'端から数えて位置6に、式(Ⅰ)のヌクレオシドを含む。さらなる別の一例において、アンチセンス鎖は、少なくとも少なくとも、アンチセンス鎖の5'端から数えて位置7に、式(Ⅰ)のヌクレオシドを含む。さらなる別の一例において、アンチセンス鎖は、少なくとも少なくとも、アンチセンス鎖の5'端から数えて位置8に、式(Ⅰ)のヌクレオシドを含む。一例において、アンチセンス鎖は、少なくとも少なくとも、アンチセンス鎖の5'端から数えて位置9に、式(Ⅰ)のヌクレオシドを含む。

【0015】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、式(Ⅰ)のヌクレオシドは式(ⅠA)：

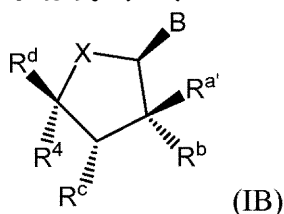


10

である。

【0016】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、式(Ⅰ)のヌクレオシドは式(ⅠB)：

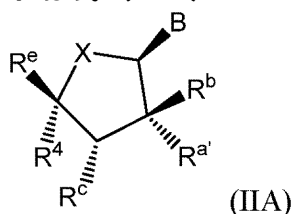


20

である。

【0017】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、式(Ⅱ)のヌクレオシドは式(ⅡA)：

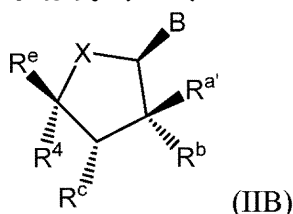


30

である。

【0018】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、式(Ⅱ)のヌクレオシドは式(ⅡB)：



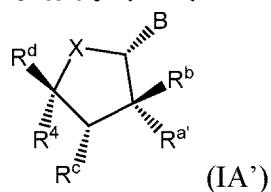
40

である。

50

【0019】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、式（I'）のヌクレオシドは式（IA'）：

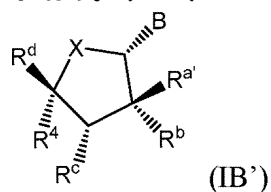


である。

10

【0020】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、式（I'）のヌクレオシドは式（IB'）：

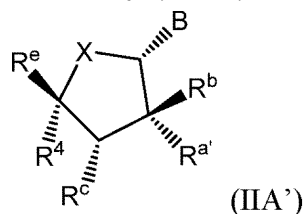


である。

20

【0021】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、式（II'）のヌクレオシドは式（IIA'）：

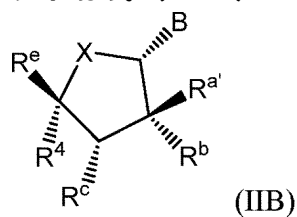


30

である。

【0022】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、式（II'）のヌクレオシドは式（IIB'）：



40

である。

【0023】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、式（II）のヌクレオシドは、式（IIA）または（IIB）のヌクレオシドであり、

式中、

Xは、Oであり、

R^{a'}は、ハロゲン（例えばFまたはCl）、ヒドロキシル、置換されていてもよいC₁～30アルコキシ（例えば-(CH₂)_nCH₃であって、ここで、nは1～21、例えば1、16であるか、あるいは-(CH₂)_m-NH₂であって、ここで、mは2～10、例えば3または6

50

であるか、あるいは $-(CH_2)_p-O Me$ であって、ここで、 p は1~21、例えば1または2である)、または後続のヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合であり、

R^b は、置換されていてもよい $C_1\sim 6$ アルキル(例えばメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、 t -ブチル、ビニル、エチニル、アリルまたはプロパルギル、好ましくはメチル)であり、

R^c は、後続のヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合またはヒドロキシルであり、ただし、 $R^{a'}$ および R^c のうち的一方だけが、後続のヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合であり、

R^4 は水素であり、および

R^e は、 $-CH=CHR^{e1}$ であって、ここで、 R^{e1} は、 $-P(O)(OR^{e4})_2$ である。

10

【0024】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、式(II)のヌクレオシドは、式(IIA)または(IIB)のヌクレオシドであり、

式中、

X は、 O であり、

$R^{a'}$ は、 F 、 Cl または置換されていてもよい $C_1\sim 30$ アルコキシ(例えば $-(CH_2)_nCH_3$ であって、ここで、 n は1~21、例えば1、16であるか、あるいは $-(CH_2)_m-NH_2$ であって、ここで、 m は2~10、例えば3または6であるか、あるいは $-(CH_2)_p-O Me$ であって、ここで、 p は1~21、例えば1または2である)であり、

20

R^b は、置換されていてもよい $C_1\sim 6$ アルキル(例えばメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、 t -ブチル、ビニル、エチニル、アリルまたはプロパルギル、好ましくはメチル)であり、

R^c は、後続のヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合であり、

R^4 は、水素であり、および

R^e は、 $-CH=CHR^{e1}$ であって、ここで、 R^{e1} は、 $-P(O)(OR^{e4})_2$ である。

【0025】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、式(II)のヌクレオシドは、式(IIA)または(IIB)のヌクレオシドであり、

式中、

X は、 O であり、

30

$R^{a'}$ は、 Cl または置換されていてもよい $C_1\sim 30$ アルコキシ(例えば $-(CH_2)_nCH_3$ であって、ここで、 n は1~21、例えば1、16であるか、あるいは $-(CH_2)_m-NH_2$ であって、ここで、 m は2~10、例えば3または6であるか、あるいは $-(CH_2)_p-O Me$ であって、ここで、 p は1~21、例えば1または2である)であり、

R^b は、置換されていてもよい $C_1\sim 6$ アルキル(例えばメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、 t -ブチル、ビニル、エチニル、アリルまたはプロパルギル、好ましくはメチル)であり、

R^c は、後続のヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合であり、

R^4 は、水素であり、および

R^e は、 $-CH_2-O-R^{e2}$ または $-CH=CHR^{e1}$ であって、ここで、 R^{e2} は水素または酸素保護基であり、および R^{e1} は、 $-P(O)(OR^{e4})_2$ である。

40

【0026】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、式(II)のヌクレオシドは、式(IIA)または(IIB)のヌクレオシドであり、

式中、

X は、 O であり、

$R^{a'}$ は、ハロゲン(例えば F 、 Br または Cl)であり、

R^b は、 $R^{a'}$ は、ハロゲン(例えば F 、 Br または Cl)であり、

R^c は、後続のヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合またはヒドロキシルであり、ただし、 $R^{a'}$ および R^c のうち的一方だけが、後続のヌクレオシドへのヌクレオシド

50

間連結部への結合であり、

R^4 は、水素であり、および

R^e は、 $-\text{CH}_2-\text{O}-R^{e2}$ または $-\text{CH}=\text{CHR}^{e1}$ であって、ここで、 R^{e2} は水素または酸素保護基であり、および R^{e1} は、 $-\text{P}(\text{O})(\text{OR}^{e4})_2$ である。

【0027】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、式(II')のヌクレオシドは、式(IIA')または(II B')のヌクレオシドであり、

式中、

Xは、Oであり、

$R^{a'}$ は、ハロゲン（例えばF、BrまたはCl）、ヒドロキシル、置換されていてもよい $\text{C}_1 \sim 30$ アルコキシ（例えば $-(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ であって、ここで、nは1~21、例えば1、16であるか、あるいは $-(\text{CH}_2)_m-\text{NH}_2$ であって、ここで、mは2~10、例えば3または6であるか、あるいは $-(\text{CH}_2)_p-\text{OMe}$ であって、ここで、pは1~21、例えば1または2である）、または後続のヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合であり、

R^b は、置換されていてもよい $\text{C}_1 \sim 6$ アルキル（例えばメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、t-ブチル、ビニル、エチニル、アリルまたはプロパルギル、好ましくはメチル）またはハロゲン（例えばF、BrまたはCl）であり、

R^c は、後続のヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合またはヒドロキシルであり、ただし、 $R^{a'}$ および R^c のうち的一方だけが、後続のヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合であり、

R^4 は、水素であり、および

R^e は、 $-\text{CH}_2-\text{O}-R^{e2}$ または $-\text{CH}=\text{CHR}^{e1}$ であって、ここで、 R^{e2} は水素または酸素保護基であり、および R^{e1} は $-\text{P}(\text{O})(\text{OR}^{e4})_2$ である。

【0028】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、式(I)のヌクレオシドは、式(IA)または(IB)のヌクレオシドであり、

式中、

Xは、Oであり、

$R^{a'}$ は、ハロゲン（例えばFまたはCl）、ヒドロキシル、置換されていてもよい $\text{C}_1 \sim 30$ アルコキシ（例えば $-(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ であって、ここで、nは1~21、例えば1、16であるか、あるいは $-(\text{CH}_2)_m-\text{NH}_2$ であって、ここで、mは2~10、例えば3または6であるか、あるいは $-(\text{CH}_2)_p-\text{OMe}$ であって、ここで、pは1~21、例えば1または2である）、または後続のヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合であり、

R^b は、置換されていてもよい $\text{C}_1 \sim 6$ アルキル（例えばメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、t-ブチル、ビニル、エチニル、アリルまたはプロパルギル、好ましくはメチル）であり、

R^c は、後続のヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合またはヒドロキシルであり、ただし、 $R^{a'}$ および R^c のうち的一方だけが、後続のヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合であり、

R^4 は、水素であり、および

R^d は、先行するヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合である。

【0029】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、式(I)のヌクレオシドは、式(IA)または(IB)のヌクレオシドであり、

式中、

Xは、Oであり、

$R^{a'}$ は、F、Clまたは置換されていてもよい $\text{C}_1 \sim 30$ アルコキシ（例えば $-(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ であって、ここで、nは1~21、例えば1、16であるか、あるいは $-(\text{CH}_2)_m-\text{NH}_2$ であって、ここで、mは2~10、例えば3または6であるか、あるいは $-(\text{CH}_2)_p-\text{OMe}$ であって、ここで、pは1~21、例えば1または2である）であり、

R^b は、置換されていてもよい $C_1\sim 6$ アルキル（例えばメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、*t*-ブチル、ビニル、エチニル、アリルまたはプロパルギル、好ましくはメチル）であり、

R^c は、後続のヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合またはヒドロキシルであり、

R^4 は、水素であり、および

R^d は、先行するヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合である。

【0030】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、式（I）のヌクレオシドは、式（IA）または（IB）のヌクレオシドであり、

10

式中、

X は、 O であり、

$R^{a'}$ は、 Cl または置換されていてもよい $C_1\sim 30$ アルコキシ（例えば $-(CH_2)_nCH_3$ であって、ここで、 n は1~21、例えば1、16であるか、あるいは $-(CH_2)_m-NH_2$ であって、ここで、 m は2~10、例えば3または6であるか、あるいは $-(CH_2)_p-OMe$ であって、ここで、 p は1~21、例えば1または2である）であり、

R^b は、置換されていてもよい $C_1\sim 6$ アルキル（例えばメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、*t*-ブチル、ビニル、エチニル、アリルまたはプロパルギル、好ましくはメチル）であり、

R^c は、後続のヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合またはヒドロキシルであり、

20

R^4 は、水素であり、および

R^d は、先行するヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合である。

【0031】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、式（I）のヌクレオシドは、式（IA）または（IB）のヌクレオシドであり、

式中、

X は、 O であり、

$R^{a'}$ は、ハロゲン（例えばF、BrまたはCl）であり、

R^b は、ハロゲン（例えばF、BrまたはCl）であり、

30

R^c は、後続のヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合またはヒドロキシルであり、

R^4 は、水素であり、および

R^d は、先行するヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合である。

【0032】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、式（I）のヌクレオシドは、式（IA）または（IB）のヌクレオシドであり、

式中、

X は、 O であり、

$R^{a'}$ は、ハロゲン（例えばF、BrまたはCl）、ヒドロキシル、置換されていてもよい $C_1\sim 30$ アルコキシ（例えば $-(CH_2)_nCH_3$ であって、ここで、 n は1~21、例えば1、16であるか、あるいは $-(CH_2)_m-NH_2$ であって、ここで、 m は2~10、例えば3または6であるか、あるいは $-(CH_2)_p-OMe$ であって、ここで、 p は1~21、例えば1または2である）、または後続のヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合であり、

40

R^b は、置換されていてもよい $C_1\sim 6$ アルキル（例えばメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、*t*-ブチル、ビニル、エチニル、アリルまたはプロパルギル、好ましくはメチル）またはハロゲン（例えばF、BrまたはCl）であり、

R^c は、後続のヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合またはヒドロキシルであり、ただし、 $R^{a'}$ および R^c のうちの一方だけが、後続のヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合であり、

50

R⁴は、水素であり、および

R^dは、先行するヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合である。

【0033】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、アンチセンス鎖は約17~42ヌクレオチド長であることができる。例えば、アンチセンス鎖は、少なくとも約17、例えば約18、約19、約20、約21、約22、約23、約24、約25、約26、約27、約28、約29、約30ヌクレオチド長、またはそれ以上である。本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、アンチセンス鎖は約19、約20、約21、約22、約23、約24、約25または約26ヌクレオチド長である。例えば、アンチセンス鎖は、約22、約23、約24または約25ヌクレオチド長である。

10

【0034】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、センス鎖は約15~40ヌクレオチド長であることができる。例えば、センス鎖は、少なくとも約15、約16、例えば約17、約18、約19、約20、約21、約22、約23、約24、約25、約26ヌクレオチド長、またはそれ以上である。本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、センス鎖は、約19、約20、約21、約22、約23、約24または約25ヌクレオチド長である。例えば、センス鎖は約21ヌクレオチド長である。

【0035】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、センス鎖は15ヌクレオチド長であり、アンチセンス鎖は18、19、20、21、または22（例えば20）ヌクレオチド長である。本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、センス鎖は19ヌクレオチド長であり、アンチセンス鎖は19、20、または21ヌクレオチド長である。本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、センス鎖は20ヌクレオチド長であり、アンチセンス鎖は20、21、または22ヌクレオチド長である。本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、センス鎖は21ヌクレオチド長であり、アンチセンス鎖は21、22、または23ヌクレオチド長である。本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、センス鎖は20~24（例えば22）ヌクレオチド長であり、アンチセンス鎖は34~38（例えば36）ヌクレオチド長である。

20

【0036】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、センス鎖は21ヌクレオチド長であり、アンチセンス鎖は22、23または25ヌクレオチド長である。

30

【0037】

本明細書記載のさまざまな局面のいくつかの態様において、二本鎖核酸（例えばdsRNA）の二本鎖領域は、少なくとも約18、例えば約19、約20、約21、約22、約23、約24、約25塩基対またはそれ以上、例えば約21塩基対の二本鎖領域であることができる。

【0038】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、アンチセンス鎖は約21、約22、約23、約24または約25ヌクレオチド長であり、センス鎖は約21ヌクレオチド長であり、dsRNAは、少なくとも18、例えば19、20または21塩基対、例えば21塩基対の二本鎖領域を含む。

40

【0039】

二本鎖核酸（例えばdsRNA）は、その末端に、平滑末端および/または一本鎖オーバーハングを含むことができる。例えば、二本鎖核酸（例えばdsRNA）は、アンチセンス鎖の5'端に平滑端を含むことができる。別の一例において、二本鎖核酸（例えばdsRNA）は、アンチセンス鎖の3'端に1~5（例えば1または2）ヌクレオチドの一本鎖オーバーハングを含むことができ、例えばアンチセンス鎖の3'端はセンス鎖の5'端を超えて延びる。

【0040】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、二本鎖核酸（例えばdsRNA）はアンチセンス鎖の5'端に平滑端を含み、アンチセンス鎖の3'端に1~5（例えば1または2）ヌクレオチドの一本鎖オーバーハングを含む。

50

【0041】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、二本鎖核酸（例えば dsRNA）は、少なくとも1個の、例えば2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれ以上の、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結部を含む。例えば二本鎖核酸（例えば dsRNA）は、少なくとも4個のホスホロチオエートヌクレオシド間連結部、例えば少なくとも6個のホスホロチオエートヌクレオシド間連結部または少なくとも8個のホスホロチオエートヌクレオシド間連結部を含む。

【0042】

ホスホロチオエートヌクレオシド間連結部は一方の鎖または両方の鎖中に存在できることに注意されたい。さらに、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結部は、鎖中のどこにでも存在することができる。例えば、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結部は、ストランドの一端に、ストランドの両端に、およびストランドの内部位置に、またはストランドの両端と内部位置とに存在することができる。好ましくは、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結部は鎖の両端に存在する。

【0043】

いくつかの態様において、アンチセンス鎖は、少なくとも1個の、例えば2、3、4個またはそれ以上の、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結部を含む。例えばアンチセンス鎖は、4つまたはそれ以上のホスホロチオエートヌクレオシド間連結部を含む。本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、アンチセンス鎖は、鎖の3'端から数えて位置1と2の間にホスホロチオエートヌクレオシド間連結部を含み、鎖の5'端から数えて位置1と2の間にホスホロチオエートヌクレオシド間連結部を含む。本明細書記載の局面のいずれか一つの他のいくつかのさらなる態様において、アンチセンス鎖は、鎖の3'端から数えて位置1と2の間および位置2と3の間にホスホロチオエートヌクレオシド間連結部を含み、鎖の5'端から数えて位置1と2の間にホスホロチオエートヌクレオシド間連結部を含む。本明細書記載の局面のいずれか一つの他のいくつかのさらなる態様において、アンチセンス鎖は、鎖の3'端から数えて位置1と2の間および位置2と3の間にホスホロチオエートヌクレオシド間連結部を含む。本明細書記載の局面のいずれか一つの他のいくつかのさらなる態様において、アンチセンス鎖は、鎖の3'端から数えて位置1と2の間および位置2と3の間および位置3と4の間にホスホロチオエートヌクレオシド間連結部を含み、鎖の5'端から数えて位置1と2の間にホスホロチオエートヌクレオシド間連結部を含む。本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、アンチセンス鎖は、鎖の3'端から数えて位置1と2の間にホスホロチオエートヌクレオシド間連結部を含み、鎖の5'端から数えて位置1と2の間および位置2と3の間にホスホロチオエートヌクレオシド間連結部を含む。本明細書記載の局面のいずれか一つの他のさらなる態様において、アンチセンス鎖は、鎖の3'端から数えて位置1と2の間にホスホロチオエートヌクレオシド間連結部を含み、鎖の5'端から数えて位置1と2の間、位置2と3の間および位置3と4の間にホスホロチオエートヌクレオシド間連結部を含む。

【0044】

アンチセンス鎖と同様に、センス鎖も、1つまたは複数の、例えば2つ、3つ、4つまたはそれ以上の、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結部を含むことができる。例えばセンス鎖は、鎖の5'端から数えて位置1と2の間にホスホロチオエートヌクレオシド間連結部を含む。本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、センス鎖は、鎖の5'端から数えて位置1と2の間および鎖の3'端から数えて位置1と2の間にホスホロチオエートヌクレオシド間連結部を含む。

【0045】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかのさらなる態様において、センス鎖は、鎖の5'端から数えて位置1と2の間および位置2と3の間にホスホロチオエートヌクレオシド間連結部を含む。例えば、センス鎖は、鎖の5'端から数えて位置1と2の間および位置2と3の間、ならびに鎖の3'端から数えて位置1と2の間および位置2と3の間にホスホロ

チオエートヌクレオシド間連結部を含む。

【0046】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、二本鎖核酸（例えばdsRNA）はリガンドを含む。例えばセンス鎖はそれに連結されたりガンドを含む。リガンドは、3'端のヌクレオチド、すなわち（3'端から数えて）位置1のヌクレオチド、または5'端のヌクレオチド、すなわち（5'端から数えて）位置1のヌクレオチドの、利用可能な任意の位置に連結できることに注意されたい。

【0047】

本明細書記載のさまざまな局面の態様はリガンドを含む。リガンドは、ペプチド、センチリン、抗体（例えば抗CD-4抗体および抗CD-117抗体）、抗体フラグメント、T細胞ターゲティングリガンド、B細胞ターゲティングリガンド、がん細胞ターゲティングリガンド（例えばDUPA、葉酸塩、およびRGD）、脾臓ターゲティング機能性、肺ターゲティング機能性、骨髄ターゲティング機能性、ファージディスプレイペプチド、細胞透過ペプチド（CPP）、インテグリンリガンド、多価アニオン性リガンド、多価カチオン性リガンド、一価および多価炭水化物（例えばGalNAc、マンノース、マンノース-6ホスフェート、ムコース（mucose）、およびムルコース（mlucose））、腎臓ターゲティングリガンド、BBB透過リガンド、脂質、ならびにアミノ酸（例えばL-アミノ酸、D-アミノ酸、およびβ-アミノ酸）からなる群より選択できることに注意されたい。本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、リガンドは一価または多価N-アセチルガラクトサミン（GalNAc）である。

【0048】

本明細書記載の二本鎖核酸（例えばdsRNA）は、1つまたは複数の追加の核酸修飾、例えば核酸塩基修飾、糖修飾、糖間連結部修飾、またはそれらの任意の組合せを含みうることに注意されたい。したがって、本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、二本鎖核酸（例えばdsRNA）は、少なくとも1個の、例えば2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれ以上の、2'-フルオロヌクレオチドを含む。例えば、アンチセンス鎖および/またはセンス鎖は、独立して、少なくとも1個の、例えば2、3、4、5個またはそれ以上の、2'-フルオロヌクレオチドを含む。

【0049】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、アンチセンス鎖は、アンチセンス鎖の5'端から数えて位置2、14および16に、2'-フルオロヌクレオチドを含む。例えば、アンチセンス鎖は、アンチセンス鎖の5'端から数えて位置2、6、14および16に、2'-フルオロヌクレオチドを含む。非限定的な別の一例において、アンチセンス鎖は、アンチセンス鎖の5'端から数えて位置2、6、9、14および16に、2'-フルオロヌクレオチドを含む。いくつかのさらなる例において、アンチセンス鎖は、アンチセンス鎖の5'端から数えて位置2、6、8、9、14および16に、2'-フルオロヌクレオチドを含む。

【0050】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、アンチセンス鎖は、アンチセンス鎖の5'端から数えて位置2、5、7、12、14および16に、2'-フルオロヌクレオチドを含む。

【0051】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、センス鎖は、センス鎖の5'端から数えて位置7、9および11に、またはセンス鎖の3'端から数えて位置11、13および15に、2'-フルオロヌクレオチドを含む。例えばセンス鎖は、センス鎖の5'端から数えて位置7、9、10および11に、またはセンス鎖の3'端から数えて位置11、12、13および15に、2'-フルオロヌクレオチドを含む。

【0052】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、センス鎖は、センス鎖の5'端から数えて位置9、10、および11に、またはセンス鎖の3'端から数えて位置11、12、および13に、2'-フルオロヌクレオチドを含む。

【0053】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、アンチセンス鎖は、アンチセンス鎖の5'端から数えて少なくとも位置2、14および16に、2'-フルオロヌクレオチドを含み、センス鎖は、センス鎖の5'端から数えて少なくとも位置7、9および11またはセンス鎖の3'端から数えて少なくとも位置11、13および15に、2'-フルオロヌクレオチドを含む。例えば、アンチセンス鎖は、アンチセンス鎖の5'端から数えて少なくとも位置2、6、14および16に、2'-フルオロヌクレオチドを含み、センス鎖は、センス鎖の5'端から数えて少なくとも位置7、9および11またはセンス鎖の3'端から数えて少なくとも位置11、13および15に、2'-フルオロヌクレオチドを含む。別の一例において、アンチセンス鎖は、アンチセンス鎖の5'端から数えて少なくとも位置2、6、9、14および16に、2'-フルオロヌクレオチドを含み、センス鎖は、センス鎖の5'端から数えて少なくとも位置7、9および11、またはセンス鎖の3'端から数えて少なくとも位置11、13および15に、2'-フルオロヌクレオチドを含む。さらなる別の一例において、アンチセンス鎖は、アンチセンス鎖の5'端から数えて少なくとも位置2、6、8、9、14および16に、2'-フルオロヌクレオチドを含み、センス鎖は、センス鎖の5'端から数えて少なくとも位置7、9および11、またはセンス鎖の3'端から数えて少なくとも位置11、13および15に、2'-フルオロヌクレオチドを含む。

10

【0054】

いくつかのさらなる非限定的な例において、アンチセンス鎖は、アンチセンス鎖の5'端から数えて少なくとも位置2、14および16に、2'-フルオロヌクレオチドを含み、センス鎖は、センス鎖の5'端から数えて少なくとも位置7、9および11またはセンス鎖の3'端から数えて少なくとも位置11、12、13および15に、2'-フルオロヌクレオチドを含む。例えば、アンチセンス鎖は、アンチセンス鎖の5'端から数えて少なくとも位置2、6、14および16に、2'-フルオロヌクレオチドを含み、センス鎖は、センス鎖の5'端から数えて少なくとも位置7、9、10および11またはセンス鎖の3'端から数えて少なくとも位置11、12、13および15に、2'-フルオロヌクレオチドを含む。別の一例において、アンチセンス鎖は、アンチセンス鎖の5'端から数えて少なくとも位置2、6、9、14および16に、2'-フルオロヌクレオチドを含み、センス鎖は、センス鎖の5'端から数えて少なくとも位置7、9、10および11またはセンス鎖の3'端から数えて少なくとも位置11、12、13および15に、2'-フルオロヌクレオチドを含む。さらなる別の一例において、アンチセンス鎖は、アンチセンス鎖の5'端から数えて少なくとも位置2、6、8、9、14および16に、2'-フルオロヌクレオチドを含み、センス鎖は、センス鎖の5'端から数えて少なくとも位置7、9、10および11、またはセンス鎖の3'端から数えて少なくとも位置11、12、13および15に、2'-フルオロヌクレオチドを含む。

20

30

【0055】

本明細書記載のdsRNAは、1個または複数個の、例えば2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれ以上の、2'-デオキシ（すなわち2'-HまたはDNA）ヌクレオチドを含むことができる。例えば、アンチセンス鎖および/またはセンス鎖は、独立して、少なくとも1個の、例えば2、3、4、5個またはそれ以上の、2'-デオキシ（すなわち2'-HまたはDNA）ヌクレオチドを含む。

40

【0056】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、アンチセンス鎖は、アンチセンス鎖の5'端から数えて位置2、5、7、および12に、DNAヌクレオチドを含む。本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、アンチセンス鎖は、アンチセンス鎖の5'端から数えて位置2、5、7、12、および14に、DNAヌクレオチドを含む。本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、アンチセンス鎖は、アンチセンス鎖の5'端から数えて位置2、5、7、12、14および16に、DNAヌクレオチドを含む。

【0057】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、アンチセンス鎖は、ア

50

ンチセンス鎖の5'端から数えて位置2、5、7、および12にDNAヌクレオチドを含み、アンチセンス鎖の位置14に2'-フルオロヌクレオチドを含む。

【0058】

本明細書記載のdsRNAは、1個または複数個の、例えば2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれ以上の、2'-OMeヌクレオチドを含むことができる。例えば、アンチセンス鎖および/またはセンス鎖は、独立して、少なくとも1個の、例えば2、3、4、5個またはそれ以上の、2'-OMeヌクレオチドを含む。本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、アンチセンス鎖中の残りのヌクレオチド、すなわち本明細書において指定した修飾以外はすべて、2'-OMeヌクレオチドである。同様に、本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、アンチセンス鎖中の残りのヌクレオチド、すなわち本明細書において指定した修飾以外はすべて、2'-OMeヌクレオチドである。

10

【0059】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、アンチセンス鎖は、その5'端に、ホスフェート基もしくはホスフェート類似体またはその誘導体を含む。例えば、アンチセンス鎖はその5'端に5'-ビニルホスホネートヌクレオチドを含む。例えば、アンチセンス鎖はその5'端に5'-E-ビニルホスファネート(vinylphosphanate)ヌクレオチドを含む。

【0060】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、dsRNAは、少なくとも1個の、例えば2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれ以上の、ロック核酸(LNA)ヌクレオチドまたは架橋型核酸(BNA)ヌクレオチドを含む。例えば、アンチセンス鎖および/またはセンス鎖は、独立して、少なくとも1個の、例えば2、3、4、5個またはそれ以上の、LNAまたはBNAヌクレオチドを含む。

20

【0061】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、dsRNAは、少なくとも1個の、例えば2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれ以上の、シクロヘキセン核酸(CeNA)ヌクレオチドを含む。例えば、アンチセンス鎖および/またはセンス鎖は、独立して、少なくとも1個の、例えば2、3、4、5個またはそれ以上の、CeNAヌクレオチドを含む。

30

【0062】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、dsRNAは、少なくとも1個の、例えば2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれ以上の、熱安定化修飾を含む。例えば、アンチセンス鎖および/またはセンス鎖は、独立して、少なくとも1個の、例えば2、3、4、5個またはそれ以上の、熱安定化修飾を含む。

【0063】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、dsRNAは、少なくとも1個の、例えば2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれ以上の、脱塩基ヌクレオチドを含む。例えば、アンチセンス鎖および/またはセンス鎖は、独立して、少なくとも1個の、例えば2、3、4、5個またはそれ以上の、脱塩基ヌクレオチドを含む。

40

【0064】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、dsRNAは、少なくとも1個の、例えば2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれ以上の、2'-デオキシヌクレオチドを含む。例えば、アンチセンス鎖および/またはセンス鎖は、独立して、少なくとも1個の、例えば2、3、4、5個またはそれ以上の、2'-デオキシヌクレオチドを含む。いくつかの態様において、アンチセンス鎖は、一本鎖オーバーハング中に1つまたは複数の、例えば1つ、2つまたはそれ以上の、2'-デオキシヌクレオチドを含む。

【0065】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、dsRNAは、少なくとも1個の、例えば2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれ以上の、非環式(例えば

50

アンロックト核酸 (UNA)、グリコール核酸 (GNA) または (S)-グリコール核酸 (S-GNA)) ヌクレオチドを含む。例えば、アンチセンスおよび/またはセンス鎖は、独立して、少なくとも1個の、例えば2、3、4、5個またはそれ以上の、UNAおよび/またはGNA ヌクレオチドを含む。

【0066】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、dsRNAは、少なくとも1個の、例えば2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれ以上の、熱不安定化修飾を含む。例えば、アンチセンスおよび/またはセンス鎖は、独立して、少なくとも1個の、例えば2、3、4、5個またはそれ以上の、熱不安定化修飾を含む。例示的な熱不安定化修飾として、脱塩基ヌクレオチド、2'-デオキシヌクレオチド、非環式ヌクレオチド (例えばUNA、GNAおよび (S)-GNA)、2'-5'連結ヌクレオチド (3'-RNA)、トレオースヌクレオチド (TNA)、2' gem Me/Fヌクレオチド、および他方の鎖中の相対するヌクレオチドとのミスマッチが挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

10

【0067】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、アンチセンス鎖は、アンチセンス鎖のシード領域 (すなわち5'端から位置2~9) に少なくとも1個の熱不安定化修飾を含む。例えば、アンチセンス鎖は、少なくとも、鎖の5'端から数えて位置6、7または8のうちの1つにおいて、熱不安定化修飾を含む。本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、アンチセンス鎖は、鎖の5'端から数えて位置7に、熱不安定化修飾を含む。

20

【0068】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、本明細書記載のオリゴヌクレオチドは、式 (I) および (II) の2'-ジェミナル置換ヌクレオチドのみを含む。

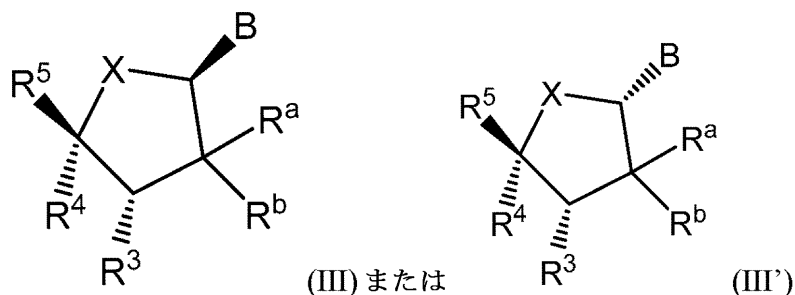
【0069】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、式 (I) および (II) の2'-ジェミナル置換ヌクレオチドのみを含み、オリゴヌクレオチドはリガンド、例えばオリゴヌクレオチドに連結された一価または多価N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) を、さらに含む。例えば、オリゴヌクレオチドは、式 (I) および (II) の2'-ジェミナル置換ヌクレオチドのみを含み、オリゴヌクレオチドはリガンド、例えばその3'端に連結された一価または多価N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) を、さらに含む。

30

【0070】

さらに別の一局面において、本明細書では、式 (III) または (III') の2'-ジェミナル置換ヌクレオチドまたはモノマー:



40

が提供される。

【0071】

式 (III) および (III') において、式中、

Xは、O、S、C (R^X)₂、またはN (R^X)_N であり、

各 R^X は、独立して、水素、ハロゲン、置換されていてもよいC₁~4アルキル、C₁~4ハロアルキル、置換されていてもよいC₂~4アルケニル、または置換されていてもよいC₂~4アルキニルであるか、あるいは両方の R^X が全体として=O、=S、=N (R^N)、ま

50

たは $=CH_2$ を形成し、

R^{XN} は、水素、置換されていてもよい $C_1\sim 30$ アルキル、置換されていてもよい $C_1\sim C_{30}$ アルコキシ、 $C_1\sim 4$ ハロアルキル、置換されていてもよい $C_2\sim 4$ アルケニル、置換されていてもよい $C_2\sim 4$ アルキニル、置換されていてもよい $C_1\sim 30$ アルキル- CO_2H 、または窒素保護基であり、

Bは、修飾されていてもよい核酸塩基であり、

R^a は、水素、ハロゲン、 $-OR^{a2}$ 、 $-SR^{a3}$ 、置換されていてもよい $C_1\sim 30$ アルキル、 $C_1\sim 30$ ハロアルキル、置換されていてもよい $C_2\sim 30$ アルケニル、置換されていてもよい $C_2\sim 30$ アルキニル、または置換されていてもよい $C_1\sim 30$ アルコキシ、アミノ(NH_2)、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、ジヘテロアリールアミノ、アミノ酸、 $-O(CH_2CH_2O)_mCH_2CH_2OR^{a4}$ 、シアノ、アルキル-チオ-アルキル、チオアルコキシ、シクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、 $-NH(CH_2CH_2NH)_nCH_2CH_2-R^{a5}$ 、 $NHC(O)R^{a4}$ 、脂質、脂質に共有結合で取り付けられたリンカー、リガンド、リガンドに共有結合で取り付けられたリンカー、固形支持体、固形支持体に共有結合で取り付けられたリンカー、または反応性リン基であり、

R^{a2} は、水素またはヒドロキシル保護基であり、

R^{a3} は、水素または硫黄保護基であり、

R^{a4} は、出現ごとに独立して、H、 $C_1\sim C_{30}$ アルキル、シクリル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アラルキル、糖または R^{a5} であり、

R^{a5} は、出現ごとに独立して、アミノ(NH_2)、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、またはジヘテロアリールアミノであり、

mは、1~50であり、

nは、1~50であり、

R^b は、置換されていてもよい $C_1\sim 30$ アルキル、置換されていてもよい $C_2\sim 30$ アルケニル、置換されていてもよい $C_2\sim 30$ アルキニル、またはハロゲンであり、

R^3 は、水素、ハロゲン、 $-OR^{c2}$ 、 $-SR^{c3}$ 、置換されていてもよい $C_1\sim 30$ アルキル、 $C_1\sim 30$ ハロアルキル、置換されていてもよい $C_2\sim 30$ アルケニル、置換されていてもよい $C_2\sim 30$ アルキニル、または置換されていてもよい $C_1\sim 30$ アルコキシ、アミノ(NH_2)、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、ジヘテロアリールアミノ、アミノ酸、 $-O(CH_2CH_2O)_rCH_2CH_2OR^{c4}$ 、シアノ、アルキル-チオ-アルキル、チオアルコキシ、シクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、 $-NH(CH_2CH_2NH)_sCH_2CH_2-R^{c5}$ 、 $NHC(O)R^{c4}$ 、脂質、脂質に共有結合で取り付けられたリンカー、リガンド、リガンドに共有結合で取り付けられたリンカー、固形支持体、固形支持体に共有結合で取り付けられたリンカー、または反応性リン基であり、

R^{c2} は、水素またはヒドロキシル保護基であり、

R^{c3} は、水素または硫黄保護基であり、

R^{c4} は、出現ごとに独立して、H、 $C_1\sim C_{30}$ アルキル、シクリル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アラルキル、糖または R^{c5} であり、

R^{c5} は、出現ごとに独立して、アミノ(NH_2)、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、またはジヘテロアリールアミノであり、

rは、1~50であり、

sは、1~50であり、

R^4 は、水素、置換されていてもよい $C_1\sim 6$ アルキル、置換されていてもよい $C_2\sim 6$ アルケニル、置換されていてもよい $C_2\sim 6$ アルキニル、または置換されていてもよい $C_1\sim 6$ アルコキシであるか、

あるいは、 R^4 および R^a は、全体として、 $4'-C(R^{a11}R^{a12})_v-Y-2'$ または $4'-Y-C(R$

$a^{11}R^{a^{12}})_v-2'$ であり、

Yは、 $-O-$ 、 $-CH_2-$ 、 $-CH(Me)-$ 、 $-C(CH_3)_2-$ 、 $-S-$ 、 $-N(R^{a^{13}})-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-N(R^{a^{13}})C(O)-$ 、または $-C(O)N(R^{a^{13}})-$ であり、

$R^{a^{11}}$ および $R^{a^{12}}$ は、独立して、H、置換されていてもよい $C_1\sim C_6$ アルキル、置換されていてもよい $C_2\sim C_6$ アルケニルまたは置換されていてもよい $C_2\sim C_6$ アルキニルであり、

$R^{a^{13}}$ は、水素、置換されていてもよい $C_1\sim C_{30}$ アルキル、置換されていてもよい $C_1\sim C_{30}$ アルコキシ、 $C_1\sim 4$ ハロアルキル、置換されていてもよい $C_2\sim 4$ アルケニル、置換されていてもよい $C_2\sim 4$ アルキニル、置換されていてもよい $C_1\sim C_{30}$ アルキル- CO_2H 、または窒素保護基であり、

vは、1、2または3であるか、

あるいは、 R^4 および R^c は、それらが取り付けられている原子と共に全体として、置換されていてもよい $C_3\sim 8$ シクロアルキル、置換されていてもよい $C_3\sim 8$ シクロアルケニル、または置換されていてもよい3～8員ヘテロシクリルを形成し、

R^5 は、置換されていてもよい $C_1\sim 6$ アルキル- R^{5a} 、置換されていてもよい $C_2\sim 6$ アルケニル- R^{5a} 、または置換されていてもよい $C_2\sim 6$ アルキニル- R^{5a} であり、

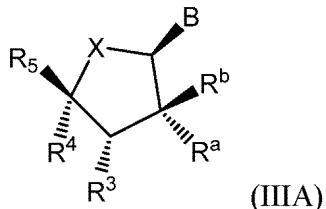
R^{5a} は、 $-OR^{5b}$ 、 $-SR^{5c}$ 、水素、リン基、リン(III) (phosphorous) 基、固形支持体、または固形支持体へのリンカーであり、ただし、 R^{3a} 、 R^3 および R^5 のうちの一つだけが、固形支持体への連結部であり、

R^{5b} は、Hまたはヒドロシル保護基であり、および

R^{5c} は、Hまたは硫黄保護基である。

【0072】

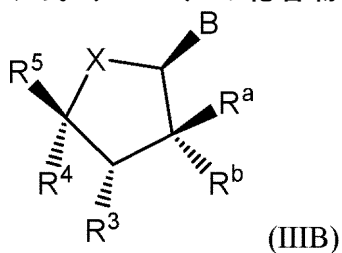
本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、式(III)の化合物は、式(IIIA)の化合物:



である。

【0073】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、式(III)の化合物は、式(IIIB')の化合物:



である。

【0074】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、式(III')の化合物は、式(IIIA')の化合物:

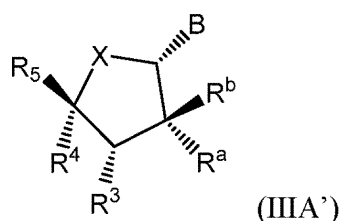
10

20

30

40

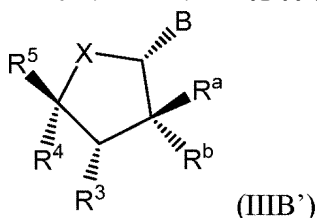
50



である。

【0075】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、式 (III') の化合物は、式 (IIIB') の化合物:



である。

【0076】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、式 (III) の化合物は、式 (IIIA) または (IIIB) の化合物であり、式中、

Xは、Oであり、

R^aは、ハロゲン (例えばFまたはCl)、ヒドロキシル、保護されたヒドロキシル、置換されていてもよいC₁~30アルコキシ (例えば-(CH₂)_nCH₃であって、ここで、nは1~21、例えば1、16であるか、あるいは-(CH₂)_m-NH₂であって、ここで、mは2~10、例えば3または6であるか、あるいは-(CH₂)_p-OMeであって、ここで、pは1~21、例えば1または2である)、反応性リン (III) 基 (例えば-OP (OR^P) N (R^{P2})₂ (例えば-OP (OCH₂CH₂CN) N (iPr)₂), -OP (SR^P) N (R^{P2})₂, -OP (O) (OR^P) N (R^{P2})₂, -OP (S) (OR^P) N (R^{P2})₂, -OP (O) (SR^P) N (R^{P2})₂, -OP (O) (OR^P) H, -OP (S) (OR^P) H, -OP (O) (SR^P) H, -OP (O) (OR^P) R^{P3}, -OP (S) (OR^P) R^{P3}, または-OP (O) (SR^P) R^{P3}), 固形支持体、または固形支持体に共有結合で取り付けられたリンカーであり、

R^bは、置換されていてもよいC₁~6アルキル (例えばメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、t-ブチル、ビニル、エチニル、アリルまたはプロパルギル、好ましくはメチル) であり、

R⁴は、水素であり、

R³は、反応性リン (III) 基 (例えば-OP (OR^P) N (R^{P2})₂ (例えば-OP (OCH₂CH₂CN) N (iPr)₂), -OP (SR^P) N (R^{P2})₂, -OP (O) (OR^P) N (R^{P2})₂, -OP (S) (OR^P) N (R^{P2})₂, -OP (O) (SR^P) N (R^{P2})₂, -OP (O) (OR^P) H, -OP (S) (OR^P) H, -OP (O) (SR^P) H, -OP (O) (OR^P) R^{P3}, -OP (S) (OR^P) R^{P3}, または-OP (O) (SR^P) R^{P3}), 固形支持体、固形支持体に共有結合で取り付けられたリンカー、ヒドロキシル、または保護されたヒドロキシルであり、ただし、R^aおよびR³のうちの1つだけが、反応性リン (III) 基 固形支持体、または固形支持体に共有結合で取り付けられたリンカーであり、および

R⁵は、-CH=CHR^{5a}であり、ここで、R^{5a}は-P (O) (OR^{5e})₂であり、および各R^{5e}は、独立して、水素、または置換されていてもよいC₁~30アルキルである。

【0077】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、式 (III) の化合物は、式 (IIIA) または (IIIB) の化合物であり、式中、

Xは、Oであり、

R^aは、F、Clまたは置換されていてもよいC₁~₃₀アルコキシ（例えば-(CH₂)_nCH₃であって、ここで、nは1~21、例えば1、16であるか、あるいは-(CH₂)_m-NH₂であって、ここで、mは2~10、例えば3または6であるか、あるいは-(CH₂)_p-OMeであって、ここで、pは1~21、例えば1または2である）であり、

R^bは、置換されていてもよいC₁~₆アルキル（例えばメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、t-ブチル、ビニル、エチニル、アリルまたはプロパルギル、好ましくはメチル）であり、

R⁴は、水素であり、

R³は、反応性リン（III）基（例えば、-OP(OR^P)N(R^{P2})₂（例えば-OP(OCH₂CH₂CN)N(iPr)₂）、-OP(SR^P)N(R^{P2})₂、-OP(O)(OR^P)N(R^{P2})₂、-OP(S)(OR^P)N(R^{P2})₂、-OP(O)(SR^P)N(R^{P2})₂、-OP(O)(OR^P)H、-OP(S)(OR^P)H、-OP(O)(SR^P)H、-OP(O)(OR^P)R^{P3}、-OP(S)(OR^P)R^{P3}、または-OP(O)(SR^P)R^{P3}）、固形支持体、固形支持体に共有結合で取り付けられたリンカー、ヒドロキシル、または保護されたヒドロキシルであり、および

R⁵は、-CH=CHR^{5a}であり、ここで、R^{5a}は-P(O)(OR^{5e})₂であり、および各R^{5e}は、独立して、水素、または置換されていてもよいC₁~₃₀アルキルである。

【0078】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、式（III）の化合物は、式（IIIA）または（IIIB）の化合物であり、式中、

Xは、Oであり、

R^aは、Clまたは置換されていてもよいC₁~₃₀アルコキシ（例えば-(CH₂)_nCH₃であって、ここで、nは1~21、例えば1、16であるか、あるいは-(CH₂)_m-NH₂であって、ここで、mは2~10、例えば3または6であるか、あるいは-(CH₂)_p-OMeであって、ここで、pは1~21、例えば1または2である）であり、

R^bは、置換されていてもよいC₁~₆アルキル（例えばメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、t-ブチル、ビニル、エチニル、アリルまたはプロパルギル、好ましくはメチル）であり、

R⁴は、水素であり、

R³は、反応性リン（III）基（例えば-OP(OR^P)N(R^{P2})₂（例えば-OP(OCH₂CH₂CN)N(iPr)₂）、-OP(SR^P)N(R^{P2})₂、-OP(O)(OR^P)N(R^{P2})₂、-OP(S)(OR^P)N(R^{P2})₂、-OP(O)(SR^P)N(R^{P2})₂、-OP(O)(OR^P)H、-OP(S)(OR^P)H、-OP(O)(SR^P)H、-OP(O)(OR^P)R^{P3}、-OP(S)(OR^P)R^{P3}、または-OP(O)(SR^P)R^{P3}）、固形支持体、固形支持体に共有結合で取り付けられたリンカー、ヒドロキシル、または保護されたヒドロキシルであり、および

R⁵は、-CH₂OR^{5b}または-CH=CHR^{5a}であり、ここで、R^{5b}はHまたはヒドロキシル保護基であり、およびR^{5a}は-P(O)(OR^{5e})₂であり、ここで、各R^{5e}は、独立して、水素、または置換されていてもよいC₁~₃₀アルキルである。

【0079】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、式（III）の化合物は、式（IIIA）または（IIIB）の化合物であり、式中、

Xは、Oであり、

R^aは、ハロゲン（例えばCl、BrまたはF）であり、

R^bは、ハロゲン（例えばCl、BrまたはF）であり、

R⁴は、水素であり、

R³は、反応性リン（III）基（例えば-OP(OR^P)N(R^{P2})₂（例えば-OP(OCH₂CH₂CN)N(iPr)₂）、-OP(SR^P)N(R^{P2})₂、-OP(O)(OR^P)N(R^{P2})₂、-OP(S)(OR^P)N(R^{P2})₂、-OP(O)(SR^P)N(R^{P2})₂、-OP(O)(OR^P)H、-OP(S)(OR^P)H、-OP(O)(SR^P)H、-OP(O)(OR^P)R^{P3}、-OP(S)(OR^P)R^{P3}、または-OP(O)(SR^P)R^{P3}）、固形支持体、固形支持体に共有結合で取り付け

けられたリンカー、ヒドロキシル、または保護されたヒドロキシルであり、および

R^5 は、 $-\text{CH}_2\text{OR}^{5b}$ または $-\text{CH}=\text{CHR}^{5a}$ であり、ここで、 R^{5b} は H またはヒドロキシル保護基であり、および R^{5a} は $-\text{P}(\text{O})(\text{OR}^{5e})_2$ であり、ここで、各 R^{5e} は、独立して、水素、または置換されていてもよい $\text{C}_1\sim 30$ アルキルであり、

ただし、 R^5 が $-\text{CH}_2\text{OR}^{5b}$ である場合、(a) 核酸塩基 B はウラシルではないか、または (b) R^a および R^b の両方が F であることはない。

【0080】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、式 (III') の化合物は、式 (IIIA') または (IIIB') の化合物であり、式中、

X は、O であり、

R^a は、ハロゲン (例えば F、Br または Cl)、ヒドロキシル、保護されたヒドロキシル、置換されていてもよい $\text{C}_1\sim 30$ アルコキシ (例えば $-(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ であって、ここで、n は 1~21、例えば 1、16 であるか、あるいは $-(\text{CH}_2)_m-\text{NH}_2$ であって、ここで、m は 2~10、例えば 3 または 6 であるか、あるいは $-(\text{CH}_2)_p-\text{OMe}$ であって、ここで、p は 1~21、例えば 1 または 2 である)、反応性リン (III) 基 (例えば $-\text{OP}(\text{OR}^p)\text{N}(\text{R}^{p2})_2$ (例えば $-\text{OP}(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN})\text{N}(\text{iPr})_2$)、 $-\text{OP}(\text{SR}^p)\text{N}(\text{R}^{p2})_2$ 、 $-\text{OP}(\text{O})(\text{OR}^p)\text{N}(\text{R}^{p2})_2$ 、 $-\text{OP}(\text{S})(\text{OR}^p)\text{N}(\text{R}^{p2})_2$ 、 $-\text{OP}(\text{O})(\text{SR}^p)\text{N}(\text{R}^{p2})_2$ 、 $-\text{OP}(\text{O})(\text{OR}^p)\text{H}$ 、 $-\text{OP}(\text{S})(\text{OR}^p)\text{H}$ 、 $-\text{OP}(\text{O})(\text{SR}^p)\text{H}$ 、 $-\text{OP}(\text{O})(\text{OR}^p)\text{R}^{p3}$ 、 $-\text{OP}(\text{S})(\text{OR}^p)\text{R}^{p3}$ 、または $-\text{OP}(\text{O})(\text{SR}^p)\text{R}^{p3}$)、固形支持体、固形支持体に共有結合で取り付けられたリンカーであり、

R^b は、置換されていてもよい $\text{C}_1\sim 6$ アルキル (例えばメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、t-ブチル、ビニル、エチニル、アリルまたはプロパルギル、好ましくはメチル)、またはハロゲン (例えば F、Br または Cl) であり、

R^4 は、水素であり、

R^3 は、反応性リン (III) 基 (例えば $-\text{OP}(\text{OR}^p)\text{N}(\text{R}^{p2})_2$ (例えば $-\text{OP}(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN})\text{N}(\text{iPr})_2$)、 $-\text{OP}(\text{SR}^p)\text{N}(\text{R}^{p2})_2$ 、 $-\text{OP}(\text{O})(\text{OR}^p)\text{N}(\text{R}^{p2})_2$ 、 $-\text{OP}(\text{S})(\text{OR}^p)\text{N}(\text{R}^{p2})_2$ 、 $-\text{OP}(\text{O})(\text{SR}^p)\text{N}(\text{R}^{p2})_2$ 、 $-\text{OP}(\text{O})(\text{OR}^p)\text{H}$ 、 $-\text{OP}(\text{S})(\text{OR}^p)\text{H}$ 、 $-\text{OP}(\text{O})(\text{SR}^p)\text{H}$ 、 $-\text{OP}(\text{O})(\text{OR}^p)\text{R}^{p3}$ 、 $-\text{OP}(\text{S})(\text{OR}^p)\text{R}^{p3}$ 、または $-\text{OP}(\text{O})(\text{SR}^p)\text{R}^{p3}$)、固形支持体、固形支持体に共有結合で取り付けられたリンカー、ヒドロキシル、または保護されたヒドロキシルであり、ただし、 R^a および R^3 のうちの一方だけが、反応性リン (III) 基、固形支持体、または固形支持体に共有結合で取り付けられたリンカーであり、および

R^5 は、 $-\text{CH}_2\text{OR}^{5b}$ または $-\text{CH}=\text{CHR}^{5a}$ あり、ここで、 R^{5b} は H またはヒドロキシル保護基であり、および R^{5a} は $-\text{P}(\text{O})(\text{OR}^{5e})_2$ であり、ここで、各 R^{5e} は、独立して、水素、または置換されていてもよい $\text{C}_1\sim 30$ アルキルである。

【0081】

別の一局面において、本明細書では、対象における標的遺伝子の発現を阻害または低減するための方法が提供される。本方法は、(i) 第1鎖が標的遺伝子に相補的である、本明細書記載の二本鎖核酸 (例えば dsRNA)、および/または (ii) 標的遺伝子に相補的である、本明細書記載のオリゴヌクレオチドを、対象に投与する工程を含む。

【図面の簡単な説明】

【0082】

【図1】図1は、いくつかの例示的な式 (III) の化合物に関する合成スキームである。

【図2】図2は、いくつかの例示的な式 (III) の化合物に関する合成スキームである。

【図3】図3は、いくつかの例示的な式 (III) の化合物に関する合成スキームである。

【図4】図4は、いくつかの例示的な式 (III) の化合物に関する合成スキームである。

【図5】図5は、いくつかの例示的な式 (III) の化合物に関する合成スキームである。

【図6】図6は、いくつかの例示的な式 (III) の化合物に関する合成スキームである。

【図7】図7は、いくつかの例示的な式 (III) の化合物に関する合成スキームである。

【図8】図8は、いくつかの例示的な式 (III) の化合物に関する合成スキームである。

【図 9】図 9 は、いくつかの例示的な式 (III) の化合物に関する合成スキームである。

【図 10】図 10 は、いくつかの例示的な式 (III) の化合物に関する合成スキームである。

【図 11】図 11 は、いくつかの例示的な式 (III) の化合物に関する合成スキームである。

【図 12】図 12 は、いくつかの例示的な式 (III) の化合物に関する合成スキームである。

【図 13】図 13 は、いくつかの例示的な式 (III) の化合物に関する合成スキームである。

【図 14】図 14 は、いくつかの例示的な式 (III) の化合物に関する合成スキームである。

10

【図 15】図 15 は、いくつかの例示的な式 (III) の化合物に関する合成スキームである。

【図 16】図 16 は、抗ウイルス HCV 薬ソホスブビルおよび活性代謝産物の構造を示しており、ここで研究された修飾 2'-F/Me ウリジン ($U_{F/Me}$) およびシチジン ($C_{F/Me}$) ならびに対応する 5'-ビニルホスホネート異性体 (E-VP- $U_{F/Me}$ および Z-VP- $U_{F/Me}$) は、これに着想を得た。

【図 17】図 17A~図 17D は、(図 17A) Ttr、(図 17B) Pten、(図 17C) F7 を標的とする完全 2'-修飾 siRNA のインビトロ効力を示している。実験条件については表 8 を参照されたい。2'-F および 2'-OMe ヌクレオチドを、それぞれ緑色または黒色の丸として表す。黄色のバーは、PS 連結部を表し、VP は 5'-(E)-ビニルホスホネートであり、zVP は 5'-(Z)-ビニルホスホネートである。エラーバーは平均からの標準偏差を示す。

20

【図 18】図 18A および図 18B は、AS7 への組み入れによる、シードが媒介するオフターゲット活性の軽減を示す。図 18A) オンターゲット効果およびオフターゲット効果を、二重ルシフェラーゼレポーターアッセイで評価した。ルシフェラーゼレポータープラスミドを表示の siRNA と共に COS-7 細胞にコトランスフェクトした。細胞を 48 時間後に回収し、ルシフェラーゼ活性をアッセイした。各 siRNA 濃度におけるウミシイタケルシフェラーゼとホタルルシフェラーゼのシグナルの比を、siRNA 非存在下での比で割ることによって、標的残存率を算出した。図 18B) 初代ラット肝細胞における転写調節異常。初代ラット肝細胞に 50 nM の表示の siRNA をトランスフェクトした。上側のパネルは、親 (si19) であり、下側のパネルは修飾体 (si20) である。48 時間後に、RNA-seq 解析のために全 RNA を単離した。ドットは、個々のラット転写産物、それらの平均リードカウント、およびモックトランスフェクション対照と比較した発現変化のレベルを表す。灰色のドットは siRNA 処置後に対照との比較で発現変動がなかった遺伝子を表し、青色と赤色のドットは、それぞれシード領域へのカノニカル miRNA マッチ (8 マー、7 マー-A1、7 マー-m8)⁵⁴ があるまたはない、発現変動遺伝子 (偽陽性率 < 0.05) を表す。Ttr のオンターゲットノックダウンは、丸で囲んだドットで示されている。Log2 倍率変化および累積分布プロットをそれぞれ左側と右側に示す。

30

【図 19】図 19A~図 19D は、インビボ活性に対する 2'-F/Me 修飾の影響を示している。図 19A および図 19B) C57BL/6 マウス (n=3) に、1 mg/kg (ピンク色) または 3 mg/kg (灰色) の、図 19A) F7 標的 siRNA を LNP 製剤として静脈内に単回投与するか、または図 1B) F7 標的 GalNAc コンジュゲート siRNA を皮下に単回投与した。対照動物には PBS を投与した。血清 F7 タンパク質レベルを、親の最下点 (parent nadir)、すなわち LNP 製剤の場合は 48 時間、GalNAc コンジュゲートの場合は 10 日において測定した。図 19C および図 19D) C57BL/6 マウス (n=3) に、1 mg/kg の表示の TTR 標的 siRNA を単回投与し、血清タンパク質レベルを 28 日目までモニターした。2'-F、2'-OMe、デオキシリボヌクレオチド、およびリボヌクレオチドが、それぞれ緑色、黒色、青色および赤色の丸で表されている。黄色のバーは PS 連結部を表す。データ点は投与前の F7 または TTR のレベルに正規化されており、値は群平均 ± SD である。

40

【図 20】図 20A は、2'-F-修飾 RNA A 型二重鎖中の単一ヌクレオチドへの 2'-β-C-Me

50

チル基の導入の結果として起こる立体衝突 (steric clash) を図解している (PDB ID 3P4A)⁶³。図20B 分子力学によるエネルギー最小化後は、メチル基とその最近接原子との間の衝突はないが、ウリジン間のスタッキングは失われている。メチルの炭素原子と水素原子はそれぞれ黄色と白色に着色されており、フッ素原子は薄緑色である。ショートコンタクト (short contact) は矢印で示されている。ワトソン・クリック水素結合とその他の選ばれた距離は薄い実線で示されており、バックボーンねじれ角 (backbone torsion angle) 範囲は図20Aに描かれている。

【図21】図21A～図21Dは、ヒトAgo2に結合したsiRNAアンチセンス鎖に組み入れられた、アンチセンス鎖の (図21A) 位置1、(図21B) 位置2、(図21C) 位置6、および (図21D) 位置7の、ヒトAgo2に結合したsiRNAガイド鎖に組み入れられた2'-F/Meヌクレオチドのモデル化されたコンフォメーションである。メチルの炭素原子と水素原子はそれぞれ黄色と白色に着色されており、フッ素原子は薄緑色である。ショートコンタクトは矢印で示されている。ヒトAgo2:miR-20a複合体の結晶構造 (PDB ID 4F3T)⁵³に見られるアンチセンス鎖の初期コンフォメーションは、薄い黒色の線で示されている。ポテンシャル的に有利なコンタクト (potentially favorable contact) が図21Dに破線で示されている。

【図22】図22A～図22Cは、Ago2 MIDドメインに結合したAS1におけるVP-2'-F/Me修飾ヌクレオチドのモデルである。(図22A) C2'エンド糖コンフォメーションを持つE-VP;炭素原子は紫色に着色されている。(図22B) O4'エンド糖コンフォメーションを持つZ-VP;炭素原子は水色に着色されている。(図22C) E-VPヌクレオチドとZ-VPヌクレオチドの重ね合わせ。2つのリン原子間の距離 (1.85 Å) は両矢印 (double arrow) で示されている。VP部分、2'-F (薄緑色) および2'-Me炭素 (黄色) は球棒 (ball-and-stick) モードで強調されており、塩橋と水素結合は薄い実線で描かれ、選ばれたAgo2側鎖にラベルが付されている。

【図23】図23Aおよび図23Bは、2'-F/Me修飾オリゴヌクレオチドによる、エキソヌクレアーゼ分解に対する改良された耐性の源泉を示している。(図23A) キイロショウジョウバエ (*D.melanogaster*) Xrn1 5'-エキソリボヌクレアーゼの活性部位に結合した、2つの5'末2'-F/Me-U残基 (シアン色の炭素) を有するオリゴ (dT) (黄色の炭素) のモデル。(図23B) 大腸菌 (*E.coli*) DNAポリメラーゼIクレノウフラグメント3'-エキソヌクレアーゼの活性部位に結合した、2つの3'末2'-F/Me-U残基 (シアン色の炭素) を有するオリゴ (dT) (黄色の炭素) のモデル。2'-Me炭素原子とリン原子の間の距離がオレンジ色の矢印で示されている。2'-Me炭素と選ばれたタンパク質およびDNA原子との間の距離が黒色の矢印で示されている。2'-F (薄緑色)、2'-Me炭素 (黄色)、リン (オレンジ色)、非架橋ホスフェート酸素 (赤色) および金属イオンが、棒球モードで強調されている。塩橋と水素結合は薄い実線で描かれ、金属イオン配位圏は破線で描かれ、選ばれたXrna1およびクレノウフラグメント側鎖にラベルが付されている。水分子は、触媒金属イオンに配位しているものを除いて、すべて省略されている。

【図24】図24A～図24Dは、6.8×PBS ([NaCl] = 931.6 mM、[KCl] = 18.4 mM、[Na₂HPO₄] = 68 mM、[KH₂PO₄] = 12.2 mM、pH7.4) における修飾二重鎖 (2.5 μM) の熱変性 (T_m) 曲線である。

【図25】図25A～図25Dは、3'エキソヌクレアーゼ存在下での修飾オリゴヌクレオチドの曲線である。オリゴヌクレオチド (0.1 mg/mL) を150 mU/mL SVPDと共に50 mM Tris、pH7.2、10 mM MgCl₂中でインキュベートし、完全長産物をIEX-HPLCによってモニターした。ON13 (X) = dT₁₉X-3'、ON14 (X) = dT₁₈XdT、ON15 (X) = dT₁₈X₂、ON16 (X) = dT₁₈X・dT-3'、ON17 (X) = dT₁₈・X-3'、ON18 (X) = dT₁₈X・X-3'、PS連結部 = ・。

【図26】図26A～図26Dは、5'エキソヌクレアーゼ存在下での修飾オリゴヌクレオチドの分解曲線である。オリゴヌクレオチド (0.1 mg/mL) をPD II (500 mU/mL) と共に、10 mM MgCl₂を含む50 mM酢酸ナトリウム緩衝液 (pH6.5) 中でインキュベートし、IEX-HPLCによってモニターした。ON19 (X) = 5'-XdT₁₉、ON20 (X) = 5'-d

$TXdT_{18}$ 、 $ON21(X) = 5'-X_2dT_{18}$ 、 $ON16(X) = dT_{18}X \cdot dT-3'$ 、 $ON17(X) = dT_{18} \cdot X-3'$ 、 $ON18(X) = dT_{18}X \cdot X-3'$ 、PS連結部 = $\cdot$ 。

【図27】図27は、ラット肝臓ホモジネートにおける37℃で24時間のインキュベーション後のインビトロ代謝安定性を示している。矢印は、LC-MSによって観察された鎖のパーセンテージを表し、ここで、矢筈方向 (tail direction) は観察されたフラグメントを表す。緑色の球 = 2'-Fヌクレオチド、黒色の球 = 2'-OMeヌクレオチド、およびピンク色の球 = 2'-F/Meウリジン、VP = 5'-(E)-ビニルホスホネート、zVP = 5'-(Z)-ビニルホスホネート。

【図28】図28は、TTR mRNAを標的とするsiRNAの IC_{50} 値を決定するための近似用量応答曲線である。

【図29】図29は、PTEN mRNAを標的とするsiRNAの IC_{50} 値を決定するための近似用量応答曲線である。

【図30】図30は、FVII mRNAを標的とするsiRNAの IC_{50} 値を決定するための近似用量応答曲線である。

【図31】図31は、インビボ活性に対する2'-F/Me修飾の影響を示している。ApoBターゲティングsiRNAを10mg/kgで投与し、標的遺伝子の相対的mRNA発現を、7日目の肝臓組織から、qPCRによって算出した。2'-F、2'-OMe、デオキシリボヌクレオチド、およびリボヌクレオチドが、それぞれ緑色、黒色、青色および赤色の円として表されている。黄色のバーはPS連結部を表し、VPは5'-(E)-ビニルホスホネートである。データ点は、投与前のApoBレベルに正規化されており、値は群平均 $\pm$ SDを表す。

【図32】図32は、2'-F/Me修飾ヌクレオチドを組み入れるためのPOLGの不安定性の源泉を示す模式図である。三元POLG・DNA・dCTP Mg^{2+} 複合体の結晶構造 (PDB ID 4ZTZ) 中の活性部位が示されている。テンプレート (ピンク色の炭素原子) とプライマー (シアン色の炭素原子) によって形成される二重鎖の副溝を見ている。2'-F/Me CMP (紫色の炭素原子) が、入ってくるdCTP (金色の炭素原子) に重ねられている。2つの Mg^{2+} イオンが灰色の球としてバックグラウンドに見えている。2'-F/Meメチル炭素 (黄色で強調されている) とTyr-951環の質量中心 (黒いドット) との間の2.78 Åという距離は、ショートコンタクトを示している (メチル基のvdW半径2 Åとフェニル炭素のvdW半径1.5 Åの和は3.5 Åである)。選ばれた距離が薄い実線で示されている。

【図33A】図33Aおよび図33Bは、いくつかの例示的化合物に関する合成スキームである。

【図33B】図33Aの説明を参照のこと。

【図34】図34は、例示的ヌクレオシドビルディングブロックを使った治療的有用性のためのp-オリゴヌクレオチドの模式図である。図示するように、任意の数のビルディングブロックをオリゴヌクレオチドとして集合させ、選ばれたリガンド (例えばTriGalNAc) に取り付けることができる。例えば、HCVのための、肝臓の肝細胞への送達における、シトシン核酸塩基を有する2'-gem Me/F化合物。同様に、ゲムシタピンを例えば肝細胞癌に送達することができる。

【発明を実施するための形態】

【0083】

詳細な説明

上記の概説および以下の詳細な説明は、単なる例示および解説であって、特許請求の範囲に記載される発明の限定ではないことを理解すべきである。本明細書において、単数形の使用は、別段の具体的言明がある場合を除き、複数形を包含する。本明細書における「または」の使用は、別段の言明がある場合を除き、「および/または」を意味する。さらにまた、「including」(を含む)ならび他の形態、例えば「includes」および「included」という用語の使用は、限定ではない。また、「要素」または「構成要素」などの用語は、別段の具体的言明がある場合を除き、1つの単位を含む要素および構成要素も、2つ以上の亜単位を含む要素および構成要素も、どちらも包含する。

【0084】

本明細書において使用されるセクション見出しには構成上の目的しかなく、記載されている主題を限定すると解釈してはならない。本願において言及される文書または文書の一部は、例えば特許、特許出願、論文、書籍および専門書を含めていずれも、ここに、参照により、その全体があらゆる目的で、明確に組み入れられるものとする。

【0085】

X

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、Xは、O、S、C(R^X)₂、またはN(R^XN)である。XがC(R^X)₂である場合、各R^Xは、独立して、水素、ハロゲン、置換されていてもよいC₁~4アルキル、C₁~4ハロアルキル、置換されていてもよいC₂~4アルケニル、または置換されていてもよいC₂~4アルキニルであるか、あるいは両方のR^Xが全体として、=O、=S、=N(R^XN)、または=CH₂を形成する。例えば、XはOである。XがN(R^XN)である場合、R^XNは、水素、置換されていてもよいC₁~30アルキル、置換されていてもよいC₁~C₃₀アルコキシ、C₁~4ハロアルキル、置換されていてもよいC₂~4アルケニル、置換されていてもよいC₂~4アルキニル、置換されていてもよいC₁~30アルキル-CO₂H、または窒素保護基である。

10

【0086】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、XはOである。

【0087】

核酸塩基

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、BはHまたは核酸塩基である。核酸塩基は天然、非天然および/または修飾核酸塩基であることができる点に注意されたい。例示的な天然核酸塩基には、アデニン、シトシン、グアニン、チミン、およびウラシルが含まれるが、それらに限定されるわけではない。「非天然核酸塩基」とは、アデニン、グアニン、シトシン、ウラシルまたはチミン以外の核酸塩基を意味する。例示的な非天然核酸塩基には、イノシン、キサントシン、ヒポキサントシン、ヌブラリン(nubularine)、イソグアニシン(isoguanisine)、ツベルシジン、ならびにアデニン、グアニン、シトシンおよびウラシルの置換類似体または修飾類似体、例えば2-アミノアデニンならびにアデニンおよびグアニンのその他のアルキル誘導体、アデニンおよびグアニンの2-プロピルその他のアルキル誘導体、5-ハロウラシルおよび5-ハロシトシン、5-プロピニルウラシルおよび5-プロピニルシトシン、6-アゾウラシル、6-アゾシトシンおよび6-アゾチミン、5-ウラシル(シュードウラシル)、4-チオウラシル、5-ハロウラシル、5-(2-アミノプロピル)ウラシル、5-アミノアリルウラシル、8-ハロ、アミノ、チオール、チオアルキル、ヒドロキシルその他の8-置換アデニンおよび同8-置換グアニン、5-トリフルオロメチルその他の5-置換ウラシルおよび同5-置換シトシン、7-メチルグアニン、5-置換ピリミジン、6-アザピリミジンならびにN-2、N-6およびO-6置換プリン、例えば2-アミノプロピルアデニン、5-プロピニルウラシルおよび5-プロピニルシトシン、ジヒドロウラシル、3-デアザ-5-アザシトシン、2-アミノプリン、5-アルキルウラシル、7-アルキルグアニン、5-アルキルシトシン、7-デアザアデニン、N6,N6-ジメチルアデニン、2,6-ジアミノプリン、5-アミノ-アリル-ウラシル、N3-メチルウラシル、置換1,2,4-トリアゾール、2-ピリジノン、5-ニトロインドール、3-ニトロピロール、5-メトキシウラシル、ウラシル-5-オキシ酢酸、5-メトキシカルボニルメチルウラシル、5-メチル-2-チオウラシル、5-メトキシカルボニルメチル-2-チオウラシル、5-メチルアミノメチル-2-チオウラシル、3-(3-アミノ-3カルボキシプロピル)ウラシル、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N⁴-アセチルシトシン、2-チオシトシン、N6-メチルアデニン、N6-イソペンチルアデニン、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデニン、N-メチルグアニン、またはO-アルキル化塩基があるが、それらに限定されるわけではない。さらなるプリン類およびピリミジン類には、米国特許第3,687,808号に開示されているもの、Concise Encyclopedia of Polymer Science and Engineering, Kroschwitz, J.I. 編、John Wiley & Sons, 1990の858~859頁に開示されているもの、および Englisch et al., Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613が開

20

30

40

50

示しているものがあり、これらすべての内容は参照により本明細書に組み入れられる。

【0088】

いくつかの態様において、非天然核酸塩基は、イノシン、キサンチン、ヒポキサンチン、ヌブラリン、イソグアニシン、ツベルシジン、2-（ハロ）アデニン、2-（アルキル）アデニン、2-（プロピル）アデニン、2-（アミノ）アデニン、2-（アミノアルキル）アデニン、2-（アミノプロピル）アデニン、2-（メチルチオ）-N⁶-（イソペンテニル）アデニン、7-（デアザ）アデニン、8-（アルケニル）アデニン、8-（アルキル）アデニン、8-（アルキニル）アデニン、8-（アミノ）アデニン、8-（ハロ）アデニン、8-（ヒドロキシル）アデニン、8-（チオアルキル）アデニン、8-（チオール）アデニン、N⁶-（イソペンチル）アデニン、N⁶-（メチル）アデニン、N⁶,N⁶-（ジメチル）アデニン、2-（アルキル）グアニン、2-（プロピル）グアニン、6-（アルキル）グアニン、6-（メチル）グアニン、7-（アルキル）グアニン、7-（メチル）グアニン、7-（デアザ）グアニン、8-（アルキル）グアニン、8-（アルケニル）グアニン、8-（アルキニル）グアニン、8-（アミノ）グアニン、8-（ハロ）グアニン、8-（ヒドロキシル）グアニン、8-（チオアルキル）グアニン、8-（チオール）グアニン、N-（メチル）グアニン、2-（チオ）シトシン、3-（デアザ）シトシン、5-（アザ）シトシン、3-（アルキル）シトシン、3-（メチル）シトシン、5-（アルキル）シトシン、5-（アルキニル）シトシン、5-（ハロ）シトシン、5-（メチル）シトシン、5-（プロピニル）シトシン、5-（プロピニル）シトシン、5-（トリフルオロメチル）シトシン、6-（アゾ）シトシン、N⁴-（アセチル）シトシン、3-（3-アミノ-3-カルボキシプロピル）ウラシル、2-（チオ）ウラシル、5-（メチル）-2-（チオ）ウラシル、5-（メチルアミノメチル）-2-（チオ）ウラシル、4-（チオ）ウラシル、5-（メチル）-4-（チオ）ウラシル、5-（メチルアミノメチル）-4-（チオ）ウラシル、5-（メチル）-2,4-（ジチオ）ウラシル、5-（メチルアミノメチル）-2,4-（ジチオ）ウラシル、5-（2-アミノプロピル）ウラシル、5-（アルキル）ウラシル、5-（アルキニル）ウラシル、5-（アリルアミノ）ウラシル、5-（アミノアリル）ウラシル、5-（アミノアルキル）ウラシル、5-（グアニジニウムアルキル）ウラシル、5-（1,3-ジアゾール-1-アルキル）ウラシル、5-（シアノアルキル）ウラシル、5-（ジアルキルアミノアルキル）ウラシル、5-（ジメチルアミノアルキル）ウラシル、5-（ハロ）ウラシル、5-（メトキシ）ウラシル、ウラシル-5-オキシ酢酸、5-（メトキシカルボニルメチル）-2-（チオ）ウラシル、5-（メトキシカルボニル-メチル）ウラシル、5-（プロピニル）ウラシル、5-（プロピニル）ウラシル、5-（トリフルオロメチル）ウラシル、6-（アゾ）ウラシル、ジヒドロウラシル、N³-（メチル）ウラシル、5-ウラシル（すなわちシュードウラシル）、2-（チオ）シュードウラシル、4-（チオ）シュードウラシル、2,4-（ジチオ）シュードウラシル、5-（アルキル）シュードウラシル、5-（メチル）シュードウラシル、5-（アルキル）-2-（チオ）シュードウラシル、5-（メチル）-2-（チオ）シュードウラシル、5-（アルキル）-4-（チオ）シュードウラシル、5-（メチル）-4-（チオ）シュードウラシル、5-（アルキル）-2,4-（ジチオ）シュードウラシル、5-（メチル）-2,4-（ジチオ）シュードウラシル、1-置換シュードウラシル、1-置換2（チオ）-シュードウラシル、1-置換4-（チオ）シュードウラシル、1-置換2,4-（ジチオ）シュードウラシル、1-（アミノカルボニルエチレニル）-シュードウラシル、1-（アミノカルボニルエチレニル）-2（チオ）-シュードウラシル、1-（アミノカルボニルエチレニル）-4-（チオ）シュードウラシル、1-（アミノカルボニルエチレニル）-2,4-（ジチオ）シュードウラシル、1-（アミノアルキルアミノカルボニルエチレニル）-シュードウラシル、1-（アミノアルキルアミノカルボニルエチレニル）-2（チオ）-シュードウラシル、1-（アミノアルキルアミノカルボニルエチレニル）-4-（チオ）シュードウラシル、1-（アミノアルキルアミノカルボニルエチレニル）-2,4-（ジチオ）シュードウラシル、1,3-（ジアザ）-2-（オキソ）-フェノキサジン-1-イル、1-（アザ）-2-（チオ）-3-（アザ）-フェノキサジン-1-イル、1,3-（ジアザ）-2-（オキソ）-フェンチアジン-1-イル、1-（アザ）-2-（チオ）-3-（アザ）-フェンチアジン-1-イル、7-置換1,3-（ジアザ）-2-（オキソ）-フェノキサジン-1-イル、7-置換1-（アザ）-2-（チオ）-3-（アザ）-フェノキサジン-1

10

20

30

40

50

-イル、7-置換1,3- (ジアザ) -2- (オキソ) -フェンチアジン-1-イル、7-置換1- (アザ) -2- (チオ) -3- (アザ) -フェンチアジン-1-イル、7- (アミノアルキルヒドロキシ) -1,3- (ジアザ) -2- (オキソ) -フェノキサジン-1-イル、7- (アミノアルキルヒドロキシ) -1- (アザ) -2- (チオ) -3- (アザ) -フェノキサジン-1-イル、7- (アミノアルキルヒドロキシ) -1,3- (ジアザ) -2- (オキソ) -フェンチアジン-1-イル、7- (アミノアルキルヒドロキシ) -1- (アザ) -2- (チオ) -3- (アザ) -フェンチアジン-1-イル、7- (グアニジニウムアルキルヒドロキシ) -1,3- (ジアザ) -2- (オキソ) -フェノキサジン-1-イル、7- (グアニジニウムアルキルヒドロキシ) -1- (アザ) -2- (チオ) -3- (アザ) -フェノキサジン-1-イル、7- (グアニジニウムアルキルヒドロキシ) -1,3- (ジアザ) -2- (オキソ) -フェンチアジン-1-イル、7- (グアニジニウムアルキルヒドロキシ) -1- (アザ) -2- (チオ) -3- (アザ) -フェンチアジン-1-イル、1,3,5- (トリアザ) -2,6- (ジオキサ) -ナフタレン、イノシン、キサントシン、ヒポキサントシン、ヌブラリン、ツベルシジン、イソグアニシン、イノシニル、2-アザ-イノシニル、7-デアザ-イノシニル、ニトロイミダゾール、ニトロピラゾール、ニトロベンゾイミダゾール、ニトロインダゾール、アミノインドリル、ピロロピリミジニル、3- (メチル) イソカルボスチリリル、5- (メチル) イソカルボスチリリル、3- (メチル) -7- (プロピニル) イソカルボスチリリル、7- (アザ) インドリル、6- (メチル) -7- (アザ) インドリル、イミジゾピリジニル、9- (メチル) -イミジゾピリジニル、ピロロピリジニル、イソカルボスチリリル、7- (プロピニル) イソカルボスチリリル、プロピニル-7- (アザ) インドリル、2,4,5- (トリメチル) フェニル、4- (メチル) インドリル、4,6- (ジメチル) インドリル、フェニル、ナフタレニル、アントラセニル、フェナントラセニル、ピレニル、スチルベニル、テトラセニル、ペンタセニル、ジフルオロトリル、4- (フルオロ) -6- (メチル) ベンゾイミダゾール、4- (メチル) ベンゾイミダゾール、6- (アゾ) チミン、2-ピリジノン、5-ニトロインドール、3-ニトロピロール、6- (アザ) ピリミジン、2- (アミノ) プリン、2,6- (ジアミノ) プリン、5-置換ピリミジン、N²-置換プリン、N⁶-置換プリン、O⁶-置換プリン、置換1,2,4-トリアゾール、およびそれらの任意のO-アルキル化またはN-アルキル化誘導体からなる群より選択することができる。

10

20

【0089】

いくつかの態様において、核酸塩基は修飾核酸塩基である。すなわち、核酸塩基は、本明細書記載の核酸塩基修飾を含み、例えば核酸塩基は、天然核酸塩基のうちのいずれかの置換または修飾類似体である。核酸塩基修飾の例としては、当技術分野において公知の、アルキル基またはアミノアルキルおよび他のカチオン基、例えばグアニジニウムおよびアミジン官能性による、C-5ピリミジン修飾、アルキル基またはアミノアルキルおよび他のカチオン基、例えばグアニジニウムおよびアミジン官能性による、プリン^{N²}-およびN⁶-修飾、G-クランプ、グアニジニウムG-クランプ、およびプソイドウリジンが挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

30

【0090】

上記局面のいずれか一つのいくつかの態様において、核酸塩基はユニバーサル核酸塩基である。本明細書にいうユニバーサル核酸塩基とは、そのユニバーサル核酸塩基を含むオリゴヌクレオチドの融解挙動、細胞内酵素による認識または活性に実質的に影響を及ぼすことなく、アデニン、シトシン、グアニンおよびウラシルのすべてと塩基対合することができる、任意の修飾または無修飾天然または非天然核酸塩基である。例示的なユニバーサル核酸塩基としては、2,4-ジフルオロトリエン、ニトロピロール、ニトロインドリル、8-アザ-7-デアザアデニン、4-フルオロ-6-メチルベンゾイミダゾール (methylbenzimidazole)、4-メチルイミダゾール (methylbenzimidazole)、3-メチルイソカルボスチリリル、5-メチルイソカルボスチリリル、3-メチル-7-プロピニルイソカルボスチリリル、7-アザインドリル、6-メチル-7-アザインドリル、イミジゾピリジニル、9-メチル-イミジゾピリジニル、ピロロピリジニル、イソカルボスチリリル、7-プロピニルイソカルボスチリリル、プロピニル-7-アザインドリル、2,4,5-トリメチルフェニル、4-メチルイノリル (methylinolyl)、4,6-ジメチルインドリル、フェニル、ナフタレニル (na

40

50

phthalenyl)、アントラセニル、フェナントラセニル、ピレニル、スチルベニル、テトラセニル、ペンタセニル、およびそれらの構造誘導体などが挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

【0091】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、核酸塩基（例えばB）は保護された核酸塩基である。本明細書にいう「保護された核酸塩基」とは、窒素保護基、および/または酸素保護基、および/または硫黄保護基を含む核酸塩基を指す。

【0092】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、核酸塩基（例えばB）は、アデニン、シトシン、グアニン、チミン、ウラシル、およびそれらの任意の修飾、保護または置換類似体から選択される核酸塩基である。

10

【0093】

$R^{a'}$

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 $R^{a'}$ は、ハロゲン、水素、 $-OR^{a2}$ 、 $-SR^{a3}$ 、置換されていてもよい $C_1\sim 30$ アルキル、 $C_1\sim 30$ ハロアルキル、置換されていてもよい $C_2\sim 30$ アルケニル、置換されていてもよい $C_2\sim 30$ アルキニル、または置換されていてもよい $C_1\sim 30$ アルコキシ、アミノ（ NH_2 ）、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、ジヘテロアリールアミノ、アミノ酸、 $-O(CH_2CH_2O)_mCH_2CH_2OR^{a4}$ 、シアノ、アルキル-チオ-アルキル、チオアルコキシ、シクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、 $-NH(CH_2CH_2NH)_nCH_2CH_2-R^{a5}$ 、 $NHC(O)R^{a4}$ 、脂質、脂質に共有結合で取り付けられたリンカー、リガンド、リガンドに共有結合で取り付けられたリンカー、固形支持体、固形支持体に共有結合で取り付けられたリンカー、または後続のヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合である。

20

【0094】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 $R^{a'}$ はハロゲンである。例えば、 $R^{a'}$ はフルオロ（F）である。いくつかの例において、 $R^{a'}$ はクロロ（Cl）である。

【0095】

上記局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 $R^{a'}$ が $-OR^{a2}$ である場合、 R^{a2} は水素またはヒドロキシル保護基であることができる。例えば、 R^{a2} は、本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様では、水素であることができる。

30

【0096】

$R^{a'}$ が $-SR^{a3}$ である場合、 R^{a3} は水素または硫黄保護基であることができる。したがって、上記局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^{a3} は水素である。

【0097】

$R^{a'}$ が $-O(CH_2CH_2O)_mCH_2CH_2OR^{a4}$ である場合、 m は1~50であり、 R^{a4} は、出現ごとに独立して、H、 $C_1\sim C_{30}$ アルキル、シクリル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アラルキル、糖または R^{a5} であり、 R^{a5} は、出現ごとに独立して、アミノ（ NH_2 ）、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、またはジヘテロアリールアミノである。

40

【0098】

$R^{a'}$ が $-NH(CH_2CH_2NH)_nCH_2CH_2-R^{a5}$ である場合、 n は1~50であり、 R^{a5} は、出現ごとに独立して、アミノ（ NH_2 ）、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、またはジヘテロアリールアミノである。

【0099】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 $R^{a'}$ は、水素、ハロゲン、 $-OR^{a2}$ 、または置換されていてもよい $C_1\sim C_{30}$ アルコキシである。例えば、 $R^{a'}$ は、ハロゲン、 $-OR^{a2}$ 、または置換されていてもよい $C_1\sim C_{30}$ アルコキシである。本明細書

50

記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^a は、F、Cl、OHまたは置換されていてもよい $C_1 \sim C_{30}$ アルコキシである。

【0100】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^a はハロゲンである。例えば、 R^a はフルオロ（F）である。いくつかの例において、 R^a はクロロ（Cl）である。

【0101】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 $R^{a'}$ は、OH、CN、SC(O)Ph、オキソ(=O)、SH、 SO_2NH_2 、 $SO_2(C_1 \sim C_4)$ アルキル、 $SO_2NH(C_1 \sim C_4)$ アルキル、ハロゲン、カルボニル、チオール、シアノ、 NH_2 、 $NH(C_1 \sim C_4)$ アルキル、 $N[(C_1 \sim C_4)アルキル]_2$ 、 $C(O)NH_2$ 、 $COOH$ 、 $COOMe$ 、アセチル、 $(C_1 \sim C_8)$ アルキル、 $O(C_1 \sim C_8)$ アルキル（すなわち $C_1 \sim C_8$ アルコキシ）、 $O(C_1 \sim C_8)$ ハロアルキル、 $(C_2 \sim C_8)$ アルケニル、 $(C_2 \sim C_8)$ アルキニル、ハロアルキル、チオアルキル、シアノメチレン、アルキルアミニル、アリール、ヘテロアリール、置換アリール、 $NH_2-C(O)-アルキレン$ 、 $NH(Me)-C(O)-アルキレン$ 、 $CH_2-C(O)-アルキル$ 、 $C(O)-アルキル$ 、アルキルカルボニルアミニル、 $CH_2-[CH(OH)]_m-(CH_2)_p-OH$ 、 $CH_2-[CH(OH)]_m-(CH_2)_p-NH_2$ または CH_2 -アリール-アルコキシから独立して選択される1、2、3、4または5つの置換基で置換されていてもよい $C_1 \sim C_{30}$ アルコキシであり、ここで「m」および「p」は、独立して1、2、3、4、5または6である。例えば、 $R^{a'}$ は、 NH_2 、OH、 $C(O)NH_2$ 、 $COOH$ 、ハロ、SH、または $C_1 \sim C_6$ アルコキシで置換されていてもよい、 $C_1 \sim C_{30}$ アルコキシである。本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 $R^{a'}$ は $-O(CH_2)_pCH_3$ であり、ここでpは1~21である。例えば、pは、14、15、16、17または18である。非限定的な一例において、pは16である。

10

20

【0102】

上記局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 $R^{a'}$ は、 $-O(CH_2)_qR^{a7}$ であり、ここで、qは2~10であり、 R^{a7} は $C_1 \sim C_6$ アルコキシ、アミノ(NH_2)、 CO_2H 、OHまたはハロである。例えば、 R^{a7} は $-CH_3$ または $-NH_2$ である。したがって、上記局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^a は $-O(CH_2)_q-OMe$ であるか、または R^a は $-O(CH_2)_q-NH_2$ である。

30

【0103】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、qは、2、3、4、5または6である。例えばqは、2、3または6である。非限定的な一例において、qは2である。非限定的な別の一例において、qは3または6である。

【0104】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 $R^{a'}$ は $C_1 \sim C_6$ ハロアルキルである。例えば、 $R^{a'}$ は $C_1 \sim C_4$ ハロアルキルである。本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^a は、 $-CF_3$ 、 $-CF_2CF_3$ 、 $-CF_2CF_2CF_3$ または $-CF_2(CF_3)_2$ である。

【0105】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 $R^{a'}$ は $-OCH(CH_2OR^{a8})CH_2OR^{a9}$ であり、ここで、 R^{a8} および R^{a9} は、独立して、H、置換されていてもよい $C_1 \sim C_{30}$ アルキル、置換されていてもよい $C_2 \sim C_{30}$ アルケニルまたは置換されていてもよい $C_2 \sim C_{30}$ アルキニルである。例えば、 R^{a8} および R^{a9} は、独立して、置換されていてもよい $C_1 \sim C_{30}$ アルキルである。

40

【0106】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 $R^{a'}$ は $-CH_2C(O)NHR^{a10}$ であり、ここで、 R^{a10} は、H、置換されていてもよい $C_1 \sim C_{30}$ アルキル、置換されていてもよい $C_2 \sim C_{30}$ アルケニルまたは置換されていてもよい $C_2 \sim C_{30}$ アルキニルである。例えば、 R^{a10} は、Hまたは置換されていてもよい $C_1 \sim C_{30}$ アルキルである。いく

50

つかの態様において、 R^{a10} は置換されていてもよい $C_1 \sim C_6$ アルキルである。

【0107】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 $R^{a'}$ は後続のヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合であることができる。

【0108】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 $R^{a'}$ は固形支持体へのリンカーであることができる。

【0109】

R^b

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^b は、置換されていてもよい $C_1 \sim 30$ アルキル、置換されていてもよい $C_2 \sim 30$ アルケニル、置換されていてもよい $C_2 \sim 30$ アルキニル、またはハロゲンである。例えば、 R^b は、OH、CN、SC(O)Ph、オキソ(=O)、SH、 SO_2NH_2 、 $SO_2(C_1 \sim C_4)$ アルキル、 $SO_2NH(C_1 \sim C_4)$ アルキル、ハロゲン、カルボニル、チオール、シアノ、 NH_2 、 $NH(C_1 \sim C_4)$ アルキル、 $N[(C_1 \sim C_4)$ アルキル] $_2$ 、 $C(O)NH_2$ 、 $COOH$ 、 $COOMe$ 、アセチル、 $(C_1 \sim C_8)$ アルキル、 $O(C_1 \sim C_8)$ アルキル(すなわち $C_1 \sim C_8$ アルコキシ)、 $O(C_1 \sim C_8)$ ハロアルキル、 $(C_2 \sim C_8)$ アルケニル、 $(C_2 \sim C_8)$ アルキニル、ハロアルキル、チオアルキル、シアノメチレン、アルキルアミニル、アリール、ヘテロアリール、置換アリール、 $NH_2-C(O)-$ アルキレン、 $NH(Me)-C(O)-$ アルキレン、 $CH_2-C(O)-$ アルキル、 $C(O)-$ アルキル、アルキルカルボニルアミニル、 $CH_2-[CH(OH)]_m-(CH_2)_p-OH$ 、 $CH_2-[CH(OH)]_m-(CH_2)_p-NH_2$ または CH_2 -アリール-アルコキシから独立して選択される1、2、3、4または5つの置換基で置換されていてもよい $C_1 \sim 30$ アルキルであり、ここで「m」および「p」は、独立して1、2、3、4、5または6である。例えば、 R^b は、 NH_2 、OH、 $C(O)NH_2$ 、 $COOH$ 、ハロ、SH、または $C_1 \sim C_6$ アルコキシで置換されていてもよい、 $C_1 \sim C_{30}$ アルキルである。

10

20

【0110】

いくつかの態様において、 R^b は、 NH_2 、OH、 $C(O)NH_2$ 、 $COOH$ 、ハロ、SH、または $C_1 \sim C_6$ アルコキシで置換されていてもよい、 $C_1 \sim 30$ アルキルである。いくつかの態様において、 R^b は、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、t-ブチル、ビニル、エチニル、アリルまたはプロパルギルである。例えば、 R^b は、メチル、ビニル、エチニル、アリルまたはプロパルギルである。本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^b はメチルである。

30

【0111】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 $R^{a'}$ はハロゲンであり、 R^b は置換されていてもよい $C_1 \sim 30$ アルキルである。例えば、 $R^{a'}$ はFであり、 R^b は、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、t-ブチル、ビニル、エチニル、アリルまたはプロパルギルである。本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 $R^{a'}$ はFであり、 R^b はメチルである。

【0112】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^a はハロゲンであり、 R^b は置換されていてもよい $C_1 \sim 30$ アルキルである。例えば、 R^a はFであり、 R^b は、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、t-ブチル、ビニル、エチニル、アリルまたはプロパルギルである。本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^a はFであり、 R^b はメチルである。

40

【0113】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 $R^{a'}$ および R^b はハロゲンである。例えば、 $R^{a'}$ および R^b は、独立して、F、Cl、BrまたはIである。 $R^{a'}$ と R^b は同じであることまたは異なることができる点に注意されたい。本明細書記載の局面のいずれかのいくつかの態様において、 $R^{a'}$ および R^b はFである。本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様では、 $R^{a'}$ と R^b とが同時にFであることはない。本明細書記載の

50

局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^a および R^b は Cl または Br である。

【0114】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^a および R^b はハロゲンである。例えば、 R^a および R^b は、独立して、F、Cl、Br または I である。 R^a および R^b は同じであることまたは異なることができる点に注意されたい。本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^a および R^b は F である。本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様では、 R^a と R^b とが同時に F であることはない。本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^a および R^b は Cl または Br である。

【0115】

R^c

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^c は、後続のヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合、水素、ハロゲン、 $-OR^{c2}$ 、 $-SR^{c3}$ 、置換されていてもよい $C_1 \sim 30$ アルキル、 $C_1 \sim 30$ ハロアルキル、置換されていてもよい $C_2 \sim 30$ アルケニル、置換されていてもよい $C_2 \sim 30$ アルキニル、または置換されていてもよい $C_1 \sim 30$ アルコキシ、アミノ (NH_2)、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、ジヘテロアリールアミノ、アミノ酸、 $-O(CH_2CH_2O)_rCH_2CH_2OR^{c4}$ 、シアノ、アルキル-チオ-アルキル、チオアルコキシ、シクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、 $-NH(CH_2CH_2NH)_sCH_2CH_2-R^{c5}$ 、 $NHC(O)R^{c4}$ 、脂質、脂質に共有結合で取り付けられたリンカー、リガンド、リガンドに共有結合で取り付けられたリンカー、固形支持体、または固形支持体に共有結合で取り付けられたリンカーである。

【0116】

上記局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^b および R^c のうちの一方は、後続のヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合である。例えば、 R^c は後続のヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合である。

【0117】

上記局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^c が $-OR^{c2}$ である場合、 R^{c2} は水素またはヒドロキシル保護基であることができる。例えば、 R^{c2} は、本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、水素であることができる。

【0118】

R^c が $-SR^{c3}$ である場合、 R^{c3} は水素または硫黄保護基であることができる。したがって、上記局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^{c3} は水素である。

【0119】

R^c が $-O(CH_2CH_2O)_rCH_2CH_2OR^{c4}$ である場合、 r は 1~50 であることができ、 R^{c4} は、出現ごとに独立して、H、 $C_1 \sim C_{30}$ アルキル、シクリル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アラルキル、糖または R^{c5} であり、 R^{c5} は、出現ごとに独立して、アミノ (NH_2)、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、またはジヘテロアリールアミノである。

【0120】

R^c が、 $-NH(CH_2CH_2NH)_sCH_2CH_2-R^{c5}$ である場合、 s は 1~50 であることができ、 R^{c5} は、出現ごとに独立して、アミノ (NH_2)、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、またはジヘテロアリールアミノであることができる。

【0121】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^c は、水素、ハロゲン、 $-OR^{c2}$ 、または置換されていてもよい $C_1 \sim C_{30}$ アルコキシである。例えば、 R^c は、ハロゲン、 $-OR^{c2}$ 、または置換されていてもよい $C_1 \sim C_{30}$ アルコキシである。本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^c は、F、OH または置換されていてもよい $C_1 \sim C_{30}$ アルコキシである。

【0122】

10

20

30

40

50

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^c は、OH、CN、SC(O)Ph、オキソ(=O)、SH、 SO_2NH_2 、 $SO_2(C_1\sim C_4)$ アルキル、 $SO_2NH(C_1\sim C_4)$ アルキル、ハロゲン、カルボニル、チオール、シアノ、 NH_2 、 $NH(C_1\sim C_4)$ アルキル、 $N[(C_1\sim C_4)$ アルキル] $_2$ 、 $C(O)NH_2$ 、 $COOH$ 、 $COOMe$ 、アセチル、 $(C_1\sim C_8)$ アルキル、 $O(C_1\sim C_8)$ アルキル(すなわち $C_1\sim C_8$ アルコキシ)、 $O(C_1\sim C_8)$ ハロアルキル、 $(C_2\sim C_8)$ アルケニル、 $(C_2\sim C_8)$ アルキニル、ハロアルキル、チオアルキル、シアノメチレン、アルキルアミニル、アリール、ヘテロアリール、置換アリール、 $NH_2-C(O)-$ アルキレン、 $NH(Me)-C(O)-$ アルキレン、 $CH_2-C(O)-$ アルキル、 $C(O)-$ アルキル、アルキルカルボニルアミニル、 $CH_2-[CH(OH)]_m-(CH_2)_p-OH$ 、 $CH_2-[CH(OH)]_m-(CH_2)_p-NH_2$ または CH_2 -アリール-アルコキシから独立して選択される1、2、3、4または5つの置換基で置換されていてもよい $C_1\sim C_{30}$ アルコキシであり、ここで「m」および「p」は、独立して1、2、3、4、5または6である。例えば、 R^c は、 NH_2 、OH、 $C(O)NH_2$ 、 $COOH$ 、ハロ、SH、または $C_1\sim C_6$ アルコキシで置換されていてもよい、 $C_1\sim C_{30}$ アルキルである。例えば、 R^c は、 NH_2 または $C_1\sim C_6$ アルコキシで置換されていてもよい、 $C_1\sim C_{30}$ アルコキシである。

10

【0123】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^c は $-O(CH_2)_tCH_3$ であり、ここで、tは1~21である。例えば、tは、14、15、16、17または18である。非限定的な一例において、tは16である。

20

【0124】

上記局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^c は $-O(CH_2)_uR^{c7}$ であり、ここで、uは2~10であり、 R^{c7} は、 $C_1\sim C_6$ アルコキシ、アミノ(NH_2)、 CO_2H 、OHまたはハロである。例えば、 R^{c7} は $-CH_3$ または NH_2 である。したがって、本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^c は $-O(CH_2)_u-OMe$ であるか、または R^c は $-O(CH_2)_uNH_2$ である。

【0125】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、uは、2、3、4、5または6である。例えば、uは、2、3または6である。非限定的な一例において、uは2である。非限定的な別の一例において、uは3または6である。

30

【0126】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^c は $C_1\sim C_6$ ハロアルキルである。例えば、 R^c は $C_1\sim C_4$ ハロアルキルである。本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^c は、 $-CF_3$ 、 $-CF_2CF_3$ 、 $-CF_2CF_2CF_3$ または $-CF_2(CF_3)_2$ である。

【0127】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^c は $-OCH(CH_2OR^{c8})CH_2OR^{c8}$ であり、ここで、 R^{c8} および R^{c9} は、独立して、H、置換されていてもよい $C_1\sim C_{30}$ アルキル、置換されていてもよい $C_2\sim C_{30}$ アルケニルまたは置換されていてもよい $C_2\sim C_{30}$ アルキニルである。例えば、 R^{c8} および R^{c9} は、独立して、置換されていてもよい $C_1\sim C_{30}$ アルキルである。

40

【0128】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^c は $-CH_2C(O)NHR^{c10}$ であり、ここで、 R^{c10} は、H、置換されていてもよい $C_1\sim C_{30}$ アルキル、置換されていてもよい $C_2\sim C_{30}$ アルケニルまたは置換されていてもよい $C_2\sim C_{30}$ アルキニルである。例えば、 R^{c10} は、Hまたは置換されていてもよい $C_1\sim C_{30}$ アルキルである。いくつかの態様において、 R^{c10} は置換されていてもよい $C_1\sim C_6$ アルキルである。

【0129】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^c は、固形支持体、または固形支持体に共有結合で取り付けられたリンカーである。

【0130】

50

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 $R^{a'}$ はハロゲンであり、 R^b は置換されていてもよい $C_1 \sim 30$ アルキルであり、 R^c は後続のヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合である。例えば、 $R^{a'}$ はFであり、 R^b は、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、*t*-ブチル、ビニル、エチニル、アリルまたはプロパルギルであり、 R^c は後続のヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合である。本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 $R^{a'}$ はFであり、 R^b はメチルであり、 R^c は後続のヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合である。

【0131】

R^4

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^4 は、水素、置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルキル、置換されていてもよい $C_2 \sim 6$ アルケニル、置換されていてもよい $C_2 \sim 6$ アルキニル、または置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルコキシであることができる。例えば、 R^4 は、水素、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、*t*-ブチル、ビニル、エチニル、アリルまたはプロパルギルであることができる。例えば、 R^b は、メチル、ビニル、エチニル、アリルまたはプロパルギルである。

10

【0132】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^4 はHである。

【0133】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^a および R^4 は、全体として、 $4'-C(R^{a11}R^{a12})_v-Y-2'$ または $4'-Y-C(R^{a11}R^{a12})_v-2'$ であり、 v は1、2または3であり、ここで、 Y は、 $-O-$ 、 $-CH_2-$ 、 $-CH(Me)-$ 、 $-C(CH_3)_2-$ 、 $-S-$ 、 $-N(R^{a13})-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-N(R^{a13})C(O)-$ 、または $-C(O)N(R^{a13})-$ であり、 R^{a11} および R^{a12} は、独立して、H、置換されていてもよい $C_1 \sim C_6$ アルキル、置換されていてもよい $C_2 \sim C_6$ アルケニルまたは置換されていてもよい $C_2 \sim C_6$ アルキニルであり、 R^{a13} は、水素、置換されていてもよい $C_1 \sim 30$ アルキル、置換されていてもよい $C_1 \sim C_{30}$ アルコキシ、 $C_1 \sim 4$ ハロアルキル、置換されていてもよい $C_2 \sim 4$ アルケニル、置換されていてもよい $C_2 \sim 4$ アルキニル、置換されていてもよい $C_1 \sim 30$ アルキル- CO_2H 、または窒素保護基である。

20

【0134】

上記局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 v は1である。上記局面のいずれか一つの他のいくつかの態様において、 v は2である。

30

【0135】

いくつかの態様において、 Y はOである。例えば、 R^a および R^4 は、全体として、 $4'-C(R^{a11}R^{a12})_v-O-2'$ である。

【0136】

同じ炭素に取り付けられた R^{a11} と R^{a12} は同じであることまたは異なることができることに注意されたい。例えば、 R^{a11} および R^{a12} のうちの一方はHであることができ、かつ R^{a11} および R^{a12} のうちの他方は置換されていてもよい $C_1 \sim C_6$ アルキルであることができる。非限定的な一例において、 R^{a11} および R^{a12} のうちの一方はHであることができ、他方は、OH、CN、 $SC(O)Ph$ 、オキソ(=O)、SH、 SO_2NH_2 、 $SO_2(C_1 \sim C_4)$ アルキル、 $SO_2NH(C_1 \sim C_4)$ アルキル、ハロゲン、カルボニル、チオール、シアノ、 NH_2 、 $NH(C_1 \sim C_4)$ アルキル、 $N[(C_1 \sim C_4)アルキル]_2$ 、 $C(O)NH_2$ 、 $COOH$ 、 $COOMe$ 、アセチル、 $(C_1 \sim C_8)$ アルキル、 $O(C_1 \sim C_8)$ アルキル(すなわち $C_1 \sim C_8$ アルコキシ)、 $O(C_1 \sim C_8)$ ハロアルキル、 $(C_2 \sim C_8)$ アルケニル、 $(C_2 \sim C_8)$ アルキニル、ハロアルキル、チオアルキル、シアノメチレン、アルキルアミニル、アリール、ヘテロアリール、置換アリール、 $NH_2-C(O)-$ アルキレン、 $NH(Me)-C(O)-$ アルキレン、 $CH_2-C(O)-$ アルキル、 $C(O)-$ アルキル、アルキルカルボニルアミニル、 $CH_2-[CH(OH)]_m-(CH_2)_p-OH$ 、 $CH_2-[CH(OH)]_m-(CH_2)_p-NH_2$ または CH_2 -アリール-アルコキシから独立して選択される1、2、3、4または5つの置換基で置換されていてもよい $C_1 \sim C_6$ アルキルであることができ、ここで「m」および「p」は、独立して1

40

50

、2、3、4、5または6である。例えば、 R^{a11} および R^{a12} は、独立して、Hであるか、あるいは NH_2 、 OH 、 $C(O)NH_2$ 、 $COOH$ 、ハロ、 SH 、または $C_1 \sim C_6$ アルコキシで置換されていてもよい、 $C_1 \sim C_{30}$ アルキルである。上記局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^{a11} および R^{a12} のうちの一方はHであり、他方は、 $C_1 \sim C_6$ アルコキシで置換されていてもよい $C_1 \sim C_6$ アルキルである。例えば、 R^{a11} および R^{a12} のうちの一方はHであり、他方は $-CH_3$ または CH_2OCH_3 である。

【0137】

上記局面のいずれか一つのいくつかの態様において、同じCに取り付けられた R^{a11} および R^{a12} は同じである。例えば、同じCに取り付けられた R^{a11} および R^{a12} はHである。

【0138】

上記局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^a および R^4 は、全体として、 $4'-CH_2-O-2'$ 、 $4'-CH(CH_3)-O-2'$ 、 $4'-CH(CH_2OCH_3)-O-2'$ 、または $4'-CH_2CH_2-O-2'$ である。

【0139】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^4 はHである。

【0140】

または、本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^c および R^4 は、それらが取り付けられている原子と共に全体として、置換されていてもよい $C_3 \sim 8$ シクロアルキル、置換されていてもよい $C_3 \sim 8$ シクロアルケニル、または置換されていてもよい3～8員ヘテロシクリルを形成する。

【0141】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 $R^{a'}$ はハロゲンであり、 R^b は置換されていてもよい $C_1 \sim 30$ アルキルであり、 R^c は後続のヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合であり、 R^4 はHである。例えば、 $R^{a'}$ はFであり、 R^b は、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、t-ブチル、ビニル、エチニル、アリルまたはプロパルギルであり、 R^c は後続のヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合であり、 R^4 はHである。本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 $R^{a'}$ はFであり、 R^b はメチルであり、 R^c は後続のヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合であり、 R^4 はHである。

【0142】

R^d

本明細書記載のさまざまな局面の態様において、 R^d は $-CH(R^{d1})-R^{d2}$ または $-C(R^{d1})=CHR^{d2}$ であることができ、ここで、 R^{d1} は、水素、置換されていてもよい $C_1 \sim 30$ アルキル、置換されていてもよい $C_2 \sim 30$ アルケニル、または置換されていてもよい $C_2 \sim 30$ アルキニルであり、 R^{d2} は先行するヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合であり、 R^{d3} は、水素、置換されていてもよい $C_1 \sim 30$ アルキル、置換されていてもよい $C_1 \sim C_{30}$ アルコキシ、 $C_1 \sim 4$ ハロアルキル、置換されていてもよい $C_2 \sim 4$ アルケニル、置換されていてもよい $C_2 \sim 4$ アルキニル、置換されていてもよい $C_1 \sim 30$ アルキル- CO_2H 、または窒素保護基である。

【0143】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 X^d はOまたは結合である。例えば、 X^d はOである。

【0144】

本明細書記載のさまざまな局面のいくつかの態様において、 R^d は $-CH(R^{d1})-X^d-R^{d2}$ である。

【0145】

本明細書記載のさまざまな局面のいくつかの態様において、 R^d は $-CH(R^{d1})-X^d-R^{d2}$ であり、ここで、 R^{d1} は、Hであるか、あるいは OH 、 CN 、 $SC(O)Ph$ 、オキソ(=O)、 SH 、 SO_2NH_2 、 $SO_2(C_1 \sim C_4)$ アルキル、 $SO_2NH(C_1 \sim C_4)$ アルキル、ハロゲン、カルボニル、チオール、シアノ、 NH_2 、 $NH(C_1 \sim C_4)$ アルキル、 $N[(C_1 \sim C_4)]$

10

20

30

40

50

アルキル]₂、C(O)NH₂、COOH、COOMe、アセチル、(C₁~C₈)アルキル、O(C₁~C₈)アルキル(すなわちC₁~C₈アルコキシ)、O(C₁~C₈)ハロアルキル、(C₂~C₈)アルケニル、(C₂~C₈)アルキニル、ハロアルキル、チオアルキル、シアノメチレン、アルキルアミニル、アリール、ヘテロアリール、置換アリール、NH₂-C(O)-アルキレン、NH(Me)-C(O)-アルキレン、CH₂-C(O)-アルキル、C(O)-アルキル、アルキルカルボニルアミニル、CH₂-[CH(OH)]_m-(CH₂)_p-OH、CH₂-[CH(OH)]_m-(CH₂)_p-NH₂もしくはCH₂-アリール-アルコキシから独立して選択される1、2、3、4または5つの置換基で置換されていてもよいC₁~C₃₀アルキルであり、ここで、「m」および「p」は、独立して、1、2、3、4、5または6である。例えば、R^{d1}はHである。他のいくつかの非限定的な例において、R^{d1}は、NH₂、OH、C(O)NH₂、COOH、ハロ、SH、またはC₁~C₆アルコキシで置換されていてもよい、C₁~C₃₀アルキルである。

10

【0146】

本明細書記載のさまざまな局面のいくつかの態様において、R^dは-CH(R^{d1})-O-R^{d2}であり、ここで、R^{d1}はHであるか、あるいはOH、CN、SC(O)Ph、オキソ(=O)、SH、SO₂NH₂、SO₂(C₁~C₄)アルキル、SO₂NH(C₁~C₄)アルキル、ハロゲン、カルボニル、チオール、シアノ、NH₂、NH(C₁~C₄)アルキル、N[(C₁~C₄)アルキル]₂、C(O)NH₂、COOH、COOMe、アセチル、(C₁~C₈)アルキル、O(C₁~C₈)アルキル(すなわちC₁~C₈アルコキシ)、O(C₁~C₈)ハロアルキル、(C₂~C₈)アルケニル、(C₂~C₈)アルキニル、ハロアルキル、チオアルキル、シアノメチレン、アルキルアミニル、アリール、ヘテロアリール、置換アリール、NH₂-C(O)-アルキレン、NH(Me)-C(O)-アルキレン、CH₂-C(O)-アルキル、C(O)-アルキル、アルキルカルボニルアミニル、CH₂-[CH(OH)]_m-(CH₂)_p-OH、CH₂-[CH(OH)]_m-(CH₂)_p-NH₂もしくはCH₂-アリール-アルコキシから独立して選択される1、2、3、4または5つの置換基から独立して選択される1、2、3、4または5つの置換基で置換されていてもよいC₁~C₃₀アルキルであり、ここで、「m」および「p」は、独立して、1、2、3、4、5または6である。例えば、R^{d1}はHである。他のいくつかの非限定的な例において、R^{d1}は、NH₂、OH、C(O)NH₂、COOH、ハロ、SH、またはC₁~C₆アルコキシで置換されていてもよい、C₁~C₃₀アルキルである。

20

【0147】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、R^dは-CH₂-O-R^{d2}である。

30

【0148】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、R^dは-C(R^{d1})=CHR^{d2}である。-C(R^{d1})=CHR^{d2}中の二重結合はシス配置またはトランス配置であることができる点に注意されたい。したがって、上記局面のいずれか一つのいくつかの態様において、R^dは-C(R^{d1})=CHR^{d2}であり、ここで二重結合はシス配置である。上記局面のいずれか一つの他のいくつかの態様において、R^dは-C(R^{d1})=CHR^{d2}であり、ここで二重結合はトランス配置である。本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、R^dは-CH=CHR^{d2}である。

40

【0149】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、R^{a'}はハロゲンであり、R^bは置換されていてもよいC₁~₃₀アルキルであり、R^cは後続のヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合であり、R⁴はHであり、R^dは先行するヌクレオチドへのヌクレオシド間連結部への結合である。例えば、R^{a'}はFであり、R^bは、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、t-ブチル、ビニル、エチニル、アリルまたはプロパルギルであり、R^cは、後続のヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合であり、R⁴はHであり、R^dは先行するヌクレオチドへのヌクレオシド間連結部への結合である。本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、R^{a'}はFであり、R^bはメチルであり、R^cは後続のヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合であ

50

り、 R^4 はHであり、 R^d は先行するヌクレオチドへのヌクレオシド間連結部への結合である。

【0150】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 $R^{a'}$ はハロゲンであり、 R^b は置換されていてもよい $C_1\sim_{30}$ アルキルであり、 R^c は、ヒドロキシル、固形支持体、または固形支持体に共有結合で連結されたリンカーであり、 R^4 はHであり、 R^d は先行するヌクレオチドへのヌクレオシド間連結部への結合である。例えば、 $R^{a'}$ はFであり、 R^b は、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、t-ブチル、ビニル、エチニル、アリルまたはプロパルギルであり、 R^c は、ヒドロキシル、固形支持体、または固形支持体に共有結合で連結されたリンカーであり、 R^4 はHであり、 R^d は先行するヌクレオチドへのヌクレオシド間連結部への結合である。本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 $R^{a'}$ はFであり、 R^b はメチルであり、 R^c は、ヒドロキシル、固形支持体、または固形支持体に共有結合で連結されたリンカーであり、 R^4 はHであり、 R^d は先行するヌクレオチドへのヌクレオシド間連結部への結合である。

10

【0151】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 $R^{a'}$ はハロゲンであり、 R^b は置換されていてもよい $C_1\sim_{30}$ アルキルであり、 R^c は後続のヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合であり、 R^4 はHであり、 R^d は $-CH_2-O-R^{d2}$ である。例えば、 $R^{a'}$ はFであり、 R^b は、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、t-ブチル、ビニル、エチニル、アリルまたはプロパルギルであり、 R^c は、後続のヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合であり、 R^4 はHであり、 R^d は $-CH_2-O-R^{d2}$ である。本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 $R^{a'}$ はFであり、 R^b はメチルであり、 R^c は後続のヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合であり、 R^4 はHであり、 R^d は $-CH_2-O-R^{d2}$ である。

20

【0152】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 $R^{a'}$ はハロゲンであり、 R^b は置換されていてもよい $C_1\sim_{30}$ アルキルであり、 R^c は、ヒドロキシル、固形支持体、または固形支持体に共有結合で連結されたリンカーであり、 R^4 はHであり、 R^d は $-CH_2-O-R^{d2}$ である。例えば、 $R^{a'}$ はFであり、 R^b は、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、t-ブチル、ビニル、エチニル、アリルまたはプロパルギルであり、 R^c は、ヒドロキシル、固形支持体、または固形支持体に共有結合で連結されたリンカーであり、 R^4 はHであり、 R^d は $-CH_2-O-R^{d2}$ である。本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 $R^{a'}$ はFであり、 R^b はメチルであり、 R^c は、ヒドロキシル、固形支持体、または固形支持体に共有結合で連結されたリンカーであり、 R^4 はHであり、 R^d は $-CH_2-O-R^{d2}$ である。

30

【0153】

R^e

本明細書記載のさまざまな局面の態様において、 R^e は置換されていてもよい $-C_2\sim_6$ アルケニル- R^{e1} 、置換されていてもよい $C_1\sim_6$ アルキル- R^{e1} 、または置換されていてもよい $-C_2\sim_6$ アルキニル- R^{e1} である。本明細書記載のさまざまな局面の態様において、 R^{e1} は、 $-OR^{e2}$ 、 $-SR^{e3}$ 、 $-P(O)(OR^{e4})_2$ 、 $-P(S)(OR^{e4})_2$ 、 $-P(S)(SR^{e5})(OR^{e4})$ 、 $-P(S)(SR^{e5})_2$ 、 $-OP(O)(OR^{e4})_2$ 、 $-OP(S)(OR^{e4})_2$ 、 $-OP(S)(SR^{e5})(OR^{e4})$ 、 $-OP(S)(SR^{e5})_2$ 、 $-SP(O)(OR^{e4})_2$ 、 $-SP(S)(OR^{e4})_2$ 、 $-SP(S)(SR^{e5})(OR^{e4})$ 、または $-SP(S)(SR^{e5})_2$ であることができ、ここで、 R^{e2} は水素または酸素保護基であり、 R^{e3} は水素または硫黄保護基であり、各 R^{e4} は、独立して、水素、置換されていてもよい $C_1\sim_{30}$ アルキル、置換されていてもよい $C_2\sim_{30}$ アルケニル、置換されていてもよい $C_2\sim_{30}$ アルキニル、酸素保護基、または総電荷が+1のアルカリ金属もしくは遷移金属であり、各 R^{e5} は、独立して、水素、置換されていてもよい $C_1\sim_{30}$ アルキル、置換されていてもよい $C_2\sim_{30}$ アルケニル、または置換されていてもよい $C_2\sim_{30}$ アルキニル、または硫黄保護基である。置換されていてもよい-C

40

50

$2\sim 6$ アルケニル- R^{e1} 中の二重結合はシス配置またはトランス配置であることができる点に注意されたい。

【0154】

上記局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 $-P(O)(OR^{e4})_2$ 、 $-P(S)(OR^{e4})_2$ 、 $-P(S)(SR^{e5})(OR^{e4})$ 、 $-OP(O)(OR^{e4})_2$ 、 $-OP(S)(OR^{e4})_2$ 、 $-OP(S)(SR^{e5})(OR^{e4})$ 、 $SP(O)(OR^{e4})_2$ 、 $-SP(S)(OR^{e4})_2$ 、および $-SP(S)(SR^{e5})(OR^{e4})$ 中の少なくとも1つの R^{e4} は、水素である。

【0155】

上記局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 $-P(O)(OR^{e4})_2$ 、 $-P(S)(OR^{e4})_2$ 、 $-P(S)(SR^{e5})(OR^{e4})$ 、 $-OP(O)(OR^{e4})_2$ 、 $-OP(S)(OR^{e4})_2$ 、 $-OP(S)(SR^{e5})(OR^{e4})$ 、 $SP(O)(OR^{e4})_2$ 、 $-SP(S)(OR^{e4})_2$ 、および $-SP(S)(SR^{e5})(OR^{e4})$ 中の少なくとも1つの R^{e4} は、総電荷が+1のアルカリ金属または遷移金属である。

10

【0156】

上記局面のいずれか一つの他のいくつかの態様において、 $-P(O)(OR^{e4})_2$ 、 $-P(S)(OR^{e4})_2$ 、 $-P(S)(SR^{e5})(OR^{e4})$ 、 $-OP(O)(OR^{e4})_2$ 、 $-OP(S)(OR^{e4})_2$ 、 $-OP(S)(SR^{e5})(OR^{e4})$ 、 $SP(O)(OR^{e4})_2$ 、 $-SP(S)(OR^{e4})_2$ 、または $-SP(S)(SR^{e5})(OR^{e4})$ 中の少なくとも1つの R^{e4} は、水素ではない。例えば、 $P(O)(OR^{e4})_2$ 、 $-P(S)(OR^{e4})_2$ 、 $-P(S)(SR^{e5})(OR^{e4})$ 、 $-OP(O)(OR^{e4})_2$ 、 $-OP(S)(OR^{e4})_2$ 、 $-OP(S)(SR^{e5})(OR^{e4})$ 、 $SP(O)(OR^{e4})_2$ 、 $-SP(S)(OR^{e4})_2$ 、および $-SP(S)(SR^{e5})(OR^{e4})$ 中の少なくとも1つの少なくとも1つの R^{e4} は、置換されていてもよい $C_1\sim 30$ アルキル、置換されていてもよい $C_2\sim 30$ アルケニル、または置換されていてもよい $C_2\sim 30$ アルキニル、または酸素保護基である。

20

【0157】

上記局面のいずれか一つのいくつかの態様では、 $-P(O)(OR^{e4})_2$ 、 $-P(S)(OR^{e4})_2$ 、 $-P(S)(SR^{e5})(OR^{e4})$ 、 $-OP(O)(OR^{e4})_2$ 、 $-OP(S)(OR^{e4})_2$ 、 $-OP(S)(SR^{e5})(OR^{e4})$ 、 $SP(O)(OR^{e4})_2$ 、 $-SP(S)(OR^{e4})_2$ 、および $-SP(S)(SR^{e5})(OR^{e4})$ において、少なくとも1つの R^{e4} はHであり、少なくとも1つの R^{e4} はH以外である。

30

【0158】

上記局面のいずれか一つのいくつかの態様では、 $-P(O)(OR^{e4})_2$ 、 $-P(S)(OR^{e4})_2$ 、 $-P(S)(SR^{e5})(OR^{e4})$ 、 $-OP(O)(OR^{e4})_2$ 、 $-OP(S)(OR^{e4})_2$ 、 $-OP(S)(SR^{e5})(OR^{e4})$ 、 $-OP(S)(SR^{e5})_2$ 、 $-SP(O)(OR^{e4})_2$ 、 $-SP(S)(OR^{e4})_2$ 、 $-SP(S)(SR^{e5})(OR^{e4})$ 、および $-SP(S)(SR^{e5})_2$ において、すべての R^{e4} がHである。

【0159】

上記局面のいずれか一つのいくつかの態様では、 $-P(O)(OR^{e4})_2$ 、 $-P(S)(OR^{e4})_2$ 、 $-P(S)(SR^{e5})(OR^{e4})$ 、 $-OP(O)(OR^{e4})_2$ 、 $-OP(S)(OR^{e4})_2$ 、 $-OP(S)(SR^{e5})(OR^{e4})$ 、 $-OP(S)(SR^{e5})_2$ 、 $-SP(O)(OR^{e4})_2$ 、 $-SP(S)(OR^{e4})_2$ 、 $-SP(S)(SR^{e5})(OR^{e4})$ 、および $-SP(S)(SR^{e5})_2$ において、すべての R^{e4} がH以外である。

40

【0160】

上記局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 $-P(S)(SR^{e5})(OR^{e4})$ 、 $-P(S)(SR^{e5})_2$ 、 $-OP(S)(OR^{e4})_2$ 、 $-OP(S)(SR^{e5})(OR^{e4})$ 、 $-OP(S)(SR^{e5})_2$ 、 $-SP(S)(SR^{e5})(OR^{e4})$ 、および $-SP(S)(SR^{e5})_2$ 中の少なくとも1つの R^{e5} は、Hである。

【0161】

上記局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 $-P(S)(SR^{e5})(OR^{e4})$ 、 $-P(S)(SR^{e5})_2$ 、 $-OP(S)(OR^{e4})_2$ 、 $-OP(S)(SR^{e5})(OR^{e4})$ 、 $-OP(S)$

50

(SR^{e5})₂、-SP(S)(SR^{e5})(OR^{e4})、および-SP(S)(SR^{e5})₂中の少なくとも1つのR^{e5}は、Hではない。例えば、-P(S)(SR^{e5})(OR^{e4})、-P(S)(SR^{e5})₂、-OP(S)(OR^{e4})₂、-OP(S)(SR^{e5})(OR^{e4})、-OP(S)(SR^{e5})₂、-SP(S)(SR^{e5})(OR^{e4})、および-SP(S)(SR^{e5})₂中の少なくとも1つのR^{e5}は、置換されていてもよいC₁~₃₀アルキル、置換されていてもよいC₂~₃₀アルケニル、または置換されていてもよいC₂~₃₀アルキニル、または硫黄保護基である。

【0162】

上記局面のいずれか一つのいくつかの態様では、-P(S)(SR^{e5})₂、-OP(S)(SR^{e5})₂および-SP(S)(SR^{e5})₂において、少なくとも1つのR^{e5}はHであり、少なくとも1つのR^{e5}はH以外である。

10

【0163】

いくつかの態様では、-P(S)(SR^{e5})(OR^{e4})、-P(S)(SR^{e5})₂、-OP(S)(OR^{e4})₂、-OP(S)(SR^{e5})(OR^{e4})、-OP(S)(SR^{e5})₂、-SP(S)(SR^{e5})(OR^{e4})、および-SP(S)(SR^{e5})₂において、すべてのR^{e5}がHである。

【0164】

いくつかの態様では、-P(S)(SR^{e5})(OR^{e4})、-P(S)(SR^{e5})₂、-OP(S)(OR^{e4})₂、-OP(S)(SR^{e5})(OR^{e4})、-OP(S)(SR^{e5})₂、-SP(S)(SR^{e5})(OR^{e4})、および-SP(S)(SR^{e5})₂において、すべてのR^{e5}がH以外である。

【0165】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、R^eは置換されていてもよい-C₂~₆アルケニル-R^{e1}である。例えば、R^eは-C₂~₆アルケニル-R^{e1}であり、ここで、C₂~₆アルケニルは、OH、CN、SC(O)Ph、オキソ(=O)、SH、SO₂NH₂、SO₂(C₁~₄)アルキル、SO₂NH(C₁~₄)アルキル、ハロゲン、カルボニル、チオール、シアノ、NH₂、NH(C₁~₄)アルキル、N[(C₁~₄)アルキル]₂、C(O)NH₂、COOH、COOMe、アセチル、(C₁~₈)アルキル、O(C₁~₈)アルキル(すなわちC₁~₈アルコキシ)、O(C₁~₈)ハロアルキル、(C₂~₈)アルケニル、(C₂~₈)アルキニル、ハロアルキル、チオアルキル、シアノメチレン、アルキルアミニル、アリール、ヘテロアリール、置換アリール、NH₂-C(O)-アルキレン、NH(Me)-C(O)-アルキレン、CH₂-C(O)-アルキル、C(O)-アルキル、アルキルカルボニルアミニル、CH₂-[CH(OH)]_m-(CH₂)_p-OH、CH₂-[CH(OH)]_m-(CH₂)_p-NH₂またはCH₂-アリール-アルコキシから独立して選択される1、2、3、4または5つの置換基で置換されていてもよく、ここで、「m」および「p」は、独立して、1、2、3、4、5または6であり、R^{e1}は、-P(O)(OR^{e4})₂、-P(S)(OR^{e4})₂、-P(S)(SR^{e5})(OR^{e4})、-P(S)(SR^{e5})₂、-OP(O)(OR^{e4})₂、-OP(S)(OR^{e4})₂、-OP(S)(SR^{e5})(OR^{e4})、-OP(S)(SR^{e5})₂、-SP(O)(OR^{e4})₂、-SP(S)(OR^{e4})₂、-SP(S)(SR^{e5})(OR^{e4})、または-SP(S)(SR^{e5})₂である。

20

30

【0166】

本明細書記載のさまざまな局面のいくつかの態様において、R^eは、-CH(R^{d1})-R^{e1}または-C(R^{d1})=CHR^{e1}であることができ、ここで、R^{d1}は、水素、置換されていてもよいC₁~₃₀アルキル、置換されていてもよいC₂~₃₀アルケニル、または置換されていてもよいC₂~₃₀アルキニルであり、R^{e1}は、-P(O)(OR^{e4})₂、-P(S)(OR^{e4})₂、-P(S)(SR^{e5})(OR^{e4})、-P(S)(SR^{e5})₂、-OP(O)(OR^{e4})₂、-OP(S)(OR^{e4})₂、-OP(S)(SR^{e5})(OR^{e4})、-OP(S)(SR^{e5})₂、-SP(O)(OR^{e4})₂、-SP(S)(OR^{e4})₂、-SP(S)(SR^{e5})(OR^{e4})、-SP(S)(SR^{e5})₂、-OR^{e2}または-SR^{e3}である。

40

【0167】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、R^eは-C(R^{d1})=CHR^{e1}である。-C(R^{d1})=CHR^{e1}中の二重結合はシス配置またはトランス配置であることができる点に注意されたい。したがって、上記局面のいずれか一つのいくつかの態様において、R^eは-C(R^{d1})=CHR^{e1}であり、ここで二重結合はシス配置である。上記局面

50

のいずれか一つの他のいくつかの態様において、 R^e は $-C(R^{d1})=CHR^{e1}$ であり、ここで二重結合はトランス配置である。

【0168】

上記局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^e は $-CH=CHR^{e1}$ である。例えば、 R^e は $-CH=CHR^{e1}$ であり、ここで二重結合はトランス配置である。別のいくつかの例において、 R^e は $-CH=CHR^{e1}$ であり、ここで二重結合はシス配置である。

【0169】

上記局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^e は、 $-CH=CH-P(O)(OR^{e4})_2$ 、 $-CH=CH-P(S)(OR^{e4})_2$ 、 $-CH=CH-P(S)(SR^{e5})(OR^{e4})_2$ 、 $-CH=CH-P(S)(SR^{e5})_2$ 、 $-CH=CH-OP(O)(OR^{e4})_2$ 、 $-CH=CH-OP(S)(OR^{e4})_2$ 、 $-CH=CH-OP(S)(SR^{e5})(OR^{e4})_2$ 、 $-CH=CH-OP(S)(SR^{e5})_2$ 、 $-CH=CH-SP(O)(OR^{e4})_2$ 、 $-CH=CH-SP(S)(OR^{e4})_2$ 、 $-CH=CH-SP(S)(SR^{e5})(OR^{e4})_2$ 、または $-CH=CH-SP(S)(SR^{e5})_2$ である。例えば、 R^e は $-CH=CH-P(O)(OR^{e4})_2$ である。

10

【0170】

上記局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^{e2} は水素または酸素保護基である。例えば、 R^{e2} は水素または4,4'-ジメトキシトリチル(DMT)である。いくつかの好ましい態様において、 R^{e2} はHである。

【0171】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^e は置換されていてもよい $-C_1\sim_6$ アルケニル- R^{e1} である。例えば、 R^e は $-C_1\sim_6$ アルケニル- R^{e1} であり、ここで、 $C_1\sim_6$ アルケニルは、OH、CN、SC(O)Ph、オキソ(=O)、SH、SO₂NH₂、SO₂(C₁~C₄)アルキル、SO₂NH(C₁~C₄)アルキル、ハロゲン、カルボニル、チオール、シアノ、NH₂、NH(C₁~C₄)アルキル、N[(C₁~C₄)アルキル]₂、C(O)NH₂、COOH、COOMe、アセチル、(C₁~C₈)アルキル、O(C₁~C₈)アルキル(すなわちC₁~C₈アルコキシ)、O(C₁~C₈)ハロアルキル、(C₂~C₈)アルケニル、(C₂~C₈)アルキニル、ハロアルキル、チオアルキル、シアノメチレン、アルキルアミニル、アリール、ヘテロアリール、置換アリール、NH₂-C(O)-アルキレン、NH(Me)-C(O)-アルキレン、CH₂-C(O)-アルキル、C(O)-アルキル、アルキルカルボニルアミニル、CH₂-[CH(OH)]_m-(CH₂)_p-OH、CH₂-[CH(OH)]_m-(CH₂)_p-NH₂またはCH₂-アリール-アルコキシから独立して選択される1、2、3、4または5つの置換基で置換されていてもよく、ここで、「m」および「p」は、独立して、1、2、3、4、5または6であり、 R^{e1} は、 $-OR^{e2}$ 、 $-SR^{e3}$ 、 $-P(O)(OR^{e4})_2$ 、 $-P(S)(OR^{e4})_2$ 、 $-P(S)(SR^{e5})(OR^{e4})_2$ 、 $-P(S)(SR^{e5})_2$ 、 $-OP(O)(OR^{e4})_2$ 、 $-OP(S)(OR^{e4})_2$ 、 $-OP(S)(SR^{e5})(OR^{e4})_2$ 、 $-OP(S)(SR^{e5})_2$ 、 $-SP(O)(OR^{e4})_2$ 、 $-SP(S)(OR^{e4})_2$ 、 $-SP(S)(SR^{e5})(OR^{e4})_2$ 、または $-SP(S)(SR^{e5})_2$ である。

20

30

【0172】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^e は $-CH(R^{e6})-R^{e1}$ であることができ、ここで、 R^{e1} は、 $-OR^{e2}$ 、 $-SR^{e3}$ 、 $-P(O)(OR^{e4})_2$ 、 $-P(S)(OR^{e4})_2$ 、 $-P(S)(SR^{e5})(OR^{e4})_2$ 、 $-P(S)(SR^{e5})_2$ 、 $-OP(O)(OR^{e4})_2$ 、 $-OP(S)(OR^{e4})_2$ 、 $-OP(S)(SR^{e5})(OR^{e4})_2$ 、 $-OP(S)(SR^{e5})_2$ 、 $-SP(O)(OR^{e4})_2$ 、 $-SP(S)(OR^{e4})_2$ 、 $-SP(S)(SR^{e5})(OR^{e4})_2$ 、または $-SP(S)(SR^{e5})_2$ であり、 R^{e6} は、H、置換されていてもよいC₁~₃₀アルキル、置換されていてもよいC₂~₃₀アルケニル、または置換されていてもよいC₂~₃₀アルキニルである。

40

【0173】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^{e6} は、Hであるか、あるいはOH、CN、SC(O)Ph、オキソ(=O)、SH、SO₂NH₂、SO₂(C₁~C₄)アルキル、SO₂NH(C₁~C₄)アルキル、ハロゲン、カルボニル、チオール、シアノ、NH₂、NH(C₁~C₄)アルキル、N[(C₁~C₄)アルキル]₂、C(O)NH₂、COOH、CO

50

OMe、アセチル、(C₁~C₈) アルキル、O (C₁~C₈) アルキル (すなわち C₁~C₈ アルコキシ)、O (C₁~C₈) ハロアルキル、(C₂~C₈) アルケニル、(C₂~C₈) アルキニル、ハロアルキル、チオアルキル、シアノメチレン、アルキルアミニル、アリール、ヘテロアリール、置換アリール、NH₂-C (O) -アルキレン、NH (Me) -C (O) -アルキレン、CH₂-C (O) -アルキル、C (O) -アルキル、アルキルカルボニルアミニル、CH₂-[CH (OH)]_m-(CH₂)_p-OH、CH₂-[CH (OH)]_m-(CH₂)_p-NH₂もしくはCH₂-アリール-アルコキシから独立して選択される1、2、3、4または5つの置換基で置換されていてもよいC₁~C₃₀アルキルであり、ここで、「m」および「p」は、独立して、1、2、3、4、5または6である。非限定的な一例において、R^{e6}はHである。他のいくつかの非限定的な例において、R^{e6}は、NH₂、OH、C (O) NH₂、COOH、ハロ、SH、およびC₁~C₆アルコキシから選択される置換基で置換されていてもよいC₁~C₃₀アルキルである。

10

【0174】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、R^eは、-CH (R^{e6}) -O-R^{e7}、ここで、R^{e7}は、H、-P (O) (OR^{e4})₂、-P (S) (OR^{e4})₂、-P (S) (SR^{e5}) (OR^{e4})、-P (S) (SR^{e5})₂、-OP (O) (OR^{e4})₂である。例えば、R^eは-CH (R^{e6}) -O-R^{e7}であり、ここで、R^{e6}はHまたは置換されていてもよいC₁~C₃₀アルキルであり、R^{e7}はHまたは-P (O) (OR^{e4})₂である。

【0175】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、R^eは-CH₂-O-R^{e2}であり、ここで、R^{e2}は水素または酸素保護基である。

20

【0176】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、R^eは-CH (R^{e6}) -S-R^{e8}であり、ここで、R^{e8}は、H、-P (O) (OR^{e4})₂、-P (S) (OR^{e4})₂、-P (S) (SR^{e5}) (OR^{e4})、-P (S) (SR^{e5})₂、-OP (O) (OR^{e4})₂である。

【0177】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、R^{a1}はハロゲンであり、R^bは置換されていてもよいC₁~₃₀アルキルであり、R^cは後続のヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合であり、R⁴はHであり、R^eは-C (R^{d1}) =CHR^{e1}である。例えば、R^{a1}はFであり、R^bは、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、t-ブチル、ビニル、エチニル、アリルまたはプロパルギルであり、R^cは、後続のヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合であり、R⁴はHであり、R^eは-C (R^{d1}) =CHR^{e1}である。本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、R^{a1}はFであり、R^bはメチルであり、R^cは後続のヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合であり、R⁴はHであり、R^eは-C (R^{d1}) =CHR^{e1}である。

30

【0178】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、R^{a1}はハロゲンであり、R^bは置換されていてもよいC₁~₃₀アルキルであり、R^cは後続のヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合であり、R⁴はHであり、R^eは-C (R^{d1}) =CHR^{e1}であり、ここで、R^{e1}は、-P (O) (OR^{e4})₂、-P (S) (OR^{e4})₂、-P (S) (SR^{e5}) (OR^{e4})、-P (S) (SR^{e5})₂、-OP (O) (OR^{e4})₂、-OP (S) (OR^{e4})₂、-OP (S) (SR^{e5}) (OR^{e4})、-OP (S) (SR^{e5})₂、-SP (O) (OR^{e4})₂、-SP (S) (OR^{e4})₂、-SP (S) (SR^{e5}) (OR^{e4})、-SP (S) (SR^{e5})₂、-OR^{e2}または-SR^{e3}である。例えば、R^{a1}はFであり、R^bは、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、t-ブチル、ビニル、エチニル、アリルまたはプロパルギルであり、R^cは、後続のヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合であり、R⁴はHであり、R^eは-C (R^{d1}) =CHR^{e1}であり、ここで、R^{e1}は、-P (O) (OR^{e4})₂、-P (S) (OR^{e4})₂、-P (S) (SR^{e5}) (OR^{e4})、-P (S) (SR^{e5})₂、-OP (O) (OR^{e4})₂、-OP (S) (OR^{e4})₂、-OP (S) (SR^{e5}) (OR^{e4})、-OP (S) (SR^{e5})₂、-SP (O) (OR^{e4})₂、-SP (S) (OR^{e4})₂、-SP (S) (SR^{e5}) (OR^{e4})、または-SP (S) (SR^{e5})₂であ

40

50

る。本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^a はFであり、 R^b はメチルであり、 R^c は後続のヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合であり、 R^d はHであり、 R^e は $-C(R^{d1})=CHR^{e1}$ であり、ここで、 R^{e1} は $-P(O)(OR^{e4})_2$ である。

【0179】

R^a

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^a は、ハロゲン、水素、 $-OR^{c2}$ 、 $-SR^{c3}$ 、置換されていてもよい $C_1\sim 30$ アルキル、 $C_1\sim 30$ ハロアルキル、置換されていてもよい $C_2\sim 30$ アルケニル、置換されていてもよい $C_2\sim 30$ アルキニル、または置換されていてもよい $C_1\sim 30$ アルコキシ、アミノ(NH_2)、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、ジヘテロアリールアミノ、アミノ酸、 $-O(CH_2CH_2O)_rCH_2CH_2OR^{c4}$ 、シアノ、アルキル-チオ-アルキル、チオアルコキシ、シクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、 $-NH(CH_2CH_2NH)_sCH_2CH_2-R^{c5}$ 、 $NHC(O)R^{c4}$ 、脂質、脂質に共有結合で取り付けられたリンカー、リガンド、リガンドに共有結合で取り付けられたリンカー、固形支持体、固形支持体に共有結合で取り付けられたリンカー、または反応性リン基である。

【0180】

上記局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^a が $-OR^{a2}$ である場合、 R^{a2} は水素またはヒドロキシル保護基であることができる。例えば、 R^{a2} は、本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様では、水素であることができる。

【0181】

R^a が $-SR^{a3}$ である場合、 R^{a3} は水素または硫黄保護基であることができる。したがって、上記局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^{a3} は水素である。

【0182】

R^a が $-O(CH_2CH_2O)_mCH_2CH_2OR^{a4}$ である場合、 m は1~50であり、 R^{a4} は、出現ごとに独立して、H、 $C_1\sim C_{30}$ アルキル、シクリル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アラルキル、糖または R^{a5} であり、 R^{a5} は、出現ごとに独立して、アミノ(NH_2)、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、またはジヘテロアリールアミノである。

【0183】

R^a が $-NH(CH_2CH_2NH)_nCH_2CH_2-R^{a5}$ である場合、 n は1~50であり、 R^{a5} は、出現ごとに独立して、アミノ(NH_2)、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、またはジヘテロアリールアミノである。

【0184】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^a は、水素、ハロゲン、 $-OR^{a2}$ 、または置換されていてもよい $C_1\sim C_{30}$ アルコキシである。例えば、 R^a は、ハロゲン、 $-OR^{a2}$ 、または置換されていてもよい $C_1\sim C_{30}$ アルコキシである。本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^a は、F、OHまたは置換されていてもよい $C_1\sim C_{30}$ アルコキシである。

【0185】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^a はハロゲンである。例えば、 R^a はフルオロ(F)である。

【0186】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^a は、OH、CN、 $SC(O)Ph$ 、オキソ(=O)、SH、 SO_2NH_2 、 $SO_2(C_1\sim C_4)$ アルキル、 $SO_2NH(C_1\sim C_4)$ アルキル、ハロゲン、カルボニル、チオール、シアノ、 NH_2 、 $NH(C_1\sim C_4)$ アルキル、 $N[(C_1\sim C_4)アルキル]_2$ 、 $C(O)NH_2$ 、 $COOH$ 、 $COOMe$ 、アセチル、 $(C_1\sim C_8)$ アルキル、 $O(C_1\sim C_8)$ アルキル(すなわち $C_1\sim C_8$ アルコキシ)、 $O(C_1\sim C_8)$ ハロアルキル、 $(C_2\sim C_8)$ アルケニル、 $(C_2\sim C_8)$ アルキニル、ハロアルキル、チ

オアルキル、シアノメチレン、アルキルアミノ、アリール、ヘテロアリール、置換アリール、 $\text{NH}_2\text{-C(O)-アルキレン}$ 、 NH(Me)-C(O)-アルキレン 、 $\text{CH}_2\text{-C(O)-アルキル}$ 、 C(O)-アルキル 、アルキルカルボニルアミノ、 $\text{CH}_2\text{-[CH(OH)]}_m\text{-(CH}_2)_p\text{-OH}$ 、 $\text{CH}_2\text{-[CH(OH)]}_m\text{-(CH}_2)_p\text{-NH}_2$ または $\text{CH}_2\text{-アリール-アルコキシ}$ から独立して選択される1、2、3、4または5つの置換基で置換されていてもよい $\text{C}_1\sim\text{C}_{30}$ アルコキシであり、ここで、「m」および「p」は、独立して、1、2、3、4、5または6である。例えば、 R^a は、 NH_2 、 OH 、 C(O)NH_2 、 COOH 、ハロ、 SH 、または $\text{C}_1\sim\text{C}_6$ アルコキシで置換されていてもよい、 $\text{C}_1\sim\text{C}_{30}$ アルコキシである。本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^a は $-\text{O(CH}_2)_p\text{CH}_3$ であり、ここでpは1～21である。例えば、pは、14、15、16、17または18である。非限定的な一例において、pは16である。

10

【0187】

上記局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^a は、 $-\text{O(CH}_2)_q\text{R}^{a7}$ であり、ここで、qは2～10であり、 R^{a7} は $\text{C}_1\sim\text{C}_6$ アルコキシ、アミノ(NH_2)、 CO_2H 、 OH またはハロである。例えば、 R^{a7} は $-\text{CH}_3$ または $-\text{NH}_2$ である。したがって、上記局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^a は $-\text{O(CH}_2)_q\text{-OMe}$ であるか、または R^a は $-\text{O(CH}_2)_q\text{-NH}_2$ である。

【0188】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、qは、2、3、4、5または6である。例えばqは、2、3または6である。非限定的な一例において、qは2である。非限定的な別の一例において、qは3または6である。

20

【0189】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^a は $\text{C}_1\sim\text{C}_6$ ハロアルキルである。例えば、 R^a は $\text{C}_1\sim\text{C}_4$ ハロアルキルである。本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^a は、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CF}_2\text{CF}_3$ 、 $-\text{CF}_2\text{CF}_2\text{CF}_3$ または $-\text{CF}_2(\text{CF}_3)_2$ である。

【0190】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^a は $-\text{OCH(CH}_2\text{OR}^{a8})\text{CH}_2\text{OR}^{a9}$ であり、ここで、 R^{a8} および R^{a9} は、独立して、H、置換されていてもよい $\text{C}_1\sim\text{C}_{30}$ アルキル、置換されていてもよい $\text{C}_2\sim\text{C}_{30}$ アルケニルまたは置換されていてもよい $\text{C}_2\sim\text{C}_{30}$ アルキニルである。例えば、 R^{a8} および R^{a9} は、独立して、置換されていてもよい $\text{C}_1\sim\text{C}_{30}$ アルキルである。

30

【0191】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^a は $-\text{CH}_2\text{C(O)NHR}^{a10}$ であり、ここで、 R^{a10} は、H、置換されていてもよい $\text{C}_1\sim\text{C}_{30}$ アルキル、置換されていてもよい $\text{C}_2\sim\text{C}_{30}$ アルケニルまたは置換されていてもよい $\text{C}_2\sim\text{C}_{30}$ アルキニルである。例えば、 R^{a10} は、Hまたは置換されていてもよい $\text{C}_1\sim\text{C}_{30}$ アルキルである。いくつかの態様において、 R^{a10} は置換されていてもよい $\text{C}_1\sim\text{C}_6$ アルキルである。

【0192】

上記局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^a はリン(III)基である。例えば、 R^a は反応性リン(III)基である。

40

【0193】

理論に拘泥するつもりはないが、反応性リン基は、例えばホスホジエステルおよびホスホロチオエートヌクレオシド間連結部を含むヌクレオシド間連結部を形成させるのに役立つ。そのような反応性リン基は当技術分野において公知であり、例えばホスホラミダイト、H-ホスホネート、ホスフェートトリエステルおよびリン含有キラル補助基など、 P^{III} または P^{V} 価電子状態のリン原子を含有する。反応性ホスファイトとしてホスホラミダイト(P^{III} ケミストリー)の形態にある反応性リン(III)基は、固相オリゴヌクレオチド合成のための、好ましい反応性リン(III)基である。続いて、中間体ホスファイト化合物を、公知の方法を使って P^{V} 状態まで酸化することにより、ホスホジエステルまたはホ

50

スホロチオエートヌクレオシド間連結部が得られる。

【0194】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、反応性ホスフェート基は、 $-OP(OR^P)N(R^{P2})_2$ 、 $-OP(SR^P)N(R^{P2})_2$ 、 $-OP(O)(OR^P)N(R^{P2})_2$ 、 $-OP(S)(OR^P)N(R^{P2})_2$ 、 $-OP(O)(SR^P)N(R^{P2})_2$ 、 $-OP(O)(OR^P)H$ 、 $-OP(S)(OR^P)H$ 、 $-OP(O)(SR^P)H$ 、 $-OP(O)(OR^P)R^{P3}$ 、 $-OP(S)(OR^P)R^{P3}$ 、または $-OP(O)(SR^P)R^{P3}$ である。例えば、反応性リン(III)基は $-OP(OR^P)N(R^{P2})_2$ である。

【0195】

上記局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^P は置換されていてもよい $C_1\sim 6$ アルキルである。例えば、 R^P は、で置換されていてもよい $C_1\sim 6$ アルキルである。

【0196】

OH、CN、SC(O)Ph、オキソ(=O)、SH、 SO_2NH_2 、 $SO_2(C_1\sim C_4)$ アルキル、 $SO_2NH(C_1\sim C_4)$ アルキル、ハロゲン、カルボニル、チオール、シアノ、 NH_2 、 $NH(C_1\sim C_4)$ アルキル、 $N[(C_1\sim C_4)アルキル]_2$ 、 $C(O)NH_2$ 、 $COOH$ 、 $COOMe$ 、アセチル、 $(C_1\sim C_8)$ アルキル、 $O(C_1\sim C_8)$ アルキル(すなわち $C_1\sim C_8$ アルコキシ)、 $O(C_1\sim C_8)$ ハロアルキル、 $(C_2\sim C_8)$ アルケニル、 $(C_2\sim C_8)$ アルキニル、ハロアルキル、チオアルキル、シアノメチレン、アルキルアミニル、アリール、ヘテロアリール、置換アリール、 $NH_2-C(O)-アルキレン$ 、 $NH(Me)-C(O)-アルキレン$ 、 $CH_2-C(O)-アルキル$ 、 $C(O)-アルキル$ 、アルキルカルボニルアミニル、 $CH_2-[CH(OH)]_m-(CH_2)_p-OH$ 、 $CH_2-[CH(OH)]_m-(CH_2)_p-NH_2$ または $CH_2-アリール-アルコキシ$ から独立して選択される1、2、3、4または5つの置換基、ここで、「m」および「p」は、独立して、1、2、3、4、5または6である。いくつかの態様において、 R^P は、CNまたは $-SC(O)Ph$ で置換されていてもよい、 $C_1\sim 6$ アルキルである。例えば、 R^P はシアノエチル($-CH_2CH_2CN$)である。

【0197】

反応性リン(III)基において、各 R^{P2} は、独立して、置換されていてもよい $C_1\sim 6$ アルキルである。例えば、各 R^{P2} は、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、n-ブチル、イソブチル、ペンチルまたはヘキシルから独立して選択することができる。反応性リン(III)基中に2つ以上の R^{P2} 基が存在する場合、それらは同じであることまたは異なることができる点に注意されたい。したがって、いくつかの非限定的な例において、2つ以上の R^{P2} 基が存在する場合、それらの R^{P2} 基は異なる。他のいくつかの非限定的な例において、2つ以上の R^{P2} 基が存在する場合、それらの R^{P2} 基は同じである。上記局面のいずれか一つのいくつかの態様において、各 R^{P2} はイソプロピルである。

【0198】

上記局面のいずれか一つのいくつかの態様において、両 R^{P2} は、それらが取り付けられている窒素原子と共に全体として、置換されていてもよい3~8員ヘテロシクリルを形成する。例示的なヘテロシクリルとしては、ピロリジニル、ピペラジニル、ジオキサニル、モルホリニル、テトラヒドロフラニル、ピペリジニル、4-モルホリル、4-ピペラジニル、ピロリジニル、パーヒドロピロリジニル(perhydropyrroliziny)、1,4-ジアザパーヒドロエピニル、1,3-ジオキサニル、1,4-ジオキサニルなどが挙げられるが、それらに限定されるわけではなく、これらはそれぞれ、任意で、OH、CN、SC(O)Ph、オキソ(=O)、SH、 SO_2NH_2 、 $SO_2(C_1\sim C_4)$ アルキル、 $SO_2NH(C_1\sim C_4)$ アルキル、ハロゲン、カルボニル、チオール、シアノ、 NH_2 、 $NH(C_1\sim C_4)$ アルキル、 $N[(C_1\sim C_4)アルキル]_2$ 、 $C(O)NH_2$ 、 $COOH$ 、 $COOMe$ 、アセチル、 $(C_1\sim C_8)$ アルキル、 $O(C_1\sim C_8)$ アルキル(すなわち $C_1\sim C_8$ アルコキシ)、 $O(C_1\sim C_8)$ ハロアルキル、 $(C_2\sim C_8)$ アルケニル、 $(C_2\sim C_8)$ アルキニル、ハロアルキル、チオアルキル、シアノメチレン、アルキルアミニル、アリール、ヘテロアリール、置換アリール、 $NH_2-C(O)-アルキレン$ 、 $NH(Me)-C(O)-アルキレン$ 、 $CH_2-C(O)-アルキル$ 、 $C(O)-アルキル$ 、アルキルカルボニルアミニル、 $CH_2-[CH(OH)]_m-(CH_2)_p-OH$ 、 C

$H_2-[CH(OH)]_m-(CH_2)_p-NH_2$ または CH_2 -アリール-アルコキシから独立して選択される1、2または3つの置換基で置換されていてもよく、ここで、「m」および「p」は、独立して、1、2、3、4、5または6である。

【0199】

上記局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^P と、 R^{P2} のうちの1つは、それらに取り付けられている原子と共に全体として、置換されていてもよい4～8員ヘテロシクリルを形成する。例示的なヘテロシクリルとしては、ピロリジニル、ピペラジニル、ジオキサニル、モルホリニル、テトラヒドロフラニル、ピペリジニル、4-モルホリル、4-ピペラジニル、ピロリジニル、パーヒドロピロリジニル、1,4-ジアザパーヒドロエピニル、1,3-ジオキサニル、1,4-ジオキサニルなどが挙げられるが、それらに限定されるわけではなく、これらはそれぞれ、任意で、OH、CN、SC(O)Ph、オキソ(=O)、SH、 SO_2NH_2 、 $SO_2(C_1\sim C_4)$ アルキル、 $SO_2NH(C_1\sim C_4)$ アルキル、ハロゲン、カルボニル、チオール、シアノ、 NH_2 、 $NH(C_1\sim C_4)$ アルキル、 $N[(C_1\sim C_4)アルキル]_2$ 、 $C(O)NH_2$ 、 $COOH$ 、 $COOMe$ 、アセチル、 $(C_1\sim C_8)$ アルキル、 $O(C_1\sim C_8)$ アルキル(すなわち $C_1\sim C_8$ アルコキシ)、 $O(C_1\sim C_8)$ ハロアルキル、 $(C_2\sim C_8)$ アルケニル、 $(C_2\sim C_8)$ アルキニル、ハロアルキル、チオアルキル、シアノメチレン、アルキルアミニル、アリール、ヘテロアリール、置換アリール、 $NH_2-C(O)-アルキレン$ 、 $NH(Me)-C(O)-アルキレン$ 、 $CH_2-C(O)-アルキル$ 、 $C(O)-アルキル$ 、アルキルカルボニルアミニル、 $CH_2-[CH(OH)]_m-(CH_2)_p-OH$ 、 $CH_2-[CH(OH)]_m-(CH_2)_p-NH_2$ または CH_2 -アリール-アルコキシから独立して選択される1、2または3つの置換基で置換されていてもよく、ここで、「m」および「p」は、独立して、1、2、3、4、5または6である。

【0200】

反応性リン(III)基において、各 R^{P3} は、独立して、置換されていてもよい $C_1\sim 6$ アルキルである。例えば、 R^{P3} は、OH、CN、SC(O)Ph、オキソ(=O)、SH、 SO_2NH_2 、 $SO_2(C_1\sim C_4)$ アルキル、 $SO_2NH(C_1\sim C_4)$ アルキル、ハロゲン、カルボニル、チオール、シアノ、 NH_2 、 $NH(C_1\sim C_4)$ アルキル、 $N[(C_1\sim C_4)アルキル]_2$ 、 $C(O)NH_2$ 、 $COOH$ 、 $COOMe$ 、アセチル、 $(C_1\sim C_8)$ アルキル、 $O(C_1\sim C_8)$ アルキル(すなわち $C_1\sim C_8$ アルコキシ)、 $O(C_1\sim C_8)$ ハロアルキル、 $(C_2\sim C_8)$ アルケニル、 $(C_2\sim C_8)$ アルキニル、ハロアルキル、チオアルキル、シアノメチレン、アルキルアミニル、アリール、ヘテロアリール、置換アリール、 $NH_2-C(O)-アルキレン$ 、 $NH(Me)-C(O)-アルキレン$ 、 $CH_2-C(O)-アルキル$ 、 $C(O)-アルキル$ 、アルキルカルボニルアミニル、 $CH_2-[CH(OH)]_m-(CH_2)_p-OH$ 、 $CH_2-[CH(OH)]_m-(CH_2)_p-NH_2$ または CH_2 -アリール-アルコキシから独立して選択される1、2、3、4または5つの置換基で置換されていてもよい $C_1\sim 6$ アルキルであることができ、ここで、「m」および「p」は、独立して、1、2、3、4、5または6である。例えば、 R^{P3} は、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、n-ブチル、イソブチル、ペンチルまたはヘキシルであり、これらはそれぞれ、任意で、 NH_2 、OH、 $C(O)NH_2$ 、 $COOH$ 、ハロ、SH、または $C_1\sim C_6$ アルコキシで置換されていてもよい。

【0201】

上記局面のいずれか一つのいくつかの態様において、反応性リン(III)基は-OP(OR^P)N(R^{P2})₂である。例えば、反応性リン(III)基は-OP(OR^P)N(R^{P2})₂であり、ここで、 R^P はシアノエチル(-CH₂CH₂CN)であり、各 R^{P2} はイソプロピルである。

【0202】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^a は反応性リン基である。例えば、 R^a は、-OP(OR^P)N(R^{P2})₂、-OP(SR^P)N(R^{P2})₂、-OP(O)(OR^P)N(R^{P2})₂、-OP(S)(OR^P)N(R^{P2})₂、-OP(O)(SR^P)N(R^{P2})₂、-OP(O)(OR^P)H、-OP(S)(OR^P)H、-OP(O)(SR^P)H、-OP(O)(OR^P)R^{P3}、-OP(S)(OR^P)R^{P3}、または-OP(O)(SR^P)R^{P3}である。

【0203】

上記局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^3 は、 $-OP(OR^P)N(R^{P2})_2$ 、 $-OP(SR^P)N(R^{P2})_2$ 、 $-OP(O)(OR^P)N(R^{P2})_2$ 、 $-OP(S)(OR^P)N(R^{P2})_2$ 、 $-OP(O)(SR^P)N(R^{P2})_2$ 、 $-OP(O)(OR^P)H$ 、 $-OP(S)(OR^P)H$ 、 $-OP(O)(SR^P)H$ 、 $-OP(O)(OR^P)R^{P3}$ 、 $-OP(S)(OR^P)R^{P3}$ 、または $-OP(O)(SR^P)R^{P3}$ であり、ここで、 R^P は置換されていてもよい $C_1\sim 6$ アルキルであり、各 R^{P2} は、独立して、置換されていてもよい $C_1\sim 6$ アルキルであり、各 R^{P3} は、独立して、置換されていてもよい $C_1\sim 6$ アルキルである。

【0204】

上記局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^a は $-OP(OR^P)N(R^{P2})_2$ である。例えば、 R^a は $-OP(OR^P)N(R^{P2})_2$ であり、ここで、 R^P はシアノエチル($-CH_2CH_2CN$)であり、各 R^{P2} はイソプロピルである。

10

【0205】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^a は固形支持体へのリンカーであることができる。

【0206】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^a はハロゲンであり、 R^b は置換されていてもよい $C_1\sim 30$ アルキルである。例えば、 R^a はFであり、 R^b は、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、t-ブチル、ビニル、エチニル、アリルまたはプロパルギルである。本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^a はFであり、 R^b はメチルである。

20

【0207】

R^3

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^3 は、水素、ハロゲン、 $-OR^{c2}$ 、 $-SR^{c3}$ 、置換されていてもよい $C_1\sim 30$ アルキル、 $C_1\sim 30$ ハロアルキル、置換されていてもよい $C_2\sim 30$ アルケニル、置換されていてもよい $C_2\sim 30$ アルキニル、または置換されていてもよい $C_1\sim 30$ アルコキシ、アミノ(NH_2)、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、ジヘテロアリールアミノ、アミノ酸、 $-O(CH_2CH_2O)_rCH_2CH_2OR^{c4}$ 、シアノ、アルキル-チオ-アルキル、チオアルコキシ、シクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、 $-NH(CH_2CH_2NH)_sCH_2CH_2-R^{c5}$ 、 $NHC(O)R^{c4}$ 、脂質、脂質に共有結合で取り付けられたリンカー、リガンド、リガンドに共有結合で取り付けられたリンカー、固形支持体、固形支持体に共有結合で取り付けられたリンカー、または反応性リン基である。

30

【0208】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^3 は反応性リン基である。例えば、 R^3 は、 $-OP(OR^P)N(R^{P2})_2$ 、 $-OP(SR^P)N(R^{P2})_2$ 、 $-OP(O)(OR^P)N(R^{P2})_2$ 、 $-OP(S)(OR^P)N(R^{P2})_2$ 、 $-OP(O)(SR^P)N(R^{P2})_2$ 、 $-OP(O)(OR^P)H$ 、 $-OP(S)(OR^P)H$ 、 $-OP(O)(SR^P)H$ 、 $-OP(O)(OR^P)R^{P3}$ 、 $-OP(S)(OR^P)R^{P3}$ 、または $-OP(O)(SR^P)R^{P3}$ である。

【0209】

上記局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^3 は、 $-OP(OR^P)N(R^{P2})_2$ 、 $-OP(SR^P)N(R^{P2})_2$ 、 $-OP(O)(OR^P)N(R^{P2})_2$ 、 $-OP(S)(OR^P)N(R^{P2})_2$ 、 $-OP(O)(SR^P)N(R^{P2})_2$ 、 $-OP(O)(OR^P)H$ 、 $-OP(S)(OR^P)H$ 、置換されていてもよい $C_1\sim 6$ アルキルであり、各 R^{P2} は、独立して、置換されていてもよい $C_1\sim 6$ アルキルであり、各 R^{P3} は、独立して、置換されていてもよい $C_1\sim 6$ アルキルである。

40

【0210】

上記局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^3 は $-OP(OR^P)N(R^{P2})_2$ である。例えば、 R^3 は $-OP(OR^P)N(R^{P2})_2$ であり、ここで、 R^P はシアノエチル($-CH_2CH_2CN$)であり、各 R^{P2} はイソプロピルである。

【0211】

50

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^3 は、固形支持体、または固形支持体に共有結合で取り付けられたリンカーである。

【0212】

上記局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^3 が $-OR^{c2}$ である場合、 R^{c2} は水素またはヒドロキシル保護基であることができる。例えば、 R^{c2} は、本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、水素であることができる。

【0213】

R^3 が $-SR^{c3}$ である場合、 R^{c3} は水素または硫黄保護基であることができる。したがって、上記局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^{c3} は水素である。

【0214】

R^3 が $-O(CH_2CH_2O)_rCH_2CH_2OR^{c4}$ である場合、 r は1~50であることができ、 R^{c4} は、出現ごとに独立して、 H 、 $C_1\sim C_{30}$ アルキル、シクリル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アラルキル、糖または R^{c5} であり、 R^{c5} は、出現ごとに独立して、アミノ(NH_2)、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、またはジヘテロアリールアミノである。

【0215】

R^3 が、 $-NH(CH_2CH_2NH)_sCH_2CH_2-R^{c5}$ である場合、 s は1~50であることができ、 R^{c5} は、出現ごとに独立して、アミノ(NH_2)、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、またはジヘテロアリールアミノであることができる。

【0216】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^3 は、水素、ハロゲン、 $-OR^{c2}$ 、または置換されていてもよい $C_1\sim C_{30}$ アルコキシである。例えば、 R^3 は、ハロゲン、 $-OR^{c2}$ 、または置換されていてもよい $C_1\sim C_{30}$ アルコキシである。本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^3 は、 F 、 OH または置換されていてもよい $C_1\sim C_{30}$ アルコキシである。

【0217】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^3 は、 OH 、 CN 、 $SC(O)Ph$ 、オキソ($=O$)、 SH 、 SO_2NH_2 、 $SO_2(C_1\sim C_4)$ アルキル、 $SO_2NH(C_1\sim C_4)$ アルキル、ハロゲン、カルボニル、チオール、シアノ、 NH_2 、 $NH(C_1\sim C_4)$ アルキル、 $N[(C_1\sim C_4)アルキル]_2$ 、 $C(O)NH_2$ 、 $COOH$ 、 $COOMe$ 、アセチル、 $(C_1\sim C_8)$ アルキル、 $O(C_1\sim C_8)$ アルキル(すなわち $C_1\sim C_8$ アルコキシ)、 $O(C_1\sim C_8)$ ハロアルキル、 $(C_2\sim C_8)$ アルケニル、 $(C_2\sim C_8)$ アルキニル、ハロアルキル、チオアルキル、シアノメチレン、アルキルアミニル、アリール、ヘテロアリール、置換アリール、 $NH_2-C(O)-アルキレン$ 、 $NH(Me)-C(O)-アルキレン$ 、 $CH_2-C(O)-アルキル$ 、 $C(O)-アルキル$ 、アルキルカルボニルアミニル、 $CH_2-[CH(OH)]_m-(CH_2)_p-OH$ 、 $CH_2-[CH(OH)]_m-(CH_2)_p-NH_2$ または $CH_2-アリール-アルコキシ$ から独立して選択される1、2、3、4または5つの置換基で置換されていてもよい $C_1\sim C_{30}$ アルコキシであり、ここで、「 m 」および「 p 」は、独立して、1、2、3、4、5または6である。例えば、 R^3 は、 NH_2 、 OH 、 $C(O)NH_2$ 、 $COOH$ 、ハロ、 SH 、または $C_1\sim C_6$ アルコキシで置換されていてもよい、 $C_1\sim C_{30}$ アルコキシである。本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^3 は $-O(CH_2)_tCH_3$ であり、ここで、 t は1~21である。例えば、 t は、14、15、16、17または18である。非限定的な一例において、 t は16である。

【0218】

上記局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^3 は $-O(CH_2)_uR^{c7}$ であり、ここで、 u は2~10であり、 R^{c7} は、 $C_1\sim C_6$ アルコキシ、アミノ(NH_2)、 CO_2H 、 OH またはハロである。例えば、 R^{c7} は $-CH_3$ または NH_2 である。したがって、本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^3 は $-O(CH_2)_u-OMe$ であるか、または R^{c7} は $-O(CH_2)_uNH_2$ である。

10

20

30

40

50

【0219】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 u は、2、3、4、5または6である。例えば、 u は、2、3または6である。非限定的な一例において、 u は2である。非限定的な別の一例において、 u は3または6である。

【0220】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^3 は $C_1 \sim C_6$ ハロアルキルである。例えば、 R^3 は $C_1 \sim C_4$ ハロアルキルである。本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^3 は、 $-CF_3$ 、 $-CF_2CF_3$ 、 $-CF_2CF_2CF_3$ または $-CF_2(CF_3)_2$ である。

【0221】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^3 は $-OCH(CH_2OR^{c8})CH_2OR^{c8}$ であり、ここで、 R^{c8} および R^{c9} は、独立して、H、置換されていてもよい $C_1 \sim C_{30}$ アルキル、置換されていてもよい $C_2 \sim C_{30}$ アルケニルまたは置換されていてもよい $C_2 \sim C_{30}$ アルキニルである。例えば、 R^{c8} および R^{c9} は、独立して、置換されていてもよい $C_1 \sim C_{30}$ アルキルである。

【0222】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^c は $-CH_2C(O)NHR^{c10}$ であり、ここで、 R^{c10} は、H、置換されていてもよい $C_1 \sim C_{30}$ アルキル、置換されていてもよい $C_2 \sim C_{30}$ アルケニルまたは置換されていてもよい $C_2 \sim C_{30}$ アルキニルである。例えば、 R^{c10} は、Hまたは置換されていてもよい $C_1 \sim C_{30}$ アルキルである。いくつかの態様において、 R^{a10} は置換されていてもよい $C_1 \sim C_6$ アルキルである。

【0223】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^a はハロゲンであり、 R^b は置換されていてもよい $C_1 \sim C_{30}$ アルキルであり、 R^3 は、ヒドロキシル、保護されたヒドロキシル、反応性リン基（例えば $-OP(OR^P)N(R^{P2})_2$ 、 $-OP(SR^P)N(R^{P2})_2$ 、 $-OP(O)(OR^P)N(R^{P2})_2$ 、 $-OP(S)(OR^P)N(R^{P2})_2$ 、 $-OP(O)(SR^P)N(R^{P2})_2$ 、 $-OP(O)(OR^P)H$ 、 $-OP(S)(OR^P)H$ 、 $-OP(O)(SR^P)H$ 、 $-OP(O)(OR^P)R^{P3}$ 、 $-OP(S)(OR^P)R^{P3}$ 、または $-OP(O)(SR^P)R^{P3}$ ）、固形支持体、または固形支持体に共有結合で連結されたリンカーである。例えば、 $R^{a'}$ はFであり、 R^b は、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、t-ブチル、ビニル、エチニル、アリルまたはプロパルギルであり、 R^3 は、ヒドロキシル、保護されたヒドロキシル、反応性リン基（例えば $-OP(OR^P)N(R^{P2})_2$ 、 $-OP(SR^P)N(R^{P2})_2$ 、 $-OP(O)(OR^P)N(R^{P2})_2$ 、 $-OP(S)(OR^P)N(R^{P2})_2$ 、 $-OP(O)(SR^P)N(R^{P2})_2$ 、 $-OP(O)(OR^P)H$ 、 $-OP(S)(OR^P)H$ 、 $-OP(O)(SR^P)H$ 、 $-OP(O)(OR^P)R^{P3}$ 、 $-OP(S)(OR^P)R^{P3}$ 、または $-OP(O)(SR^P)R^{P3}$ ）、固形支持体、または固形支持体に共有結合で連結されたリンカーである。本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 $R^{a'}$ はFであり、 R^b はメチルであり、 R^3 は、ヒドロキシル、保護されたヒドロキシル、反応性リン基（例えば $-OP(OR^P)N(R^{P2})_2$ 、 $-OP(SR^P)N(R^{P2})_2$ 、 $-OP(O)(OR^P)N(R^{P2})_2$ 、 $-OP(S)(OR^P)N(R^{P2})_2$ 、 $-OP(O)(SR^P)N(R^{P2})_2$ 、 $-OP(O)(OR^P)H$ 、 $-OP(S)(OR^P)H$ 、 $-OP(O)(SR^P)H$ 、 $-OP(O)(OR^P)R^{P3}$ 、 $-OP(S)(OR^P)R^{P3}$ 、または $-OP(O)(SR^P)R^{P3}$ ）、固形支持体、または固形支持体に共有結合で連結されたリンカーである。

【0224】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^a はハロゲンであり、 R^b は置換されていてもよい $C_1 \sim C_{30}$ アルキルであり、 R^3 は、ヒドロキシル、保護されたヒドロキシル、 $-OP(OR^P)N(R^{P2})_2$ 、または固形支持体に共有結合で連結されたリンカーである。例えば、 $R^{a'}$ はFであり、 R^b は、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、t-ブチル、ビニル、エチニル、アリルまたはプロパルギルであり、および R^3 は、ヒドロキシル、保護されたヒドロキシル、 $-OP(OR^P)N(R^{P2})_2$

10

20

30

40

50

、または固形支持体に共有結合で連結されたリンカーである。本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 $R^{a'}$ はFであり、 R^b はメチルであり、 R^3 は、ヒドロキシル、保護されたヒドロキシル、 $-OP(OR^P)N(R^{P2})_2$ 、または固形支持体に共有結合で連結されたリンカーである。

【0225】

R^5

本明細書記載のさまざまな局面のいくつかの態様において、 R^5 は、置換されていてもよい $C_1\sim 6$ アルキル- R^{5a} 、置換されていてもよい $C_2\sim 6$ アルケニル- R^{5a} 、または置換されていてもよい $C_2\sim 6$ アルキニル- R^{5a} であり、ここで、 R^{5a} は、 $-OR^{5b}$ 、 $-SR^{5c}$ 、水素、リン(III)基、固形支持体、または固形支持体へのリンカーであることができる。 R^{5a} が $-OR^{5b}$ である場合、 R^{5b} はHまたはヒドロキシル保護基であることができる。同様に、 R^{5a} が $-SR^{5c}$ である場合、 R^{5c} はHまたは硫黄保護基であることができる。

10

【0226】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^5 は $-CH(R^{5d})-R^{5a}$ であり、ここで、 R^{5d} は、水素、ハロゲン、置換されていてもよい $C_1\sim C_{30}$ アルキル、置換されていてもよい $C_2\sim C_{30}$ アルケニル、置換されていてもよい $C_2\sim C_{30}$ アルキニル、または置換されていてもよい $C_1\sim C_{30}$ アルコキシである。

【0227】

上記局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^5 が $-CH(R^{5d})-R^{5a}$ である場合、 R^{5d} はHであるか、あるいはOH、CN、 $SC(O)Ph$ 、オキソ(=O)、SH、 SO_2NH_2 、 $SO_2(C_1\sim C_4)$ アルキル、 $SO_2NH(C_1\sim C_4)$ アルキル、ハロゲン、カルボニル、チオール、シアノ、 NH_2 、 $NH(C_1\sim C_4)$ アルキル、 $N[(C_1\sim C_4)アルキル]_2$ 、 $C(O)NH_2$ 、 $COOH$ 、 $COOMe$ 、アセチル、 $(C_1\sim C_8)$ アルキル、 $O(C_1\sim C_8)$ アルキル(すなわち $C_1\sim C_8$ アルコキシ)、 $O(C_1\sim C_8)$ ハロアルキル、 $(C_2\sim C_8)$ アルケニル、 $(C_2\sim C_8)$ アルキニル、ハロアルキル、チオアルキル、シアノメチレン、アルキルアミニル、アリール、ヘテロアリール、置換アリール、 $NH_2-C(O)-アルキレン$ 、 $NH(Me)-C(O)-アルキレン$ 、 $CH_2-C(O)-アルキル$ 、 $C(O)-アルキル$ 、アルキルカルボニルアミニル、 $CH_2-[CH(OH)]_m-(CH_2)_p-OH$ 、 $CH_2-[CH(OH)]_m-(CH_2)_p-NH_2$ もしくは $CH_2-アリール-アルコキシ$ から独立して選択される1、2、3、4または5つの置換基で置換されていてもよい $C_1\sim C_{30}$ アルキルであり、ここで、「m」および「p」は、独立して、1、2、3、4、5または6である。例えば、 R^{5d} はHである。他のいくつかの非限定的な例において、 R^{5d} は、 NH_2 、OH、 $C(O)NH_2$ 、 $COOH$ 、ハロ、SH、または $C_1\sim C_6$ アルコキシで置換されていてもよい、 $C_1\sim C_{30}$ アルキルである。

20

30

【0228】

本明細書記載のさまざまな局面のいくつかの態様において、 R^5 は $-CH(R^{5d})-O-R^{5b}$ であり、ここで、 R^{5d} は、Hであるか、あるいはOH、CN、 $SC(O)Ph$ 、オキソ(=O)、SH、 SO_2NH_2 、 $SO_2(C_1\sim C_4)$ アルキル、 $SO_2NH(C_1\sim C_4)$ アルキル、ハロゲン、カルボニル、チオール、シアノ、 NH_2 、 $NH(C_1\sim C_4)$ アルキル、 $N[(C_1\sim C_4)アルキル]_2$ 、 $C(O)NH_2$ 、 $COOH$ 、 $COOMe$ 、アセチル、 $(C_1\sim C_8)$ アルキル、 $O(C_1\sim C_8)$ アルキル(すなわち $C_1\sim C_8$ アルコキシ)、 $O(C_1\sim C_8)$ ハロアルキル、 $(C_2\sim C_8)$ アルケニル、 $(C_2\sim C_8)$ アルキニル、ハロアルキル、チオアルキル、シアノメチレン、アルキルアミニル、アリール、ヘテロアリール、置換アリール、 $NH_2-C(O)-アルキレン$ 、 $NH(Me)-C(O)-アルキレン$ 、 $CH_2-C(O)-アルキル$ 、 $C(O)-アルキル$ 、アルキルカルボニルアミニル、 $CH_2-[CH(OH)]_m-(CH_2)_p-OH$ 、 $CH_2-[CH(OH)]_m-(CH_2)_p-NH_2$ もしくは $CH_2-アリール-アルコキシ$ から独立して選択される1、2、3、4または5つの置換基で置換されていてもよい $C_1\sim C_{30}$ アルキルであり、ここで、「m」および「p」は、独立して、1、2、3、4、5または6である。例えば、 R^{5d} はHである。他のいくつかの非限定的な例において、 R^{5d} は、 NH_2 、OH、 $C(O)NH_2$ 、 $COOH$ 、ハロ、SH、または $C_1\sim C_6$ アルコキシで置換されていてもよい、 $C_1\sim C_{30}$ アルキルである。

40

50

【0229】

本明細書記載のさまざまな局面のいくつかの態様において、 R^5 は、置換されていてもよい $C_1\sim 6$ アルキル- R^{5a} 、または置換されていてもよい $-C_2\sim 6$ アルケニル- R^{5a} である。

【0230】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^5 は $-C(R^{5d})=CHR^{5a}$ である。 $-C(R^{5d})=CHR^{5a}$ 中の二重結合はシス配置またはトランス配置であることができる点に注意されたい。したがって、上記局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^d は $-C(R^{5d})=CHR^{5a}$ であり、ここで二重結合はシス配置である。上記局面のいずれか一つの他のいくつかの態様において、 R^d は $-C(R^{5d})=CHR^{5a}$ であり、ここで二重結合はトランス配置である。

10

【0231】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^5 は $-CH=CHR^{5a}$ である。例えば、 R^5 は $-CH=CHR^{5a}$ であり、ここで二重結合はトランス配置である。他のいくつかの非限定的な例において、 R^5 は $-CH=CHR^{5a}$ であり、ここで二重結合はシス配置である。

【0232】

上記局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^5 が $-C(R^{5d})=CHR^{5a}$ である場合、 R^{5d} は、Hであるか、あるいはOH、CN、SC(O)Ph、オキソ(=O)、SH、SO₂NH₂、SO₂(C₁~C₄)アルキル、SO₂NH(C₁~C₄)アルキル、ハロゲン、カルボニル、チオール、シアノ、NH₂、NH(C₁~C₄)アルキル、N[(C₁~C₄)アルキル]₂、C(O)NH₂、COOH、COOMe、アセチル、(C₁~C₈)アルキル、O(C₁~C₈)アルキル(すなわちC₁~C₈アルコキシ)、O(C₁~C₈)ハロアルキル、(C₂~C₈)アルケニル、(C₂~C₈)アルキニル、ハロアルキル、チオアルキル、シアノメチレン、アルキルアミニル、アリール、ヘテロアリール、置換アリール、NH₂-C(O)-アルキレン、NH(Me)-C(O)-アルキレン、CH₂-C(O)-アルキル、C(O)-アルキル、アルキルカルボニルアミニル、CH₂-[CH(OH)]_m-(CH₂)_p-OH、CH₂-[CH(OH)]_m-(CH₂)_p-NH₂もしくはCH₂-アリール-アルコキシから独立して選択される1、2、3、4または5つの置換基で置換されていてもよいC₁~C₃₀アルキルであり、ここで、「m」および「p」は、独立して、1、2、3、4、5または6であり、 R^{5a} はリン(III)基である。例えば、 R^5 は $-CH=CHR^{5a}$ である。

20

30

【0233】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^{5a} は反応性リン(III)基である。

【0234】

上記局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^{5a} は、 $-P(O)(OR^{5e})_2$ 、 $-P(S)(OR^{5e})_2$ 、 $-P(S)(SR^{5f})(OR^{5e})$ 、 $-P(S)(SR^{5f})_2$ 、 $-OP(O)(OR^{5e})_2$ 、 $-OP(S)(OR^{5e})_2$ 、 $-OP(S)(SR^{5f})(OR^{5e})$ 、 $-OP(S)(SR^{5f})_2$ 、 $-SP(O)(OR^{5e})_2$ 、 $-SP(S)(OR^{5e})_2$ 、 $-SP(S)(SR^{5f})(OR^{5e})$ 、または $-SP(S)(SR^{5f})_2$ であり、ここで、各 R^{5e} は、独立して、水素、置換されていてもよいC₁~30アルキル、置換されていてもよいC₂~30アルケニル、置換されていてもよいC₂~30アルキニル、酸素保護基、または総電荷が+1のアルカリ金属もしくは遷移金属であり、各 R^{5f} は、独立して、水素、置換されていてもよいC₁~30アルキル、置換されていてもよいC₂~30アルケニル、または置換されていてもよいC₂~30アルキニル、または硫黄保護基である。

40

【0235】

上記局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^5 は、 $-CH=CH-P(O)(OR^{5e})_2$ 、 $-CH=CH-P(S)(OR^{5e})_2$ 、 $-CH=CH-P(S)(SR^{5f})(OR^{5e})$ 、 $-CH=CH-P(S)(SR^{5f})_2$ 、 $-CH=CH-OP(O)(OR^{5e})_2$ 、 $-CH=CH-OP(S)(OR^{5e})_2$ 、 $-CH=CH-OP(S)(SR^{5f})(OR^{5e})$ 、 $-CH=CH-OP(S)(SR^{5f})_2$ 、 $-CH=CH-SP(O)(OR^{5e})_2$ 、 $-CH=CH-SP(S)(OR^{5e})_2$ 、 $-CH=CH-SP(S)(SR^{5f})(OR^{5e})$ 、

50

OR^{5e})、または-CH=CH-SP(S)(SR^{5f})₂であり、ここで、各R^{5e}は、独立して、水素、置換されていてもよいC₁~₃₀アルキル、置換されていてもよいC₂~₃₀アルケニル、置換されていてもよいC₂~₃₀アルキニル、酸素保護基、または総電荷が+1のアルカリ金属もしくは遷移金属であり、各R^{5f}は、独立して、水素、置換されていてもよいC₁~₃₀アルキル、置換されていてもよいC₂~₃₀アルケニル、または置換されていてもよいC₂~₃₀アルキニル、または硫黄保護基である。

【0236】

上記局面のいずれか一つのいくつかの態様において、-P(O)(OR^{5e})₂、-P(S)(OR^{5e})₂、-P(S)(SR^{5f})(OR^{5e})、-OP(O)(OR^{5e})₂、-OP(S)(OR^{5e})₂、-OP(S)(SR^{5f})(OR^{5e})、SP(O)(OR^{5e})₂、-SP(S)(OR^{5e})₂、および-SP(S)(SR^{5f})(OR^{5e})中の少なくとも1つのR^{5e}は、水素である。

10

【0237】

上記局面のいずれか一つの他のいくつかの態様において、-P(O)(OR^{5e})₂、-P(S)(OR^{5e})₂、-P(S)(SR^{5f})(OR^{5e})、-OP(O)(OR^{5e})₂、-OP(S)(OR^{5e})₂、-OP(S)(SR^{5f})(OR^{5e})、SP(O)(OR^{5e})₂、-SP(S)(OR^{5e})₂、または-SP(S)(SR^{5f})(OR^{5e})中の少なくとも1つのR^{5e}は、水素ではない。例えば、P(O)(OR^{5e})₂、-P(S)(OR^{5e})₂、-P(S)(SR^{5f})(OR^{5e})、-OP(O)(OR^{5e})₂、-OP(S)(OR^{5e})₂、-OP(S)(SR^{5f})(OR^{5e})、SP(O)(OR^{5e})₂、-SP(S)(OR^{5e})₂、および-SP(S)(SR^{5f})(OR^{5e})中の少なくとも1つの少なくとも1つのR^{5e}は、置換されていてもよいC₁~₃₀アルキル、置換されていてもよいC₂~₃₀アルケニル、または置換されていてもよいC₂~₃₀アルキニル、または酸素保護基である。

20

【0238】

上記局面のいずれか一つのいくつかの態様では、-P(O)(OR^{5e})₂、-P(S)(OR^{5e})₂、-P(S)(SR^{5f})(OR^{5e})、-OP(O)(OR^{5e})₂、-OP(S)(OR^{5e})₂、-OP(S)(SR^{5f})(OR^{5e})、SP(O)(OR^{5e})₂、-SP(S)(OR^{5e})₂、および-SP(S)(SR^{5f})(OR^{5e})において、少なくとも1つのR^{5e}はHであり、少なくとも1つのR^{5e}はH以外である。

【0239】

上記局面のいずれか一つのいくつかの態様では、-P(O)(OR^{5e})₂、-P(S)(OR^{5e})₂、-P(S)(SR^{5f})(OR^{5e})、-OP(O)(OR^{5e})₂、-OP(S)(OR^{5e})₂、-OP(S)(SR^{5f})(OR^{5e})、-OP(S)(SR^{5f})₂、-SP(O)(OR^{5e})₂、-SP(S)(OR^{5e})₂、-SP(S)(SR^{5f})(OR^{5e})、および-SP(S)(SR^{5f})₂において、すべてのR^{5e}がHである。

30

【0240】

上記局面のいずれか一つのいくつかの態様では、-P(O)(OR^{5e})₂、-P(S)(OR^{5e})₂、-P(S)(SR^{5f})(OR^{5e})、-OP(O)(OR^{5e})₂、-OP(S)(OR^{5e})₂、-OP(S)(SR^{5f})(OR^{5e})、-OP(S)(SR^{5f})₂、-SP(O)(OR^{5e})₂、-SP(S)(OR^{5e})₂、-SP(S)(SR^{5f})(OR^{5e})、および-SP(S)(SR^{5f})₂において、すべてのR^{5e}がH以外である。

40

【0241】

上記局面のいずれか一つのいくつかの態様において、-P(S)(SR^{5f})(OR^{5e})、-P(S)(SR^{5f})₂、-OP(S)(OR^{5e})₂、-OP(S)(SR^{5f})(OR^{5e})、-OP(S)(SR^{5f})₂、-SP(S)(SR^{5f})(OR^{5e})、および-SP(S)(SR^{5f})₂中の少なくとも1つのR^{5f}は、Hである。

【0242】

上記局面のいずれか一つのいくつかの態様において、-P(S)(SR^{5f})(OR^{5e})、-P(S)(SR^{5f})₂、-OP(S)(OR^{5e})₂、-OP(S)(SR^{5f})(OR^{5e})、-OP(S)(SR^{5f})₂、-SP(S)(SR^{5f})(OR^{5e})、および-SP(S)(SR^{5f})₂中の少なくとも1つのR^{5f}は、H以外である。例えば、-P(S)(SR^{5f})(OR^{5e})、-P(S)(SR^{5f})₂

50

、-OP(S)(OR^{5e})₂、-OP(S)(SR^{5f})(OR^{5e})、-OP(S)(SR^{5f})₂、-SP(S)(SR^{5f})(OR^{5e})、および-SP(S)(SR^{5f})₂中の少なくとも1つのR^{5f}は、置換されていてもよいC₁~₃₀アルキル、置換されていてもよいC₂~₃₀アルケニル、または置換されていてもよいC₂~₃₀アルキニル、または硫黄保護基である。

【0243】

上記局面のいずれか一つのいくつかの態様では、-P(S)(SR^{5f})₂、-OP(S)(SR^{5f})₂、および-SP(S)(SR^{5f})₂において、少なくとも1つのR^{5f}はHであり、少なくとも1つのR^{5f}はH以外である。

【0244】

いくつかの態様では、-P(S)(SR^{5f})(OR^{5e})、-P(S)(SR^{5f})₂、-OP(S)(OR^{5e})₂、-OP(S)(SR^{5f})(OR^{5e})、-OP(S)(SR^{5f})₂、-SP(S)(SR^{5f})(OR^{5e})、および-SP(S)(SR^{5f})₂において、すべてのR^{5f}がHである。

10

【0245】

いくつかの態様では、-P(S)(SR^{5f})(OR^{5e})、-P(S)(SR^{5f})₂、-OP(S)(OR^{5e})₂、-OP(S)(SR^{5f})(OR^{5e})、-OP(S)(SR^{5f})₂、-SP(S)(SR^{5f})(OR^{5e})、および-SP(S)(SR^{5f})₂において、すべてのR^{5f}がH以外である。

【0246】

上記局面のいずれか一つのいくつかの態様において、R⁵は-CH=CH-P(O)(OR^{5e})₂であり、ここで、各R^{5e}はHまたは酸素保護基である。

【0247】

上記局面のいずれか一つのいくつかの態様において、R⁵は-CH=CH-P(O)(OR^{5e})₂であり、ここで、二重結合はトランス配置である。上記局面のいずれか一つの他のいくつかの態様において、R⁵は-CH=CH-P(O)(OR^{5e})₂であり、ここで、二重結合はシス配置である。

20

【0248】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、R^aはハロゲンであり、R^bは置換されていてもよいC₁~₃₀アルキルであり、R³は、ヒドロキシル、保護されたヒドロキシル、反応性リン基（例えば、-OP(OR^p)N(R^{p2})₂、-OP(SR^p)N(R^{p2})₂、-OP(O)(OR^p)N(R^{p2})₂、-OP(S)(OR^p)N(R^{p2})₂、-OP(O)(SR^p)N(R^{p2})₂、-OP(O)(OR^p)H、-OP(S)(OR^p)H、-OP(O)(SR^p)H、-OP(O)(OR^p)R^{p3}、-OP(S)(OR^p)R^{p3}、または-OP(O)(SR^p)R^{p3})、固形支持体、または固形支持体に共有結合で連結されたリンカーであり、R⁴はHであり、R⁵は-CH=CH-P(O)(OR^{5e})₂である。例えば、R^{a'}はFであり、R^bは、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、t-ブチル、ビニル、エチニル、アリルまたはプロパルギルであり、R³は、ヒドロキシル、保護されたヒドロキシル、反応性リン基（例えば、-OP(OR^p)N(R^{p2})₂、-OP(SR^p)N(R^{p2})₂、-OP(O)(OR^p)N(R^{p2})₂、-OP(S)(OR^p)N(R^{p2})₂、-OP(O)(SR^p)N(R^{p2})₂、-OP(O)(OR^p)H、-OP(S)(OR^p)H、-OP(O)(SR^p)H、-OP(O)(OR^p)R^{p3}、-OP(S)(OR^p)R^{p3}、または-OP(O)(SR^p)R^{p3})、固形支持体、または固形支持体に共有結合で連結されたリンカーであり、R⁴はHであり、R⁵は-CH=CH-P(O)(OR^{5e})₂である。本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、R^{a'}はFであり、R^bはメチルであり、R³は、ヒドロキシル、保護されたヒドロキシル、反応性リン基（例えば、-OP(OR^p)N(R^{p2})₂、-OP(SR^p)N(R^{p2})₂、-OP(O)(OR^p)N(R^{p2})₂、-OP(S)(OR^p)N(R^{p2})₂、-OP(O)(SR^p)N(R^{p2})₂、-OP(O)(OR^p)H、-OP(S)(OR^p)H、-OP(O)(SR^p)H、-OP(O)(OR^p)R^{p3}、-OP(S)(OR^p)R^{p3}、または-OP(O)(SR^p)R^{p3})、固形支持体、または固形支持体に共有結合で連結されたリンカーであり、R⁴はHであり、R⁵は-CH=CH-P(O)(OR^{5e})₂である。

30

40

【0249】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、R^aはハロゲンであり

50

、 R^b は置換されていてもよい $C_{1\sim 30}$ アルキルであり、 R^3 は、ヒドロキシル、保護されたヒドロキシル、 $-OP(OR^P)N(R^{P2})_2$ 、または固形支持体に共有結合で連結されたリンカーであり、 R^4 はHであり、 R^5 は $-CH=CH-P(O)(OR^{5e})_2$ である。例えば、 $R^{a'}$ はFであり、 R^b は、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、*t*-ブチル、ビニル、エチニル、アリルまたはプロパルギルであり、 R^3 は、ヒドロキシル、保護されたヒドロキシル、 $-OP(OR^P)N(R^{P2})_2$ 、または固形支持体に共有結合で連結されたリンカーであり、 R^4 はHであり、 R^5 は $-CH=CH-P(O)(OR^{5e})_2$ である。本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 $R^{a'}$ はFであり、 R^b はメチルであり、 R^3 は、ヒドロキシル、保護されたヒドロキシル、 $-OP(OR^P)N(R^{P2})_2$ 、または固形支持体に共有結合で連結されたリンカーであり、 R^4 はHであり、 R^5 は $-CH=CH-P(O)(OR^{5e})_2$ である。

10

【0250】

ヌクレオシド間連結部

本明細書にいう「ヌクレオシド間連結部」とは、隣接するヌクレオシド間の共有結合による連結部を指す。ヌクレオシド間連結部の2つの主要クラスは、リン原子の有無によって定義される。代表的なリン含有連結部として、ホスホジエステル($P=O$)、ホスホトリエステル、メチルホスホネート、ホスホラミデート、およびホスホロチオエート($P=S$)などが挙げられるが、それらに限定されるわけではない。代表的な非リン含有連結部として、メチレンメチルイミノ($-CH_2-N(CH_3)-O-CH_2-$)、チオジエステル($-O-C(O)-S-$)、チオノカルバメート($-O-C(O)(NH)-S-$)、シロキサン($-O-Si(H)_2-O-$)、および N,N' -ジメチルヒドラジン($-CH_2-N(CH_3)-N(CH_3)-$)などが挙げられるが、それらに限定されるわけではない。修飾ヌクレオシド間連結部は、天然ホスホジエステル連結部と比較して、オリゴヌクレオチド化合物のヌクレアーゼ耐性を変化させるために、典型的には増加させるために使用することができる。一定の態様において、キラル原子を有する連結部は、ラセミ混合物として、別々のエナンチオマーとして、調製することができる。代表的なキラル連結部として、アルキルホスホネートおよびホスホロチオエートが挙げられるが、それらに限定されるわけではない。リン(III)含有および非リン(III)含有連結部の調製方法は当業者には周知である。

20

【0251】

ヌクレオシド間連結部中のホスフェート基は、その酸素のうちの一つを異なる置換基で置き換えることによって修飾することができる。この修飾の結果の一つは、核酸分解による崩壊(nucleolytic breakdown)に対するオリゴヌクレオチドの耐性の増加でありうる。修飾ホスフェート基の例としては、ホスホロチオエート、ホスホロセネート、ボラノホスフェート、ボラノホスフェートエステル、ハイドロゲンホスホネート、ホスホロアミデート、アルキルまたはアリールホスホネートおよびホスホトリエステルが挙げられる。いくつかの態様において、ホスホジエステルヌクレオシド間連結部中の非架橋ホスフェート酸素原子のうちの1つは、以下のいずれかによって置き換えることができる: S 、 Se 、 BR_3 (R は、水素、アルキル、アリールである)、 C (すなわち、アルキル基、アリール基など……)、 H 、 NR_2 (R は、水素、置換されていてもよいアルキル、アリールである)、または OR (R は置換されていてもよいアルキルまたはアリールである)。無修飾ホスフェート基中のリン(III)原子はアキラルである。しかし、非架橋酸素のうちの1つを上記の原子または原子団のうちの1つで置き換えると、リン(III)原子がキラルになる。言い換えると、このような形で修飾されたホスフェート基中のリン(III)原子は不斉中心である。不斉リン(III)原子は「 R 」立体配置(本明細書では R_p という)または「 S 」立体配置(本明細書では S_p という)のどちらかを有することができる。

30

40

【0252】

ホスホロジチオエートは両方の非架橋酸素が硫黄で置換されている。ホスホロジチオエート中のリン中心はアキラルであり、これにより、オリゴヌクレオチドジアステレオマーの形成は排除される。したがって、理論に束縛されることは望まないが、キラル中心を除去する両方の非架橋酸素への修飾、例えばホスホロジチオエート形成は、ジアステレオマ

50

一混合物を生じさせることができないという点で望ましい場合がある。非架橋酸素は、独立して、O、S、Se、B、C、H、N、またはOR（Rはアルキルまたはアリール）のいずれかであることができる。

【0253】

ホスホジエステルヌクレオシド間連結部は、窒素（架橋ホスホロアミデート）、硫黄（架橋ホスホロチオエート）および炭素（架橋メチレンスルホネート）による架橋酸素（すなわちホスフェートをヌクレオシドの糖に連結する酸素）の置き換えによって修飾することもできる。置き換えは連結酸素のうちの一方で、または両方の連結酸素で、行うことができる。架橋酸素がヌクレオシドの3'-酸素である場合は、炭素による置き換えが好ましい。架橋酸素がヌクレオシドの5'-酸素である場合は、窒素による置き換えが好ましい。

10

【0254】

ホスフェートに連結された酸素のうちの少なくとも1つが置き換えられているかまたはホスフェート基が非リン（III）基で置き換えられている修飾ホスフェート連結部を、「非ホスホジエステル糖間連結部」または「非ホスホジエステルリンカー」ともいう。

【0255】

一定の態様において、ホスフェート基は、非リン含有コネクタ（non-phosphorus containing connector）、例えばデホスホリンカー（dephospho linker）で置き換えることができる。デホスホリンカーを本明細書では非ホスホジエステルリンカーともいう。理論に束縛されることは望まないが、荷電ホスホジエステル基は核酸分解による分解（nucleolytic degradation）における反応中心であるので、中性構造ミミックによるその置き換えは、強化されたヌクレアーゼ安定性を付与するはずである。ここでも理論に束縛されることは望まないが、いくつかの態様では、荷電ホスフェート基が中性部分で置き換えられる改変を導入することが望ましい場合がある。

20

【0256】

ホスフェート基を置き換えることができる部分の例として、アミド（例えばアミド-3（3'-CH₂-C(=O)-N(H)-5'）およびアミド-4（3'-CH₂-N(H)-C(=O)-5'））、ヒドロキシルアミノ、シロキサン（ジアルキルシロキサン）、カルボキサミド、カーボネート、カルボキシメチル、カルバメート、カルボン酸エステル、チオエーテル、エチレンオキシドリンカー、スルフィド、スルホネート、スルホンアミド、スルホン酸エステル、チオホルムアセタール（3'-S-CH₂-O-5'）、ホルムアセタール（3'-O-CH₂-O-5'）、オキシム、メチレンイミノ、メチケンカルボニルアミノ（methykenecarbonyl amino）、メチレンメチルイミノ（MMI、3'-CH₂-N(CH₃)-O-5'）、メチレンヒドラゾ、メチレンジメチルヒドラゾ、メチレンオキシメチルイミノ、エーテル（C3'-O-C5'）、チオエーテル（C3'-S-C5'）、チオアセトアミド（C3'-N(H)-C(=O)-CH₂-S-C5'、C3'-O-P(O)-O-SS-C5'、C3'-CH₂-NH-NH-C5'、3'-NHP(O)(OCH₃)-O-5'および3'-NHP(O)(OCH₃)-O-5'、ならびに混合されたN、O、SおよびCH₂構成要素パーツを含有する非イオン性連結部が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。例えば「Carbohydrate Modifications in Antisense Research」Y.S.SanghviおよびP.D.Cook編、ACS Symposium Series 580、チャプター3および4（40～65頁）参照。好ましい態様には、メチレンメチルイミノ（MMI）、メチレンカルボニルアミノ、アミド、カルバメートおよびエチレンオキシドリンカーが含まれる。

30

40

【0257】

一定の例において、非架橋酸素の置き換えが隣接2'-OHによる糖間連結部の切断の強化につながりうることは、当業者にはよく知られているので、非架橋酸素の修飾は、多くの例で、2'-OHの修飾、例えば隣接する糖間連結部の切断に参加しない修飾、例えばアラビノース糖、2'-O-アルキル、2'-F、LNAおよびENAを必要としうる。

【0258】

好ましい非ホスホジエステルヌクレオシド間連結部には、ホスホロチオエート、Sp異性体のエナンチオマー過剰率が少なくとも1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% 95%またはそれ以上であるホスホロチオエート、Rp異

50

性体のエナンチオマー過剰率が少なくとも1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%またはそれ以上であるホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホトリエステル (phosphotriester)、アミノアルキルホスホトリオエステル (aminoalkylphosphotriester)、アルキルホスホネーター (alkyl-phosphonater) (例えばメチル-ホスホネート)、セレノホスフェート、ホスホラミデート (例えばN-アルキルホスホラミデート)、およびボラノホスホネートがある。

【0259】

さらなる例示的非リン含有ヌクレオシド間連結基は、米国特許第5,034,506号、同第5,166,315号、同第5,185,444号、同第5,214,134号、同第5,216,141号、同第5,235,033号、同第5,264,562号、同第5,264,564号、同第5,405,938号、同第5,434,257号、同第5,466,677号、同第5,470,967号、同第5,489,677号、同第5,541,307号、同第5,561,225号、同第5,596,086号、同第5,602,240号、同第5,610,289号、同第5,602,240号、同第5,608,046号、同第5,610,289号、同第5,618,704号、同第5,623,070号、同第5,663,312号、同第5,633,360号、同第5,677,437号、同第5,792,608号、同第5,646,269号および同第5,677,439号に記載されており、これらの文献のそれぞれの内容は参照により本明細書に組み入れられる。

【0260】

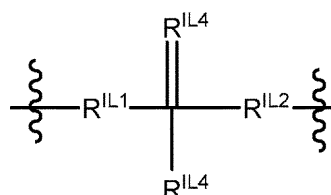
上記局面のいずれか一つのいくつかの態様において、本発明のオリゴヌクレオチドは、1つまたは複数の、非イオン性である中性ヌクレオシド間連結部を含む。適切な中性ヌクレオシド間連結部として、ホスホトリエステル、メチルホスホネート、MMI (3'-CH₂-N(CH₃)-O-5')、アミド-3 (3'-CH₂-C(=O)-N(H)-5')、アミド-4 (3'-CH₂-N(H)-C(=O)-5')、ホルムアセタール (3'-O-CH₂-O-5')、およびチオホルムアセタール (3'-S-CH₂-O-5') ; シロキサン (ジアルキルシロキサン)、カルボン酸エステル、カルボキサミド、スルフィド、スルホン酸エステルおよび/またはアミドを含有する非イオン性連結部 (例えば「Carbohydrate Modifications in Antisense Research」Y.S.SanghviおよびP.D.Cook編、ACS Symposium Series 580、チャプター3および4 (40~65頁) 参照); ならびに混合されたN、O、SおよびCH₂構成要素パーツを含有する非イオン性連結部が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

【0261】

一態様において、非ホスホジエステルバックボーン連結部は、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、アルキル-ホスホネートおよびホスホラミデートバックボーン連結部からなる群より選択される。

【0262】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、ヌクレオシド間連結部は、



であり、ここで、R^{IL1}およびR^{IL2}は、それぞれ出現ごとに独立して、存在しないか、またはO、S、CH₂、NR (Rは水素、アルキル、アリールである)、もしくは置換されていてもよいアルキレンであって、アルキレンのバックボーンはO、S、SSおよびNR (Rは水素、アルキル、アリールである) のうちの1つまたは複数を内部および/または端部に含むことができ、R^{IL3}およびR^{IL4}は、それぞれ独立して、O、OR (Rは、水素、アルキル、アリールである)、S、Se、BR₃ (Rは、水素、アルキル、アリールである)、BH₃⁻、C (すなわち、アルキル基、アリール基など...)、H、NR₂ (Rは、水素、アルキル、アリールである)、アルキルまたはアリールからなる群より選択される。R^{IL1}およびR^{IL2}のうちの一方が第1ヌクレオシド糖の5'炭素に連結された酸素を置き換えており、R^{IL1}

および R^{IL2} のうちの他方が第2ヌクレオシド糖の3'（または2'）炭素に連結された酸素を置き換えていることは言うまでもない。

【0263】

上記局面のいずれか一つのいくつかの態様では、 R^{IL1} 、 R^{IL2} 、 R^{IL1} および R^{IL2} がすべて0である。

【0264】

いくつかの態様において、 R^{IL1} および R^{IL2} は0であり、 R^{IL3} および R^{IL4} のうちの少なくとも一方である。例えば、 R^{IL3} および R^{IL4} のうちの一方はSであり、かつ他方は0であるか、または R^{IL3} および R^{IL4} の両方がSである。

【0265】

上記局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^a または R^c のうちの一方は R^{IL1} または R^{IL2} への結合である。例えば、 R^c は R^{IL1} への結合である。

【0266】

上記局面のいずれか一つのいくつかの態様において、 R^a または R^c のうちの一方は R^{IL1} または R^{IL2} への結合であり、 R^d は R^{IL1} または R^{IL2} のうちの他方への結合である。例えば、 R^c は R^{IL1} への結合であり、 R^d は R^{IL2} への結合である。

【0267】

窒素保護基

本明細書記載のさまざまな局面のいくつかの態様は、窒素保護基（本明細書ではアミノ保護基ともいう）を含む。窒素保護基として、 $-OH$ 、 $-OR^{NP1}$ 、 $-N(R^{NP2})_2$ 、 $-C(=O)R^{NP1}$ 、 $-C(=O)N(R^{NP2})_2$ 、 $-CO_2R^{NP1}$ 、 $-SO_2R^{NP1}$ 、 $-C(=NR^{NP2})R^{NP1}$ 、 $-C(=NR^{NP2})OR^{NP1}$ 、 $-C(=NR^{NP2})N(R^{NP2})_2$ 、 $-SO_2N(R^{NP2})_2$ 、 $-SO_2R^{NP2}$ 、 $-SO_2OR^{NP2}$ 、 $-SOR^{NP1}$ 、 $-C(=S)N(R^{NP2})_2$ 、 $-C(=O)SR^{NP2}$ 、 $-C(=S)SR^{NP2}$ 、 $C_1\sim 10$ アルキル（例えばアラルキル、ヘテロアラルキル）、 $C_2\sim 10$ アルケニル、 $C_2\sim 10$ アルキニル、 $C_3\sim 10$ カルボシクリル、3～14員ヘテロシクリル、 $C_6\sim 14$ アリール、および5～14員ヘテロアリール基が挙げられるが、それらに限定されるわけではなく、ここで、各 R^{NP1} は、独立して、 $C_1\sim 10$ アルキル、 $C_1\sim 10$ パーハロアルキル、 $C_2\sim 10$ アルケニル、 $C_2\sim 10$ アルキニル、ヘテロ $C_1\sim 10$ アルキル、ヘテロ $C_2\sim 10$ アルケニル、ヘテロ $C_2\sim 10$ アルキニル、 $C_3\sim 10$ カルボシクリル、3～14員ヘテロシクリル、 $C_6\sim 14$ アリール、または5～14員ヘテロアリールであるか、あるいは2つの R^{NP1} 基が一緒になって3～14員ヘテロシクリルまたは5～14員ヘテロアリール環を形成し、各 R^{NP2} は、独立して、水素、 $C_1\sim 10$ アルキル、 $C_1\sim 10$ パーハロアルキル、 $C_2\sim 10$ アルケニル、 $C_2\sim 10$ アルキニル、ヘテロ $C_1\sim 10$ アルキル、ヘテロ $C_2\sim 10$ アルケニル、ヘテロ $C_2\sim 10$ アルキニル、 $C_3\sim 10$ カルボシクリル、3～14員ヘテロシクリル、 $C_6\sim 14$ アリール、および5～14員ヘテロアリールであるか、あるいは2つの R^{SP3} 基が一緒になって3～14員ヘテロシクリルまたは5～14員ヘテロアリール環を形成し、ここで、 R^{NP1} および R^{NP2} の各アルキル、アルケニル、アルキニル、カルボシクリル、ヘテロシクリル、アラルキル、アリール、およびヘテロアリールは、任意で、 OH 、 CN 、 $SC(O)Ph$ 、オキソ（ $=O$ ）、 SH 、 SO_2NH_2 、 $SO_2(C_1\sim C_4)$ アルキル、 $SO_2NH(C_1\sim C_4)$ アルキル、ハロゲン、カルボニル、チオール、シアノ、 NH_2 、 $NH(C_1\sim C_4)$ アルキル、 $N[(C_1\sim C_4)アルキル]_2$ 、 $C(O)NH_2$ 、 $COOH$ 、 $COOMe$ 、アセチル、 $(C_1\sim C_8)$ アルキル、 $O(C_1\sim C_8)$ アルキル（すなわち $C_1\sim C_8$ アルコキシ）、 $O(C_1\sim C_8)$ ハロアルキル、 $(C_2\sim C_8)$ アルケニル、 $(C_2\sim C_8)$ アルキニル、ハロアルキル、チオアルキル、シアノメチレン、アルキルアミニル、アリール、ヘテロアリール、置換アリール、 $NH_2-C(O)-アルキレン$ 、 $NH(Me)-C(O)-アルキレン$ 、 $CH_2-C(O)-アルキル$ 、 $C(O)-アルキル$ 、アルキルカルボニルアミニル、 $CH_2-[CH(OH)]_m-(CH_2)_p-OH$ 、 $CH_2-[CH(OH)]_m-(CH_2)_p-NH_2$ または $CH_2-アリール-アルコキシ$ から独立して選択される1、2、3、4または5つの置換基で置換されていることができ、ここで、「m」および「p」は、独立して、1、2、3、4、5または6である。

【0268】

窒素保護基は、当技術分野において周知であり、これには、参照により本明細書に組み入れられる「Greene's Protecting Groups in Organic Synthesis」P.G.M.Wuts、第5版、John Wiley & Sons、2014に詳述されているものが含まれる。

【0269】

例示的なアミド（例えば-C(=O)R^{NP1}）窒素保護基として、ホルムアミド、アセトアミド、クロロアセトアミド、トリクロロアセトアミド、トリフルオロアセトアミド、フェニルアセトアミド、3-フェニルプロパンアミド、ピコリンアミド、3-ピリジルカルボキサミド、N-ベンゾイルフェニルアラニル誘導体、ベンズアミド、p-フェニルベンズアミド、o-ニトロフェニルアセトアミド（o-nitrophenylacetamide）、o-ニトロフェノキシアセトアミド、アセトアセトアミド、（N'-ジチオベンジルオキシアシルアミノ）アセトアミド、3-（p-ヒドロキシフェニル）プロパンアミド、3-（o-ニトロフェニル）プロパンアミド、2-メチル-2-（o-ニトロフェノキシ）プロパンアミド、2-メチル-2-（o-フェニルアゾフェノキシ）プロパンアミド、4-クロロブタンアミド、3-メチル-3-ニトロブタンアミド、o-ニトロシンアミド、N-アセチルメチオニン誘導体、o-ニトロベンズアミド、およびo-（ベンゾイルオキシメチル）ベンズアミドが挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

【0270】

例示的なカルバメート（例えば-C(=O)OR^{NP1}）窒素保護基として、メチルカルバメート、エチルカルバメート、9-フルオレニルメチルカルバメート（Fmoc）、9-（2-スルホ）フルオレニルメチルカルバメート、9-（2,7-ジブromo）フルオレニルメチルカルバメート、2,7-ジ-t-ブチル-[9-（10,10-ジオキソ-10,10,10,10-テトラヒドロチオキサンチル）]メチルカルバメート（DBD-Tmoc）、4-メトキシフェナシルカルバメート（Phenoc）、2,2,2-トリクロロエチルカルバメート（Troc）、2-トリメチルシリルエチルカルバメート（Teoc）、2-フェニルエチルカルバメート（hZ）、1-（1-アダマンチル）-1-メチルエチルカルバメート（Adpoc）、1,1-ジメチル-2-ハロエチルカルバメート、1,1-ジメチル-2,2-ジブromoエチルカルバメート（DB-t-BOC）、1,1-ジメチル-2,2,2-トリクロロエチルカルバメート（TCBOC）、1-メチル-1-（4-ビフェニリル）エチルカルバメート（Bpoc）、1-（3,5-ジ-t-ブチルフェニル）-1-メチルエチルカルバメート（t-Bumeoc）、2-（2'-および4'-ピリジル）エチルカルバメート（Pyoc）、2-（N,N-ジシクロヘキシルカルボキサミド）エチルカルバメート、t-ブチルカルバメート（BOCまたはBoc）、1-アダマンチルカルバメート（Adoc）、ビニルカルバメート（Voc）、アリルカルバメート（Alloc）、1-イソプロピルアリルカルバメート（Ipaoc）、シンナミルカルバメート（Coc）、4-ニトロシンナミルカルバメート（Noc）、8-キノリルカルバメート、N-ヒドロキシピペリジニルカルバメート、アルキルジチオカルバメート、ベンジルカルバメート（Cbz）、p-メトキシベンジルカルバメート（Moz）、p-ニトベンジル（nitobenzyl）カルバメート、p-ブromoベンジルカルバメート、p-クロロベンジルカルバメート、2,4-ジクロロベンジルカルバメート、4-メチルスルフィニルベンジルカルバメート（MsZ）、9-アントリルメチルカルバメート、ジフェニルメチルカルバメート、2-メチルチオエチルカルバメート、2-メチルスルホニルエチルカルバメート、2-（p-トルエンスルホニル）エチルカルバメート、[2-（1,3-ジチアニル）]メチルカルバメート（Dmoc）、4-メチルチオフェニルカルバメート（Mtpc）、2,4-ジメチルチオフェニルカルバメート（Bmpc）、2-ホスホニオエチルカルバメート（Peoc）、2-トリフェニルホスホニオイソプロピルカルバメート（Ppoc）、1,1-ジメチル-2-シアノエチルカルバメート、m-クロロ-p-アシルオキシベンジルカルバメート、p-（ジヒドロキシボリル）ベンジルカルバメート、5-ベンゾイソオキサゾリルメチルカルバメート、2-（トリフルオロメチル）-6-クロモニルメチルカルバメート（Tcroc）、m-ニトロフェニルカルバメート、3,5-ジメトキシベンジルカルバメート、o-ニトロベンジルカルバメート、3,4-ジメトキシ-6-ニトロベンジルカルバメート、フェニル（o-ニトロフェニル）メチルカルバメート、t-アミルカルバメート、S-ベンジルチオカルバメート、p-シアノベンジルカルバメート、シクロブチルカルバメート、シクロヘキシルカルバメート

ト、シクロペンチルカルバメート、シクロプロピルメチルカルバメート、p-デシルオキシベンジルカルバメート、2,2-ジメトキシシアシルビニルカルバメート、o-(N,N-ジメチルカルボキサミド)ベンジルカルバメート、1,1-ジメチル-3-(N,N-ジメチルカルボキサミド)プロピルカルバメート、1,1-ジメチルプロピニルカルバメート、ジ(2-ピリジル)メチルカルバメート、2-フラニルメチルカルバメート、2-ヨードエチルカルバメート、イソボルニルカルバメート、イソブチルカルバメート、イソニコチニルカルバメート、p-(p'-メトキシフェニルアゾ)ベンジルカルバメート、1-メチルシクロブチルカルバメート、1-メチルシクロヘキシルカルバメート、1-メチル-1-シクロプロピルメチルカルバメート、1-メチル-1-(3,5-ジメトキシフェニル)エチルカルバメート、1-メチル-1-(p-フェニルアゾフェニル)エチルカルバメート、1-メチル-1-フェニルエチルカルバメート、1-メチル-1-(4-ピリジル)エチルカルバメート、フェニルカルバメート、p-(フェニルアゾ)ベンジルカルバメート、2,4,6-トリ-t-ブチルフェニルカルバメート、4-(トリメチルアンモニウム)ベンジルカルバメート、および2,4,6-トリメチルベンジルカルバメートが挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

10

【0271】

例示的なスルホンアミド(例えば-S(=O)₂R^{NP1})窒素保護基として、例えばp-トルエンスルホンアミド(Ts)、ベンゼンスルホンアミド、2,3,6,-トリメチル-4-メトキシベンゼンスルホンアミド(Mtr)、2,4,6-トリメトキシベンゼンスルホンアミド(Mtb)、2,6-ジメチル-4-メトキシベンゼンスルホンアミド(Pme)、2,3,5,6-テトラメチル-4-メトキシベンゼンスルホンアミド(Mte)、4-メトキシベンゼンスルホンアミド(Mbs)、2,4,6-トリメチルベンゼンスルホンアミド(Mts)、2,6-ジメトキシ-4-メチルベンゼンスルホンアミド(iMds)、2,2,5,7,8-ペンタメチルクロマン-6-スルホンアミド(Pmc)、メタンスルホンアミド(Ms)、β-トリメチルシリルエタンスルホンアミド(SES)、9-アントラセンスルホンアミド、4-(4',8'-ジメトキシナフチルメチル)ベンゼンスルホンアミド(DNMBS)、ベンジルスルホンアミド、トリフルオロメチルスルホンアミド、およびフェナシルスルホンアミドが挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

20

【0272】

さらなる例示的窒素保護基として、フェノチアジニル-(10)-アシル誘導体、N'-p-トルエンスルホニルアミノアシル誘導体、N'-フェニルアミノチオアシル誘導体、N-ベンゾイルフェニルアラニル誘導体、N-アセチルメチオニン誘導体、4,5-ジフェニル-3-オキサゾリン-2-オン、N-フタルイミド、N-ジチアスNP2インイミド(dithiasuNP2inimide)(Dts)、N-2,3-ジフェニルマレイミド、N-2,5-ジメチルピロール、N-1,1,4,4-テトラメチルジシリルアザシクロペンタン付加物(STABASE)、5-置換1,3-ジメチル-1,3,5-トリアザシクロヘキサン-2-オン、5-置換1,3-ジベンジル-1,3,5-トリアザシクロヘキサン-2-オン、1-置換3,5-ジニトロ-4-ピリドン、N-メチルアミン、N-アリルアミン、N-[2-(トリメチルシリル)エトキシ]メチルアミン(SEM)、N-3-アセトキシプロピルアミン、N-(1-イソプロピル-4-ニトロ-2-オキソ-3-ピロリン-3-イル)アミン、4級アンモニウム塩、N-ベンジルアミン、N-ジ(4-メトキシフェニル)メチルアミン、N-5-ジベンゾスベリルアミン、N-トリフェニルメチルアミン(Tr)、N-[(4-メトキシフェニル)ジフェニルメチル]アミン(MMTr)、N-9-フェニルフルオレニルアミン(PhF)、N-2,7-ジクロロ-9-フルオレニルメチレンアミン、N-フェロセニルメチルアミノ(Fcm)、N-2-ピコリルアミノN'-オキシド、N-1,1-ジメチルチオメチレンアミン、N-ベンジリデンアミン、N-p-メトキシベンジリデンアミン、N-ジフェニルメチレンアミン、N-[(2-ピリジル)メシチル]メチレンアミン、N-(N',N'-ジメチルアミノメチレン)アミン、N,N'-イソプロピリデンジアミン、N-p-ニトロベンジリデンアミン、N-サリチリデンアミン、N-5-クロロサリチリデンアミン、N-(5-クロロ-2-ヒドロキシフェニル)フェニルメチレンアミン、N-シクロヘキシリデンアミン、N-(5,5-ジメチル-3-オキソ-1-シクロヘキセニル)アミン、N-ボランおよびN-ジフェニルボリン酸誘導体、N-[フェニル(ペントNP1シルクロム(pentNP1cylchromium))-またはタングステ

30

40

50

ン) アシル] アミン、N-銅キレート、N-亜鉛キレート、N-ニトロアミン、N-ニトロソアミン、アミンN-オキシド、ジフェニルホスフィンアミド (Dpp)、ジメチルチオホスフィンアミド (Mpt)、ジフェニルチオホスフィンアミド (Ppt)、ジアルキルホスホラミデート、ジベンジルホスホラミデート、ジフェニルホスホラミデート、ベンゼンスルフェンアミド、o-ニトロベンゼンスルフェンアミド (Nps)、2,4-ジニトロベンゼンスルフェンアミド、ペンタクロロベンゼンスルフェンアミド、2-ニトロ-4-メトキシベンゼンスルフェンアミド、トリフェニルメチルスルフェンアミド、および3-ニトロピリジンスルフェンアミド (Npys) が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

【0273】

酸素保護基

本明細書記載のさまざまな局面のいくつかの態様は、酸素保護基 (本明細書ではヒドロキシル保護基ともいう) を含む。酸素保護基としては、 $-R^{OP1}$ 、 $-N(R^{OP2})_2$ 、 $-C(=O)SR^{OP1}$ 、 $-C(=O)R^{OP1}$ 、 $-CO_2R^{OP1}$ 、 $-C(=O)N(R^{OP2})_2$ 、 $-C(=NR^{OP2})R^{OP1}$ 、 $-C(=NR^{OP2})OR^{OP1}$ 、 $-C(=NR^{OP2})N(R^{OP2})_2$ 、 $-S(=O)R^{OP1}$ 、 $-SO_2R^{OP1}$ 、 $-Si(R^{OP1})_3$ 、 $-P(R^{OP3})_2$ 、 $-P(R^{OP3})_3X^-$ 、 $-P(OR^{OP3})_2$ 、 $-P(OR^{OP3})_3X^-$ 、 $-P(=O)(R^{OP1})_2$ 、 $-P(=O)(OR^{OP3})_2$ 、および $-P(=O)(N(R^{OP2})_2)_2$ が挙げられるが、それらに限定されるわけではなく、ここで、各 X^- は対イオンであり、各 R^{OP1} は、独立して、 $C_1\sim 10$ アルキル、 $C_1\sim 10$ パーハロアルキル、 $C_2\sim 10$ アルケニル、 $C_2\sim 10$ アルキニル、ヘテロ $C_1\sim 10$ アルキル、ヘテロ $C_2\sim 10$ アルケニル、ヘテロ $C_2\sim 10$ アルキニル、 $C_3\sim 10$ カルボシクリル、3~14員ヘテロシクリル、 $C_6\sim 14$ アリール、または5~14員ヘテロアリールであるか、あるいは2つの R^{OP1} 基が一緒になって3~14員ヘテロシクリルまたは5~14員ヘテロアリール環を形成し、各 R^{OP2} は、水素、 $-OH$ 、 $-OR^{OP1}$ 、 $-N(R^{OP3})_2$ 、 $-CN$ 、 $-C(=O)R^{OP1}$ 、 $-C(=O)N(R^{OP3})_2$ 、 $-CO_2R^{OP1}$ 、 $-SO_2R^{OP1}$ 、 $-C(=NR^{OP3})OR^{OP1}$ 、 $-C(=NR^{OP3})N(R^{OP3})_2$ 、 $-SO_2N(R^{OP3})_2$ 、 $-SO_2R^{OP3}$ 、 $-SO_2OR^{OP3}$ 、 $-SOR^{OP1}$ 、 $-C(=S)N(R^{OP3})_2$ 、 $-C(=O)SR^{OP3}$ 、 $-C(=S)SR^{OP3}$ 、 $-P(=O)(R^{OP1})_2$ 、 $-P(=O)(OR^{OP3})_2$ 、 $-P(=O)(N(R^{OP3})_2)_2$ 、 $C_1\sim 10$ アルキル、 $C_1\sim 10$ パーハロアルキル、 $C_2\sim 10$ アルケニル、 $C_2\sim 10$ アルキニル、ヘテロ $C_1\sim 10$ アルキル、ヘテロ $C_2\sim 10$ アルケニル、ヘテロ $C_2\sim 10$ アルキニル、 $C_3\sim 10$ カルボシクリル、3~14員ヘテロシクリル、 $C_6\sim 14$ アリール、および5~14員ヘテロアリールであるか、あるいは2つの R^{OP2} 基が一緒になって3~14員ヘテロシクリルまたは5~14員ヘテロアリール環を形成し、各 R^{OP3} は、独立して、水素、 $C_1\sim 10$ アルキル、 $C_1\sim 10$ パーハロアルキル、 $C_2\sim 10$ アルケニル、 $C_2\sim 10$ アルキニル、ヘテロ $C_1\sim 10$ アルキル、ヘテロ $C_2\sim 10$ アルケニル、ヘテロ $C_2\sim 10$ アルキニル、 $C_3\sim 10$ カルボシクリル、3~14員ヘテロシクリル、 $C_6\sim 14$ アリール、および5~14員ヘテロアリールであるか、あるいは2つの R^{OP3} 基が一緒になって3~14員ヘテロシクリルまたは5~14員ヘテロアリール環を形成し、ここで、 R^{OP1} 、 R^{OP2} および R^{OP3} の各アルキル、アルケニル、アルキニル、カルボシクリル、ヘテロシクリル、アラールキル、アリール、およびヘテロアリールは、任意で、 OH 、 CN 、 $SC(O)Ph$ 、オキソ($=O$)、 SH 、 SO_2NH_2 、 $SO_2(C_1\sim C_4)$ アルキル、 $SO_2NH(C_1\sim C_4)$ アルキル、ハロゲン、カルボニル、チオール、シアノ、 NH_2 、 $NH(C_1\sim C_4)$ アルキル、 $N[(C_1\sim C_4)アルキル]_2$ 、 $C(O)NH_2$ 、 $COOH$ 、 $COOMe$ 、アセチル、 $(C_1\sim C_8)$ アルキル、 $O(C_1\sim C_8)$ アルキル (すなわち $C_1\sim C_8$ アルコキシ)、 $O(C_1\sim C_8)$ ハロアルキル、 $(C_2\sim C_8)$ アルケニル、 $(C_2\sim C_8)$ アルキニル、ハロアルキル、チオアルキル、シアノメチレン、アルキルアミニル、アリール、ヘテロアリール、置換アリール、 $NH_2-C(O)-$ アルキレン、 $NH(Me)-C(O)-$ アルキレン、 $CH_2-C(O)-$ アルキル、 $C(O)-$ アルキル、アルキルカルボニルアミニル、 $CH_2-[CH(OH)]_m-(CH_2)_p-OH$ 、 $CH_2-[CH(OH)]_m-(CH_2)_p-NH_2$ または CH_2 -アリール-アルコキシから独立して選択される1、2、3、4または5つの置換基で置換されていてもよく、ここで、「m」および「p」は、独立して、1、2、3、4、5または6である。

【0274】

酸素保護基は、当技術分野において周知であり、これには、参照により本明細書に組み入れられる「Greene's Protecting Groups in Organic Synthesis」P.G.M.Wuts、第5版、John Wiley & Sons、2014に詳述されているものが含まれる。

【0275】

例示的な酸素保護基として、メチル、*t*-ブチルオキシカルボニル（BOCまたはBoc）、メトキシメチル（MOM）、メチルチオメチル（MTM）、*t*-ブチルチオメチル、（フェニルジメチルシリル）メトキシメチル（SMOM）、ベンジルオキシメチル（BOM）、*p*-メトキシベンジルオキシメチル（PMBM）、（4-メトキシフェノキシ）メチル（*p*-AOM）、グアヤコールメチル（GUM）、*t*-ブトキシメチル、4-ペンテニルオキシメチル（POM）、シロキシメチル、2-メトキシエトキシメチル（MEM）、2,2,2-トリクロロエトキシメチル、ビス（2-クロロエトキシ）メチル、2-（トリメチルシリル）エトキシメチル（SEMOR）、テトラヒドロピラニル（THP）、3-プロモテトラヒドロピラニル、テトラヒドロチオピラニル、1-メトキシシクロヘキシル、4-メトキシテトラヒドロピラニル（MTHP）、4-メトキシテトラヒドロチオピラニル、4-メトキシテトラヒドロチオピラニルS,S-ジオキシド、1-〔（2-クロロ-4-メチル）フェニル〕-4-メトキシピペリジン-4-イル（CTMP）、1,4-ジオキサソ-2-イル、テトラヒドロフラニル、テトラヒドロチオフラニル、2,3,3a,4,5,6,7,7a-オクタヒドロ-7,8,8-トリメチル-4,7-メタノベンゾフラン-2-イル、1-エトキシエチル、1-（2-クロロエトキシ）エチル、1-メチル-1-メトキシエチル、1-メチル-1-ベンジルオキシエチル、1-メチル-1-ベンジルオキシ-2-フルオロエチル、2,2,2-トリクロロエチル、2-トリメチルシリルエチル、2-（フェニルセレニル）エチル、*t*-ブチル、アリル、*p*-クロロフェニル、*p*-メトキシフェニル、2,4-ジニトロフェニル、ベンジル（Bn）、*p*-メトキシベンジル、3,4-ジメトキシベンジル、*o*-ニトロベンジル、*p*-ニトロベンジル、*p*-ハロベンジル、2,6-ジクロロベンジル、*p*-シアノベンジル、*p*-フェニルベンジル、2-ピコリル、4-ピコリル、3-メチル-2-ピコリルN-オキシド、ジフェニルメチル、*p,p'*-ジニトロベンズヒドリル、5-ジベンゾスベリル、トリフェニルメチル、 α -ナフチルジフェニルメチル、*p*-メトキシフェニルジフェニルメチル、ジ（*p*-メトキシフェニル）フェニルメチル、トリ（*p*-メトキシフェニル）メチル、4-（4'-プロモフェナシルオキシフェニル）ジフェニルメチル、4,4',4''-トリス（4,5-ジクロロフタルイミドフェニル）メチル、4,4',4''-トリス（レブリノイルオキシフェニル）メチル、4,4',4''-トリス（ベンゾイルオキシフェニル）メチル、3-（イミダゾール-1-イル）ビス（4',4''-ジメトキシフェニル）メチル、1,1'-ビス（4-メトキシフェニル）-1'-ピレニルメチル、9-アントリル、9-（9-フェニル）キサントニル、9-（9-フェニル-10-オキソ）アントリル、1,3-ベンゾジスルフラン-2-イル、ベンゾイソチアゾリルS,S-ジオキシド、トリメチルシリル（TMS）、トリエチルシリル（TES）、トリイソプロピルシリル（TIPS）、ジメチルイソプロピルシリル（IPDMS）、ジエチルイソプロピルシリル（DEIPS）、ジメチルテキシルシリル、*t*-ブチルジメチルシリル（TBDMS）、*t*-ブチルジフェニルシリル（TBDPS）、トリベンジルシリル、トリ-*p*-キシリルシリル、トリフェニルシリル、ジフェニルメチルシリル（DPMS）、*t*-ブチルメトキシフェニルシリル（TBMPMS）、ホルメート、アセテート、クロロアセテート、ジクロロアセテート、トリクロロアセテート、トリフルオロアセテート、メトキシアセテート、トリフェニルメトキシアセテート、フェノキシアセテート、*p*-クロロフェノキシアセテート、3-フェニルプロピオネート、4-オキソペンタノエート（レブリネート）、4,4-（エチレンジチオ）ペンタノエート（レブリノイルジチオアセタール）、アダマントエート、クロトネート、4-メトキシクロトネート、ベンゾエート、*p*-フェニルベンゾエート、2,4,6-トリメチルベンゾエート（メシトエート）、アルキルメチルカーボネート、9-フルオレニルメチルカーボネート（Fmoc）、アルキルエチルカーボネート、アルキル2,2,2-トリクロロエチルカーボネート（Troc）、2-（トリメチルシリル）エチルカーボネート（TMSEC）、2-（フェニルスルホニル）エチルカーボネート（Psec）、2-（トリフェニルホスホニオ）エチルカーボネート（Peoc）、アルキルイソブチルカーボネート、アルキルビニルカーボネートアルキルアリルカーボネート、アルキル*p*-ニトロフェニルカーボネート、ア

10

20

30

40

50

ルキルベンジルカーボネート、アルキルp-メトキシベンジルカーボネート、アルキル3,4-ジメトキシベンジルカーボネート、アルキルo-ニトロベンジルカーボネート、アルキルp-ニトロベンジルカーボネート、アルキルS-ベンジルチオカーボネート、4-エトキシ-1-ナフチルカーボネート、メチルジチオカーボネート、2-ヨードベンゾエート、4-アジドブチレート、4-ニトロ-4-メチルペンタノエート、o-（ジブロモメチル）ベンゾエート、2-ホルミルベンゼンスルホネート、2-（メチルチオメトキシ）エチル、4-（メチルチオメトキシ）ブチレート、2-（メチルチオメトキシメチル）ベンゾエート、2,6-ジクロロ-4-メチルフェノキシアセテート、2,6-ジクロロ-4-（1,1,3,3-テトラメチルブチル）フェノキシアセテート、2,4-ビス（1,1-ジメチルプロピル）フェノキシアセテート、クロロジフェニルアセテート、イソブチレート、モノス SP_3 イノエート（monosu SP_3 inoate）、（E）-2-メチル-2-ブテノエート、o-（メトキシアシル）ベンゾエート、 α -ナフトエート、ニトレート、アルキルN,N,N',N'-テトラメチルホスホロジアミデート、アルキルN-フェニルカルバメート、ボレート、ジメチルホスフィノチオイル、アルキル2,4-ジニトロフェニルスルフェネート、サルフェート、メタンスルホネート（メシレート）、ベンジルスルホネート、およびトシレート（Ts）が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

10

【0276】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、酸素保護基は、ベンジル、ベンゾイル、2,6-ジクロロベンジル、t-ブチルジメチルシリル、t-ブチルジフェニルシリル、メシレート、トシレート、4,4'-ジメトキシトリチル（DMT）、9-フェニルキサンチン-9-イル（Pixyl）および9-（p-メトキシフェニル）キサンチン-9-イル（MOX）である。一定の態様において、T1は、アセチル、ベンジル、t-ブチルジメチルシリル、t-ブチルジフェニルシリルおよびジメトキシトリチルから選択されるヒドロキシル保護基であり、より好ましいヒドロキシル保護基T1は4,4'-ジメトキシトリチルである。

20

【0277】

硫黄保護基

本明細書記載のさまざまな局面のいくつかの態様は、硫黄保護基（本明細書ではチオール保護基ともいう）を含む。硫黄保護基として、 $-R^{SP1}$ 、 $-N(R^{SP2})_2$ 、 $-C(=O)SR^{SP1}$ 、 $-C(=O)R^{SP1}$ 、 $-CO_2R^{SP1}$ 、 $-C(=O)N(R^{SP2})_2$ 、 $-C(=NR^{SP2})R^{SP1}$ 、 $-C(=NR^{SP2})OR^{SP1}$ 、 $-C(=NR^{SP2})N(R^{SP2})_2$ 、 $-S(=O)R^{SP1}$ 、 $-SO_2R^{SP1}$ 、 $-Si(R^{SP1})_3$ 、 $-P(R^{SP3})_2$ 、 $-P(R^{SP3})+3X^-$ 、 $-P(OR^{SP3})_2$ 、 $-P(OR^{SP3})+3X^-$ 、 $-P(=O)(R^{SP1})_2$ 、 $-P(=O)(OR^{SP3})_2$ 、および $-P(=O)(N(R^{SP2})_2)_2$ が挙げられるが、それらに限定されるわけではなく、ここで、

30

X^- は対イオンであり、各 R^{SP1} は、独立して、 $C_1\sim 10$ アルキル、 $C_1\sim 10$ パーハロアルキル、 $C_2\sim 10$ アルケニル、 $C_2\sim 10$ アルキニル、ヘテロ $C_1\sim 10$ アルキル、ヘテロ $C_2\sim 10$ アルケニル、ヘテロ $C_2\sim 10$ アルキニル、 $C_3\sim 10$ カルボシクリル、3～14員ヘテロシクリル、 $C_6\sim 14$ アリール、または5～14員ヘテロアリールであるか、あるいは2つの R^{SP1} 基が一緒になって3～14員ヘテロシクリルまたは5～14員ヘテロアリール環を形成し、各 R^{SP2} は、水素、 $-OH$ 、 $-OR^{SP1}$ 、 $-N(R^{SP3})_2$ 、 $-CN$ 、 $-C(=O)R^{SP1}$ 、 $-C(=O)N(R^{SP3})_2$ 、 $-CO_2R^{SP1}$ 、 $-SO_2R^{SP1}$ 、 $-C(=NR^{SP3})OR^{SP1}$ 、 $-C(=NR^{SP3})N(R^{SP3})_2$ 、 $-SO_2N(R^{SP3})_2$ 、 $-SO_2R^{SP3}$ 、 $-SO_2OR^{SP3}$ 、 $-SOR^{SP1}$ 、 $-C(=S)N(R^{SP3})_2$ 、 $-C(=O)SR^{SP3}$ 、 $-C(=S)SR^{SP3}$ 、 $-P(=O)(R^{SP1})_2$ 、 $-P(=O)(OR^{SP3})_2$ 、 $-P(=O)(N(R^{SP3})_2)_2$ 、 $C_1\sim 10$ アルキル、 $C_1\sim 10$ パーハロアルキル、 $C_2\sim 10$ アルケニル、 $C_2\sim 10$ アルキニル、ヘテロ $C_1\sim 10$ アルキル、ヘテロ $C_2\sim 10$ アルケニル、ヘテロ $C_2\sim 10$ アルキニル、 $C_3\sim 10$ カルボシクリル、3～14員ヘテロシクリル、 $C_6\sim 14$ アリール、および5～14員ヘテロアリールであるか、あるいは2つの R^{SP2} 基が一緒になって3～14員ヘテロシクリルまたは5～14員ヘテロアリール環を形成し、各 R^{SP3} は、独立して、水素、 $C_1\sim 10$ アルキル、 $C_1\sim 10$ パーハロアルキル、 $C_2\sim 10$ アルケニル、 $C_2\sim 10$ アルキニル、ヘテロ $C_1\sim 10$ アルキル、ヘテロ $C_2\sim 10$ アルケニル、ヘテロ $C_2\sim 10$ アルキニル、 $C_3\sim 10$ カルボシクリル、3～14員ヘテロシクリル、 $C_6\sim 14$ アリール、および

40

50

5～14員ヘテロアリールであるか、あるいは2つの R^{SP3} 基が一緒になって3～14員ヘテロシクリルまたは5～14員ヘテロアリール環を形成し、ここで、 R^{SP1} 、 R^{SP2} および R^{SP3} のアルキル、アルケニル、アルキニル、カルボシクリル、ヘテロシクリル、アラルキル、アリール、およびヘテロアリールは、任意で、OH、CN、SC(O)Ph、オキソ(=O)、SH、SO₂NH₂、SO₂(C₁～C₄)アルキル、SO₂NH(C₁～C₄)アルキル、ハロゲン、カルボニル、チオール、シアノ、NH₂、NH(C₁～C₄)アルキル、N[(C₁～C₄)アルキル]₂、C(O)NH₂、COOH、COOMe、アセチル、(C₁～C₈)アルキル、O(C₁～C₈)アルキル(すなわちC₁～C₈アルコキシ)、O(C₁～C₈)ハロアルキル、(C₂～C₈)アルケニル、(C₂～C₈)アルキニル、ハロアルキル、チオアルキル、シアノメチレン、アルキルアミニル、アリール、ヘテロアリール、置換アリール、NH₂-C(O)-アルキレン、NH(Me)-C(O)-アルキレン、CH₂-C(O)-アルキル、C(O)-アルキル、アルキルカルボニルアミニル、CH₂-[CH(OH)]_m-(CH₂)_p-OH、CH₂-[CH(OH)]_m-(CH₂)_p-NH₂またはCH₂-アリール-アルコキシから独立して選択される1、2、3、4または5つの置換基で置換されていてもよく、ここで、「m」および「p」は、独立して、1、2、3、4、5または6である。

10

【0278】

硫黄保護基は、当技術分野において周知であり、これには、参照により本明細書に組み入れられる「Greene's Protecting Groups in Organic Synthesis」P.G.M. Wuts、第5版、John Wiley & Sons、2014に詳述されているものが含まれる。

20

【0279】

化合物/モノマー

一局面において、本明細書では、化合物/モノマー、すなわち式(III)または(III')の2'-ジェミナル置換ヌクレオシドおよびヌクレオチドが提供される。いくつかの態様において、式(III)の化合物は、表1に示す化合物から選択される。

【0280】

(表1) 例示的な式(III)の化合物

30

40

50

10

20

30

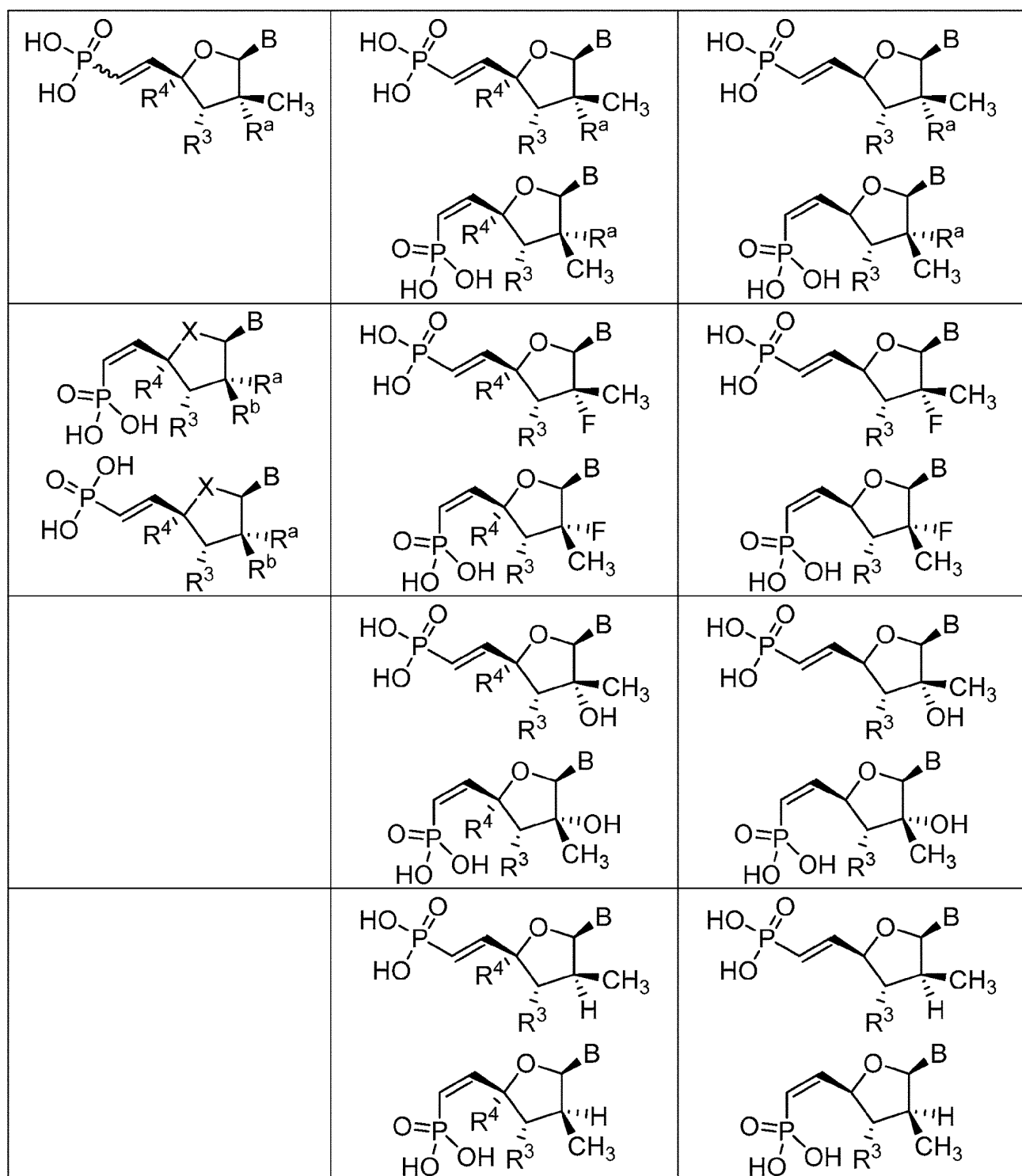
40

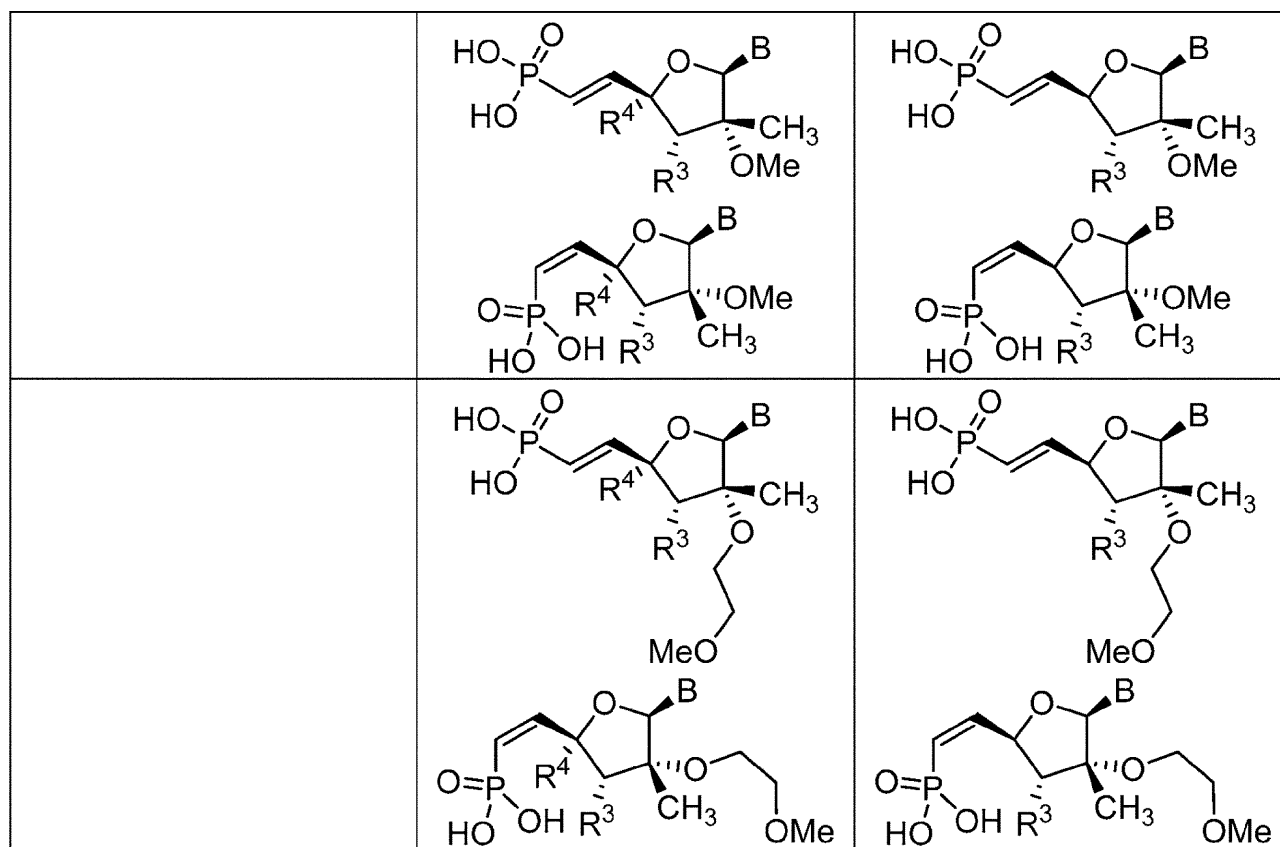
【0281】

いくつかの態様において、式 (III) の化合物は、表2～3に示す化合物から選択される。

【0282】

(表2) 例示的な式 (III) の化合物





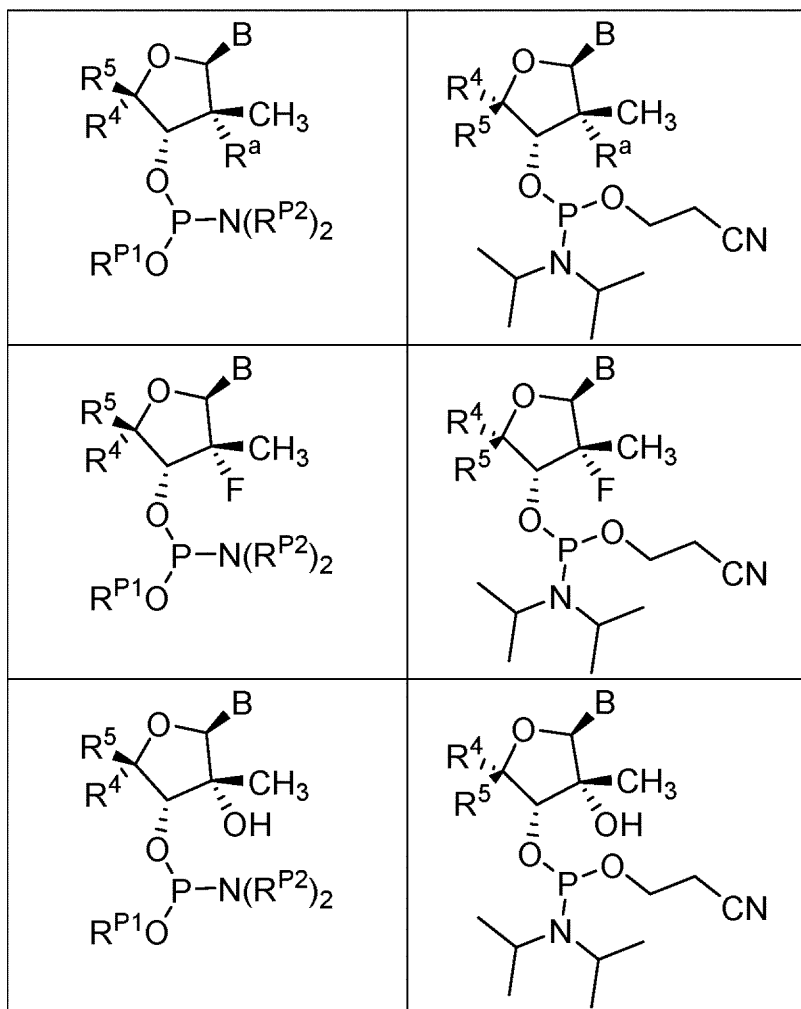
【 0 2 8 3 】

(表 3) 例示的な式 (III) の化合物

30

40

50



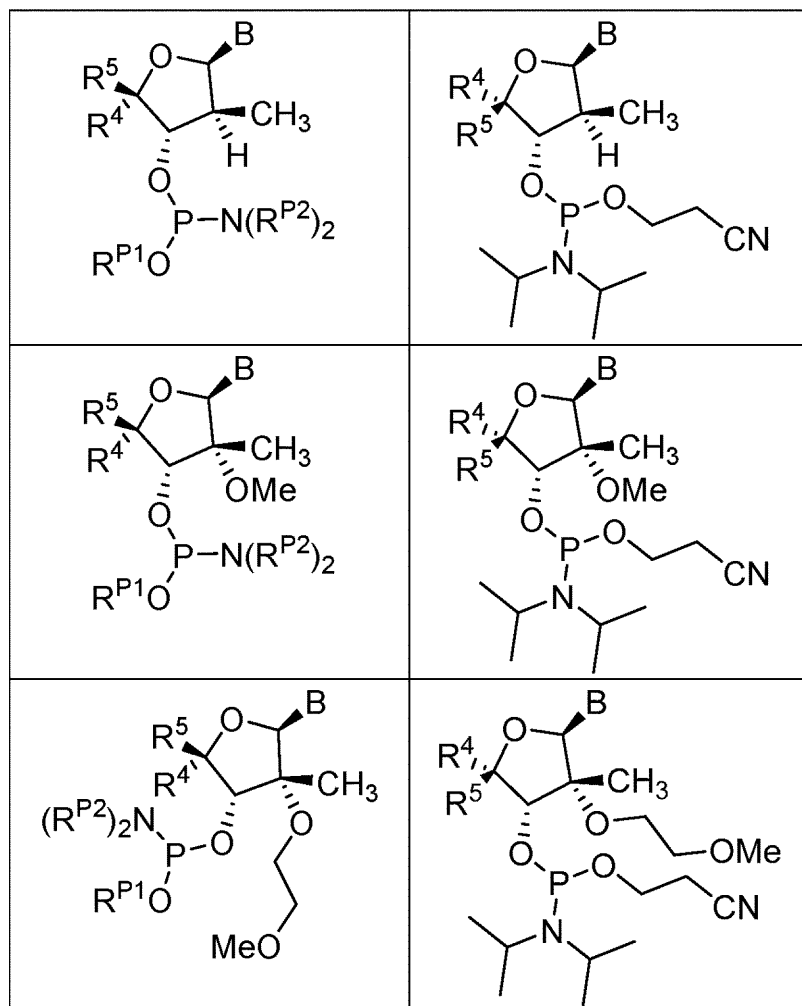
10

20

30

40

50



10

20

【0284】

表3の化合物では、リン(III)に取り付けられている一方または両方のヒドロキシルを、独立して、置換されていてもよい $C_1 \sim C_{30}$ アルキル、置換されていてもよい $C_2 \sim C_{30}$ アルケニルまたは置換されていてもよい $C_2 \sim C_{30}$ アルキニルで置き換えることができる。例えば、リン(III)に取り付けられているヒドロキシル基のうちの一方を、置換されていてもよい $C_1 \sim C_6$ アルキル、置換されていてもよい $C_2 \sim C_6$ アルケニルまたは置換されていてもよい $C_2 \sim C_{60}$ アルキニルで置換することができる。

30

【0285】

例示的な式(III)の2'-ジェミナル置換ヌクレオシドおよびヌクレオチドは、図1～15に示す合成スキームに従って調製することができる。

【0286】

上記局面のいずれか一つのいくつかの態様において、式(III)の化合物は、図2に示す化合物10、11、11A、12、13または13Aである。

40

【0287】

上記局面のいずれか一つのいくつかの態様において、式(III)の化合物は、図3に示す化合物32または33である。

【0288】

上記局面のいずれか一つのいくつかの態様において、式(III)の化合物は、図4に示す化合物37または38である。

【0289】

上記局面のいずれか一つのいくつかの態様において、式(III)の化合物は、図5に示す化合物42または43である。

50

【0290】

上記局面のいずれか一つのいくつかの態様において、式(III)の化合物は、図7に示す化合物55、56または56Aである。

【0291】

上記局面のいずれか一つのいくつかの態様において、式(III)の化合物は、図8に示す化合物60、61A、61B、62A、62B、63Aまたは63Bである。

【0292】

上記局面のいずれか一つのいくつかの態様において、式(III)の化合物は、図9に示す化合物64A、64B、64Aまたは65Bである。

【0293】

上記局面のいずれか一つのいくつかの態様において、式(III)の化合物は、図10に示す化合物69、70A、70B、71A、71B、72Aまたは72Bである。

10

【0294】

上記局面のいずれか一つのいくつかの態様において、式(III)の化合物は、図11に示す化合物73A、73B、74Aまたは74Bである。

【0295】

上記局面のいずれか一つのいくつかの態様において、式(III)の化合物は、図12に示す化合物15、16、17、18、19、20または21である。

【0296】

上記局面のいずれか一つのいくつかの態様において、式(III)の化合物は、図13に示す化合物22、23、24、25、26または27である。

20

【0297】

上記局面のいずれか一つのいくつかの態様において、式(III)の化合物は、図14に示す化合物75、76、77、78、79、80または81である。

【0298】

上記局面のいずれか一つのいくつかの態様において、式(III)の化合物は、図15に示す化合物82、83、84、85、86または87である。

【0299】

上記局面のいずれか一つのいくつかの態様において、式(III)の化合物は、以下の化合物ではない： R^a がFであり、 R^b がメチルであり、 R^3 が $-OR^{c2}$ 、反応性リン(III)基または固形支持体への連結部であり、 R^{c2} が水素またはヒドロキシル保護基であり、 R^4 がHであり、 R^5 が $-CH_2OR^{5b}$ であり、 R^{5b} がH、ヒドロキシル保護基またはリン基であり、かつBが、それぞれ無保護であるか、保護されているか、または修飾されていることができるアデニン、シトシン、グアニンまたはウラシルである。

30

【0300】

上記局面のいずれか一つのいくつかの態様において、式(III)の化合物は、以下の化合物ではない： R^a がOHであり、 R^b がメチル、ビニルまたはエチニルであり、 R^3 が $-OR^{c2}$ 、反応性リン(III)基または固形支持体への連結部であり、 R^{c2} が水素またはヒドロキシル保護基であり、 R^4 がHであり、 R^5 が $-CH_2OR^{5b}$ であり、 R^{5b} がH、ヒドロキシル保護基またはリン基であり、かつBが、それぞれ無保護であるか、保護されているか、または修飾されていることができるアデニンまたはグアニンである。

40

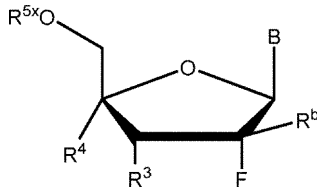
【0301】

上記局面のいずれか一つのいくつかの態様において、式(III)の化合物は、図1～図12に示す化合物1～9、14、28～31、34～36、39～41、44～55、57～59、66～68ではない。

【0302】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、式(III)の化合物は、構造

50



の化合物ではなく、

ここで、

R^b は、水素または置換もしくは無置換 $C_1 \sim C_4$ アルキルであり、

R^c は、 $-OR^{1x}$ であり、ここで、

R^{1x} は、 H 、 $-P(O)(OM)_2$ 、 $-P(O)(OM)-O-P(O)(OM)_2$ 、 $-P(O)(Oアルキル)_2$ 、 $-P(O)(Oアルキル)-O-P(O)(Oアルキル)_2$ 、 $-PO_3H_2$ 、 $-PO_3HM$ 、 $-PO_3M_2$ 、 $-PO_2SH_2$ 、 $-PO_2SHM$ 、 $-PO_2SM_2$ 、 $-PO_3M$ 、または $-PO_2SM$ 、保護基、リガンド、リガンド担持モノマー、 $-F$ 、 $-(C_rC_6)$ アルキル、 $-(C_2 \sim C_6)$ アリル、 $-(C(R^3)_2)_nOR^3$ 、 $-(C(R^3)_2)_nSR^3$ 、 $-(C(R^3)_2)_nN(R^3)_2$ 、 $-(C(R^3)_2)_nC(O)N(R^3)_2$ 、 $-(C(R^3)_2)_nO(C_rC_6)$ アルキル、 $-(C(R^3)_2)_nS(C_rC_6)$ アルキル、 $-(C(R^3)_2)_nO(C(R^3)_2)_nN((C_i \sim C_6)$ アルキル) $_2$ 、 $-(C(R^3)_2)_nON((C_i \sim C_6)$ アルキル) $_2$ 、 $-C(O)R^3$ 、 $-C(O)R^3C(O)H$ 、 $-C(O)R^3C(O)OH$ 、 $-C(O)R^3C(O)R^3$ 、 $-C(O)R^3C(O)NR^3-PO_2$ 、 $-P(OR^3)_2$ 、 $-P(N(R^3)_2)_2$ 、 $-P(OR^3)N(R^3)_2$ 、またはリンカーであり、

R^4 は、 H であり、

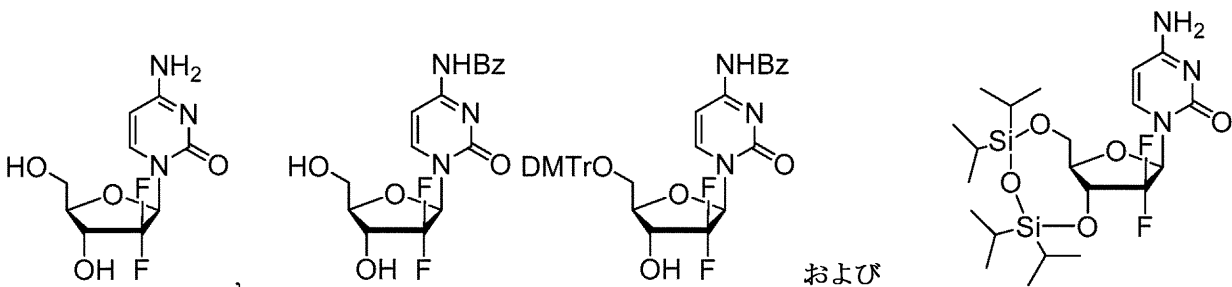
R^{5x} は、 H 、 $-P(O)(OM)_2$ 、 $-P(O)(OM)-O-P(O)(OM)_2$ 、 $-P(O)(Oアルキル)_2$ 、 $-P(O)(Oアルキル)-O-P(O)(Oアルキル)_2$ 、 $-PO_3H_2$ 、 $-PO_3HM$ 、 $-PO_3M_2$ 、 $-PO_2SH_2$ 、 $-PO_2SHM$ 、 $-PO_2SM_2$ 、 $-PO_3M$ 、または $-PO_2SM$ 、保護基、リガンド、またはリガンド担持モノマーであり、

M は、出現ごとに独立して、総電荷が $+1$ のアルカリ金属または遷移金属を表し、および

n は、 $1 \sim 4$ の整数である。

【0303】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、式(III)の化合物は



ではない。

【0304】

オリゴヌクレオチド

一局面において、本明細書では、(i) 少なくとも1つの、式(I)または(I')の2'-ジェミナル置換ヌクレオシド、および/または(ii) 5'末端ヌクレオチドにおける式(II)または(II')の2'-ジェミナル置換ヌクレオシドを含む、オリゴヌクレオチドが提供される。

【0305】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、5'末端ヌクレオチドの式(II)の2'-ジェミナル置換ヌクレオシドは、構造:

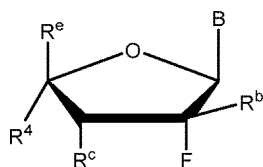
10

20

30

40

50



のヌクレオシドではなく、

ここで、

R^b は、水素または置換もしくは無置換 $C_1 \sim C_4$ アルキルであり、

R^c は、後続のヌクレオシドへのヌクレオチド間連結部への結合または $-OR^{Ix}$ であり、
ここで、

R^{Ix} は、 H 、 $-P(O)(OM)_2$ 、 $-P(O)(OM)-O-P(O)(OM)_2$ 、 $-P(O)(Oアルキル)_2$ 、 $-P(O)(Oアルキル)-O-P(O)(Oアルキル)_2$ 、 $-PO_3H_2$ 、 $-PO_3HM$ 、 $-PO_3M_2$ 、 $-PO_2SH_2$ 、 $-PO_2SHM$ 、 $-PO_2SM_2$ 、 $-PO_3M$ 、または $-PO_2SM$ 、保護基、リガンド、リガンド担持モノマー、 $-F$ 、 $-(C_rC_6)$ アルキル、 $-(C_2 \sim C_6)$ アリル、 $-(C(R^3)_2)_nOR^3$ 、 $-(C(R^3)_2)_nSR^3$ 、 $-(C(R^3)_2)_nN(R^3)_2$ 、 $-(C(R^3)_2)_nC(O)N(R^3)_2$ 、 $-(C(R^3)_2)_nO(C_rC_6)$ アルキル、 $-(C(R^3)_2)_nS(C_rC_6)$ アルキル、 $-(C(R^3)_2)_nO(C(R^3)_2)_nN(C_i \sim C_6)$ アルキル $_2$ 、 $-(C(R^3)_2)_nON(C_i \sim C_6)$ アルキル $_2$ 、 $-C(O)R^3$ 、 $-C(O)R^3C(O)H$ 、 $-C(O)R^3C(O)OH$ 、 $-C(O)R^3C(O)R^3$ 、 $-C(O)R^3C(O)NR^3-PO_2$ 、 $-P(OR^3)_2$ 、 $-P(N(R^3)_2)_2$ 、 $-P(OR^3)N(R^3)_2$ 、またはリンカーであり、

R^4 は、 H であり、

R^e は、 $-CH_2OR^{IIX}$ であり、ここで、

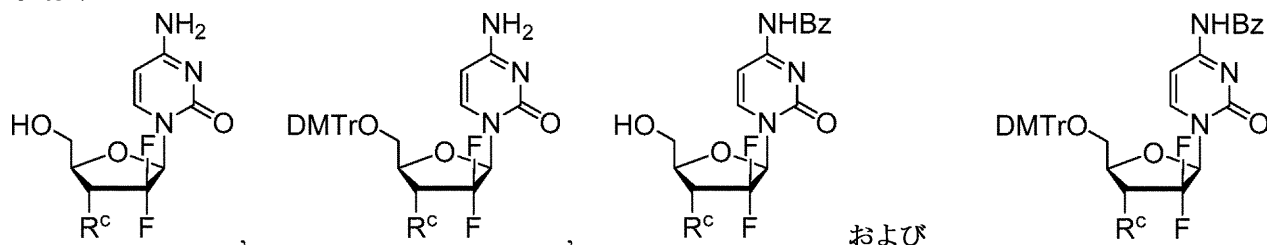
R^{IIX} は、 $-H$ 、 $-P(O)(OM)_2$ 、 $-P(O)(OM)-O-P(O)(OM)_2$ 、 $-P(O)(Oアルキル)_2$ 、 $-P(O)(Oアルキル)-O-P(O)(Oアルキル)_2$ 、 $-PO_3H_2$ 、 $-PO_3HM$ 、 $-PO_3M_2$ 、 $-PO_2SH_2$ 、 $-PO_2SHM$ 、 $-PO_2SM_2$ 、 $-PO_3M$ 、または $-PO_2SM$ 、保護基、リガンド、またはリガンド担持モノマーであり、

M は、出現ごとに独立して、総電荷が $+1$ のアルカリ金属または遷移金属を表し、および

n は、 $1 \sim 4$ の整数である。

【0306】

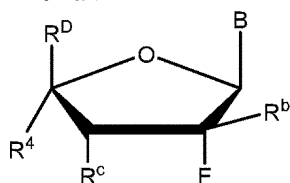
本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、式(II)のヌクレオシドは、



ではない。

【0307】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、式(I)の2'-ジェミナル置換ヌクレオシドは、構造:



のヌクレオシドではなく、

ここで、

R^b は、水素または置換もしくは無置換 $C_1 \sim C_4$ アルキルであり、

R^c は、後続のヌクレオシドへのヌクレオチド間連結部への結合または $-OR^{1x}$ であり、
ここで、

R^{1x} は、 H 、 $-P(O)(OM)_2$ 、 $-P(O)(OM)-O-P(O)(OM)_2$ 、 $-P(O)(O$
アルキル) $_2$ 、 $-P(O)(O$ アルキル) $-O-P(O)(O$ アルキル) $_2$ 、 $-PO_3H_2$ 、 $-PO_3H$
M、 $-PO_3M_2$ 、 $-PO_2SH_2$ 、 $-PO_2SHM$ 、 $-PO_2SM_2$ 、 $-PO_3M$ 、または $-PO_2SM$ 、保護基
、リガンド、リガンド担持モノマー、 $-F$ 、 $-(C_rC_6)$ アルキル、 $-(C_2 \sim C_6)$ アリル、 $-(C(R^3)_2)_nOR^3$ 、 $-(C(R^3)_2)_nSR^3$ 、 $-(C(R^3)_2)_nN(R^3)_2$ 、 $-(C(R^3)_2)_nC(O)N(R^3)_2$ 、 $-(C(R^3)_2)_nO(C_rC_6)$ アルキル、 $-(C(R^3)_2)_nS(C_rC_6)$ アルキル、 $-(C(R^3)_2)_nO(C(R^3)_2)_nN((C_i \sim C_6)$ アルキル) $_2$ 、 $-(C(R^3)_2)_nON((C_i \sim C_6)$ アルキル) $_2$ 、 $-C(O)R^3$ 、 $-C(O)R^3C(O)H$ 、 $-C(O)R^3C(O)OH$ 、 $-C(O)R^3C(O)R^3$ 、 $-C(O)R^3C(O)NR^3-PO_2$ 、 $-P(OR^3)_2$ 、 $-P(N(R^3)_2)_2$ 、 $-P(OR^3)N(R^3)_2$ 、またはリンカーであり、

R^4 は、 H であり、

R^d は、先行するヌクレオシドへのヌクレオチド間連結部への結合であり、

Mは、出現ごとに独立して、総電荷が+1のアルカリ金属または遷移金属を表し、およ
び

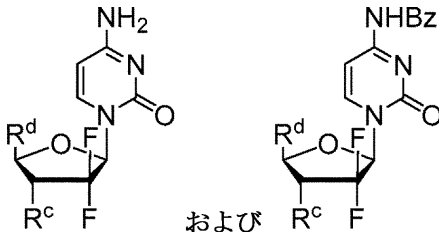
nは、1~4の整数であり、および

1、および

nは、1~4の整数である。

【0308】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、式(1)のヌクレオシ
ドは、



ではない。

【0309】

式(1)または(1')の2'-ジェミナル置換ヌクレオシドは、オリゴヌクレオチド中のど
こにでも位置できることに注意されたい。いくつかの態様において、式(1)または(1'
)の2'-ジェミナル置換ヌクレオシドは、オリゴヌクレオチドの5'端から数えて位置2~1
0に存在する。例えば、式(1)または(1')の2'-ジェミナル置換ヌクレオシドは、オリ
ゴヌクレオチドの5'端から数えて位置2、または位置3、位置4、位置5、位置6、位置7
、位置8、位置9、または位置10に存在する。いくつかの非限定的な例において、式(1
)または(1')の2'-ジェミナル置換ヌクレオシドは、オリゴヌクレオチドの5'端から数
えて位置2に存在する。いくつかの非限定的な例において、式(1)または(1')の2'-ジ
ェミナル置換ヌクレオシドは、オリゴヌクレオチドの5'端から数えて位置3に存在する。
いくつかの非限定的な例において、式(1)または(1')の2'-ジェミナル置換ヌクレオシ
ドは、オリゴヌクレオチドの5'端から数えて位置4に存在する。いくつかの非限定的な例
において、式(1)または(1')の2'-ジェミナル置換ヌクレオシドは、オリゴヌクレオチ
ドの5'端から数えて位置5に存在する。いくつかの非限定的な例において、式(1)また
は(1')の2'-ジェミナル置換ヌクレオシドは、オリゴヌクレオチドの5'端から数えて位
置6に存在する。いくつかの非限定的な例において、式(1)または(1')の2'-ジェミナ
ル置換ヌクレオシドは、オリゴヌクレオチドの5'端から数えて位置7に存在する。いくつ

かの非限定的な例において、式 (I) または (I') の 2'-ジェミナル置換ヌクレオシドは、オリゴヌクレオチドの 5' 端から数えて位置 8 に存在する。いくつかの非限定的な例において、式 (I) または (I') の 2'-ジェミナル置換ヌクレオシドは、オリゴヌクレオチドの 5' 端から数えて位置 9 に存在する。いくつかの非限定的な例において、式 (I) または (I') の 2'-ジェミナル置換ヌクレオシドは、オリゴヌクレオチドの 5' 端から数えて位置 10 に存在する。

【0310】

いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、少なくとも 1 個の、例えば 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 個またはそれ以上の、式 (I) および/または (I') の 2'-ジェミナル置換ヌクレオシドを含む。例えば、オリゴヌクレオチドは、1、2、3、4、5、6、7、8、9 または 10 個の、式 (I) および/または (I') の 2'-ジェミナル置換ヌクレオシドを含む。いくつかの態様では、オリゴヌクレオチド中のヌクレオチドがすべて、本明細書記載の 2'-ジェミナル置換ヌクレオシドである。言い換えると、オリゴヌクレオチドは、式 (I)、(I')、(II) および/または (II') の 2'-ジェミナル置換ヌクレオチドのみを含む。

10

【0311】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、式 (I) および (II) の 2'-ジェミナル置換ヌクレオチドのみを含む。

【0312】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、式 (I) および (II) の 2'-ジェミナル置換ヌクレオチドのみを含み、オリゴヌクレオチドはリガンド、例えばオリゴヌクレオチドに連結された一価または多価 N-アセチルガラクトサミン (GalNac) を、さらに含む。例えば、オリゴヌクレオチドは、式 (I) および (II) の 2'-ジェミナル置換ヌクレオチドのみを含み、オリゴヌクレオチドはリガンド、例えばその 3' 端に連結された一価または多価 N-アセチルガラクトサミン (GalNac) を、さらに含む。

20

【0313】

いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドの 5' 末端ヌクレオチドは、式 (II) または (II') の 2'-ジェミナル置換ヌクレオチドである。いくつかの別の態様において、オリゴヌクレオチドの 5' 末端ヌクレオチドは、式 (II) または (II') の 2'-ジェミナル置換ヌクレオチドではない。

30

【0314】

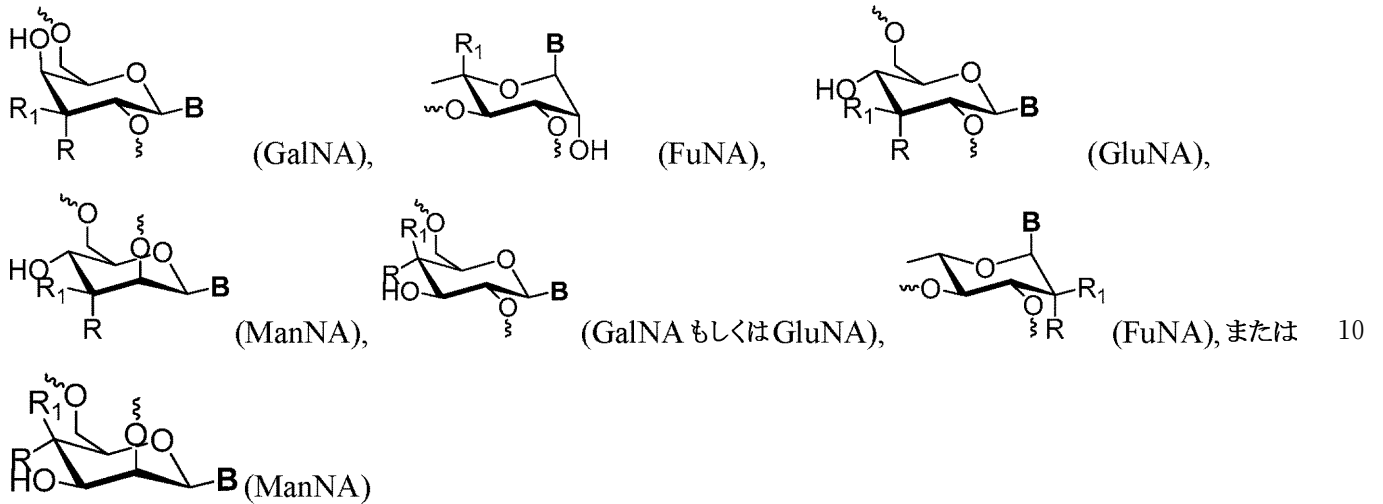
いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、修飾糖を有するヌクレオシドをさらに含む。「修飾糖」とは、2'-デオキシ (すなわち 2'-H)、2'-OH リボース糖または本明細書記載の 2'-ジェミナル置換ヌクレオシド以外の糖または部分を意味する。修飾糖を含む例示的なヌクレオチドには、2'-F リボース、2'-OMe リボース、2'-O,4'-C-メチレンリボース (ロックト核酸、LNA)、アンヒドロヘキシトール (1,5-アンヒドロヘキシトール核酸、HNA)、シクロヘキセン (シクロヘキセン核酸、CeNA)、2'-メトキシエチルリボース、2'-O-アリルリボース、2'-C-アリルリボース、2'-O-N-メチルアセトアミド (2'-O-NMA) リボース、2'-O-ジメチルアミノエトキシエチル (2'-O-DMAEOE) リボース、2'-O-アミノプロピル (2'-O-AP) リボース、2'-F アラビノース (2'-ara-F)、トレオース (トレオース核酸、TNA)、および 2,3-ジヒドロキシプロピル (グリコール核酸、GNA) がある。修飾糖を有するヌクレオシドはオリゴヌクレオチドの任意の位置に存在できることに注意されたい。

40

【0315】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、オリゴヌクレオチド、例えば本明細書記載の dsRNA のアンチセンス鎖またはセンス鎖は、少なくとも 1 個の、例えば 2、3、4、5、6、7、8、9、10 個またはそれ以上の、CeNA ヌクレオチドまたはその類似体を含む。いくつかの態様において、CeNA ヌクレオチドまたはその類似体は

50



であり、
ここで、

Rは、F、Cl、Br、I、H、保護されたOH、OMe、F、O-MOE、O-アルキル、O-アルケン、O-アルキン、O-C₁₆、分岐脂質、または保護されたアミノアルキルであり、
R¹は、F、Cl、Br、I、H、保護されたOH、OMe、F、O-MOE、O-アルキル、O-アルケン、O-アルキン、O-C₁₆、分岐脂質、保護されたアミノアルキルであり、および
Bは、核酸塩基である。

【0316】

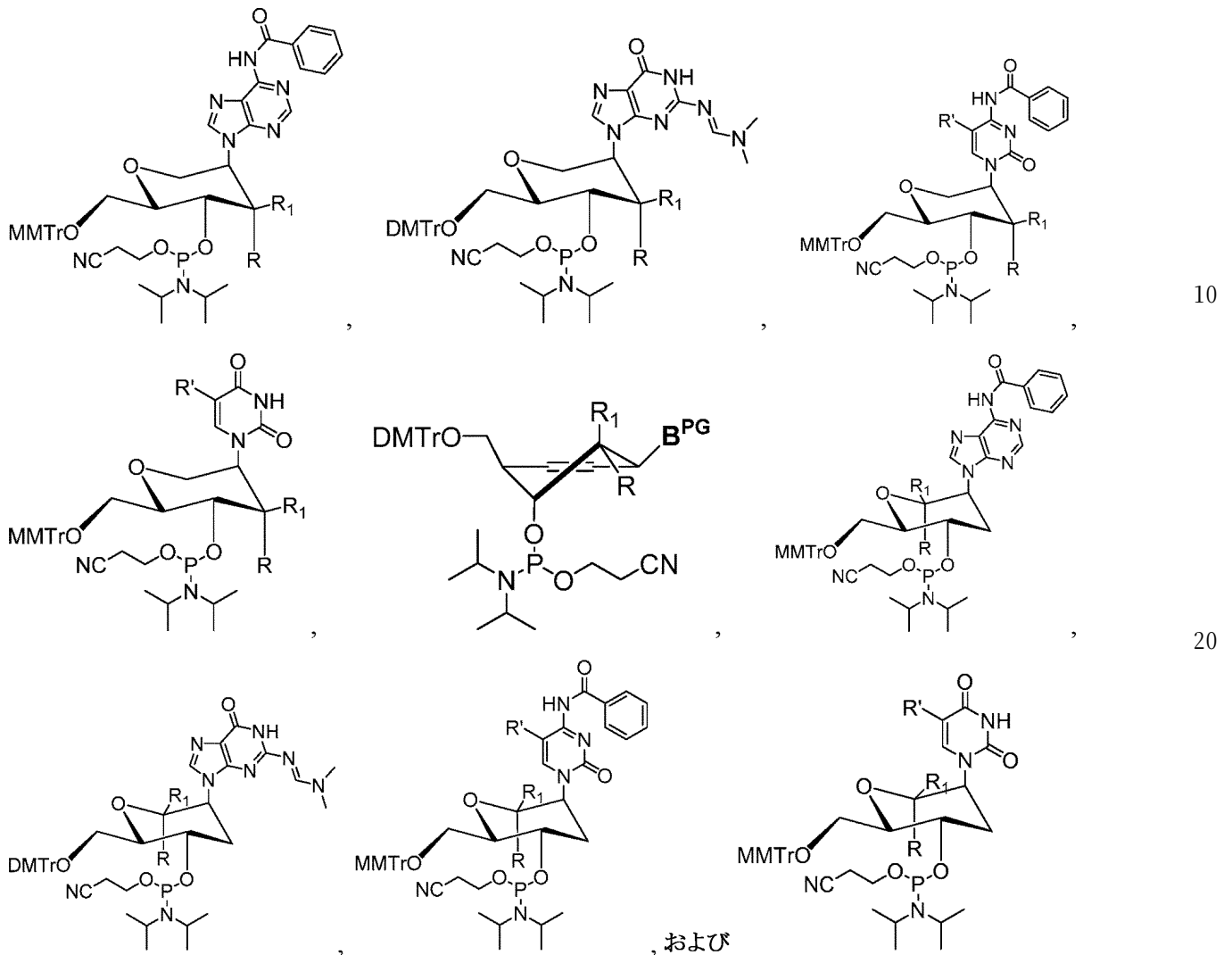
本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、オリゴヌクレオチド、例えばCeNAヌクレオチドまたはその類似体を含む本明細書記載のdsRNAのアンチセンス鎖またはセンス鎖は、

20

30

40

50



からなる群より選択されるモノマーを使って調製され、
ここで、

R'は、HまたはCH₃であり、

Rは、F、Cl、Br、I、H、保護されたOH、OMe、F、O-MOE、O-アルキル、O-アルケン、O-アルキン、O-C₁₆、分岐脂質、または保護されたアミノアルキルであり、

R¹は、F、Cl、Br、I、H、保護されたOH、OMe、F、O-MOE、O-アルキル、O-アルケン、O-アルキン、O-C₁₆、分岐脂質、保護されたアミノアルキルであり、

PGは、保護基であり、および

Bは、核酸塩基である。

【0317】

例示的なCeNAヌクレオシドおよびヌクレオチドならびにその類似体のいくつかは、Kumar et al. *Nucleic Acids Research*, 2020, 48, 4028-4040、Declercq et al. *J. Am. Chem. Soc.* 2002, 124, 928-933、Egli et al., *J. Am. Chem. Soc.* 2011, 133, 16642-16649、Wang et al., *J. Am. Chem. Soc.* 2000, 122, 8595-8602、Wan et al., *J. Med. Chem.* 2016, 59, 9645-9667、Ermolinsky et al., *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2002, 28, 50-57、Behera et al., *J. Am. Chem. Soc.* 2020, 142, 456-467、Ghotekar et al., *Org. Lett.* 2020, 22, 537-541、Deshpande et al., *Tetrahedron Letters* 2004, 45, 2255-2258、Deshpande et al., *Tetrahedron* 2007, 63, 602-608、Deshpande et al., *Carbohydrate Research* 2008, 343, 1163-1170、Sanki et al., *Tetrahedron* 2008, 64, 10406-10416、および

10

20

30

40

50

Rao et al., J. Org. Chem. 2015, 80, 1499-1505に記載されており、これらいずれの文献の内容も、参照により、その全体が本明細書に組み入れられる。

【0318】

いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、少なくとも1個の、例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれ以上の、2'-フルオロ（2'-F）ヌクレオチドを、さらに含む。例えば、オリゴヌクレオチドは、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個の2'-Fヌクレオチドを含むことができる。2'-Fヌクレオチドはオリゴヌクレオチドの任意の位置に存在できることに注意されたい。

【0319】

いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、2'-ジェミナル置換ヌクレオシドおよび2'-Fヌクレオシドを含み、例えば2'-ジェミナル置換ヌクレオシドおよび2'-Fヌクレオシドのみを含む。

10

【0320】

いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、少なくとも1個の、例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれ以上の、2'-OMeヌクレオチドを、さらに含む。例えば、オリゴヌクレオチドは、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個の2'-OMeヌクレオチドを含むことができる。2'-OMeヌクレオチドはオリゴヌクレオチドの任意の位置に存在できることに注意されたい。

【0321】

いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、2'-ジェミナル置換ヌクレオシドおよび2'-OMeヌクレオシドを含み、例えば2'-ジェミナル置換ヌクレオシドおよび2'-OMeヌクレオシドのみを含む。いくつかの別の態様において、オリゴヌクレオチドは、2'-ジェミナル置換ヌクレオシド、2'-OMeヌクレオシドおよび2'-Fヌクレオシドを含み、例えば2'-ジェミナル置換ヌクレオシド、2'-OMeヌクレオシドおよび2'-Fヌクレオシドのみを含む。

20

【0322】

いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、少なくとも1個の、例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれ以上の、2'-デオキシ、例えば2'-Hヌクレオチドを、さらに含む。例えば、オリゴヌクレオチドは、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個の2'-デオキシ、例えば2'-Hヌクレオチドを含むことができる。2'-デオキシ、例えば2'-Hヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの任意の位置に存在できることに注意されたい。例えば、オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの5'端から数えて位置2、5、7、12、14および16のうちの1、2、3、4、5または6つに、2'-デオキシ、例えば2'-Hヌクレオチドを含むことができる。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの5'端から数えて位置5および7に、2'-デオキシヌクレオチドを含む。

30

【0323】

いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、2'-ジェミナル置換ヌクレオシドおよび2'-デオキシ（2'-H）ヌクレオチドを含み、例えば2'-ジェミナル置換ヌクレオシドおよび2'-デオキシ（2'-H）ヌクレオチドのみを含む。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、2'-ジェミナル置換ヌクレオシド、2'-OMeヌクレオシド、および2'-デオキシ（2'-H）ヌクレオチドを含み、例えば2'-ジェミナル置換ヌクレオシド、2'-OMeヌクレオシド、および2'-デオキシ（2'-H）ヌクレオチドのみを含む。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、2'-ジェミナル置換ヌクレオシド、2'-Fヌクレオシドおよび2'-デオキシ（2'-H）ヌクレオチドを含み、例えば2'-ジェミナル置換ヌクレオシド、2'-Fヌクレオシドおよび2'-デオキシ（2'-H）ヌクレオチドのみを含む。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、2'-ジェミナル置換ヌクレオシド、2'-OMeヌクレオシド、2'-Fヌクレオシドおよび2'-デオキシ（2'-H）ヌクレオチドを含み、例えば2'-ジェミナル置換ヌクレオシド、2'-OMeヌクレオシド、2'-Fヌクレオシドおよび2'-デオキシ（2'-H）ヌクレオチドのみを含む。

40

50

【0324】

いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、1個または複数個の、例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれ以上の、非天然核酸塩基を含むヌクレオチドを含むことができる。非天然核酸塩基を含むヌクレオチドはオリゴヌクレオチド中のどこにでも存在することができる。

【0325】

上記局面のいずれか一つのいくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、1個または複数個の、例えば1、2、3、4、5、6、7、8個またはそれ以上の、修飾ヌクレオシド間連結部を含むことができる。例えば、オリゴヌクレオチドは1、2、3、4、5または6個の修飾ヌクレオシド間連結部を含むことができる。例えば、オリゴヌクレオチドは1、2、3または4個の修飾ヌクレオシド間連結部を含む。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの5'端から数えて最初の5つのヌクレオチドの間に少なくとも2つの修飾ヌクレオシド間連結部を含み、オリゴヌクレオチドの3'端から数えて最初の5つのヌクレオチドの間に少なくとも2個の修飾ヌクレオシド間連結部をさらに含む。例えば、オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの5'端から数えてヌクレオチド1と2の間およびヌクレオチド2と3の間、ならびにオリゴヌクレオチドの3'端から数えてヌクレオチド1と2の間およびヌクレオチド2と3の間に、修飾ヌクレオシド間連結部を含む。

10

【0326】

上記局面のいずれか一つのいくつかの態様において、修飾ヌクレオシド間連結部はホスホロチオエートである。したがって、上記局面のいずれか一つのいくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、1個または複数個の、例えば1、2、3、4、5、6、7、8個またはそれ以上の、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結部を含む。例えば、オリゴヌクレオチドは、1、2、3、4、5または6個のホスホロチオエートヌクレオシド間連結部を含む。例えば、オリゴヌクレオチドは、1、2、3または4個のホスホロチオエートヌクレオシド間連結部を含む。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの5'端から数えて最初の5つのヌクレオチドの間に少なくとも2個のホスホロチオエートヌクレオシド間連結部を含み、オリゴヌクレオチドの3'端から数えて最初の5つのヌクレオチドの間に少なくとも2個のホスホロチオエートヌクレオシド間連結部をさらに含む。例えば、オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの5'端から数えてヌクレオチド1と2の間およびヌクレオチド2と3の間、ならびにオリゴヌクレオチドの3'端から数えてヌクレオチド1と2の間およびヌクレオチド2と3の間に、修飾ヌクレオシド間連結部を含む。

20

30

【0327】

いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、当該オリゴヌクレオチドにコンジュゲートされたりガンドを、さらに含む。

【0328】

いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、当該オリゴヌクレオチドに連結された固形支持体をさらに含む。

【0329】

本明細書記載のオリゴヌクレオチドは、数ヌクレオチド（例えば2、3、4、5、6、7、8、9または10ヌクレオチド）長から数百ヌクレオチド長に及びうる。例えば、オリゴヌクレオチドは5ヌクレオチド長から100ヌクレオチド長であることができる。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは10ヌクレオチド長から50ヌクレオチド長である。例えば、オリゴヌクレオチドは、15～35、より一般的には18～25、さらに一般的には19～24、そして最も一般的には19～21塩基対長である。いくつかの態様では、より長い25～30ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドが好ましい。いくつかの態様では、より短い10～15ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドが好ましい。別の一態様において、オリゴヌクレオチドは少なくとも21ヌクレオチド長である。

40

【0330】

50

二本鎖RNA

20～23塩基対の、特に21塩基対の、二重鎖構造を含む二本鎖RNAがRNA干渉を誘導するのに特に有効であると認められていることは、当業者にはよく知られている(Elbashir et al., EMBO 2001, 20:6877-6888)。しかし、他の研究者らは、それより短いまたは長い二本鎖オリゴヌクレオチドも同様に有効でありうることを見いだしている。

【0331】

したがって、一局面において、本明細書では、第1鎖(アンチセンス鎖またはガイド鎖ともいう)と第2鎖(センス鎖またはパッセンジャー鎖ともいう)とを含む二本鎖RNA(dsRNA)であって、第1鎖(すなわちアンチセンス鎖)または第2鎖(すなわちセンス鎖)の少なくとも一方が本明細書記載のオリゴヌクレオチドである、dsRNAが提供される。言い換えると、第1鎖(すなわちアンチセンス鎖)または第2鎖(すなわちセンス鎖)のうちの少なくとも一方は、少なくとも1つの、式(I)および/または(II)の2'-ジェミナル置換ヌクレオチドを含む。

10

【0332】

いくつかの好ましい態様において、アンチセンス鎖は本明細書記載のオリゴヌクレオチドである。言い換えると、アンチセンス鎖は、少なくとも1つの、式(I)、(I')、(II)および/または(II')の2'-ジェミナル置換ヌクレオチドを含む。

【0333】

本明細書記載のさまざまな局面のいくつかの態様において、アンチセンス鎖は標的核酸、例えば標的遺伝子または標的mRNA遺伝子に実質的に相補的であり、dsRNAはその標的核酸の標的切断を誘導することができる。

20

【0334】

dsRNA分子の各鎖は15～35ヌクレオチド長の範囲にあることができる。例えば各鎖は、17～35ヌクレオチド長、17～30ヌクレオチド長、25～35ヌクレオチド長、27～30ヌクレオチド長、17～23ヌクレオチド長、17～21ヌクレオチド長、17～19ヌクレオチド長、19～25ヌクレオチド長、19～23ヌクレオチド長、19～21ヌクレオチド長、21～25ヌクレオチド長、または21～23ヌクレオチド長であることができる。限定されるわけではないが、センス鎖とアンチセンス鎖は長さが等しくてもよいし、長さが等しくなくてもよい。例えばセンス鎖とアンチセンス鎖は、独立して、18、19、20、21、22、23、24または25ヌクレオチドの長さを有する。

30

【0335】

いくつかの態様において、アンチセンス鎖は15～35ヌクレオチドの長さである。いくつかの態様において、アンチセンス鎖は、15～35、17～35、17～30、25～35、27～30、17～23、17～21、17～19、19～25、19～23、19～21、21～25、21～25または21～23ヌクレオチド長である。例えばアンチセンス鎖は、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34または35ヌクレオチド長であることができる。いくつかの態様において、アンチセンス鎖は、19、20、21、22、23、24または25ヌクレオチド長である。例えばアンチセンス鎖は、21、22、23、24または25ヌクレオチド長である。いくつかの特定態様において、アンチセンス鎖は、22、23または24ヌクレオチド長である。例えばアンチセンス鎖は23ヌクレオチド長である。

40

【0336】

アンチセンス鎖と同様に、センス鎖も、いくつかの態様において、15～35ヌクレオチド長であることができる。いくつかの態様において、センス鎖は、15～35、17～35、17～30、25～35、27～30、17～23、17～21、17～19、19～25、19～23、19～21、21～25、21～25または21～23ヌクレオチド長である。例えばセンス鎖は、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34または35ヌクレオチド長であることができる。いくつかの態様において、センス鎖は、17、18、19、20、21、22、23、24または25ヌクレオチド長である。例えばセンス鎖は、19、20、21、22または23ヌクレオチド長である。いくつかの特定

50

態様において、センス鎖は、20、21または22ヌクレオチド長である。例えばセンス鎖は21ヌクレオチド長である。

【0337】

いくつかの態様において、センス鎖は15~35ヌクレオチド長であることができ、アンチセンス鎖はセンス鎖とは独立して15~35ヌクレオチド長であることができる。いくつかの態様において、センス鎖は、15~35、17~35、17~30、25~35、27~30、17~23、17~21、17~19、19~25、19~23、19~21、21~25、21~25または21~23ヌクレオチド長であり、アンチセンス鎖は、独立して、15~35、17~35、17~30、25~35、27~30、17~23、17~21、17~19、19~25、19~23、19~21、21~25、21~25または21~23ヌクレオチド長である。例えばセンス鎖とアンチセンス鎖は、独立して、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34または35ヌクレオチド長であることができる。いくつかの態様において、センス鎖とアンチセンス鎖は、独立して、17、18、19、20、21、22、23、24または25ヌクレオチド長であることができる。例えばセンス鎖は19、20、21、22または23ヌクレオチド長であり、アンチセンス鎖は21、22、23、24または25ヌクレオチド長である。いくつかの特定態様において、センス鎖は20、21または22ヌクレオチド長であり、アンチセンス鎖は22、23または24ヌクレオチド長である。例えばセンス鎖は21ヌクレオチド長であり、アンチセンス鎖は23ヌクレオチド長である。

10

【0338】

センス鎖とアンチセンス鎖は、典型的には、二本鎖領域または二重鎖領域を形成する。限定されるわけではないが、本明細書記載のdsRNA作用物質の二重鎖領域は、12~35ヌクレオチド（または塩基）対長であることができる。例えば二重鎖領域は、14~35ヌクレオチド対長、17~30ヌクレオチド対長、25~35ヌクレオチド対長、27~35ヌクレオチド対長、17~23ヌクレオチド対長、17~21ヌクレオチド対長、17~19ヌクレオチド対長、19~25ヌクレオチド対長、19~23ヌクレオチド対長、19~21ヌクレオチド対長、21~25ヌクレオチド対長または21~23ヌクレオチド対長であることができる。別の一例において、二重鎖領域は、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26および27ヌクレオチド対長から選択される。いくつかの態様において、二重鎖領域は18、19、20、21、22、23、24または25ヌクレオチド対長である。例えば二重鎖領域は、19、20、21、22または23ヌクレオチド対長である。いくつかの態様において、二重鎖領域は、20、21または22ヌクレオチド対長である。例えばdsRNA分子は21塩基対の二重鎖領域を有する。

20

30

【0339】

本明細書に記載するとおり、本明細書記載のdsRNA分子は、少なくとも1個の、例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれ以上の、式(I)および/または(II)の2'-ジェミナル置換ヌクレオチドを含むことができる。限定されるわけではないが、2'-ジェミナル置換ヌクレオチドはすべてが1本の鎖中に存在することができる。2'-ジェミナル置換ヌクレオチドは、センス鎖もしくはアンチセンス鎖の、または両方の鎖の、鎖のどの位置にあるどのヌクレオチドにも、存在しうる。

40

【0340】

いくつかの態様において、アンチセンス鎖は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれ以上の、本明細書記載の2'-ジェミナル置換ヌクレオチドを含む。本明細書記載の2'-ジェミナル置換ヌクレオチドはアンチセンス鎖の任意の位置に存在することができる。例えば、本明細書記載の2'-ジェミナル置換ヌクレオチドはアンチセンス鎖の末端領域に存在することができる。例えば、本明細書記載の2'-ジェミナル置換ヌクレオチドは、アンチセンス鎖の5'端から数えて位置1、2、3および4のうちの1つまたは複数に存在することができる。非限定的な別の一例において、本明細書記載の2'-ジェミナル置換ヌクレオチドは、アンチセンス鎖の3'端から数えて位置1、2、3、4、5および6のうちの1つまたは複数に存在することができる。いくつかの態様において、本明細書記載の2'

50

-ジェミナル置換ヌクレオチドは、アンチセンス鎖の5'端から数えて位置18、19、20、21、22および23のうちの1つまたは複数に存在することができる。本明細書記載の2'-ジェミナル置換ヌクレオチドはアンチセンス鎖の中央領域に位置することもできる。例えば、本明細書記載の2'-ジェミナル置換ヌクレオチドは、アンチセンス鎖の5'端から数えて位置6、7、8、9、10、11、12および13のうちの1つまたは複数に位置することができる。

【0341】

いくつかの態様において、センス鎖は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれ以上の、本明細書記載の2'-ジェミナル置換ヌクレオチドを含む。本明細書記載の2'-ジェミナル置換ヌクレオチドはセンス鎖の任意の位置に存在することができる。例えば、本明細書記載の2'-ジェミナル置換ヌクレオチドはセンス鎖の末端領域に存在することができる。例えば、本明細書記載の2'-ジェミナル置換ヌクレオチドは、センス鎖の5'端から数えて位置1、2、3および4のうちの1つまたは複数に存在することができる。非限定的な別の一例において、本明細書記載の2'-ジェミナル置換ヌクレオチドは、センス鎖の3'端から数えて位置1、2、3および4のうちの1つまたは複数に存在することができる。いくつかの態様において、2'-ジェミナル置換ヌクレオチドは、センス鎖の5'端から数えて位置18、19、20および21のうちの1つまたは複数に存在することができる。本明細書記載の2'-ジェミナル置換ヌクレオチドは2'-ジェミナル置換ヌクレオチドセンス鎖の中央領域に位置することもできる。例えば、本明細書記載の2'-ジェミナル置換ヌクレオチドは、センス鎖の5'端から数えて位置6、7、8、9、10、11、12および13のうちの1つまたは複数に位置することができる。いくつかの態様において、センス鎖は2'-ジェミナル置換ヌクレオチドを含まない。

【0342】

本明細書に記載するとおり、dsRNA作用物質は、1個または複数個の、例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9もしくは10個またはそれ以上の、修飾糖を含むヌクレオチドを含むことができる。したがって、いくつかの態様において、dsRNA作用物質は、2'-F、2'-OMe、非環式ヌクレオチド、ロックト核酸(LNA)、HNA、CeNA、2'-メトキシエチル、2'-O-アリル、2'-C-アリル、2'-O-N-メチルアセトアミド(2'-O-NMA)、2'-O-ジメチルアミノエトキシエチル(2'-O-DMAEOE)、2'-O-アミノプロピル(2'-O-AP)、および2'-ara-Fからなる群より独立して選択される1個または複数個の、例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれ以上の、ヌクレオチドを含むことができる。修飾糖を含むヌクレオチドはdsRNA分子中のどこにでも存在することができる。例えば、修飾糖を含むヌクレオチドはセンス鎖中に存在することができ、または修飾糖を含むヌクレオチドはアンチセンス鎖中に存在することができる。修飾糖を含むヌクレオチドがdsRNA分子中に2つ以上存在する場合、それらはすべて、センス鎖中もしくはアンチセンス鎖中に存在するか、またはセンス鎖とアンチセンス鎖の両方に存在することができる。

【0343】

本明細書に記載するとおり、本明細書記載のdsRNA分子は、少なくとも1個の、例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれ以上の、2'-フルオロ(2'-F)ヌクレオチドを含むことができる。いくつかの態様において、センス鎖は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれ以上の、2'-フルオロヌクレオチドを含む。2'-フルオロヌクレオチドはセンス鎖中のどこにでも位置することができる。例えば、センス鎖は、センス鎖の5'端から数えて位置10に2'-フルオロヌクレオチドを含む。いくつかの態様において、センス鎖は、センス鎖の5'端から数えて位置10に2'-フルオロヌクレオチドを含み、センス鎖は、センス鎖の5'端から数えて位置8、9、11または12に2'-フルオロヌクレオチドをさらに含む。例えば、センス鎖は、センス鎖の5'端から数えて位置9、10に2'-フルオロヌクレオチドを含む。別の一例において、センス鎖は、センス鎖の5'端から数えて位置10および11に2'-フルオロヌクレオチドを含む。いくつかの態様において、センス鎖は、センス鎖の5'端から数えて位置9、10および11に2'-フルオロヌクレオチド

を含む。いくつかの別の態様において、センス鎖は、センス鎖の5'端から数えて位置8、9および10に2'-フルオロヌクレオチドを含む。さらにいくつかの別の態様において、センス鎖は、センス鎖の5'端から数えて位置10、11および12に2'-フルオロヌクレオチドを含む。

【0344】

いくつかの態様において、アンチセンスは、5'端から位置7、10および11に2'-フルオロヌクレオチドを含む。いくつかの別の態様において、センス鎖は、5'端から位置7、9、10および11に2'-フルオロヌクレオチドを含む。いくつかの態様において、センス鎖は、アンチセンス鎖の5'端から数えてアンチセンス鎖の位置11、12および15に相対するまたは相補的な位置に、2'-フルオロヌクレオチドを含む。いくつかの別の態様において、センス鎖は、アンチセンス鎖の5'端から数えてアンチセンス鎖の位置11、12、13および15に相対するまたは相補的な位置に、2'-フルオロヌクレオチドを含む。いくつかの態様において、センス鎖は、2、3または4個の2'-フルオロヌクレオチドのブロックを含む。

10

【0345】

いくつかの態様において、センス鎖は、二重鎖のアンチセンス鎖中の熱不安定化修飾に相対するまたは相補的な位置には、2'-フルオロヌクレオチドを含まない。

【0346】

いくつかの態様において、アンチセンス鎖は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれ以上の2'-フルオロヌクレオチドを含む。2'-フルオロヌクレオチドはアンチセンス鎖中のどこにでも位置することができる。例えばアンチセンス鎖は、アンチセンス鎖の5'端から数えて位置14に2'-フルオロヌクレオチドを含むことができる。いくつかの態様において、アンチセンスは、アンチセンス鎖の5'端から数えて位置2、14および16に、2'-フルオロヌクレオチドを含む。いくつかの別の態様において、アンチセンスは、5'端から位置2、6、14および16に2'-フルオロヌクレオチドを含む。さらにいくつかの態様において、アンチセンスは、5'端から位置2、6、8、9、14および16に2'-フルオロヌクレオチドを含む。

20

【0347】

いくつかの態様において、アンチセンス鎖は、不安定化修飾に隣接して少なくとも1つの2'-フルオロヌクレオチドを含む。例えば、2'-フルオロヌクレオチドは、不安定化修飾の5'端または3'端にあるヌクレオチド、すなわち不安定化修飾の位置から-1または+1の位置にあるヌクレオチドであることができる。いくつかの態様において、アンチセンス鎖は、不安定化修飾の5'端と3'端のそれぞれに、すなわち不安定化修飾の位置から-1の位置と+1の位置に、2'-フルオロヌクレオチドを含む。いくつかの態様において、アンチセンス鎖は、不安定化修飾の3'端に、すなわち不安定化修飾の位置から+1および+2の位置に、少なくとも2つの2'-フルオロヌクレオチドを含む。

30

【0348】

いくつかの態様において、センス鎖とアンチセンス鎖はどちらも少なくとも1つの2'-フルオロヌクレオチドを含む。2'-フルオロ修飾は、センス鎖またはアンチセンス鎖の任意のヌクレオチド上に存在することができる。例えば2'-フルオロ修飾はセンス鎖上および/またはアンチセンス鎖上のすべてのヌクレオチドに存在することができ、または各2'-フルオロ修飾はセンス鎖上もしくはアンチセンス鎖上に交互パターンで存在することができ、またはセンス鎖もしくはアンチセンス鎖は両方の2'-フルオロ修飾を交互パターンで含む。センス鎖上の2'-フルオロ修飾の交互パターンは、アンチセンス鎖と同じであっても異なってもよく、センス鎖上の2'-フルオロ修飾の交互パターンは、アンチセンス鎖上の2'-フルオロ修飾の交互パターンに対してシフトしていてもよい。

40

【0349】

本明細書に記載するとおり、本明細書記載のdsRNA分子は、少なくとも1個の、例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれ以上の、2'-OMeヌクレオチドを含むことができる。限定されるわけではないが、2'-OMeヌクレオチドはすべてが1本の鎖

50

中に存在することができる。2'-OMeヌクレオチドは、センス鎖もしくはアンチセンス鎖の、または両方の鎖の、鎖のどの位置にあるどのヌクレオチドにも、存在しうる。

【0350】

いくつかの態様において、センス鎖は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれ以上の、2'-OMeヌクレオチドを含む。2'-OMeヌクレオチドはセンス鎖中のどこにでも位置することができる。いくつかの態様において、アンチセンス鎖は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれ以上の2'-OMeヌクレオチドを含む。2'-OMeヌクレオチドはアンチセンス鎖中のどこにでも位置することができる。

【0351】

本明細書に記載するとおり、本明細書記載のdsRNA分子は、少なくとも1個の、例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれ以上の、2'-デオキシ、例えば2'-Hリボースヌクレオチドを含むことができる。例えばdsRNAは、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個の2'-デオキシヌクレオチド、例えば2'-Hヌクレオチドを含むことができる。2'-デオキシヌクレオチドは、センス鎖もしくはアンチセンス鎖の、または両方の鎖の、鎖のどの位置にあるどのヌクレオチドにも、存在しうる。

【0352】

本明細書に記載するとおり、dsRNAは、少なくとも1個の、例えば少なくとも2個、少なくとも3個、少なくとも4個、少なくとも5個、少なくとも6個、少なくとも7個またはそれ以上の、2'-デオキシ修飾を、センス鎖および/またはアンチセンス鎖の中央領域に含むことができる。例えば、センス鎖およびアンチセンスの少なくとも一方は、少なくとも1個の、例えば少なくとも2個、少なくとも3個、少なくとも4個、少なくとも5個、少なくとも6個、少なくとも7個またはそれ以上の、2'-デオキシ修飾を、センス鎖またはアンチセンス鎖の5'端から数えて位置5~17、例えば位置6~16、位置6~15、位置6~14、位置6~13、位置6~12、位置7~15、位置7~14、位置7~13、位置7~12、位置8~16、位置8~15、位置8~14、位置8~13、位置8~12、位置9~16、位置9~15、位置9~14、位置9~13、位置9~12、位置10~16、位置10~15、位置10~14、位置10~13または位置10~12に、含むことができる。

【0353】

いくつかの態様において、アンチセンス鎖は、1、2、3、4、5または6個の2'-デオキシヌクレオチドを含む。例えばアンチセンス鎖は、2、3、4、5または6個の2'-デオキシヌクレオチドを含むことができる。2'-デオキシヌクレオチドはアンチセンス鎖中のどこにでも位置することができる。例えばアンチセンス鎖は、アンチセンス鎖の5'端から数えて位置2、5、7、12、14および16のうちの1、2、3、4、5または6つに、2'-デオキシヌクレオチドを含む。非限定的な一例において、アンチセンス鎖は、アンチセンス鎖の5'端から数えて位置2、5、7、および12のうちの1、2、3または4つに、2'-デオキシヌクレオチドを含む。

【0354】

いくつかの態様において、アンチセンスは、アンチセンス鎖の5'端から数えて位置5および7に2'-デオキシヌクレオチドを含む。例えばアンチセンス鎖は、アンチセンス鎖の5'端から数えて5、位置7および12に、2'-デオキシヌクレオチドを含む。いくつかの態様において、アンチセンス鎖は、アンチセンス鎖の5'端から数えて位置2、5および7に、2'-デオキシヌクレオチドを含む。例えばアンチセンス鎖は、アンチセンス鎖の5'端から数えて位置2、5、7、および12に、2'-デオキシヌクレオチドを含む。いくつかの態様において、アンチセンス鎖は、アンチセンス鎖の5'端から数えて位置2、5、7、12および14に、2'-デオキシヌクレオチドを含む。例えばアンチセンス鎖は、アンチセンス鎖の5'端から数えて位置2、5、7、12、14および16に、2'-デオキシヌクレオチドを含む。

【0355】

いくつかの態様において、アンチセンスは、アンチセンス鎖の5'端から数えて位置2または12に、2'-デオキシヌクレオチドを含む。例えばアンチセンスは、アンチセンス鎖の5'端から数えて位置12に、2'-デオキシヌクレオチドを含む。

10

20

30

40

50

【0356】

いくつかの態様において、dsRNAは少なくとも3個の2'-デオキシ修飾を含み、それらの2'-デオキシ修飾は、アンチセンス鎖の5'端から数えてアンチセンス鎖の位置2および14、ならびにセンス鎖の5'端から数えてセンス鎖の位置11にある。

【0357】

いくつかの態様において、dsRNAは少なくとも5個の2'-デオキシ修飾を含み、それらの2'-デオキシ修飾は、アンチセンス鎖の5'端から数えてアンチセンス鎖の位置2、12および14、ならびにセンス鎖の5'端から数えてセンス鎖の位置9および11にある。

【0358】

いくつかの態様において、dsRNAは少なくとも7個の2'-デオキシ修飾を含み、それらの2'-デオキシ修飾は、アンチセンス鎖の5'端から数えてアンチセンス鎖の位置2、5、7、12および14、ならびにセンス鎖の5'端から数えてセンス鎖の位置9および11にある。

10

【0359】

いくつかの態様において、アンチセンス鎖は、少なくとも5個の2'-デオキシ修飾を、アンチセンス鎖の5'端から数えて位置2、5、7、12および14に含む。

【0360】

非限定的な一例において、センス鎖は、センス鎖の5'端から数えて位置11に2'-デオキシヌクレオチドを含まない。

【0361】

いくつかの態様において、dsRNAは、1個または複数個の、例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9もしくは10個またはそれ以上の、非天然核酸塩基を含むヌクレオチドを含むことができる。

20

【0362】

非天然核酸塩基を含むヌクレオチドは、dsRNA分子中のどこにでも存在することができる。例えば、非天然核酸塩基を含むヌクレオチドはセンス鎖中に存在することができ、または非天然核酸塩基を含むヌクレオチドはアンチセンス鎖中に存在することができる。非天然核酸塩基を含むヌクレオチドがdsRNA分子中に2個以上存在する場合、それらはすべて、センス鎖中、アンチセンス鎖中、またはセンス鎖とアンチセンス鎖の両方に存在することができる。

【0363】

本明細書に記載のdsRNA分子は、少なくとも1個のホスホロチオエートまたはメチルホスホネートヌクレオシド間連結部を、さらに含むことができる。ホスホロチオエートヌクレオシド間連結部修飾またはメチルホスホネートヌクレオシド間連結部修飾は、鎖のどの位置でも、センス鎖もしくはアンチセンス鎖またはその両方の任意のヌクレオチド上に存在しうる。例えばヌクレオシド間連結部修飾はセンス鎖上および/またはアンチセンス鎖上のすべてのヌクレオチドに存在してよく、または各ヌクレオシド間連結部修飾はセンス鎖上もしくはアンチセンス鎖上に交互パターンで存在してよく、またはセンス鎖もしくはアンチセンス鎖は両方のヌクレオシド間連結部修飾を交互パターンで含む。センス鎖上のヌクレオシド間連結部修飾の交互パターンは、アンチセンス鎖と同じであっても異なってもよく、センス鎖上のヌクレオシド間連結部修飾の交互パターンは、アンチセンス鎖上のヌクレオシド間連結部修飾の交互パターンに対してシフトしていてもよい。

30

40

【0364】

いくつかの態様において、dsRNA分子は、オーバーハング領域中にホスホロチオエートヌクレオシド間連結部修飾またはメチルホスホネートヌクレオシド間連結部修飾を含む。例えば、オーバーハング領域は、2つのヌクレオチド間にホスホロチオエートヌクレオシド間連結部またはメチルホスホネートヌクレオシド間連結部を有する2つのヌクレオチドを含む。オーバーハングヌクレオチドを二重鎖領域内の末端対合ヌクレオチドと連結するためにヌクレオシド間連結部修飾を行ってもよい。例えば、少なくとも2、3もしくは4つのまたはすべてのオーバーハングヌクレオチドをホスホロチオエートヌクレオシド間連結部またはメチルホスホネートヌクレオシド間連結部で連結してもよく、任意で、オー

50

バーハングヌクレオチドとオーバーハングヌクレオチドに隣接する対合ヌクレオチドとを連結する追加のホスホロチオエートヌクレオシド間連結部またはメチルホスホネートヌクレオシド間連結部が存在してもよい。例えば、末端の3つのヌクレオチドの間に少なくとも2つのホスホロチオエートヌクレオシド間連結部が存在して、それら3つのヌクレオチドのうちの2つがオーバーハングヌクレオチドであり、3つ目がオーバーハングヌクレオチドに隣接する対合ヌクレオチドであってもよい。好ましくは、これら3つの末端ヌクレオチドはアンチセンス鎖の3'端にありうる。

【0365】

いくつかの態様において、dsRNA分子のセンス鎖は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15または16個のホスフェートヌクレオシド間連結部で隔てられた、2～10個のホスホロチオエートヌクレオシド間連結部またはメチルホスホネートヌクレオシド間連結部のブロックを、1～10個含み、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結部またはメチルホスホネートヌクレオシド間連結部のうちの1つはオリゴヌクレオチド配列中の任意の位置に置かれ、該センス鎖は、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結部、メチルホスホネートヌクレオシド間連結部およびホスフェートヌクレオシド間連結部の任意の組合せを含むアンチセンス鎖、またはホスホロチオエート連結部もしくはメチルホスホネート連結部もしくはホスフェート連結部のいずれかを含むアンチセンス鎖と、対合している。

【0366】

いくつかの態様において、dsRNA分子のアンチセンス鎖は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17または18個のホスフェートヌクレオシド間連結部で隔てられた、2個のホスホロチオエートヌクレオシド間連結部またはメチルホスホネートヌクレオシド間連結部のブロックを、2個含み、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結部またはメチルホスホネートヌクレオシド間連結部のうちの1つはオリゴヌクレオチド配列中の任意の位置に置かれ、該アンチセンス鎖は、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結部、メチルホスホネートヌクレオシド間連結部およびホスフェートヌクレオシド間連結部の任意の組合せを含むセンス鎖、またはホスホロチオエート連結部もしくはメチルホスホネート連結部もしくはホスフェート連結部のいずれかを含むアンチセンス鎖と、対合している。

【0367】

いくつかの態様において、dsRNA分子のアンチセンス鎖は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15または16個のホスフェートヌクレオシド間連結部で隔てられた、3個のホスホロチオエートヌクレオシド間連結部またはメチルホスホネートヌクレオシド間連結部のブロックを、2個含み、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結部またはメチルホスホネートヌクレオシド間連結部のうちの1つはオリゴヌクレオチド配列中の任意の位置に置かれ、該アンチセンス鎖は、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結部、メチルホスホネートヌクレオシド間連結部およびホスフェートヌクレオシド間連結部の任意の組合せを含むセンス鎖、またはホスホロチオエート連結部もしくはメチルホスホネート連結部もしくはホスフェート連結部のいずれかを含むアンチセンス鎖と、対合している。

【0368】

いくつかの態様において、dsRNA分子のアンチセンス鎖は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13または14個のホスフェートヌクレオシド間連結部で隔てられた、4個のホスホロチオエートヌクレオシド間連結部またはメチルホスホネートヌクレオシド間連結部のブロックを、2個含み、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結部またはメチルホスホネートヌクレオシド間連結部のうちの1つはオリゴヌクレオチド配列中の任意の位置に置かれ、該アンチセンス鎖は、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結部、メチルホスホネートヌクレオシド間連結部およびホスフェートヌクレオシド間連結部の任意の組合せを含むセンス鎖、またはホスホロチオエート連結部もしくはメチルホスホネート連結部もしくはホスフェート連結部のいずれかを含むアンチセンス鎖と、対合している

。

【0369】

いくつかの態様において、dsRNA分子のアンチセンス鎖は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11または12個のホスフェートヌクレオシド間連結部で隔てられた、5個のホスホロチオエートヌクレオシド間連結部またはメチルホスホネートヌクレオシド間連結部のブロックを、2個含み、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結部またはメチルホスホネートヌクレオシド間連結部のうちの1つはオリゴヌクレオチド配列中の任意の位置に置かれ、該アンチセンス鎖は、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結部、メチルホスホネートヌクレオシド間連結部およびホスフェートヌクレオシド間連結部の任意の組合せを含むセンス鎖、またはホスホロチオエート連結部もしくはメチルホスホネート連結部もしくはホスフェート連結部のいずれかを含むアンチセンス鎖と、対合している。

10

【0370】

いくつかの態様において、dsRNA分子のアンチセンス鎖は、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個のホスフェートヌクレオシド間連結部で隔てられた、6個のホスホロチオエートヌクレオシド間連結部またはメチルホスホネートヌクレオシド間連結部のブロックを、2個含み、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結部またはメチルホスホネートヌクレオシド間連結部のうちの1つはオリゴヌクレオチド配列中の任意の位置に置かれ、該アンチセンス鎖は、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結部、メチルホスホネートヌクレオシド間連結部およびホスフェートヌクレオシド間連結部の任意の組合せを含むセンス鎖、またはホスホロチオエート連結部もしくはメチルホスホネート連結部もしくはホスフェート連結部のいずれかを含むアンチセンス鎖と、対合している。

20

【0371】

いくつかの態様において、dsRNA分子のアンチセンス鎖は、1、2、3、4、5、6、7または8個のホスフェートヌクレオシド間連結部で隔てられた、7個のホスホロチオエートヌクレオシド間連結部またはメチルホスホネートヌクレオシド間連結部のブロックを、2個含み、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結部またはメチルホスホネートヌクレオシド間連結部のうちの1つはオリゴヌクレオチド配列中の任意の位置に置かれ、該アンチセンス鎖は、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結部、メチルホスホネートヌクレオシド間連結部およびホスフェートヌクレオシド間連結部の任意の組合せを含むセンス鎖、またはホスホロチオエート連結部もしくはメチルホスホネート連結部もしくはホスフェート連結部のいずれかを含むアンチセンス鎖と、対合している。

30

【0372】

いくつかの態様において、dsRNA分子のアンチセンス鎖は、1、2、3、4、5または6個のホスフェートヌクレオシド間連結部で隔てられた、8個のホスホロチオエートヌクレオシド間連結部またはメチルホスホネートヌクレオシド間連結部のブロックを、2個含み、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結部またはメチルホスホネートヌクレオシド間連結部のうちの1つはオリゴヌクレオチド配列中の任意の位置に置かれ、該アンチセンス鎖は、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結部、メチルホスホネートヌクレオシド間連結部およびホスフェートヌクレオシド間連結部の任意の組合せを含むセンス鎖、またはホスホロチオエート連結部もしくはメチルホスホネート連結部もしくはホスフェート連結部のいずれかを含むアンチセンス鎖と、対合している。

40

【0373】

いくつかの態様において、dsRNA分子のアンチセンス鎖は、1、2、3または4個のホスフェートヌクレオシド間連結部で隔てられた、9個のホスホロチオエートヌクレオシド間連結部またはメチルホスホネートヌクレオシド間連結部のブロックを、2個含み、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結部またはメチルホスホネートヌクレオシド間連結部のうちの1つはオリゴヌクレオチド配列中の任意の位置に置かれ、該アンチセンス鎖は、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結部、メチルホスホネートヌクレオシド間連結部およびホスフェートヌクレオシド間連結部の任意の組合せを含むセンス鎖、またはホスホロチオエート連結部もしくはメチルホスホネート連結部もしくはホスフェート連結部のいずれ

50

かを含むアンチセンス鎖と、対合している。

【0374】

いくつかの態様において、本明細書に記載のdsRNA分子は、センス鎖および/またはアンチセンス鎖の末端位置のうちの1~10個内に、1つまたは複数のホスホロチオエートヌクレオシド間連結部修飾またはメチルホスホネートヌクレオシド間連結部修飾を、さらに含む。例えばセンス鎖および/またはアンチセンス鎖の一端または両端において、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9または10個のヌクレオチドが、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結部またはメチルホスホネートヌクレオシド間連結部によって連結されうる。

【0375】

いくつかの態様において、本明細書に記載のdsRNA分子は、センス鎖および/またはアンチセンス鎖のそれぞれの二重鎖の内部領域のうちの1~10個内に、1つまたは複数のホスホロチオエートヌクレオシド間連結部修飾またはメチルホスホネートヌクレオシド間連結部修飾を含む。例えばセンス鎖の5'端から数えて二重鎖領域の位置8~16では、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9または10個のヌクレオチドが、ホスホロチオエート・メチルホスホネートヌクレオシド間連結部によって連結されていてよく、dsRNA分子は、任意で、末端位置のうちの1~10個内に、1つまたは複数のホスホロチオエートヌクレオシド間連結部修飾またはメチルホスホネートヌクレオシド間連結部修飾をさらに含むことができる。

【0376】

いくつかの態様において、本明細書に記載のdsRNA分子は、センス鎖の（5'端から数えて）位置1~5内に1~5つのホスホロチオエートヌクレオシド間連結部修飾またはメチルホスホネートヌクレオシド間連結部修飾、および最後の3つの位置内に1~5つのホスホロチオエートヌクレオシド間連結部修飾またはメチルホスホネートヌクレオシド間連結部修飾、ならびにアンチセンス鎖の（5'端から数えて）位置1および2に1~5つのホスホロチオエートヌクレオシド間連結部修飾またはメチルホスホネートヌクレオシド間連結部修飾、および最後の6つの位置内に1~5つのホスホロチオエートヌクレオシド間連結部修飾またはメチルホスホネートヌクレオシド間連結部修飾を、さらに含む。

【0377】

いくつかの態様において、本明細書に記載のdsRNA分子は、センス鎖の（5'端から数えて）位置1~5内に1つのホスホロチオエートヌクレオシド間連結部修飾、および最後の6つの位置内に1つのホスホロチオエートヌクレオシド間連結部修飾またはメチルホスホネートヌクレオシド間連結部修飾、ならびにアンチセンス鎖の（5'端から数えて）位置1および2に1つのホスホロチオエートヌクレオシド間連結部修飾、および最後の6つの最後の6つの位置内に2つのホスホロチオエートヌクレオシド間連結部修飾またはメチルホスホネートヌクレオシド間連結部修飾を、さらに含む。

【0378】

いくつかの態様において、本明細書に記載のdsRNA分子は、センス鎖の（5'端から数えて）位置1~5内に2つのホスホロチオエートヌクレオシド間連結部修飾、および最後の6つの位置内に1つのホスホロチオエートヌクレオシド間連結部修飾、ならびにアンチセンス鎖の（5'端から数えて）位置1および2に1つのホスホロチオエートヌクレオシド間連結部修飾、および最後の6つの位置内に2つのホスホロチオエートヌクレオシド間連結部修飾を、さらに含む。

【0379】

いくつかの態様において、本明細書に記載のdsRNA分子は、センス鎖の（5'端から数えて）位置1~5内に2つのホスホロチオエートヌクレオシド間連結部修飾、および最後の4つの位置内に2つのホスホロチオエートヌクレオシド間連結部修飾、ならびにアンチセンス鎖の（5'端から数えて）位置1および2に1つのホスホロチオエートヌクレオシド間連結部修飾、および最後の6つの位置内に2つのホスホロチオエートヌクレオシド間連結部修飾を、さらに含む。

【0380】

いくつかの態様において、本明細書に記載のdsRNA分子は、センス鎖の（5'端から数えて）位置1～5内に2つのホスホロチオエートヌクレオシド間連結部修飾、および最後の4つの位置内に2つのホスホロチオエートヌクレオシド間連結部修飾、ならびにアンチセンス鎖の（5'端から数えて）位置1および2に1つのホスホロチオエートヌクレオシド間連結部修飾、および最後の6つの位置内に1つのホスホロチオエートヌクレオシド間連結部修飾を、さらに含む。

【0381】

いくつかの態様において、本明細書に記載のdsRNA分子は、センス鎖の（5'端から数えて）位置1～5内に1つのホスホロチオエートヌクレオシド間連結部修飾、および最後の4つの位置内に1つのホスホロチオエートヌクレオシド間連結部修飾、ならびにアンチセンス鎖の（5'端から数えて）位置1および2に2つのホスホロチオエートヌクレオシド間連結部修飾、および最後の6つの位置内に2つのホスホロチオエートヌクレオシド間連結部修飾を、さらに含む。

10

【0382】

いくつかの態様において、本明細書に記載のdsRNA分子は、センス鎖の（5'端から数えて）位置1～5内に1つのホスホロチオエートヌクレオシド間連結部修飾、および最後の6つの位置内に1つ、ならびにアンチセンス鎖の（5'端から数えて）位置1および2に2つのホスホロチオエートヌクレオシド間連結部修飾、および最後の6つの位置内に1つのホスホロチオエートヌクレオシド間連結部修飾を、さらに含む。

20

【0383】

いくつかの態様において、本明細書に記載のdsRNA分子は、センス鎖の（5'端から数えて）位置1～5内に1つのホスホロチオエートヌクレオシド間連結部修飾、ならびにアンチセンス鎖の（5'端から数えて）位置1および2に2つのホスホロチオエートヌクレオシド間連結部修飾、および最後の6つの位置内に1つのホスホロチオエートヌクレオシド間連結部修飾を、さらに含む。

【0384】

いくつかの態様において、本明細書に記載のdsRNA分子は、センス鎖の（5'端から数えて）位置1～5内に2つのホスホロチオエートヌクレオシド間連結部修飾、ならびにアンチセンス鎖の（5'端から数えて）位置1および2に1つのホスホロチオエートヌクレオシド間連結部修飾、および最後の6つの位置内に2つのホスホロチオエートヌクレオシド間連結部修飾を、さらに含む。

30

【0385】

いくつかの態様において、本明細書に記載のdsRNA分子は、センス鎖の（5'端から数えて）位置1～5内に2つのホスホロチオエートヌクレオシド間連結部修飾、および最後の6つの位置内に1つ、ならびにアンチセンス鎖の（5'端から数えて）位置1および2に2つのホスホロチオエートヌクレオシド間連結部修飾、および最後の6つの位置内に1つのホスホロチオエートヌクレオシド間連結部修飾を、さらに含む。

【0386】

いくつかの態様において、本明細書に記載のdsRNA分子は、センス鎖の（5'端から数えて）位置1～5内に2つのホスホロチオエートヌクレオシド間連結部修飾、および最後の6つの位置内に1つのホスホロチオエートヌクレオシド間連結部修飾、ならびにアンチセンス鎖の（5'端から数えて）位置1および2に2つのホスホロチオエートヌクレオシド間連結部修飾、および最後の6つの位置内に2つのホスホロチオエートヌクレオシド間連結部修飾を、さらに含む。

40

【0387】

いくつかの態様において、本明細書に記載のdsRNA分子は、センス鎖の（5'端から数えて）位置1～5内に2つのホスホロチオエートヌクレオシド間連結部修飾、および最後の6つの位置内に1つのホスホロチオエートヌクレオシド間連結部修飾、ならびにアンチセンス鎖の（5'端から数えて）位置1および2に1つのホスホロチオエートヌクレオシド

50

間連結部修飾、および最後の6つの位置内に2つのホスホロチオエートヌクレオシド間連結部修飾を、さらに含む。

【0388】

いくつかの態様において、本明細書に記載のdsRNA分子は、センス鎖の（5'端から数えて）位置1および2に2つのホスホロチオエートヌクレオシド間連結部修飾、位置20および21に2つのホスホロチオエートヌクレオシド間連結部修飾、ならびにアンチセンス鎖の（5'端から数えて）位置1に1つのホスホロチオエートヌクレオシド間連結部修飾、および位置21に1つを、さらに含む。

【0389】

いくつかの態様において、本明細書に記載のdsRNA分子は、センス鎖の（5'端から数えて）位置1に1つのホスホロチオエートヌクレオシド間連結部修飾、および位置21に1つのホスホロチオエートヌクレオシド間連結部修飾、ならびにアンチセンス鎖の（5'端から数えて）位置1および2に2つのホスホロチオエートヌクレオシド間連結部修飾、位置20および21に2つのホスホロチオエートヌクレオシド間連結部修飾を、さらに含む。

【0390】

いくつかの態様において、本明細書に記載のdsRNA分子は、センス鎖の（5'端から数えて）位置1および2に2つのホスホロチオエートヌクレオシド間連結部修飾、位置21および22に2つのホスホロチオエートヌクレオシド間連結部修飾、ならびにアンチセンス鎖の（5'端から数えて）位置1に1つのホスホロチオエートヌクレオシド間連結部修飾、および位置21に1つのホスホロチオエートヌクレオシド間連結部修飾を、さらに含む。

【0391】

いくつかの態様において、本明細書に記載のdsRNA分子は、センス鎖の（5'端から数えて）位置1に1つのホスホロチオエートヌクレオシド間連結部修飾、および位置21に1つのホスホロチオエートヌクレオシド間連結部修飾、ならびにアンチセンス鎖の（5'端から数えて）位置1および2に2つのホスホロチオエートヌクレオシド間連結部修飾、位置21および22に2つのホスホロチオエートヌクレオシド間連結部修飾を、さらに含む。

【0392】

いくつかの態様において、本明細書に記載のdsRNA分子は、センス鎖の（5'端から数えて）位置1および2に2つのホスホロチオエートヌクレオシド間連結部修飾、位置22および23に2つのホスホロチオエートヌクレオシド間連結部修飾、ならびにアンチセンス鎖の（5'端から数えて）位置1に1つのホスホロチオエートヌクレオシド間連結部修飾、および位置21に1つのホスホロチオエートヌクレオシド間連結部修飾を、さらに含む。

【0393】

いくつかの態様において、本明細書に記載のdsRNA分子は、センス鎖の（5'端から数えて）位置1に1つのホスホロチオエートヌクレオシド間連結部修飾、および位置21に1つのホスホロチオエートヌクレオシド間連結部修飾、ならびにアンチセンス鎖の（5'端から数えて）位置1および2に2つのホスホロチオエートヌクレオシド間連結部修飾、位置22および23に2つのホスホロチオエートヌクレオシド間連結部修飾を、さらに含む。

【0394】

いくつかの態様において、センス鎖は、センス鎖の5'端から数えて最初の5ヌクレオチドの間に少なくとも2つのホスホロチオエートヌクレオシド間連結部を含む。例えばセンス鎖は、センス鎖の5'端から数えてヌクレオチド1と2の間およびヌクレオチド2と3の間に、ホスホロチオエート連結部を含む。

【0395】

いくつかの態様において、アンチセンス鎖は、アンチセンス鎖の5'端から数えて最初の5ヌクレオチドの間に少なくとも2つのホスホロチオエートヌクレオシド間連結部を含む。例えばアンチセンス鎖は、アンチセンス鎖の5'端から数えてヌクレオチド1と2の間およびヌクレオチド2と3の間に、ホスホロチオエート連結部を含む。

【0396】

いくつかの態様において、アンチセンス鎖は、アンチセンス鎖の3'端から数えて最初

10

20

30

40

50

の5ヌクレオチドの間に少なくとも2つのホスホロチオエートヌクレオシド間連結部を含む。例えばアンチセンス鎖は、ヌクレオチド n と $n-1$ の間およびヌクレオチド $n-1$ と $n-2$ の間に、ホスホロチオエート連結部を含み、ここで n は、アンチセンス鎖の長さ、すなわちアンチセンス鎖中のヌクレオチドの数である。言い換えると、アンチセンス鎖は、アンチセンス鎖の3'端から数えてヌクレオチド1と2の間およびヌクレオチド2と3の間に、ホスホロチオエート連結部を含む。

【0397】

いくつかの態様において、アンチセンス鎖は、アンチセンス鎖の5'端から数えて最初の5ヌクレオチドの間に少なくとも2つのホスホロチオエートヌクレオシド間連結部を含み、アンチセンス鎖の5'端から数えて最初の5ヌクレオチドの間に少なくとも2つのホスホロチオエートヌクレオシド間連結部を含む。例えばアンチセンス鎖は、アンチセンス鎖の5'端から数えてヌクレオチド1と2の間、およびヌクレオチド2と3の間、ならびにアンチセンス鎖の3'端から数えてヌクレオチド1と2の間およびヌクレオチド2と3の間に、ホスホロチオエート連結部を含む。

10

【0398】

いくつかの態様において、センス鎖は、センス鎖の5'端から数えて最初の5ヌクレオチドの間に少なくとも2つのホスホロチオエートヌクレオシド間連結部を含み、アンチセンス鎖は、アンチセンス鎖の5'端から数えて最初の5ヌクレオチドの間に少なくとも2つのホスホロチオエートヌクレオシド間連結部を含む。例えばセンス鎖は、センス鎖の5'端から数えてヌクレオチド1と2の間およびヌクレオチド2と3の間にホスホロチオエート連結部を含み、アンチセンス鎖は、アンチセンス鎖の5'端から数えてヌクレオチド1と2の間およびヌクレオチド2と3の間にホスホロチオエート連結部を含む。

20

【0399】

いくつかの態様において、センス鎖は、センス鎖の5'端から数えて最初の5ヌクレオチドの間に少なくとも2つのホスホロチオエートヌクレオシド間連結部を含み、アンチセンス鎖は、アンチセンス鎖の3'端から数えて最初の5ヌクレオチドの間に少なくとも2つのホスホロチオエートヌクレオシド間連結部を含む。例えばセンス鎖は、センス鎖の5'端から数えてヌクレオチド1と2の間およびヌクレオチド2と3の間にホスホロチオエート連結部を含み、アンチセンス鎖は、アンチセンス鎖の3'端から数えてヌクレオチド1と2の間およびヌクレオチド2と3の間にホスホロチオエート連結部を含む。

30

【0400】

いくつかの態様において、本明細書に記載のdsRNA分子は、あるパターンのバックボーンキラル中心を含む。いくつかの態様において、バックボーンキラル中心の共通パターンは、少なくとも5つの、Sp立体配置のヌクレオチド間連結部を含む。いくつかの態様において、バックボーンキラル中心の共通パターンは、少なくとも6つの、Sp立体配置のヌクレオチド間連結部を含む。いくつかの態様において、バックボーンキラル中心の共通パターンは、少なくとも7つの、Sp立体配置のヌクレオチド間連結部を含む。いくつかの態様において、バックボーンキラル中心の共通パターンは、少なくとも8つの、Sp立体配置のヌクレオチド間連結部を含む。いくつかの態様において、バックボーンキラル中心の共通パターンは、少なくとも9つの、Sp立体配置のヌクレオチド間連結部を含む。いくつかの態様において、バックボーンキラル中心の共通パターンは、少なくとも10個の、Sp立体配置のヌクレオチド間連結部を含む。いくつかの態様において、バックボーンキラル中心の共通パターンは、少なくとも11個の、Sp立体配置のヌクレオチド間連結部を含む。いくつかの態様において、バックボーンキラル中心の共通パターンは、少なくとも12個の、Sp立体配置のヌクレオチド間連結部を含む。いくつかの態様において、バックボーンキラル中心の共通パターンは、少なくとも13個の、Sp立体配置のヌクレオチド間連結部を含む。いくつかの態様において、バックボーンキラル中心の共通パターンは、少なくとも14個の、Sp立体配置のヌクレオチド間連結部を含む。いくつかの態様において、バックボーンキラル中心の共通パターンは、少なくとも15個の、Sp立体配置のヌクレオチド間連結部を含む。いくつかの態様において、バックボーンキラル中心の共通パターンは

40

50

、少なくとも16個の、Sp立体配置のヌクレオチド間連結部を含む。いくつかの態様において、バックボーンキラル中心の共通パターンは、少なくとも17個の、Sp立体配置のヌクレオチド間連結部を含む。いくつかの態様において、バックボーンキラル中心の共通パターンは、少なくとも18個の、Sp立体配置のヌクレオチド間連結部を含む。いくつかの態様において、バックボーンキラル中心の共通パターンは、少なくとも19個の、Sp立体配置のヌクレオチド間連結部を含む。いくつかの態様において、バックボーンキラル中心の共通パターンが含むRp立体配置のヌクレオチド間連結部は8つ以下である。いくつかの態様において、バックボーンキラル中心の共通パターンが含むRp立体配置のヌクレオチド間連結部は7つ以下である。いくつかの態様において、バックボーンキラル中心の共通パターンが含むRp立体配置のヌクレオチド間連結部は6つ以下である。いくつかの態様において、バックボーンキラル中心の共通パターンが含むRp立体配置のヌクレオチド間連結部は5つ以下である。いくつかの態様において、バックボーンキラル中心の共通パターンが含むRp立体配置のヌクレオチド間連結部は4つ以下である。いくつかの態様において、バックボーンキラル中心の共通パターンが含むRp立体配置のヌクレオチド間連結部は3つ以下である。いくつかの態様において、バックボーンキラル中心の共通パターンが含むRp立体配置のヌクレオチド間連結部は2つ以下である。いくつかの態様において、バックボーンキラル中心の共通パターンが含むRp立体配置のヌクレオチド間連結部は1つ以下である。いくつかの態様において、バックボーンキラル中心の共通パターンが含むキラルでないヌクレオチド間連結部（非限定的な例として、ホスホジエステル）は、8つ以下である。いくつかの態様において、バックボーンキラル中心の共通パターンが含むキラルでないヌクレオチド間連結部は、7つ以下である。いくつかの態様において、バックボーンキラル中心の共通パターンが含むキラルでないヌクレオチド間連結部は、6つ以下である。いくつかの態様において、バックボーンキラル中心の共通パターンが含むキラルでないヌクレオチド間連結部は、5つ以下である。いくつかの態様において、バックボーンキラル中心の共通パターンが含むキラルでないヌクレオチド間連結部は、4つ以下である。いくつかの態様において、バックボーンキラル中心の共通パターンが含むキラルでないヌクレオチド間連結部は、3つ以下である。いくつかの態様において、バックボーンキラル中心の共通パターンが含むキラルでないヌクレオチド間連結部は、2つ以下である。いくつかの態様において、バックボーンキラル中心の共通パターンが含むキラルでないヌクレオチド間連結部は、1つ以下である。いくつかの態様において、バックボーンキラル中心の共通パターンは、少なくとも10個の、Sp立体配置のヌクレオチド間連結部と、8個以下の、キラルでないヌクレオチド間連結部とを含む。いくつかの態様において、バックボーンキラル中心の共通パターンは、少なくとも11個の、Sp立体配置のヌクレオチド間連結部と、7個以下の、キラルでないヌクレオチド間連結部とを含む。いくつかの態様において、バックボーンキラル中心の共通パターンは、少なくとも12個の、Sp立体配置のヌクレオチド間連結部と、6個以下の、キラルでないヌクレオチド間連結部とを含む。いくつかの態様において、バックボーンキラル中心の共通パターンは、少なくとも13個の、Sp立体配置のヌクレオチド間連結部と、6個以下の、キラルでないヌクレオチド間連結部とを含む。いくつかの態様において、バックボーンキラル中心の共通パターンは、少なくとも14個の、Sp立体配置のヌクレオチド間連結部と、5個以下の、キラルでないヌクレオチド間連結部とを含む。いくつかの態様において、バックボーンキラル中心の共通パターンは、少なくとも15個の、Sp立体配置のヌクレオチド間連結部と、4個以下の、キラルでないヌクレオチド間連結部とを含む。いくつかの態様において、Sp立体配置のヌクレオチド間連結部は任意で連続していても連続していなくてもよい。いくつかの態様において、Rp立体配置のヌクレオチド間連結部は任意で連続していても連続していなくてもよい。いくつかの態様において、キラルでないヌクレオチド間連結部は任意で連続していても連続していなくてもよい。

10

20

30

40

50

【0401】

いくつかの態様において、本明細書に記載のdsRNA分子は、立体化学ブロックであるブロックを含む。いくつかの態様において、ブロックは、ブロックの各ヌクレオチド間連

結部がRpであるRpブロックである。いくつかの態様において、5'-ブロックはRpブロックである。いくつかの態様において、3'-ブロックはRpブロックである。いくつかの態様において、ブロックは、ブロックの各ヌクレオチド間連結部がSpであるSpブロックである。いくつかの態様において、5'-ブロックはSpブロックである。いくつかの態様において、3'-ブロックはSpブロックである。いくつかの態様において、提供されるオリゴヌクレオチドはRpブロックとSpブロックの両方を含む。いくつかの態様において、提供されるオリゴヌクレオチドは、1つまたは複数のRpブロックを含むが、Spブロックは含まない。いくつかの態様において、提供されるオリゴヌクレオチドは、1つまたは複数のSpブロックを含むが、Rpブロックは含まない。いくつかの態様において、提供されるオリゴヌクレオチドは、各ヌクレオチド間連結部が天然のホスフェート連結部である1つまたは複数のPOブロックを含む。

10

【0402】

いくつかの態様において、本明細書に記載のdsRNA分子は、各糖部分が2'-フルオロ修飾を含むSpブロックである5'-ブロックを含む。いくつかの態様において、5'-ブロックは、ヌクレオチド間連結部のそれぞれが修飾ヌクレオチド間連結部であり、各糖部分が2'-フルオロ修飾を含む、Spブロックである。いくつかの態様において、5'-ブロックは、ヌクレオチド間連結部のそれぞれがホスホロチオエート連結部であり、各糖部分が2'-フルオロ修飾を含む、Spブロックである。いくつかの態様において、5'-ブロックは4つまたはそれ以上のヌクレオシド単位を含む。いくつかの態様において、5'-ブロックは5つまたはそれ以上のヌクレオシド単位を含む。いくつかの態様において、5'-ブロックは6つまたはそれ以上のヌクレオシド単位を含む。いくつかの態様において、5'-ブロックは7つまたはそれ以上のヌクレオシド単位を含む。いくつかの態様において、3'-ブロックは、各糖部分が2'-フルオロ修飾を含むSpブロックである。いくつかの態様において、3'-ブロックは、ヌクレオチド間連結部のそれぞれが修飾ヌクレオチド間連結部であり、各糖部分が2'-フルオロ修飾を含む、Spブロックである。いくつかの態様において、3'-ブロックは、ヌクレオチド間連結部のそれぞれがホスホロチオエート連結部であり、各糖部分が2'-フルオロ修飾を含む、Spブロックである。いくつかの態様において、3'-ブロックは4つまたはそれ以上のヌクレオシド単位を含む。いくつかの態様において、3'-ブロックは5つまたはそれ以上のヌクレオシド単位を含む。いくつかの態様において、3'-ブロックは6つまたはそれ以上のヌクレオシド単位を含む。いくつかの態様において、3'-ブロックは7つまたはそれ以上のヌクレオシド単位を含む。

20

30

【0403】

いくつかの態様において、本明細書に記載のdsRNA分子は、ある領域またはオリゴヌクレオチド中のあるタイプのヌクレオシドであって、その後、特定タイプのヌクレオチド間連結部、例えば天然のホスフェート連結部、修飾ヌクレオチド間連結部、Rpキラルヌクレオチド間連結部、Spキラルヌクレオチド間連結部などが続くヌクレオシドを含む。いくつかの態様において、Aの後にSpが続く。いくつかの態様では、Aの後にRpが続く。いくつかの態様では、Aの後に天然のホスフェート連結部(PO)が続く。いくつかの態様では、Uの後にSpが続く。いくつかの態様では、Uの後にRpが続く。いくつかの態様では、Uの後に天然のホスフェート連結部(PO)が続く。いくつかの態様では、Cの後にSpが続く。いくつかの態様では、Cの後にRpが続く。いくつかの態様では、Cの後に天然のホスフェート連結部(PO)が続く。いくつかの態様では、Gの後にSpが続く。いくつかの態様では、Gの後にRpが続く。いくつかの態様では、Gの後に天然のホスフェート連結部(PO)が続く。いくつかの態様では、CおよびUの後にSpが続く。いくつかの態様では、CおよびUの後にRpが続く。いくつかの態様では、CおよびUの後に天然のホスフェート連結部(PO)が続く。いくつかの態様では、AおよびGの後にSpが続く。いくつかの態様では、AおよびGの後にRpが続く。

40

【0404】

さまざまな刊行物が多量体型siRNAを記載しており、それらはいずれも本発明のオリゴヌクレオチドおよびdsRNAに使用することができる。そのような刊行物には、WO20

50

07/091269、米国特許第7858769号、WO2010/141511、WO2007/117686、WO2009/014887およびWO2011/031520が含まれ、それらはその全体が本明細書に組み入れられる。

【0405】

いくつかの態様において、本明細書に記載のdsRNA分子は、鎖の3'端もしくは5'端または両端に、1つまたは複数の、dsRNA分子のオーバーハング領域および/またはキャッピング基を含む。オーバーハングは1~10ヌクレオチド長であることができる。例えばオーバーハングは、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10ヌクレオチド長であることができる。いくつかの態様において、オーバーハングは1~6ヌクレオチド長、例えば2~6ヌクレオチド長、1~5ヌクレオチド長、2~5ヌクレオチド長、1~4ヌクレオチド長、2~4ヌクレオチド長、1~3ヌクレオチド長、2~3ヌクレオチド長、または1~2ヌクレオチド長である。オーバーハングは、一方の鎖が他方の鎖より長い結果であるか、同じ長さの2本の鎖が互いにずれている結果であることができる。オーバーハングは、標的配列とミスマッチを形成するか、標的となる遺伝子配列に相補的であるか、または他の配列であることができる。第1鎖と第2鎖は、例えば追加の塩基で接合してヘアピンを形成させるか、または他の非塩基リンカーで接合することもできる。

10

【0406】

いくつかの態様において、本明細書に記載のdsRNA分子のオーバーハング領域中のヌクレオチドは、それぞれ独立して、修飾ヌクレオチドまたは無修飾ヌクレオチド、例えば限定するわけではないが、2'-糖修飾、例えば2'-フルオロ、2'-O-メチル、チミジン(T)、2'-O-メトキシエチル-5-メチルウリジン、2'-O-メトキシエチルアデノシン、2'-O-メトキシエチル-5-メチルシチジン、GNA、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNA、h'GNA、およびそれらの任意の組合せであることができる。例えばdTdTは、どちらかの鎖のどちらかの端のオーバーハング配列であることができる。オーバーハングは、標的mRNAとミスマッチを形成するか、標的となる遺伝子配列に相補的であるか、または他の配列であることができる。

20

【0407】

本明細書に記載のdsRNA分子のセンス鎖、アンチセンス鎖または両鎖の5'-オーバーハングまたは3'-オーバーハングをリン酸化しうる。いくつかの態様において、オーバーハング領域は、2つのヌクレオチドの間にホスホロチオエートを有する2つのヌクレオチドを含有し、それら2つのヌクレオチドは同じである場合も異なる場合もある。いくつかの態様において、オーバーハングは、センス鎖、アンチセンス鎖または両方の鎖の3'端に存在する。いくつかの態様において、この3'-オーバーハングはアンチセンス鎖に存在する。いくつかの態様において、この3'-オーバーハングはセンス鎖に存在する。

30

【0408】

本明細書に記載のdsRNA分子はオーバーハングを一つだけ含んでもよく、これは、dsRNAの全体的安定性に影響を及ぼすことなく、その干渉活性を強化することができる。例えば一本鎖オーバーハングは、センス鎖の3'末端に位置するか、あるいはアンチセンス鎖の3'末端に位置することができる。dsRNAは、アンチセンス鎖の5'端(またはセンス鎖の3'端)に位置するかまたはその逆である平滑端を有することもできる。

40

【0409】

一般にdsRNAのアンチセンス鎖は3'端にヌクレオチドオーバーハングを有し、5'端は平滑である。理論に拘泥するわけではないが、非対称なアンチセンス鎖の5'端の平滑端とアンチセンス鎖の3'端オーバーハングは、RISCへのガイド鎖の積み込みプロセスにとって有利である。例えば、単一のオーバーハングは、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9または10ヌクレオチド長である。いくつかの態様において、dsRNAは、アンチセンス鎖の3'端に2ヌクレオチドのオーバーハングを有し、アンチセンス鎖の5'端に平滑端を有する。

【0410】

本明細書に記載のdsRNAは1つまたは複数の修飾ヌクレオチドを含むことができる。

50

例えば、dsRNA分子のセンス鎖中およびアンチセンス鎖中のすべてのヌクレオチドを修飾することができる。各ヌクレオチドは同じ修飾または異なる修飾で修飾することができる、これらの修飾には、非連結ホスフェート酸素のうち的一方もしくは両方および/または連結ホスフェート酸素のうちの一つもしくは複数の1つまたは複数の改変;リボース糖の構成成分の改変;リボース糖の置き換え;「デホスホ (dephospho)」リンカーによるホスフェート部分の全面的置換;天然塩基の修飾または置換;およびリボース-ホスフェートバックボーンの置換または修飾を含めることができる。

【0411】

核酸はサブユニットのポリマーであるから、修飾の多くは、例えば塩基、またはホスフェート部分、もしくはホスフェート部分の非連結Oの修飾など、核酸内で繰り返される位置に存在する。場合により、修飾は核酸中の対象位置のすべてに存在することになるが、多くの場合は、そうはならないだろう。例えば、修飾は3'末端位置または5'末端位置にのみ存在するか、あるいは中央領域にのみ存在するか、あるいは非末端領域にのみ存在するか、あるいは末端領域中、例えば末端ヌクレオチド上の位置または鎖の最後の2、3、4、5もしくは10ヌクレオチド中にのみ存在しうる。修飾は、二本鎖領域中、一本鎖領域中、またはその両方に存在しうる。修飾は、RNAの二本鎖領域中にのみ存在するか、またはRNAの一本鎖領域中にのみ存在しうる。例えば非連結O位置のホスホロチオエート修飾は、一端または両端にのみ存在するか、あるいは末端領域中の、例えば末端ヌクレオチド上の位置、または鎖の最後の2、3、4、5もしくは10ヌクレオチド中にのみ存在するか、あるいは二本鎖領域および一本鎖領域、特に末端に存在しうる。1つまたは複数の5'端をリン酸化することができる。

【0412】

例えば、安定性を強化すること、オーバーハングに特定の塩基を含めること、または修飾ヌクレオチドもしくはヌクレオチド代替物を一本鎖オーバーハング、例えば5'オーバーハングもしくは3'オーバーハング、またはその両方に含めることが可能でありうる。例えば、オーバーハングにプリンヌクレオチドを含めることが望ましい場合がありうる。いくつかの態様では、3'オーバーハングまたは5'オーバーハング中の塩基の全部または一部を、例えば本明細書に記載の修飾で、修飾しうる。修飾には、例えば、当技術分野において公知の修飾によるリボース糖の2'位における修飾の使用、例えば核酸塩基のリボース糖の代わりにデオキシリボヌクレオチド、2'-デオキシ-2'-フルオロ (2'-F) または2'-O-メチル修飾物の使用、およびホスフェート基中の修飾、例えばホスホロチオエート修飾を含めることができる。オーバーハングが標的配列と相同である必要はない。

【0413】

いくつかの態様において、本明細書に記載のdsRNA分子は交互パターンの修飾を、特にB1、B2、B3、B1'、B2'、B3'、B4'領域に含む。本明細書において使用される「交互モチーフ」または「交互パターン」という用語は、1つまたは複数の修飾を有し、それぞれの修飾が一本の鎖の交互ヌクレオチド上に存在するモチーフを指す。交互ヌクレオチドとは、一つ置き、もしくは二つ置きのヌクレオチドなどといったパターンを指しうる。例えばA、BおよびCがそれぞれヌクレオチドに対する修飾のタイプを表すとする、交互モチーフとは「ABABABABABAB…」、「AABBAABBAABB…」、「AABAABAABAAB…」、「AAABAAABAAAB…」、「AAABBBAAABBB…」または「ABCABCABCABC…」などであることができる。

【0414】

交互モチーフに含まれる修飾のタイプは同じであっても異なってもよい。例えば、A、B、C、Dがそれぞれヌクレオチド上の修飾のタイプを表すとする、交互パターン、すなわちヌクレオチド一つ置きの修飾は同じであってもよいが、センス鎖またはアンチセンス鎖のそれぞれは、例えば「ABABAB…」、「ACACAC…」、「BDBDBD…」または「CDCDCD…」など、交互モチーフ内でいくつか考えられる修飾から選択することができる。

【0415】

いくつかの態様において、本明細書に記載のdsRNA分子は、アンチセンス鎖上の交互モチーフに関する修飾パターンに対してシフトした、センス鎖上の交互モチーフに関する修飾パターンを含む。シフトは、センス鎖のヌクレオチドの修飾を受けた基が、アンチセンス鎖のヌクレオチドの異なる修飾を受けた基に対応するようなシフト、またはその逆でありうる。例えばセンス鎖がdsRNA二重鎖中でアンチセンス鎖と対合している場合に、二重鎖領域内で、センス鎖中の交互モチーフは鎖の5'から3'に向かって「ABABAB」で始まり、アンチセンス鎖中の交互モチーフは鎖の3'から5'に向かって「BABABA」で始まりうる。もう一つの例として、センス鎖とアンチセンス鎖の間で修飾パターンの完全なまたは部分的なシフトが生じるように、二重鎖領域内で、センス鎖中の交互モチーフは鎖の5'から3'に向かって「AABBAABB」で始まり、アンチセンス鎖中の交互モチーフは鎖の3'から5'に向かって「BBAABBAA」で始まりうる。

10

【0416】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、本明細書記載のオリゴヌクレオチド、または本明細書記載のdsRNAの少なくとも一方の鎖、例えば両方の鎖は、5'リン酸化されているか、または5'プライム末にホスホリル類似体を含む。5'-ホスフェート修飾として、RISCが媒介する遺伝子サイレンシングと適合するものが挙げられる。適切な修飾として、5'-モノホスフェート ($(\text{HO})_2(\text{O})\text{P}-\text{O}-5'$)、5'-ジホスフェート ($(\text{HO})_2(\text{O})\text{P}-\text{O}-\text{P}(\text{HO})(\text{O})-\text{O}-5'$)、5'-トリホスフェート ($(\text{HO})_2(\text{O})\text{P}-\text{O}-\text{P}(\text{HO})(\text{O})-\text{O}-\text{P}(\text{HO})(\text{O})-\text{O}-5'$)、5'-グアノシンキャップ (7-メチル化または非メチル化) ($7\text{m}-\text{G}-\text{O}-5'-(\text{HO})(\text{O})\text{P}-\text{O}-(\text{HO})(\text{O})\text{P}-\text{O}-\text{P}(\text{HO})(\text{O})-\text{O}-5'$)、5'-アデノシンキャップ (Appp)、および任意の修飾または無修飾ヌクレオチドキャップ構造 ($\text{N}-\text{O}-5'-(\text{HO})(\text{O})\text{P}-\text{O}-(\text{HO})(\text{O})\text{P}-\text{O}-\text{P}(\text{HO})(\text{O})-\text{O}-5'$)、5'-モノチオホスフェート (ホスホロチオエート、 $(\text{HO})_2(\text{S})\text{P}-\text{O}-5'$)、5'-モノジチオホスフェート (ホスホロジチオエート、 $(\text{HO})(\text{HS})(\text{S})\text{P}-\text{O}-5'$)、5'-ホスホロチオレート ($(\text{HO})_2(\text{O})\text{P}-\text{S}-5'$) ; 酸素/硫黄置換モノホスフェート、ジホスフェートおよびトリホスフェート (例えば5'-アルファ-チオトリホスフェート、5'-ガンマ-チオトリホスフェートなど) の任意のさらなる組合せ、5'-ホスホラミデート ($(\text{HO})_2(\text{O})\text{P}-\text{NH}-5'$ 、 $(\text{HO})(\text{NH}_2)(\text{O})\text{P}-\text{O}-5'$)、5'-アルキルホスホネート (例えば $\text{RP}(\text{OH})(\text{O})-\text{O}-5'$ 、 $\text{R}=\text{アルキル}$ 、例えばメチル、エチル、イソプロピル、ブロピルなど)、5'-アルケニルホスホネート (すなわち、ビニル、置換ビニル、例えば $\text{OH}_2(\text{O})\text{P}-5'-\text{CH}=\text{または}(\text{OH})_2(\text{O})\text{P}-5'-\text{CH}_2-$)、5'-アルキルエーテルホスホネート (例えば $\text{R}(\text{OH})(\text{O})\text{P}-\text{O}-5'$ 、 $\text{R}=\text{アルキルエーテル}$ 、例えばメトキシメチル (MeOCH_2-)、エトキシメチルなど) が挙げられる。他の例示的5'-修飾には、Zが少なくとも1回は、置換されていてもよいアルキルであるもの、例えば ($(\text{HO})_2(\text{X})\text{P}-\text{O}-[-(\text{CH}_2)_a-\text{O}-\text{P}(\text{X})(\text{OH})-\text{O}]_b-5'$ 、 $(\text{HO})_2(\text{X})\text{P}-\text{O}-[-(\text{CH}_2)_a-\text{P}(\text{X})(\text{OH})-\text{O}]_b-5'$ 、 $(\text{HO})_2(\text{X})\text{P}-[-(\text{CH}_2)_a-\text{O}-\text{P}(\text{X})(\text{OH})-\text{O}]_b-5'$; ジアルキル末端ホスフェートおよびホスフェートミミック: $\text{HO}-[-(\text{CH}_2)_a-\text{O}-\text{P}(\text{X})(\text{OH})-\text{O}]_b-5'$ 、 $\text{H}_2\text{N}-[-(\text{CH}_2)_a-\text{O}-\text{P}(\text{X})(\text{OH})-\text{O}]_b-5'$ 、 $\text{H}-[-(\text{CH}_2)_a-\text{O}-\text{P}(\text{X})(\text{OH})-\text{O}]_b-5'$ 、 $\text{Me}_2\text{N}-[-(\text{CH}_2)_a-\text{O}-\text{P}(\text{X})(\text{OH})-\text{O}]_b-5'$ 、 $\text{HO}-[-(\text{CH}_2)_a-\text{P}(\text{X})(\text{OH})-\text{O}]_b-5'$ 、 $\text{H}_2\text{N}-[-(\text{CH}_2)_a-\text{P}(\text{X})(\text{OH})-\text{O}]_b-5'$ 、 $\text{H}-[-(\text{CH}_2)_a-\text{P}(\text{X})(\text{OH})-\text{O}]_b-5'$ 、 $\text{Me}_2\text{N}-[-(\text{CH}_2)_a-\text{P}(\text{X})(\text{OH})-\text{O}]_b-5'$ があり、ここで、aおよびbは、それぞれ独立して、1~10である。別の態様は、 BH_3 、 BH_3^- および/またはSeによる酸素および/または硫黄の置換を含む。

20

30

40

【0417】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、本明細書記載のオリゴヌクレオチド、または本明細書記載のdsRNAの少なくとも一方 (例えば両方) の鎖は、5'-ビニルホスホネート基を含む。例えば、本明細書記載のオリゴヌクレオチド、または本明細書記載のdsRNAの少なくとも一方 (例えば両方) の鎖は、5'-E-ビニルまたは本明細書記載のdsRNAの少なくとも一方 (例えば両方) の鎖ホスホネート基を含む。他のいくつかの非限定的な例において、オリゴヌクレオチドは5'-Z-ビニルホスホネート基を

50

含む。

【0418】

一例において、5'-修飾は、二本鎖核酸の、例えばdsRNA分子の、アンチセンス鎖中に置くことができる。例えばアンチセンスは5'-E-ビニルホスホネートを含む。他のいくつかの非限定的な例において、アンチセンス鎖は5'-Z-ビニルホスホネート基を含む。

【0419】

いくつかの態様において、センス鎖は、5'-モルホリノ、5'-ジメチルアミノ、5'-デオキシ、反転脱塩基、または反転脱塩基ロックト核酸修飾を、5'端に含む。

【0420】

本発明のdsRNA剤は、オフターゲット遺伝子サイレンシングを低減または阻害するために、アンチセンス鎖のシード領域中（すなわちアンチセンス鎖の5'端から位置2～9）に熱不安定化修飾を含むことができる。理論に拘泥するつもりはないが、アンチセンス鎖の5'端から数えて最初の9ヌクレオチド位置内に二重鎖の熱不安定化修飾を少なくとも1つは含むアンチセンス鎖を持つdsRNAは、低減したオフターゲット遺伝子サイレンシング活性を有する。したがっていくつかの態様において、アンチセンス鎖は、アンチセンス鎖の5'領域の最初の9個のヌクレオチド位置内に、二重鎖の熱不安定化修飾を少なくとも1つ（例えば1つ、2つ、3つ、4つ、5つまたはそれ以上）含む。いくつかの態様において、二重鎖の熱不安定化修飾は、アンチセンス鎖の5'端から、位置2～9、または好ましくは位置4～8に位置する。いくつかのさらなる態様において、二重鎖の熱不安定化修飾は、アンチセンス鎖の5'端から、位置5、6、7または8に位置する。

【0421】

いくつかのさらなる態様において、二重鎖の熱不安定化修飾は、アンチセンス鎖の5'端から、位置7に位置する。

【0422】

「熱不安定化修飾」という用語は、全体の融解温度（ T_m ）が低下したdsRNA（好ましくはそのような修飾を有しないdsRNAの T_m よりも1、2、3または4度低い T_m をもたらすであろう修飾を包含する。いくつかの態様において、二重鎖の熱不安定化修飾は、アンチセンス鎖の5'端から位置2、3、4、5、6、7、8または9に位置する。

【0423】

熱不安定化修飾は、脱塩基修飾；相対する鎖中の相対するヌクレオチドとのミスマッチ；および2'-デオキシ修飾または非環式ヌクレオチド、例えばアンロックド核酸（UNA）またはグリコール核酸（GNA）などの糖修飾を含むことができるが、それらに限定されるわけではない。例えば熱不安定化修飾としては、以下のmUNAおよびGNAビルディングブロックを挙げることができるが、それらに限定されるわけではない：

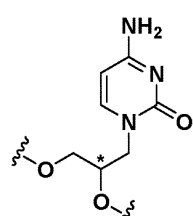
10

20

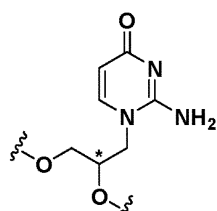
30

40

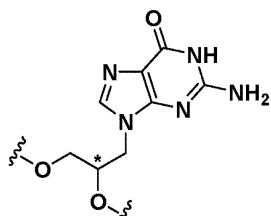
50



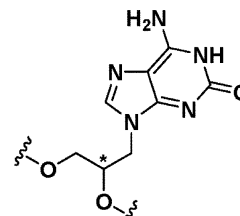
Mod 1
(GNA-C)



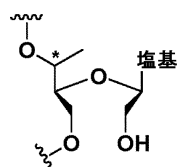
Mod 2
(GNA-isoC)



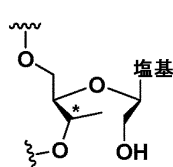
Mod 3
(GNA-G)



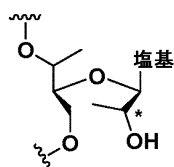
Mod 4
(GNA-isoG)



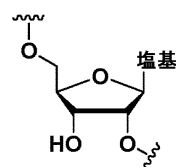
Mod 5
(5'-mUNA)



Mod 6
(3'-mUNA)

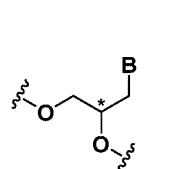


Mod 7
(2'-mUNA)

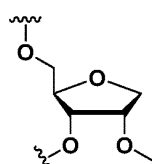


Mod 8
(2'-5'-RNA)

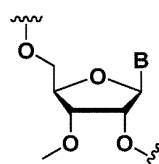
*両方の立体異性体を試験



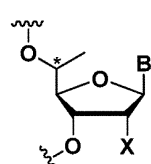
Mod1
(GNA)



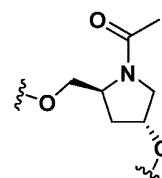
Mod2
(2'-OMe 脱塩基
スペーサー)



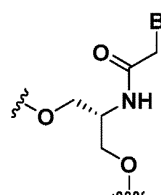
Mod3
(3'-OMe)



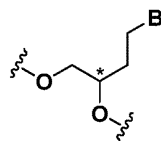
Mod4
(5'-Me)
X = OMe, F



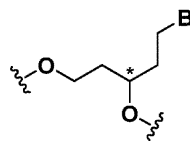
Mod5
(Hyp-スペーサー)



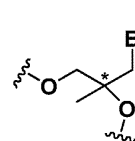
Mod6
(SNA)



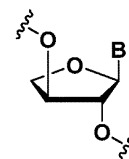
Mod7
(hGNA)



Mod8
(hhGNA)

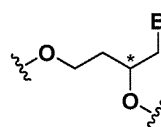


Mod9
(mGNA)



Mod10
(TNA)

*両方の立体異性体を試験



h'GNA

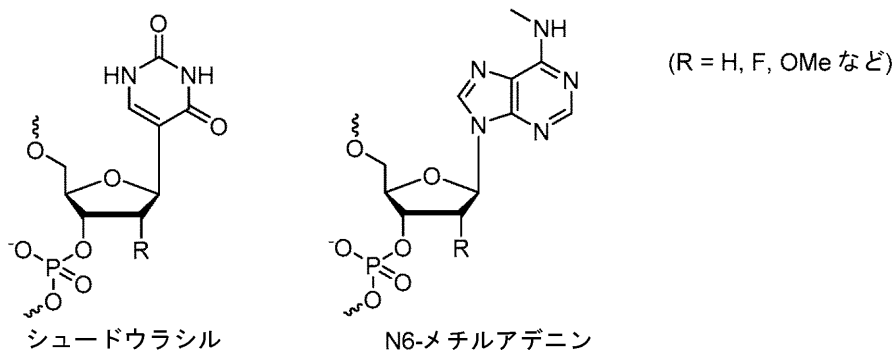
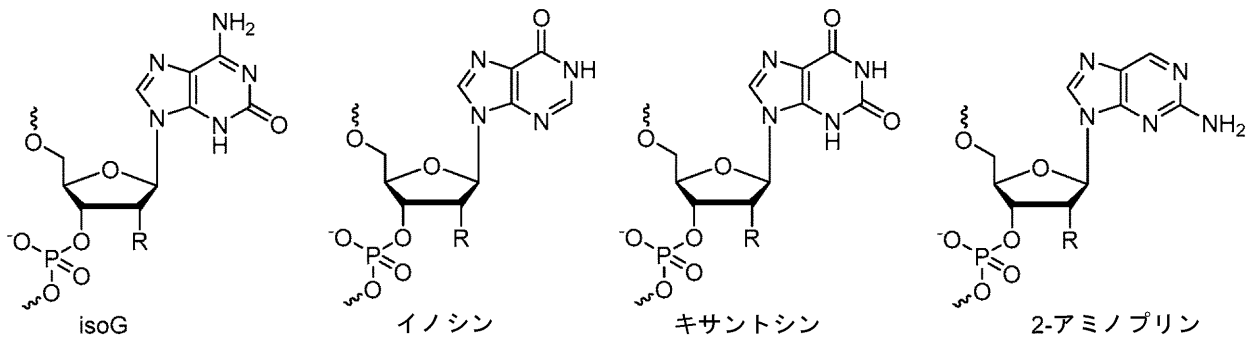
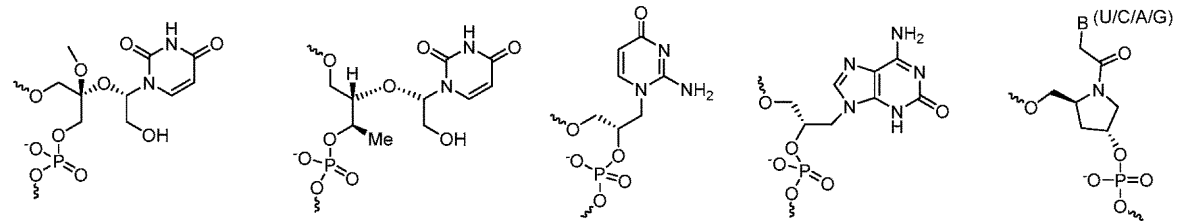
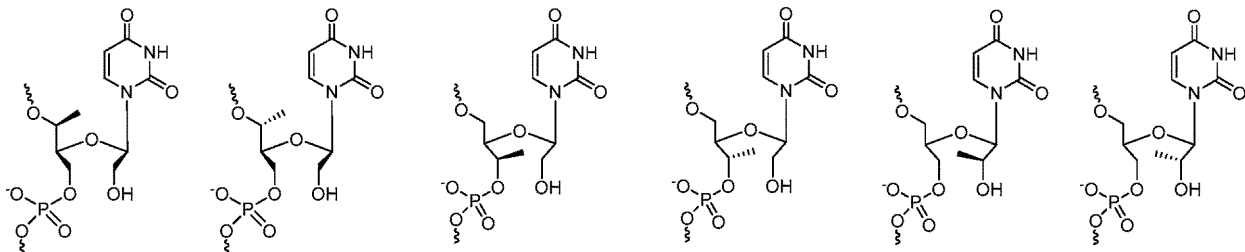
10

20

30

40

50



。【0424】

いくつかの態様において、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNAおよび2'-mUNAからなる群より選択される。

【0425】

いくつかの態様において、不安定化修飾mUNAは、

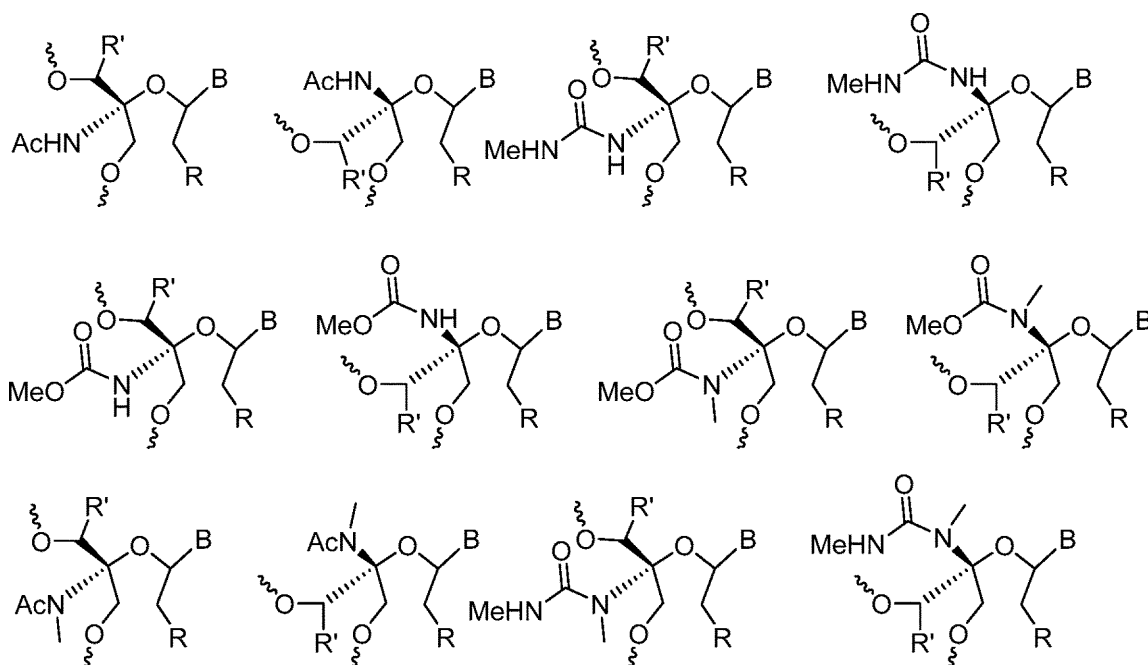
10

20

30

40

50



10

R = H、OH;OMe;Cl、F;OH;O-(CH₂)₂OMe;SMe、NMe₂;NH₂;Me;CCH (アルキン)、O-nPr;O-アルキル;O-アルキルアミノ;

20

R' = H、Me;

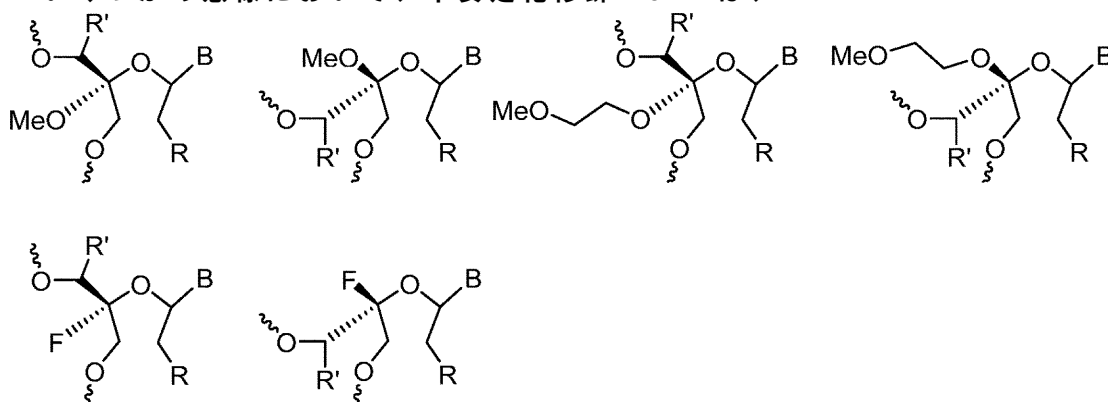
B = A;C;5-Me-C;G;I;U;T;Y;2-チオウリジン;4-チオウリジン;C5-修飾ピリミジン;C2-修飾プリン;N8-修飾プリン;フェノキサジン;G-クランプ (G-clamp);非標準単環式、二環式および三環式複素環;シュードウラシル;isoC;isoG;2,6-ジアミノプリン;シュードシトシン;2-アミノプリン;キサントシン;N6-アルキル-A;O6-アルキル-G;2-チオウリジン;4-チオウリジン;C5-修飾ピリミジン;C2-修飾プリン;N8-修飾プリン;7-デアザプリン、フェノキサジン;G-クランプ;非標準単環式、二環式および三環式複素環

からなる群より選択され、立体化学は、指定されていないキラル中心については、RまたはSならびにRおよびSの組合せである。

30

【0426】

いくつかの態様において、不安定化修飾mUNAは、



40

R = H、OH;OMe;Cl、F;OH;O-(CH₂)₂OMe;SMe、NMe₂;NH₂;Me;CCH (アルキン)、O-nPr;O-アルキル;O-アルキルアミノ;

R' = H、Me;

B = A;C;5-Me-C;G;I;U;T;Y;2-チオウリジン;4-チオウリジン;C5-修飾ピリミジン;C2-修飾プリン;N8-修飾プリン;フェノキサジン;G-クランプ;非標準単環式、二環式および三環式複素環;シュードウラシル;isoC;isoG;2,6-ジアミノプリン;シュードシトシン;2-

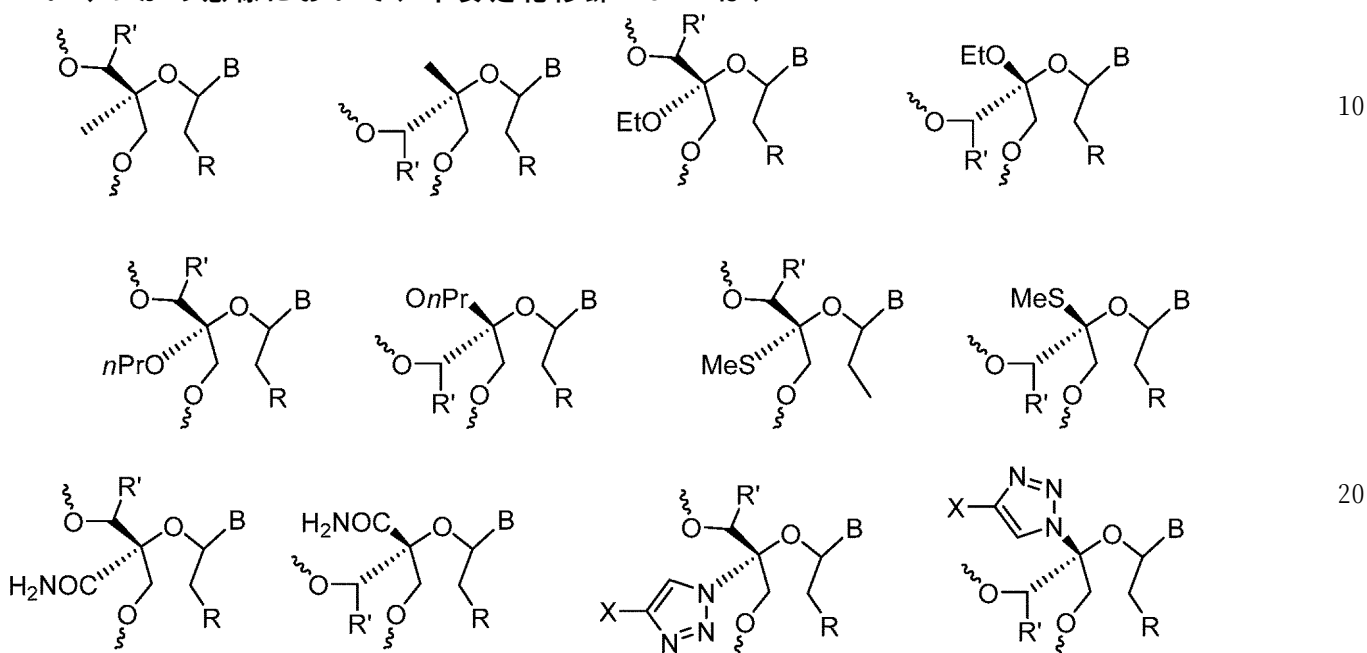
50

アミノプリン;キサントシン;N6-アルキル-A;O6-アルキル-G;2-チオウリジン;4-チオウリジン;C5-修飾ピリミジン;C2-修飾プリン;N8-修飾プリン;7-デアザプリン、フェノキサジン;G-クランプ;非標準単環式、二環式および三環式複素環

からなる群より選択され、立体化学は、指定されていないキラル中心については、RまたはSならびにRおよびSの組合せである。

【0427】

いくつかの態様において、不安定化修飾mUNAは、



R = H、OMe;F;OH;O-(CH₂)₂OMe;SMe、NMe₂;NH₂;Me;O-nPr;O-アルキル;O-アルキルアミノ;

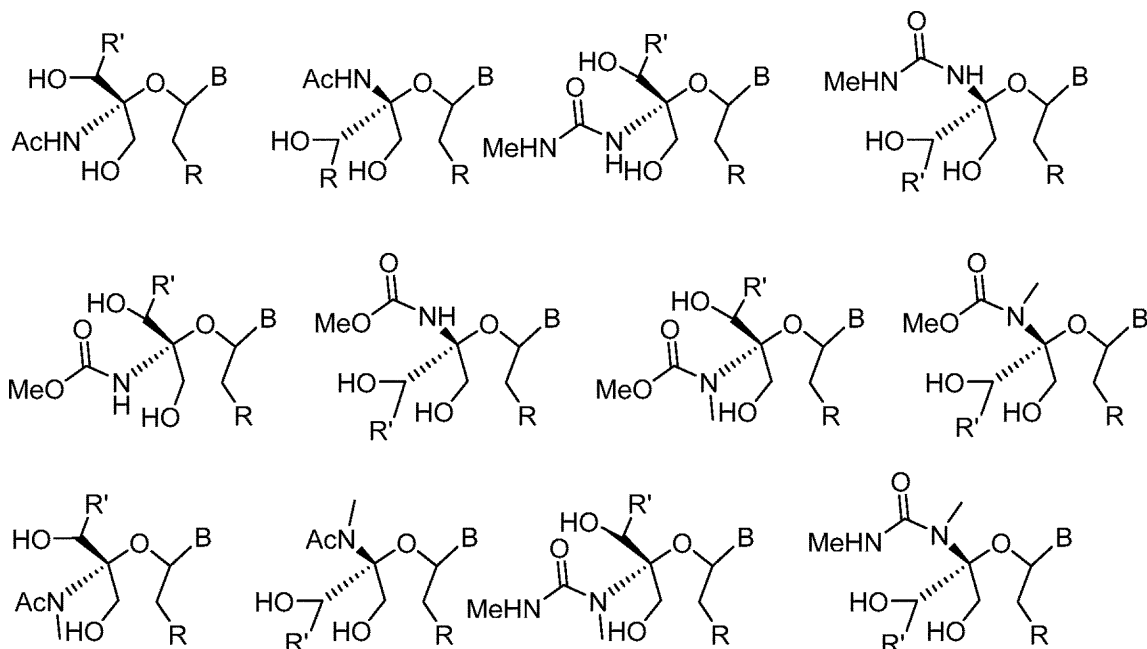
R' = H、Me;

B = A;C;5-Me-C;G;I;U;T;Y;2-チオウリジン;4-チオウリジン;C5-修飾ピリミジン;C2-修飾プリン;N8-修飾プリン;フェノキサジン;G-クランプ;非標準単環式、二環式および三環式複素環;シュードウラシル;isoC;isoG;2,6-ジアミノプリン;シュードシトシン;2-アミノプリン;キサントシン;N6-アルキル-A;O6-アルキル-G;7-デアザプリン

からなる群より選択され、立体化学は、指定されていないキラル中心については、RまたはSならびにRおよびSの組合せである。

【0428】

いくつかの態様において、不安定化修飾mUNAは、



10

20

30

40

50

R = H、OH; OMe; Cl、F; OH; O- (CH₂)₂OMe; SMe、NMe₂; NH₂; Me; CCH (アルキン)、O-nPr; O-アルキル; O-アルキルアミノ;

R' = H、Me;

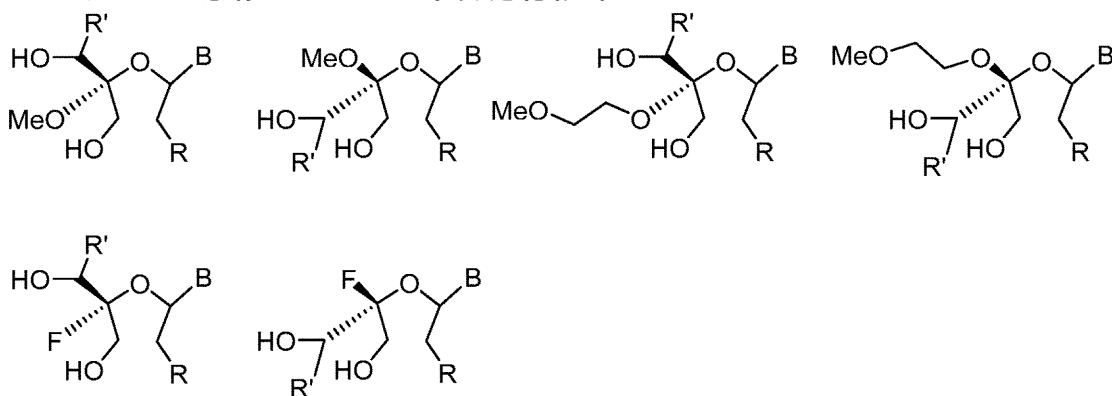
B = A; C; 5-Me-C; G; I; U; T; Y; 2-チオウリジン; 4-チオウリジン; C5-修飾ピリミジン; C2-修飾プリン; N8-修飾プリン; フェノキサジン; G-クランプ; 非標準単環式、二環式および三環式複素環; シュードウラシル; isoC; isoG; 2,6-ジアミノプリン; シュードシトシン; 2-アミノプリン; キサントシン; N6-アルキル-A; O6-アルキル-G; 2-チオウリジン; 4-チオウリジン; C5-修飾ピリミジン; C2-修飾プリン; N8-修飾プリン; 7-デアザプリン、フェノキサジン; G-クランプ; 非標準単環式、二環式および三環式複素環

からなる群より選択され、

立体化学は、指定されていないキラル中心については、RまたはSならびにRおよびSの組合せである。

【0429】

いくつかの態様において、不安定化修飾mUNAは、



R = H、OH; OMe; Cl、F; OH; O- (CH₂)₂OMe; SMe、NMe₂; NH₂; Me; CCH (アルキン)、O-nPr; O-アルキル; O-アルキルアミノ;

R' = H、Me;

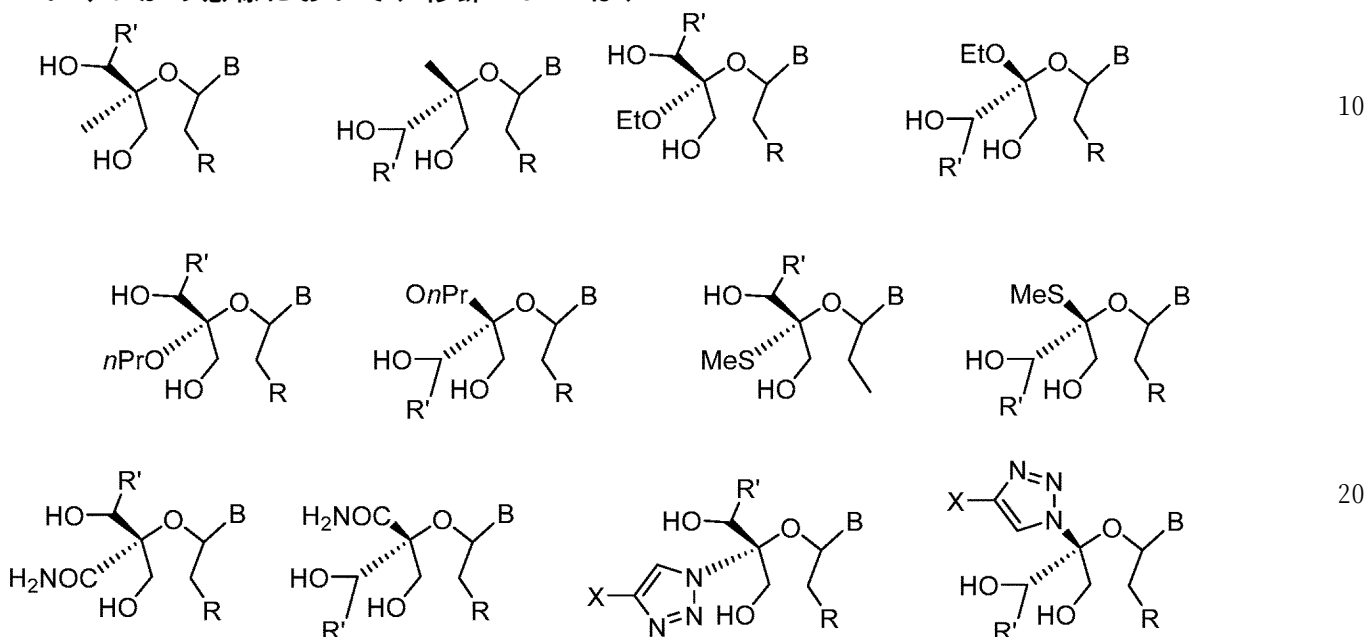
B = A; C; 5-Me-C; G; I; U; T; Y; 2-チオウリジン; 4-チオウリジン; C5-修飾ピリミジン; C2-修飾プリン; N8-修飾プリン; フェノキサジン; G-クランプ; 非標準単環式、二環式および三環式複素環; シュードウラシル; isoC; isoG; 2,6-ジアミノプリン; シュードシトシン; 2-

アミノプリン;キサントシン;N6-アルキル-A;O6-アルキル-G;2-チオウリジン;4-チオウリジン;C5-修飾ピリミジン;C2-修飾プリン;N8-修飾プリン;7-デアザプリン、フェノキサジン;G-クランプ;非標準単環式、二環式および三環式複素環

からなる群より選択され、立体化学は、指定されていないキラル中心については、RまたはSならびにRおよびSの組合せである。

【0430】

いくつかの態様において、修飾mUNAは、



R = H、OMe;F;OH;O-(CH₂)₂OMe;SMe、NMe₂;NH₂;Me;O-nPr;O-アルキル;O-アルキルアミノ;

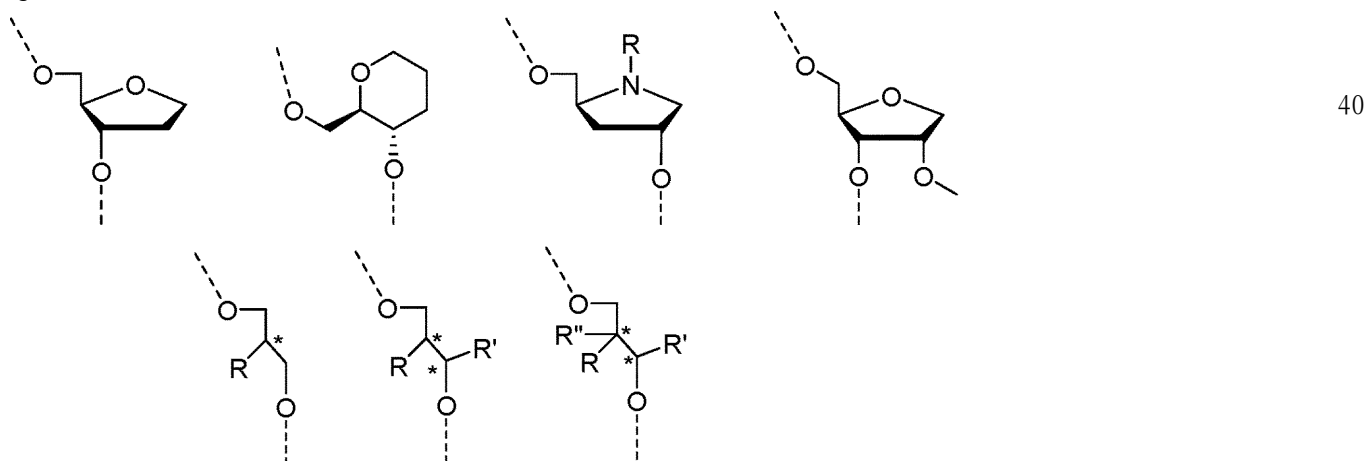
R' = H、Me;

B = A;C;5-Me-C;G;I;U;T;Y;2-チオウリジン;4-チオウリジン;C5-修飾ピリミジン;C2-修飾プリン;N8-修飾プリン;フェノキサジン;G-クランプ;非標準単環式、二環式および三環式複素環;シュードウラシル;isoC;isoG;2,6-ジアミノプリン;シュードシトシン;2-アミノプリン;キサントシン;N6-アルキル-A;O6-アルキル-G;7-デアザプリン

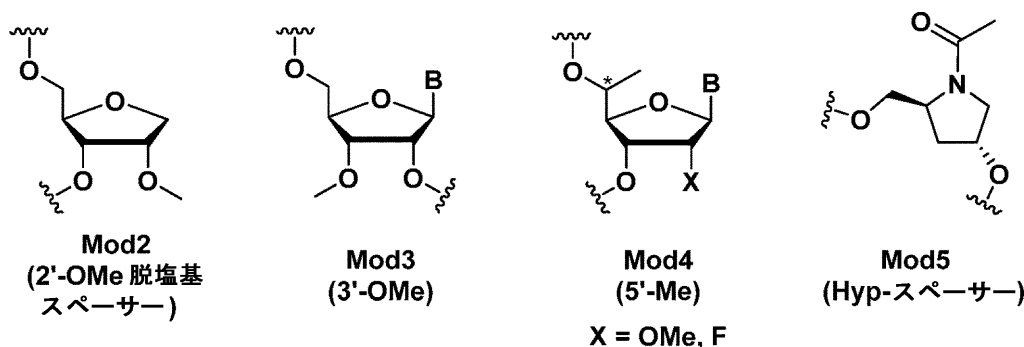
からなる群より選択され、立体化学は、指定されていないキラル中心については、RまたはSならびにRおよびSの組合せである。

【0431】

例示的な脱塩基修飾として、以下の修飾が挙げられるが、それらに限定されるわけではない:



ここで、R = H、Me、Et または OMe、R' = H、Me、Et または OMe、R'' = H、Me、Et または OMe

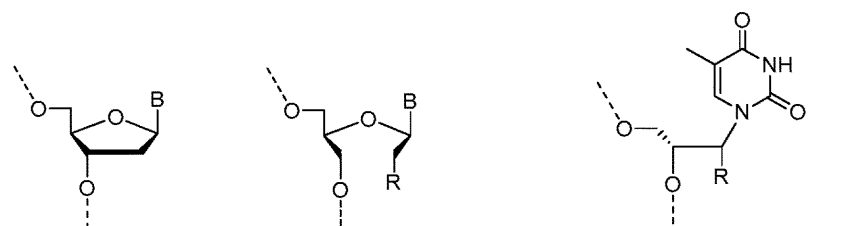


10

ここで、Bは修飾または無修飾核酸塩基であり、各構造上のアスタリスクはR、Sまたはラセミのいずれかを表す。

【0432】

例示される糖修飾として、以下の修飾が挙げられるが、それらに限定されるわけではない：

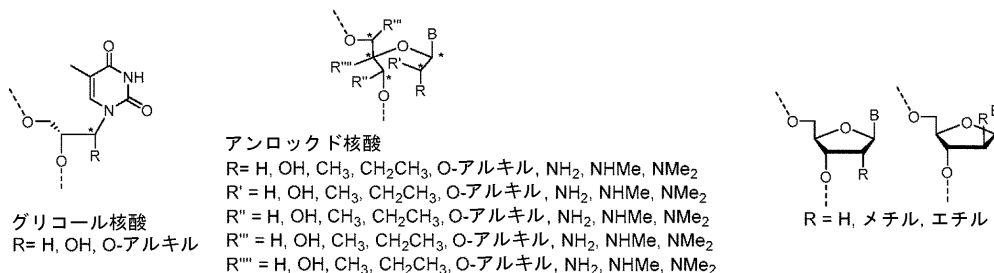


20

2'-デオキシ

アンロックド核酸
R = H, OH, O-アルキル

グリコール核酸
R = H, OH, O-アルキル



30

ここで、Bは修飾または無修飾核酸塩基であり、各構造上のアスタリスクはR、Sまたはラセミのいずれかを表す。

【0433】

いくつかの態様において、二重鎖の熱不安定化修飾は、本明細書の実施例1～3に記載のmUNAおよびGNAビルディングブロックから選択される。いくつかの態様において、不安定化修飾は、GNA-isoC、GNA-isoG、5'-mUNA、4'-mUNA、3'-mUNAおよび2'-mUNAからなる群より選択される。これらのいくつかのさらなる態様において、dsRNA分子は、GNA、2'-OMe、3'-OMe、5'-Me、Hyp-スパーサー、SNA、hGNA、hhGNA、mGNA、TNAおよびh'GNA (Mod A～Mod K) からなる群より選択される少なくとも1つの熱不安定化修飾を、さらに含む。

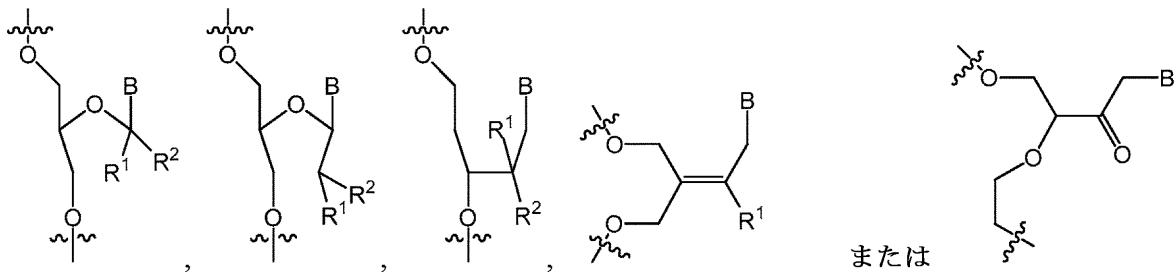
40

【0434】

「非環式ヌクレオチド」という用語は、非環式リボース糖を有する任意のヌクレオチド、例えばリボース炭素間の結合のいずれか（例えばC1'-C2'、C2'-C3'、C3'-C4'、C4'-O4'またはC1'-O4'）が存在せず、および/またはリボース炭素またはリボース酸素のうちの少なくとも1つ（例えばC1'、C2'、C3'、C4'またはO4'）が独立してまたは組み合わされてヌクレオチドから欠失しているものを指す。いくつかの態様において、非環式ヌ

50

クレオチドは、



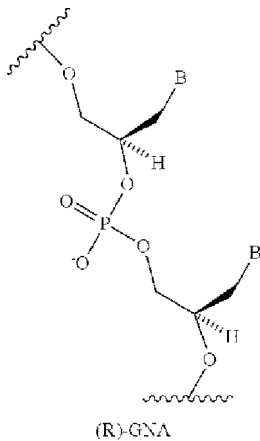
であり、ここで、Bは修飾または無修飾核酸塩基であり、R1およびR2は、独立して、H、ハロゲン、OR3、またはアルキルであり、R3は、H、アルキル、シクロアルキル、アリール、アラルキル、ヘテロアリールまたは糖である。「UNA」という用語は、糖の結合のいずれかが除去されてアンロックド「糖」残基を形成しているアンロックド非環式核酸を指す。一例において、UNAは、C1'-C4'間の結合（すなわちC1'炭素とC4'炭素の間の炭素-酸素-炭素共有結合）が除去されているモノマーも包含する。もう一つの例では、糖のC2'-C3'結合（すなわちC2'炭素とC3'炭素の間の炭素-炭素共有結合）が除去される（Mikhailov et.al., Tetrahedron Letters, 26 (17):2059 (1985) および Fluiter et al., Mol. Biosyst., 10:1039 (2009) 参照。これらの文献は参照によりそれらの全体が本明細書に組み入れられる）。非環式誘導体は、ワトソン-クリック対合に影響を及ぼすことなく、バックボーンのフレキシビリティを増大させる。非環式ヌクレオチドは2'-5'連結部または3'-5'連結部によって連結されうる。

10

20

【0435】

「GNA」という用語は、DNAまたはRNAに似たポリマーであるが、その「バックボーン」の組成が、ホスホジエステル結合によって連結された繰り返しグリセロール単位で構成される点で異なるポリマーである、グリコール核酸：



30

を指す。

【0436】

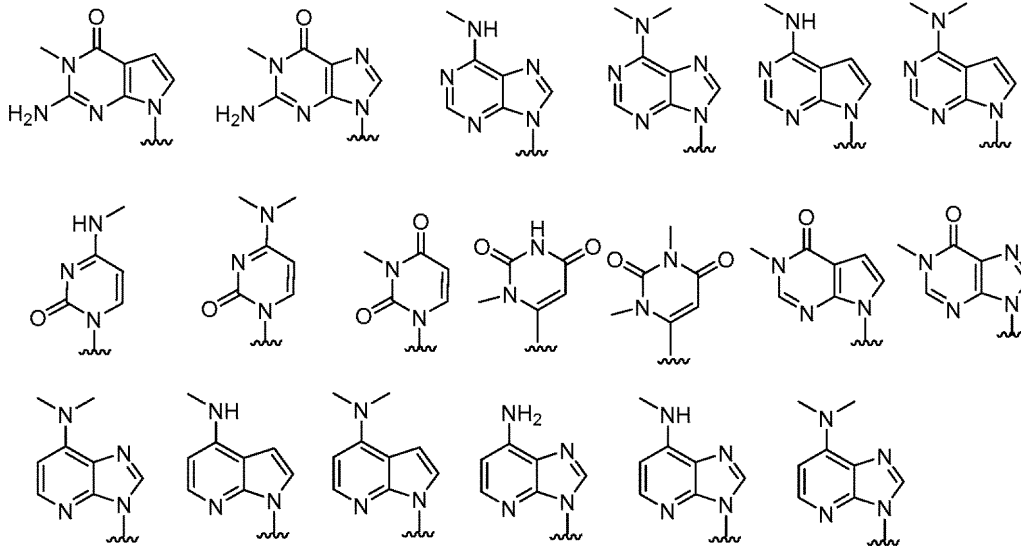
二重鎖の熱不安定化修飾は、dsRNA二重鎖内の熱不安定化ヌクレオチドと逆鎖中の相対するヌクレオチドとの間のミスマッチ（すなわち非相補的な塩基対）であることができる。例示的なミスマッチ塩基対として、G:G、G:A、G:U、G:T、A:A、A:C、C:C、C:U、C:T、U:U、T:T、U:T、またはそれらの組合せが挙げられる。当技術分野において公知の他のミスマッチ塩基対合も本発明に適用できる。ミスマッチは、天然ヌクレオチドまたは修飾ヌクレオチドのいずれかであるヌクレオチドの間で起こりうる。すなわちミスマッチ塩基対合は、ヌクレオチドのリボース糖上の修飾とは無関係に、各ヌクレオチドの核酸塩基間で起こりうる。一定の態様において、dsRNA分子は、ミスマッチ対合中に、2'-デオキシ核酸塩基である核酸塩基を少なくとも1つは含有し、例えばその2'-デオキシ核酸塩基はセンス鎖中にある。

40

50

【0437】

いくつかの態様において、アンチセンス鎖のシード領域における二重鎖の熱不安定化修飾は、標的mRNA上の相補塩基へのW-C H結合が損なわれているヌクレオチド、例えば、



10

を含む。

20

【0438】

脱塩基ヌクレオチド修飾、非環式ヌクレオチド修飾（UNAおよびGNAを含む）およびミスマッチ修飾のさらなる例は、WO 2011/133876に詳述されており、この文献は参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

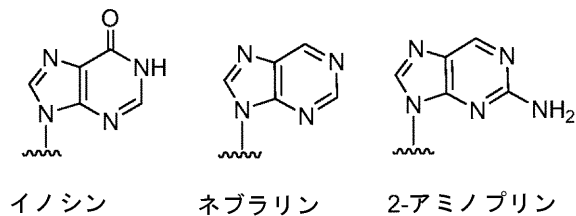
【0439】

熱不安定化修飾には、相対する塩基と水素結合する能力が低減または消失しているユニバーサル塩基、およびホスフェート修飾も含めうる。

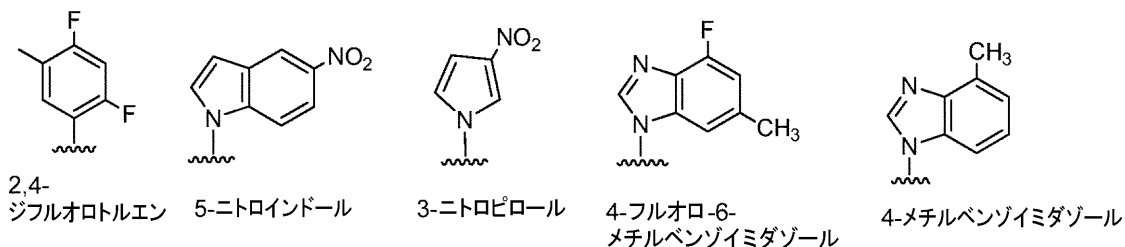
【0440】

いくつかの態様において、二重鎖の熱不安定化修飾には、非標準塩基を有するヌクレオチド、例えば限定するわけではないが逆鎖中の塩基と水素結合を形成する能力が損なわれているか完全に消失している核酸塩基修飾が含まれる。これらの核酸塩基修飾は、WO 2010/0011895に記載されているように、dsRNA二重鎖の中央領域の不安定化について評価されており、この文献は参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。例示的な核酸塩基修飾は、

30



40

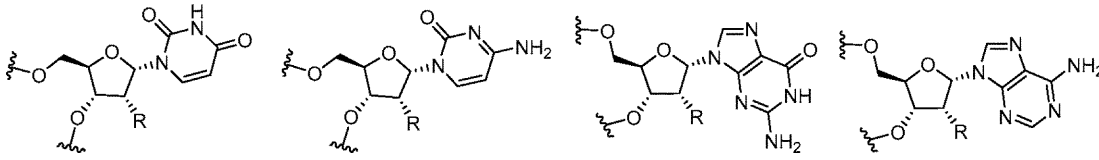


である。

【0441】

50

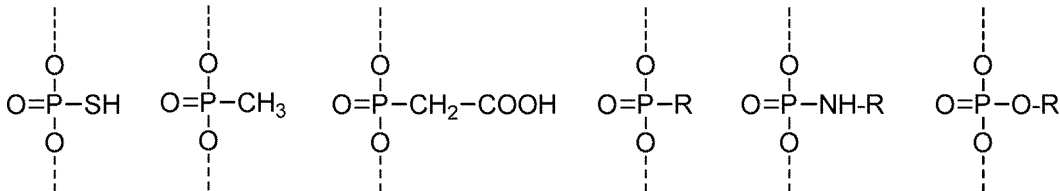
いくつかの態様において、アンチセンス鎖のシード領域における二重鎖の熱不安定化修飾は、標的mRNA上の塩基に相補的な1つまたは複数の α -ヌクレオチド、例えば、



を含み、ここで、Rは、H、OH、OCH₃、F、NH₂、NHMe、NMe₂またはO-アルキルである。

【0442】

天然のホスホジエステル連結部と比べてdsRNA二重鎖の熱安定性を減少させることが公知である例示的ホスフェート修飾は、



R = アルキル

である。

【0443】

R基としてのアルキルはC₁~C₆アルキルであることができる。R基としての具体的アルキルには、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、ペンチルおよびヘキシルなどがあるが、それらに限定されるわけではない。

【0444】

熱不安定化修飾はアンチセンス鎖中の2'-デオキシヌクレオチドを置き換えることに注意されたい。例えば、アンチセンス鎖の5'端から数えて位置2、5、7、12、14および/または16の2'-デオキシヌクレオチドを、本明細書記載の熱不安定化修飾で置き換えることができる。したがって、いくつかの態様において、アンチセンス鎖は、アンチセンス鎖の5'端から数えて位置2、5、7、12、14および/または16のうちの1、2、3、4、5および/または6つに、熱不安定化修飾を含む。例えばアンチセンス鎖は、アンチセンス鎖の5'端から数えて位置5および7に熱不安定化修飾を含む。

【0445】

熱不安定化修飾を含むアンチセンス鎖に加えて、dsRNAは、1個または複数個の安定化修飾も含むことができる。例えばdsRNAは、少なくとも2個（例えば2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれ以上）の安定化修飾を含むことができる。限定されるわけではないが、安定化修飾はすべてが1本の鎖中に存在することができる。いくつかの態様において、センス鎖とアンチセンス鎖の両方が少なくとも2個の安定化修飾を含む。安定化修飾は、センス鎖またはアンチセンス鎖の任意のヌクレオチド上に存在することができる。例えば安定化修飾はセンス鎖上および/またはアンチセンス鎖上のすべてのヌクレオチドに存在することができ、または各安定化修飾はセンス鎖上もしくはアンチセンス鎖上に交互パターンで存在することができ、またはセンス鎖もしくはアンチセンス鎖は両方の安定化修飾を交互パターンで含む。センス鎖上の安定化修飾の交互パターンは、アンチセンス鎖と同じであっても異なってもよく、センス鎖上の安定化修飾の交互パターンは、アンチセンス鎖上の安定化修飾の交互パターンに対してシフトしていてもよい。

【0446】

いくつかの態様において、アンチセンス鎖は、少なくとも2個（例えば2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれ以上）の安定化修飾を含む。限定されるわけではないが、アンチセンス鎖中の安定化修飾は任意の位置に存在することができる。いくつかの態様において、アンチセンス鎖は、5'端から位置2、6、8、9、14および16に安定化修飾を含

10

20

30

40

50

む。いくつかの別の態様において、アンチセンスは、5'端から位置2、6、14および16に安定化修飾を含む。いくつかのさらに別の態様において、アンチセンスは、5'端から位置2、14および16に安定化修飾を含む。

【0447】

いくつかの態様において、アンチセンス鎖は、不安定化修飾に隣接して少なくとも1個の安定化修飾を含む。例えば、安定化修飾は、不安定化修飾の5'端または3'端にあるヌクレオチド、すなわち不安定化修飾の位置から-1または+1の位置にあるヌクレオチドであることができる。いくつかの態様において、アンチセンス鎖は、不安定化修飾の5'端と3'端のそれぞれに、すなわち不安定化修飾の位置から-1の位置と+1の位置に、安定化修飾を含む。

10

【0448】

いくつかの態様において、アンチセンス鎖は、不安定化修飾の3'端に少なくとも2個の安定化修飾を、すなわち少なくとも不安定化修飾の位置から+1の位置と+2の位置に2個の安定化修飾を含む。いくつかの態様において、センス鎖は、少なくとも2個（例えば2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれ以上）の安定化修飾を含む。限定されるわけではないが、センス鎖中の安定化修飾は任意の位置に存在することができる。いくつかの態様において、センス鎖は、5'端から位置7、10および11に安定化修飾を含む。いくつかの別の態様において、センス鎖は、5'端から位置7、9、10および11に安定化修飾を含む。いくつかの態様において、センス鎖は、アンチセンス鎖の5'端から数えてアンチセンス鎖の位置11、12および15に相対するまたは相補的な位置に、安定化修飾を含む。いくつかの別の態様において、センス鎖は、アンチセンス鎖の5'端から数えてアンチセンス鎖の位置11、12、13および15に相対するまたは相補的な位置に、安定化修飾を含む。いくつかの態様において、センス鎖は、2つ、3つまたは4つの安定化修飾のブロックを含む。

20

【0449】

いくつかの態様において、センス鎖は、アンチセンス鎖中の二重鎖の熱不安定化修飾に相対するまたは相補的な位置には、安定化修飾を含まない。

【0450】

例示的な熱安定化修飾として、2'-フルオロ修飾が挙げられるが、それに限定されるわけではない。他の熱安定化修飾として、LNAが挙げられるが、それに限定されるわけではない。

30

【0451】

熱安定化修飾はセンス鎖および/またはアンチセンス鎖中の2'-フルオロヌクレオチドを置き換えることに注意されたい。例えば、センス鎖の5'端から数えて位置8、9、10、11および/または12の2'-フルオロヌクレオチドを、熱安定化修飾で置き換えることができる。同様に、アンチセンス鎖の5'端から数えて位置14の2'-フルオロヌクレオチドを、熱安定化修飾で置き換えることができる。

【0452】

dsRNA分子がインビボでより有効であるためには、アンチセンス鎖が、ある程度は代謝安定性でなければならない。言い換えると、dsRNA分子がインビボでより有効であるためには、投与後、ある期間後に、ある程度の量のアンチセンス鎖がインビボに存在する必要がある。したがっていくつかの態様では、インビボ投与後5日目に、dsRNAのアンチセンス鎖の少なくとも40%、例えば少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%または少なくとも80%が、インビボに、例えばマウス肝臓中に存在する。いくつかの態様では、インビボ投与後6日目に、dsRNAのアンチセンス鎖の少なくとも40%、例えば少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%または少なくとも80%が、インビボに、例えばマウス肝臓中に存在する。いくつかの態様では、インビボ投与後7日目に、dsRNAのアンチセンス鎖の少なくとも40%、例えば少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%

40

50

%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%または少なくとも80%が、インビボに、例えばマウス肝臓中に存在する。いくつかの態様では、インビボ投与後8日目に、dsRNAのアンチセンス鎖の少なくとも40%、例えば少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%または少なくとも80%が、インビボに、例えばマウス肝臓中に存在する。いくつかの態様では、インビボ投与後9日目に、dsRNAのアンチセンス鎖の少なくとも40%、例えば少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%または少なくとも80%が、インビボに、例えばマウス肝臓中に存在する。いくつかの態様では、インビボ投与後10日目に、dsRNAのアンチセンス鎖の少なくとも40%、例えば少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%または少なくとも80%が、インビボに、例えばマウス肝臓中に存在する。いくつかの態様では、インビボ投与後11日目に、dsRNAのアンチセンス鎖の少なくとも40%、例えば少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%または少なくとも80%が、インビボに、例えばマウス肝臓中に存在する。いくつかの態様では、インビボ投与後12日目に、dsRNAのアンチセンス鎖の少なくとも40%、例えば少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%または少なくとも80%が、インビボに、例えばマウス肝臓中に存在する。いくつかの態様では、インビボ投与後13日目に、dsRNAのアンチセンス鎖の少なくとも40%、例えば少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%または少なくとも80%が、インビボに、例えばマウス肝臓中に存在する。いくつかの態様では、インビボ投与後14日目に、dsRNAのアンチセンス鎖の少なくとも40%、例えば少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%または少なくとも80%が、インビボに、例えばマウス肝臓中に存在する。いくつかの態様では、インビボ投与後15日目に、dsRNAのアンチセンス鎖の少なくとも40%、例えば少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%または少なくとも80%が、インビボに、例えばマウス肝臓中に存在する。

10

20

30

【0453】

リガンド

本明細書記載のさまざまな局面の態様はリガンドを含む。理論に拘泥するつもりはないが、リガンドは、取り付けられた分子（例えば本明細書記載のオリゴヌクレオチド）の1つまたは複数の性質、例えば限定するわけではないが、薬力学、薬物動態、結合、吸収、細胞内分布、細胞取り込み、電荷およびクリアランスを変更する。リガンドは化学分野では日常的に使用されており、親化合物には直接連結されるか、または随意的連結部分もしくは連結基を介して連結される。リガンドの好ましいリストには、インターカレーター、レポーター分子、ポリアミン、ポリアミド、ポリエチレングリコール、チオエーテル、ポリエーテル、コレステロール、チオコレステロール、コール酸部分、葉酸塩、脂質、リン脂質、ピオチン、フェナジン、フェナントリジン、アントラキノン、アダマンタン、アクリジン、フルオレセイン、ローダミン、クマリンおよび色素が含まれるが、それらに限定されるわけではない。

40

【0454】

本発明に適用できる好ましいリガンドには、脂質部分、例えばコレステロール部分（L etsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 6553）；コール酸（Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1994, 4, 1053）；チオエーテル、例えばヘキシル-S-トリチルチオール（Manoharan et al., Ann. N.Y. Acad. Sci., 1992, 660, 306、Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1993, 3, 2765）；チオコレステロール（Oberhauser et al., Nucl. Acids Res., 1992, 20, 533）；脂肪族鎖、例えばドデ

50

カンジオールもしくはウンデシル残基 (Saison-Behmoaras et al., EMBO J., 1991, 10, 111; Kabanov et al., FEBS Lett., 1990, 259, 327; Svinarchuk et al., Biochimie, 1993, 75, 49) ; リン脂質、例えばジ-ヘキサデシル-rac-グリセロールもしくはトリエチルアンモニウム-1,2-ジ-O-ヘキサデシル-rac-グリセロ-3-H-ホスホネート (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651; Shea et al., Nucl. Acids Res., 1990, 18, 3777) ; ポリアミンもしくはポリエチレングリコール鎖 (Manoharan et al., Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14, 969) ; アダマンタン酢酸 (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651) ; パルミチル部分 (Mishra et al., Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264, 229) ; または、オクタデシルアミンもしくはヘキシルアミノ-カルボニル-オキシコレステロール部分 (Crooke et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277, 923) がある。

10

【0455】

リガンドは、天然分子または組換え分子もしくは合成分子を含むことができる。例示的なリガンドとしては、ポリリジン (PLL)、ポリL-アスパラギン酸、ポリL-グルタミン酸、スチレン-マレイン酸無水物コポリマー、ポリ (L-ラクチド-co-グリコリド) コポリマー、ジビニルエーテル-無水マレイン酸コポリマー、N- (2-ヒドロキシプロピル) メタクリルアミドコポリマー (HMPA)、ポリエチレングリコール (PEG、例えばPEG-2K、PEG-5K、PEG-10K、PEG-12K、PEG-15K、PEG-20K、PEG-40K)、MPEG、[MPEG]₂、ポリビニルアルコール (PVA)、ポリウレタン、ポリ (2-エチルアクリル酸)、N-イソプロピルアクリルアミドポリマー、ポリホスファジン、ポリエチレンイミン、カチオン基、スペルミン、スペルミジン、ポリアミン、シュードペプチド-ポリアミン、ペプチドミメティックポリアミン、デンドリマーポリアミン、アルギニン、アミジン、プロタミン、カチオン性脂質、カチオン性ポリフィリン、ポリアミンの第4級塩、サイロトロピン、メラノトロピン、レクチン、糖タンパク質、サーファクタントタンパク質A、ムチン、グリコシル化ポリアミノ酸、トランスフェリン、ビスホスホネート、ポリグルタメート、ポリアスパルテート、アプタマー、アシアロフェチュイン、ヒアルロン、プロコラーゲン、免疫グロブリン (例えば抗体)、インスリン、トランスフェリン、アルブミン、糖-アルブミンコンジュゲート、挿入剤 (例えばアクリジン類)、架橋剤 (例えばソラレン、マイトマイシンC)、ポリフィリン (例えばTPPC4、テキサフィリン、サフィリン)、多環式芳香族炭化水素 (例えばフェナジン、ジヒドロフェナジン)、人工エンドヌクレアーゼ (例えばEDTA)、親油性分子 (例えばステロイド、胆汁酸、コレステロール、コール酸、アダマンタン酢酸、1-ピレン酪酸、ジヒドロテストステロン、1,3-ビス-O (ヘキサデシル) グリセロール、ゲラニルオキシヘキシル基、ヘキサデシルグリセロール、ボルネオール、メントール、1,3-プロパンジオール、ヘプタデシル基、パルミチン酸、ミリスチン酸、O3- (オレオイル) リトコール酸、O3- (オレオイル) コレン酸、ジメトキシトリチル、またはフェノキサジン)、ペプチド (例えばアルファヘリックスペプチド、両親媒性ペプチド、RGDペプチド、細胞透過ペプチド、エンドソーム溶解性/膜融合性ペプチド)、アルキル化剤、ホスフェート、アミノ、メルカプト、ポリアミノ、アルキル、置換アルキル、放射標識マーカー、酵素、ハプテン (例えばビオチン)、輸送/吸収促進物質 (例えばナプロキセン、アスピリン、ビタミンE、葉酸)、合成リボヌクレアーゼ (例えばイミダゾール、ビスイミダゾール、ヒスタミン、イミダゾールクラスター、アクリジン-イミダゾールコンジュゲート、テトラアザ大環状化合物のEu³⁺錯体)、ジニトロフェニル、HRP、AP、抗体、ホルモンおよびホルモン受容体、レクチン、炭水化物、多価炭水化物、ビタミン類 (例えばビタミンA、ビタミンE、ビタミンK、ビタミンB、例えば葉酸、B12、リボフラビン、ビオチンおよびピリドキサル)、ビタミン補因子、リボ多糖、p38 MAPキナーゼの活性化因子、NF-κBの活性化因子、タキソン (taxon)、ピンクリスチン、ピンブラスチン、サイトカラシン、ノコダゾール、ジャブラキノリド (japlakinolide)、ラトランクリンA、ファロイジン、スウィンホリドA、インダノシン、ミオセルビン (myoservin)、腫瘍壊死因子アルファ (TNFアルファ)、インターロイキン-1ベータ、ガンマインターフェロン、天然または組換え低密度リ

20

30

40

50

ポタンパク質（LDL）、天然または組換え高密度リポタンパク質（HDL）、および細胞透過剤（例えば α -ヘリックス細胞透過作用物質（ α -helical cell-permeation agent））が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

【0456】

ペプチドおよびペプチドミメティックリガンドには、天然ペプチドまたは修飾ペプチド、例えばDまたはLペプチド； α 、 β または γ ペプチド；N-メチルペプチド；アザペプチド；1つまたは複数のアミド連結部を有するペプチド、すなわち連結部が1つまたは複数の尿素、チオ尿素、カルバメート、またはスルホニル尿素連結部で置き換えられているペプチド；または環状ペプチドを有するものが含まれる。ペプチドミメティック（本明細書ではオリゴペプチドミメティックともいう）は、天然ペプチドと同様の明確な三次元構造に折りたたまれうる分子である。ペプチドまたはペプチドミメティックリガンドは、約5～50アミノ酸長、例えば約5、10、15、20、25、30、35、40、45または50アミノ酸長であることができる。

10

【0457】

例示的な両親媒性ペプチドとして、セクロピン、リコトキシン、パラダキシン（paradaxin）、ブフォリン、CPF、ボンビニン様ペプチド（BLP）、カテリシジン、セラトトキシン（ceratotoxin）、エボヤ（*S.clava*）ペプチド、メクラウナギ腸抗微生物ペプチド（HFIAP）、マガイニン、ブレビニン-2、デルマセプチン、メリチン、プルーロシジン（pleurocidin）、 H_2A ペプチド、ツメガエル（*Xenopus*）ペプチド、エスクレンチニス（*esculentinis*）-1、およびカーリン（*caerin*）が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

20

【0458】

本明細書において使用される場合、「エンドソーム溶解性リガンド」という用語は、エンドソーム溶解特性を有する分子を指す。エンドソーム溶解性リガンドは、細胞コンパートメント、例えばエンドソーム、リソソーム、小胞体（ER）、ゴルジ装置、微小管、ペルオキシソーム、もしくは細胞内の他の胞状体（*vesicular body*）の溶解、および/またはそこから細胞の細胞質への本発明組成物またはその構成要素の輸送を促進する。例示的なエンドソーム溶解性リガンドとして、イミダゾール、ポリまたはオリゴイミダゾール、線状または分岐ポリエチレンイミン（PEI）、線状および分岐ポリアミン、例えばスベルミン、カチオン性線状および分岐ポリアミン、ポリカルボキシレート、ポリカチオン、遮蔽オリゴまたはポリカチオンまたはアニオン、アセタール、ポリアセタール、ケタール/ポリケタール、オルトエステル、遮蔽または遮蔽されていないカチオン電荷またはアニオン電荷を持つ線状または分岐ポリマー、遮蔽または遮蔽されていないカチオン電荷またはアニオン電荷を持つデンドリマー、ポリアニオン性ペプチド、ポリアニオン性ペプチドミメティック、pH感受性ペプチド、天然および合成膜融合性脂質、天然および合成カチオン性脂質が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

30

【0459】

例示的なエンドソーム溶解性/膜融合性ペプチドとして、

40

AALEALAEALAEALAEALAEAAAAGGC (GALA);
 AALAEALAEALAEALAEALAEALAAAAGGC (EALA); ALEALAEALAEALAE;
 GLFEAIEGFIENGWEGMIWDYG (INF-7); GLFGAIAAGFIENGWEGMIDGWYGC (Inf HA-
 2); GLFEAIEGFIENGWEGMIDGWYGCGLFEAIEGFIENGWEGMID GWYGC (diINF-
 7); GLFEAIEGFIENGWEGMIDGGCGLFEAIEGFIENGWEGMIDGGC (diINF-3);
 GLFGALAEALAEALAEHLAEALAEALAEALAAGGSC (GLF);
 GLFEAIEGFIENGWEGLAELAEALAEALAEALAAGGSC (GALA-INF3); GLF EAI EGFI
 ENGW EGnI DG K GLF EAI EGFI ENGW EGnI DG (INF-5, nはノルロイシンである);
 LFEALLELLESLWELLLEA (JTS-1); GLFKALLKLLKSLWKLLKA (ppTG1);
 GLFRALLRLLRSLWRLLLR (ppTG20);
 WEAKLAKALAKALAKHLAKALAKALKACEA (KALA);
 GLFFEAIAEFIEGGWEGLIEGC (HA); GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ
 (メリチン); H₅WYG; および CHK₆HC

10

20

が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

【0460】

理論に拘泥するつもりはないが、膜融合性脂質は膜と融合し、その結果、膜を不安定化する。膜融合性脂質は、通常、小さな頭部と不飽和アシル鎖とを有する。例示的な膜融合性脂質としては、1,2-ジレオイル (dileoyl) -sn-3-ホスホエタノールアミン (DOPE)、ホスファチジルエタノールアミン (POPE)、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン (POPC)、(6Z,9Z,28Z,31Z)-ヘプタトリアコンタ-6,9,28,31-テトラエン-19-オール (Di-Lin)、N-メチル(2,2-ジ((9Z,12Z)-オクタデカ-9,12-ジエニル)-1,3-ジオキソラン-4-イル)メタンアミン (DLin-k-DMA) およびN-メチル-2-(2,2-ジ((9Z,12Z)-オクタデカ-9,12-ジエニル)-1,3-ジオキソラン-4-イル)エタ

30

ンアミン (本明細書ではXTCともいう) が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

【0461】

本発明に適用できるエンドソーム溶解活性を持つ合成ポリマーは、米国特許出願公開第2009/0048410号、同第2009/0023890号、同第2008/0287630号、同第2008/0287628号、同第2008/0281044号、同第2008/0281041号、同第2008/0269450号、同第2007/0105804号、同第20070036865号および同第2004/0198687号に記載されており、それらの内容は、参照により、その全体が本明細書に組み入れられる。

【0462】

例示的な細胞透過ペプチドとしては、

40

50

RQIKIWFQNRMRMKWKK (ペネトラチン); GRKKRRQRRRPPQC (Tatフラグメント48-60);
 GALFLGWLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV (シグナル配列に基づくペプチド);
 LLIILRRRIRKQAHASHK (PVEC); GWTLNSAGYLLKINLKALAALAKKIL
 (トランスポーター); KLALKLALKALKAAALKLA (両親媒性モデルペプチド); RRRRRRRRRR
 (Arg9); KFFKFFKFFK (細菌細胞壁透過ペプチド);
 LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLVPRTES (LL-37);
 SWLSKTAKKLENSAKKRISGIAIAIQGGPR (セクロピン P1);
 ACYCRIPACIAGERRYGTCTIYQGRLWAFCC (α -ディフェンシン);
 DHYNCVSSGGQCLYSACPIFTKIQTGTCYRGKAKCK (β -ディフェンシン);
 RRRPRPPYLPRPRPPFFPPRLPPRIPPGFPPRFPPRFPGR-NH₂ (PR-39);
 ILPWKWPWWPWR-NH₂ (インドリシジン); AAVALLPAVLLALLAP (RFGF);
 AALLPVLLAAP (RFGF 類似体); および RKCRIVVIRVCR (バクテネシン)

10

が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

20

【0463】

例示的なカチオン基としては、プロトン化されたアミノ基であって、例えばO-アミン
 (アミン=NH₂; アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ
 、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、またはジヘテロアリールアミノ、エチレン
 ジアミン、ポリアミノ); アミノアルコキシ、例えばO(CH₂)_nアミン (例えばアミン=
 NH₂; アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリ
 ルアミノ、ヘテロアリールアミノ、またはジヘテロアリールアミノ、エチレンジアミン、
 ポリアミノ)、アミノ (例えばNH₂; アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリ
 ル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、ジヘテロアリールアミ
 ノ、またはアミノ酸)、およびNH(CH₂CH₂NH)_nCH₂CH₂-アミン (アミン=NH₂;
 アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミ
 ノ、ヘテロアリールアミノ、またはジヘテロアリールアミノ) から誘導されるものが挙げ
 られるが、それらに限定されるわけではない。

30

【0464】

本明細書において使用される場合、「ターゲティングリガンド」という用語は、選ばれ
 た標的、例えば細胞、細胞タイプ、組織、器官、身体の領域、またはコンパートメント、
 例えば細胞、組織もしくは器官のコンパートメントに対して、強化されたアフィニティを
 与える任意の分子を指す。例示的なターゲティングリガンドとして、抗体、抗原、葉酸塩
 、受容体リガンド、炭水化物、アプタマー、インテグリン受容体リガンド、ケモカイン受
 容体リガンド、トランスフェリン、ビオチン、セロトニン受容体リガンド、PSMA、エン
 ドセリン、GCP II、ソマトスタチン、LDLおよびHDLリガンドが挙げられるが、それら
 に限定されるわけではない。

40

【0465】

炭水化物に基づくターゲティングリガンドとして、D-ガラクトース、多価ガラクト
 ース、N-アセチル-D-ガラクトサミン (GalNAc)、多価GalNAc、例えばGalNAc₂およ
 びGalNAc₃、D-マンノース、多価マンノース、多価ラクトース、N-アセチル-グルコサ
 ミン (N-acetyl-gulucosamine)、多価フコース、グリコシル化ポリアミノ酸および
 レクチンが挙げられるが、それらに限定されるわけではない。多価という用語は、2つ以
 上の単糖単位が存在することを示す。そのような単糖サブユニットは、グリコシド結合に
 よって互いに連結されるか、またはスキャフォールド分子に連結されうる。

50

【0466】

本発明に適用できる葉酸塩および葉酸類似体は、米国特許第2,816,110号、同第5,552,545号、同第6,335,434号および同第7,128,893号に、いくつか記載されており、これらの文献の内容は参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

【0467】

本明細書において使用される場合、「PK調整リガンド」および「PK調整物質」という用語は、本明細書記載のオリゴヌクレオチドの薬物動態を調整することができる分子を指す。例示的なPK調整物質として、親油性分子、胆汁酸、ステロール、リン脂質類似体、ペプチド、タンパク質結合作用物質、ビタミン、脂肪酸、フェノキサジン、アスピリン、ナプロキセン、イブプロフェン、スプロフェン、ケトプロフェン、(S)-(+) - プラノプロフェン、カルプロフェン、PEG、ビオチン、およびトランスサイレチア結合リガンド (transthyretia-binding ligand) (例えばテトラヨードチロ酢酸、2、4、6-トリヨードフェノールおよびフルフェナム酸) が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。いくつかのホスホロチオエート糖間連結部を含むオリゴマー化合物は、血清タンパク質に結合することも公知であるので、短いオリゴマー化合物、例えば約5~30ヌクレオチド (例えば5~25ヌクレオチド、好ましくは5~20ヌクレオチド、例えば5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20ヌクレオチド) のオリゴヌクレオチドであって、そのバックボーン中に複数のホスホロチオエート連結部を含むものも、リガンド (例えばPK調整リガンド) として、本発明に適用できる。PK調整オリゴヌクレオチドは、少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15個またはそれ以上のホスホロチオエートおよび/またはホスホロジチオエート連結部を含むことができる。いくつかの態様では、PK調整オリゴヌクレオチド中のヌクレオシド間連結部がすべて、ホスホロチオエートおよび/またはホスホロジチオエート連結部である。加えて、血清構成要素 (例えば血清タンパク質) に結合するアダプターも、PK調整リガンドとして本発明に適用できる。血清構成要素 (例えば血清タンパク質) への結合は、アルブミン結合アッセイ、例えばOravcova, et al., Journal of Chromatography B (1996), 677:1-27に記載されているものから予測することができる。

【0468】

2つ以上のリガンドが存在する場合、それらのリガンドはすべてが同じ性質を有するか、すべてが異なる性質を有するか、または一部のリガンドが同じ性質を有し、同時に他のリガンドは異なる性質を有することができる。例えばリガンドは、ターゲティング特性を有し、エンドソーム溶解活性を有し、またはPK調整特性を有することができる。好ましい一態様では、すべてのリガンドが異なる性質を有する。

【0469】

上記局面のいずれか一つのいくつかの態様において、リガンドは式(IV)~(VII)のいずれかに示す構造を有する:

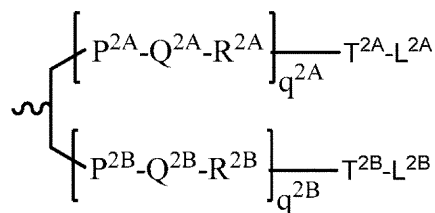
10

20

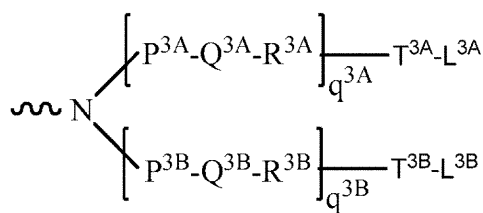
30

40

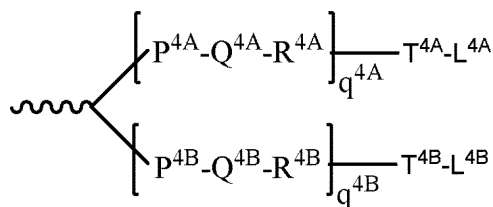
50



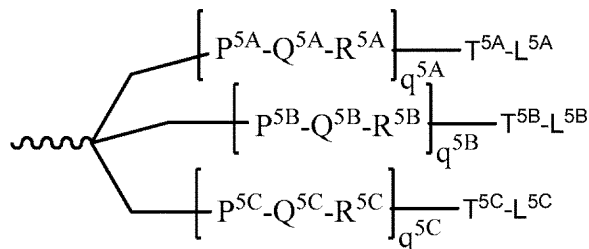
式 (IV)



式 (V)



式 (VI)



式 (VII)

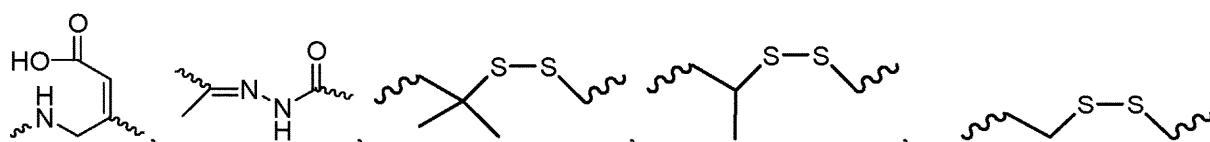
式中、

$q^{2\text{A}}$ 、 $q^{2\text{B}}$ 、 $q^{3\text{A}}$ 、 $q^{3\text{B}}$ 、 $q^{4\text{A}}$ 、 $q^{4\text{B}}$ 、 $q^{5\text{A}}$ 、 $q^{5\text{B}}$ および $q^{5\text{C}}$ は、出現ごとに独立して、0~20を表し、繰り返し単位は同じであるか、または異なることができ、

$p^{2\text{A}}$ 、 $p^{2\text{B}}$ 、 $p^{3\text{A}}$ 、 $p^{3\text{B}}$ 、 $p^{4\text{A}}$ 、 $p^{4\text{B}}$ 、 $p^{5\text{A}}$ 、 $p^{5\text{B}}$ 、 $p^{5\text{C}}$ 、 $T^{2\text{A}}$ 、 $T^{2\text{B}}$ 、 $T^{3\text{A}}$ 、 $T^{3\text{B}}$ 、 $T^{4\text{A}}$ 、 $T^{4\text{B}}$ 、 $T^{5\text{A}}$ 、 $T^{5\text{B}}$ 、 $T^{5\text{C}}$ はそれぞれ、出現ごとに独立して、存在しないか、またはC、O、NH、S、OC(O)、NHC(O)、CH₂、CH₂NHもしくはCH₂Oであり、

$Q^{2\text{A}}$ 、 $Q^{2\text{B}}$ 、 $Q^{3\text{A}}$ 、 $Q^{3\text{B}}$ 、 $Q^{4\text{A}}$ 、 $Q^{4\text{B}}$ 、 $Q^{5\text{A}}$ 、 $Q^{5\text{B}}$ 、 $Q^{5\text{C}}$ は、出現ごとに独立して、存在しないか、またはアルキレン、置換アルキレンであり、ここで、1つまたは複数のメチレンは、O、S、S(O)、SO₂、N(R^N)、C(R')=C(R'')、C≡CまたはC(O)のうちの1つまたは複数で中断されるか終わっていてもよく、

$R^{2\text{A}}$ 、 $R^{2\text{B}}$ 、 $R^{3\text{A}}$ 、 $R^{3\text{B}}$ 、 $R^{4\text{A}}$ 、 $R^{4\text{B}}$ 、 $R^{5\text{A}}$ 、 $R^{5\text{B}}$ 、 $R^{5\text{C}}$ はそれぞれ、出現ごとに独立して、存在しないか、またはNH、O、S、CH₂、C(O)O、C(O)NH、NHCH(R^a)C(O)、-C(O)-CH(R^a)-NH-、CO、CH=N-O、



もしくはヘテロシクリルであり、

$L^{2\text{A}}$ 、 $L^{2\text{B}}$ 、 $L^{3\text{A}}$ 、 $L^{3\text{B}}$ 、 $L^{4\text{A}}$ 、 $L^{4\text{B}}$ 、 $L^{5\text{A}}$ 、 $L^{5\text{B}}$ および $L^{5\text{C}}$ は、リガンド、すなわち、それぞれ出現ごとに独立して、単糖(GalNAcなど)、二糖、三糖、四糖、オリゴ糖または多糖を表し、

R^aは、Hまたはアミノ酸側鎖である。

【0470】

上記局面のいずれか一つのいくつかの態様において、リガンドは式(VII)のリガンドである：

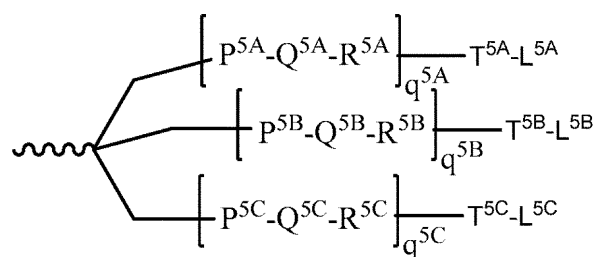
10

20

30

40

50



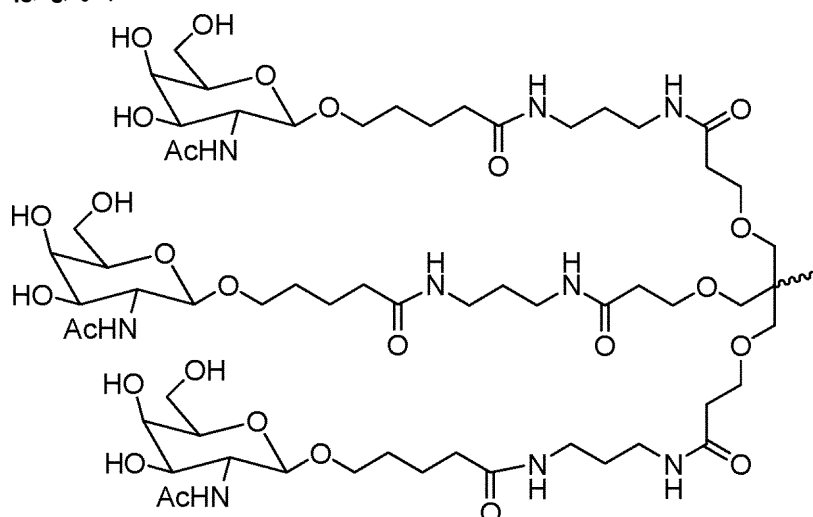
式 (VII)

式中、 L^{5A} 、 L^{5B} および L^{5C} は単糖、例えばGalNAc誘導体を表す。

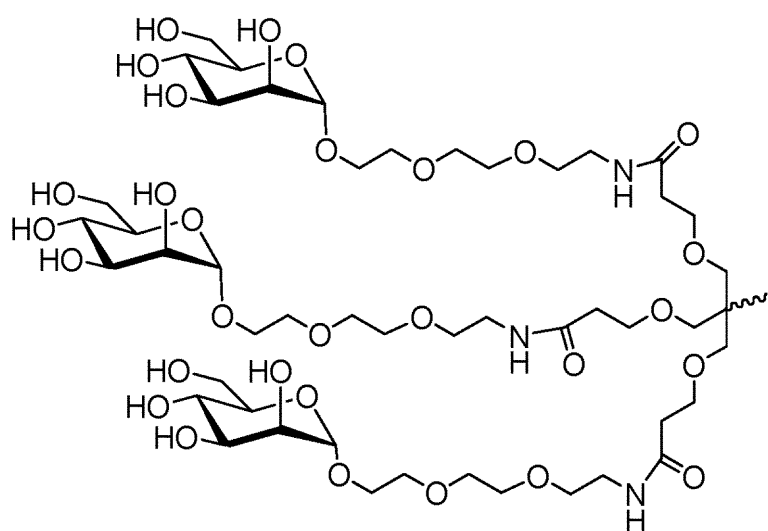
10

【 0 4 7 1 】

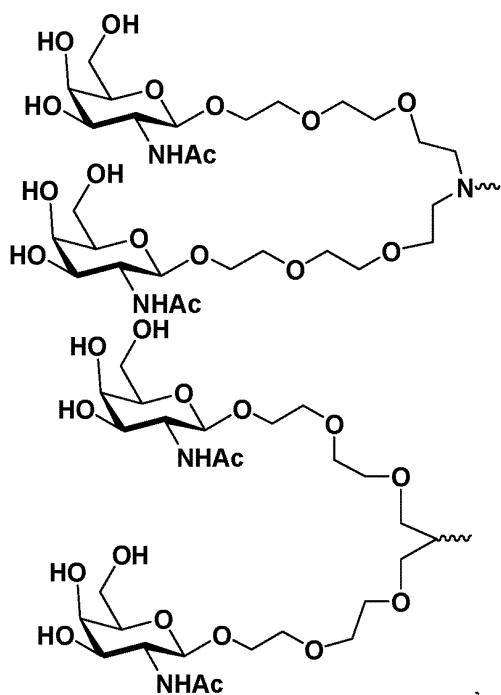
例示的なリガンドとして、以下のリガンドが挙げられるが、それらに限定されるわけではない：



リガンド1

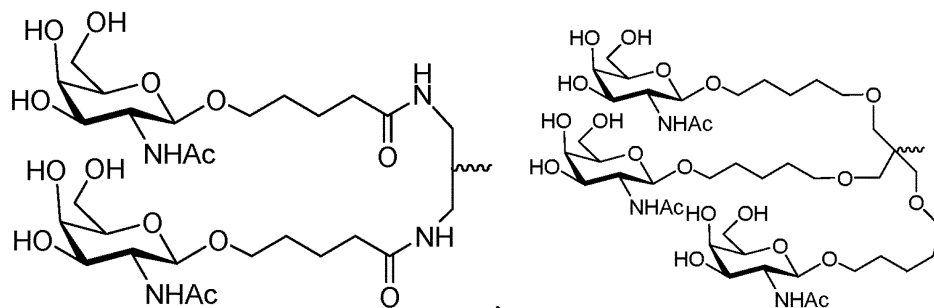


リガンド2



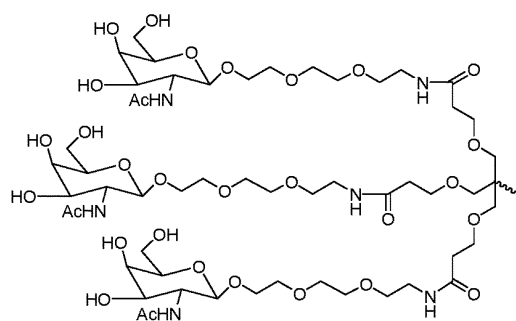
リガンド3

リガンド4



リガンド5

リガンド6



リガンド7

, または

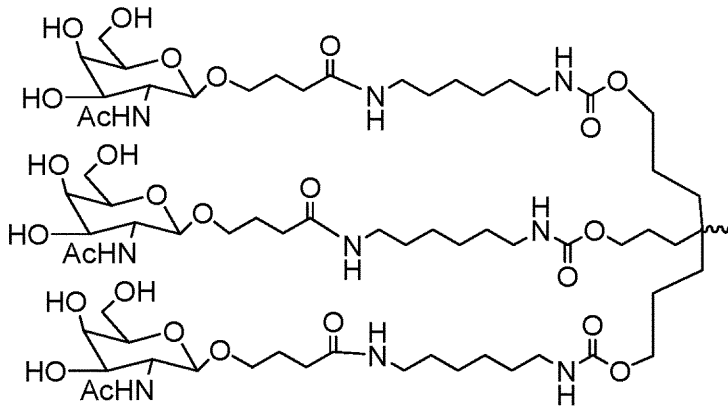
10

20

30

40

50



リガンド8

10

。

【0472】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、リガンドは、米国特許第5,994,517号または米国特許第6,906,182号記載のリガンドであり、これら各文献の内容は参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

【0473】

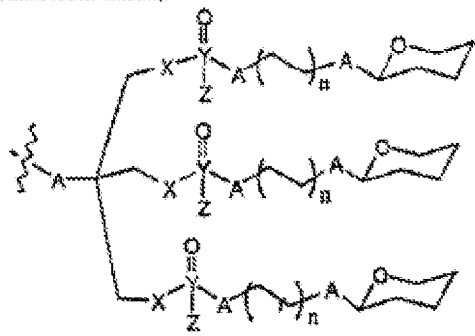
いくつかの態様において、リガンドは、米国特許第6,906,182号の図3に記載されているトリアンテナ型リガンドであることができる。例えば、リガンドは以下のトリアンテナ型リガンドから選択される：

20

30

40

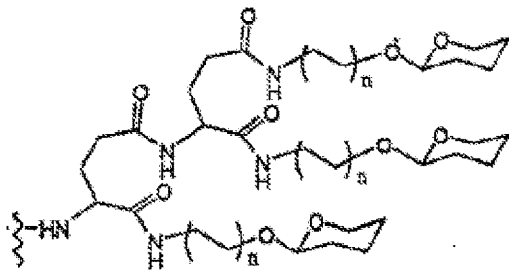
50

トリアンテナ型

$X = \text{NH}, \text{O}, \text{S}$
 $Y = \text{P}$ または S
 $Z = \text{NH-アルキル}, \text{NH}_2, \text{O}^-, \text{S}^-$
 $A = \text{NH}, \text{CH}_2, \text{O}, \text{S}$
 $n = 2 \sim 17$ 個の2炭素単位
 炭水化物 $\approx$

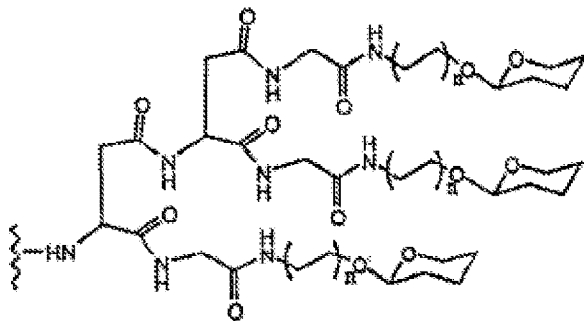
トリス((ヘテロ原子)メチル)-[ヘテロ原子]メタン

10

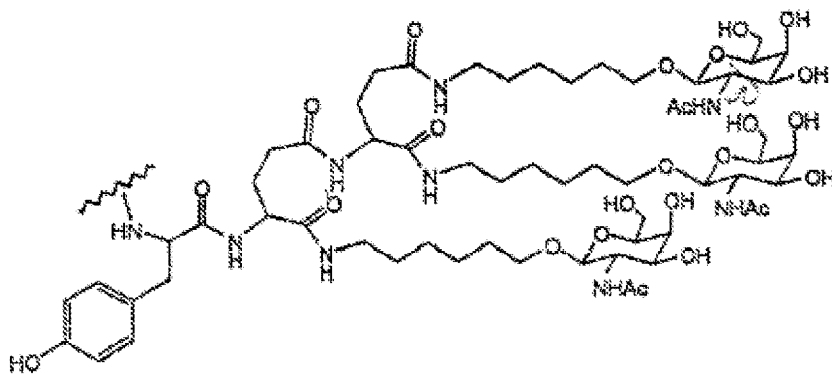


ジグルタミル^{*}

20



ジアスパラチル



30

40

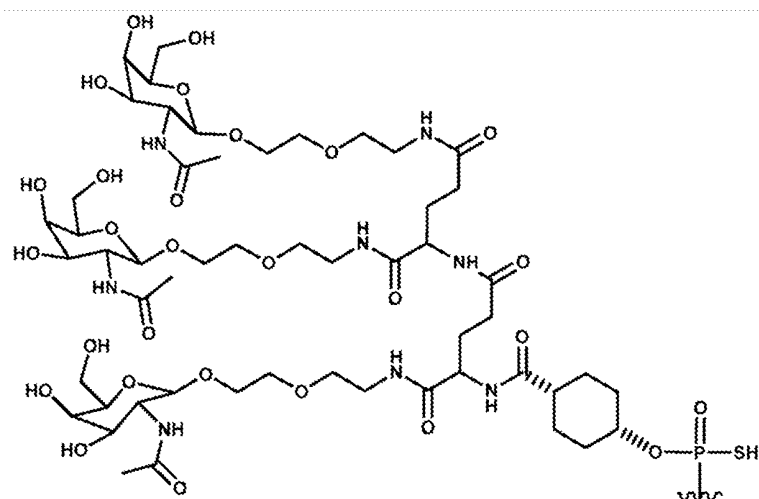
。【0474】

いくつかの態様において、リガンドは、例えばUS2021/0123048の図4Aおよび図4Bに記載のリガンドであることができ、この文献の内容は参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

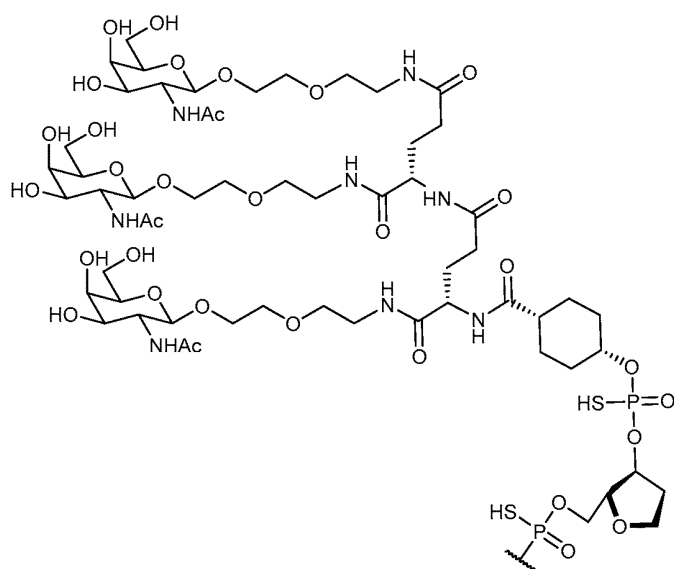
【0475】

本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様において、リガンドは

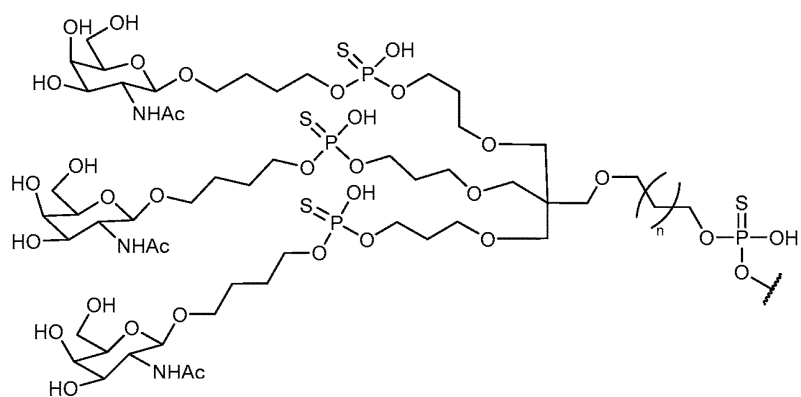
50



10



20

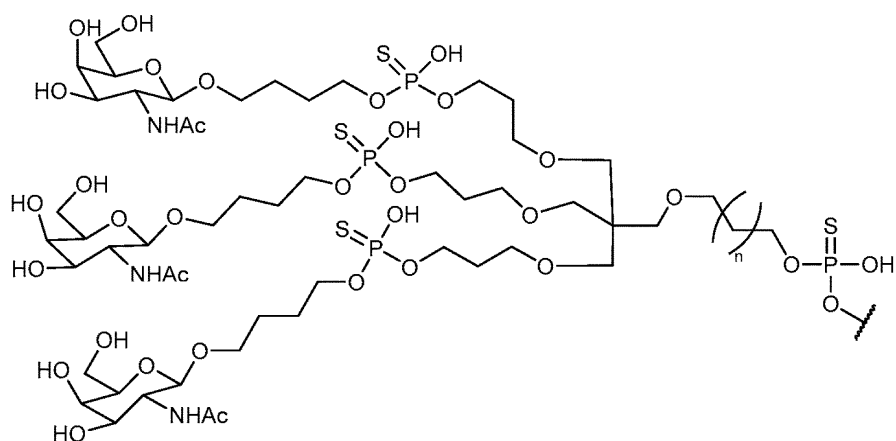


30

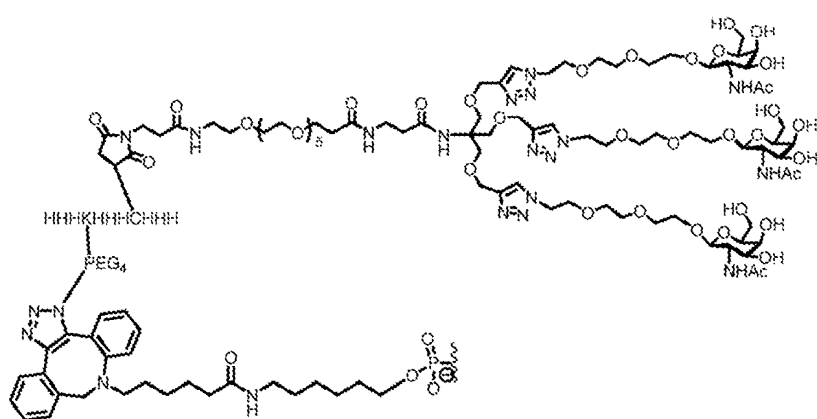
40

(ここで、 n は0～10であり、例えば n は1または4である)、

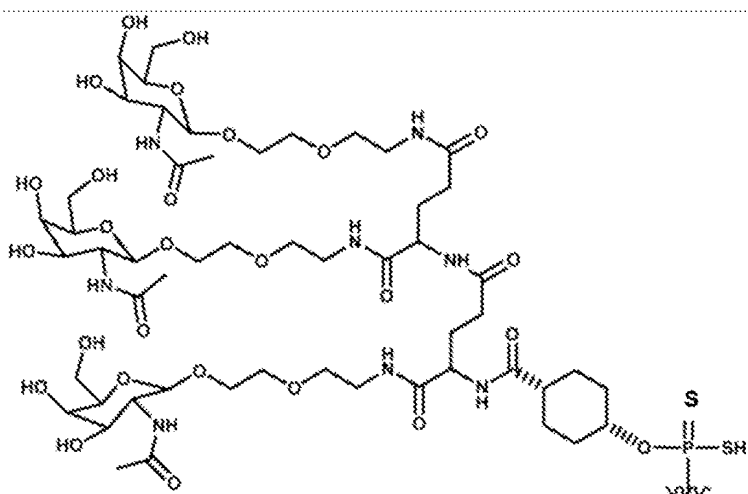
50



10



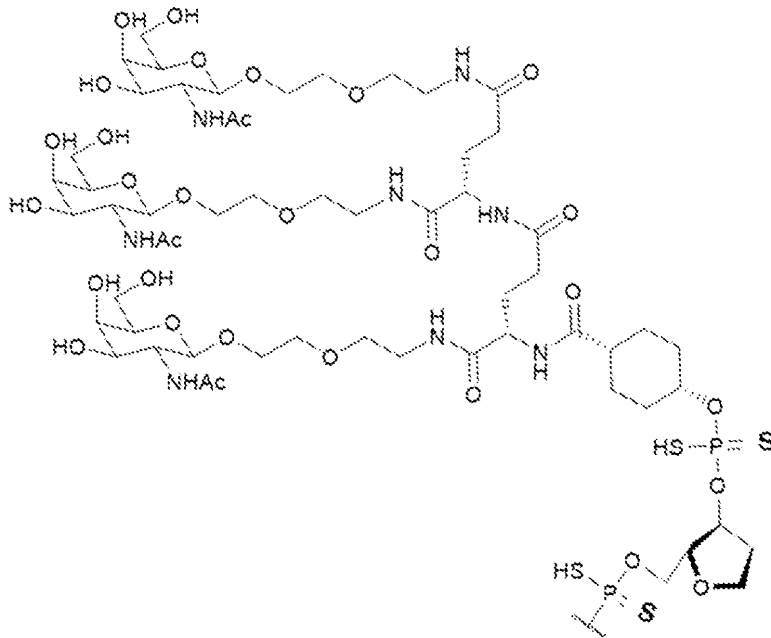
20



30

40

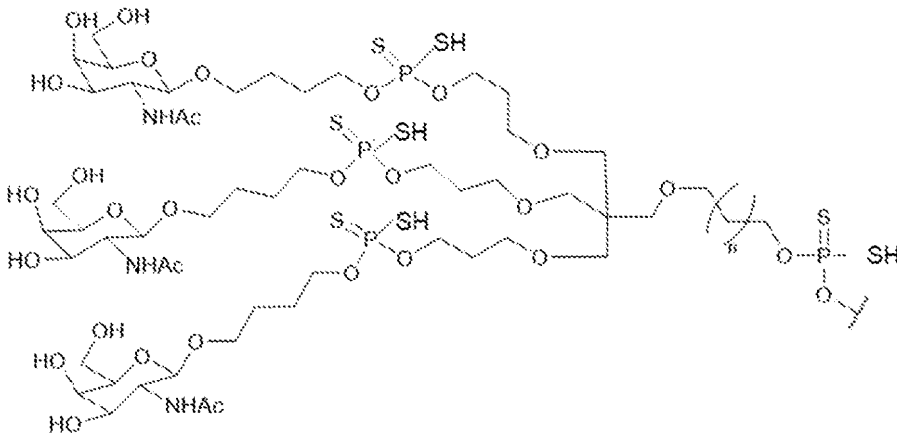
50



10

,または

20



30

であることができる。

【0476】

2つ以上のリガンドが存在する場合、それらは同じであることまたは異なることができることに注意されたい。したがって、本明細書記載の局面のいずれか一つのいくつかの態様では、すべてのリガンドが同じである。本明細書記載の局面のいずれか一つの他のいくつかの態様では、リガンドが異なる。

【0477】

例示的なリガンドとして、ペプチド、センチリン、抗体、抗体フラグメント、T細胞ターゲットリガンド、B細胞ターゲットリガンド、がん細胞ターゲットリガンド (DUPA、葉酸塩、RGD)、脾臓ターゲット機能性、肺ターゲット機能性、骨髄ターゲット機能性、抗CD-4抗体、抗CD-117抗体、ファージディスプレイペプチド、細胞透過ペプチド (CPP)、イテグリン (integrin) リガンド、多価アニオン性リガンド、多価カチオン性リガンド、炭水化物 (GalNAc、マンノース、マンノース-6ホスフェート、フコース、グルコース、一価および多価)、腎臓ターゲットリガンド、血液脳関門 (BBB) 透過リガンド、脂質およびアミノ酸 (L-アミノ酸、D-アミノ酸、β-アミノ酸) が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

40

【0478】

いくつかの態様において、リガンドは親油性基を含む。例えばリガンドはC₆~30脂肪族基またはC₁₀~30脂肪族基であることができる。いくつかの態様において、リガンド

50

は、 $C_{10} \sim 30$ アルキル、 $C_{10} \sim 30$ アルケニルまたは $C_{10} \sim 30$ アルキニル基である。例えばリガンドは、直鎖または分岐ヘキシル、オクチル、デシル、ドデシル、テトラデシル、ヘキサデシル、オクタデシル、イコシル、ドコシル、またはテトラコシル基である。いくつかの態様において、リガンドは、直鎖ヘキシル、オクチル、デシル、ドデシル、テトラデシル、ヘキサデシル、オクタデシル、イコシル、ドコシル、またはテトラコシル基である。例えばリガンドは、直鎖ヘキシル、オクチル、デシル、ドデシル、ヘキサデシル、オクタデシル、イコシル、またはドコシル基である。例えばリガンドは直鎖ヘキサデシル基である。別の一例において、リガンドは直鎖ドコシル基である。

【0479】

オリゴヌクレオチドおよびdsRNAの使用

10

上記局面のいずれか一つのいくつかの態様において、本明細書記載のオリゴヌクレオチドまたは本明細書記載のdsRNA分子のアンチセンス鎖は、標的核酸、例えば標的遺伝子または標的mRNAに実質的に相補的なヌクレオチド配列を含む。

【0480】

したがって、別の一局面において、本開示は、標的遺伝子の発現を阻害するための、本明細書に記載のオリゴヌクレオチドおよび/またはdsRNA分子の使用へと向けられる。いくつかの態様において、本発明はさらに、インビトロで標的遺伝子の発現を阻害するための、本明細書に記載のオリゴヌクレオチドおよび/またはdsRNA分子の使用に関する。

【0481】

別の一局面において、本開示は、対象における標的遺伝子の発現を阻害するのに使用するための、本明細書に記載のオリゴヌクレオチドおよび/またはdsRNA分子の使用へと向けられる。対象は、任意の動物、例えば哺乳動物、例えばマウス、ラット、ヒツジ、ウシ、イヌ、ネコ、またはヒトでありうる。

20

【0482】

いくつかの態様において、本明細書に記載のオリゴヌクレオチドおよび/またはdsRNA分子は緩衝液に入れて投与される。

【0483】

いくつかの態様において、本明細書に記載のオリゴヌクレオチドおよび/またはdsRNA分子は、対象への投与のために製剤化されうる。製剤化されたオリゴヌクレオチドおよび/またはdsRNAの組成物はさまざまな状態をとることができる。いくつかの例において、組成物は少なくとも部分的に結晶性であり、一様に結晶性であり、および/または無水（例えば80、50、30、20または10%未満の水分）である。別の一例において、siRNAは水相にあり、例えば水を含む溶液中にある。

30

【0484】

水相または結晶性組成物は、例えば送達媒体、例えばリポソーム（特に水相用）または粒子（例えば結晶性組成物にとって適当でありうるような微粒子）に組み入れることができる。一般に、siRNA組成物は、本明細書に記載するように、意図する投与方法に適合する方法で、製剤化される。例えば、特定の態様において、組成物は、以下の方法のうちの少なくとも1つによって調製される：噴霧乾燥、凍結乾燥、真空乾燥、エバポレーション、流動床乾燥、もしくはこれらの技法の組合せ；、または脂質と共に超音波処理、フリーズドライ、凝縮および他の自己集合。

40

【0485】

オリゴヌクレオチドおよび/またはdsRNAの調製物は、別の剤、例えば別の治療剤と、またはオリゴヌクレオチドおよび/もしくはdsRNAを安定化する剤、例えばオリゴヌクレオチドおよび/またはdsRNAと複合体化するタンパク質と、組み合わせて製剤化することができる。さらなる他の剤として、キレート剤、例えばEDTA（例えば Mg^{2+} などの二価カチオンを除去するため）、塩、RNAse阻害剤（例えばRNAsinなどの広域特異性RNAse阻害剤）などが挙げられる。

【0486】

いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドおよび/またはdsRNAの調製物は、別の

50

dsRNA化合物、例えば第2の遺伝子に関してまたは同じ遺伝子に関してRNAiを媒介することができる第2のdsRNAを含む。さらに別の調製物は、少なくとも3、5、10、20、50もしくは100種、またはそれ以上の異なるsiRNA種を含むことができる。そのようなdsRNAは、同様の数の異なる遺伝子に関してRNAiを媒介することができる。

【0487】

いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドおよび/またはdsRNAの調製物は、少なくとも第2の治療剤（例えばRNAまたはDNA以外の剤）を含む。例えば、ウイルス疾患、例えばHIVを処置するための、オリゴヌクレオチドおよび/またはdsRNAの組成物は、公知の抗ウイルス剤（例えばプロテアーゼ阻害剤または逆転写酵素阻害剤）を含むかもしれない。別の一例において、がんを処置するためのdsRNA組成物は化学療法剤をさらに含むかもしれない。

10

【0488】

本発明のオリゴヌクレオチドおよび/またはdsRNAを投与するために使用することができる例示的な製剤を以下に論じる。

【0489】

リポソーム。オリゴヌクレオチドおよび/またはdsRNAの調製物は、送達のために、膜分子アセンブリ、例えばリポソームまたはミセルに、製剤化することができる。本明細書において使用される「リポソーム」という用語は、少なくとも1つの二重層、例えば1つの二重層または複数の二重層に配列された両親媒性脂質から構成される小胞を指す。リポソームには、親油性材料から形成される膜と水性内部とを有するユニラメラ小胞およびマルチラメラ小胞が含まれる。水性部分はオリゴヌクレオチドおよび/またはdsRNAの組成物を含有する。親油性材料は水性内部を水性外部から隔離し、水性外部は典型的にはオリゴヌクレオチドおよび/またはdsRNAの組成物を含まないが、いくつかの例では、オリゴヌクレオチドおよび/またはdsRNAの組成物を含みうる。リポソームは、作用部位への活性成分の移入および送達に有用である。リポソーム膜は生体膜と構造的に類似しているので、リポソームを組織に適用すると、リポソームの二重層が細胞膜の二重層と融合する。リポソームと細胞の合体が進行するにつれて、オリゴヌクレオチドおよび/またはdsRNAを含む内側の水性内容物は細胞中に送達され、そこではdsRNAが標的RNAに特異的に結合してRNAiを媒介することができる。いくつかの態様において、例えばオリゴヌクレオチドおよび/またはdsRNAを特定細胞タイプに向かわせるために、リポソームも特異的に標的指向させる。

20

30

【0490】

オリゴヌクレオチドおよび/またはdsRNAを含有するリポソームは、さまざまな方法によって調製することができる。ある例では、リポソームの脂質構成要素を、脂質構成要素でミセルが形成されるように、デタージェント中に溶解する。例えば、脂質構成要素は両親媒性カチオン性脂質または脂質コンジュゲートであることができる。デタージェントは高い臨界ミセル濃度を有することができ、非イオン性でありうる。例示的なデタージェントとして、コール酸、CHAPS、オクチルグルコシド、デオキシコール酸およびラウロイルサルコシンが挙げられる。次に、脂質構成要素を含むミセルに、dsRNA調製物を加える。脂質上のカチオン基はsiRNAと相互作用し、dsRNAの周りに凝縮することでリポソームを形成する。凝縮後に、デタージェントを透析などによって取り除くことで、オリゴヌクレオチドおよび/またはdsRNAのリポソーム調製物を得る。

40

【0491】

必要であれば、凝縮を助ける担体化合物を、凝縮反応中に、制御された添加などによって加えることができる。例えば、担体化合物は核酸以外のポリマー（例えばスペルミンまたはスペルミジン）であることができる。凝縮に有利になるようにpHを調節することもできる。

【0492】

ポリヌクレオチド/カチオン性脂質複合体を送達媒体の構成要素として組み入れた安定なポリヌクレオチド送達媒体を生産するための方法のさらなる説明は、例えばWO96/3

50

7194に記載されている。リポソーム形成は、Felgner, P.L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 8:7413-7417, 1987、米国特許第4,897,355号、米国特許第5,171,678号、Bangham, et al. M. Mol. Biol. 23:238, 1965、Olson, et al. Biochim. Biophys. Acta 557:9, 1979、Szoka, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 75:4194, 1978、Mayhew, et al. Biochim. Biophys. Acta 775:169, 1984、Kim, et al. Biochim. Biophys. Acta 728:339, 1983およびFukunaga, et al. Endocrinol. 115:757, 1984に記載の例示的な方法の1つまたは複数の局面も含むことができ、これらの文献は参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。送達媒体としての使用に適したサイズの脂質凝集体を調製するためによく使用される技法として、超音波処理および凍結融解と押出しが挙げられる（例えばMayer, et al. Biochim. Biophys. Acta 858:161, 1986参照。この文献は参照によりその全体が本明細書に組み入れられる）。一貫して小さく（50~200nm）比較的一様な凝集体が望ましい場合は、マイクロ流体技術を使用することができる（Mayhew, et al. Biochim. Biophys. Acta 775:169, 1984、この文献は参照によりその全体が本明細書に組み入れられる）。これらの方法はリポソームへのオリゴヌクレオチドおよび/またはsiRNA調製物のパッケージングに容易に適合させることができる。

10

20

30

40

50

【0493】

pH感受性のまたは負に帯電したリポソームは、核酸分子との複合体を形成するのではなく、むしろ核酸を封入する。核酸分子と脂質はどちらも同じように帯電しているので、複合体の形成よりもむしろ反発が起こる。それでも一部の核酸分子はこれらのリポソームの水性内部内に封入される。pH感受性リポソームは、チミジンキナーゼ遺伝子をコードするDNAを培養細胞単層に送達するために使用されている。標的細胞において外因性遺伝子の発現が検出された（Zhou et al., Journal of Controlled Release, 19, (1992) 269-274、この文献は参照によりその全体が本明細書に組み入れられる）。

【0494】

リポソーム組成物の主要タイプの一つは、天然由来ホスファチジルコリン以外のリン脂質を含む。中性リポソーム組成物は、例えばジミリスチルホスファチジルコリン（DMPC）またはジパルミトイルホスファチジルコリン（DPPC）から形成されうる。アニオン性リポソーム組成物は、一般に、ジミリスチルホスファチジルグリセロールから形成され、一方、アニオン性膜融合性リポソームは主としてジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（DOPE）から形成される。もう一つのタイプのリポソーム組成物はホスファチジルコリン（PC）、例えば大豆PCおよび卵PCなどから形成される。もう一つのタイプはリン脂質および/またはホスファチジルコリンおよび/またはコレステロールの混合物から形成される。

【0495】

インビトロで細胞にリポソームを導入するための他の方法の例として、米国特許第5,283,185号、米国特許第5,171,678号、WO94/00569、WO93/24640、WO 91/16024、Felgner, J. Biol. Chem. 269:2550, 1994、Nabel, Proc. Natl. Acad. Sci. 90:11307, 1993、Nabel, Human Gene Ther. 3:649, 1992、Gershon, Biochem. 32:7143, 1993およびStrauss EMBO J. 11:417, 1992が挙げられる。

【0496】

いくつかの態様では、カチオン性リポソームが使用される。カチオン性リポソームには、細胞膜に融合できるという利点がある。非カチオン性リポソームは、形質膜と効率よく融合することはできないものの、インビボではマクロファージによって取り込まれ、siRNAをマクロファージに送達するために使用することができる。

【0497】

リポソームのさらなる利点として、天然リン脂質から得られたリポソームは生体適合性かつ生分解性であること、リポソームには広範囲にわたる水溶性および脂溶性の薬物を組み入れることができること、リポソームはその内側区画に封入されたsiRNAを代謝および分解から保護できることが挙げられる（Rosoff, 「Pharmaceutical Dosage Forms」, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, volume 1, p.245）。リポソ

ーム製剤の調製において考慮すべき重要な事項は、脂質表面電荷、小胞サイズおよびリボソームの水体積である。

【0498】

正荷電合成カチオン性脂質N-[1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド(DOTMA)を使って、核酸と自発的に相互作用して脂質-核酸複合体を形成する小さなリボソームを形成させることができ、このリボソームは、組織培養細胞の細胞膜の負に帯電した脂質と融合することで、結果として、siRNAを送達する能力を有する(DOTMAおよびDNAとのその使用については、例えばFelgner, P.L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 8:7413-7417, 1987および米国特許第4,897,355号を参照されたい、これらの文献は参照によりその全体が本明細書に組み入れられる)。

10

【0499】

DOTMA類似体1,2-ビス(オレオイルオキシ)-3-(トリメチルアンモニア)プロパン(DOTAP)をリン脂質と組み合わせて使用することにより、DNA複合体化小胞を形成させることができる。Lipofectin(商標)(Bethesda Research Laboratories、メリーランド州ゲイサースバーグ)は、高度にアニオン性である核酸を生きている組織培養細胞中に送達するための効果的な薬剤であり、負に帯電したポリヌクレオチドと自発的に相互作用して複合体を形成する正に帯電したDOTMAリボソームを含む。十分な正に帯電したリボソームを使用すると、結果として生じる複合体の正味の電荷はやはり正になる。この方法で調製される正に帯電した複合体は、負に帯電した細胞表面に自発的に付着し、形質膜と融合して、例えば組織培養細胞中に、機能的核酸を効率よく送達する。市販されているもう一つのカチオン性脂質、1,2-ビス(オレオイルオキシ)-3,3-(トリメチルアンモニア)プロパン(「DOTAP」)(Boehringer Mannheim、インディアナ州インディアナポリス)は、オレオイル部分がエーテル連結部ではなくエステルによって連結されている点で、DOTMAとは異なる。

20

【0500】

報告されている他のカチオン性脂質化合物には、さまざまな部分にコンジュゲートされたもの、例えば2タイプの脂質のうち1つにコンジュゲートされたカルボキシスベルミンであって、5-カルボキシスベルミルグリシンジオクタオレイルアミド(「DOGS」)(Transfectam(商標)、Promega、ウィスコンシン州マディソン)およびジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン5-カルボキシスベルミルアミド(「DPPEs」)などの化合物を含むものがある(例えば米国特許第5,171,678号を参照されたい)。

30

【0501】

もう一つのカチオン性脂質コンジュゲートには、DOPEと組み合わせてリボソームに製剤化された、コレステロールによる脂質の誘導体化(「DC-Chol」)が含まれる(例えばGao, X. and Huang, L., Biochim. Biophys. Res. Commun. 179:280, 1991参照)。DOPEにポリリジンをコンジュゲートすることによって作製されるリボポリリジンは、血清存在下でのトランスフェクションに有効であると報告されている(Zhou, X. et al., Biochim. Biophys. Acta 1065:8, 1991、この文献は参照によりその全体が本明細書に組み入れられる)。一定の細胞株については、コンジュゲートされたカチオン性脂質を含有するこれらのリボソームは、DOTMA含有組成物よりも低い毒性を呈し、効率のよいトランスフェクションをもたらすと言われている。他の市販のカチオン性脂質製品には、DMRIEおよびDMRIE-HP(Vical、カリフォルニア州ラホーヤ)およびLipofectamine(DOSPA)(Life Technology, Inc., メリーランド州ゲイサースバーグ)がある。オリゴヌクレオチドの送達に適した他のカチオン性脂質はWO98/39359およびWO96/37194に記載されている。

40

【0502】

リボソーム製剤は外用投与には特に適している。リボソームには他の製剤と比較していくつかの利点がある。それらの利点には、投与された薬物の高い全身性吸収に関係する副作用の低減、投与された薬物の所望の標的における蓄積の増加、および皮膚にsiRNAを

50

投与できることが含まれる。いくつかの実施形態では、表皮細胞にsiRNAを送達するために、そして真皮組織への、例えば皮膚への、siRNAの浸透を強化するために、リポソームが使用される。例えばリポソームは外用的に適用することができる。リポソームとして製剤化された薬物の外用送達は詳述されている（例えばWeiner et al., Journal of Drug Targeting, 1992, vol. 2, 405-410 および du Plessis et al., Antiviral Research, 18, 1992, 259-265、Mannino, R. J. and Fould-Fogerite, S., Biotechniques 6: 682-690, 1988、Itani, T. et al. Gene 56: 267-276. 1987、Nicolau, C. et al. Meth. Enz. 149: 157-176, 1987、Straubinger, R. M. and Papahadjopoulos, D. Meth. Enz. 101: 512-527, 1983、Wang, C. Y. and Huang, L., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7851-7855, 1987を参照されたい。これらの文献は参照によりその全体が本明細書に組み入れられる）。

10

【0503】

非イオン性リポソーム系、特に非イオン性界面活性剤とコレステロールとを含む系も、皮膚への薬物の送達におけるそれらの有用性を決定するために検討されている。Novasome I（グリセリルジラウレート/コレステロール/ポリオキシエチレン-10-ステアリルエーテル）およびNovasome II（グリセリルジステアレート/コレステロール/ポリオキシエチレン-10-ステアリルエーテル）を含む非イオン性リポソーム製剤が、マウス皮膚の真皮に薬物を送達するために使用された。本明細書記載のdsRNAを含むそのような製剤は皮膚障害を処置するのに有用である。

【0504】

本明細書記載のオリゴヌクレオチドおよび/またはdsRNAを含むリポソームは高度に変形可能であるようにすることができる。そのような変形可能性は、リポソームが、リポソームの平均半径よりも小さな小孔を通して浸透することを可能に示す。例えばトランスファーソームは変形可能なリポソームのタイプである。トランスファーソームは、標準的なリポソーム組成物に表面エッジ活性化因子（surface edge activator）、通常は界面活性剤を添加することによって作製することができる。本明細書記載のオリゴヌクレオチドおよび/またはdsRNAを含むトランスファーソームは、皮膚のケラチノサイトにdsRNAを送達するために、例えば皮下にインフェクション（infection）によって送達することができる。哺乳動物の無傷の皮膚を横切るために、脂質小胞は、適切な経皮勾配の影響下で、それぞれが直径50nm未満である一連の細孔を通過しなければならない。加えて、脂質の特性ゆえに、これらのトランスファーソームは、自己最適化性（小孔、例えば皮膚の小孔の形状に対して適応性がある）、自己修復性であることができ、多くの場合、断片化せずにそれぞれの標的に到達することができ、多くの場合、自己装填性（self-loading）であることができる。

20

30

【0505】

本発明に適する他の製剤は、2008年1月2日に出願された米国仮出願第61/018,616号、2008年1月2日に出願された同第61/018,611号、2008年3月26日に出願された同第61/039,748号、2008年4月22日に出願された同第61/047,087号および2008年5月8日に出願された同第61/051,528号に記載されている。2007年10月3日に出願されたPCT出願番号PCT/US2007/080331にも、本発明に適した製剤が記載されている。

40

【0506】

界面活性剤。オリゴヌクレオチドおよび/またはdsRNAの組成物は界面活性剤を含むことができる。いくつかの態様において、dsRNAは界面活性剤を含むエマルジョンとして製剤化される。天然界面活性剤でも合成界面活性剤でも数多くの異なるタイプの界面活性剤の性質を分類しランク付する最も一般的な方法は、親水性/親油性バランス（HLB）を使用する方法である。親水性基の性質は、製剤に使用されるさまざまな界面活性剤をカテゴリー化するための最も有用な手段になる（Rieger, 「Pharmaceutical Dosage Forms」, Marcel Dekker, Inc., ニューヨーク、NY, 1988, p. 285）。

【0507】

50

界面活性剤分子がイオン化されないのであれば、それは非イオン性界面活性剤と分類される。非イオン性界面活性剤は、薬学的製品に広く応用され、広範囲にわたるpH値で使うことができる。一般に、それらのHLB値は、それぞれの構造に依存して2～約18の範囲にある。非イオン性界面活性剤には、エチレングリコールエステル、プロピレングリコールエステル、グリセリルエステル、ポリグリセリルエステル、ソルビタンエステル、スクロースエステルおよびエトキシ化エステルなどの非イオン性エステルが含まれる。非イオン性のアルカノールアミドおよびアルカノールエーテル、例えば脂肪アルコールエトキシレート、プロポキシ化アルコールおよびエトキシ化/プロポキシ化ブロックポリマーもこのクラスに含まれる。ポリオキシエチレン界面活性剤は非イオン性界面活性剤クラスの最も一般的なメンバーである。

10

【0508】

水に溶解または分散させた時に界面活性剤分子が負電荷を持つのであれば、その界面活性剤はアニオン性と分類される。アニオン性界面活性剤には、石鹼などのカルボキシレート、アシルラクチレート、アミノ酸のアシルアミド、硫酸のエステル、例えばアルキルサルフェートおよびエトキシ化アルキルサルフェート、スルホネート、例えばアルキルベンゼンスルホネート、アシルイセチオネート、アシルタウレートおよびスルホスクシネート、ならびにホスフェートが含まれる。アニオン性界面活性剤クラスの最も重要なメンバーはアルキルサルフェートおよび石鹼である。

【0509】

水に溶解または分散させた時に界面活性剤分子が正電荷を持つのであれば、その界面活性剤はカチオン性と分類される。カチオン性界面活性剤には4級アンモニウム塩およびエトキシ化アミンが挙げられる。4級アンモニウム塩はこのクラスでは最も使用されるメンバーである。

20

【0510】

界面活性剤分子が正電荷または負電荷をどちらでも持つことができる場合、その界面活性剤は両性と分類される。両性界面活性剤には、アクリル酸誘導体、置換アルキルアミド、N-アルキルベタインおよびホスファチドが含まれる。

【0511】

薬物製品、製剤およびエマルションにおける界面活性剤の使用については総説がある (Rieger, 「Pharmaceutical Dosage Forms」, Marcel Dekker, Inc., ニューヨーク、NY, 1988, p. 285)。

30

【0512】

ミセルおよび他の膜製剤。「ミセル」とは、本明細書では、両親媒性分子の疎水性部分がすべて内側を向き、親水性部分は周囲の水相と接触した状態を保つように、両親媒性分子が球状構造に配置されている分子集合体の一特定タイプと定義される。環境が疎水性であるなら、逆の配置が存在する。

【0513】

経皮メンブレン (transdermal membranes) による送達に適した混合ミセル製剤は、オリゴヌクレオチドおよび/またはdsRNAの組成物の水溶液、アルカリ金属C₈～C₂₂アルキルサルフェートおよびミセル形成化合物を混合することによって調製される。例示的なミセル形成化合物としては、レシチン、ヒアルロン酸、ヒアルロン酸の薬学的に許容される塩、グリコール酸、乳酸、カモミール抽出物、キュウリ抽出物、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸、モノオレイン、モノオレート、モノラウレート、ポリジオイル、月見草オイル、メントール、トリヒドロキシオキソコラニルグリシンおよび薬学的に許容されるその塩、グリセリン、ポリグリセリン、リジン、ポリリジン、トリオレイン、ポリオキシエチレンエーテルおよびその類似体、ポリドカノールアルキルエーテルおよびその類似体、ケノデオキシコール酸、デオキシコール酸、ならびにそれらの混合物が挙げられる。ミセル形成化合物はアルカリ金属アルキルサルフェートの添加と同時にまたはアルカリ金属アルキルサルフェートの添加後に添加しうる。混合ミセルは、実質上あらゆる種類の成分の混合で形成されるが、より小さいサイズのミセルを得るには激しく混合する。

40

50

【0514】

ある方法では、オリゴヌクレオチドおよび/またはdsRNAの組成物と少なくともアルカリ金属アルキルサルフェートとを含有する第1ミセル組成物が調製される。次にその第1ミセル組成物を少なくとも3種のミセル形成化合物と混合することで、混合ミセル組成物を形成させる。別の方法では、dsRNA組成物とアルカリ金属アルキルサルフェートとミセル形成化合物のうちの少なくとも1つとを混合することによってミセル組成物を調製し、次に残りのミセル形成化合物を加えて激しく攪拌する。

【0515】

製剤を安定化し細菌の増殖から保護するために、フェノールおよび/またはm-クレゾールを混合ミセル組成物に加えてもよい。あるいは、フェノールおよび/またはm-クレゾールをミセル形成成分と共に加えてもよい。混合ミセル組成物の形成後にグリセリンなどの等張化剤も加えうる。

【0516】

ミセル製剤をスプレーとして送達するために、製剤をエアロゾルディスペンサーに入れることができ、ディスペンサーには噴射剤が充填される。加圧下の噴射剤はディスペンサー中で液状である。成分の比は、水相と噴射剤相とが1つになるように、すなわち存在する相が1つであるように、調節される。2つの相が存在する場合は、内容物の一部を例えば計量弁を通して投薬する前に、ディスペンサーを振とうする必要がある。薬学的剤の投薬量は、計量弁から微細な霧として噴射される。

【0517】

噴射剤は、含水素クロロフルオロカーボン、含水素フルオロカーボン、ジメチルエーテルおよびジエチルエーテルを含みうる。一定の態様では、HFA134a(1,1,1,2テトラフルオロエタン)を使用しうる。

【0518】

必須成分の具体的濃度は比較的単純な実験によって決定することができる。口腔からの吸収には、注射による場合または消化管経路の投与による場合の投薬量を、例えば少なくとも2倍または3倍に増加させることが望ましいことが多い。

【0519】

粒子。いくつかの態様において、dsRNA調製物は粒子、例えば微粒子に組み入れることができる。微粒子は噴霧乾燥によって生産することができるが、凍結乾燥、エバポレーション、流動床乾燥、真空乾燥またはそれらの技法の組合せなどといった他の方法によっても生産されうる。

【0520】

薬学的組成物

本明細書記載のオリゴヌクレオチドおよび/またはdsRNAは、薬学的使用のために製剤化することができる。本発明はさらに、本明細書記載のオリゴヌクレオチドおよび/またはdsRNAを含む薬学的組成物に関する。薬学的に許容される組成物は、単独で投薬されるか、または1つもしくは複数の薬学的に許容される担体(添加剤)、賦形剤および/もしくは希釈剤と一緒に製剤化された、治療有効量の1種または複数種の前記態様のいずれかのdsRNA分子を含む。

【0521】

薬学的組成物は、次に挙げる投与に適合するものを含めて、固形物または液状物として投与するために、特別に製剤化されうる。(1)経口投与、例えば飲薬(水性または非水性の溶液または懸濁液)、錠剤、例えば口腔粘膜、舌下および全身性吸収を目的とするもの、ボーラス、粉末剤、顆粒剤、舌に塗布するためのペースト剤、(2)非経口投与、例えば滅菌溶液もしくは滅菌懸濁液または徐放性製剤としての皮下、筋肉内、静脈内または硬膜外注射によるもの、(3)外用適用、例えばクリーム剤、軟膏もしくは放出制御性貼付剤、または皮膚に適用される噴霧剤、(4)例えばペッサリー、クリーム剤またはフォーム剤としての、腔内または直腸内投与、(5)舌下投与、(6)眼投与、(7)経皮投与、または(8)鼻腔投与。皮下法または静脈内法を使った送達は特に有利である。

【0522】

本明細書において使用される「治療有効量」という語句は、本明細書記載のdsRNA分子を含む化合物、材料または組成物の量であって、動物中の細胞の少なくとも部分集団において、任意の医学的処置に適用可能な合理的ベネフィット/リスク比で、何らかの所望の治療効果を生じるのに有効な量を意味する。

【0523】

「薬学的に許容される」という語句は、本明細書では、妥当な医学的判断の範囲内で、合理的なベネフィット/リスク比に見合った、過剰な毒性、刺激、アレルギー応答または他の問題もしくは合併症を伴わずにヒトおよび動物の組織と接触させて使用するのに適する、化合物、材料、組成物、および/または剤形を指すために使用される。

10

【0524】

本明細書において使用される「薬学的に許容される担体」という語句は、身体のある器官または部分から身体の別の器官または部分へと本化合物を運搬または輸送するのに必要な、薬学的に許容される材料、組成物または媒体、例えば液状または固形の充填剤、希釈剤、賦形剤、製造助剤（例えば潤滑剤、タルクマグネシウム、ステアリン酸カルシウムもしくはステアリン酸亜鉛、またはステアリン酸（steric acid））、または溶媒封入材料を意味する。各担体は、製剤の他の成分と適合し、患者にとって有害でないという意味で、「許容される」ものでなければならない。薬学的に許容される担体として役立つ材料の例を以下にいくつか挙げる：（1）糖類、例えばラクトース、グルコースおよびスクロース、（2）デンプン、例えばトウモロコシデンプンおよびバレイショデンプン、（3）セルロースおよびその誘導体、例えばカルボキシメチルセルロースナトリウム、エチルセルロースおよび酢酸セルロース、（4）トラガント粉末、（5）麦芽、（6）ゼラチン、（7）潤滑剤、例えばステアリン酸マグネシウム（magnesium state）、ラウリル硫酸ナトリウムおよびタルク、（8）賦形剤、例えばカカオ脂および坐剤用ワックス、（9）油、例えばラッカセイ油、綿実油、サフラワー油、ゴマ油、オリーブ油、トウモロコシ油およびダイズ油、（10）グリコール、例えばプロピレングリコール、（11）ポリオール、例えばグリセリン、ソルビトール、マンニトールおよびポリエチレングリコール、（12）エステル、例えばオレイン酸エチルおよびラウリン酸エチル、（13）寒天、（14）緩衝剤、例えば水酸化マグネシウムおよび水酸化アルミニウム、（15）アルギン酸、（16）パイロジェンフリー水、（17）等張食塩水、（18）リンゲル液、（19）エチルアルコール、（20）pH緩衝溶液、（21）ポリエステル、ポリカーボネートおよび/またはポリ無水物、（22）増量剤、例えばポリペプチドおよびアミノ酸、（23）血清構成要素、例えば血清アルブミン、HDLおよびLDL、ならびに（22）薬学的製剤に使用される他の非毒性適合物質が挙げられる。

20

30

【0525】

製剤は、単位剤形で都合よく提示することができ、薬学分野において周知の任意の方法によって調製しうる。単一の剤形を生産するために担体材料と合わせることができる活性成分の量は、処置される宿主、特定投与様式に依存して変動するだろう。単一の剤形を生産するために担体材料と合わせることができる活性成分の量は、一般に、治療効果を生じる化合物の量であるだろう。一般に、この量は、100パーセントのうち、活性成分約0.1パーセントから約99パーセントまで、好ましくは約5パーセントから約70パーセントまで、最も好ましくは約10パーセントから約30パーセントまでの範囲に及ぶだろう。

40

【0526】

一定の態様において、本発明の製剤は、シクロデキストリン、セルロース、リポソーム、ミセル形成剤、例えば胆汁酸、ならびにポリマー担体、例えばポリエステルおよびポリ無水物からなる群より選択される賦形剤と、本発明の化合物とを含む。一定の態様において、前述の製剤は、本発明の化合物を経口バイオアベイラブルにする。

【0527】

これらの製剤または組成物を調製する方法は、オリゴヌクレオチドおよび/またはdsRNAを担体および任意で1つまたは複数の補助成分と混合する工程を含む。一般に製剤は

50

本発明の化合物を液状担体もしくは粉碎された固形担体またはその両方と一様かつ密接に混合し、次に必要であれば製品を成形することによって調製される。

【0528】

場合によっては、薬物の効果を長引かせるために、皮下注射または筋肉内注射からの薬物の吸収を遅くすることが望ましい。これは、水溶性に乏しい結晶性材料または無定形材料の懸濁液の使用によって達成しうる。その場合、薬物の吸収速度はその溶解速度に依存し、そして溶解速度は結晶サイズおよび結晶形に依存しうる。あるいは、非経口的に投与された剤形の遅延吸収は、薬物を油性媒体に溶解するか懸濁することによって達成される。

【0529】

本明細書に記載のオリゴヌクレオチドおよび/またはdsRNAは、他の医薬品との類推により、医学または獣医学における使用のために任意の好都合な方法での投与用に製剤化されうる。

【0530】

「処置」(treatment)という用語は、セラピー(therapy)およびキュア(cure)を包含するものとする。この処置を受ける患者は、その必要がある任意の動物、例えば霊長類、特にヒト、および他の哺乳動物、例えばウマ、ウシ、ブタおよびヒツジ、ならびに家禽およびペット全般である。

【0531】

本明細書記載のオリゴヌクレオチドおよび/もしくはdsRNAまたは本明細書記載のオリゴヌクレオチドおよび/もしくはdsRNAを含む薬学的組成物は、さまざまな送達経路を使って対象に投与することができる。本明細書記載のオリゴヌクレオチドおよび/またはdsRNAを含む組成物は、さまざまな経路によって対象に到達することができる。例示的な経路として、静脈内、皮下、外用、直腸、肛門、膺、鼻腔、肺、眼が挙げられる。

【0532】

本明細書記載のオリゴヌクレオチドおよび/またはdsRNAは、局所的処置を望むか全身性処置を望むかに依存して、また処置されるべき領域に依存して、いくつかの方法で投与しうる。投与は外用(眼、膺、直腸、鼻腔内、経皮を含む)、経口または非経口でありうる。非経口投与には、静脈内点滴、皮下、腹腔内もしくは筋肉内注射、または髄腔内もしくは室内投与が含まれる。

【0533】

投与経路および投与部位は、ターゲティングが強化されるように選ばれうる。例えば筋細胞を標的とするには、関心対象の筋肉への筋肉内注射が論理的な選択になるだろう。本明細書記載のオリゴヌクレオチドおよび/またはdsRNAをエアロゾルの形態で投与することにより、肺細胞が標的になりうる。血管内皮細胞は、バルーンカテーテルを本明細書記載のオリゴヌクレオチドおよび/またはdsRNAでコーティングし、本明細書記載のオリゴヌクレオチドおよび/またはdsRNAを機械的に導入することによって標的となりうる。

【0534】

一局面において、本明細書記載のオリゴヌクレオチドおよび/またはdsRNAを対象(例えばヒト対象)に投与する方法を、本明細書において提供する。別の一局面において、本発明は、対象における標的遺伝子の発現を阻害するのに使用するための、本明細書記載のオリゴヌクレオチドおよび/またはdsRNAに関する。本方法または医学的使用は、本明細書記載のオリゴヌクレオチドおよび/またはdsRNAの単位用量を投与することを含む。いくつかの態様において、単位用量は、体重1kgあたり10mg未満、または体重1kgあたり10、5、2、1、0.5、0.1、0.05、0.01、0.005、0.001、0.0005、0.0001、0.00005もしくは0.00001mg未満、および体重1kgあたりRNA剤200nmole(例えば約 4.4×10^{16} コピー)未満、または体重1kgあたり本明細書記載のオリゴヌクレオチドおよび/もしくはdsRNA 1500、750、300、150、75、15、7.5、1.5、0.75、0.15、0.075、0.015、0.0075、0.0015、0.00075、0.00015nmole未満である。

【0535】

規定の量は、疾患または障害、例えば標的遺伝子と関連する疾患または障害を処置または防止するのに有効な量でありうる。単位用量は、例えば、注射（例えば静脈内、皮下または筋肉内）、吸入投与、または外用によって投与することができる。いくつかの態様において、投薬量は10、5、2、1または0.1 mg/kg体重未満でありうる。

【0536】

いくつかの態様において、単位用量は、1日1回未満、例えば2、4、8または30日ごとに1回未満の頻度で投与される。別の一態様において、単位用量は、ある頻度では（例えば定期的頻度では）投与されない。例えば単位用量は1回だけ投与されうる。

【0537】

いくつかの態様では、有効用量が、従来の他の治療モダリティと共に投与される。

【0538】

いくつかの態様において、対象には、初回用量と、1回または複数回の維持量とが、投与される。1回または複数回の維持量は、初回量と同じである場合も、初回量より少ない場合、例えば初回量の半分である場合もある。維持レジメンは、1日あたり0.01 µg~15 mg/kg体重の範囲の用量、例えば1日あたり体重1 kgあたり10、1、0.1、0.01、0.001または0.00001 mgの用量で、対象を1回または複数回処置することを含みうる。維持量は例えば2、5、10または30日ごとに1回以下の頻度で投与される。さらに、処置レジメンはある期間にわたって続けられ、その期間は、その特定疾患の性質、その重症度および患者の全体的状態に依存して変動することになる。一定の態様において、投薬量は、1日1回以下、例えば24、36もしくは48時間またはそれ以上に1回以下、例えば5日ごとまたは8日ごとに1回以下の頻度で送達されうる。処置後に、患者を、その状態の変化について、および疾患状態の症状の改善について、監視することができる。現在の投薬量レベルに患者が有意に反応しない場合には化合物の投薬量を増加させることができ、または疾患状態の症状の改善が観察されるか、疾患状態が消失しているか、もしくは望ましくない副作用が観察された場合には、用量を減少させることができる。

【0539】

有効用量は、所望に応じてまたはその具体的状況下で適宜考慮して、単回投与で投与するか、2回以上の投与で投与することができる。反復注入または頻回注入が望まれる場合は、送達デバイス、例えばポンプ、半永久ステント（例えば静脈内、腹腔内、槽内または嚢内）、またはリザーバーの埋植が得策になりうる。

【0540】

いくつかの態様において、組成物は複数のdsRNA分子種を含む。別の一態様において、dsRNA分子種は、天然の標的配列に関して、別の種とはオーバーラップも隣接もしていない配列を有する。別の一態様において、複数のdsRNA分子種は、異なる天然標的遺伝子に特異的である。別の一態様において、dsRNA分子はアレル特異的である。

【0541】

本明細書記載のオリゴヌクレオチドおよび/またはdsRNAは、哺乳動物、特に大型の哺乳動物、例えば非ヒト霊長類またはヒトに、いくつかの方法で投与することができる。

【0542】

いくつかの態様では、本明細書記載のオリゴヌクレオチドおよび/またはdsRNA組成物の投与は、非経口投与、例えば静脈内（例えばボラスとしてまたは拡散可能な注入として）、皮内、腹腔内、筋肉内、髄腔内、室内、頭蓋内、皮下、経粘膜、口腔粘膜、舌下、内視鏡、直腸、経口、膈、外用、肺、鼻腔内、尿道または眼投与である。投与は、対象が行うか、別の人物、例えば医療提供者が行うことができる。投薬は、計量された用量で、または計量された用量を送達するディスペンサーで行われうる。選ばれた送達モードを以下に詳述する。

【0543】

本発明は、本明細書記載のオリゴヌクレオチドおよび/またはdsRNA組成物を直腸投与または直腸送達するための方法、組成物およびキットを提供する。

【0544】

10

20

30

40

50

標的遺伝子の発現を阻害する方法

本開示の諸局面は標的遺伝子の発現を阻害するための方法にも関係する。本方法は、(i) 第1鎖が標的遺伝子に相補的である、本明細書記載の二本鎖RNA、および/または(ii) 標的遺伝子に相補的である、本明細書記載のオリゴヌクレオチドを、標的遺伝子の発現を阻害するのに十分な量で、対象に投与する工程を含む。

【0545】

本開示は、標的細胞における標的遺伝子の発現を阻害するための、本明細書記載のオリゴヌクレオチドおよび/またはdsRNA分子の使用に、さらに関係する。本開示は、インビトロで、標的細胞における標的遺伝子の発現を阻害するための、本明細書記載のオリゴヌクレオチドおよび/またはdsRNA分子の使用に、さらに関係する。

10

【0546】

別の一局面において、本発明は、細胞における標的遺伝子の発現を調整する方法であって、本明細書記載のオリゴヌクレオチドおよび/またはdsRNA分子を該細胞に投与する工程を含む方法に関する。いくつかの態様において、標的遺伝子は、第VII因子、Eg5、P_{CSK9}、TPX2、apoB、SAA、TTR、RSV、PDGFベータ遺伝子、Erb-B遺伝子、Src遺伝子、CRK遺伝子、GRB2遺伝子、RAS遺伝子、MEKK遺伝子、JNK遺伝子、RAF遺伝子、Erk1/2遺伝子、PCNA (p21) 遺伝子、MYB遺伝子、JUN遺伝子、FOS遺伝子、BCL-2遺伝子、ヘプシジン、活性化プロテインC、サイクリンD遺伝子、VEGF遺伝子、EGFR遺伝子、サイクリンA遺伝子、サイクリンE遺伝子、WNT-1遺伝子、ベータ-カテニン遺伝子、c-MET遺伝子、PKC遺伝子、NFkB遺伝子、STAT3遺伝子、サバイビン遺伝子、Her2/Neu遺伝子、トポイソメラーゼI遺伝子、トポイソメラーゼIIアルファ遺伝子、p73遺伝子中の変異、p21 (WAF1/CIP1) 遺伝子中の変異、p27 (KIP1) 遺伝子中の変異、PPM1D遺伝子中の変異、RAS遺伝子中の変異、カベオリンI遺伝子中の変異、MIB1遺伝子中の変異、MTA1遺伝子中の変異、M68遺伝子中の変異、腫瘍抑制遺伝子中の変異、およびp53腫瘍抑制遺伝子中の変異からなる群より選択される。

20

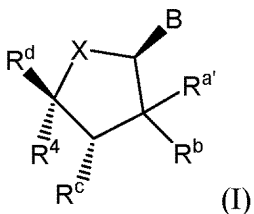
【0547】

さまざまな局面の例示的態様は、以下の番号付き態様のうちの1つまたは複数によって記載することができる。

【0548】

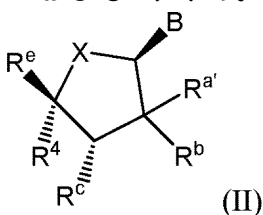
態様1: (a) および (b) のうち的一方または両方を含む、オリゴヌクレオチド:
少なくとも1つの、式 (I) の2'-ジェミナル置換ヌクレオシド:

30



および (b) 式 (II) の2'-ジェミナル置換ヌクレオシドである、5'末端ヌクレオシド

40



式 (I) および (II) において、式中、

Xは、O、S、C(R^X)₂、またはN(R^XN)であり、

各R^Xは、独立して、水素、ハロゲン、置換されていてもよいC₁~₄アルキル、C₁~₄ハロアルキル、置換されていてもよいC₂~₄アルケニル、または置換されていてもよいC₂~

50

4 アルキニルであるか、あるいは両方の R^X が全体として、 $=O$ 、 $=S$ 、 $=N(R^N)$ 、または $=CH_2$ を形成し、

R^{XN} は、水素、置換されていてもよい $C_1 \sim 30$ アルキル、置換されていてもよい $C_1 \sim C_{30}$ アルコキシ、 $C_1 \sim 4$ ハロアルキル、置換されていてもよい $C_2 \sim 4$ アルケニル、置換されていてもよい $C_2 \sim 4$ アルキニル、置換されていてもよい $C_1 \sim 30$ アルキル- CO_2H 、または窒素保護基であり、

B は、修飾されていてもよい核酸塩基であり、

R^{a1} は、水素、ハロゲン、 $-OR^{a2}$ 、 $-SR^{a3}$ 、置換されていてもよい $C_1 \sim 30$ アルキル、 $C_1 \sim 30$ ハロアルキル、置換されていてもよい $C_2 \sim 30$ アルケニル、置換されていてもよい $C_2 \sim 30$ アルキニル、または置換されていてもよい $C_1 \sim 30$ アルコキシ、アミノ (NH_2)、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、ジヘテロアリールアミノ、アミノ酸、 $-O(CH_2CH_2O)_mCH_2CH_2OR^{a4}$ 、シアノ、アルキル-チオ-アルキル、チオアルコキシ、シクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、 $-NH(CH_2CH_2NH)_nCH_2CH_2-R^{a5}$ 、 $NHC(O)R^{a4}$ 、脂質、脂質に共有結合で取り付けられたリンカー、リガンド、リガンドに共有結合で取り付けられたリンカー、固形支持体、固形支持体に共有結合で取り付けられたリンカー、または後続のヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合であり、

R^{a2} は、水素またはヒドロキシル保護基であり、

R^{a3} は、水素または硫黄保護基であり、

R^{a4} は、出現ごとに独立して、 H 、 $C_1 \sim C_{30}$ アルキル、シクリル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アラルキル、糖または R^{a5} であり、

R^{a5} は、出現ごとに独立して、アミノ (NH_2)、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、またはジヘテロアリールアミノであり、

m は、1~50 であり、

n は、1~50 であり、

R^b は、置換されていてもよい $C_1 \sim 30$ アルキル、置換されていてもよい $C_2 \sim 30$ アルケニル、または置換されていてもよい $C_2 \sim 30$ アルキニルであり、

R^c は、後続のヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合、水素、ハロゲン、 $-OR^{c2}$ 、 $-SR^{c3}$ 、置換されていてもよい $C_1 \sim 30$ アルキル、 $C_1 \sim 30$ ハロアルキル、置換されていてもよい $C_2 \sim 30$ アルケニル、置換されていてもよい $C_2 \sim 30$ アルキニル、または置換されていてもよい $C_1 \sim 30$ アルコキシ、アミノ (NH_2)、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、ジヘテロアリールアミノ、アミノ酸、 $-O(CH_2CH_2O)_rCH_2CH_2OR^{c4}$ 、シアノ、アルキル-チオ-アルキル、チオアルコキシ、シクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、 $-NH(CH_2CH_2NH)_sCH_2CH_2-R^{c5}$ 、 $NHC(O)R^{c4}$ 、脂質、脂質に共有結合で取り付けられたリンカー、リガンド、リガンドに共有結合で取り付けられたリンカー、固形支持体、または固形支持体に共有結合で取り付けられたリンカーであり、ここで、任意で、少なくとも R^c または R^b は、後続のヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合であり、

R^{c2} は、水素またはヒドロキシル保護基であり、

R^{c3} は、水素または硫黄保護基であり、

R^{c4} は、出現ごとに独立して、 H 、 $C_1 \sim C_{30}$ アルキル、シクリル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アラルキル、糖または R^{c5} であり、

R^{c5} は、出現ごとに独立して、アミノ (NH_2)、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、またはジヘテロアリールアミノであり、

r は、1~50 であり、

s は、1~50 であり、

R^4 は、水素、置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルキル、置換されていてもよい $C_2 \sim 6$ アルケニル、置換されていてもよい $C_2 \sim 6$ アルキニル、または置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ ア

10

20

30

40

50

ルコキシであるか、

あるいは、 R^4 および R^a は、全体として、 $4'-C(R^{a11}R^{a12})_v-Y-2'$ または $4'-Y-C(R^{a11}R^{a12})_v-2'$ であり、

Y は、 $-O-$ 、 $-CH_2-$ 、 $-CH(Me)-$ 、 $-C(CH_3)_2-$ 、 $-S-$ 、 $-N(R^{a13})-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-N(R^{a13})C(O)-$ 、または $-C(O)N(R^{a13})-$ であり、

R^{a11} および R^{a12} は、独立して、 H 、置換されていてもよい $C_1\sim C_6$ アルキル、置換されていてもよい $C_2\sim C_6$ アルケニルまたは置換されていてもよい $C_2\sim C_6$ アルキニルであり、

R^{a13} は、水素、置換されていてもよい $C_1\sim C_{30}$ アルキル、置換されていてもよい $C_1\sim C_{30}$ アルコキシ、 $C_1\sim C_4$ ハロアルキル、置換されていてもよい $C_2\sim C_4$ アルケニル、置換されていてもよい $C_2\sim C_4$ アルキニル、置換されていてもよい $C_1\sim C_{30}$ アルキル- CO_2H 、または窒素保護基であり、

v は、1、2または3であるか、

あるいは、 R^4 および R^c は、それらが取り付けられている原子と共に全体として、置換されていてもよい $C_3\sim 8$ シクロアルキル、置換されていてもよい $C_3\sim 8$ シクロアルケニル、または置換されていてもよい3～8員ヘテロシクリルを形成し、

R^d は、 $-CH(R^{d1})-R^{d2}$ または $-C(R^{d1})=CHR^{d2}$ であり、

R^{d1} は、水素、置換されていてもよい $C_1\sim C_{30}$ アルキル、置換されていてもよい $C_2\sim C_{30}$ アルケニル、または置換されていてもよい $C_2\sim C_{30}$ アルキニルであり、

R^{d2} は、先行するヌクレオシドへのヌクレオシド間連結部への結合であり、

R^e は、置換されていてもよい $C_1\sim 6$ アルキル- R^{e1} 、置換されていてもよい $C_2\sim 6$ アルケニル- R^{e1} 、または置換されていてもよい $C_2\sim 6$ アルキニル- R^{e1} であり、

R^{e1} は、 $-OR^{e2}$ 、 $-SR^{e3}$ 、 $-P(O)(OR^{e4})_2$ 、 $-P(S)(OR^{e4})_2$ 、 $-P(S)(SR^{e5})(OR^{e4})$ 、 $-P(S)(SR^{e5})_2$ 、 $-OP(O)(OR^{e4})_2$ 、 $-OP(S)(OR^{e4})_2$ 、 $-OP(S)(SR^{e5})(OR^{e4})$ 、 $-OP(S)(SR^{e5})_2$ 、 $-SP(O)(OR^{e4})_2$ 、 $-SP(S)(OR^{e4})_2$ 、 $-SP(S)(SR^{e5})(OR^{e4})$ 、または $-SP(S)(SR^{e5})_2$ であり、

R^{e2} は、水素または酸素保護基であり、

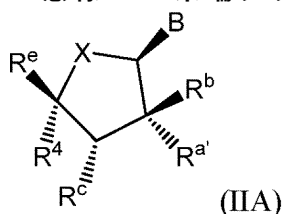
R^{e3} は、水素または硫黄保護基であり、

各 R^{e4} は、独立して、水素、置換されていてもよい $C_1\sim C_{30}$ アルキル、置換されていてもよい $C_2\sim C_{30}$ アルケニル、または置換されていてもよい $C_2\sim C_{30}$ アルキニル、または酸素保護基であり、

および、各 R^{e5} は、独立して、水素、置換されていてもよい $C_1\sim C_{30}$ アルキル、置換されていてもよい $C_2\sim C_{30}$ アルケニル、または置換されていてもよい $C_2\sim C_{30}$ アルキニル、または硫黄保護基である。

【0549】

態様2:5'末端ヌクレオシドが、式(IIA)：



に従うか、または式(II B)：

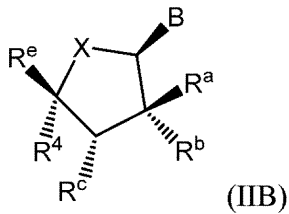
10

20

30

40

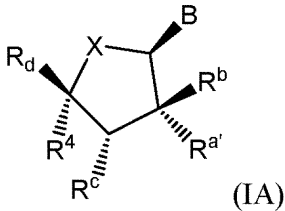
50



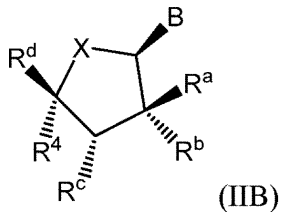
に従う、態様1のオリゴヌクレオチド。

【0550】

態様3: 2'-ジェミナル置換ヌクレオシドが、式(IA)：



に従うか、または式(1B)：



に従う、態様1または2のオリゴヌクレオチド。

【0551】

態様4: Xが0である、態様1~3のいずれか一つのオリゴヌクレオチド。

【0552】

態様5: $R^{a'}$ が、水素、ハロゲン、 $-OR^{a2}$ 、置換されていてもよい $C_1 \sim C_{30}$ アルキル、置換されていてもよい $C_1 \sim C_{30}$ アルコキシ、 $-O(CH_2CH_2O)_mCH_2CH_2OR^{a4}$ 、または $-NH(CH_2CH_2NH)_nCH_2CH_2-R^{a5}$ である、態様1~4のいずれか一つのオリゴヌクレオチド。

【0553】

態様6: $R^{a'}$ が、水素、ハロゲン、 $-OR^{a2}$ 、または置換されていてもよい $C_1 \sim C_{30}$ アルコキシである、態様1~5のいずれか一つのオリゴヌクレオチド。

【0554】

態様7: $R^{a'}$ が、ハロゲン、 $-OR^{a2}$ 、または置換されていてもよい $C_1 \sim C_{30}$ アルコキシである、態様1~6のいずれか一つのオリゴヌクレオチド。

【0555】

態様8: $R^{a'}$ が、F、OHまたは置換されていてもよい $C_1 \sim C_{30}$ アルコキシである、態様1~7のいずれか一つのオリゴヌクレオチド。

【0556】

態様9: $R^{a'}$ が、アミノまたは $C_1 \sim C_6$ アルコキシで置換されていてもよい、 $C_1 \sim C_{30}$ アルコキシである、態様1~8のいずれか一つのオリゴヌクレオチド。

【0557】

態様10: R^b が、置換されていてもよい $C_1 \sim 6$ アルキル、 $C_1 \sim 6$ ハロアルキル、置換されていてもよい $C_2 \sim 6$ アルケニル、または置換されていてもよい $C_2 \sim 6$ アルキニルである、態様1~9のいずれか一つのオリゴヌクレオチド。

【0558】

態様11: R^b が、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、*t*-ブチル、ビニル、エチニル、アリルまたはプロパルギルである、態様1～10のいずれか一つのオリゴヌクレオチド。

【0559】

態様12: R^b が、メチル、ビニル、エチニル、アリルまたはプロパルギルである、態様1～11のいずれか一つのオリゴヌクレオチド。

【0560】

態様13: R^4 が、水素、置換されていてもよい $C_1\sim 6$ アルキル、置換されていてもよい $C_2\sim 6$ アルケニル、置換されていてもよい $C_2\sim 6$ アルキニル、または置換されていてもよい $C_1\sim 6$ アルコキシである、態様1～12のいずれか一つのオリゴヌクレオチド。

10

【0561】

態様14: R^4 が水素である、態様1～13のいずれか一つのオリゴヌクレオチド。

【0562】

態様15: R^d が $-\text{CH}(R^{d1})-X^d-R^{d2}$ である、態様1～14のいずれか一つのオリゴヌクレオチド。

【0563】

態様16: X^d がOである、態様1～15のいずれか一つのオリゴヌクレオチド。

【0564】

態様17: R^{d1} が水素または置換されていてもよい $C_1\sim C_6$ アルキルである、態様1～16のいずれか一つのオリゴヌクレオチド。

20

【0565】

態様18: R^{d6} が水素である、態様1～17のいずれか一つのオリゴヌクレオチド。

【0566】

態様19: R^e が $C_1\sim 6$ アルキル- R^{e1} または $-C_2\sim 6$ アルケニル- R^{e1} であり、 $C_1\sim 6$ アルキルおよび $C_2\sim 6$ アルケニルは置換されていてもよい、態様1～18のいずれか一つのオリゴヌクレオチド。

【0567】

態様20: R^e が $-\text{CH}=\text{CHR}^{e1}$ である、態様1～19のいずれか一つのオリゴヌクレオチド。

【0568】

態様21: R^{e1} が、 $-\text{OR}^{e2}$ 、 $-\text{P}(\text{O})(\text{OR}^{e4})_2$ 、または $-\text{OP}(\text{O})(\text{OR}^{e4})_2$ である、態様1～20のいずれか一つのオリゴヌクレオチド。

30

【0569】

態様22: R^{e2} が水素または置換されていてもよい $C_1\sim C_6$ アルキルである、態様1～21のいずれか一つのオリゴヌクレオチド。

【0570】

態様23: 式(I)の2'-ジェミナル置換ヌクレオシドが、少なくとも、オリゴヌクレオチドの5'端から数えて位置2、3、4、5、6、7、8、9または10のうちの1つにある、態様1～22のいずれか一つのオリゴヌクレオチド。

【0571】

態様24: 式(I)の2'-ジェミナル置換ヌクレオシドが、オリゴヌクレオチドの5'端から数えて位置7にある、態様1～23のいずれか一つのオリゴヌクレオチド。

40

【0572】

態様25: 当該オリゴヌクレオチドに連結されたりガンドをさらに含む、態様1～24のいずれか一つのオリゴヌクレオチド。

【0573】

態様26: 式(I)および(II)の2'-ジェミナル置換ヌクレオシドのみを含む、態様1～25のいずれか一つのオリゴヌクレオチド。

【0574】

態様: 少なくとも1つの修飾ヌクレオシド間27連結部をさらに含む、態様1～26のいずれか一つのオリゴヌクレオチド。

50

【0575】

態様28:少なくとも1つの修飾核酸塩基をさらに含む、態様1～27のいずれか一つのオリゴヌクレオチド。

【0576】

態様29:少なくとも1つの、2'位において修飾されたヌクレオシドを含み、2'位において修飾された該ヌクレオチドが2'-ジェミナルヌクレオシドではない、態様1～28のオリゴヌクレオチド。

【0577】

態様30:前記少なくとも1つの、2'位において修飾されたヌクレオシドが、2'-Fまたは2'-OMeヌクレオシドである、態様1～29のいずれか一つのオリゴヌクレオチド。

10

【0578】

態様31:10～50ヌクレオチド長である、態様1～30のいずれか一つのオリゴヌクレオチド。

【0579】

態様32:5'末端ヌクレオチドが式(II)の2'-ジェミナル置換32ヌクレオチドである、態様1～31のいずれか一つのオリゴヌクレオチド。

【0580】

態様33:固形支持体に連結されている、態様1～32のいずれか一つのオリゴヌクレオチド。

【0581】

態様34:第1オリゴヌクレオチド鎖と該第1鎖に相補的な第2オリゴヌクレオチド鎖とを含み、該第1鎖および/または該第2鎖が態様1～33のいずれか一つのオリゴヌクレオチドである、二本鎖核酸。

20

【0582】

態様35:第1鎖および第2鎖が、独立して、15～25ヌクレオチド長である、態様34の二本鎖核酸。

【0583】

態様36:第1鎖および/または第2鎖がそれぞれの5'端または3'端に1～5ヌクレオチドのオーバーハングを有する、態様34～35のいずれか一つの二本鎖核酸。

【0584】

態様37:第1鎖または第2鎖のうちの一方だけが、その5'端または3'端に2ヌクレオチドの一本鎖オーバーハングを有する、態様34～36のいずれか一つの二本鎖核酸。

30

【0585】

態様38:一方の鎖だけがその3'端に2ヌクレオチドの一本鎖オーバーハンド(overhand)を有する、態様34～37のいずれか一つの二本鎖核酸。

【0586】

態様39:第2鎖が、該第2鎖に連結されたリガンドを含む、態様34～38のいずれか一つの二本鎖核酸。

【0587】

態様40:第1鎖が標的核酸に実質的に相補的であり、二本鎖核酸がRNA干渉を誘導することができる、態様34～39のいずれか一つの二本鎖核酸。

40

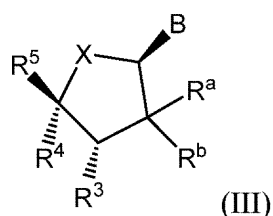
【0588】

態様41:(i)第1鎖が標的遺伝子に相補的である、態様34～40のいずれか一つの二本鎖RNA、または(ii)標的遺伝子に相補的である、態様1～32のいずれか一つのオリゴヌクレオチドのいずれかを、対象に投与する工程を含む、対象における標的遺伝子の発現を低減する方法。

【0589】

態様42:式(III)の化合物:

50



式中、Xは、O、S、C(R^X)₂、またはN(R^{XN})であり、各R^Xは、独立して、水素、ハロゲン、置換されていてもよいC₁~4アルキル、C₁~4ハロアルキル、置換されていてもよいC₂~4アルケニル、または置換されていてもよいC₂~4アルキニルであるか、あるいは両方のR^Xが全体として=O、=S、=N(R^N)、または=CH₂を形成し、R^{XN}は、水素、置換されていてもよいC₁~30アルキル、置換されていてもよいC₁~C₃₀アルコキシ、C₁~4ハロアルキル、置換されていてもよいC₂~4アルケニル、置換されていてもよいC₂~4アルキニル、置換されていてもよいC₁~30アルキル-CO₂H、または窒素保護基であり、Bは、修飾されていてもよい核酸塩基であり、R^aは、水素、ハロゲン、-OR^{a2}、-SR^{a3}、置換されていてもよいC₁~30アルキル、C₁~30ハロアルキル、置換されていてもよいC₂~30アルケニル、置換されていてもよいC₂~30アルキニル、または置換されていてもよいC₁~30アルコキシ、アミノ(NH₂)、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、ジヘテロアリールアミノ、アミノ酸、-O(CH₂CH₂O)_mCH₂CH₂OR^{a4}、シアノ、アルキル-チオ-アルキル、チオアルコキシ、シクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、-NH(CH₂CH₂NH)_nCH₂CH₂-R^{a5}、NHC(O)R^{a4}、脂質、脂質に共有結合で取り付けられたリンカー、リガンド、リガンドに共有結合で取り付けられたリンカー、固形支持体、固形支持体に共有結合で取り付けられたリンカー、または反応性リン基であり、R^{a2}は、水素またはヒドロキシル保護基であり、R^{a3}は、水素または硫黄保護基であり、R^{a4}は、出現ごとに独立して、H、C₁~C₃₀アルキル、シクリル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アラルキル、糖またはR^{a5}であり、R^{a5}は、出現ごとに独立して、アミノ(NH₂)、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、またはジヘテロアリールアミノであり、mは1~50であり、nは1~50であり、R^bは、置換されていてもよいC₁~30アルキル、置換されていてもよいC₂~30アルケニル、または置換されていてもよいC₂~30アルキニルであり、R³は、水素、ハロゲン、-OR^{c2}、-SR^{c3}、置換されていてもよいC₁~30アルキル、C₁~30ハロアルキル、置換されていてもよいC₂~30アルケニル、置換されていてもよいC₂~30アルキニル、または置換されていてもよいC₁~30アルコキシ、アミノ(NH₂)、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、ジヘテロアリールアミノ、アミノ酸、-O(CH₂CH₂O)_rCH₂CH₂OR^{c4}、シアノ、アルキル-チオ-アルキル、チオアルコキシ、シクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、-NH(CH₂CH₂NH)_sCH₂CH₂-R^{c5}、NHC(O)R^{c4}、脂質、脂質に共有結合で取り付けられたリンカー、リガンド、リガンドに共有結合で取り付けられたリンカー、固形支持体、固形支持体に共有結合で取り付けられたリンカー、または反応性リン基であり、R^{c2}は、水素またはヒドロキシル保護基であり、R^{c3}は、水素または硫黄保護基であり、R^{c4}は、出現ごとに独立して、H、C₁~C₃₀アルキル、シクリル、ヘテロシクリル、アリール、ヘテロアリール、アラルキル、糖またはR^{c5}であり、R^{c5}は、出現ごとに独立して、アミノ(NH₂)、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、またはジヘテロアリールアミノであり、rは1~50であり、sは1~50であり、R⁴は、水素、置換されていてもよいC₁~6アルキル、置換されていてもよいC₂~6アルケニル、置換されていてもよいC₂~6アルキニル、または置換されていてもよいC₁~6アルコキシであるか、あるいはR⁴およびR^aは、全体として、4'-C(R^{a11}R^{a12})_v-Y-2'または4'-Y-C(R^{a11}R^{a12})_v-2'であり、Yは、-O-、-CH₂-、-CH(Me)-、-C(CH₃)₂-、-S-、-N(R^{a13})-、-C(O)-、-C(S)-、-S(O)

10

20

30

40

50

-、 $-S(O)_2-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-N(R^{a13})C(O)-$ 、または $-C(O)N(R^{a13})-$ であり、 R^{a11} および R^{a12} は、独立して、H、置換されていてもよい $C_1\sim C_6$ アルキル、置換されていてもよい $C_2\sim C_6$ アルケニルまたは置換されていてもよい $C_2\sim C_6$ アルキニルであり、 R^{a13} は、水素、置換されていてもよい $C_1\sim C_{30}$ アルキル、置換されていてもよい $C_1\sim C_{30}$ アルコキシ、 $C_1\sim 4$ ハロアルキル、置換されていてもよい $C_2\sim 4$ アルケニル、置換されていてもよい $C_2\sim 4$ アルキニル、置換されていてもよい $C_1\sim C_{30}$ アルキル- CO_2H 、または窒素保護基であり、 v は1、2または3であるか、あるいは R^4 および R^c は、それらが取り付けられている原子と共に全体として、置換されていてもよい $C_3\sim 8$ シクロアルキル、置換されていてもよい $C_3\sim 8$ シクロアルケニル、または置換されていてもよい3~8員ヘテロシクリルを形成し、 R^5 は、置換されていてもよい $C_1\sim 6$ アルキル- R^{5a} 、置換されていてもよい $-C_2\sim 6$ アルケニル- R^{5a} 、または置換されていてもよい $-C_2\sim 6$ アルキニル- R^{5a} であり、 R^{5a} は、 $-OR^{5b}$ 、 $-SR^{5c}$ 、水素、リン基、保護されたリン(III)基、固形支持体、または固形支持体へのリンカーであり、ただし、 R^{3a} 、 R^3 および R^5 のうちの1つだけが、固形支持体への連結部であり、 R^{5b} は、Hまたはヒドロキシル保護基であり、および R^{5c} はHまたは硫黄保護基であり、ただし、 R^{3a} 、 R^3 、および R^{5a} のうちの1つだけが、固形支持体、または固形支持体への連結部であり、ただし、 R^{3a} 、 R^3 および R^{5a} のうちの1つだけが、反応性リン(III)であり、ただし、該化合物は、以下の化合物ではない： R^a がFであり、 R^b がメチルであり、 R^3 が $-OR^{c2}$ 、反応性リン(III)基または固形支持体への連結部であり、 R^{c2} が水素またはヒドロキシル保護基であり、 R^4 がHであり、 R^5 が $-CH_2OR^{5b}$ であり、 R^{5b} がH、ヒドロキシル保護基またはリン基であり、かつBが、それぞれ無保護であるか、保護されているか、または修飾されていることができるアデニン、シトシン、グアニンまたはウラシルであるか、あるいは、 R^a がOHであり、 R^b がメチル、ビニルまたはエチニルであり、 R^3 が $-OR^{c2}$ 、反応性リン(III)基または固形支持体への連結部であり、 R^{c2} が水素またはヒドロキシル保護基であり、 R^4 がHであり、 R^5 が $-CH_2OR^{5b}$ であり、 R^{5b} がH、ヒドロキシル保護基またはリン基であり、かつBが、それぞれ無保護であるか、保護されているか、または修飾されていることができるアデニンまたはグアニンである。

10

20

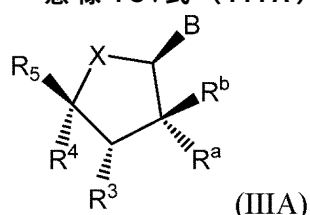
30

40

50

【0590】

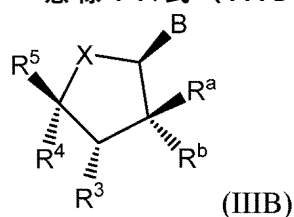
態様43:式(IIIA)の化合物:



である、態様42の化合物。

【0591】

態様44:式(IIIB)の化合物:



である、態様42の化合物。

【0592】

態様45:反応性リン(III)基が、ホスホラミダイト、H-ホスホネート、アルキル-ホスホネート、またはホスフェートトリエステルである、態様42~44のいずれか一つの化合

物。

【0593】

態様46:反応性リン(III)基が、 $-OP(OR^P)N(R^{P2})_2$ 、 $-OP(SR^P)N(R^{P2})_2$ 、 $-OP(O)(OR^P)N(R^{P2})_2$ 、 $-OP(S)(OR^P)N(R^{P2})_2$ 、 $-OP(O)(SR^P)N(R^{P2})_2$ 、 $-OP(O)(OR^P)H$ 、 $-OP(S)(OR^P)H$ 、 $-OP(O)(SR^P)H$ 、 $-OP(O)(OR^P)R^{P3}$ 、 $-OP(S)(OR^P)R^{P3}$ 、または $-OP(O)(SR^P)R^{P3}$ であり、ここで、 R^P は置換されていてもよい $C_1\sim 6$ アルキルであり、各 R^{P2} は、独立して、置換されていてもよい $C_1\sim 6$ アルキルであるか、または両方の R^{P2} が、それらが取り付けられている窒素原子と共に全体として、置換されていてもよい3~8員ヘテロシクリルを形成するか、または R^P と R^{P2} のうちの1つとが、それらが取り付けられている原子と共に全体として、置換されていてもよい4~8員ヘテロシクリルを形成し、および R^{P3} は置換されていてもよい $C_1\sim C_{30}$ アルキル、置換されていてもよい $C_2\sim C_{30}$ アルケニル、または置換されていてもよい $C_2\sim C_{30}$ アルキニルである、態様42~45のいずれか一つの化合物。

10

【0594】

態様47:反応性リン(III)基が $-OP(OR^P)(NR^{P2})_2$ である、態様46の化合物。

【0595】

態様48: R^P が、シアノまたは $-SC(O)Ph$ で置換された、 $C_1\sim 6$ アルキルである、態様46~47の化合物。

【0596】

態様49: R^P が $-CH_2CH_2CN$ である、態様46~48のいずれか一つの化合物。

20

【0597】

態様50:各 R^{P2} が、独立して、メチル、エチル、プロピル、またはイソプロピルである、態様46~49のいずれか一つの化合物。

【0598】

態様51:各 R^{P2} がイソプロピルである、態様46~50のいずれか一つの化合物。

【0599】

態様52: R^{P3} が、置換されていてもよい $C_1\sim C_6$ アルキルである、態様46~51のいずれか一つの化合物。

【0600】

態様53: X が O である、態様42~52のいずれか一つの化合物。

30

【0601】

態様54: R^a が、水素、ハロゲン、 $-OR^{a2}$ 、または置換されていてもよい $C_1\sim C_{30}$ アルコキシである、態様42~53のいずれか一つの化合物。

【0602】

態様55: R^a が、ハロゲン、 $-OR^{a2}$ 、または置換されていてもよい $C_1\sim C_{30}$ アルコキシである、態様42~54のいずれか一つの化合物。

【0603】

態様56: R^a が、 F 、 OH または置換されていてもよい $C_1\sim C_{30}$ アルコキシである、態様42~55のいずれか一つの化合物。

【0604】

態様57: R^a が、アミノまたは $C_1\sim C_6$ アルコキシで置換されていてもよい、 $C_1\sim C_{30}$ アルコキシである、態様42~56のいずれか一つの化合物。

40

【0605】

態様58: R^b が、置換されていてもよい $C_1\sim 6$ アルキル、 $C_1\sim 6$ ハロアルキル、置換されていてもよい $C_2\sim 6$ アルケニル、または置換されていてもよい $C_2\sim 6$ アルキニルである、態様42~57のいずれか一つの化合物。

【0606】

態様59: R^b が、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、 t -ブチル、ビニル、エチニル、アリルまたはプロパルギルである、態様42~58のいずれか一つの化合物。

50

【0607】

態様60:R^bが、メチル、ビニル、エチニル、アリルまたはプロパルギルである、態様42～59のいずれか一つの化合物。

【0608】

態様61:R³が、H、ハロゲン、OR^{c2}、反応性リン基、または固形支持体への連結部である、態様42～60のいずれか一つの化合物。

【0609】

態様62:R³が反応性リン基であるかまたは固形支持体への連結部である、態様42～61のいずれか一つの化合物。

【0610】

態様63:R³が反応性リン(III)基である、態様42～62のいずれか一つの化合物。

【0611】

態様64:R⁴が、水素、置換されていてもよいC₁～₆アルキル、置換されていてもよいC₂～₆アルケニル、置換されていてもよいC₂～₆アルキニル、または置換されていてもよいC₁～₆アルコキシである、態様42～63のいずれか一つの化合物。

【0612】

態様65:R⁴が水素である、態様42～64のいずれか一つの化合物。

【0613】

態様66:R⁵が、置換されていてもよいC₁～₆アルキル-R^{5a}または置換されていてもよいC₂～₆アルケニル-R^{5a}である、態様42～65のいずれか一つの化合物。

【0614】

態様67:R^{5a}が-OR^{5b}またはリン(III)基である、態様42～66のいずれか一つの化合物。

【0615】

態様68:R^{5a}が-OR^{5b}である、態様42～67のいずれか一つの化合物。

【0616】

定義の抜粋

本明細書、実施例および添付の特許請求の範囲において使用される一定の用語を、便宜上、ここに集めておく。別段の言明がある場合または文脈上言うまでもない場合を除き、以下の用語および語句は以下に掲載する意味を包含する。明示的に別段の言明がある場合または文脈から明らかな場合を除き、以下の用語および語句は、その用語または語句が関連技術分野において獲得している意味を排除するものではない。これらの定義は、特定態様の説明を助けるために掲載するのであって、請求項に係る発明を限定しようとするものではない。本発明の範囲は請求項によってのみ限定されるからである。さらに、文脈上別段の必要がある場合を除き、単数形は複数を包含するものとし、複数形は単数を包含するものとする。

【0617】

別段の定義がある場合を除き、本明細書において使用される技術用語および科学用語はすべて、本発明が関係する技術分野の当業者に一般に理解されているものと同じ意味を有する。公知の方法、デバイスおよび材料はいずれも本発明の実施または試験に使用しうが、これに関して、それらの方法、デバイスおよび材料を本明細書に記載する。

【0618】

さらに、本発明の実施には、別段の表示がある場合を除き、当技術分野の技能の範囲内にある分子生物学(組換え技法を含む)、微生物学、細胞生物学、生化学および免疫学の従来技術を使用することができる。そのような技法は、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」, second edition (Sambrook et al., 1989)、「Oligonucleotide Synthesis」(M.J. Gait, ed., 1984)、「Animal Cell Culture」(R.I. Freshney, ed., 1987)、「Methods in Enzymology」(Academic Press, Inc.)、「Current Protocols in Molecular Biology」(F.M. Ausubel et al., eds., 1987および定期更新版)、「PCR: The Polymerase Chain Reaction」, (Mullis et a

10

20

30

40

50

l., ed., 1994)、「A Practical Guide to Molecular Cloning」(Perbal Bernard V., 1988)、「Phage Display: A Laboratory Manual」(Barbas et al., 2001)などの文献に詳述されている。

【0619】

値の範囲が提供されている場合、その範囲の上限と下限との間に介在する各値（文脈上そうでないことが明らかな場合を除きその単位の10分の1まで）と、明記されたその範囲内の他の任意の明記された値または介在する値は、本発明内に包含されると理解される。これら小範囲の上限および下限は、当該小範囲に独立して含まれてもよく、明記された範囲内で特に除外される任意の限界点を除いて、同様に本発明に包含される。明記された範囲が限界点の一方または両方を含む場合、それら含まれた限界点のどちらか一方または両方を除外する範囲もまた、本発明に包含される。

10

【0620】

本明細書では、一定の範囲が、「約」という用語を前置した数値で提示される。本明細書において、「約」という用語は、それが前置されている数字そのものと、この用語が前置されている数字に近いまたはそれを近似する数字とを、字義上サポートするために使用される。数字が具体的に具陳された数字に近いまたはそれを近似する数字であるかどうかの決定において、その近いまたは近似する、具陳されていない数字は、それが提示される文脈において、具体的に具陳された数字の実質的均等物となる数字でありうる。

【0621】

本明細書において使用される用語「comprising」または「comprises」（を含む）は、本発明にとって不可欠な組成物、方法およびそれらの各構成要素に関連して使用されるが、不可欠であるか否かを問わず、指定されていない要素の包含も許容される。

20

【0622】

単数の用語「1つの(a)」、「1つの(an)」および「その(the)」は、文脈上そうでないことが明らかである場合を除き、複数の指示対象を包含する。同様に、「または(or)」という単語は、文脈上明らかにそうではない場合を除き、「および(and)」を包含するものとする。さらに、随意である要素はいずれも除外されるように請求項が起草されうることには注意されたい。したがって、この言明は、請求項の要素の具陳に関連して、「だけ」「のみ」などの排他的表現の使用または「消極的」限定の使用によって、前提となる根拠として役立つものとする。

30

【0623】

本明細書において使用される場合、「アルキル」という用語は、鎖中に1～約60個の炭素原子を有する直鎖または分岐鎖であることができる脂肪族炭化水素基を指し、これは好ましくは鎖中に約6～約50個の炭素を有する。「低級アルキル」とは、1～約8個の炭素原子を有するアルキル基を指す。「高級アルキル」とは、約10～約20個の炭素原子を有するアルキル基を指す。アルキル基は、任意で、同じであることまたは異なることができる1つまたは複数のアルキル基置換基で置換されていてもよく、ここで、「アルキル基置換基」としては、ハロ、アミノ、アリール、ヒドロキシ、アルコキシ、アリールオキシ、アルキルオキシ、アルキルチオ、アリールチオ、アラルキルオキシ、アラルキルチオ、カルボキシ、アルコシカルボニル、オキソおよびシクロアルキルが挙げられる。「分岐」とは、低級アルキル基、例えばメチル、エチルまたはプロピルが線状アルキル鎖に取り付けられているアルキル基を指す。例示的なアルキル基として、メチル、エチル、プロピル、i-プロピル、n-ブチル、t-ブチル、n-ペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル、デシル、ドデシル、トリデシル、テトラデシル、ペンタデシルおよびヘキサデシルが挙げられる。有用なアルキル基としては炭素数6～50の分岐または直鎖アルキル基が挙げられ、これには、炭素数1～約4の低級アルキル基および炭素数約12～約16の高級アルキル基も含まれる。

40

【0624】

「ヘテロアルキル」基では、アルキル基の炭素のいずれか1つが、適当な数の水素原子が取り付けられたヘテロ原子で（例えばCH₂基がNH基またはO基に）置き換わっている

50

。「ヘテロアルキル」という用語には、炭素以外の原子、例えば酸素、窒素、硫黄、リン、ケイ素、またはそれらの組合せから選択される、1つまたは複数の骨格鎖炭素を有する、置換されていてもよいアルキル、アルケニルおよびアルキニル基が包含される。一定の態様において、ヘテロ原子は、ヘテロアルキル基の任意の内部位置に置かれる。例として、 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})_2-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{O}-\text{CH}_3$ 、 $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{N}-\text{OCH}_3$ 、および $-\text{CH}=\text{CH}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$ が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。いくつかの態様では、例えば $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{OCH}_3$ および $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ など、最大2つのヘテロ原子が連続している。

10

【0625】

本明細書において使用される場合、「アルケニル」という用語は、少なくとも1つの炭素-炭素二重結合を含有するアルキル基を指す。アルケニル基は、任意で、1つまたは複数の「アルキル基置換基」で置換されていてもよい。例示的なアルケニル基として、ビニル、アリル、*n*-ペンテニル、デセニル、ドデセニル、テトラデカジエニル、ヘプタデカ-8-エン-1-イルおよびヘプタデカ-8,11-ジエン-1-イルが挙げられる。

【0626】

本明細書において使用される場合、「アルキニル」という用語は、炭素-炭素三重結合を含有するアルキル基を指す。アルキニル基は、任意で、1つまたは複数の「アルキル基置換基」で置換されていてもよい。例示的なアルキニル基として、エチニル、プロパルギル、*n*-ペンチニル、デシニルおよびドデシニルが挙げられる。有用なアルキニル基として低級アルキニル基が挙げられる。

20

【0627】

本明細書において使用される場合、「シクロアルキル」という用語は、炭素原子数が約3～約12個の非芳香族単環式または多環式環系を指す。シクロアルキル基は、任意で、部分不飽和であることができる。シクロアルキル基は、任意で、アリール基置換基、オキソおよび/またはアルキレンで置換されていてもよい。代表的な単環式シクロアルキル環として、シクロペンチル、シクロヘキシルおよびシクロヘプチルが挙げられる。有用な多環式シクロアルキル環として、アダマンチル、オクタヒドロナフチル、デカリン、カンファー、カンファン、およびノルアダマンチルが挙げられる。

30

【0628】

「ヘテロシクリル」とは、単環式なら1～3個、二環式なら1～6個、または三環式なら1～9個の、O、N、またはSから選択されるヘテロ原子（例えば炭素原子と、単環式、二環式または三環式なら、それぞれ1～3、1～6、または1～9個の、N、OまたはSであるヘテロ原子と）を有する、非芳香族3～8員単環式、8～12員二環式、または11～14員三環式環系を指す。 C_x ヘテロシクリルおよび $\text{C}_x\sim\text{C}_y$ ヘテロシクリルが典型的に使用され、ここで、*x*および*y*は、環系内の炭素原子の数を示す。いくつかの態様において、各環の1、2または3個の水素原子を、置換基で置換することができる。例示的なヘテロシクリル基として、ピペラジニル、ピロリジニル、ジオキサニル、モルホリニル、テトラヒドロフラニル、ピペリジル、4-モルホリル、4-ピペラジニル、ピロリジニル、パーヒドロピロリジニル、1,4-ジアザパーヒドロエピニル、1,3-ジオキサニル、1,4-ジオキサニルなどが挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

40

【0629】

「アリール」とは、約3～約13個の炭素原子を含有する芳香族炭素環式基を指す。アリール基は、任意で、同じであるかまたは異なることができる1つまたは複数のアリール基置換基で置換されていてもよく、ここで、「アリール基置換基」としては、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、アラルキル、ヒドロキシ、アルコキシ、アリールオキシ、アラルコキシ、カルボキシ、アロイル、ハロ、ニトロ、トリハロメチル、シアノ、アルコキシカルボニル、アリールオキシカルボニル、アラルコキシカルボニル、アシルオキシ、アシルアミノ、アロイルアミノ、カルバモイル、アルキルカルバモイル、ジアルキ

50

ルカルバモイル、リルチオ (rylthio)、アルキルチオ、アルキレンおよび-NRR'が挙げられ、ここで、RおよびR'は、それぞれ独立して、水素、アルキル、アリールおよびアラールキルである。例示的なアリール基としては、置換または無置換フェニル、および置換または無置換ナフチルが挙げられる。

【0630】

「ヘテロアリール」とは、単環式なら1~3個、二環式なら1~6個、または三環式なら1~9個の、O、N、またはSから選択されるヘテロ原子（例えば炭素原子と、単環式、二環式または三環式なら、それぞれ1~3、1~6、または1~9個の、N、OまたはSであるヘテロ原子と）を有する、芳香族3~8員単環式、8~12員縮合二環式、または11~14員縮合三環式環系を指す。

10

【0631】

例示的なアリールおよびヘテロアリールとして、フェニル、ピリジニル、ピリミジニル、フラニル、チエニル、イミダゾリル、チアゾリル、ピラゾリル、ピリダジニル、ピラジニル、トリアジニル、テトラゾリル、インドリル、ベンジル、ナフチル、アントラセニル、アズレニル、フルオレニル、インダニル、インデニル、ナフチル、テトラヒドロナフチル、ベンゾイミダゾリル、ベンゾフラニル、ベンゾチオフラニル、ベンゾチオフエニル、ベンゾオキサゾリル、ベンゾオキサゾリニル、ベンズチアゾリル、ベンズトリアゾリル、ベンズテトラゾリル、ベンゾイソオキサゾリル、ベンゾイソチアゾリル、ベンゾイミダゾリニル、カルバゾリル、4aHカルバゾリル、カルボリニル、クロマニル、クロメニル、シンノリニル、デカヒドロキノリニル、2H,6H-1,5,2-ジチアジニル、ジヒドロフロ [2,3 b] テトラヒドロフラン、フラニル、フラザニル、イミダゾリジニル、イミダゾリニル、イミダゾリル、1H-インダゾリル、インドレニル、インドリニル、インドリジニル、インドリル、3H-インドリル、イサチノイル、イソベンゾフラニル、イソクロマニル、イソインダゾリル、イソインドリニル、イソインドリル、イソキノリニル、イソチアゾリル、イソオキサゾリル、メチレンジオキシフェニル、モルホリニル、ナフチリジニル、オクタヒドロイソキノリニル、オキサジアゾリル、1,2,3-オキサジアゾリル、1,2,4-オキサジアゾリル、1,2,5-オキサジアゾリル、1,3,4-オキサジアゾリル、オキサゾリジニル、オキサゾリル、オキシンドリル、ピリミジニル、フェナントリジニル、フェナントロリニル、フェナジニル、フェノチアジニル、フェノキサチアニル、フェノキサジニル、フタラジニル、ペペラジニル、ペペリジニル、ペペリドニル、4-ペペリドニル、ペペロニル、プテリジニル、プリニル、ピラニル、ピラジニル、ピラゾリジニル、ピラゾリニル、ピラゾリル、ピリダジニル、ピリドオキサゾール、ピリドイミダゾール、ピリドチアゾール、ピリジニル、ピリジル、ピリミジニル、ピロリジニル、ピロリニル、2H-ピロリル、ピロリル、キナゾリニル、キノリニル、4H-キノリジニル、キノキサリニル、キヌクリジニル、テトラヒドロフラニル、テトラヒドロイソキノリニル、テトラヒドロキノリニル、テトラゾリル、6H-1,2,5-チアジニル、1,2,3-チアジニル、1,2,4-チアジニル、1,2,5-チアジニル、1,3,4-チアジニル、チアントレニル、チアゾリル、チエニル、チエノチアゾリル、チエノオキサゾリル、チエノイミダゾリル、チオフエニルおよびキサンテニルなどが挙げられるが、それらに限定されるわけではない。いくつかの態様では、各環の1、2、3、または4個の水素原子を、置換基で置換することができる。

20

30

40

【0632】

本明細書において使用される場合、「ハロゲン」または「ハロ」という用語は、フッ素、塩素、臭素およびヨウ素から選択される原子を指す。「ハロゲン放射性同位体」または「ハロ同位体」という用語は、フッ素、塩素、臭素およびヨウ素から選択される原子の放射性核種を指す。

【0633】

孤立した基としての、またはより大きな基の一部としての、「ハロゲン置換部分」または「ハロ置換部分」は、本願において定義される用語での、1つまたは複数の「ハロ」原子で置換された、本明細書記載の脂肪族、脂環式、または芳香族部分を意味する。

【0634】

50

「ハロアルキル」という用語は、本明細書において使用される場合、フッ素、塩素 (chlorine)、臭素もしくはヨウ素である少なくとも1つの置換基、またはそれらの組合せを有する、アルキルおよびアルコキシ構造構造を指す。基に2つ以上のハロゲンが含まれている状態では、ハロゲンは同じであるか、または異なる。「フルオロアルキル」および「フルオロアルコキシ」という用語は、ハロがフッ素である、ハロアルキル基およびハロアルコキシ基を、それぞれ包含する。例示的なハロ置換アルキルとして、ハロアルキル、ジハロアルキル、トリハロアルキル、パーハロアルキルなどが挙げられる (例えばハロ置換 ($C_1 \sim C_3$) アルキルとして、クロロメチル、ジクロロメチル、ジフルオロメチル、トリフルオロメチル (CF_3)、パーフルオロエチル、2,2,2-トリフルオロエチル、2,2,2-トリフルオロ-1,1-ジクロロエチルなどが挙げられる)。

10

【0635】

本明細書において使用される場合、「アミノ」用語は $-NH_2$ を意味する。「アルキルアミノ」という用語は、窒素に取り付けられた1つの直鎖または分岐不飽和脂肪族、シクリル、またはヘテロシクリル基を有する窒素部分、例えば $-NH$ (アルキル) を意味する。

「ジアルキルアミノ」という用語は、窒素に取り付けられた2つの直鎖または分岐不飽和脂肪族、シクリル、またはヘテロシクリル基を有する窒素部分、例えば $-N$ (アルキル)

(アルキル) を意味する。「アルキルアミノ」という用語には、「アルケニルアミノ」、「アルキニルアミノ」、「シクリルアミノ」および「ヘテロシクリルアミノ」が包含される。

「アリールアミノ」という用語は、窒素に取り付けられた少なくとも1つのアリール基を有する窒素部分を意味する。例えば、 $-NH$ アリール、および $-N$ (アリール)₂。

20

「ヘテロアリールアミノ」という用語は、窒素に取り付けられた少なくとも1つのヘテロアリール基を有する窒素部分を意味する。例えば、 $-NH$ ヘテロアリール、および $-N$ (ヘテロアリール)₂。任意で、2つの置換基は窒素と共に環を形成することもできる。別段の表示がある場合を除き、アミノ部分を含有する本明細書記載の化合物は、その保護された誘導体を含むことができる。

アミノ部分のための適切な保護基として、アセチル、tertブトキシカルボニル、ベンジルオキシカルボニルなどが挙げられる。例示的なアルキルアミノとして、 NH ($C_1 \sim C_{10}$ アルキル)、例えば $-NHCH_3$ 、 $-NHCH_2CH_3$ 、 $-NHCH_2CH_2CH_3$ 、および $-NHCH(CH_3)_2$ が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

30

例示的なジアルキルアミノとして、 $-N$ ($C_1 \sim C_{10}$ アルキル)₂、例えば $N(CH_3)_2$ 、 $-N(CH_2CH_3)_2$ 、 $-N(CH_2CH_2CH_3)_2$ 、および $-N(CH(CH_3)_2)_2$ が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

【0636】

「アミノアルキル」という用語は、上に定義したアルキル、アルケニル、およびアルキニルにおいて、そのアルキル、アルケニル、またはアルキニルの炭素原子の間に1つまたは複数の置換または無置換窒素原子 ($-N-$) が配置されているものを意味する。例えば、($C_2 \sim C_6$) アミノアルキルとは、2~6個の炭素と、それらの炭素原子の間に配置された1つまたは複数の窒素原子とを含む鎖を指す。

【0637】

「ヒドロキシ」および「ヒドロキシル」という用語は基 $-OH$ を意味する。

【0638】

「アルコキシル」または「アルコキシ」という用語は、本明細書において使用される場合、上に定義したアルキル基に酸素基が取り付けられているものを指し、 $-O-$ アルキル、 $-O-$ アルケニル、および $-O-$ アルキニルのうちの1つによって表すことができる。アロキシ (aroxy) は、 $-O-$ アリールまたは $O-$ ヘテロアリールによって表すことができ、ここでアリールおよびヘテロアリールは本明細書において定義するとおりである。アルコキシ基およびアロキシ基は、アルキルに関して上述したように置換されうる。例示的なアルコキシ基として、 $O-$ メチル、 $O-$ エチル、 $O-n-$ プロピル、 $O-$ イソプロピル、 $O-n-$ ブチル、 $O-$ イソブチル、 $O-sec-$ ブチル、 $O-tert-$ ブチル、 $O-$ ペンチル、 $O-$ ヘキシル、 $O-$ シクロプロピル、 $O-$ シクロブチル、 $O-$ シクロペンチル、 $O-$ シクロヘキシルなどが挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

40

50

【0639】

本明細書において使用される場合、「カルボニル」という用語は基-C(=O)-を意味する。カルボニル基は、さまざまな置換基でさらに置換されて、酸、酸ハライド、アミド、エステル、ケトンなどを含む種々のカルボニル基を形成することに注意されたい。

【0640】

本明細書において使用される場合、「オキソ」という用語は二重結合している酸素、すなわち=Oを意味する。

【0641】

「カルボキシ」という用語は基-C(=O)O-を意味する。カルボキシ部分を含有する本明細書記載の化合物には、その保護された誘導体、すなわち酸素が保護基で置換されているものが含まれることに注意されたい。カルボキシ部分の適切な保護基としてベンジル、tert-ブチルなどが挙げられる。本明細書にいうカルボキシ基には、-COOH、すなわちカルボキシル基が含まれる。

10

【0642】

「エステル」という用語は、式-C(=O)ORを有する化学部分を指し、ここで、Rは、アルキル、シクロアルキル、アリール、ヘテロアリールおよびヘテロシクロアルキルからなる群より選択される。

【0643】

「シアノ」という用語は基-CNを意味する。

【0644】

「ニトロ」という用語は基-NO₂を意味する。

20

【0645】

「ヘテロ原子」という用語は、炭素原子ではない原子を指す。ヘテロ原子の特定例として、窒素、酸素、硫黄およびハロゲンが挙げられるが、それらに限定されるわけではない。「ヘテロ原子部分」には、その部分の取り付けに使われている原子が炭素ではない部分が含まれる。ヘテロ原子部分の例として、-N=、-NR^N-、-N⁺(O⁻)=、-O-、-S-または-S(O)₂-、-OS(O)₂-、および-SS-が挙げられ、ここで、R^NはHまたはさらなる置換基である。

【0646】

「アルキルチオ」および「チオアルコキシ」という用語は、上に定義したアルコキシ基において、酸素原子が硫黄で置き換えられているものを指す。好ましい態様において、「アルキルチオ」部分は、-S-アルキル、-S-アルケニル、および-S-アルキニルのうちの1つによって表される。代表的なアルキルチオ基として、メチルチオ、エチルチオなどが挙げられる。「アルキルチオ」という用語は、シクロアルキル基、アルケンおよびシクロアルケン基、およびアルキン基も包含する。「アリールチオ」は、アリール基またはヘテロアリール基を指す。

30

【0647】

「スルフィニル」という用語は基-SO-を意味する。スルフィニル基は、さまざまな置換基でさらに置換されて、スルフィン酸、スルフィンアミド、スルフィニルエステル、スルホキシドなどを含む種々のスルフィニル基を形成することに注意されたい。

40

【0648】

「スルホニル」という用語は基-SO₂-を意味する。スルホニル基は、さまざまな置換基でさらに置換されて、スルホン酸(-SO₃H)、スルホンアミド、スルホネートエステル、スルホンなどを含む種々のスルホニル基を形成することに注意されたい。

【0649】

「チオカルボニル」という用語は基-C(S)-を意味する。チオカルボニル基は、さまざまな置換基でさらに置換されて、チオ酸、チオアミド、チオエステル、チオケトンなどを含む種々のチオカルボニル基を形成することに注意されたい。

【0650】

「アシル」とはアルキル-CO-基を指し、ここでアルキルは既述のとおりである。例示

50

的なアシル基は炭素原子数が1～約30個のアルキルを含む。例示的なアシル基には、アセチル、プロパノイル、2-メチルプロパノイル、ブタノイルおよびパルミトイルも含まれる。

【0651】

「アロイル」は、アリール-CO基を意味し、ここでアリールは既述のとおりである。例示的なアロイル基として、ベンゾイルならびに1-および2-ナフトイルが挙げられる。

【0652】

「アリールチオ」とはアリール-S-基を指し、ここでアリール基は既述のとおりである。例示的なアリールチオ基として、フェニルチオおよびナフチルチオが挙げられる。

【0653】

「アラルキル」とはアリール-アルキル-基を指し、ここでアリールおよびアルキルは既述のとおりである。例示的なアラルキル基として、ベンジル、フェニルエチルおよびナフチルメチルが挙げられる。

【0654】

「アラルキルオキシ」とはアラルキル-O-基を指し、ここでアラルキル基は既述のとおりである。例示的なアラルキルオキシ基はベンジルオキシである。

【0655】

「アラルキルチオ」とはアラルキル-S-基を指し、ここでアラルキル基は既述のとおりである。例示的なアラルキルチオ基はベンジルチオである。

【0656】

「アルコキシカルボニル」とはアルキル-O-CO-基を指す。例示的なアルコキシカルボニル基として、メトキシカルボニル、エトキシカルボニル、ブチルオキシカルボニル、およびt-ブチルオキシカルボニルが挙げられる。

【0657】

「アリールオキシカルボニル」とはアリール-O-CO-基を指す。例示的なアリールオキシカルボニル基としてフェノキシ-およびナフトキシ-カルボニルが挙げられる。

【0658】

「アラルコキシカルボニル」とはアラルキル-O-CO-基を指す。例示的なアラルコキシカルボニル基はベンジルオキシカルボニルである。

【0659】

「カルバモイル」とは H_2N-CO -基を指す。

【0660】

「アルキルカルバモイル」とは $R'RN-CO$ -基を指し、ここで、RおよびR'のうちの一方は水素であり、RおよびR'のうちの他方は既述のアルキルである。

【0661】

「ジアルキルカルバモイル」とは $R'RN-CO$ -基を指し、ここで、RおよびR'のそれぞれは、独立して、既述のアルキルである。

【0662】

「アシルオキシ」とはアシル-O-基を指し、ここでアシルは既述のとおりである。「アシルアミノ」とはアシル-NH-基を指し、ここでアシルは既述のとおりである。「アロイルアミノ」とはアロイル-NH-基を指し、ここでアロイルは既述のとおりである。

【0663】

「置換されていてもよい」という用語は、指定された基または部分が無置換であるか、あるいは「置換基」の定義において以下に列挙されるまたは他の形で指定される置換基の群から独立して選択される1つまたは複数（典型的には1、2、3、4、5または6個の置換基）で置換されていることを意味する。「置換基」という用語は、置換された基の任意の原子において、置換された基上に「置換された」基を指す。適切な置換基として、ハロゲン、ヒドロキシ、カボキシ（carboxy）、オキソ、ニトロ、ハロアルキル、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルカリール、アリール、ヘテロアリール、シクリル、ヘテロシクリル、アラルキル、アルコキシ、アリールオキシ、アミノ、アシルアミノ、アルキルカ

10

20

30

40

50

ルバノイル (alkylcarbanoyl)、アリールカルバノイル (arylcarbanoyl)、アミノアルキル、アルコキシカルボニル、カルボキシ、ヒドロキシアルキル、アルカンスルホニル、アレーンスルホニル、アルカンスルホンアミド、アレーンスルホンアミド、アラルキルスルホンアミド、アルキルカルボニル、アシルオキシ、シアノまたはウレイドが挙げられるが、それらに限定されるわけではない。いくつかの例において、2つの置換基は、それらが取り付けられている炭素と共に、環を形成することができる。

【0664】

例えば、任意のアルキル、アルケニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル、ヘテロアリールまたはアリールは、OH、CN、-SC(O)Ph、オキソ(=O)、SH、SO₂NH₂、SO₂(C₁~C₄)アルキル、SO₂NH(C₁~C₄)アルキル、ハロゲン、カルボニル、チオール、シアノ、NH₂、NH(C₁~C₄)アルキル、N[(C₁~C₄)アルキル]₂、C(O)NH₂、COOH、COOMe、アセチル、(C₁~C₈)アルキル、O(C₁~C₈)アルキル、O(C₁~C₈)ハロアルキル、(C₂~C₈)アルケニル、(C₂~C₈)アルキニル、ハロアルキル、チオアルキル、シアノメチレン、アルキルアミニル、アリール、ヘテロアリール、置換アリール、NH₂-C(O)-アルキレン、NH(Me)-C(O)-アルキレン、CH₂-C(O)-アルキル、C(O)-アルキル、アルキルカルボニルアミニル、CH₂-[CH(OH)]_m-(CH₂)_p-OH、CH₂-[CH(OH)]_m-(CH₂)_p-NH₂またはCH₂-アリール-アルコキシから選択される1、2、3、4または5個の基で置換されていてもよく、「m」および「p」は、独立して、1、2、3、4、5または6である。

【0665】

いくつかの態様において、置換されていてもよい基は、1個の置換基で置換されている。いくつかの別の態様において、置換されていてもよい基は、同じであることまたは異なることができる2つの独立して選択される置換基で置換されている。いくつかの別の態様において、置換されていてもよい基は、同じであること、異なること、または同じ置換基と異なる置換基の任意の組合せであることができる、3つの独立して選択される置換基で置換されている。いくつかのさらなる別の態様において、置換されていてもよい基は、同じであること、異なること、または同じ置換基と異なる置換基の任意の組合せであることができる、4つの独立して選択される置換基で置換されている。いくつかのさらなる別の態様において、置換されていてもよい基は、同じであること、異なること、または同じ置換基と異なる置換基の任意の組合せであることができる、5つの独立して選択される置換基で置換されている。

【0666】

「イソシアナト」基とはNCO基を指す。

【0667】

「チオシアナト」基とはCNS基を指す。

【0668】

「イソチオシアナト」基とはNCS基を指す。

【0669】

「アルコイルオキシ」(alkoxyloxy)とはRC(=O)O-基を指す。

【0670】

「アルコイル」(alkoyl)とはRC(=O)-基を指す。

【0671】

本明細書において使用される場合、「dsRNA」、「siRNA」および「iRNA剤」という用語は、標的RNA、例えばmRNA、例えばタンパク質をコードする遺伝子の転写産物のサイレンシングを媒介することができる剤を指すために、相互可換的に使用される。そのようなmRNAを、便宜上、本明細書では、サイレンシングされるmRNAともいう。そのような遺伝子は標的遺伝子とも呼ばれる。一般に、サイレンシングされるRNAは内在性遺伝子、外因性遺伝子または病原遺伝子である。加えて、mRNA以外のRNA、例えばtRNAおよびウイルスRNAも、標的になりうる。

【0672】

本明細書において使用される「RNAiを媒介する」という語句は、標的遺伝子、例えば mRNA を、配列特異的にサイレンシングする能力を指す。理論に束縛されることは望まないが、サイレンシングには RNAi 機構または RNAi プロセスとガイド RNA、例えば dsRNA のアンチセンス鎖とが使用されると考えられ、ここで、アンチセンス鎖は 21~23 ヌクレオチド長である。

【0673】

「特異的にハイブリダイズ可能」および「相補的」とは、ある核酸が、伝統的ワトソン・クリックタイプによって、または他の非伝統的タイプによって、別の核酸配列と水素結合を形成できることを意味する。本発明の核酸分子に関して、核酸分子とその相補的配列とに関する結合自由エネルギーは、核酸の関連する機能、例えば RNAi 活性を進行させるのに十分である。核酸分子に関する結合自由エネルギーの決定は当技術分野では周知である（例えば Turner et al, 1987, CSH Symp. Quant. Biol. LII pp.123-133, Frier et al., 1986, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 83:9373-9377, Turner et al., 1987, /. Am. Chem. Soc. 109:3783-3785 を参照されたい）。相補率は、第 2 の核酸配列と水素結合（例えばワトソン・クリック塩基対合）を形成することができる、核酸分子中の連続残基のパーセンテージを示す（例えば 10 残基中の 5、6、7、8、9、10 残基は 50%、60%、70%、80%、90%、および 100% 相補性である）。「完全に相補性」または 100% の相補性とは、核酸配列中の連続残基のすべてが、第 2 の核酸配列中の同じ数の連続残基と水素結合することの意味する。完全でない相補性とは、2 つの鎖のすべてではなく一部のヌクレオシド単位が互いに水素結合できる状況を指す。「実質的相補性」とは、ポリヌクレオチド鎖のうち、非相補的になるように選択された領域、例えばオーバーハングを除いて、90% 以上の相補性を呈するポリヌクレオチド鎖を指す。特異的結合は、特異的結合が望まれる条件下での、すなわちインビボアッセイもしくは治療的処置の場合は生理的条件下での、またはインビトロアッセイの場合はアッセイが行われる条件下での、非標的配列へのオリゴマー化合物の非特異的結合を避けるために、十分な程度の相補性を必要とする。非標的配列は典型的には少なくとも 5 ヌクレオチドが異なる。

【0674】

「オフターゲット」という用語および「オフターゲット効果」という語句は、所与の標的に対するエフェクター分子が、別の標的配列、DNA 配列もしくは細胞タンパク質または他の部分と直接的または間接的に相互作用することによって、意図せぬ効果を引き起こす任意の例を指す。例えば、「オフターゲット効果」は、他の転写産物と siRNA のセンス鎖および/またはアンチセンス鎖との間に部分的な相溶性または相補性があるために当該他の転写産物の同時分解が起こる場合に生じうる。

【0675】

本明細書において使用される場合、「ヌクレオシド」という用語は、核酸塩基と糖とを含むグリコシルアミンを意味する。ヌクレオシドには、天然ヌクレオシド、脱塩基ヌクレオシド、修飾ヌクレオシド、およびミメティック塩基および/または糖基を有するヌクレオシドが含まれるが、それらに限定されるわけではない。

【0676】

本明細書において使用される場合、「ヌクレオチド」という用語は、核酸塩基と、糖に共有結合で連結されたホスフェート基を有する糖とを含む、グリコソミン (glycosamine) を指す。ヌクレオチドはさまざまな置換基のいずれかで修飾されうる。

【0677】

本明細書において使用される場合、「ロクト核酸」または「LNA」または「ロクトヌクレオシド」または「ロクトヌクレオチド」という用語は、ヌクレオシドのフラノース部分が、フラノース環上の 2 つの炭素原子をつなぐ架橋を含むことで二環式の環系を形成しているヌクレオシドまたはヌクレオチドを指す。ロクト核酸は二環式核酸 (BNA) ともいう。

【0678】

本明細書において使用される場合、別段の表示がある場合を除き、「メチレンオキシL

NA」という用語は、単独で、 β -D-メチレンオキシLNAを指す。

【0679】

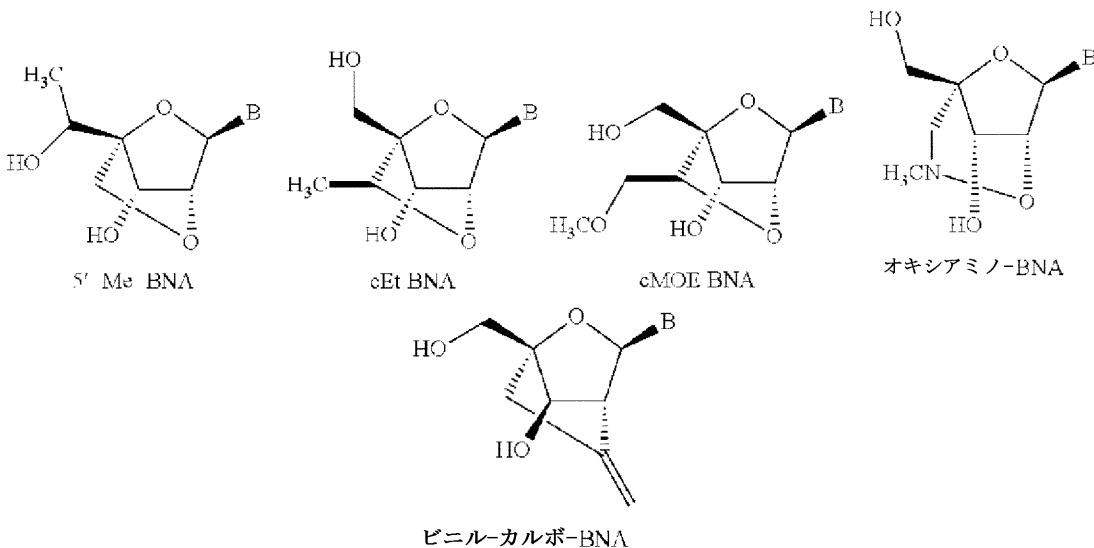
本明細書において使用される場合、「MOE」という用語は、2'-O-メトキシエチル置換基を指す。

【0680】

本明細書において使用される場合、「ギャップマー」(gapmer)という用語は、中央領域(「ギャップ」)と、中央領域の両側にある領域(「ウイング」)とを含み、ギャップが各ウイングの修飾とは異なる修飾を少なくとも1つは含む、キメラオリゴマー化合物を指す。そのような修飾には、核酸塩基、モノマー連結部および糖の修飾、ならびに修飾の不在(無修飾)が含まれる。したがって、一定の態様では、各ウイング中のヌクレオチド連結部が、ギャップ中のヌクレオチド連結部とは異なる。一定の態様において、各ウイングは高アフィニティ修飾を有するヌクレオチドを含み、ギャップはその修飾を含まないヌクレオチドを含む。一定の態様において、ギャップ中のヌクレオチドとウイング中のヌクレオチドはすべて高アフィニティ修飾を含むが、ギャップ中の高アフィニティ修飾はウイング中の高アフィニティ修飾とは異なる。一定の態様において、ウイング中の修飾は互いに同じである。一定の態様において、ウイング中の修飾は互いに異なる。一定の態様において、ギャップ中のヌクレオチドは無修飾であり、ウイング中のヌクレオチドは修飾されている。一定の態様において、各ウイング中の修飾は同じである。一定の態様において、一方のウイング中の修飾は、他方のウイング中の修飾とは異なる。一定の態様において、オリゴマー化合物は、ギャップ中に2'-デオキシヌクレオチドを有し、ウイング中に高アフィニティ修飾を有するヌクレオチドを有する、ギャップマーである。

【0681】

「BNA」という用語は架橋型核酸を指し、拘束された(constrained) RNAまたはアクセス不能な(inaccessible) RNAと呼ばれることも多い。BNAは、「固定された」C_{3'}-エンド型糖パッカリングを持つ5員、6員、さらには7員橋かけ構造を含有することができる。架橋は典型的にはリボースの2',4'位に組み入れられて、2',4'-BNAヌクレオチド(例えばLNAまたはENA)を与える。BNAヌクレオチドの例には以下のヌクレオシドが含まれる:

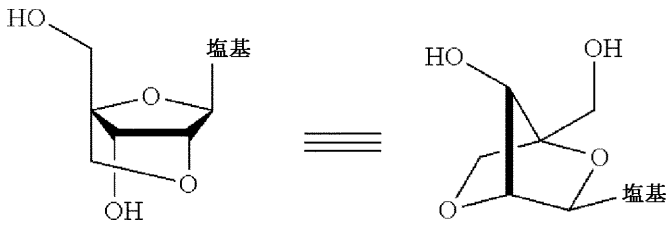


。

【0682】

「LNA」という用語はロックト核酸を指し、拘束されたRNAまたはアクセス不能なRNAと呼ばれることも多い。LNAは修飾RNAヌクレオチドである。LNAヌクレオチドのリボース部分は、2'ヒドロキシルを同じリボース糖の4'炭素につなぐ追加の架橋(例えばメチレン架橋またはエチレン架橋)で修飾されている。例えば、架橋はリボースを3'-エ

ンドNorth) 型立体配座:



に「ロック」することができる。

【0683】

「ENA」という用語はエチレン架橋型核酸（エチレン-架橋型核酸）を指し、拘束されたRNAまたはアクセス不能なRNAと呼ばれることも多い。

【0684】

本明細書にいう「切断部位」とは、iRNA剤を利用することにより、RISC機構によって切断される、標的遺伝子またはセンス鎖中のバックボーン連結部を意味する。また、標的切断部位領域は、切断部位の両側に少なくとも1つまたは少なくとも2つのヌクレオチドを含む。センス鎖の場合、センス鎖自体がRNAi機序によって切断される標的であるなら、切断部位は、センス鎖中の切断されるバックボーン連結部である。切断部位は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられるSoutschek et al., Nature (2004) 432, 173-178に記載の5'-RACEアッセイなど、当技術分野において公知の方法を使って決定することができる。当技術分野ではよく理解されているとおり、2本の21ヌクレオチド長鎖を含むコニカル（conical）二本鎖RNAi剤（ここでは鎖が、3'端に2ヌクレオチドの一本鎖オーバーハングを有する19連続塩基対の二本鎖領域を形成する）の場合、切断部位領域はセンス鎖の5'端から位置9～12に相当する。

【0685】

「減少する」、「低減する」、「低減」または「阻害する」という用語は、いずれも本明細書では、統計的に有意な量の減少を表すために使用される。いくつかの態様において、「低減する」、「低減」または「減少する」または「阻害する」は、典型的には、基準レベル（例えば所与の処置の非存在下）と比較して少なくとも10%の減少を意味し、例えば少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、少なくとも約99%またはそれ以上の減少を含みうる。本明細書において使用される「低減」または「阻害」は、基準レベルと比較して完全な阻害または完全な低減を包含しない。「完全な阻害」とはリファレンスレベルと比較して100%の阻害である。減少は、好ましくは、所与の障害を持たない個体にとって正常範囲内として許容されるレベルまで下がりうる。

【0686】

本明細書において使用される場合、鎖の「末端領域」とは、その鎖の最も近い端から数えて位置1～4、例えば位置1、2、3および4を指す。例えば、5'末端領域とは、鎖の5'端から数えて位置1～4、例えば位置1、2、3および4を指す。同様に、3'末端領域とは、鎖の3'端から数えて位置1～4、例えば位置1、2、3および4を指す。

【0687】

例えば、アンチセンス鎖の5'末端領域は、アンチセンス鎖の5'端から数えて位置1、2、3および4である。アンチセンス鎖の場合、好ましい5'末端領域は、アンチセンス鎖の5'端から数えて位置1、2および3である。アンチセンス鎖の3'末端領域は、鎖の3'端から数えて位置1、2、3、および4であることができる。アンチセンス鎖の場合、好ましい3'末端領域は、アンチセンス鎖の3'端から数えて位置1、2および3である。

【0688】

10

20

30

40

50

同様に、センス鎖の5'末領域は、センス鎖の5'端から数えて位置1、2、3および4である。センス鎖の場合、好ましい5'末領域は、センス鎖の5'端から数えて位置1、2および3である。センス鎖の3'末領域は、鎖の3'端から数えて位置1、2、3、および4であることができる。センス鎖の場合、好ましい3'末領域は、センス鎖の3'端から数えて位置1、2および3である。

【0689】

本明細書にいう鎖の「中央領域」とは、鎖の5'端から数えて位置5～17、例えば位置6～16、位置6～15、位置6～14、位置6～13、位置6～12、位置7～15、位置7～14、位置7～13、位置7～12、位置8～16、位置8～15、位置8～14、位置8～13、位置8～12、位置9～16、位置9～15、位置9～14、位置9～13、位置9～12、位置10～16、位置10～15、位置10～14、位置10～13または位置10～12を指す。例えば、鎖の中央領域とは、鎖の位置5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16または17を意味する。センス鎖の好ましい中央領域は、センス鎖の5'端から数えて位置6、7、8、9、10、11、12、13および14である。センス鎖の、より好ましい中央領域は、センス鎖の5'端から数えて位置7、8、9、10、11、12および13である。アンチセンス鎖の好ましい中央領域は、アンチセンス鎖の5'端から数えて位置9、10、11、12、13、14、15、16および17である。アンチセンス鎖の、より好ましい中央領域は、アンチセンス鎖の5'端から数えて位置10、11、12、13、14、15および16である。

【0690】

本明細書において使用される「インビトロ」という用語は、生物（例えば動物または植物）内ではなく、人工的環境で起こる、例えば試験管または反応槽、細胞培養などにおいて起こる、事象を指す。本明細書において使用される場合、「エクスビボ」という用語は、生きている生物から、その生物の外部に（例えば試験管に）取り出された細胞を指す。本明細書において使用される場合、「インビボ」という用語は、生物（例えば動物、植物、および/または微生物）内で起こる事象を指す。

【0691】

本明細書において使用される場合、「対象」または「患者」という用語は、本明細書において開示する組成物を、例えば実験、診断および/または治療を目的として投与することができる任意の生物を指す。典型的な対象として、動物（例えばマウス、ラット、ウサギ、非ヒト霊長類、およびヒトなどの哺乳動物）および/または植物が挙げられる。通常、動物は、霊長類、齧歯類、家畜または狩猟動物などの脊椎動物である。霊長類としては、チンパンジー、カニクイザル（*cynomologous monkey*）、クモザル、およびマカク、例えばアカゲザルが挙げられる。齧歯類としては、マウス、ラット、ウッドチャック、フェレット、ウサギおよびハムスターが挙げられる。家畜および狩猟動物としては、ウシ、ウマ、ブタ、シカ、バイソン、スイギュウ、ネコ科動物、例えばイエネコ、イヌ科動物、例えばイヌ、キツネ、オオカミ、鳥類、例えばニワトリ、エミュー、ダチョウ、および魚類、例えばマス、ナマズおよびサケが挙げられる。患者または対象には、前記の任意のサブセット、例えば1つまたは複数の群または種、例えばヒト、霊長類または齧歯類を除く、上記のすべてが含まれる。本明細書記載の局面の一定の態様において、対象は哺乳動物、例えば霊長類、例えばヒトである。「患者」および「対象」という用語は、本明細書では可換的に使用される。対象は雄性または雌性であることができる。

【0692】

好ましくは対象は哺乳動物である。哺乳動物は、ヒト、非ヒト霊長類、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウマまたはウシであることができるが、これらの例に限定されない。ヒト以外の哺乳動物は、ヒトの疾患および障害の動物モデルに相当する対象として、有利に使用することができる。加えて、本明細書記載の化合物、組成物および方法は、家畜および/またはペットにも使用することができる。

【0693】

いくつかの態様において、対象はヒトである。別の態様において、対象は実験動物または疾患モデルとしての代用動物である。この用語は特定の年齢または性別を意味しない

10

20

30

40

50

。したがって、成体および新生児である対象、ならびに胎児が、雌雄を問わず包含されるものとする。対象の例として、ヒト、イヌ、ネコ、ウシ、ヤギ、およびマウスが挙げられる。対象という用語は、さらに、トランスジェニック種を包含するものとする。いくつかの態様において、対象はヨーロッパ人の祖先を持つことができる。いくつかの態様において、対象はアフリカ系アメリカ人の祖先を持つことができる。いくつかの態様において、対象はアジア人の祖先を持つことができる。

【0694】

人体に対して実施される方法の特許付与が禁止されている地域において、ヒト対象への組成物の「投与」の意味は、ヒト対象が何らかの技法（例えば経口、吸入、外用適用、注射、挿入など）によって自己投与する規制物質を処方することに制限されるべきである。特許可能な主題を規定する法律または規制に合致する最も広い妥当な解釈が意図される。人体に対して実施される方法の特許付与が禁止されていない地域では、組成物の「投与」に、人体に実施される方法と上述した行為との両方が含まれる。

【0695】

本明細書において使用される場合、「非経口投与」という用語は、注射または注入による投与を指す。非経口投与には、皮下投与、静脈内投与、または筋肉内投与が含まれるが、それらに限定されるわけではない。

【0696】

本明細書において使用される場合、「皮下投与」という用語は、皮膚直下への投与を指す。「静脈内投与」は静脈中への投与を意味する。

【0697】

本明細書において使用される場合、「用量」という用語は、1回の投与で与えられる薬学的作用物質の指定された量を指す。一定の態様において、用量は、2以上のボラス、錠剤または注射で投与されうる。例えば、皮下投与が望まれる一定の態様では、望ましい用量が、1回の注射に容易には収まらない体積を必要とする。そのような態様では、所望の用量を達成するために、2回以上の注射が使用されうる。一定の態様において、用量は、個体における注射部位反応を最小限に抑えるために、2回以上の注射で投与されうる。

【0698】

本明細書において使用される場合、「投与単位」という用語は、薬学的作用物質が提供される形態を指す。一定の態様において、投与単位は、凍結乾燥された本明細書記載のオリゴヌクレオチドまたは二本鎖オリゴヌクレオチドを含むバイアルである。一定の態様において、投与単位は、再構成された本明細書記載のオリゴヌクレオチドまたは二本鎖オリゴヌクレオチドを含むバイアルである。

【0699】

本開示は本明細書において提供される特定の方法、プロトコールおよび試薬に限定されず、したがってさまざまでありうると理解すべきである。本明細書において使用される術語には、特定の態様を説明する目的しかなく、本願の請求項によってのみ画定される本開示の範囲を限定する意図はない。以下に実施例を挙げて本発明をさらに例示するが、これらの実施例をさらなる限定であると解釈すべきではない。

【実施例】

【0700】

実施例1: 2'-デオキシ-2'- α -F-2'- β -C-メチルピリミジンヌクレオチドを有する siRNA: 5'-ホスフェートミミックとシード領域媒介オフターゲット軽減との相乗作用による、熱および代謝安定性の調整、RNAi 活性の改良

2'-デオキシ-2'- α -F-2'- β -C-メチル (2'-F/Me) ウリジンヌクレオシド誘導体は、抗ウイルス薬のクラスとして成功を収めているが、この修飾はオリゴヌクレオチドでは研究されていなかった。本明細書において、本発明者らは、2'-F/Me 修飾ピリミジンホスホラミダイトの容易な合成と、それに続くオリゴヌクレオチドへの組み入れを実証する。親ヌクレオシドの C3' エンド前組織化 (preorganization) にも関わらず、RNA または DNA への単一の組み入れは、たぶん立体効果に起因する不利なエンタルピーにより、

10

20

30

40

50

二重鎖の有意な熱不安定化をもたらした。2'-F/Me修飾は、それがオリゴヌクレオチドの末端に位置する場合には、対応する2'-Fヌクレオチドを上回る、分解への耐性を付与した。一定の位置が2'-F/Meで修飾された低分子干渉RNA (siRNA) は、脂質ナノ粒子によって送達するか、またはGalNAcコンジュゲートとして送達した場合に、最適化された親siRNAとの比較で、類似するまたはより良いサイレンシング活性を有した。アンチセンス鎖のシード領域中、位置6または位置7における修飾は、親と等価な活性をもたらした。アンチセンスの位置7における置き換えは、シードに基づくオフターゲット効果を軽減した。2'-F/Me修飾は、5' ビニルホスホネートE異性体と組み合わせた場合に、親と比較して、サイレンシングを強化し、Z異性体と組み合わせた場合は同等だった。これは、Z異性体活性の同等性を初めて実証したものであり、これはおそらく、C-メチル含有糖環の立体的およびコンフォメーション的特徴によるのだろう。これらのデータは、2'-F/Meヌクレオチドが、核酸に基づく治療的応用にとって、効力、持続時間および安全性を増加させるための、有望なツールであることを示している。

10

【0701】

RNA干渉 (RNAi) は、低分子干渉RNA (siRNAs) によって媒介される、遺伝子調節のための転写後経路である^{1~3}。RNA誘導サイレンシング複合体 (RISC) の触媒構成要素であるアルゴノート2 (Ago2) に積み込まれたsiRNAは、相補的mRNAを分解の標的とする⁴。これは、コードされているタンパク質の発現を低減させる。合成siRNAは基礎研究にとって強力なツールであり、遺伝性トランスサイレチン媒介性アミロイドーシス、急性肝性ポルフィリン症、原発性高シュウ酸尿症1型、およびヘテロ接合性家族性高コレステロール血症を含む複数の疾患の処置に、臨床的にも使用されている^{5~19}。臨床使用の場合、siRNAは脂質ナノ粒子 (LNP) 中に製剤化されるか¹³、またはアシアロ糖タンパク質受容体による肝細胞特異的送達をもたらすトリ-N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) とコンジュゲートされる²⁰。臨床的に使用されるsiRNAには、効力を改良し、代謝安定性を増加させ、免疫応答を回避し、オフターゲット効果を軽減するために、化学修飾も加えられる^{21~22,23}。臨床的に承認されたsiRNAにおいて現在使用されている化学修飾は、DNA、2'-フルオロ (2'-F)、および2'-O-メチル (2'-OMe) である。これらの修飾は、5'末および3'末におけるホスホロチオエートと組み合わせると、十分な特異性および代謝安定性を与えて、インビボで優れた安全性および有効性プロファイルをもたらす。

20

30

【0702】

化学修飾2'-Fおよび2'-OMeは、RNA様C3'エンドコンフォメーションに前組織化することで、親リボヌクレオチドとの比較で、RNAへの結合の強化、Ago2への有利な結合、およびヌクレアーゼ分解に対する耐性の増加をもたらす^{24~25}。本発明者らは、C3'エンドコンフォメーションに前組織化される他のヌクレオシドを使用することでsiRNA活性が最適化されるかもしれないと考えた。C3'エンドコンフォメーションは、2'-デオキシ-2'- α -C-メチルチミジンの場合のように糖をアルキル化すると有利になる^{26~28}。2'-C-メチルウリジンヌクレオシドでは、2'-Cメチル置換基が、立体相互作用ゆえに擬エクアトリアルコンフォメーションをとり、C2'-OH基は安定化O4'-O2'ゴーシュ効果を有し、C-5'側鎖は擬エクアトリアルであり、塩基は擬アキシャルであって、弱いアノマー効果を満たす^{12,29}。糖アルキル化ヌクレオシドはC型肝炎ウイルス (HCV) に対する抗ウイルス作用物質として使用するために開発された^{25,30~32}。HCVの処置に関してFDAの承認を受けた最初のリボヌクレオチド類似体阻害薬であるソホスブビル^{33~38}は、2'-デオキシ-2'- α -C-F-2'- β -C-Me (2'-F/Me) ウリジントリホスフェートのプロドラッグである (図16)。2'-F/Meウリジントリホスフェートは、たぶん2'位周辺の立体的嵩高さゆえに、ヒトミトコンドリアポリメラーゼの基質として作用しない³⁹。

40

【0703】

2'-F/MeヌクレオチドのC3'エンド糖コンフォメーションの占有率の増加、ミトコンドリア毒性の欠如、および代謝安定性が増加する可能性により、これは、RNAi応用にとって興味深い修飾になる。ミトコンドリア毒性の欠如は特に重要である。というのも、2

50

2'-F修飾は、極めて高い濃度では、多少の安全性リスクを有するからである⁴⁰。RNAiでは、アンチセンス鎖の5'末における、(E) ビニルホスホネート (VP) などといった、非加水分解性で代謝的に安定な5'ホスフェートミミックにより、センス鎖と比べてこの鎖の、Ago2のMIDドメインによる選択的認識が可能になり、それが効力の改良をもたらす^{22,41~47}。ハイブリダイゼーションに基づくオフターゲット効果は、適正な鎖の選択を保証する機序によって、またはグリコール核酸 (GNA) のような不安定化修飾の適切な組み入れによって、軽減することができる⁴⁸。本明細書において、本発明者らは、2'-F/Meピリミジンホスホラミダイトの合成と、この修飾が、siRNAの二重鎖の熱安定性、エキソヌクレアーゼ分解に対する耐性、ならびにRNAiオン-およびオフ-ターゲット活性に及ぼす効果とを記載する。本発明者らの観察結果は、適当な核酸-タンパク質相互作用の分子モデリングを使って合理的に説明された。

10

【0704】

結果および考察

2'-F/Me-ピリミジンを含有するRNAオリゴヌクレオチドの合成。スキーム1に示すように、2'-F/Meピリミジンホスホラミダイト (3および6) を、対応する市販のヌクレオシド (1および4) から、5'位には4,4'-ジメトキシトリチル基、シトシン塩基の環外アミンにはベンゾイル基による、標準的ヌクレオシド保護と、ホスフィチル化とを使って合成した (スキーム1)。ビス-ピバロイルオキシメチルビニルホスホネート7は、他のヌクレオシドのために本発明者らの研究室で開発された方法を使って合成された^{22,41~47}。3'-ヒドロキシ基の脱シリル化後に、ジアステレオマーの混合物 (E/Z $\approx$ 5/1)

20

を純粋な異性体8および9に分離した。これらのヌクレオシドモノマーの3'-ヒドロキシ基をホスホロアミダイト型に変換した (スキーム1、詳細については補足情報を参照されたい)。自動合成装置を使って、ホスホロアミダイトビルディングブロックを、オリゴヌクレオチド中に部位特異的に組み入れた。合成されたオリゴヌクレオチドの固形支持体からの切断とそれに続く脱保護は、水酸化アンモニウム溶液を使った標準的条件下で行った。粗オリゴヌクレオチドをHPLCで精製し、LC-MSによって特性解析した (詳細については補足情報を参照されたい)。

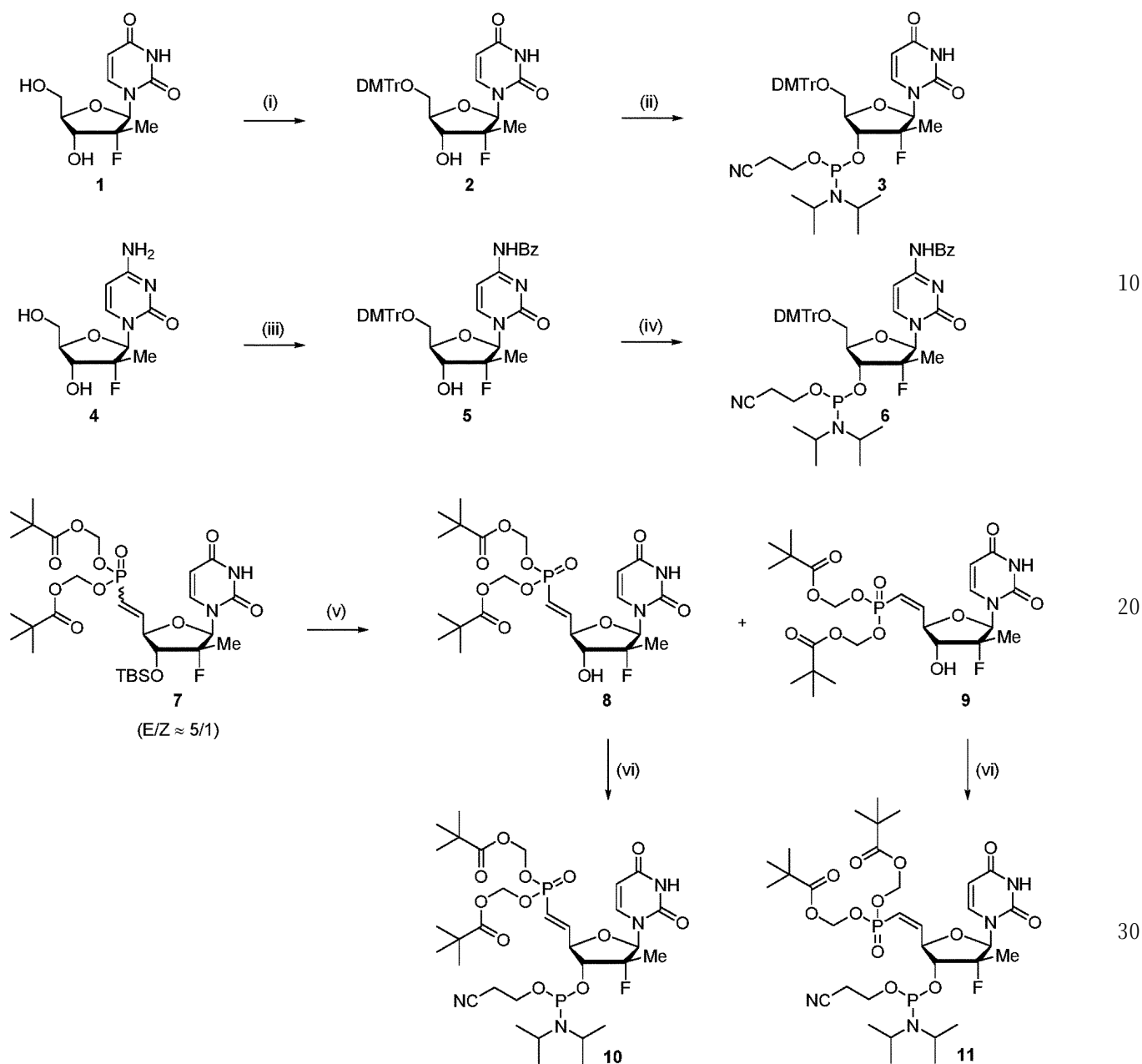
30

【0705】

スキーム1. 2'-F/Me-ピリミジンビルディングブロックの合成

40

50



試薬および条件: (i) DMTrCl/ピリジン、室温、16時間、61%、(ii) 2-シアノエチルN,N-ジイソプロピルクロロホスホラミダイト/DIPEA/CH₂Cl₂、室温、16時間、90%、(iii) Bz₂O/DMF、室温、24時間、次に、DMTrCl/ピリジン、室温、16時間、74%、(iv) 2-シアノエチルN,N,N',N'-テトライソプロピルホスホロジアミダイト/4,5-ジシアノイミダゾール/CH₂Cl₂、室温、16時間、95%、(v) HCOOH/H₂O、40℃、16時間、8:60%、9:12%、(vi) 2-シアノエチルN,N,N',N'-テトライソプロピルホスホロジアミダイト/5-エチルチオ-2H-テトラゾール/CH₃CN、室温、2時間、10:74%、11:75%。

【0706】

2'-F/Me-ピリミジンヌクレオチドで修飾されたRNA鎖を含有する二重鎖の熱力学的安定性。中央に位置する単一の修飾を含有する12マーRNA二重鎖のハイブリダイゼーションの融解温度(T_m)および熱力学的パラメータを評価した(表4)。2'-F-修飾UまたはC(それぞれU_FおよびC_F)を含有する二重鎖は、無修飾RNA二重鎖と比較して、類似するまたはわずかに増加したT_mを有した(ON3:2およびON5:2対ON1:2)。しかし、2'-F/Me修飾ヌクレオチド(U_F/MeおよびC_F/Me)の組み入れは、T_mを、無修飾RNA二重

鎖との比較で約15℃、劇的に低減させた。この不安定化には配列依存性はほとんどないようであった。というのも、それは、それぞれON4:2またはON6:2におけるG:CまたはU:Aに隣接する $U_{F/Me}:A$ および $C_{F/Me}:G$ のどちらの塩基対にも観察されたからである。このパターンの熱安定性の減少は、RNA:DNAおよびDNA:DNA二重鎖においても観察され、この場合は、高塩濃度(1M NaCl、PBS、pH7.4)下でさえ、明確な転移が見られなかった(表9)。特に、 $U_{F/Me}$ と相補的DNA鎖とを含有する二重鎖の場合、融解曲線の形状は極めて幅広かった。

【0707】

(表4) 2'-Fまたは2'-F/Meを含有するRNA鎖による二重鎖の熱変性温度および熱力学的パラメータ^a

ON	配列	T_m [°C]	ΔT_m [°C]	ΔG_{310} [kJ/mol]	ΔH [kJ/mol]	$T_{310}\Delta S$ [kJ/mol]
1	5'-r(UACAGUCUAUGU)	54.1		-58 ± 0	-453 ± 6	-395 ± 6
2	3'-r(AUGUCAGAUACA)					
3	5'-r(UACAGU _F CUAUGU)	53.9	-0.2	-60 ± 0	-449 ± 4	-388 ± 3
2	3'-r(AUGUCAGAUACA)					
4	5'-r(UACAGU _{F/Me} CUAUGU)	39.1	-15.0	-38 ± 0	-343 ± 6	-304 ± 6
2	3'-r(AUGUCAGAUACA)					
5	5'-r(UACAGUC _F UAUGU)	55.1	+1.1	-61 ± 0	-444 ± 3	-383 ± 3
2	3'-r(AUGUCAGAUACA)					
6	5'-r(UACAGUC _{F/Me} UAUGU)	38.3	-15.8	-38 ± 1	-347 ± 7	-309 ± 7
2	3'-r(AUGUCAGAUACA)					

^a ハイブリダイズした二重鎖(2.5□M)の260nmにおける吸光度を低塩濃度PBS(137 mM NaCl、2.7 mM KCl、10 mM Na₂HPO₄、1.8 mM KH₂PO₄、pH7.4)中、温度の関数として決定した。 T_m は融解曲線の一次導関数の極大として決定した。値を2回の独立した実験の平均として報告する。 ΔT_m は無修飾RNA二重鎖に対して算出した。熱力学的パラメータはVarian Cary Bio-300ビルトインソフトウェアを使った6回の決定の平均であり、標準偏差と共に報告する。

【0708】

熱力学的パラメータは、融解曲線の濃色効果に基づくファントホッフ法を使って得た(表4)。修飾RNA鎖と相補的RNAとから形成された二重鎖は比較的シャープな転移を有するので(図24A~図24D)、二状態モデルの仮定が支持される⁴⁹。ハイブリダイゼーションのギブス自由エネルギーの変化は、2'-F/Me修飾が二重鎖の熱安定性を有意に低減することを示す T_m 値に見られる傾向とよく似ている。RNA二重鎖と2'-F修飾二重鎖はどちらも熱力学的に有利であり、 ΔG_{310} 値がおおよそ-60 kJ/molであったのに対し、2'-F/Me修飾鎖から形成されるものは、無修飾RNAと比較して、約20 kJ/mol不利であった(ON1:2とON4:2およびON6:2を比較されたい)。2'-F/Me修飾二重鎖の安定性の低減は、その大部分が有利なエントロピー寄与によって相殺される不利なエンタルピー寄与によるもののようである。 $U_{F/Me}$ および $C_{F/Me}$ は、RNAへの結合のために前組織化されたC3'エンド糖パッカーをとるが、不安定化は、有利なエンタルピー寄与をもたらす他の相互作用(例えば塩基対合、スタッキング)が損なわれることを示唆している。

【0709】

2'-F/Me-ピリジンヌクレオチドで修飾されたRNAオリゴヌクレオチドによるミスマッチ識別。次に、修飾ヌクレオチドを含有する二重鎖中の一塩基ミスマッチを熱的に識別する能力を評価した(表5)。 U_F (ON3)または $U_{F/Me}$ (ON4)のどちらかを含有するRNA鎖と、ウリジン誘導体による単一ミスマッチ(ON7、ON8、またはON9)、または修飾ヌクレオチドの3'側にあるミスマッチ(ON10、ON11、ON12)を除けば相補的であるRNA鎖との間で、二重鎖を形成させた。本発明者らは、 C_F (ON5)または $C_{F/Me}$ (

ON6) を含有するRNA鎖と、修飾ヌクレオチドに対するミスマッチをもたらすON10ならびに二重鎖ON11およびON12との間、および修飾ヌクレオチドの5'側にミスマッチをもたらす二重鎖ON7、ON8およびON9との間で形成される二重鎖も評価した。ミスマッチが引き起こす融解温度の低下ゆえに、これらの二重鎖を高塩濃度緩衝液において評価すると、カノニカルRNA二重鎖と2'-Fヌクレオチドを含有する二重鎖はどちらも、修飾に対するミスマッチの近さに関わらず、優れた類似の熱的識別を呈した(表5)。

【0710】

(表5) 一塩基対ミスマッチを含有する修飾二重鎖の熱変性温度^a

修飾鎖	$T_m(^{\circ}\text{C})$		$\Delta T_m(^{\circ}\text{C})$							
	ON2		3'-AUGUCBGAUACA				3'-AUGUCABAUACA			
	ON2		ON7	ON8	ON9	ON10	ON11	ON12		
ON1	5'-UACAGUCUAUGU	61.6	G	U	C	C	U	A		
ON3	5'-UACAGU _F CUAUGU	62.2	-1.5	-11.4	-11.9	-21.1	-18.6	-18.5		
ON4	5'-UACAGU _{FMe} CUAUGU	47.1	-2.0	-12.4	-12.9	-21.1	-19.5	-18.9		
ON5	5'-UACAGUC _F UAUGU	63.1	-2.6	-5.1	-8.0	-16.4	-15.8	-12.7		
ON6	5'-UACAGUC _{FMe} UAUGU	45.2	-2.6	-12.1	-12.0	-21.9	-19.8	-19.7		
			0.0	-9.9	-13.9	-15.7	-13.3	-13.1		

^a T_m は、ハイブリダイズした二重鎖 (2.5 μM) の吸光度を、高塩濃度PBS (932 mM

NaCl、18.4mM KCl、68mM Na₂HPO₄、12.2mM KH₂PO₄、pH7.4) 中で、昇温しながらモニターすることによって測定した。ΔT_mは、対応する相補的二重鎖 (ON1:ON2) に対して算出される。

【0711】

U_F/Meがグアノシンの真向いに位置する場合 (ON4:ON7)、識別は、無修飾RNAと比較して、G:Uゆらぎに関して、およそ1°C増加したが (ON4:ON7対ON1:ON7)、他のミスマッチは無修飾RNAより識別の程度が低かった。興味深いことに、識別の低減は、3'隣接塩基対に伝播したことから (例えばON4:ON10、ON4:ON11、ON4:ON12)、修飾が引き起こす局所的ひずみが、近くのミスマッチに対する許容性を増加させることが示唆された。C_F/Meは、修飾ヌクレオチドの真向いに位置するミスマッチした核酸塩基の熱的識別を、無修飾RNAと比較して約5°C、低減した (例えばON6:ON10、ON6:ON11、ON6:ON12)。熱的識別のこの喪失は、ミスマッチが5'側にある場合にはおおむね回復したことから (例えばON6:ON7、ON6:ON8、ON6:ON9)、2'-F/Meピリミジンは、二重鎖を3'方向に非対称的にかく乱することが示唆された。ミスマッチの識別の低減があってもなお、著しく低い絶対的融解温度が、37°Cという生物学的に意味のある温度におけるハイブリダイゼーションの総合的特異性を増加させる可能性が高いことは、注目に値する。

【0712】

2'-F/Me修飾を有するオリゴヌクレオチドのエキソヌクレアーゼ媒介分解。2'-F/Me修飾が代謝安定性に及ぼす影響を評価するために、末端修飾ポリ-dTオリゴヌクレオチドを、3'または5'エキソヌクレアーゼの存在下でインキュベートした。末端または末端から2番目の位置に単一の2'-Fまたは2'-F/Me残基を含有する、完全ホスホジエステル (PO) バックボーンを持つオリゴヌクレオチド (ON13、ON15およびON15) は3'エキソヌクレアーゼヘビ毒ホスホジエステラーゼ (SVPD) の存在下で1時間以内に分解された (図25A~図25D)。二重に修飾された修飾ON15 (U_F/Me) and ON15 (C_F/Me) は、それぞれおよそ1時間および2時間のt_{1/2}値を有した (表6)。単一のホスホロチオエート (PS) 連結部とU_F/MeまたはC_F/Meのどちらかとを有するオリゴヌクレオチドは、対応する2'-F-修飾オリゴヌクレオチドよりも、SVPD触媒分解に対する耐性が明らかに高く (ON14対ON13およびON17対ON16)、PS連結部を介してつながれた2つの2'-F/Meピリミジンヌクレオチドは、さらなる安定化効果を有した (表6)。

【0713】

(表6) 3'エキソヌクレアーゼSVPDと共にインキュベートされたオリゴヌクレオチドの半減期^a

X =	3'-エキソヌクレアーゼ存在下での t _{1/2} (h)					
	ON13(X) dT ₁₉ X	ON14(X) dT ₁₈ XdT	ON15(X) dT ₁₈ XX	ON16(X) dT ₁₉ •X	ON17(X) dT ₁₈ X•dT	ON18(X) dT ₁₈ X•X
U _F	<0.2	<0.2	<0.2	79	10	29
U _F /Me	0.2	0.2	0.9	3.2	no deg.	27
C _F	<0.2	<0.2	<0.2	19	12	24
C _F /Me	0.6	<0.2	2.0	1.6	31	15

^a半減期は、時間に対して完全長オリゴヌクレオチドのパーセントをプロットして、指数減衰関数にフィッティングすることによって決定した。実験条件については図2を参照されたい。PS連結部、•; no deg.、24時間以内に分解は観察されなかった。

【0714】

ホスホジエステラーゼII (PDII) による5'エキソヌクレアーゼ媒介性分解に対する5'-修飾オリゴヌクレオチドの安定性も評価した (表7)。完全POバックボーンを持つオリゴヌクレオチド (ON19) の場合、U_F/Meによる安定化は、U_Fよりわずかに強かった。シチジン誘導体の場合、2'-F/Meの利益は著しかった。単一の末端C_F/Me修飾を有するオリゴヌクレオチドでは24時間後に25%の分解しか観察されなかったのに対し、末端C_F

を有するオリゴヌクレオチドは1時間以内に完全に分解された（ON19（C_F/Me）対ON19（C_F）；図26A～図26D）。末端PS連結部の追加（ON21）は、C_F/MeまたはC_Fのどちらかで修飾されたオリゴヌクレオチドを、分解に対して完全に安定化した。これは、以前に記されているように⁵⁰、この特定酵素の基質優先性を反映しているのだろう。要約すると、U_F/MeおよびC_F/Meは、U_FおよびC_Fよりも良い5'-エキソヌクレアーゼ保護を与える。

【0715】

（表7）5'-エキソヌクレアーゼPD IIと共にインキュベートされた修飾オリゴヌクレオチドの半減期^a

X =	5'-エキソヌクレアーゼ存在下での $t_{1/2}$ (h)					
	ON19(X)	ON20(X)	ON21(X)	(X)ON22	(X)ON23	(X)ON24
	XdT ₁₉	dTXdT ₁₈	XXdT ₁₈	X•dT ₁₉	dT•XdT ₁₈	X•XdT ₁₈
U _F	<0.2	<0.2	<0.2	32	17	43
U _F /Me	0.9	0.6	1.8	no deg.	50	no deg.
C _F	<0.2	n.d.	0.3	no deg.	n.d.	5.8
C _F /Me	55	n.d.	260	no deg.	n.d.	no deg.

^a半減期（ $t_{1/2}$ ）は、時間に対して完全長オリゴヌクレオチドのパーセントをプロットして、指数減衰関数にフィッティングすることによって決定した。実験条件については図3を参照されたい。n.d.、未決定；no deg.、24時間以内に分解は観察されなかった。

【0716】

2'-F/Meヌクレオチドで修飾されたsiRNAのインビトロRNAi活性。次に、4つの異なるmRNA:Ttr、Pten、apo-BおよびF7を標的とすることによる細胞培養における肝臓特異的遺伝子サイレンシングについて、2'-F/Me修飾を有するsiRNAを評価した（表8）。Ttr mRNAを標的とする修飾siRNAでは、アンチセンス鎖の3'末および5'末における2'-F/Me修飾の効果を問うた（表8および図17A）。証拠は、RISCへのsiRNAの効率の良い積み込みと、それに続くAgo2による標的mRNAの切断には、アンチセンス鎖の5'リン酸化が必要であることを示している^{43,51}。5'末近くの修飾はリン酸化を邪魔しうるので⁵²、アンチセンス鎖の位置1に2'-F/Me修飾を有するsiRNAを、あらかじめ導入された（pre-installed）5'ホスフェート基または5'-OHのどちらかで評価した。2'-OMeで修飾された親siRNAの有効性はホスフェート基の存在に依存しなかった（si1とsi2を比較されたい）。あらかじめ導入されたホスフェートが存在しない位置1におけるU_F/Meによる修飾（si3）は活性の低減をもたらし、それは、鎖を5'ホスフェート（si4）または5'-(E)-VP（si5）で修飾するとおおむね回復した。驚いたことに、5'-(Z)-VP（si6）もRNAi活性を強化した。アンチセンス鎖の3'末にU_F/Meを一つまたは二つ組み入れることは十分に許容され、活性は親と類似していた（si7およびsi8とsi2とを比較されたい）。

【0717】

（表8）2'-F/Me修飾を有するおよび有しないGalNAcコンジュゲートsiRNAのインビトロ有効性

10

20

30

40

50

siRNA	標的	鎖	配列 (5'→3')	IC ₅₀ (pM)
si1	<i>Ttr</i>	S	A [•] a [•] CfaGfuGfuUfCfUfuGfcUfcUfaUfaAf [*] u [•] Uf [•] aUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfu [•] u	11±4
si2	<i>Ttr</i>	S	A [•] a [•] CfaGfuGfuUfCfUfuGfcUfcUfaUfaAf [*] Pu [•] Uf [•] aUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfu [•] u	7±3
si3	<i>Ttr</i>	S	A [•] a [•] CfaGfuGfuUfCfUfuGfcUfcUfaUfaAf [*] U _{F/Mc} [•] Uf [•] aUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfu [•] u	33±17
si4	<i>Ttr</i>	S	A [•] a [•] CfaGfuGfuUfCfUfuGfcUfcUfaUfaAf [*] PU _{F/Mc} [•] Uf [•] aUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfu [•] u	8±8
si5	<i>Ttr</i>	S	A [•] a [•] CfaGfuGfuUfCfUfuGfcUfcUfaUfaAf [*] VP-U _{F/Mc} [•] Uf [•] aUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfu [•] u	2±1
si6	<i>Ttr</i>	S	A [•] a [•] CfaGfuGfuUfCfUfuGfcUfcUfaUfaAf [*] zVP-U _{F/Mc} [•] Uf [•] aUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfu [•] u	11±4
si7	<i>Ttr</i>	S	A [•] a [•] CfaGfuGfuUfCfUfuGfcUfcUfaUfaAf [*] Pu [•] Uf [•] aUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfu [•] U _{F/Mc} [•] u	6±4
si8	<i>Ttr</i>	S	A [•] a [•] CfaGfuGfuUfCfUfuGfcUfcUfaUfaAf [*] Pu [•] Uf [•] aUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfu [•] U _{F/Mc} [•] U _{F/Mc} [•] u	12±5
si9	<i>Pten</i>	S	A [•] a [•] GfaUfgAfuGfUfUfuGfaAfaCfuAfuUf [*] Pa [•] Af [•] uAfgUfuUfcAfaacAfuCfaUfcUfu [•] g [•] u	13±3
si10	<i>Pten</i>	S	A [•] a [•] GfaUfgAfuGfUfUfuGfaAfaCfuAfuUf [*] Pa [•] Af [•] uAfgU _{F/Mc} [•] Uf [•] aUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfu [•] g [•] u	35±16
si11	<i>Pten</i>	S	A [•] a [•] GfaUfgAfuGfUfUfuGfaAfaCfuAfuUf [*] Pa [•] Af [•] uAfgUf _{F/Mc} [•] Uf [•] aUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfu [•] g [•] u	280±110
si12	<i>Pten</i>	S	A [•] a [•] GfaUfgAfuGfUfUfuGfaAfaCfuAfuUf [*] Pa [•] Af [•] uAfgU _{F/Mc} [•] Uf [•] aUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfu [•] g [•] u	2800±1000
si13	<i>F7</i>	S	Cf [•] a [•] GfgAfuCfaUfCfUfcAfaGfuCfuUfaAf [*] u [•] Uf [•] aAfgAfcUfuGfagaUfgAfuCfcUfg [•] g [•] c	9±16
si14	<i>F7</i>	S	Cf [•] a [•] GfgAfuCfaUfCfUfcAfaGfuCfuUfaAf [*] Pu [•] Uf [•] aAfgAfcUfuGfagaUfgAfuCfcUfg [•] g [•] c	0.2±0.4
si15	<i>F7</i>	S	Cf [•] a [•] GfgAfuCfaUfCfUfcAfaGfuCfuUfaAf [*] U _{F/Mc} [•] Uf [•] aAfgAfcUfuGfagaUfgAfuCfcUfg [•] g [•] c	52±24

10

20

30

40

50

si16	F7	S	Cf•a•GfgAfuCfaUfCfUfcAfaGfuCfuUfaAf*	10±9
		AS	Pu _{F/Mc} •Uf•aAfgAfcUfuGfagaUfgAfuCfcUfgg•g•c	
si17	F7	S	Cf•a•GfgAfuCfaUfCfUfcAfaGfuCfuUfaAf*	170±65
		AS	Pu•Uf•aAfgAfc _{F/Mc} UfuGfagaUfgAfuCfcUfgg•g•c	
si18	F7	S	C _{F/Mc} •a•GfgAfuCfaUfCfUfcAfaGfuCfuUfaAf*	6±4
		AS	Pu•Uf•aAfgAfcUfuGfagaUfgAfuCfcUfgg•g•c	
si19	Ttr	S	5'-a•g•uguuCFuUFGFCFucuuaaaca*	112 ^b
		AS	5'-u•GF•uuuaagagcaAFgAFacacu•g•u	
si20	Ttr	S	a•g•uguuCFuUFGFCFucuuaaaca*	60 ^b
		AS	u•GF•uuuaUF/MeagagcaAFgAFacacu•g•u	

^a (A) Ttr、(B) Ptenおよび (C) F7を標的とする完全2'-修飾siRNAのインビトロ効力。初代マウス肝細胞に10nM siRNAならびにTtrについては100nM siRNAの6倍段階希釈液およびPtenとF7については5倍段階希釈液をトランスフェクトした。24時間後にRT-qPCRを使って標的mRNAを定量した。フィッティングされた用量応答曲線については図S2～図S4を参照されたい。2'-Fおよび2'-OMeヌクレオチドはそれぞれU_Fまたはuで表される。PS連結部＝・、VP＝5'-(E)-ビニルホスホネート、およびzVP＝5'-(Z)-ビニルホスホネート。エラーバーは平均からの標準偏差を示す。^b二重ルシフェラーゼアッセイによる分析。実験条件については図18Aおよび図18Bを参照されたい。

【0718】

シード領域における修飾に対する許容性を、Ptenを標的とするsiRNAについて、位置6または位置7における単一の組み入れまたは両方の位置における組み入れで評価した（それぞれsi10、si11、およびsi12;表8および図17B）。位置6における修飾は十分に許

10

20

30

40

50

容され、si10は親siRNA (si9) の活性と類似する活性を有した。位置7における修飾は、親の約13pMという IC_{50} から、280pMへと、活性を低減させた。これは、siRNA構造におけるねじれ (kink) を必要とする、この領域におけるAgo2のユニークな構造要件によるのだろう⁵³。両方の位置を修飾すると、かなりの効力喪失が起こった (IC_{50} = 2800pM)。

【0719】

F7を標的とするsiRNAには2'-F/Meピリミジンヌクレオチドで修飾することができる位置がいくつかある (表8および図17C)。アンチセンス鎖上にあらかじめ導入された5'ホスフェートを含有するsiRNAは、親構築物と比較してわずかに改良された活性を有した (si14をsi13と比較されたい)。同様に、アンチセンス鎖の位置1にU_{F/Me}を有し、5'ホスフェートがあらかじめ導入されているsiRNAは、この修飾と5'-OHとを有するsiRNAよりも高い効力を有した (si16をsi15と比較されたい)。これは、アンチセンス鎖の位置1にある2'-F/Me修飾はRISCによって許容されるが、内因性のリン酸化には何らかの障害があることを示唆している。アンチセンス鎖の位置7の修飾は、親よりかなり低下した活性を有した (si17をsi13と比較されたい)。一般に、シード領域における2'-F/Meピリミジンヌクレオチド、3'オーバーハングの修飾、およびVPと結合しているアンチセンスの位置1は、そのうちの一つであれば、十分に許容された。ただし、この分析では明らかにならない配列依存的および標的依存的効果はありうる。

【0720】

2'-F/Meで修飾されたsiRNAのオフターゲット効果。シードが媒介するオフターゲット活性は、ラットにおいてsiRNAの肝毒性の一因となり、このオフターゲット活性を軽減するための一方法は、熱不安定化ヌクレオチド、例えばGNAをシード領域に組み入れることである⁴⁸。有効であるには、そのような熱不安定化修飾が、オフターゲット活性を低減しつつも、オンターゲット活性を維持しなければならない。シード領域において2'-F/Meヌクレオチドは十分に許容されるので、本発明者らは、ルシフェラーゼ3'-非翻訳領域中にsiRNAに対する4つのタンデムシードマッチが存在するルシフェラーゼレポーターアッセイを使って、オフターゲット活性に対する2'-F/Meの効果を測定した^{55~57}。アッセイに使用したsiRNAはTtrを標的とするように設計された。si19は親であり、si20はアンチセンス鎖の位置7に2'-F/Meを有する。インビトロ活性と合致して、シード領域中に2'-F/Meを有するsiRNAのオンターゲット活性は、親の活性と類似していたが、オフターゲット活性は、アンチセンス鎖の位置7に単一の2'-F/Meヌクレオチドを組み入れることによって軽減され (図18A)、その熱不安定化特性と合致した。

【0721】

2'-F/Meがオフターゲット活性に及ぼす影響をさらに評価するために、本発明者らは、RNAシーケンシングを使ってsiRNA処置後の転写調節異常のレベルを測定した。初代ラット間細胞にTtrを標的とする親siRNA (si19) を濃度50nMでトランスフェクトすると、48時間の時点で、何百もの転写産物の強いアップレギュレートとダウンレギュレーションとが起こり、その多くはカノニカルシードマッチを含有していた (図18B)。ルシフェラーゼレポーターアッセイと合致して、アンチセンス鎖のシード領域中、位置7に2'-F/Meを組み入れると (si20)、転写調節異常は、親siRNAで観察されるものよりかなり少なくなった。これらの結果は、2'-F/Me修飾がGNAと同じようにオフターゲット活性を軽減することを示唆している。

【0722】

2'-F/Me修飾siRNAのインビボ活性。2'-F/Me修飾siRNAのインビトロ活性に励まされて、本発明者らは、2つの異なる送達プラットフォームを使って、これらのsiRNAをマウスにおいて評価した。まず、2つのチミジンオーバーハングと末端PS連結部とを有する21マーRNA二重鎖からなるF7を標的とするsiRNAを、肝送達に最適化された脂質ナノ粒子に製剤化した⁵⁸。マウス (C57BL/6) にsiRNAを1または3mg/kgのどちらかで投与し、投与後48時間の時点で、血清F7レベルを定量した。親鎖si21は3mg/kgのED₈₀を有し、単一の2'-F/Me修飾をアンチセンス鎖の位置2に有するsiRNA (si22) も同様

10

20

30

40

50

だった。複数の2'-F/Me修飾を有するsiRNA (si23、si24、およびsi25) は劇的に低いED₅₀を有していた (図19A)。これらのデータは、許容される2'-F/Me修飾には位置依存性があるか、またはそのパーセンテージに制限があることを示唆している。LNP製剤はインビトロ薬理評価には使用できないので、本発明者らはこの製剤ではインビトロアッセイを実行しなかった。

【0723】

位置依存性を評価するために、皮下投与することができる、GalNAcにコンジュゲートされたF7標的siRNAを、分析した。GalNAcコンジュゲートsiRNAのための最適化されたテンプレートは、LNP製剤に使用されたものより2'-F/Me修飾が少ない⁵⁸。これらのsiRNAは、2'-OMeおよび2'-Fヌクレオチド、末端ホスホロチオエート、ならびにセンス鎖上の3'-コンジュゲートGalNAcリガンドで構成される21:23マーの非対称な二重鎖である。さまざまな位置に2'-F/Meヌクレオチドを有するsiRNAに関するデータを図19B~図19Dに示す。1mg/kgの用量での親siRNA (si26) による処置は、投与の10日後にアッセイした場合、循環F7タンパク質を60%低減させた。アンチセンス鎖の位置20に2'-F/Meを有するsiRNA (si27) は親の活性と類似する活性を有した。しかし、アンチセンス鎖の位置18と位置20に2つの2'-F/Meヌクレオチドを組み入れた場合 (si28) は、3mg/kgを投与してもF7の低減は40%しか起こらず、アンチセンス鎖中に3つの2'-F/Me修飾を有するsiRNAの効力はさらに低かった (si29)。センス鎖上の複数の2'-F/Me修飾はあまり許容されず、位置9~11に3つの修飾を有するsi30は親と比較して活性を失った。最適な活性はこの領域におけるセンス鎖切断を必要とし^{43,45,47}、これらの位置に2'-F/Meを連続して配置することによって、この切断が阻害される可能性が高い。

【0724】

Ago2と相互作用するアンチセンス鎖の位置1における修飾の影響をさらに理解するために、この位置で修飾されたsiRNAのインビボ効力を、Ttr標的siRNAの1mg/kg皮下投与後、28日目まで評価した (図19C)。本発明者らはこのsiRNAで広範な構造活性相間研究を行ってきた^{43,45,47}。予想どおり、位置1に2'-F/Meを有するsiRNA (si3) は親より活性が低かった。これはおそらく、それがキナーゼ基質としての機能を果たさないからだろう。この仮説を裏付けるように、(E)-VPを有するsiRNA (si5) は、親si1との比較でわずかに改良された効力を有した。(Z)-VP (si6) はわずかに低減した活性を有した。このように、(E)-VPによる5'-修飾とアンチセンスsiRNAの位置1における2'-F/Meは、他の最適化された修飾との組合せで、親 (si1) と比較して改良された優れたインビボ有効性を持つsiRNAをもたらす。興味深いことに、2'-F/Meと(Z)-VPの両方で修飾されたsiRNA (si6) のサイレンシング活性は親 (si1) よりわずかに低いだけだった。これは(Z)-VP-修飾siRNAの活性を初めて観察したものである^{41~47}。2'-F/Meの立体的影響は、(Z)-VPを位置1における2'-OMeまたは2'-F置換基と一緒に使用した場合よりも有利なコンフォメーションをもたらさう。

【0725】

マウスモデルにおけるオフターゲット効果を軽減する2'-F/Meの潜在能力を評価するために、本発明者らは、アンチセンス鎖の位置6に2'-F/Meを有するGalNAcコンジュゲートsiRNA (si10) を分析した。これはオフターゲットを起こしやすい (off-target prone) 配列である^{48,59}。2'-F/Me修飾siRNAは親siRNA (si9) と同等な効力を有した (図19D)。このように、2'-F/Meによる修飾は、シードが媒介するオフターゲット効果を、オンターゲット効力を損なうことなく軽減するための、有望なアプローチである。

【0726】

siRNAにおける2'-F/Meの構造的帰結。 β -D-2'-デオキシ-2'- α -フルオロ-2'- β -C-メチルシチジン⁶⁰および対応するウリジンヌクレオチドプロドラッグPSI-7977の結晶構造⁶¹は、修飾糖がC3'エンドパッカーをとることを明らかにした。標準的なsc-/ap/sc+/sc+/ap/sc-バックボーンねじれ角 ($\square$ から $\square$) とC3'エンドコンフォメーション

のリボースとを有するA型RNAオリゴヌクレオチドにおいて、2'-β-C-メチル基の擬エクアトリアル配向は、3'隣接ヌクレオチドの塩基、糖およびホスフェート原子へのショートコンタクトをもたらす（図20A）。これらの一部はメチル基のファンデルワールス半径（2 Å）をкаろうじて超え、それはたぶん、一方の鎖上に2'-F/Me UまたはCを有するRNA二重鎖に観察された不安定化の説明になる（表4）。これらのショートコンタクトを避けるには、おそらくバックボーンおよびグリコシドねじれ角における調節を伴い、局所的な塩基のアンスタッキングをもたらす可能性が高い、コンフォメーション変化が必要である。実際、標準的な分子力学的アプローチ（Amber 14ff、UCSF Chimera）⁶²を使った、2'-F/Me残基を含有するモデル二重鎖のエネルギー最小化は、メチル基と3'-隣接ヌクレオチドからの原子との間に許容されうる距離をもたらした。これらのヌクレオチド間の立体競合（steric conflict）を避けることは、ウラシル塩基間のスタッキングの喪失をもたらした（図20B）。さらにこれらの変化は、ネイティブ二重鎖における5.7 Åから、修飾残基を有する二重鎖における6.6 Åへの、鎖内ホスフェート-ホスフェート距離の増加に現れる、糖-ホスフェートバックボーンの伸長を伴った（図20B）。ホスフェート間の間隔の変化と、それに伴う局所静電表面ポテンシャルの差は、おそらく、2'-Fヌクレオチドとの比較で2'-F/Meによって与えられる、ヌクレアーゼ分解に対する改良された耐性の一因だろう（表6および表7）。

【0727】

2'-F/Meヌクレオチドがアンチセンス鎖の位置1、2、または6に組み入れられているsiRNAで観察された活性の構造的源泉をよりよく理解するために、本発明者らは、miR-20aとの複合体を形成したヒトAgo2の結晶構造（PDB ID 4F3T）⁵³を調べた。修飾ヌクレオチドは、位置1および位置6では非常によく許容されるが、位置2では著しい活性の喪失をもたらす（図19A～図19D）。アンチセンス鎖の5'末位置では、ホスフェート基および塩基が、ホスフェート基が関与する塩橋を含む複数の相互作用によって、しかるべき位置にしっかりと保持される（図21A）。アンチセンス鎖の位置1のヌクレオチドのリボースはC2'エンドB-DNA様パッカーをとり、アンチセンス鎖は、位置1と2の間でシャープなターンを作り、タンパク質のタイトグリッ（tight grip）が位置2および位置3でも続く。本発明者らは、UCSF Chimeraを使って位置1、2および6の糖に2'-β-C配向でメチル基を加え、ネイティブ2'-ヒドロキシル基をフッ素で置き換えた。次に、修飾された複合体を、UCSF Chimeraに実装されている分子力学法（Amber 14ff）を使って緩和させた⁶²。複合体におけるタンパク質と各ヌクレオチドとの間の複数の相互作用ゆえに、使用した計算的アプローチでは、追加のメチル基から生じるショートコンタクトによってトリガーされる原子の有意な動きはもたらされない。

【0728】

位置1では、2'-β-C-メチル基の擬アキシアル配向が、精密化されたモデルにおける、2つの比較的タイトな、C5'およびN1への、ヌクレオシド間1・・・5コンタクト（それぞれ3.5 Åおよび3.1 Å）につながる（図21A）。糖が異なるパッカーにフリップされるのでない限り、これらを回避することは難しい。しかし、Ago2によって提供される鑄型は実質的なコンフォメーション変化を不可能にする可能性が高い。メチル基が追加された帰結としての他の競合はなく、本発明者らは、アンチセンス鎖の位置1にある2'-F/Me修飾ヌクレオチドは、Ago2結合部位によって極めてうまく収容されると結論した。これは、この修飾を有するsiRNAの高い活性と合致する（図17A～17C）。逆に、位置2への修飾ヌクレオチドの組み入れは、メチル基と3'-隣接ヌクレオチドからの塩基、糖およびホスフェート部分の原子との間の衝突をもたらす（図21B）。位置2と3の間の糖-ホスフェートバックボーンの拡張はAgo2による結合を妨害し、よって、アンチセンス鎖の位置2では2'-F/Meヌクレオチドがあまり許容されない理由の構造的根拠を与える。最後に、Ago2複合体の結晶構造に見られる位置6と位置7の間の強いねじれ⁵³は、位置6の2'-F/Me修飾ヌクレオチドを収容するための豊富なスペースを提供する。初期構築モデルにおける、メチル基と、位置7のグアニジンのC8-H位との間の、多少のショートコンタクトは、精密化されたモデルでは、Me・・・C8距離のおよそ3.4 Åへの増加を伴うグリコシ

ド結合周りの塩基のわずかな回転によって軽減される（図21C）。計算モデルは、このように、位置6における2'-F/MeヌクレオチドがRNAi活性を損なわない理由を明確にしている。位置7に組み入れられた2'-F/Meヌクレオチドも、2'-メチル基と3'-隣接ヌクレオチドの塩基のC6との間に多少タイトな間隔をもたらした（図21D）。精密化されたモデルでは、2つの塩基がわずかに押し離されるので、その距離は3.5 Åである。しかし、2'-メチルと位置8の4'-酸素との間の密接なコンタクトは残っている（2.8 Å）。位置6および位置7の対応する原子間には、これらの残基間のねじれゆえに、この衝突は見られない（図21C）。位置7における修飾の興味深い帰結は、2'-メチル部分とAgo2のMet-364の側鎖のメチル基との間のポテンシャル的に有利なコンタクトである（3.6 Å）（図21D）。

10

【0729】

アンチセンス鎖の位置1におけるE-VPおよびZ-VP 2'-F/Meウリジンの相互作用をモデル化するために、本発明者らは、miR-20aとの複合体を形成したヒトAgo2の結晶構造から出発した²⁴。この構造では、E-VPが、擬アキシアル2'-□-C-Me置換基を持つ珍しいC2'-エンド（サウス（South））糖パッカーを有する（図22A）。5'-リン酸化miRNAとの結晶構造では、P-O5'-C5'-C4'ねじれ角がほぼアンチペリプラナー（ap）であり、E-VP部分は、それゆえに、親構造との比較でホスフェートの配向を事実上変化させずに収容される。Z-VPモデルはO4'-エンド（イースト（East））糖パッカーを特徴とし、2'-F置換基と2'-Me置換基はどちらも擬アキシアル配向ではない（図22B）。ホスフェートは、Lys-566との塩橋に関与し、Tyr-529およびGln-545への水素結合を形成しており、E-VPモデルとZ-VPモデルの重ね合わせは、これらのホスフェートが1.85 Åしか離れていないことを示している（図22C）。Z-VPホスフェートは、E-VP部分のホスフェートほどには、結合ポケットの奥深くまで到達しないが、Z-VPホスフェートは有利な静電相互作用を樹立することができる。E-VPモデルとZ-VPモデルの間のさらなるわずかな変化は、Tyr-529側鎖と相対するウラシル塩基の配向に関する。Z-VPモデルでは塩基が部分的にアンスタッキングしており、E-VPウラシル環との比較でおよそ1 Å垂直に移動している（図22C）。全体として、Z-VP 2'-F/Meウリジン-修飾鎖のモデルは、2'-OMeまたは2'-Fケミストリーとの関連での、VPのZ異性体の低い活性^{41~47}とは対照的な、この修飾のインビボ効力の観察結果（図17A~17C）と合致している。

20

【0730】

2'-F/Me修飾によって与えられる、エキソヌクレアーゼによる攻撃からの保護（図25A~図25Dおよび図26A~図26D）の分子的理由を、5'-リン酸化トリヌクレオチドP-d（TTT）に結合したキロショウジョウバエ（*Drosophila melanogaster*）5'-3'エキソリボヌクレアーゼXrn1（PDB ID 2Y35）⁶⁴および単一のSp-PS部分を持つDNAテトラマー3'-d（Tp₅TTT）-5'に結合した大腸菌（*Escherichia coli*）DNAポリメラーゼIクレノウフラグメント3'-5'エキソヌクレアーゼ（PDB ID 1KSP）⁶⁵の結晶構造に基づく複合体のモデルを使って評価した。どちらの場合も、末端および末端から2番目のdTが2'-F/Me-Uで置き換えられた。親結晶構造における糖パッカーは変化しなかった：糖は、Xrn1活性部位ではC2'エンドコンフォメーションをとり（図23A）、DNAポリメラーゼIクレノウエキソヌクレアーゼの活性部位ではC3'エンドコンフォメーションをとる（図23B）。Xrn1の活性部位では、5'末2'-F/Me-Uのメチル基が5'ホスフェートおよび第1架橋ホスフェートに極めて近接している（それぞれ4.2 Åおよび4.4 Å、ファンデルワールス半径の和4.8 Å未満）。クレノウ3'-エキソヌクレアーゼの活性部位における3'末2'-F/Me-Uのメチル基は、活性部位のフロアを形成する2つのPhe残基によって制約されるタイトな空間である（最も近い距離は3.2 Å、ファンデルワールス半径の和3.5 Å未満である）。これらの解析は、2'-F単独との比較で2'-F/Me修飾のより良い保護を合理的に説明する。

30

40

【0731】

ミトコンドリアポリメラーゼガンマによる2'-F/Meヌクレオチドの組み入れが不十分であることの構造面の合理的説明。本発明者らは以前に、ネイティブNTP（rCTP、rUT

50

P、dCTP、およびdTTP)が、ミトコンドリアのDNAポリメラーゼおよびRNAポリメラーゼ、それぞれPOLGおよびPOLRMTによって効率よく組み入れられることを示した^{40, 66}。2'-Fモノマーは、POLRMTにより、高い濃度で組み込まれるが、2'-F/Me修飾ヌクレオチド類似体はどちらのミトコンドリアポリメラーゼの基質でもない^{15~17}。POLGが2'-F/Me修飾残基を組み入れられないことは、2'-メチル部分と活性部位における「ゲートキーパー」残基Tyr-951との間の不利な相互作用で容易に説明することができる。つまり、精密化された二重鎖構造(C3'エンドパッカー)からの2'-F/Me CMPを、三元POLG複合体の結晶構造⁶⁷(PDB ID 4ZTZ;において、入ってくるdCTP上に重ねると、gemメチル基が当該チロシンの環に直接向いており、それによって衝突が生じる(図32))。

10

【0732】

結論

ソホスビルは、ウイルスRNAポリメラーゼの阻害薬として機能する非常に有効なその5'ホスフェートプロドラッグおよび優れた安全性プロファイルゆえに、HCVの処置に多大な価値を持つことが証明されたリボヌクレオチド類似体阻害薬である。この薬物の薬理学に着想を得て、本発明者らは、オリゴヌクレオチドに基づくRNAi治療薬におけるこのコアヌクレオチドバックボーンを評価した。そのために、本発明者らは、2'-F/Meホスホラミダイトならびに対応するウリジン(E)-VPおよび(Z)-VPホスホラミダイトの容易な合成を実証した。これらの化合物はオリゴヌクレオチドおよび治療用siRNAに組み入れられた。これらの修飾は、RNA:RNA二重鎖とRNA:DNA二重鎖をどちらも熱的に不安定化するものであり、この修飾の3'側で二重鎖のジオメトリーをかく乱する可能性が高い。本発明者らは、このかく乱が、5'-および3'-エキソヌクレアーゼによる分解に対して末端2'-F/Me修飾が与える安定性の強化をもたらすと推測している。2'-β-C-メチル基による立体衝突は、相補的オリゴヌクレオチドとの、およびヌクレアーゼとの、相互作用が不安定化する説明になるようである。

20

【0733】

2'-F/Meで修飾されたsiRNAのインビボ遺伝子サイレンシング活性を分析することにより、RNAi活性の位置依存性が明らかになった。siRNAを数個の2'-F/Me残基で修飾するか、またはアンチセンス鎖の位置2だけを修飾すると、LNP製剤としてまたはGalNAcコンジュゲートとして細胞中に送達した場合に、効力が、親siRNAよりもかなり低くなった。位置2における置換による活性の喪失は驚くべきことではない。この位置では2'-H、2'-OH、および2'-Fだけが許容され、2'-OMeでさえサイレンシングを損なうからである²¹。2'-F/Meの各置換はアンチセンス鎖におけるねじれにつながるので、複数の2'-F/Me置換は、Ago2との弱い相互作用、および標的mRNAとの不安定な二重結合形成につながり、それが、多重置換による効力の喪失の説明になる。興味深いことに、2'-F/Me修飾は(E)-5'-VPを伴う場合、および(Z)-VP異性体を伴う場合には、アンチセンス鎖の位置1では十分に許容された。これが興味深いことであったのは、アンチセンス鎖の位置1が天然リボヌクレオチド、2'-F、または2'-OMeである場合には、Z-VPは許容されないからである。2'-F/Meを伴う場合、Z-VPホスフェートは、2'-β-C-メチル基によって与えられるひずみゆえに、有利な静電相互作用を樹立することができる。シード領域中、位置6または位置7における2'-F/Me修飾は、効力を妨害しなかった。重要なことに、これらの位置における2'-F/Meヌクレオチドは、GNAのような他の熱力学的不安定化修飾と同じように⁴⁸、オフターゲット効果を軽減した。Ago2複合体の結晶構造に見られる位置6と位置7の間の強いねじれ⁵³は、位置6および位置7の2'-F/Me修飾ヌクレオチドを収容するための豊富なスペースを提供する。

30

40

【0734】

最後に、2'-F/Meヌクレオチドはポリメラーゼにとっては悪い基質なので⁶⁸、この修飾はミトコンドリア毒性を誘導しないはずである。したがって2'-F/Meヌクレオチドは、RNAiへの応用に関して、部位特異的効力、持続時間、および安全性を潜在的に改良するための有望なツールになる。本発明者らは、自らの発見に励まされて、さまざまなmR

50

NAを標的とするsiRNAの各位置で、この修飾を体系的に評価することを計画している。これには、プリン2'-F/Meヌクレオシド⁶⁹⁻⁷¹ホスホラミダイトおよび固形支持体の合成が必要になるが、それは現在、進行中である。

【 0 7 3 5 】

参考文献

1. Elbashir, S. M.; Harborth, J.; Lendeckel, W.; Yalcin, A.; Weber, K.; Tuschl, T., Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **2001**, *411* (6836), 494-498.
2. Wang, H. W.; Noland, C.; Siridechadilok, B.; Taylor, D. W.; Ma, E.; Felderer, K.; Doudna, J. A.; Nogales, E., Structural insights into RNA processing by the human RISC-loading complex. *Nat Struct Mol Biol* **2009**, *16* (11), 1148-53.
3. Meister, G.; Landthaler, M.; Patkaniowska, A.; Dorsett, Y.; Teng, G.; Tuschl, T., Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell* **2004**, *15* (2), 185-97.
4. Liu, J.; Carmell, M. A.; Rivas, F. V.; Marsden, C. G.; Thomson, J. M.; Song, J. J.; Hammond, S. M.; Joshua-Tor, L.; Hannon, G. J., Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* **2004**, *305* (5689), 1437-41.
5. Hammond, S. M.; Aartsma-Rus, A.; Alves, S.; Borgos, S. E.; Buijsen, R. A. M.; Collin, R. W. J.; Covello, G.; Denti, M. A.; Desviat, L. R.; Echevarría, L.; Foged, C.; Gaina, G.; Garanto, A.; Goyenvall, A. T.; Guzowska, M.; Holodnuka, I.; Jones, D. R.; Krause, S.; Lehto, T.; Montolio, M.; Van Roon-Mom, W.; Arechavala-Gomez, V., Delivery of oligonucleotide-based therapeutics: challenges and opportunities. *EMBO Mol. Med.* **2021**, *13* (4), e13243.
6. Xiong, H.; Veedu, R. N.; Diermeier, S. D., Recent Advances in Oligonucleotide Therapeutics in Oncology. *International Journal of Molecular Sciences* **2021**, *22* (7), 3295.
7. Smith, C. I. E.; Zain, R., Therapeutic Oligonucleotides: State of the Art. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **2019**, *59* (1), 605-630.
8. Shen, X.; Corey, D. R., Chemistry, mechanism and clinical status of antisense oligonucleotides and duplex RNAs. *Nucleic acids research* **2017**, *46* (4), 1584-1600.

10

20

30

40

50

9. Stein, C. A.; Castanotto, D., FDA-Approved Oligonucleotide Therapies in 2017. *Mol. Ther.* **2017**, *25* (5), 1069-1075.
10. Crooke, S. T.; Witztum, J. L.; Bennett, C. F.; Baker, B. F., RNA-Targeted Therapeutics. *Cell Metabolism* **2018**, *27* (4), 714-739.
11. Setten, R. L.; Rossi, J. J.; Han, S.-p., The current state and future directions of RNAi-based therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2019**, *18* (6), 421-446.
12. Roberts, T. C.; Langer, R.; Wood, M. J. A., Advances in oligonucleotide drug delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2020**, *19* (10), 673-694.
13. Akinc, A.; Maier, M. A.; Manoharan, M.; Fitzgerald, K.; Jayaraman, M.; Barros, S.; Ansell, S.; Du, X.; Hope, M. J.; Madden, T. D.; Mui, B. L.; Semple, S. C.; Tam, Y. K.; Ciufolini, M.; Witzigmann, D.; Kulkarni, J. A.; van der Meel, R.; Cullis, P. R., The Onpatro story and the clinical translation of nanomedicines containing nucleic acid-based drugs. *Nat Nanotechnol* **2019**, *14* (12), 1084-1087.
14. Balwani, M.; Sardh, E.; Ventura, P.; Peiró, P. A.; Rees, D. C.; Stölzel, U.; Bissell, D. M.; Bonkovsky, H. L.; Windyga, J.; Anderson, K. E.; Parker, C.; Silver, S. M.; Keel, S. B.; Wang, J.-D.; Stein, P. E.; Harper, P.; Vassiliou, D.; Wang, B.; Phillips, J.; Ivanova, A.; Langendonk, J. G.; Kauppinen, R.; Minder, E.; Horie, Y.; Penz, C.; Chen, J.; Liu, S.; Ko, J. J.; Sweetser, M. T.; Garg, P.; Vaishnav, A.; Kim, J. B.; Simon, A. R.; Gouya, L., Phase 3 Trial of RNAi Therapeutic Givosiran for Acute Intermittent Porphyria. *New England Journal of Medicine* **2020**, *382* (24), 2289-2301.
15. Chan, A.; Liebow, A.; Yasuda, M.; Gan, L.; Racie, T.; Maier, M.; Kuchimanchi, S.; Foster, D.; Milstein, S.; Charisse, K.; Sehgal, A.; Manoharan, M.; Meyers, R.; Fitzgerald, K.; Simon, A.; Desnick, R. J.; Querbes, W., Preclinical Development of a Subcutaneous ALAS1 RNAi Therapeutic for Treatment of Hepatic Porphyrias Using Circulating RNA Quantification. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2015**, *4*, e263.
16. Liebow, A.; Li, X.; Racie, T.; Hettinger, J.; Bettencourt, B. R.; Najafian, N.; Haslett, P.; Fitzgerald, K.; Holmes, R. P.; Erbe, D.; Querbes, W.; Knight, J., An Investigational RNAi Therapeutic Targeting Glycolate Oxidase Reduces Oxalate Production in Models of Primary Hyperoxaluria. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2017**, *28* (2), 494-503.
17. Raal, F. J.; Kallend, D.; Ray, K. K.; Turner, T.; Koenig, W.; Wright, R. S.; Wijngaard, P. L. J.; Curcio, D.; Jaros, M. J.; Leiter, L. A.; Kastelein, J. J. P., Inclisiran for the Treatment of Heterozygous Familial Hypercholesterolemia. *New England Journal of Medicine* **2020**, *382* (16), 1520-1530.
18. Ray, K. K.; Wright, R. S.; Kallend, D.; Koenig, W.; Leiter, L. A.; Raal, F. J.; Bisch, J. A.; Richardson, T.; Jaros, M.; Wijngaard, P. L. J.; Kastelein, J. J. P., Two Phase 3 Trials of Inclisiran in Patients with Elevated LDL Cholesterol. *New England Journal of Medicine* **2020**, *382* (16), 1507-1519.
19. Fitzgerald, K.; White, S.; Borodovsky, A.; Bettencourt, B. R.; Strahs, A.; Clausen, V.; Wijngaard, P.; Horton, J. D.; Taubel, J.; Brooks, A.; Fernando, C.; Kauffman, R. S.; Kallend, D.; Vaishnav, A.; Simon, A., A Highly Durable RNAi Therapeutic Inhibitor of PCSK9. *N. Engl. J. Med.* **2016**, *376* (1), 41-51.
20. Nair, J. K.; Willoughby, J. L.; Chan, A.; Charisse, K.; Alam, M. R.; Wang, Q.; Hoekstra, M.; Kandasamy, P.; Kel'in, A. V.; Milstein, S.; Taneja, N.; O'Shea, J.; Shaikh, S.; Zhang, L.; van der Sluis, R. J.; Jung, M. E.; Akinc, A.; Hutabarat, R.; Kuchimanchi, S.; Fitzgerald, K.; Zimmermann, T.; van Berkel, T. J.; Maier, M. A.; Rajeev, K. G.; Manoharan, M., Multivalent N-acetylgalactosamine-conjugated siRNA localizes in hepatocytes and elicits robust RNAi-mediated gene silencing. *J Am Chem Soc* **2014**, *136* (49), 16958-61.
21. Egli, M.; Manoharan, M., Re-Engineering RNA Molecules into Therapeutic Agents. *Acc Chem Res* **2019**, *52* (4), 1036-1047.
22. Jonathan, O. S.; Christopher, S. T.; Rajat, D.; Babu, I. R.; Klaus, C.; Muthiah, M.; Martin, A. M.; Ivan, Z., An efficient deprotection method for 5'-O-bis(pivaloyloxymethyl)-(E)-vinylphosphonate containing oligonucleotides. *Tetrahedron* **2018**, *74* (42), 6182-6186.

10

20

30

40

50

23. Khvorova, A.; Watts, J. K., The chemical evolution of oligonucleotide therapies of clinical utility. *Nat Biotechnol* **2017**, *35* (3), 238-248.
24. Pallan, P. S.; Greene, E. M.; Jicman, P. A.; Pandey, R. K.; Manoharan, M.; Rozners, E.; Egli, M., Unexpected origins of the enhanced pairing affinity of 2'-fluoro-modified RNA. *Nucleic Acids Res* **2011**, *39* (8), 3482-95.
25. Kawasaki, A. M.; Casper, M. D.; Freier, S. M.; Lesnik, E. A.; Zounes, M. C.; Cummins, L. L.; Gonzalez, C.; Cook, P. D., Uniformly modified 2'-deoxy-2'-fluoro phosphorothioate oligonucleotides as nuclease-resistant antisense compounds with high affinity and specificity for RNA targets. *J Med Chem* **1993**, *36* (7), 831-41.
26. Chantal, S.; Marc-Olivier, B.; Alain; Karl-Heinz, A., The effects of 2'- and 3'-alkyl substituents on oligonucleotide hybridization and stability. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1994**, *4* (16), 1969-1974. 10
27. Daniel, O. C.; Mariana, G.; Philippe, J. N.; Adolfo, M. I., Synthesis and properties of (2'S)- and (2'R)-2'-deoxy-2'-C-methyl oligonucleotides. *Tetrahedron* **2001**, *57* (36), 7613-7621.
28. Robaldo, L.; Izzo, F.; Dellafiore, M.; Proietti, C.; Elizalde, P. V.; Montserrat, J. M.; Iribarren, A. M., Influence of conformationally restricted pyrimidines on the activity of 10–23 DNAzymes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2012**, *20* (8), 2581-2586.
29. Koole, L. H.; Wu, J. C.; Neidle, S.; Chattopadhyaya, J., Structural properties of four isomeric C2'/C3' modified uridines. *Journal of the American Chemical Society* **1992**, *114* (7), 2687-2696.
30. Gamarnik, A.; Arnold, J. J.; Sharma, S. D.; Feng, J. Y.; Ray, A. S.; Smidansky, E. D.; Kireeva, M. L.; Cho, A.; Perry, J.; Vela, J. E.; Park, Y.; Xu, Y.; Tian, Y.; Babusis, D.; Barauskus, O.; Peterson, B. R.; Gnatt, A.; Kashlev, M.; Zhong, W.; Cameron, C. E., Sensitivity of Mitochondrial Transcription and Resistance of RNA Polymerase II Dependent Nuclear Transcription to Antiviral Ribonucleosides. *PLoS Pathogens* **2012**, *8* (11), e1003030. 20
31. Reddy, P. G.; Bao, D.; Chang, W.; Chun, B.-K.; Du, J.; Nagarathnam, D.; Rachakonda, S.; Ross, B. S.; Zhang, H.-R.; Bansal, S.; Espiritu, C. L.; Keilman, M.; Lam, A. M.; Niu, C.; Steuer, H. M.; Furman, P. A.; Otto, M. J.; Sofia, M. J., 2'-Deoxy-2'- α -fluoro-2'- β -C-methyl 3',5'-cyclic phosphate nucleotide prodrug analogs as inhibitors of HCV NS5B polymerase: Discovery of PSI-352938. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2010**, *20* (24), 7376-7380.
32. Zhou, S.; Mahmoud, S.; Liu, P.; Zhou, L.; Ehteshami, M.; Bassit, L.; Tao, S.; Domaoal, R. A.; Sari, O.; Schutter, C. D.; Amiralaie, S.; Khalil, A.; Ollinger Russell, O.; McBrayer, T.; Whitaker, T.; Abou-Taleb, N.; Amblard, F.; Coats, S. J.; Schinazi, R. F., 2'-Chloro,2'-fluoro Ribonucleotide Prodrugs with Potent Pan-genotypic Activity against Hepatitis C Virus Replication in Culture. *J. Med. Chem.* **2017**, *60* (13), 5424-5437.
33. Wang, P.; Chun, B. K.; Rachakonda, S.; Du, J.; Khan, N.; Shi, J.; Stec, W.; Cleary, D.; Ross, B. S.; Sofia, M. J., An efficient and diastereoselective synthesis of PSI-6130: a clinically efficacious inhibitor of HCV NS5B polymerase. *J Org Chem* **2009**, *74* (17), 6819-24. 30
34. Sofia, M. J.; Bao, D.; Chang, W.; Du, J.; Nagarathnam, D.; Rachakonda, S.; Reddy, P. G.; Ross, B. S.; Wang, P.; Zhang, H. R.; Bansal, S.; Espiritu, C.; Keilman, M.; Lam, A. M.; Steuer, H. M.; Niu, C.; Otto, M. J.; Furman, P. A., Discovery of a β -d-2'-deoxy-2'- α -fluoro-2'- β -C-methyluridine nucleotide prodrug (PSI-7977) for the treatment of hepatitis C virus. *J Med Chem* **2010**, *53* (19), 7202-18.
35. Chun, B. K.; Du, J.; Zhang, H. R.; Chang, W.; Ross, B. S.; Jiang, Y.; Bao, D.; Espiritu, C. L.; Keilman, M.; Steuer, H. M.; Furman, P. A.; Sofia, M. J., Synthesis of stable isotope labeled analogs of the anti-hepatitis C virus nucleotide prodrugs PSI-7977 and PSI-352938. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2011**, *30* (11), 886-96.
36. Ross, B. S.; Reddy, P. G.; Zhang, H. R.; Rachakonda, S.; Sofia, M. J., Synthesis of diastereomerically pure nucleotide phosphoramidates. *J Org Chem* **2011**, *76* (20), 8311-9. 40

37. Du, J.; Bao, D.; Chun, B. K.; Jiang, Y.; Reddy, P. G.; Zhang, H. R.; Ross, B. S.; Bansal, S.; Bao, H.; Espiritu, C.; Lam, A. M.; Murakami, E.; Niu, C.; Micolochick Steuer, H. M.; Furman, P. A.; Otto, M. J.; Sofia, M. J., β -D-2'- α -F-2'- β -C-Methyl-6-O-substituted 3',5'-cyclic phosphate nucleotide prodrugs as inhibitors of hepatitis C virus replication: a structure-activity relationship study. *Bioorg Med Chem Lett* **2012**, *22* (18), 5924-9.
38. Keating, G. M.; Vaidya, A., Sofosbuvir: first global approval. *Drugs* **2014**, *74* (2), 273-82.
39. Feng, J. Y.; Xu, Y.; Barauskas, O.; Perry, J. K.; Ahmadyar, S.; Stepan, G.; Yu, H.; Babusis, D.; Park, Y.; McCutcheon, K.; Perron, M.; Schultz, B. E.; Sakowicz, R.; Ray, A. S., Role of Mitochondrial RNA Polymerase in the Toxicity of Nucleotide Inhibitors of Hepatitis C Virus. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2016**, *60* (2), 806-817.
40. Janas, M. M.; Zlatev, I.; Liu, J.; Jiang, Y.; Barros, S. A.; Sutherland, J. E.; Davis, W. P.; Liu, J.; Brown, C. R.; Liu, X.; Schlegel, M. K.; Blair, L.; Zhang, X.; Das, B.; Tran, C.; Aluri, K.; Li, J.; Agarwal, S.; Indrakanti, R.; Charisse, K.; Nair, J.; Matsuda, S.; Rajeev, K. G.; Zimmermann, T.; Sepp-Lorenzino, L.; Xu, Y.; Akinc, A.; Fitzgerald, K.; Vaishnav, A. K.; Smith, P. F.; Manoharan, M.; Jadhav, V.; Wu, J. T.; Maier, M. A., Safety evaluation of 2'-deoxy-2'-fluoro nucleotides in GalNAc-siRNA conjugates. *Nucleic Acids Res* **2019**, *47* (7), 3306-3320. 10
41. Lima, W. F.; Prakash, T. P.; Murray, H. M.; Kinberger, G. A.; Li, W.; Chappell, A. E.; Li, C. S.; Murray, S. F.; Gaus, H.; Seth, P. P.; Swayze, E. E.; Crooke, S. T., Single-stranded siRNAs activate RNAi in animals. *Cell* **2012**, *150* (5), 883-94.
42. Prakash, T. P.; Lima, W. F.; Murray, H. M.; Li, W.; Kinberger, G. A.; Chappell, A. E.; Gaus, H.; Seth, P. P.; Bhat, B.; Crooke, S. T.; Swayze, E. E., Identification of metabolically stable 5'-phosphate analogs that support single-stranded siRNA activity. *Nucleic Acids Res* **2015**, *43* (6), 2993-3011. 20
43. Parmar, R.; Willoughby, J. L.; Liu, J.; Foster, D. J.; Brigham, B.; Theile, C. S.; Charisse, K.; Akinc, A.; Guidry, E.; Pei, Y.; Strapps, W.; Cancelli, M.; Stanton, M. G.; Rajeev, K. G.; Sepp-Lorenzino, L.; Manoharan, M.; Meyers, R.; Maier, M. A.; Jadhav, V., 5'-(E)-Vinylphosphonate: A Stable Phosphate Mimic Can Improve the RNAi Activity of siRNA-GalNAc Conjugates. *ChemBiochem* **2016**, *17* (11), 985-9.
44. Prakash, T. P.; Kinberger, G. A.; Murray, H. M.; Chappell, A.; Riney, S.; Graham, M. J.; Lima, W. F.; Swayze, E. E.; Seth, P. P., Synergistic effect of phosphorothioate, 5'-vinylphosphonate and GalNAc modifications for enhancing activity of synthetic siRNA. *Bioorg Med Chem Lett* **2016**, *26* (12), 2817-2820.
45. Elkayam, E.; Parmar, R.; Brown, C. R.; Willoughby, J. L.; Theile, C. S.; Manoharan, M.; Joshua-Tor, L., siRNA carrying an (E)-vinylphosphonate moiety at the 5' end of the guide strand augments gene silencing by enhanced binding to human Argonaute-2. *Nucleic Acids Res* **2017**, *45* (6), 3528-3536.
46. Haraszti, R. A.; Roux, L.; Coles, A. H.; Turanov, A. A.; Alterman, J. F.; Echeverria, D.; Godinho, B.; Aronin, N.; Khvorova, A., 5'-Vinylphosphonate improves tissue accumulation and efficacy of conjugated siRNAs in vivo. *Nucleic Acids Res* **2017**, *45* (13), 7581-7592. 30
47. Parmar, R. G.; Brown, C. R.; Matsuda, S.; Willoughby, J. L. S.; Theile, C. S.; Charissé, K.; Foster, D. J.; Zlatev, I.; Jadhav, V.; Maier, M. A.; Egli, M.; Manoharan, M.; Rajeev, K. G., Facile Synthesis, Geometry, and 2'-Substituent-Dependent in Vivo Activity of 5'-(E)- and 5'-(Z)-Vinylphosphonate-Modified siRNA Conjugates. *J Med Chem* **2018**, *61* (3), 734-744.
48. Janas, M. M.; Schlegel, M. K.; Harbison, C. E.; Yilmaz, V. O.; Jiang, Y.; Parmar, R.; Zlatev, I.; Castoreno, A.; Xu, H.; Shulga-Morskaya, S.; Rajeev, K. G.; Manoharan, M.; Keirstead, N. D.; Maier, M. A.; Jadhav, V., Selection of GalNAc-conjugated siRNAs with limited off-target-driven rat hepatotoxicity. *Nat Commun* **2018**, *9* (1), 723.
49. Mergny, J. L.; Lacroix, L., Analysis of thermal melting curves. *Oligonucleotides* **2003**, *13* (6), 515-37. 40

50. Bernardi, A.; Bernardi, G., Studies on acid hydrolases. IV. Isolation and characterization of spleen exonuclease. *Biochim Biophys Acta* **1968**, *155* (2), 360-70.
51. Elkayam, E.; Parmar, R.; Brown, C. R.; Willoughby, J. L.; Theile, C. S.; Manoharan, M.; Joshua-Tor, L., siRNA carrying an (E)-vinylphosphonate moiety at the 5' end of the guide strand augments gene silencing by enhanced binding to human Argonaute-2. *Nucleic Acids Res* **2017**, *45* (6), 3528-3536.
52. Kenski, D. M.; Cooper, A. J.; Li, J. J.; Willingham, A. T.; Haringsma, H. J.; Young, T. A.; Kuklin, N. A.; Jones, J. J.; Cancilla, M. T.; McMasters, D. R.; Mathur, M.; Sachs, A. B.; Flanagan, W. M., Analysis of acyclic nucleoside modifications in siRNAs finds sensitivity at position 1 that is restored by 5'-terminal phosphorylation both in vitro and in vivo. *Nucleic Acids Res* **2010**, *38* (2), 660-71.
53. Elkayam, E.; Kuhn, C. D.; Tocilj, A.; Haase, A. D.; Greene, E. M.; Hannon, G. J.; Joshua-Tor, L., The structure of human argonaute-2 in complex with miR-20a. *Cell* **2012**, *150* (1), 100-10.
54. Agarwal, V.; Bell, G. W.; Nam, J. W.; Bartel, D. P., Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *Elife* **2015**, *4*.
55. Doench, J. G.; Petersen, C. P.; Sharp, P. A., siRNAs can function as miRNAs. *Genes Dev* **2003**, *17* (4), 438-42.
56. Vaish, N.; Chen, F.; Seth, S.; Fosnaugh, K.; Liu, Y.; Adami, R.; Brown, T.; Chen, Y.; Harvie, P.; Johns, R.; Severson, G.; Granger, B.; Charmley, P.; Houston, M.; Templin, M. V.; Polisky, B., Improved specificity of gene silencing by siRNAs containing unlocked nucleobase analogs. *Nucleic Acids Res* **2011**, *39* (5), 1823-32.
57. Ui-Tei, K.; Naito, Y.; Nishi, K.; Juni, A.; Saigo, K., Thermodynamic stability and Watson-Crick base pairing in the seed duplex are major determinants of the efficiency of the siRNA-based off-target effect. *Nucleic Acids Res* **2008**, *36* (22), 7100-9.
58. Jayaraman, M.; Ansell, S. M.; Mui, B. L.; Tam, Y. K.; Chen, J.; Du, X.; Butler, D.; Eltepu, L.; Matsuda, S.; Narayanannair, J. K.; Rajeev, K. G.; Hafez, I. M.; Akinc, A.; Maier, M. A.; Tracy, M. A.; Cullis, P. R.; Madden, T. D.; Manoharan, M.; Hope, M. J., Maximizing the potency of siRNA lipid nanoparticles for hepatic gene silencing in vivo. *Angew Chem Int Ed Engl* **2012**, *51* (34), 8529-33.
59. Schlegel, M. K.; Foster, D. J.; Kel'in, A. V.; Zlatev, I.; Bisbe, A.; Jayaraman, M.; Lackey, J. G.; Rajeev, K. G.; Charissé, K.; Harp, J.; Pallan, P. S.; Maier, M. A.; Egli, M.; Manoharan, M., Chirality Dependent Potency Enhancement and Structural Impact of Glycol Nucleic Acid Modification on siRNA. *J Am Chem Soc* **2017**, *139* (25), 8537-8546.
60. Clark, J. L.; Hollecker, L.; Mason, J. C.; Stuyver, L. J.; Tharnish, P. M.; Lostia, S.; McBrayer, T. R.; Schinazi, R. F.; Watanabe, K. A.; Otto, M. J.; Furman, P. A.; Stec, W. J.; Patterson, S. E.; Pankiewicz, K. W., Design, synthesis, and antiviral activity of 2'-deoxy-2'-fluoro-2'-C-methylcytidine, a potent inhibitor of hepatitis C virus replication. *J Med Chem* **2005**, *48* (17), 5504-8.
61. Sofia, M. J.; Bao, D.; Chang, W.; Du, J.; Nagarathnam, D.; Rachakonda, S.; Reddy, P. G.; Ross, B. S.; Wang, P.; Zhang, H. R.; Bansal, S.; Espiritu, C.; Keilman, M.; Lam, A. M.; Steuer, H. M.; Niu, C.; Otto, M. J.; Furman, P. A., Discovery of a beta-d-2'-deoxy-2'-alpha-fluoro-2'-beta-C-methyluridine nucleotide prodrug (PSI-7977) for the treatment of hepatitis C virus. *J Med Chem* **2010**, *53* (19), 7202-18.
62. Pettersen, E. F.; Goddard, T. D.; Huang, C. C.; Couch, G. S.; Greenblatt, D. M.; Meng, E. C.; Ferrin, T. E., UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* **2004**, *25* (13), 1605-12.
63. Pallan, P. S.; Greene, E. M.; Jicman, P. A.; Pandey, R. K.; Manoharan, M.; Rozners, E.; Egli, M., Unexpected origins of the enhanced pairing affinity of 2'-fluoro-modified RNA. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39* (Copyright (C) 2017 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.), 3482-3495.

10

20

30

40

50

64. Jinek, M.; Coyle, S. M.; Doudna, J. A., Coupled 5' nucleotide recognition and processivity in Xrn1-mediated mRNA decay. *Mol Cell* **2011**, *41* (5), 600-8.
65. Brautigam, C. A.; Steitz, T. A., Structural principles for the inhibition of the 3'-5' exonuclease activity of Escherichia coli DNA polymerase I by phosphorothioates. *J Mol Biol* **1998**, *277* (2), 363-77.
66. Akabane-Nakata, M.; Erande, N. D.; Kumar, P.; Degaonkar, R.; Gilbert, J. A.; Qin, J.; Mendez, M.; Woods, L. B.; Jiang, Y.; Janas, M. M.; O'Flaherty, D. K.; Zlatev, I.; Schlegel, M. K.; Matsuda, S.; Egli, M.; Manoharan, M., siRNAs containing 2'-fluorinated Northern-methanocarbacyclic (2'-F-NMC) nucleotides: in vitro and in vivo RNAi activity and inability of mitochondrial polymerases to incorporate 2'-F-NMC NTPs. *Nucleic Acids Res* **2021**, *49* (5), 2435-2449.
67. Szymanski, M. R.; Kuznetsov, V. B.; Shumate, C.; Meng, Q.; Lee, Y. S.; Patel, G.; Patel, S.; Yin, Y. W., Structural basis for processivity and antiviral drug toxicity in human mitochondrial DNA replicase. *Embo j* **2015**, *34* (14), 1959-70.
68. Arnold, J. J.; Smidansky, E. D.; Moustafa, I. M.; Cameron, C. E., Human mitochondrial RNA polymerase: structure-function, mechanism and inhibition. *Biochim Biophys Acta* **2012**, *1819* (9-10), 948-60.
69. Reddy, P. G.; Bao, D.; Chang, W.; Chun, B. K.; Du, J.; Nagarathnam, D.; Rachakonda, S.; Ross, B. S.; Zhang, H. R.; Bansal, S.; Espiritu, C. L.; Keilman, M.; Lam, A. M.; Niu, C.; Steuer, H. M.; Furman, P. A.; Otto, M. J.; Sofia, M. J., 2'-deoxy-2'- α -fluoro-2'- β -C-methyl 3',5'-cyclic phosphate nucleotide prodrug analogs as inhibitors of HCV NS5B polymerase: discovery of PSI-352938. *Bioorg Med Chem Lett* **2010**, *20* (24), 7376-80.
70. Chang, W.; Bao, D.; Chun, B. K.; Naduthambi, D.; Nagarathnam, D.; Rachakonda, S.; Reddy, P. G.; Ross, B. S.; Zhang, H. R.; Bansal, S.; Espiritu, C. L.; Keilman, M.; Lam, A. M.; Niu, C.; Steuer, H. M.; Furman, P. A.; Otto, M. J.; Sofia, M. J., Discovery of PSI-353661, a Novel Purine Nucleotide Prodrug for the Treatment of HCV Infection. *ACS Med Chem Lett* **2011**, *2* (2), 130-5.
71. Reddy, P. G.; Chun, B. K.; Zhang, H. R.; Rachakonda, S.; Ross, B. S.; Sofia, M. J., Stereoselective synthesis of PSI-352938: a β -D-2'-deoxy-2'- α -fluoro-2'- β -C-methyl-3',5'-cyclic phosphate nucleotide prodrug for the treatment of HCV. *J Org Chem* **2011**, *76* (10), 3782-90.

10

20

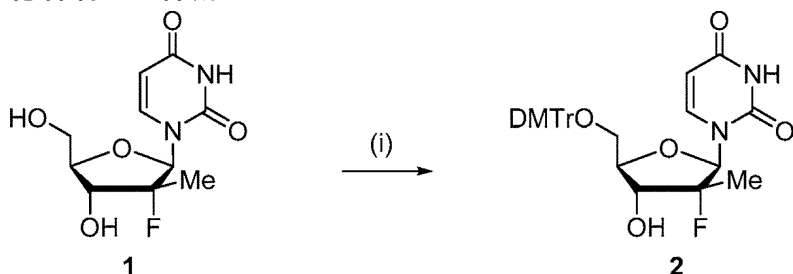
30

【 0 7 3 6 】

補足情報

実験項

化合物2の合成



40

【 0 7 3 7 】

化合物1¹ (10.1g、38.8mmol) の無水ピリジン (100mL) 溶液に0℃でDMTrCl (14.5g、42.7mmol) を加えた。反応混合物を周囲温度で16時間攪拌してから、MeOHの添加によってクエンチした。溶媒を減圧下で除去し、残渣をCH₂Cl₂と飽和NaHCO₃水溶液とで抽出した。有機層を分離し、無水Na₂SO₄で乾燥し、濾過し、濃縮した。その粗物質をフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CH₂Cl₂中、0-4% MeOH) で精製することにより、化合物2 (20.0g、35.6mmol、92%、R_f=0.36; CH₂Cl₂中の4% MeOHで展開) を得た。

50

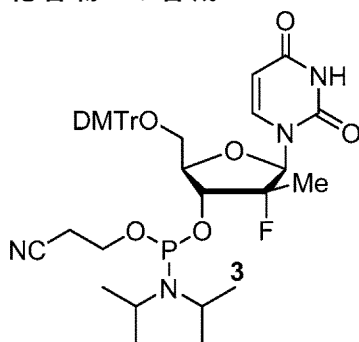
¹H NMR

(400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 11.52 (s, 1 H), 7.84 (d, *J* = 8.0 Hz, 1 H), 7.40 – 7.31 (m, 4 H), 7.28 – 7.23 (m, 4 H), 6.92 – 6.90 (m, 4 H), 6.03 (d, *J* = 19.2 Hz, 1 H), 5.78 (d, *J* = 8.0 Hz, 1 H), 5.14 (d, *J* = 8.0 Hz, 1 H), 4.13 – 3.97 (m, 2 H), 3.74 (s, 6 H), 3.42 (dd, *J* = 11.0, 3.8 Hz, 1 H), 3.34 – 3.31 (m, 1 H), 1.33 (s, 3 H), 1.27 (s, 3 H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ 167.85, 162.70, 158.17, 158.06, 150.43, 144.54, 135.31, 134.92, 134.25, 131.18, 129.80, 128.18, 127.94, 127.74, 127.43, 126.85, 101.86, 101.34, 99.90, 86.02, 80.06, 71.25, 61.35, 55.06, 55.05, 16.52, 16.32. ¹⁹F NMR (376 MHz, DMSO-*d*₆): δ -162.62. HRMS calc. for C₃₁H₃₂FN₂O₇ [M + H]⁺ 563.2194, found 563.2200.

10

【 0 7 3 8 】

化合物 3 の合成



20

化合物 2¹ (8.00 g、14.2 mmol) の無水CH₂Cl₂ (80 mL) および N,N-ジイソプロピルエチルアミン (9.89 mL、56.8 mmol) 溶液に、2-シアノエチル N,N-ジイソプロピルクロロホスホラミダイト (5.00 g、21.1 mmol) を加えた。反応混合物をアルゴン雰囲気下、周囲温度で 16 時間攪拌した。反応混合物を CH₂Cl₂ (300 mL) で希釈してから飽和 NaHCO₃ 水溶液 (100 mL) で洗浄した。有機層を分離し、無水 Na₂SO₄ で乾燥し、濾過し、濃縮した。その粗物質をフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン類中、0-50% EtOAc) で精製することにより、化合物 3 (9.71 g、12.7 mmol、90%、*R*_f = 0.15、0.25、ヘキサン類中の 50% EtOAc で展開) を白色泡状物として得た。

30

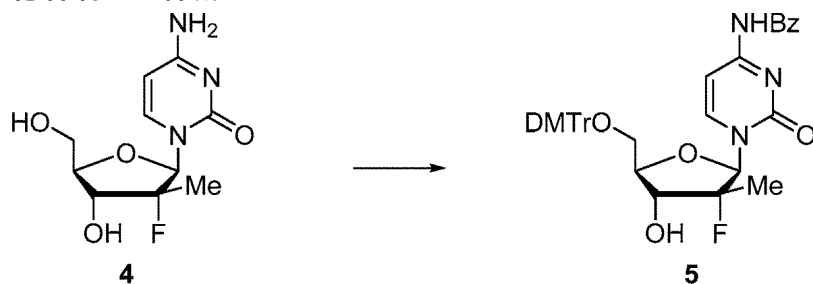
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 11.55 (s, 1 H), 7.91 – 7.88 (m, 1 H), 7.40 – 7.23 (m, 9 H), 6.92 – 6.88 (m, 4 H), 6.08 (d, *J* = 10.8 Hz, 1 H), 5.08 (brs, 1 H), 4.49 – 4.37 (m, 1 H), 4.12 – 4.07 (m, 1 H), 3.80 – 3.61 (m, 8 H), 3.56 – 3.40 (m, 5 H), 2.79 (t, *J* = 5.8 Hz, 1 H), 2.59 – 2.53 (m, 1 H), 1.43 – 1.37 (m, 3 H), 1.13 – 0.92 (m, 12 H). ³¹P NMR (162 MHz, DMSO-*d*₆): δ 155.13, 154.08. ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ 162.64, 158.21, 158.20, 150.38, 144.42, 144.39, 139.29, 135.09, 134.99, 134.83, 134.70, 129.90, 129.87, 129.85, 127.87, 127.86, 127.83, 127.76, 126.90, 126.85, 118.97, 118.62, 113.19, 113.17, 101.99, 100.91, 99.45, 88.41, 86.15, 79.71, 73.06, 58.23, 58.07, 58.00, 57.85, 55.03, 55.01, 55.00, 54.98, 42.69, 42.65, 42.59, 42.55, 24.31, 24.28, 24.25, 24.23, 24.21, 24.18, 24.15, 24.13, 19.76, 19.72, 19.70, 19.66, 17.22, 17.02, 16.85, 16.65. ¹⁹F NMR (376 MHz, DMSO-*d*₆): δ -160.84. HRMS calc. for C₄₀H₄₈FN₄NaO₈P [M + Na]⁺ 785.3092, found 785.3098.

40

【 0 7 3 9 】

50

化合物5の合成



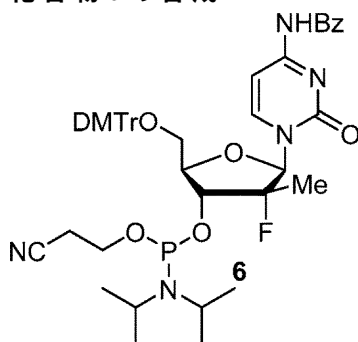
化合物4 (5.00 g、19.3 mmol) の無水DMF (80 mL) 溶液に無水安息香酸 (4.80 g、21.2 mmol) を加えた。反応混合物を周囲温度で24時間攪拌してから、溶媒を減圧下で除去した。残渣をピリジンと共に2回コエバポレーションし、それ以上精製することなく次の段階に使用した。その粗物質の無水ピリジン (80 mL) 溶液に0°CでDMTrCl (7.19 g、21.2 mmol) を加えた。反応混合物を周囲温度で16時間攪拌してから、MeOHの添加によってクエンチした。溶媒を減圧下で除去し、残渣をCH₂Cl₂と飽和NaHCO₃水溶液とで抽出した。有機層を分離し、無水Na₂SO₄で乾燥し、濾過し、濃縮した。その粗物質をフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン類中の0-80% EtOAc) で精製することにより、化合物5 (9.46 g、14.2 mmol、74%、R_f = 0.33; ヘキサン類/EtOAc = 1:3で展開) を得た。

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 11.33

(s, 1 H), 8.40 (d, *J* = 7.6 Hz, 1 H), 8.00 – 7.98 (m, 2 H), 7.65 – 7.61 (m, 1 H), 7.54 – 7.50 (m, 2 H), 7.42 – 7.34 (m, 4 H), 7.30 – 7.25 (m, 5 H), 7.16 (d, *J* = 7.6 Hz, 1 H), 6.95 – 6.91 (m, 4 H), 6.21 (d, *J* = 18.4 Hz, 1 H), 5.80 (d, *J* = 7.2 Hz, 1 H), 4.21 – 4.04 (m, 2 H), 3.77 (s, 3 H), 3.76 (s, 3 H), 3.47 – 3.37 (m, 2 H), 1.31 (d, *J* = 22.4 Hz, 3 H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ 167.37, 163.32, 158.21, 158.19, 154.53, 144.20, 135.47, 135.06, 133.05, 132.78, 129.82, 129.66, 128.45, 128.44, 127.99, 127.85, 126.94, 101.63, 100.18, 96.68, 86.15, 80.15, 70.99, 70.85, 61.08, 55.01, 16.45, 16.25. ¹⁹F NMR (376 MHz, DMSO-*d*₆): δ -163.72. HRMS calc. for C₃₈H₃₇FN₃O₇ [M + H]⁺ 666.2616, found 666.2620.

【0740】

化合物6の合成



化合物5 (9.40 g、14.1 mmol) の無水CH₂Cl₂ (70 mL) 溶液に2-シアノエチルN,N',N'-テトライソプロピルホスホロジアミダイト (5.37 mL、16.9 mmol) および4,5-ジシアノイミダゾール (1.67 g、14.1 mmol) を加えた。反応混合物をアルゴン雰囲気下、周囲温度で16時間攪拌した。反応混合物をCH₂Cl₂ (300 mL) で希釈してから飽和NaHCO₃水溶液 (150 mL) で洗浄した。有機層を分離し、無水Na₂SO₄で乾燥し、濾過

し、濃縮した。その粗物質をフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン類中の30-50% EtOAc）で精製することにより、6（11.6 g、13.4 mmol、95%、 $R_f = 0.18$ 、0.25、ヘキサン類中の50% EtOAcで展開）を淡黄色泡状物として得た。

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ

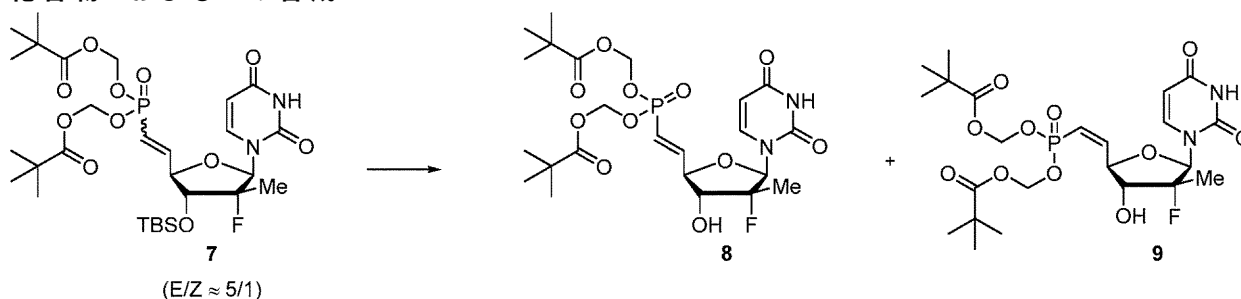
11.35 (s, 1 H), 8.43 (d, $J = 7.6$ Hz, 1 H), 8.00 – 7.97 (m, 2 H), 7.65 – 7.61 (m, 1 H), 7.53 – 7.50 (m, 2 H), 7.44 – 7.26 (m, 9 H), 7.11 (d, $J = 8.0$ Hz, 1 H), 6.94 – 6.90 (m, 4 H), 6.29 – 6.24 (m, 1 H), 4.54 – 4.37 (m, 1 H), 4.20 – 4.14 (m, 1 H), 3.82 – 3.75 (m, 7 H), 3.65 – 3.43 (m, 6 H), 2.78 (t, $J = 5.8$ Hz, 1 H), 2.61 – 2.54 (m, 1 H), 1.45 – 1.38 (m, 3 H), 1.17 – 0.93 (m, 12 H). ^{31}P NMR (162 MHz, DMSO- d_6): δ 155.21, 154.16. ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ 167.30, 163.40, 158.24, 154.47, 144.11, 135.18, 135.01, 134.95, 134.85, 133.00, 132.76, 129.89, 129.87, 129.80, 129.77, 128.42, 127.94, 127.92, 127.90, 127.86, 126.99, 126.93, 118.98, 118.65, 113.26, 113.23, 113.22, 101.22, 101.02, 100.99, 99.76, 99.55, 99.52, 96.77, 89.39, 86.26, 79.92, 72.90, 60.60, 58.22, 58.06, 57.95, 57.80, 55.02, 55.00, 54.98, 54.96, 54.95, 54.93, 42.68, 42.58, 24.32, 24.31, 24.26, 24.22, 24.16, 24.12, 19.76, 19.74, 19.70, 19.68, 17.16, 16.96, 16.74, 16.54. ^{19}F NMR (376 MHz, DMSO- d_6): δ -161.78. HRMS calc. for $\text{C}_{47}\text{H}_{54}\text{FN}_5\text{O}_8\text{P}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 866.3694, found 866.3688.

10

20

【0741】

化合物8および9の合成



30

報告された手順²に従って化合物7を合成し、ジアステレオマーの混合物 (E/Z ≈ 5/1)

として使用した。化合物7（15.0 g、22.1 mmol）のHCOOH/H₂O（200 mL、1:1、v:v）溶液を40℃で16時間攪拌してから、溶媒を減圧下で除去した。残渣をフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィー（AcOEt）で生成することにより、化合物8（7.51 g、13.31 mmol、60%、 $R_f = 0.36$ ；ヘキサン類中の80% EtOAcで展開）を白色泡状物として、また別途、化合物9（1.56 g、2.77 mmol、12%、 $R_f = 0.32$ ；ヘキサン類中の80% EtOAcで展開）を白色泡状物として得た。化合物8：

40

50

^1H NMR (500 MHz, CD_3OD): δ 7.48 (d, $J = 8.5$ Hz, 1 H), 7.00 (ddd, $J = 24.0, 17.0, 4.5$ Hz, 1 H), 6.26 – 6.00 (m, 2 H), 5.75 (d, $J = 8.0$ Hz, 1 H), 5.73 – 5.65 (m, 4H), 4.52 – 4.46 (m, 1 H), 4.03 – 3.77 (m, 1 H), (d, $J = 22.5$, 3 H), 1.23 (s, 9 H), 1.22 (s, 9 H). ^{31}P NMR (202MHz, CD_3OD): δ 18.30. ^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD): δ 178.19, 173.10, 165.71, 152.06, 150.87, 142.29, 119.64, 117.74, 103.70, 102.56, 100.75, 83.30, 82.24, 82.00, 78.19, 61.66, 49.58, 39.90, 27.39, 21.01, 17.13, 16.88, 14.62. ^{19}F NMR (470 MHz, CD_3OD): δ -161.65. HRMS calc. for $\text{C}_{23}\text{H}_{34}\text{FN}_2\text{NaO}_7\text{P}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 587.1782, found 587.1789. 化合物 9:

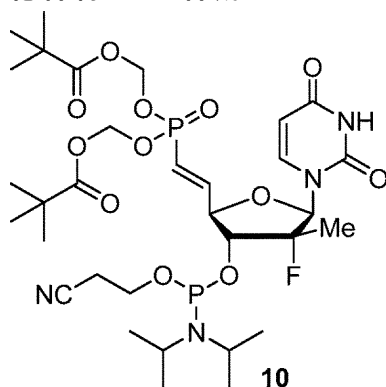
10

^1H NMR (500 MHz, CD_3OD): δ 7.58 (d, $J = 8.0$ Hz, 1 H), 6.79 (ddd, $J = 55.0, 13.5, 9.0$ Hz, 1 H), 6.18 – 5.94 (m, 2 H), 5.77 – 5.65 (m, 5 H), 5.30 – 5.23 (m, 1 H), 4.00 – 3.66 (m, 1 H), 1.37 (d, $J = 22.5$, 3 H), 1.23 (s, 9 H), 1.22 (s, 9 H). ^{31}P NMR (202MHz, CD_3OD): δ 16.21. ^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD): δ 178.19, 178.11, 165.76, 152.08, 150.93, 142.63, 122.64, 120.79, 103.49, 102.32, 100.52, 83.22, 83.17, 79.00, 78.98, 78.83, 78.82, 78.80, 39.89, 27.37, 17.30, 17.05. ^{19}F NMR (470 MHz, CD_3OD): δ -161.69. HRMS calc. for $\text{C}_{23}\text{H}_{35}\text{FN}_2\text{O}_7\text{P}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 565.1963, found 565.1965.

20

【 0 7 4 2 】

化合物 10 の合成



30

化合物 8 (2.40 g、4.26 mmol) および 5- (エチルチオ) -1H-テトラゾール (0.54 g、4.26 mmol) の無水アセトニトリル (40 mL) 溶液に 2-シアノエチル $\text{N}, \text{N}, \text{N}', \text{N}'$ -テトライソプロピルホスホルジアミダイト (1.54 g、5.12 mmol) を加えた。反応混合物を室温で 2 時間攪拌した。0.15% トリエチルアミンを含有する酢酸エチル/ヘキサン類 (2:8、v/v) での TLC 分析によって、生成物の形成が確認された。反応混合物を濾過し、濃縮し、シリカゲルカラムにローディングした。0.15% トリエチルアミンを含有するヘキサン類中の 50% 酢酸エチルで試料を溶出させることにより、化合物 10 (2.40 g、3.14 mmol、74%、 $R_f = 0.12$ 、0.27、ヘキサン類中の 60% EtOAc で展開) を白色泡状物として得た。

40

50

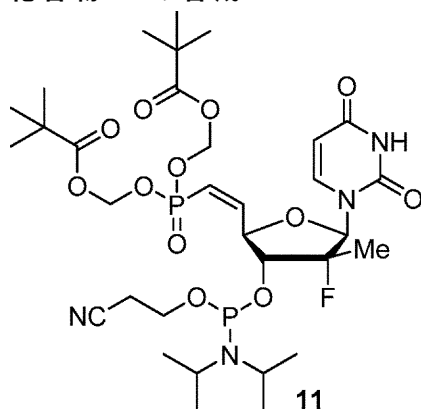
^1H NMR (500 MHz, CD_3CN): δ 9.31

(brs, 1 H), 7.35 – 7.27 (m, 1 H), 7.08 – 6.84 (m, 1 H), 6.26 – 5.94 (m, 2 H), 5.70 – 5.55 (m, 5 H), 4.59 – 4.49 (m, 1 H), 4.28 – 3.99 (m, 1 H), 3.91 – 3.82 (m, 1 H), 3.76 – 3.60 (m, 3 H), 2.86 – 2.71 (m, 2 H), 1.45 – 1.34 (m, 3H), 1.21 – 1.16 (m, 30 H). ^{31}P NMR (202MHz, CD_3CN): δ 153.40, 151.44, 17.94, 17.24. ^{13}C NMR (101 MHz, CD_3CN) δ 177.68, 177.64, 163.66, 163.65, 151.40, 149.06, 148.47, 120.62, 119.90, 118.74, 103.71, 82.87, 82.83, 82.82, 82.78, 80.85, 79.24, 59.52, 59.32, 44.31, 44.27, 44.19, 44.15, 39.48, 39.46, 27.20, 27.18, 25.16, 25.08, 25.05, 24.96, 24.89, 20.93, 20.85, 17.87, 17.84, 17.62, 17.59. ^{19}F NMR (470 MHz, CD_3CN): δ -158.78. HRMS calc. for $\text{C}_{32}\text{H}_{35}\text{FN}_2\text{O}_7\text{P}_2$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 765.3041, found 765.3050.

10

【 0 7 4 3 】

化合物 11 の合成



20

化合物 9 (1.20 g、2.13 mmol) および 5- (エチルチオ) -1H-テトラゾール (0.27 g、2.13 mmol) の無水アセトニトリル (20 mL) 溶液に 2-シアノエチル N,N,N',N' -テトライソプロピルホスホルジアミダイト (0.77 g、2.56 mmol) を加えた。反応混合物を室温で 2 時間攪拌した。0.15 % トリエチルアミンを含有する酢酸エチル/ヘキサン類 (2: 8、v/v) での TLC 分析によって、生成物の形成が確認された。反応混合物を濾過し、濃縮し、シリカゲルカラムにローディングした。0.15 % トリエチルアミンを含有するヘキサン類中の 50 % 酢酸エチルで試料を溶出させることにより、化合物 11 (1.22 g、1.59 mmol、75 %、 $R_f = 0.18$ 、0.34、ヘキサン類中の 60 % EtOAc で展開) を白色泡状物として得た。

30

^1H NMR (500 MHz, CD_3CN): δ 9.30

(brs, 1 H), 7.39 – 7.34 (m, 1 H), 6.79 – 6.53 (m, 1 H), 6.20 – 5.90 (m, 2 H), 5.72 – 5.56 (m, 5 H), 5.43 – 5.34 (m, 1 H), 4.36 – 3.96 (m, 1 H), 3.90 – 3.44 (m, 4 H), 2.86 – 2.58 (m, 2 H), 1.48 – 1.34 (m, 3H), 1.26 – 1.14 (m, 30 H). ^{31}P NMR (202MHz, CD_3CN): δ 152.43, 150.46, 15.01, 14.84. ^{13}C NMR (101 MHz, CD_3CN) δ 177.62, 177.58, 177.56, 177.55, 163.73, 163.72, 151.40, 148.47, 119.77, 103.46, 82.82, 82.77, 82.72, 82.66, 82.59, 82.54, 80.05, 79.89, 79.73, 79.58, 79.53, 79.41, 77.03, 59.71, 59.56, 59.53, 46.36, 46.30, 44.26, 44.14, 44.10, 43.97, 39.47, 39.46, 27.17, 27.14, 25.19, 25.11, 25.04, 25.02, 24.97, 24.94, 23.41, 22.62, 21.06, 21.01, 20.99, 20.93, 18.38, 18.33, 18.12, 18.08, 17.97, 17.95, 17.72, 17.69. ^{19}F NMR (470 MHz, CD_3CN): δ -157.27. HRMS calc. for $\text{C}_{32}\text{H}_{35}\text{FN}_2\text{O}_7\text{P}_2$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 765.3041, found 765.3039.

40

50

【0744】

固相オリゴヌクレオチド合成。オリゴヌクレオチドは、標準的な固相合成および脱保護プロトコルを使って、ABIシンセサイザーで合成した³。合成は、市販されているウリジンの(5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2'-デオキシ-2'-フルオロ-)、5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2'-O-(tert-ブチルジメチルシリル)-、または5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2'-O-メチル-3'-O-(2-シアノエチル-N,N-ジイソプロピル)ホスホラミダイトモノマー、4-N-アセチルシチジン、6-N-ベンゾイルアデノシン、および2-N-イソブチリルグアノシンを使用し、1 μ molスケールで行った。3'ヌクレオシドのスクシネートまたはGalNAcリガンドのどちらかを、ポアサイズ約500 Åのコントロールドポアガラスに長鎖アルキルアミンを介してコンジュゲートした。合成が完了したら、オリゴヌクレオチドをアセトニトリル中の0.5 M無水ピペリジンで10分間処理してから、無水アセトニトリルでよく洗浄し、窒素を使って乾燥させた。水酸化アンモニウムを使って30°Cで17時間、オリゴヌクレオチドを固形支持体から切り離し、脱保護した。ナイロンシリンジフィルタ(0.45 μ m)による濾過後に、オリゴヌクレオチドを、その後の精製のために貯蔵するか、またはRNAの場合には、2'-OHを脱保護するために60°Cにおいて10分間、Et₃N・HFで処理した。オリゴヌクレオチドは、移動相(0.15 M NaCl、10 % MeCNおよび1.0 M NaBr、10 % MeCN)の適当な勾配を用いるIEX-HPLCを使って精製し、水を溶離液とするサイズ排除クロマトグラフィーを使って脱塩した。次に、260 nmにおける吸光度を測定することにより、以下の吸光係数を使って、オリゴヌクレオチドを定量した:A、13.86;T/U、7.92;C、6.57;およびG、10.53。それぞれ分析用アニオン交換クロマトグラフィー質量分析によって、純度を決定し、実体を検証した(表9)。

10

20

【0745】

熱変性温度の決定。熱変性温度は、昇温(1°C/分)しながら260 nmにおける吸光度をモニターすることによって、PBS(137 mM NaCl、2.7 mM KCl、10 mM Na₂HPO₄、1.8 mM KH₂PO₄、pH7.4)中、または高塩濃度PBS(931.6 mM NaCl、18.4 mM KCl、68 mM Na₂HPO₄、12.2 mM KH₂PO₄、pH7.4)中、等モル濃度の両鎖(2.5 μ M)で測定した。値を一次導関数の極大として報告した。値は少なくとも2回の実験の平均値である。

【0746】

ハイブリダイゼーションの熱力学的パラメータの決定。熱力学的パラメータは、ファントホッフ法および融解曲線のベースラインフィッティングを使って決定した。これはCary WinUV Thermalソフトウェアで可能である。簡単に述べると、ユーザーは、ハイブリッド形成率への変換を可能にするベースラインを定義する。ユーザーが入力した総濃度および反応分子数を使って、平衡式がファントホッフプロットに変換される。線形領域の上限と下限を定義することにより、それぞれエンタルピーパラメータとエントロピーパラメータに対応する傾きとy切片とを算出することができる。各二重鎖を調製し、3回解析した。融解曲線は二重に収集し、結果を平均することで報告する値を得た。

30

【0747】

3'または5'特異的エキソヌクレアーゼに対する安定性。3'-または5'-特異的エキソヌクレアーゼに対する安定性を評価するために、修飾オリゴヌクレオチドを、50 mM Tris(pH7.2)、10 mM MgCl₂中、または50 mM 酢酸ナトリウム(pH6.5)、10 mM MgCl₂中に、0.1 mg/mLの最終濃度で調製した。エキソヌクレアーゼ(150 mU/mL SVP DEまたは500 mU/mLホスホジエステラーゼII)、分析は、IEX HPLC(Dionex DNA Pac PA200、4×250 mm)により、7.5分で37-52 %移動相(1 M NaBr、20 mM リン酸ナトリウム、pH11、15 % MeCN;固定相:20 mM リン酸ナトリウム、15 % MeCN、pH11)の勾配を使用して、1 mL/分の流量で行った。試料を24時間まで、所与の時点で分析した。完全長オリゴヌクレオチドの量を260 nmにおける吸光度曲線下面積として決定した。完全長オリゴヌクレオチド率は、関心対象の時点における曲線下面積をt=0における曲線下面積で割り、それを100倍することによって算出した。酵素の活性は、

40

50

末端ホスホロチオエート連結部を有するオリゴデオキシチミジル酸（3'-または5'-エキソヌクレアーゼ活性用にそれぞれ5'-T₁₉・Tまたは5'-T・T₁₉、ここで・はホスホロチオエート連結部を示す）を含めることによって、実験ごとに検証した。酵素の各アリコートは実験直前に融解した。半減期は一次速度論へのフィッティングによって決定した。

【0748】

インビトロでのmRNA定量。RNAiMAX試薬（ThermoFisher）を製造者の推奨に従って使用することにより、初代マウス肝細胞にオリゴヌクレオチドをトランスフェクトした。簡単に述べると、細胞をトランスフェクションの直前に融解し、10%ウシ胎児血清を捕捉したウィリアム培地E中、約5000細胞/ウェルの接種密度で、384ウェルプレートにプレイングした。プレインキュベートした脂質/siRNA複合体（0.1μL RNAi Max、siRNA、5μL Opti-MEM、15分間、どちらの試薬もThermo Fisher製）を384ウェルコラーゲンコートプレート（BioCoat、Corning）に加えた。細胞を5%CO₂の雰囲気下、37℃で、20時間インキュベートした。次に、培地を除去し、細胞を洗浄し、溶解した。Dynabeads mRNA単離キット（Invitrogen）を製造者のプロトコールに従って使用することで、RNAを抽出してから、ABI high capacity cDNA逆転写キットを使って逆転写を行った。定量は、リアルタイム定量PCRによって達成した。ここでは、cDNA（2μL）を、0.5μLマウスGAPDH TaqManプローブを含有するマスターミックス、および5μLの標的TaqManプローブ、および0.5μL Lightcycler 480プローブマスターミックスに加えた。増幅はABI 7900HT-RT-PCRシステム（Applied Biosystems）において、ΔΔCt（RQ）アッセイを使って行った。各データ点は少なくとも4つの生物学的レプリケートで試験された。各ウェルをGAPDH対照に正規化し、非ターゲットイングsiRNAで処置した細胞との比較で、残存するmRNAを算出した。IC₅₀値はGraphPad Prismを使った近似曲線から算出された。

【0749】

オンターゲットおよびオフターゲットルシフェラーゼレポーターアッセイ。COS-7細胞を、10%ウシ胎児血清を補足したダルベッコ変法イーグル培地中、37℃、5%CO₂で培養した。96ウェルプレート（15,000細胞/ウェル）において、細胞に、10ngのルシフェラーゼレポータープラスミドと、5倍希釈液で0.64pMから50nMまでのsiRNAとを、2μLのLipofectamine 2000（Thermo Fisher Scientific）を製造者の説明書に従って使用することにより、コトランスフェクトした。トランスフェクションの48時間後に、二重ルシフェラーゼアッセイ（Promega）を製造者の説明書に従って行うために、細胞を回収した。オンターゲットレポータープラスミドは、ウミシイタケルシフェラーゼの3'非翻訳領域（3'UTR）にアンチセンス鎖に対して完全に相補的な単一部位を含有した。オフターゲットレポータープラスミドは、ウミシイタケルシフェラーゼの3'UTRに、19ヌクレオチドスペーサー（TAATATTACATAAATAAAA）で隔てられた4つのタンデムシード相補部位を含有した。どちらのプラスミドもトランスフェクション対照としてホタルルシフェラーゼを同時発現した。

【0750】

RNA-seqを用いるオフターゲット活性評価。初代ラット肝細胞（BioreclamationIVT）を、96ウェルコラーゲンIプレコートプレート（Gibco）に、95μLのINVITROGRO CP Rodent培地（BioreclamationIVT）中、およそ50,000細胞/ウェルで播種した。プレインキュベートした脂質/siRNA複合体（3.75μL Opti-MEM中、0.25μL RNAiMax（Thermo Fisher Scientific）および1μL siRNA、15分間）を、細胞にトランスフェクトするために加え、5%CO₂の雰囲気下、37℃で48時間インキュベートした。siRNAの最終濃度は50nMとし、各siRNAを四重に試験した。培地を除去し、miRNeasy 96キット（Qiagen）を使ってRNAを抽出し、TruSeq Stranded Total RNAライブラリー調製キット（Illumina）でcDNAライブラリーを調製し、HiSeqまたはNextSeq500シーケンサー（Illumina）で配列決定した。これらはいずれも製造者の説明書に従った。fastq-mcfを使って、生のRNAseqリードを25の最小平均クオリティスコア（minimal mean quality score）および36の最小残存長（minimal remaining

length) でフィルタリングした。STAR (超高速ユニバーサルRNAseqアライナー (ultrafast universal RNAseq aligner)) をデフォルトパラメータで使用して、フィルタリングされたリードを、ドブネズミ (*Rattus norvegicus*) ゲノム (Rnor_6.0) にアライメントした。ユニークにアライメントされたリードをfeature Countsによって数えた⁴。遺伝子発現変動解析はRパッケージDESeq2を使って行った。

【0751】

マウスにおけるsiRNA効力の解析。マウスを使用する手順はすべて、認定された研究室員により、地域、州および連邦の規制と合致するプロトコルを使って行われた。実験プロトコルは、施設内動物実験委員会、国際実験動物管理公認協会 (認定番号:001345) および実験動物福祉局 (認定番号:#A4517-01) によって承認された。すべての対照動物は施設到着後に無作為にケージに割り当てられた。動物研究に必要な試料数を算出するために、本発明者らは、最終的に必要な数を、IACUCガイドラインに従って要求されるとおり、結果として得られるデータセットが最小限の動物数を利用して信頼のおけるものとなるような数と決定した。

【0752】

およそ6~8週齢の野生型C57BL/6雌マウスをCharles River Laboratoriesから取得した。動物 (各群n=3) に、1×PBSに0.3mg/mLまたは0.1mg/mLのどちらかに希釈したGalNAc-siRNAコンジュゲートを、PBS中に体重1gあたり10μLの注射体積で調製した10mg/kgまたは1mg/kgの単回皮下注射によって投与した。肝臓中のmRNAを評価するために、血液の収集後にマウスを二酸化炭素で安楽死させ、肝臓を回収し、液体窒素で瞬間凍結した。肝臓組織をSPEX GenoGrinderで加工して、少量の粉末化された組織をチューブに移し、miRNeasyマイクロキット (Qiagenカタログ番号217084) を使って溶解した。cDNA合成は、High-capacity cDNA逆転写キット (applied Biosystems) で達成した。1反応につき1μLの10×緩衝液、0.4μLの25×dNTP、1μLのランダムプライマー、0.5μLの逆転写酵素、0.5μLのRNase阻害剤および6.6μLの水の混合物を、各ウェルに加えた。関心対象のmRNAのレベルをRT-qPCRによって定量し、GAPDHのレベルに正規化した。値は、対照siRNAで処置した試料中に存在する標的mRNAのレベルと比較したパーセントとして表される。すべてのデータ点は2回の測定の実験値である。

【0753】

siRNA二重鎖は以前に報告されているようにLNPで製剤化された⁵。LNP (50% MC3、38.5% コレステロールおよび10% DSPC、1.5% C₁₄ PEG2000脂質) 製剤化siRNAを、10mL/kgの体積で尾静脈から静脈内投与するために、0.003mg/kgおよび0.001mg/kgに希釈した。既述のBiophenアッセイ⁶を使って循環F7タンパク質レベルをアッセイするために、投与前と投与後のさまざまな時点で血清を収集した。

【0754】

構造モデルおよび分子力学によるエネルギー最小化。全2'-F RNA二重鎖およびヒトAgo2-miR20a複合体の結晶構造をProtein Data Bank (www.rcsb.org) から取得した。UCSF Chimera (Mac用バージョン1.13) の構造編集オプション⁷を使って2'-F/Meヌクレオチドを組み入れ、Amber ff 14SB力場をUCSF Chimeraに実装されているGasteigerポテンシャルと組み合わせて使用することにより、すべてのRNAおよびRNA-タンパク質複合体モデルをエネルギー最小化した。精密化には、さらなる幾何学的変化が起こらないことによって判断した収束に達するまで、最急降下法および共役勾配法型の最小化をどちらも含めた。図はすべてプログラムUCSF Chimeraを使って生成させた。

【0755】

オリゴヌクレオチドの特性解析

(表9) 修飾オリゴヌクレオチドのMS (m/z) 分析^a

10

20

30

40

50

オリゴヌクレオチド	配列 (5'-3')	質量 (m/z)	
		計算値	実測値
3	UACAGU _F CUAUGU	3759.3	3758.7
4	UACAGU _F MeCUAUGU	3773.3	3772.8
5	UACAGUC _F UAUGU	3759.3	3758.3
6	UACAGUC _F MeUAUGU	3773.3	3772.0
13(U _F /Me)	dT ₁₀ U _F /Me	6039.9	6039.1
13(U _F)	dT ₁₀ U _F	6025.9	6024.8
13(C _F /Me)	dT ₁₉ C _F /Me	6038.9	6038.1
13(C _F)	dT ₁₉ C _F	6024.9	6025.1
14(U _F /Me)	dT ₁₈ U _F /Me dT	6039.9	6039.2
14(U _F)	dT ₁₈ U _F dT	6025.9	6025.7
14(C _F /Me)	dT ₁₈ C _F /Me dT	6038.9	6038.0
14(C _F)	dT ₁₈ C _F dT	6024.9	6024.2
15(U _F /Me)	dT ₁₈ U _F /Me U _F /Me	6057.9	6057.3
15(U _F)	dT ₁₈ U _F U _F	6029.8	6029.1
15(C _F /Me)	dT ₁₈ C _F /Me C _F /Me	6055.9	6055.2
15(C _F)	dT ₁₈ C _F C _F	6027.9	6027.1
16(U _F /Me)	dT ₁₉ •U _F /Me	6056.0	6055.1
16(U _F)	dT ₁₉ •U _F	6041.9	6041.3
16(C _F /Me)	dT ₁₉ •C _F /Me	6055.0	6054.0
16(C _F)	dT ₁₉ •C _F	6040.9	6040.8
17(U _F /Me)	dT ₁₈ U _F /Me•dT	6055.9	6055.1
17(U _F)	dT ₁₈ U _F •dT	6041.9	6041.6
17(C _F /Me)	dT ₁₈ C _F /Me•dT	6054.9	6054.1
17(C _F)	dT ₁₈ C _F •dT	6040.9	6041.0
18(U _F /Me)	dT ₁₈ U _F /Me•U _F /Me	6073.9	6073.6
18(U _F)	dT ₁₈ U _F •U _F	6045.9	6045.4
18(C _F /Me)	dT ₁₈ C _F /Me•C _F /Me	6071.9	6071.2
18(C _F)	dT ₁₈ C _F •C _F	6043.9	6043.1
19(U _F /Me)	U _F /Me dT ₁₉	6039.9	6039.1

10

20

30

40

50

19(U _F)	U _{Fd} T ₁₉	6025.9	6025.3
19(C _{F/Mc})	C _{F/Mcd} T ₁₉	6038.9	6038.3
19(C _F)	C _{Fd} T ₁₉	6024.9	6023.9
20(U _{F/Mc})	dTU _{F/Mcd} T ₁₈	6039.9	6038.5
20(U _F)	dTU _{Fd} T ₁₈	6025.9	6025.6
21(U _{F/Mc})	U _{F/Mc} U _{F/Mcd} T ₁₈	6362.1	6361.6
21(U _F)	U _F U _{Fd} T ₁₈	6029.8	6028.6
21(C _{F/Mc})	C _{F/Mc} C _{F/Mcd} T ₁₈	6360.1	6359.4
21(C _F)	C _F C _{Fd} T ₁₈	6027.9	6027.1
22(U _{F/Mc})	U _{F/Mc} •dT ₁₉	6055.9	6054.9
22(U _F)	U _F •dT ₁₉	6041.9	6040.8
22(C _{F/Mc})	C _{F/Mc} •dT ₁₉	6054.9	6054.1
22(C _F)	C _F •dT ₁₉	6040.9	6039.9
23(U _{F/Mc})	dT•U _{F/Mcd} T ₁₈	6056.0	6054.6
23(U _F)	dT•U _{Fd} T ₁₈	6041.9	6041.3
24(U _{F/Mc})	U _{F/Mc} •U _{F/Mcd} T ₁₈	6378.1	6377.6
24(U _F)	U _F •U _{Fd} T ₁₈	6045.9	6044.7
24(C _{F/Mc})	C _{F/Mc} •C _{F/Mcd} T ₁₈	6376.1	6375.5
24(C _F)	C _F •C _{Fd} T ₁₈	6043.9	6043.1
25	A _F •a•C _{Fa} G _{Fu} G _{Fu} U _F •C _F U _{Fu} G _{Fc} U _{Fc} U _{Fa} U _{Fa} A _F •*	8590.2	8590.0
26	U _F •U _F •aU _{Fa} G _{Fa} G _{Fc} A _{Faga} A _{Fc} A _{Fc} U _{Fg} U _{Fu} •u	7583.9	7582.4
27	PU _F •U _F •aU _{Fa} G _{Fa} G _{Fc} A _{Faga} A _{Fc} A _{Fc} U _{Fg} U _{Fu} •u	7662.9	7663.3
28	U _{F/Mc} •U _F •aU _{Fa} G _{Fa} G _{Fc} A _{Faga} A _{Fc} A _{Fc} U _{Fg} U _{Fu} •u	7597.9	7597.7
29	PU _{F/Mc} •U _F •aU _{Fa} G _{Fa} G _{Fc} A _{Faga} A _{Fc} A _{Fc} U _{Fg} U _{Fu} •u	7676.9	7676.7
30	VPU _{F/Mc} •U _F •aU _{Fa} G _{Fa} G _{Fc} A _{Faga} A _{Fc} A _{Fc} U _{Fg} U _{Fu} •u	7673.9	7672.4
31	zVPU _{F/Mc} •U _F •aU _{Fa} G _{Fa} G _{Fc} A _{Faga} A _{Fc} A _{Fc} U _{Fg} U _{Fu} •u	7673.9	7672.3
32	Pu•U _F •aU _{Fa} G _{Fa} G _{Fc} A _{Faga} A _{Fc} A _{Fc} U _{Fg} U _{Fu} •U _{F/Mc} •u	7676.9	7676.7
33	Pu•U _F •aU _{Fa} G _{Fa} G _{Fc} A _{Faga} A _{Fc} A _{Fc} U _{Fg} U _{Fu} •U _{F/Mc} •U _{F/Mc}	7678.8	7679.0
34	A _F •a•G _{Fa} U _{Fg} A _{Fu} G _F U _{Fu} G _{Fa} A _{Fa} C _{Fu} A _{Fu} U _F •*	8678.2	8677.9
35	Pa•A _F •uA _{Fg} U _{Fu} U _{Fc} A _{Faac} A _{Fu} C _{Fa} U _{Fc} U _{Fu} •g•u	7595.9	7595.7
36	Pa•A _F •uA _{Fg} U _{F/Mc} U _{Fc} A _{Faac} A _{Fu} C _{Fa} U _{Fc} U _{Fu} •g•u	7609.9	7610.7
37	Pa•A _F •uA _{Fg} U _F U _{F/Mc} U _{Fc} A _{Faac} A _{Fu} C _{Fa} U _{Fc} U _{Fu} •g•u	7597.9	7598.0
38	Pa•A _F •uA _{Fg} U _{F/Mc} U _{F/Mc} U _{Fc} A _{Faac} A _{Fu} C _{Fa} U _{Fc} U _{Fu} •g•u	7611.9	7612.5
39	C _F •a•G _{Fg} A _{Fu} C _{Fa} U _F •C _F U _{Fc} A _{Fa} G _{Fu} C _{Fu} U _{Fa} A _F •*	8612.2	8611.7

10

20

30

40

50

40	u•Uf•aAfgAfcUfuGfagaUfgAfuCfcUfg•g•c	7627.0	7626.1
41	Pu•Uf•aAfgAfcUfuGfagaUfgAfuCfcUfg•g•c	7705.9	7706.4
42	Uf/Me•Uf•aAfgAfcUfuGfagaUfgAfuCfcUfg•g•c	7628.9	7627.7
43	PUf/Me•Uf•aAfgAfcUfuGfagaUfgAfuCfcUfg•g•c	7707.9	7707.9
44	Pu•Uf•aAfgAfcUf/Me•UfuGfagaUfgAfuCfcUfg•g•c	7707.9	7708.2
45	Cf/Me•a•GfgAfuCfaUf•Cf•UfcAfaGfuCfuUfaAf*	8626.2	8626.1
46	a•g•uguuCfuUf•Gf•Cfucuaaaca*	8686.5	8685.8
47	u•Gf•uuuauagagcaAfgAfacacu•g•u	7707.2	7706.6
48	u•Gf•uuuauagagcaAfgAfacacu•g•u	7709.2	7708.6
49	GGUfCfAfcUfCfUfCfAAGUfCfUfUfACfdT•dT	6629.0	6627.8
50	GUfAAGACfUfUfGAGAUfGfGUfCfCfdT•dT	6726.1	6724.9
51	GUf/Me•AAGACfUfUfGAGAUfGfGUfCfCfdT•dT	6740.1	6739.3
52	GUfAAGACf/Me•Uf/Me•Uf/Me•GAGAUfGfGUfCfCfdT•dT	6810.2	6809.3
53	GUf/Me•AAGACf/Me•Uf/Me•Uf/Me•GAGAUfGfGUfCfCfdT•dT	6838.3	6837.5
54	GGAUf/Me•Cf/Me•AUf/Me•Cf/Me•Uf/Me•AAGUf/Me•Cf/Me•Uf/Me•Cf/Me•dT	6783.3	6782.5
55	Cf•a•GfgAfuCfaUfCfUfCfAfaGfuCfuUfaCf*	8588.2	8557.2
58	g•Uf•aAfgAfcUfuGfagaUfgAfuCfcUfg•g•c	7666.0	7664.9
59	g•Uf•aAfgAfcUfuGfagaUfgAfuCfcUfg•g•c	7680.0	7679.1
60	g•Uf•aAfgAfcUfuGfagaUfgAfuCfcUfg•g•c	7694.0	7693.2
61	g•Uf•aAfgAfcUfuGfagaUfgAfuCfcUfg•g•c	7708.1	7707.0
62	Cf•a•GfgAfuCfaUf/Me•Cf/Me•Uf/Me•AfaGfuCfuUfaCf*	8630.3	8629.6
63	dTdAdCdAdGUfCdTdAdTdGdT	3639.4	3638.9
64	dTdAdCdAdGUf/Me•CdTdAdTdGdT	3653.4	3652.9
65	dTdAdCdAdGdUCfCdTdAdTdGdT	3653.4	3652.4
66	dTdAdCdAdGCf/Me•CdTdAdTdGdT	3667.4	3666.2

10

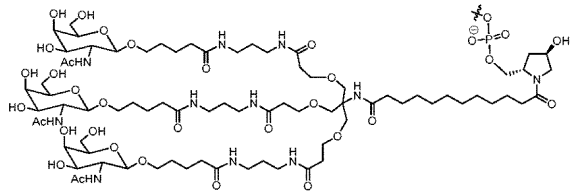
20

30

40

^a大文字 (B) = リボヌクレオチド、接頭辞 d (dB) = デオキシリボヌクレオチド、下付きの F (B_F) = 2'-フルオロヌクレオチド、小文字 (b) = 2'-OMeヌクレオチド、下付きの F/Me (B_{F/Me}) = 2'-F/Me修飾ヌクレオチド、• = ホスホロチオエート連結部、P = 5'-モノホスフェート、VP = 5'- (E) -ビニルホスホネート、zVP = 5'- (Z) -ビニルホスホネート、* = トリアンテナ型 GalNAcリガンド。

50



* (GalNAc) =

【 0 7 5 6 】
(表 1 0) 高塩濃度PBSにおける単一修飾二重鎖の熱変性温度^a

修飾鎖	$T_m[\Delta T_m](^{\circ}\text{C})$	
	ON2: 3'-r(AUGUCUGAUACA)	ON57: 3'-d(ATGTCACATACA)
ON1 5'-r(UACAGUCUAUGU)	61.6	47.1
ON3 5'-r(UACAGU _F CUAUGU)	62.2 [+0.6]	47.8 [+0.8]
ON4 5'-r(UACAGU _{F/Mc} CUAUGU)	47.1 [-14.5]	30.1 [-16.9]
ON5 5'-r(UACAGUC _F UAUGU)	63.1 [+1.5]	47.6 [+0.6]
ON6 5'-r(UACAGUC _{F/Mc} UAUGU)	45.2 [-16.4]	29.6 [-17.5]
ON56 5'-d(TACAGTCTATGT)	49.7	51.1
ON58 5'-d(TACAGU _F CTATGT)	50.5 [+0.8]	48.2 [-2.9]
ON59 5'-d(TACAGU _{F/Mc} CTATGT)	27.9 [-21.8]	28.2 [-22.9]
ON60 5'-d(TACAGTC _F TATGT)	51.6 [+1.9]	50.2 [-0.9]
ON61 5'-d(TACAGTC _{F/Mc} TATGT)	34.5 [-15.2]	36.6 [-14.5]

10

20

30

40

50

^a T_m は、ハイブリダイズした二重鎖 ($2.5 \mu\text{M}$) の吸光度を、高塩濃度PBS (932 mM NaCl 、 18.4 mM KCl 、 $68 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$ 、 $12.2 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{pH}7.4$) 中で、昇温しながらモニターすること (A_{260} 対 T) によって測定した。 T_m は、融解曲線 (A_{260} 対 T) の一次導関数の極大として決定し、2回の独立した実験の平均値として報告する。 ΔT_m は、対応する相補的二重鎖に対して算出される。

【0757】

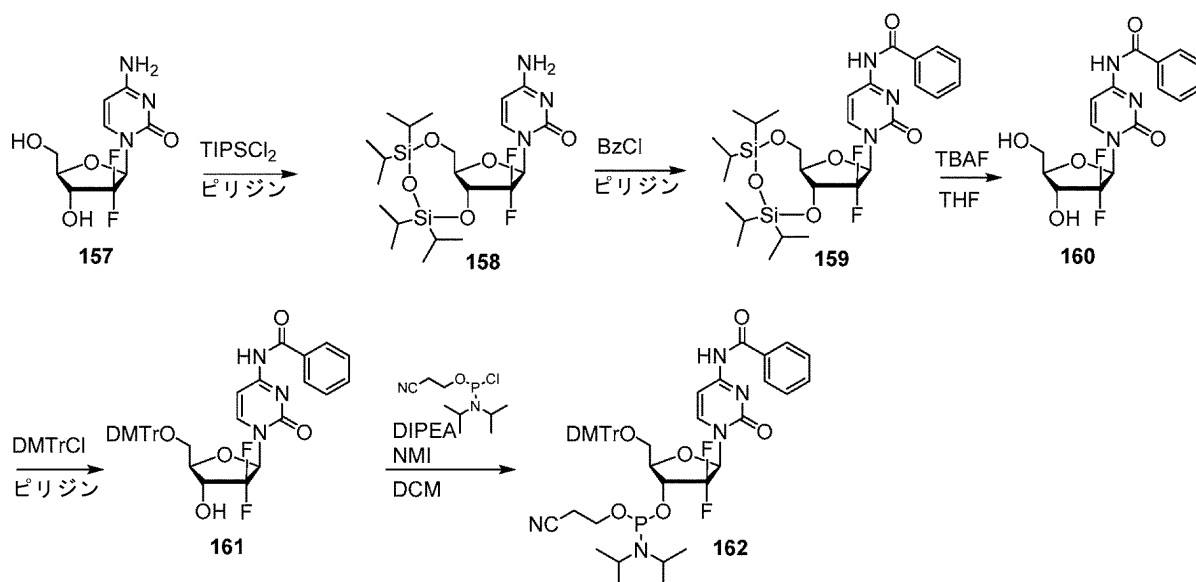
参考文献

1. Clark, J. L.; Hollecker, L.; Mason, J. C.; Stuyver, L. J.; Tharnish, P. M.; Lostia, S.; McBrayer, T. R.; Schinazi, R. F.; Watanabe, K. A.; Otto, M. J.; Furman, P. A.; Stec, W. J.; Patterson, S. E.; Pankiewicz, K. W., Design, synthesis, and antiviral activity of 2'-deoxy-2'-fluoro-2'-C-methylcytidine, a potent inhibitor of hepatitis C virus replication. *J Med Chem* **2005**, *48* (17), 5504-8. 10
2. Pradere, U.; Amblard, F.; Coats, S. J.; Schinazi, R. F., Synthesis of 5'-methylene-phosphonate furanonucleoside prodrugs: application to D-2'-deoxy-2'- α -fluoro-2'- β -C-methyl nucleosides. *Org Lett* **2012**, *14* (17), 4426-9.
3. Damha, M. J.; Ogilvie, K. K., Oligoribonucleotide synthesis. The silyl-phosphoramidite method. *Methods Mol Biol* **1993**, *20*, 81-114.
4. Liao, Y.; Smyth, G. K.; Shi, W., featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* **2014**, *30* (7), 923-30.
5. Akinc, A.; Goldberg, M.; Qin, J.; Dorkin, J. R.; Gamba-Vitalo, C.; Maier, M.; Jayaprakash, K. N.; Jayaraman, M.; Rajeev, K. G.; Manoharan, M.; Kotliansky, V.; Röhl, I.; Leshchiner, E. S.; Langer, R.; Anderson, D. G., Development of Lipidoid-siRNA Formulations for Systemic Delivery to the Liver. *Molecular Therapy* **2009**, *17* (5), 872-879. 20
6. Akinc, A.; Querbes, W.; De, S.; Qin, J.; Frank-Kamenetsky, M.; Jayaprakash, K. N.; Jayaraman, M.; Rajeev, K. G.; Cantley, W. L.; Dorkin, J. R.; Butler, J. S.; Qin, L.; Racie, T.; Sprague, A.; Fava, E.; Zeigerer, A.; Hope, M. J.; Zerial, M.; Sah, D. W. Y.; Fitzgerald, K.; Tracy, M. A.; Manoharan, M.; Kotliansky, V.; Fougereolles, A. d.; Maier, M. A., Targeted Delivery of RNAi Therapeutics With Endogenous and Exogenous Ligand-Based Mechanisms. *Molecular Therapy* **2010**, *18* (7), 1357-1364.
7. Pettersen, E. F.; Goddard, T. D.; Huang, C. C.; Couch, G. S.; Greenblatt, D. M.; Meng, E. C.; Ferrin, T. E., UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* **2004**, *25* (13), 1605-12. 30

【0758】

さらなる例示的化合物の合成

スキーム 2:

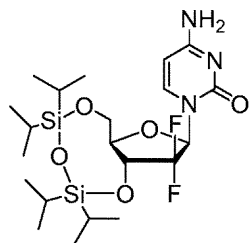


10

【 0 7 5 9 】

実験の詳細:

20



1- [(6aR,8R) -9,9-ジフルオロ-2,2,4,4-テトライソプロピル-6,6a,8,9a-テトラヒドロフロ [3,2-f] [1,3,5,2,4] トリオキサジシロシン-8-イル] -4-アミノ-ピリミジン-2-オン158:透明な157 (1.7g、6.46mmol) のピリジン (30mL) 溶液にジクロロ-1,1,3,3-テトライソプロピルジシロキサン (2.04g、6.46mmol) を一度に加えた。反応混合物を22℃で16時間攪拌した。すべての揮発物を高真空ポンプ下で除去し、残渣をDCM (100mL) に溶解した。有機層を10% NaHCO₃ 溶液 (50mL) とブライン (2×40mL) で洗浄した。DCM層を分離し、無水Na₂SO₄で乾燥し、濾過し、濾液を蒸発乾固した。粗化合物をフラッシュカラムクロマトグラフィー (勾配:DCM中、0-5% MeOH) で精製することにより、158 (2.4g、収率73%) を白色固形物として得た。

30

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.49 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.43 (s, 2H),

6.35 – 6.04 (m, 1H), 4.40 – 4.28 (m, 1H), 4.17 (dd, *J* = 13.0, 3.4 Hz, 1H), 3.96 (ddd, *J* = 14.4, 11.2,

40

3.0 Hz, 2H), 1.15 – 0.97 (m, 28H) ppm. ¹⁹F NMR (565 MHz, DMSO-*d*₆) δ -116.76 ppm. ¹³C NMR

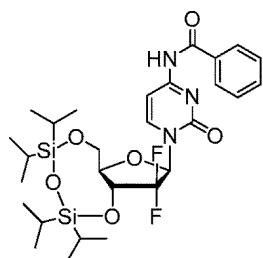
(151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165.64, 154.41, 139.29, 123.98, 122.29, 120.57, 94.85, 83.46, 77.85,

70.33, 60.34, 54.91, 17.18, 17.06, 17.04, 17.02, 16.72, 16.70, 16.51, 12.58, 12.29, 11.96, 11.95

ppm.

【 0 7 6 0 】

50



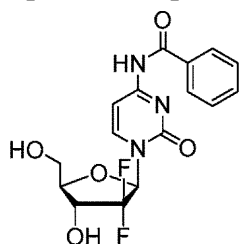
N- [1- [(6aR,8R) -9,9-ジフルオロ-2,2,4,4-テトライソプロピル-6,6a,8,9a-テトラヒドロフロ [3,2-f] [1,3,5,2,4] トリオキサジシロシン-8-イル] -2-オキソ-ピリミジン-4-イル] ベンズアミド 159:0℃の、透明な 158 (2.4 g、4.75 mmol) のピリジン (30 mL) 溶液に、塩化ベンゾイル (667.13 mg、4.75 mmol) を3回に分けて加えた。反応混合物を22℃で8時間攪拌してから、10% NaHCO₃ 溶液 (25 mL) でクエンチした。DCM (30 mL) を加え、有機層を分離し、無水 Na₂SO₄ で乾燥し、濾過し、濾液を蒸発乾固した。こうして得た粗化合物をフラッシュカラムクロマトグラフィー (勾配:ヘキサン中、30-50% EtOAc) で精製することにより、159 (2.75 g、収率95%) を白色泡状物として得た。

10

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.44 (s, 1H), 8.05 – 7.99 (m, 3H), 7.66 – 7.60 (m, 1H), 7.55 – 7.49 (m, 2H), 7.46 – 7.41 (m, 1H), 6.21 (s, 1H), 4.46 (s, 1H), 4.24 (dd, *J* = 13.0, 3.6 Hz, 1H), 4.09 – 3.99 (m, 2H), 1.16 – 0.99 (m, 28H) ppm. ¹⁹F NMR (565 MHz, DMSO-*d*₆) δ -116.79 ppm. ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 167.47, 167.35, 163.85, 153.92, 143.56, 132.90, 129.24, 128.55, 128.46, 123.89, 122.18, 120.45, 96.92, 95.40, 84.32, 78.43, 70.35, 60.40, 17.18, 17.06, 17.03, 16.72, 16.70, 16.51, 12.55, 12.29, 11.98, 11.96 ppm.

20

【 0 7 6 1 】



30

N- [1- [(2R,5R) -3,3-ジフルオロ-4-ヒドロキシ-5- (ヒドロキシメチル) テトラヒドロフラン-2-イル] -2-オキソ-ピリミジン-4-イル] ベンズアミド 160:透明な 159 (2.75 g、4.51 mmol) の THF (30 mL) 溶液に TBAF (2.83 g、10.82 mmol) を一度に加え、22℃で3時間攪拌した。すべての揮発物を高真空ポンプ下で蒸発させ、こうして得た粗残渣をフラッシュカラムクロマトグラフィー (勾配:DCM 中、0-5% MeOH) で精製することにより、160 (1.22 g、収率74%) を白色泡状物として得た。

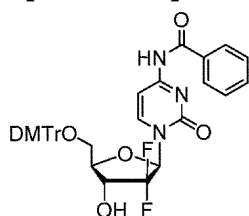
40

50

^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 11.39 (s, 1H), 8.32 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 8.03 – 7.97 (m, 2H), 7.66 – 7.61 (m, 1H), 7.52 (td, $J = 8.1, 2.1$ Hz, 2H), 7.43 – 7.39 (m, 1H), 6.34 (dd, $J = 6.6, 2.1$ Hz, 1H), 6.21 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H), 5.33 (td, $J = 5.5, 2.0$ Hz, 1H), 4.27 – 4.17 (m, 1H), 3.92 (dq, $J = 8.3, 2.6$ Hz, 1H), 3.86 – 3.80 (m, 1H), 3.71 – 3.64 (m, 1H) ppm. ^{19}F NMR (565 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ -116.86 ppm. ^{13}C NMR (151 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 167.45, 163.73, 154.20, 144.71, 132.99, 132.87, 128.55, 128.47, 124.70, 122.99, 121.27, 96.67, 95.41, 84.41, 84.21, 83.99, 81.07, 81.05, 81.02, 68.50, 68.35, 68.21, 58.78, 48.61 ppm.

10

【 0 7 6 2 】



N- [1- [(2R,5R) -5- [[ビス (4-メトキシフェニル) -フェニル-メトキシ] メチル] -3,3-ジフルオロ-4-ヒドロキシ-テトラヒドロフラン-2-イル] -2-オキソ-ピリミジン-4-イル] ベンズアミド 161: 透明な 160 (1.22 g、3.32 mmol) のピリジン (30 mL) 溶液に 4,4'-ジメトキシトリチルクロリド (1.35 g、3.99 mmol) を 2 回に分けて加えた。反応混合物を 16 時間攪拌し、DCM (30 mL) で希釈してから、10% NaHCO_3 (30 mL) でクエンチした。有機層をブライン (20 mL $\times$ 2) で洗浄し、分離し、無水 Na_2SO_4 で乾燥し、濾過した。濾液を高真空ポンプ下で蒸発させ、得られた粗製物をフラッシュカラムクロマトグラフィー (ヘキサン中、10-50% EtOAc) で精製することにより、161 (1.95 g、収率 88%) を黄白色泡状物として得た。

20

^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-$

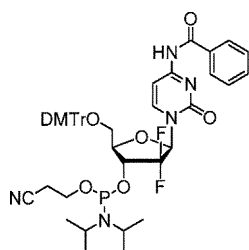
d_6) δ 11.41 (s, 1H), 8.23 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 8.03 – 7.98 (m, 2H), 7.67 – 7.61 (m, 1H), 7.55 – 7.49 (m, 2H), 7.43 – 7.38 (m, 2H), 7.38 – 7.32 (m, 2H), 7.32 – 7.24 (m, 6H), 6.96 – 6.90 (m, 4H), 6.43 (d, $J = 6.7$ Hz, 1H), 6.26 (t, $J = 7.1$ Hz, 1H), 4.47 – 4.36 (m, 1H), 4.09 (ddd, $J = 9.1, 4.5, 2.3$ Hz, 1H), 3.76 (d, $J = 0.8$ Hz, 6H), 3.46 (dd, $J = 11.2, 4.7$ Hz, 1H), 3.36 (dd, $J = 11.1, 2.3$ Hz, 1H) ppm.

30

^{19}F NMR (565 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ -117.26 ppm. ^{13}C NMR (151 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 167.44, 163.74, 158.25, 158.23, 154.11, 144.32, 135.33, 135.04, 132.97, 132.88, 129.79, 129.69, 128.53, 128.47, 128.00, 127.76, 126.94, 124.43, 122.71, 121.00, 96.78, 95.40, 86.03, 84.38, 79.16, 79.13, 79.09, 69.11, 68.96, 68.81, 61.58, 59.76, 55.04 ppm.

40

【 0 7 6 3 】



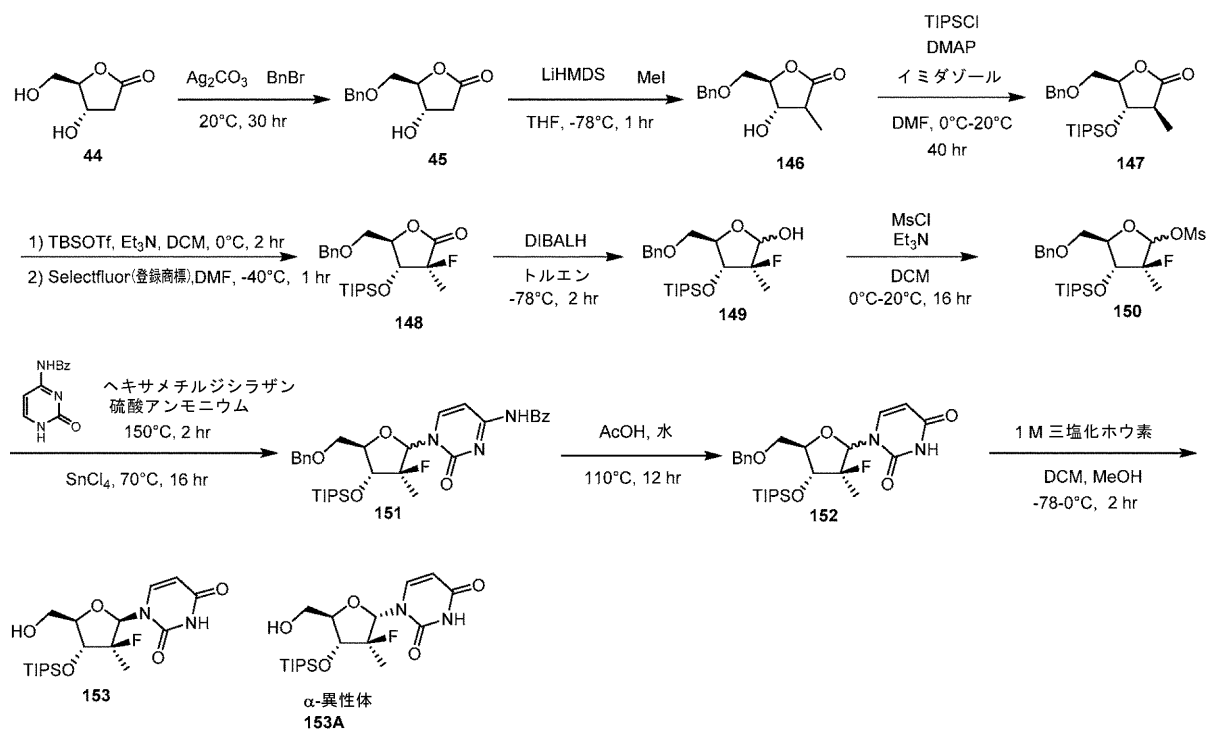
50

N- [1- [(2R,5R) -5- [[ビス (4-メトキシフェニル) -フェニル-メトキシ] メチル] -4- [2-シアノエトキシ- (ジイソプロピルアミノ) ホスファニル] オキシ-3,3-ジフルオロ-テトラヒドロフラン-2-イル] -2-オキソ-ピリミジン-4-イル] ベンズアミド 162 : 透明な 161 (1.1 g、1.64 mmol) の DCM (30 mL) 溶液に N-メチルイミダゾール (269.72 mg、3.29 mmol、261.86 μ L) およびジイソプロピルエチルアミン (1.06 g、8.21 mmol、1.43 mL) を一度に加えた。反応混合物を 22 °C で 5 分間攪拌した後、2-シアノエチル-N,N-ジイソプロピルクロロホスホラミダイト (777.54 mg、3.29 mmol、733.53 μ L) を加え、攪拌を 1 時間続けて、TLC をチェックした。出発物質は消費されていた。反応混合物を DCM (20 mL) で希釈した。DCM 層を 10% NaHCO₃ (25 mL $\times$ 2) 溶液およびブライン (30 mL) で洗浄した。有機層を分離し、無水 Na₂SO₄ で乾燥し、濾過し、濾液を 36 °C で蒸発させて得た粗化合物を、フラッシュクロマトグラフィー (ヘキサン中、20-50% EtOAc) で精製することにより、162 (1.08 g、収率 76%) を白色泡状物として得た。

¹H NMR (600 MHz, CD₃CN) δ 9.24 (s, 1H), 8.26 – 8.11 (m, 1H), 7.97 – 7.92 (m, 2H), 7.67 – 7.61 (m, 1H), 7.55 – 7.50 (m, 2H), 7.50 – 7.43 (m, 2H), 7.40 – 7.22 (m, 7H), 6.94 – 6.86 (m, 4H), 6.28 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 4.83 – 4.53 (m, 1H), 4.19 (ddt, *J* = 9.1, 6.1, 2.3 Hz, 1H), 3.79 (d, *J* = 5.7 Hz, 6H), 3.64 – 3.44 (m, 4H), 2.63 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H), 2.49 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H), 1.27 – 1.06 (m, 12H), 1.00 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H) ppm. ³¹P NMR (243 MHz, CD₃CN) δ 152.74, 151.77 ppm. ¹⁹F NMR (565 MHz, CD₃CN) δ -115.92, -116.03 ppm. ¹³C NMR (151 MHz, CD₃CN) δ 171.66, 168.05, 164.32, 159.87, 155.53, 145.44, 145.36, 145.22, 136.41, 136.35, 136.31, 136.30, 134.24, 134.00, 131.15, 131.12, 129.65, 129.19, 129.12, 129.02, 129.00, 128.18, 128.13, 125.19, 125.08, 123.47, 123.45, 123.36, 121.74, 121.63, 119.36, 119.19, 114.20, 97.76, 87.72, 86.23, 86.02, 85.82, 80.42, 72.17, 72.02, 71.92, 71.87, 71.77, 71.49, 71.35, 71.24, 71.09, 62.84, 62.80, 62.06, 61.54, 60.96, 60.03, 59.90, 59.76, 55.94, 55.91, 55.32, 48.36, 48.33, 44.29, 44.25, 44.20, 44.17, 24.92, 24.88, 24.87, 24.76, 24.74, 24.71, 24.69, 22.78, 22.76, 21.35, 21.33, 21.14, 20.96, 20.92, 20.90, 20.85, 20.12, 20.05 ppm.

【 0 7 6 4 】

スキーム 3



10

20

化合物 45

44 (40 g、302.77 mmol) のトルエン (1600 mL) 溶液に BnBr (54.37 g、317.91 mmol) および Ag_2CO_3 (250.46 g、908.30 mmol) を加えた。反応混合物を 20°C で 30 時間攪拌した。40 g スケールの追加バイアルについても上述のようにセットアップした。合わせた反応混合物をテトラヒドロフラン (1500 mL) で希釈し、濾過し、濾過ケーキを酢酸エチル (1000 mL × 2) ですすいだ。合わせた有機層を減圧下で濃縮した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (石油エーテル/酢酸エチル = 10/1 → 3/1 で溶出) で精製することにより、45 (120 g、539.97 mmol、収率 35.67%) を黄色油状物として得た。

30

^1H NMR: (400 MHz, メタノール- d_4) δ ppm 2.25 - 2.63 (m, 1 H) 2.90 (dd, $J=18.01, 6.63$ Hz, 1 H) 3.66 - 3.75 (m, 2 H) 4.27 - 4.45 (m, 1 H) 4.51 - 4.59 (m, 2 H) 7.19 - 7.41 (m, 5 H).

【 0 7 6 5 】

化合物 146

45 (20 g、89.99 mmol) および MeI (26.82 g、188.99 mmol) の THF (400 mL) 溶液に LiHMDS (1 M、206.99 mL、2.3 当量) を -78°C で滴下した。反応混合物を -78°C で 60 分間攪拌した。その混合物を飽和 NH_4Cl 水溶液 (800 mL) 中に注いだ。20 g スケールの追加バイアル 3 つを上述のようにセットアップした。そしてその混合物を酢酸エチル (1000 mL × 3) で抽出した。合わせた有機層を Na_2SO_4 で乾燥し、濾過し、濃縮し、石油エーテル/酢酸エチル = 10:1 → 3:1 で溶出させるシリカゲルクロマトグラフィーで残渣を精製することにより、146 (16 g、67.72 mmol、収率 18.81%) を無色の油状物として得た。

40

^1H NMR: (400 MHz, メタノール- d_4) δ ppm 1.11 - 1.28 (m, 4 H) 2.51 - 2.98 (m, 1 H) 3.62 - 3.71 (m, 1 H) 3.81 (dd, $J=11.40, 2.19$ Hz, 1 H) 3.96 (dd, $J=8.44, 7.34$ Hz, 1 H) 4.25 (ddd, $J=7.34, 4.93, 2.19$ Hz, 1 H) 4.42 (t, $J=3.51$ Hz, 1 H) 4.50 - 4.62 (m, 1 H) 4.50 - 4.60 (m, 1 H) 7.24 - 7.38 (m, 5 H)

50

【0766】

化合物147

146 (15 g、63.49 mmol) の DMF (300 mL) 溶液にイミダゾール (21.61 g、317.44 mmol)、DMAP (38.78 g、317.44 mmol) および TIPSCl (48.96 g、253.95 mmol) を 0℃ で加えた。反応混合物を 20℃ で 40 時間攪拌した。反応混合物を水 (300 mL) で希釈し、その混合物を酢酸エチル (200 mL×2) で抽出した。合わせた有機層を水 (200 mL×2)、ブライン (200 mL×2) で洗浄し、減圧下で濃縮した。20 g スケールの追加バイアル1つを上述のようにセットアップした。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (石油エーテル/酢酸エチル=100/1→30/1で溶出) で精製することにより、147 (25 g、63.68 mmol、収率50.15%) を無色の油状物として得た。

10

¹H NMR: (400 MHz,

クロロホルム-d) δ ppm 1.05 - 1.07 (m, 65 H) 1.30 - 1.36 (m, 3 H) 2.62 (dd, *J*=7.45, 5.70 Hz, 1

H) 3.58 - 3.68 (m, 1 H) 3.70 - 3.77 (m, 1 H) 4.20 - 4.36 (m, 2 H) 4.49 - 4.63 (m, 2 H) 7.28 - 7.39

(m, 4 H).

【0767】

化合物148

147 (25 g、63.68 mmol) の DCM (400 mL) 溶液に TEA (20.62 g、203.77 mmol、28.36 mL、3.2 当量) および TBSOTf (26.93 g、101.88 mmol) を 0℃ で加えた。反応を 0℃ で 2 時間攪拌してから、水 (100 mL) でクエンチした。その水性混合物をジクロロメタン (100 mL×3) で抽出した。合わせた有機層を減圧下で濃縮した。残渣を DMF (400 mL) に溶解し、-40℃ に冷却してから、Selectfluor F (45.12 g、127.36 mmol) を加え、反応を -40℃ で 1 時間攪拌した。反応混合物を水 (400 mL) の添加によってクエンチし、水層を酢酸エチル (200 mL×3) で抽出した。合わせた有機層を Na₂SO₄ で乾燥し、減圧下で濃縮した。残渣をシリカゲルでのカラムクロマトグラフィー (石油エーテル/酢酸エチル=50/1で溶出) で精製することにより、148 (18 g、43.84 mmol、収率68.85%) を無色の油状物として得た。

20

¹H NMR: (400 MHz, クロロホルム-d) δ ppm 1.02 - 1.14 (m, 57 H) 1.54 - 1.64

(m, 3 H) 3.67 - 3.73 (m, 1 H) 3.78 - 3.85 (m, 1 H) 4.07 - 4.15 (m, 1 H) 4.57 - 4.60 (m, 2 H) 4.73 -

30

4.86 (m, 1 H) 7.29 - 7.43 (m, 5 H)

【0768】

化合物149

148 (18 g、43.84 mmol) のトルエン (360 mL) 溶液に DIBAL-H (1M、175.36 mL) を -78℃ で滴下した。反応混合物を -78℃ で 2 時間攪拌した。反応をメタノール (20 mL) の添加によってクエンチした。その混合物を室温まで温ませ、その混合物に HCl 水溶液 (300 mL、0.1 mol/L) を加えた。その混合物を 10 分間攪拌し、有機層を分離した。水層をメチル *t*-ブチルエーテル (200 mL×4) で抽出した。合わせた有機層を Na₂SO₄ で乾燥し、減圧下で濃縮した。残渣をシリカゲルでのカラムクロマトグラフィー (石油エーテル/酢酸エチル=20/1→4/1で溶出) で精製することにより、149 (13.5 g、32.72 mmol、収率74.63%) を無色の油状物として得た。

40

¹H NMR: (400 MHz, クロロホルム-d) δ ppm 0.98 - 1.21 (m,

21 H) 1.39 - 1.69 (m, 3 H) 3.23 (br d, *J*=10.76 Hz, 1 H) 3.46 - 3.71 (m, 2 H) 3.86 - 3.95 (m, 1 H)

4.19 (br d, *J*=13.38 Hz, 1 H) 4.37 (br t, *J*=6.50 Hz, 1 H) 4.47 - 4.73 (m, 2 H) 4.95 (br d, *J*=6.50 Hz,

1 H) 5.17 (br t, *J*=9.13 Hz, 1 H) 7.28 - 7.44 (m, 4 H)

【0769】

50

化合物150

0℃の、149 (13.5 g、32.72 mmol) のDCM (150 mL) 溶液に、TEA (6.62 g、65.44 mmol) およびMsCl (6.76 g、59.01 mmol) を加えた。その結果生じた懸濁液を10分間攪拌してから、20℃に温め、16時間攪拌した。その反応をNaHCO₃水溶液 (1 mol/L、150 mL) でクエンチし、酢酸エチル (400 mL) で希釈した。層を分離した。有機層をHCl水溶液 (100 mL、1 mol/L)、水 (100 mL) およびブライン (100 mL) で洗浄し、Na₂SO₄で乾燥し、減圧下で濃縮することで得た黄色油状物をヘプタン (120 mL) で希釈し、Celite (登録商標) で濾過した。濾液を減圧下で濃縮することにより、150 (15 g、30.57 mmol、収率93.43%) を黄色油状物として得た。

¹H NMR (400 MHz,

クロロホルム-*d*) 0.96 - 1.20 (m, 25 H) 1.47 - 1.71 (m, 4 H) 3.68 (d, *J*=5.00 Hz, 1 H) 3.71 - 3.77 (m, 1 H) 4.02 (td, *J*=6.63, 3.75 Hz, 1 H) 4.20 (br dd, *J*=3.88, 0.75 Hz, 1 H) 4.26 (br dd, *J*=3.88, 0.88 Hz, 1 H) 4.42 (q, *J*=4.88 Hz, 1 H) 4.56 - 4.62 (m, 2 H) 4.63 - 4.76 (m, 1 H) 5.91 (s, 1 H) 6.11 (d, *J*=10.76 Hz, 1 H) 7.28 - 7.42 (m, 5 H) ppm.

10

【0770】

化合物151

N- (2-オキソ-1H-ピリミジン-4-イル) ベンズアミド (28.07 g、130.43 mmol)、硫酸アンモニウム (6.46 g、48.91 mmol) およびヘキサメチルジシラザン (288.00 mL) の混合物を140℃に加熱した所、10分以内に溶液になった。2時間後に、その溶液を室温まで冷却し、減圧下で濃縮することで得た濃厚な油状物を、高真空下に置いた。残渣に150 (16 g、32.61 mmol) のDCE (200 mL) 溶液を加え、次に、20℃でSnCl₄ (17.84 g、68.47 mmol) を滴下し、その結果生じた溶液を20℃で30分間攪拌し、次に70℃で16時間攪拌した。室温まで冷却してから0℃に冷却し、反応混合物をNa₂CO₃の氷冷水溶液 (1 mol/L、200 mL) に加えることによってクエンチし、5分間攪拌してから、20℃に温めて、20分間攪拌した。Celite (登録商標) (50 g) を加え、その混合物を15分間攪拌してから、Celite (登録商標) のパッドで濾過し、固形物を酢酸エチル (200 mL×5) ですすいだ。濾液を水 (200 mL) およびブライン (200 mL) で洗浄した。合わせた水層を酢酸エチル (250 mL×2) で逆抽出した。9 gスケールの追加バイアル1つを上述のようにセットアップした。合わせた有機層をMgSO₄で乾燥し、減圧下で濃縮し、石油エーテル/酢酸エチル=10:1→1:1で溶出させるシリカゲルクロマトグラフィーで残渣を精製することにより、151 (27 g、44.28 mmol、収率87.05%) を無色の油状物として得た。

¹H NMR: (400 MHz, クロロホルム-*d*) δ ppm 0.97 - 1.19 (m, 21 H) 1.45 - 1.67 (m, 3 H) 3.56 - 3.66 (m, 1 H) 3.67 - 3.74 (m, 1 H) 3.74 - 3.81 (m, 1 H) 4.08 (br d, *J*=4.50 Hz, 1 H) 4.27 - 4.37 (m, 1 H) 4.37 - 4.44 (m, 1 H) 4.53 - 4.68 (m, 3 H) 6.22 - 6.62 (m, 1 H) 7.29 - 7.45 (m, 5 H) 7.49 - 7.58 (m, 2 H) 7.59 - 7.66 (m, 1 H) 7.83 - 8.13 (m, 3 H) 8.67 (br s, 1 H) ppm.

20

30

40

【0771】

化合物152

AcOH (300 mL) とH₂O (75 mL) の混合物に混合した151 (27 g、44.28 mmol) を110℃に加熱し、12時間攪拌した。合わせた混合物を減圧下で濃縮し、石油エーテル/酢酸エチル=10:1→5:1で溶出させるシリカゲルクロマトグラフィーで残渣を精製することにより、152 (18 g、35.53 mmol、収率80%) を無色の油状物として得た。

50

¹H NMR: (400 MHz, クロロホルム-*d*) δ ppm 0.98 - 1.18 (m, 21 H) 1.40 - 1.60 (m, 3 H) 3.51 - 3.61 (m, 1 H) 3.62 - 3.70 (m, 1 H) 3.70 - 3.81 (m, 1 H) 4.01 (q, *J*=4.48 Hz, 1 H) 4.32 (d, *J*=13.82 Hz, 1 H) 4.40 (dd, *J*=17.73, 4.65 Hz, 1 H) 4.51 - 4.65 (m, 2 H) 5.52 (dd, *J*=8.25, 2.14 Hz, 1 H) 5.68 (dd, *J*=8.19, 2.08 Hz, 1 H) 6.07 (d, *J*=13.82 Hz, 1 H) 6.35 (d, *J*=16.75 Hz, 1 H) 7.29 - 7.40 (m, 4 H) 7.44 - 7.51 (m, 1 H) 7.57 (d, *J*=8.19 Hz, 1 H) 7.60 - 7.64 (m, 1 H) 8.07 - 8.16 (m, 1 H) 8.60 - 8.82 (m, 1 H)

【 0 7 7 2 】

10

化合物153および異性体153A

-78℃の、152 (9g、17.76mmol) のDCM (180mL) 溶液に、-70℃のBCl₃ (1 mol/L、88.81mL) を加えた。そして溶液を-78~-70℃で1時間攪拌してから、冷却浴中で1時間、0℃まで温めさせた。その混合物をメタノール (150mL) でクエンチし、その溶液を20℃に温めた。9gスケールの追加バイアル1つを上述のようにセットアップした。その混合物を減圧下で濃縮し、残渣を分取用HPLC (中性システム) で精製し、所望の溶出物をそれぞれ凍結乾燥することにより、153 (1g、2.40mmol、収率6.76%) を白色固形物として、また異性体 (4g、9.60mmol、収率27.03%) を白色固形物として得た。

¹H NMR for 153: ET48980-107-P1H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 0.94 - 1.19 (m, 21 H) 1.36 - 1.54 (m, 3 H) 3.55 - 3.65 (m, 1 H) 3.67 - 3.76 (m, 1 H) 3.80 (q, *J*=4.42 Hz, 1 H) 4.41 (dd, *J*=19.01, 5.13 Hz, 1 H) 5.22 (t, *J*=5.25 Hz, 1 H) 5.67 (d, *J*=8.13 Hz, 1 H) 5.93 (d, *J*=13.76 Hz, 1 H) 7.72 (dd, *J*=8.25, 1.88 Hz, 1 H) 11.44 (br s, 1 H)

20

【 0 7 7 3 】

分取用HPLC法:

- 機器: 島津LC-8A分取用HPLC
- カラム: Welch Xtimate C18 250×100mm #10um
- 移動相: AとしてH₂O (10mM NH₄HCO₃)、BとしてACN
- 勾配: 20分で40% Bから70% Bへ
- 流速: 260mL/分
- 波長: 220および254nm

30

【 0 7 7 4 】

153のLCMS (ESI+) : *m/z* 417 (M+1)、RT: 3.275分。

【 0 7 7 5 】

LCMS方法: LC/MS (勾配は0.40分で5% B、0.40~3.40分で5-95% B、95% Bで0.45分保持、次に0.01分で95-5% Bとした。流速は0.8ml/分とした。移動相AはH₂O + 10mM NH₄HCO₃、移動相Bはアセトニトリルとした。クロマトグラフィーに使用したカラムはXbridge-C18 2.1×50mm 5umである。検出方法はダイオードアレイ (DAD) および蒸発光散乱検出 (ELSD) である。MSモードはポジティブエレクトロスプレーイオン化とした。MS範囲は100~1000とした。

40

【 0 7 7 6 】

¹H NMR for 153A: ET48980-107-P2C (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.01 - 1.08 (m, 18 H) 1.09 - 1.18 (m, 3 H) 1.30 - 1.42 (m, 3 H) 3.47 - 3.57 (m, 2 H) 4.31 (td, *J*=6.16, 2.19 Hz, 1 H) 4.42 (dd, *J*=14.95, 2.44 Hz, 1 H) 5.14 (t, *J*=5.63 Hz, 1 H) 5.63 (d, *J*=8.13 Hz, 1 H) 6.14 (d, *J*=15.88 Hz, 1 H) 7.53 (d, *J*=8.13 Hz, 1 H) 11.48 (s, 1 H)

【 0 7 7 7 】

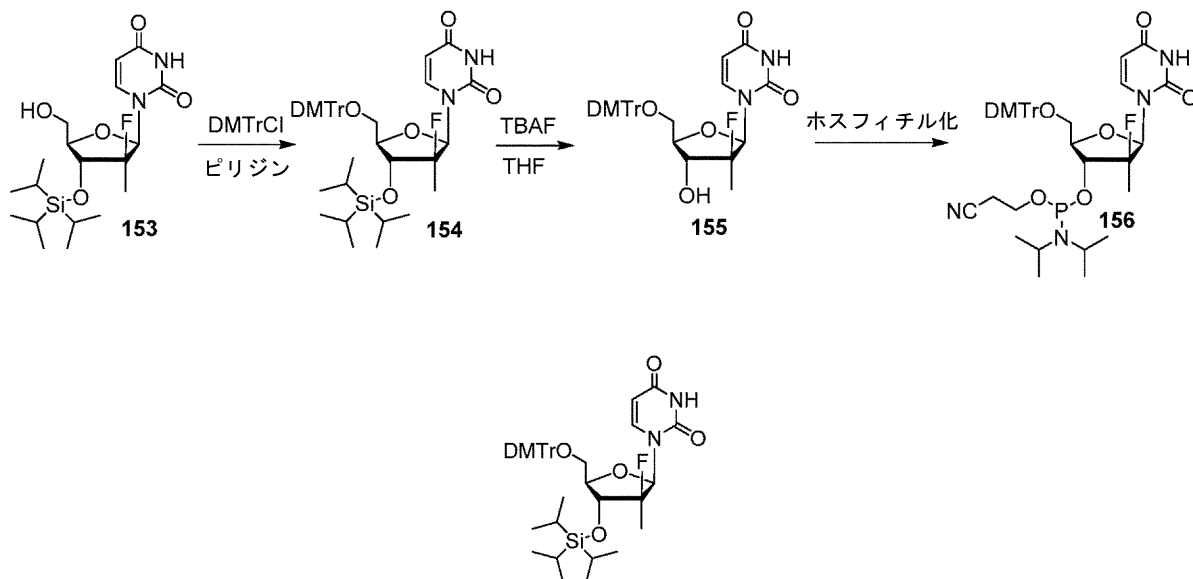
50

153AのLCMS (ESI+) : m/z 417 ($M+1$)、RT:3.139分
【0778】

LCMS方法:LC/MS (勾配は0.40分で5%B、0.40~3.40分で5-95%B、95%Bで0.45分保持、次に0.01分で95-5%Bとした。流速は0.8ml/分とした。移動相AはH₂O+10mM NH₄HCO₃、移動相Bはアセトニトリルとした。クロマトグラフィーに使用したカラムはXbridge-C18 2.1*50mm 5umである。検出方法はダイオードアレイ (DAD) および蒸発光散乱検出 (ELSD) である。MSモードはポジティブエレクトロスプレーイオン化とした。MS範囲は100~1000とした。

【0779】

スキーム 4:

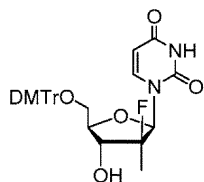


1- [(2S,5R)-5-[[[ビス(4-メトキシフェニル)-フェニル-メトキシ]メチル]-3-フルオロ-3-メチル-4-トリイソプロピルシリルオキシ-テトラヒドロフラン-2-イル]ピリミジン-2,4-ジオン154:透明な153 (0.22g、528.14 μ mol) のピリジン (20mL) 溶液に4,4'-ジメトキシトリチルクロリド (214.74mg、633.76 μ mol) を2回に分けて加えた。反応混合物を16時間攪拌し、DCM (30mL) で希釈してから、10% NaHCO₃ (30mL) でクエンチした。有機層をブライン (20mL×2) で洗浄し、分離し、無水Na₂SO₄で乾燥し、濾過した。濾液を高真空ポンプ下で蒸発させ、得られた粗製物をフラッシュカラムクロマトグラフィー (ヘキサン中、10-50% EtOAc) で精製することにより、154 (0.35g、収率92%) を白色泡状物として得た。

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.52

(s, 1H), 7.66 (dd, J = 8.2, 1.9 Hz, 1H), 7.40 – 7.35 (m, 2H), 7.35 – 7.30 (m, 2H), 7.28 – 7.21 (m, 5H), 6.93 – 6.87 (m, 4H), 5.99 (d, J = 12.3 Hz, 1H), 5.49 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 4.51 – 4.37 (m, 1H), 3.94 (td, J = 6.3, 2.6 Hz, 1H), 3.74 (d, J = 1.0 Hz, 6H), 3.43 (dd, J = 10.7, 2.7 Hz, 1H), 3.26 (dd, J = 10.8, 5.3 Hz, 1H), 1.51 – 1.38 (m, 3H), 0.94 (d, J = 6.7 Hz, 9H), 0.91 – 0.82 (m, 12H) ppm. ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 162.80, 158.26, 150.48, 144.39, 140.65, 135.04, 134.97, 129.76, 129.74, 127.88, 127.69, 126.89, 113.21, 113.18, 101.86, 101.46, 100.60, 85.80, 81.27, 81.23, 76.12, 75.92, 61.98, 59.76, 55.08, 17.75, 17.64, 17.62, 17.45, 11.88 ppm. ¹⁹F NMR (565 MHz, DMSO-*d*₆) δ -155.53 ppm.

【0780】

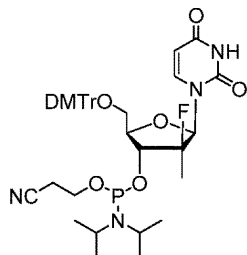


1- [(2R,5R) -5- [[ビス (4-メトキシフェニル) -フェニル-メトキシ] メチル] -3-フルオロ-4-ヒドロキシ-3-メチル-テトラヒドロフラン-2-イル] ピリミジン-2,4-ジオン155:透明な154 (0.33g、459.02 μmol) のTHF (20mL) 溶液にTBAF (156.02mg、596.73 μmol) を一度に加え、22℃で5時間攪拌した。すべての揮発物を高真空ポンプ下で蒸発させ、こうして得た粗残渣をフラッシュカラムクロマトグラフィー (勾配:DCM中、0-5% MeOH) で精製することにより、155 (0.22g、収率85%) を白色泡状物として得た。

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 11.49

(d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 7.48 (dd, $J = 8.2, 2.2$ Hz, 1H), 7.42 – 7.37 (m, 2H), 7.33 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H), 7.29 – 7.21 (m, 5H), 6.93 – 6.88 (m, 4H), 5.99 – 5.91 (m, 2H), 5.52 (dd, $J = 8.2, 2.2$ Hz, 1H), 4.09 – 4.03 (m, 1H), 3.91 (td, $J = 5.6, 3.6$ Hz, 1H), 3.74 (d, $J = 1.0$ Hz, 6H), 3.31 – 3.23 (m, 2H), 1.45 – 1.27 (m, 3H) ppm. ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ 162.82, 158.14, 150.49, 144.68, 140.80, 135.43, 135.27, 129.74, 129.70, 127.92, 127.68, 126.81, 113.26, 101.79, 101.32, 100.56, 81.66, 81.63, 74.96, 74.76, 62.79, 59.76, 55.06, 16.74, 16.58 ppm. ^{19}F NMR (565 MHz, DMSO- d_6) δ -157.12 ppm.

【 0 7 8 1 】



3- [[(2R,5R) -2- [[ビス (4-メトキシフェニル) -フェニル-メトキシ] メチル] -5- (2,4-ジオキソピリミジン-1-イル) -4-フルオロ-4-メチル-テトラヒドロフラン-3-イル] オキシ- (ジイソプロピルアミノ) ホスファニル] オキシプロパンニトリル156:透明な155 (0.22g、391.05 μmol) のDCM (10mL) 溶液にN-メチルイミダゾール (64.21mg、782.11 μmol 、62.34 μL) およびDIPEA (252.70mg、1.96mmol、340.56 μL) を一度に加えた。反応混合物を22℃で5分間攪拌した後、2-シアノエチルN,N-ジイソプロピルクロロホスホラミダイト (185.11mg、782.11 μmol 、174.63 μL) を加え、攪拌を1時間続けて、TLCをチェックした。出発物質は消費されていた。反応混合物をDCM (15mL) で希釈した。DCM層を10% NaHCO_3 (25mL $\times$ 2) 溶液およびブライン (30mL) で洗浄した。有機層を分離し、無水 Na_2SO_4 で乾燥し、濾過し、濾液を36℃で蒸発させることで得られた粗化合物を、フラッシュクロマトグラフィー (ヘキサン中、20-60% EtOAc) で精製することにより、156 (0.28g、収率94%) を白色泡状物として得た。

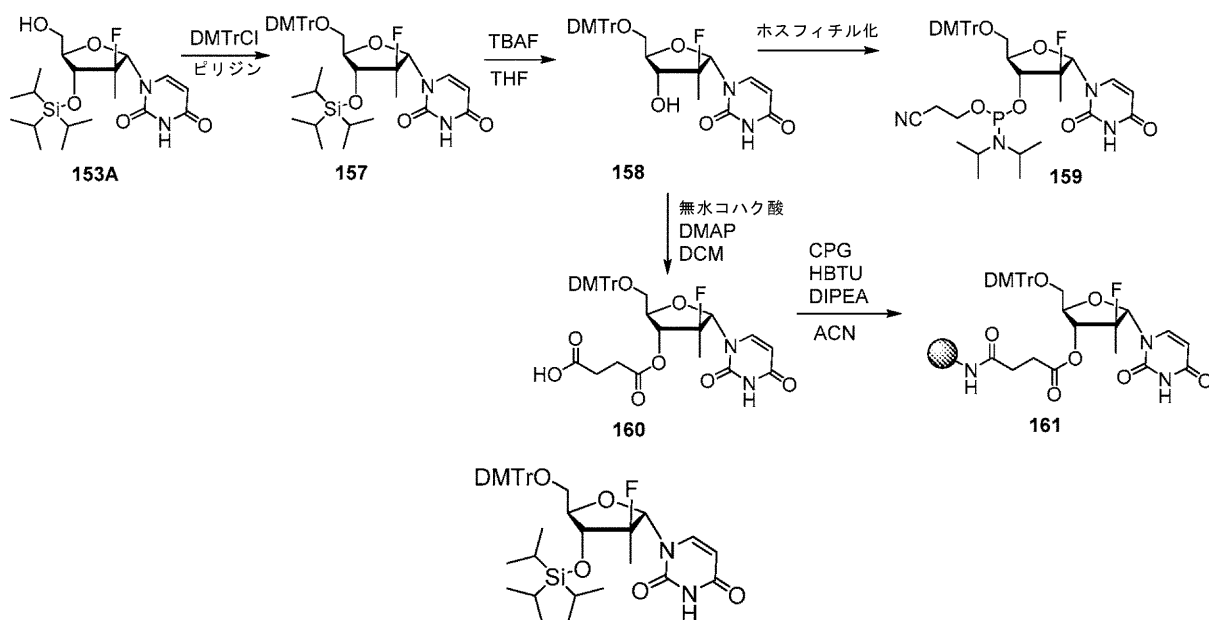
^1H NMR (600 MHz, CD_3CN) δ 9.04 (s, 1H), 7.57 – 7.43 (m, 3H), 7.37 – 7.29 (m, 6H), 7.28 – 7.21 (m, 1H), 6.91 – 6.84 (m, 4H), 5.99 (dd, $J = 15.5, 4.4$ Hz, 1H), 5.48 (dd, $J = 8.2, 3.0$ Hz, 1H), 4.43 – 4.30 (m, 1H), 4.14 – 4.06 (m, 1H), 3.85 – 3.68 (m, 7H), 3.67 – 3.53 (m, 2H), 3.47 – 3.37 (m, 1H), 3.37 – 3.30 (m, 1H), 2.61 (t, $J = 5.9$ Hz, 1H), 2.42 (t, $J = 6.1$ Hz, 1H), 1.63 – 1.35 (m, 3H), 1.26 (dd, $J = 11.2, 6.7$ Hz, 1H), 1.16 (dd, $J = 8.6, 6.8$ Hz, 9H), 1.04 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H) ppm. ^{13}C NMR (151 MHz, CD_3CN) δ 163.57, 159.75, 151.51, 145.88, 142.03, 142.00, 141.96, 141.93, 136.72, 136.66, 136.65, 136.58, 131.08, 131.06, 131.04, 129.07, 128.99, 128.91, 127.97, 127.95, 119.37, 119.19, 114.11, 114.09, 102.69, 102.61, 102.36, 101.45, 101.33, 87.56, 87.44, 87.37, 87.25, 87.24, 87.22, 82.94, 82.92, 82.91, 82.71, 82.68, 82.65, 78.59, 78.49, 78.39, 78.28, 78.12, 78.02, 77.91, 77.81, 63.36, 62.83, 62.80, 60.96, 59.68, 59.54, 59.49, 59.36, 55.93, 55.91, 48.37, 48.34, 44.22, 44.14, 44.09, 44.01, 24.96, 24.91, 24.84, 24.82, 24.79, 24.76, 24.72, 22.78, 22.76, 21.34, 21.14, 20.98, 20.93, 20.85, 20.80, 20.12, 20.06, 18.09, 17.92, 17.84, 17.68 ppm. ^{19}F NMR (565 MHz, CD_3CN) δ -158.30, -158.31, -158.74, -158.74 ppm. ^{31}P NMR (243 MHz, CD_3CN) δ 150.80, 150.53 ppm.

10

20

【 0 7 8 2 】

スキーム 5:



30

40

1- [(2S,5R) -5- [[ビス (4-メトキシフェニル) -フェニル-メトキシ] メチル] -3-フルオロ-3-メチル-4-トリイソプロピルシリルオキシ-テトラヒドロフラン-2-イル] ピリミジン-2,4-ジオン 157: 透明な 153A (1.0 g、2.40 mmol) のピリジン (20 mL) 溶液に 4,4'-ジメトキシトリチルクロリド (976.08 mg、2.88 mmol) を 2 回に分けて加えた。反応混合物を 16 時間攪拌し、DCM (30 mL) で希釈してから、10% NaHCO_3 (30 mL) でクエンチした。有機層をブライン (20 mL $\times$ 2) で洗浄し、分離し、無水 Na_2SO_4 で乾燥し、濾過した。濾液を高真空ポンプ下で蒸発させ、得られた粗製物をフラッシュカラムクロマトグラフィー (ヘキサン中、10-50% EtOAc) で精製することにより、157 (1.61 g、収率 93%) を白色泡状物として得た。

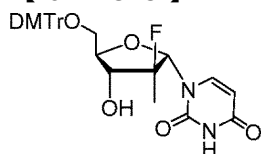
50

^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 11.50

(d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 7.61 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.42 – 7.37 (m, 2H), 7.31 (dd, $J = 8.5, 7.1$ Hz, 2H), 7.28 – 7.20 (m, 5H), 6.93 – 6.87 (m, 4H), 6.18 (d, $J = 15.2$ Hz, 1H), 5.65 (dd, $J = 8.2, 2.2$ Hz, 1H), 4.51 – 4.42 (m, 2H), 3.73 (d, $J = 0.9$ Hz, 6H), 3.25 – 3.13 (m, 2H), 1.38 – 1.25 (m, 3H), 1.04 – 0.92 (m, 22H) ppm. ^{13}C NMR (151 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 162.89, 158.17, 150.61, 144.60, 140.45, 135.18, 129.67, 129.65, 127.84, 127.59, 126.78, 113.20, 104.65, 103.46, 101.59, 85.90, 85.89, 85.80, 76.78, 76.58, 62.87, 59.76, 55.05, 17.75, 17.72, 15.28, 15.12, 11.68 ppm. ^{19}F NMR (565 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ -145.32 ppm.

10

【0783】



1- [(2S,5R)-5-[[[ビス(4-メトキシフェニル)-フェニル-メトキシ]メチル]-3-フルオロ-4-ヒドロキシ-3-メチル-テトラヒドロフラン-2-イル]ピリミジン-2,4-ジオン158:透明な157 (1.1 g、1.53 mmol) のTHF (20 mL) 溶液にTBAF (520.07 mg、1.99 mmol、575.93 μL) を一度に加え、22℃で4時間攪拌した。すべての揮発物を高真空ポンプ下で蒸発させ、こうして得た粗残渣をフラッシュカラムクロマトグラフィー (勾配:DCM中、0-5% MeOH) で精製することにより、158 (0.8 g、収率93%) を白色泡状物として得た。

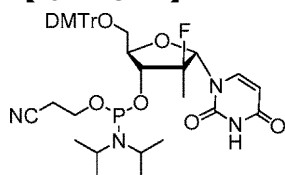
20

^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 11.45

(d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 7.63 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.44 – 7.39 (m, 2H), 7.35 – 7.20 (m, 8H), 6.94 – 6.87 (m, 4H), 6.22 (d, $J = 4.5$ Hz, 1H), 6.12 (d, $J = 16.6$ Hz, 1H), 5.69 (dd, $J = 8.2, 2.2$ Hz, 1H), 4.52 (ddd, $J = 7.5, 5.2, 2.5$ Hz, 1H), 4.09 (ddd, $J = 15.7, 4.6, 2.6$ Hz, 1H), 3.74 (s, 6H), 3.19 (ddd, $J = 9.6, 7.1, 2.1$ Hz, 1H), 3.03 (dd, $J = 9.9, 5.2$ Hz, 1H), 1.36 – 1.09 (m, 3H) ppm. ^{13}C NMR (151 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 162.98, 158.11, 150.74, 144.80, 140.82, 135.53, 135.40, 129.66, 127.88, 127.64, 126.74, 113.24, 113.23, 105.05, 103.89, 101.61, 90.32, 90.04, 86.88, 85.53, 75.40, 75.20, 67.03, 63.46, 63.43, 55.04, 54.92, 25.14, 15.19, 15.03 ppm. ^{19}F NMR (565 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ -143.86 ppm.

30

【0784】



40

3- [[(2R,5S)-2-[[[ビス(4-メトキシフェニル)-フェニル-メトキシ]メチル]-5-(2,4-ジオキソピリミジン-1-イル)-4-フルオロ-4-メチル-テトラヒドロフラン-3-イル]オキシ-(ジイソプロピルアミノ)ホスファニル]オキシプロパンニトリル159:透明な158 (0.94 g、1.67 mmol) のDCM (20 mL) 溶液にN-メチルイミダゾール (274.36 mg、3.34 mmol、266.36 μL) およびDIPEA (1.08 g、8.35 mmol、1.46 mL

50

）を一度に加えた。反応混合物を22℃で5分間攪拌した後、2-シアノエチル-N,N-ジイソプロピルクロロホスホラミダイト（790.92 mg、3.34 mmol、746.15 μ L）を加え、攪拌を1時間続けて、TLCをチェックした。出発物質は消費されていた。反応混合物をDCM（15 mL）で希釈した。DCM層を10% NaHCO₃（25 mL×2）溶液およびブライン（30 mL）で洗浄した。有機層を分離し、無水Na₂SO₄で乾燥し、濾過し、濾液を36℃で蒸発させることで得た粗化合物をフラッシュクロマトグラフィー（ヘキサン中、20-60% EtOAc）で精製することにより、159（0.97 g、収率76%）を白色泡状物として得た。

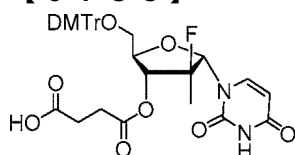
¹H NMR (600 MHz, CD₃CN) δ 9.10 (s, 1H), 7.52 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.50 – 7.44

(m, 3H), 7.38 – 7.28 (m, 7H), 7.27 – 7.21 (m, 1H), 6.88 (ddd, *J* = 9.0, 5.1, 2.0 Hz, 4H), 6.17 (dd, *J* = 15.8, 2.6 Hz, 1H), 5.64 (dd, *J* = 10.8, 8.2 Hz, 1H), 4.80 – 4.58 (m, 1H), 4.40 – 4.30 (m, 1H), 3.85 – 3.66 (m, 8H), 3.63 – 3.54 (m, 1H), 3.28 (ddt, *J* = 9.6, 7.0, 2.5 Hz, 1H), 3.22 – 3.13 (m, 1H), 2.60 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H), 2.51 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H), 1.43 – 1.32 (m, 3H), 1.18 (d, *J* = 6.8 Hz, 4H), 1.11 (dd, *J* = 6.8, 2.3 Hz, 6H) ppm. ¹³C NMR (151 MHz, CD₃CN) δ 163.75, 163.70, 159.72, 151.67, 151.65, 145.97, 141.39, 141.33, 136.86, 136.76, 130.99, 130.98, 129.00, 128.95, 128.87, 127.89, 119.31, 119.28, 114.09, 114.07, 102.66, 102.59, 92.00, 91.97, 91.72, 87.87, 87.85, 87.77, 87.75, 87.23, 87.21, 79.66, 79.55, 79.44, 79.33, 79.15, 79.05, 78.93, 78.83, 64.48, 64.45, 64.42, 60.96, 59.77, 59.64, 59.44, 59.31, 55.90, 44.19, 44.11, 44.03, 25.00, 24.95, 24.89, 24.84, 24.78, 21.15, 20.95, 20.92, 20.90, 20.87, 16.49, 16.36, 16.21, 14.51 ppm. ¹⁹F NMR (565 MHz, CD₃CN) δ -144.63, -145.20 ppm. ³¹P NMR (243 MHz, CD₃CN) δ 152.37, 149.99 ppm.

10

20

【 0 7 8 5 】



30

4- [(2R,5S) -2- [[ビス (4-メトキシフェニル) -フェニル-メトキシ] メチル] -5- (2,4-ジオキソピリミジン-1-イル) -4-フルオロ-4-メチル-テトラヒドロフラン-3-イル] オキシ-4-オキソ-ブタン酸160:透明な158（0.4 g、711.00 μ mol）のDCM（10.00 mL）溶液にDMAP（347.45 mg、2.84 mmol）および無水コハク酸（142.30 mg、1.42 mmol）を一度に加えた。反応混合物を22℃で4時間攪拌した。この反応混合物にDCM（10 mL）を加え、10% NH₄Cl溶液（10 mL×2）で洗浄した。有機層を分離し、無水Na₂SO₄で乾燥し、濾過し、濾液を蒸発乾固した。粗化合物をフラッシュカラムクロマトグラフィー（勾配:DCM中、0-5% MeOH）で精製することにより、160（0.4 g、収率85%）を白色泡状物として得た。

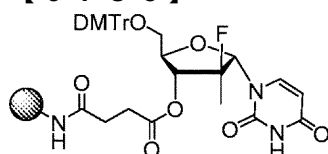
40

50

^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 12.35 (s, 1H), 11.51 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 7.61 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.44 – 7.39 (m, 2H), 7.35 – 7.20 (m, 8H), 6.94 – 6.86 (m, 4H), 6.18 (d, $J = 15.5$ Hz, 1H), 5.65 (dd, $J = 8.2, 2.1$ Hz, 1H), 5.11 (dd, $J = 14.9, 1.7$ Hz, 1H), 4.81 (t, $J = 6.4$ Hz, 1H), 3.74 (s, 6H), 3.23 (ddd, $J = 9.8, 7.4, 2.2$ Hz, 1H), 3.09 (dd, $J = 9.9, 5.1$ Hz, 1H), 2.57 (dd, $J = 8.0, 5.9$ Hz, 2H), 2.53 (dd, $J = 5.9, 1.7$ Hz, 2H), 1.40 – 1.22 (m, 3H) ppm. ^{19}F NMR (565 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ -144.76 ppm. ^{13}C NMR (151 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 173.47, 170.88, 162.95, 162.31, 158.13, 150.71, 144.65, 140.24, 140.20, 135.39, 135.26, 129.65, 128.92, 127.89, 127.65, 127.62, 127.42, 126.76, 113.26, 113.24, 112.77, 104.39, 103.23, 101.60, 90.65, 90.38, 85.70, 85.10, 76.94, 76.70, 63.27, 63.24, 55.04, 35.79, 30.77, 28.91, 28.63, 14.95, 14.80 ppm.

10

【0786】



160 (0.4 g、603.63 μmol) および DIPEA (387.72 mg、3.00 mmol、522.53 μL) を rb フラスコに投入する。次に乾燥 DCM (10.00 mL) を加える。よく攪拌して溶解させてから、HBTU (228.68 mg、603.00 μmol) を加えて酸をプレ活性化する。約5分間攪拌しておき、次に CPG を加える。蓋をして、メカニカルシェーカー上に一晩置く。翌日、CPG を濾過し、ACN で洗浄し、次に、MeOH、次に ACN、次にジエチルエーテルで洗浄する。約5分間乾燥してから、キャッピングのために rb フラスコに戻す。ピリジン中の30%無水酢酸 (合計50 mL) および1% TEA を加える。蓋をして、メカニカルシェーカー上に3時間、戻しておく。3時間後に取り出して、CPG を次のように洗浄する: 10% H_2O / THF、次に MeOH、次に 10% H_2O / THF、次に MeOH、次に ACN、エーテル (約250 mL の各洗浄用溶媒)。rb フラスコに移し、CPG 161 を高真空下で一晩乾燥する。

20

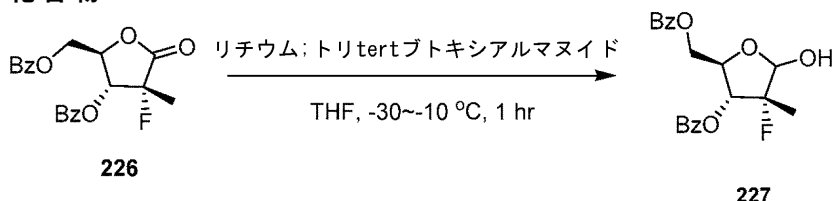
30

【0787】

負荷量のチェック: 40 mg を計り取り、250 mL メスフラスコに投入する。次に ACN 中の 0.1 M トルエン-*p*-スルホン酸を標線まで加える。超音波処理し、1時間沈降させる。分光測光器とベールの法則によって負荷量をチェックする。溶液を UV キュベットに計り取り、411 nm における UV 吸光度を測定する。生データについてワークシートをチェックする。ベールの法則 = $[250 (\text{mL}) \times (\text{吸光度 } A) \times 35.5 (\text{DMTr の吸光係数})] / \text{CPG の重量 (mg)}$ を使って負荷量を産出する。収量: 4.0 g、負荷量: 86 $\mu\text{mol/g}$ 。

【0788】

化合物 227



40

リチウム;トリtert-ブトキシアルマヌイド (THF 中、1.00 M、375 mL、1.12 当量) を、化合物 226 (125.0 g、336 mmol、1.00 当量) の THF (575 mL) 溶液に、-30 °C ~ -25 °C において滴下し、次にその反応を -10 °C で 1 時間攪拌した。TLC (石油エーテル / EtOAc = 3 / 1) は、反応が完了したことを示した。反応混合物を N_2 下、0 °C における NH_4Cl (1000 mL) の添加によってクエンチし、次に、4つの反応を合わせてから、EtOAc

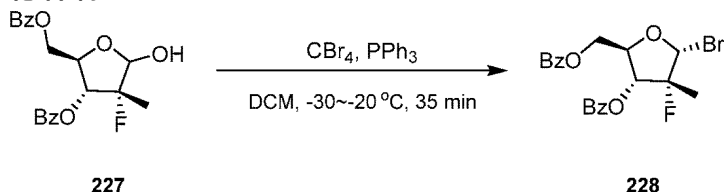
50

(1000 mL×3)で抽出した。合わせた有機層をブライン(1000 mL)で洗浄し、Na₂SO₄で乾燥し、濾過し、減圧下で濃縮することにより、残渣を得た。その残渣をカラムクロマトグラフィー(SiO₂、石油エーテル/酢酸エチル=100/1→1/1)で精製することにより、化合物227(366 g、収率72.8%)を白色固形物として得た。

¹H NMR: DMSO-*d*₆, 400 MHz, δ 7.98-8.00 (m, 2H), 7.90-7.92 (m, 2H), 7.68-7.72 (m, 1H), 7.59-7.63 (m, 1H), 7.53-7.57 (m, 2H), 7.40-7.44 (m, 2H), 7.32 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H), 5.50-5.58 (m, 1H), 5.18-5.22 (m, 1H), 4.41-4.54 (m, 3H), 1.43 (d, *J* = 22.8 Hz, 3H).

【0789】

化合物228

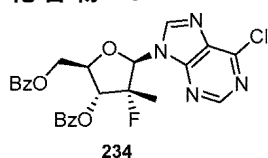


反応は文献の手順に従って実行した¹。PPh₃(73.5 g、280 mmol、1.40当量)のDCM(1950 mL)溶液を三口フラスコに加えてから、反応を-20℃に冷却し、227(75.0 g、200 mmol、1.00当量)を上記の反応に加え、-20~-30℃で15分間攪拌し、次にCBr₄(99.6 g、300 mmol、1.50当量)を-30~-20℃で上記の反応に加えた後、-25~-30℃で20分間攪拌した。TLC(石油エーテル/EtOAc=3/1)は、反応が完了したことを示した。上記の反応に-20~-25℃でシリカゲル(165.0 g)を加えた後、シリカゲルのパッド(488 g)で反応を濾過し、減圧下で濃縮することにより、30℃未満で残渣を得た。その残渣をカラムクロマトグラフィー(SiO₂、石油エーテル/酢酸エチル=0/1→4/1)で精製することにより、化合物228(133 g、収率75.9%)を黄色油状物として得た。

¹H NMR CDCl₃, 400 MHz, δ 8.12-8.15 (m, 2H), 8.02-8.04 (m, 2H), 7.56-7.64 (m, 2H), 7.42-7.50 (m, 5H), 6.35 (s, 1H), 5.28-5.30 (m, 1H), 4.86-4.90 (m, 1H), 4.75-4.80 (m, 1H), 4.61-4.66 (m, 1H), 1.72 (d, *J* = 22.4 Hz, 3H).

【0790】

化合物234

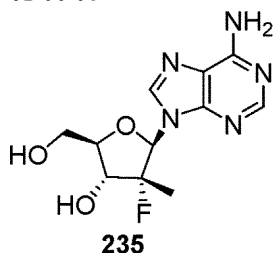


t-BuOK(37.2 g、332 mmol、2.90当量)を化合物228(53.0 g、343 mmol、3.00当量)の*t*-BuOH(1150 mL)溶液に加え、次にその反応を30℃で1時間攪拌し、次に化合物3(50.0 g、114 mmol、1.00当量)のACN(250 mL)溶液を上記反応に加え、次に反応を65℃で12時間攪拌した。反応混合物をNH₄Cl(1500 mL)に注ぎ入れ、EtOAc(500 mL×2)で抽出し、合わせた有機層をブライン(500 mL)で洗浄し、次にNa₂SO₄で乾燥し、濾過し、減圧下で濃縮することにより、残渣を得た。その残渣をカラムクロマトグラフィー(SiO₂、石油エーテル/酢酸エチル=100/1→1/1)で精製することにより、化合物234(69.0 g、収率39.3%)を白色固形物として得た。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz, δ 7.99-8.03 (m, 2H), 7.62-7.66 (m, 1H), 7.55-7.58 (m, 1H), 7.47-7.51 (m, 2H), 7.39-7.44 (m, 2H), 6.37 (d, $J = 18$ Hz, 1H), 6.22-6.30 (m, 1H), 4.87-4.90 (m, 1H), 4.79-4.83 (m, 1H), 4.67-4.72 (m, 1H), 1.33 (d, $J = 22.4$ Hz, 3H).

【 0 7 9 1 】

化合物 235



10

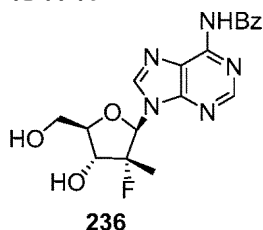
$\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (120 mL) を化合物 234 (12.0 g、23.4 mmol、1.00 当量) のジオキサン (50 mL) 溶液に加え、次にその反応を 95°C で 12 時間撹拌した。TLC (DCM/MeOH = 10/1) は反応が完了したことを示した。反応を減圧下で濃縮することで残渣を得て、その残渣を分取用 HPLC (カラム: Phenomenex Titank C18 Bulk 250 $\times$ 100 mm 10 μ 、移動相: [水 (10 mM NH_4HCO_3) - ACN] ; B%: 1% - 25%、20 分) で精製することにより、化合物 235 (32.0 g) を白色固形物として得た。

20

$^1\text{H NMR}$: DMSO- d_6 , 400 MHz, δ 8.43 (s, 1H), 8.15 (s, 1H), 7.37 (s, 2H), 6.18 (d, $J = 18$ Hz, 1H), 5.68 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 5.24-5.26 (m, 1H), 4.24-4.35 (m, 1H), 3.84-3.95 (m, 2H), 3.67-3.73 (m, 1H), 1.05 (d, $J = 22.8$ Hz, 3H).

【 0 7 9 2 】

化合物 236



30

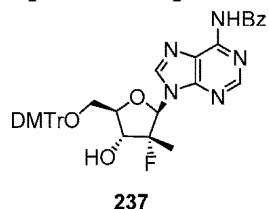
TMSCl (35.6 g、328 mmol、6.00 当量) を化合物 235 (15.5 g、54.7 mmol、1.00 当量) の Py (329 mL) 溶液に加え、次にその反応を 15°C で 3 時間撹拌した。TLC (DCM/MeOH = 10/1) は反応が完了したことを示した。BzCl (15.3 g、109 mmol、2.00 当量) を上記の溶液に 0°C で加え、次に反応を 15°C で 2.5 時間撹拌した。TLC (DCM/MeOH = 10/1) は反応が完了したことを示した。 H_2O (51.8 g) を反応溶液に加え、 0°C で 15 分間撹拌した。次に $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (155 mL) を $0 \sim 5^\circ\text{C}$ で加え、 0°C でさらに 15 分間撹拌した。TLC (DCM/MeOH = 10/1) は反応が完了したことを示した。 NH_4Cl (200 mL) の添加によって反応混合物をクエンチし、EtOAc (200 mL) で希釈し、EtOAc (200 mL $\times$ 3) で抽出した。合わせた有機層をブライン (200 mL) で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥し、濾過し、減圧下で濃縮することにより、残渣を得た。残渣をカラムクロマトグラフィー (SiO_2 、DCM/MeOH = 100/1 $\rightarrow$ 10/1) で精製し、分取用 HPLC (カラム: Phenomenex Titank C18 Bulk 250 $\times$ 100 mm 10 μ 、移動相: [水 (10 mM NH_4HCO_3) - ACN] ; B%: 1% - 30%、20 分) でさらに精製することにより、236 (10.6 g、収率 24.8%、純度 98.7%) を白色固形物として得た。

40

50

^1H NMR (ET43664-53-P1B): DMSO- d_6 , 400 MHz, δ 11.26 (s, 1H), 8.79 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 8.04 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H), 7.53-7.66 (m, 3H), 6.35 (d, $J = 17.6$ Hz, 1H), 5.77 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 5.28-5.31 (m, 1H), 4.29-4.39 (m, 1H), 3.99 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 3.87-3.91 (m, 1H), 3.70-3.75 (m, 1H), 1.12 (d, $J = 22.4$ Hz, 3H). ^{19}F NMR (ET43664-53-P1B): DMSO- d_6 , 376 MHz, δ : -161.38. LCMS $[\text{M} + \text{H}]^+ = 388.1$

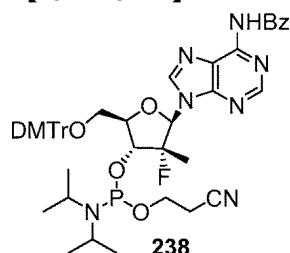
【 0 7 9 3 】



N- [(9S) -9- [(2R,4R,5R) -5- [[ビス (4-メトキシフェニル) -フェニル-メトキシ] メチル] -3-フルオロ-4-ヒドロキシ-3-メチル-テトラヒドロフラン-2-イル] プリン-6-イル] ベンズアミド 237: 透明な 236 (1.4 g, 3.61 mmol) のピリジン (30 mL) 溶液に 4,4'-ジメトキシトリチルクロリド (1.47 g, 4.34 mmol) を 2 回に分けて加えた。反応混合物を 16 時間攪拌し、DCM (30 mL) で希釈してから、10% NaHCO_3 (30 mL) でクエンチした。有機層をブライン (20 mL $\times$ 2) で洗浄し、分離し、無水 Na_2SO_4 で乾燥し、濾過した。濾液を高真空ポンプ下で蒸発させ、得られた粗製物をフラッシュカラムクロマトグラフィー (ヘキサン中、10-50% EtOAc) で精製することにより、237 (1.5 g、収率 60%) を白色固形物として得た。

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 11.27 (s, 1H), 8.64 (s, 1H), 8.59 (s, 1H), 8.08 – 8.02 (m, 2H), 7.68 – 7.62 (m, 1H), 7.56 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H), 7.41 – 7.36 (m, 2H), 7.30 – 7.16 (m, 7H), 6.86 – 6.77 (m, 4H), 6.48 – 6.33 (m, 1H), 5.76 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 4.60 – 4.46 (m, 1H), 4.22 – 4.16 (m, 1H), 3.71 (d, $J = 6.4$ Hz, 6H), 3.54 (dd, $J = 10.6, 6.9$ Hz, 1H), 3.29 (dd, $J = 10.6, 2.0$ Hz, 1H), 1.22 – 1.14 (m, 3H) ppm. ^{19}F NMR (565 MHz, DMSO- d_6) δ -159.52 ppm. ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ 165.64, 158.06, 158.04, 151.71, 151.41, 150.64, 149.62, 144.71, 135.58, 135.33, 133.32, 132.51, 129.74, 129.70, 128.53, 128.48, 127.75, 127.73, 126.68, 125.75, 123.91, 113.13, 113.08, 101.39, 100.20, 89.22, 88.95, 85.57, 80.67, 72.51, 72.39, 63.41, 59.76, 55.00, 54.98, 54.92, 16.64, 16.47 ppm.

【 0 7 9 4 】



N- [(9S) -9- [(2R,4R,5R) -5- [[ビス (4-メトキシフェニル) -フェニル-メトキシ] メチル] -4- [[ビス (1-メチルエチル) アミノ] - (2-シアノエトキシ) ホスファニル] オキシ-3-フルオロ-3-メチル-テトラヒドロフラン-2-イル] プリン-6-イル] ベ

ンズアミド238:透明な237 (1.0 g、1.45 mmol) のDCM (29.35 mL) 溶液にN-メチルイミダゾール (238.06 mg、2.90 mmol、230.91 μ L) およびDIPEA (936.89 mg、7.25 mmol、1.26 mL) を一度に加えた。反応混合物を22℃で5分間攪拌した後、2-シアノエチル-N,N-ジイソプロピルクロロホスホラミダイト (686.30 mg、2.90 mmol、647.45 μ L) を加え、攪拌を0.5時間続けて、TLCをチェックした。出発物質は消費されていた。反応混合物をDCM (20 mL) で希釈した。DCM層を10% NaHCO₃ (25 mL $\times$ 2) 溶液およびブライン (30 mL) で洗浄した。有機層を分離し、無水Na₂SO₄で乾燥し、濾過し、濾液を36℃で蒸発させることで得た粗化合物をフラッシュクロマトグラフィー (ヘキサン中、30-70% EtOAc) で精製することにより、238 (1.0 g、収率77%) を白色泡状物として得た。

¹H NMR (600 MHz, CD₃CN) δ 9.33 (s, 1H), 8.53 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H), 8.34 (d, *J* = 13.6 Hz, 1H), 7.99 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.67 – 7.61 (m, 1H), 7.57 – 7.51 (m, 2H), 7.46 – 7.41 (m, 2H), 7.33 – 7.17 (m, 6H), 6.83 – 6.74 (m, 4H), 6.38 – 6.31 (m, 1H), 4.98 – 4.87 (m, 1H), 4.36 – 4.29 (m, 1H), 3.86 – 3.67 (m, 7H), 3.63 – 3.51 (m, 4H), 2.62 (ddd, *J* = 6.5, 5.4, 1.9 Hz, 1H), 2.48 – 2.40 (m, 1H), 1.34 – 1.26 (m, 3H), 1.17 – 1.09 (m, 9H), 0.99 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H) ppm. ³¹P NMR (243 MHz, CD₃CN) δ 150.63, 149.67 ppm. ¹⁹F NMR (565 MHz, CD₃CN) δ -159.13, -159.32 ppm. ¹³C NMR (151 MHz, CD₃CN) δ 166.11, 159.69, 159.66, 159.64, 159.61, 152.90, 152.42, 151.09, 145.95, 145.93, 143.68, 143.54, 136.72, 136.57, 136.56, 134.79, 133.61, 131.15, 131.13, 131.10, 131.08, 129.66, 129.15, 129.11, 129.03, 128.77, 128.74, 127.85, 125.83, 125.76, 119.54, 119.34, 114.00, 113.94, 113.90, 102.34, 102.17, 102.14, 101.13, 100.93, 91.15, 91.06, 90.88, 90.80, 87.23, 87.20, 82.15, 81.91, 81.88, 75.57, 75.47, 75.35, 75.24, 75.14, 64.07, 63.56, 60.96, 59.42, 59.32, 59.29, 59.19, 55.88, 55.86, 55.84, 44.07, 43.99, 24.97, 24.92, 24.87, 24.82, 24.80, 24.75, 21.15, 20.94, 20.92, 20.89, 20.87, 17.92, 17.89, 17.81, 17.80, 17.75, 17.73, 17.65, 17.63 ppm.

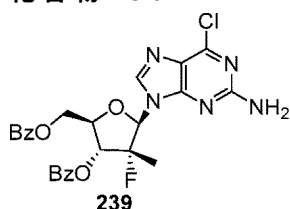
10

20

30

【0795】

化合物239



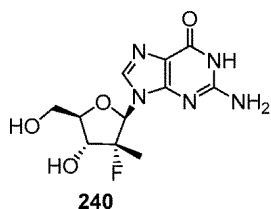
化合物228 (58.8 g、343 mmol、3.00当量) のt-BuOH (1150 mL) 溶液にt-BuOK (37.2 g、331 mmol、2.90当量) を加え、1時間攪拌してから、N₂下、15℃で、化合物3 (50.0 g、114 mmol、1.00当量) のACN (250 mL) 溶液を上記の溶液に加えた。次に、その混合物を65℃で16時間攪拌した。LCMS (ET44598-18-P1A1) は反応が完了したことを示した。その反応混合物に固形のNH₄Cl (3000 mL) を加え、次にEtOAc (1500 mL) を加えて、セライトで濾過した。合わせた有機層をブライン (500 mL) で洗浄し、Na₂SO₄で乾燥し、濾過し、減圧下で濃縮することにより、残渣を得た。残渣をカラムクロマトグラフィー (SiO₂、石油エーテル/酢酸エチル = 10/1 $\rightarrow$ 0/1) で精製した。化合物239 (30 g、57.0 mmol、収率49.8%) を白色固形物として得た。

40

【0796】

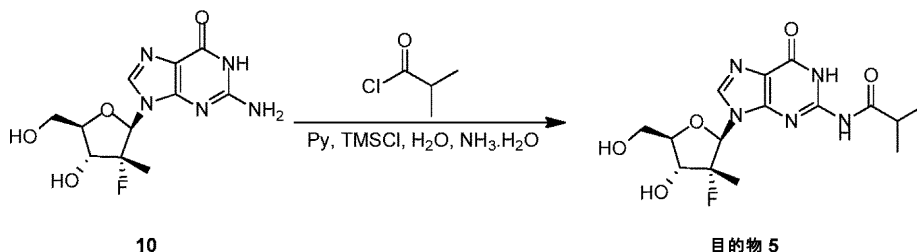
化合物240

50



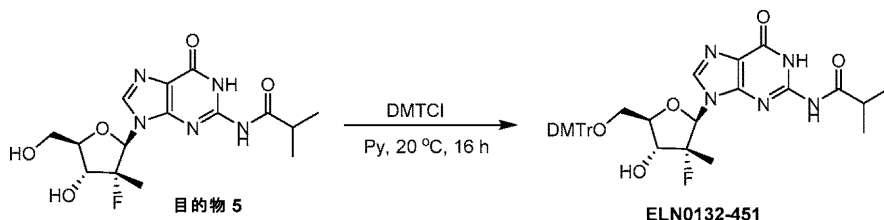
HCl (2M、142mL、10当量)を化合物239 (15g、28.5mmol、1.00当量)のジオキサン (150mL) 溶液に加えてから、90℃で16時間攪拌した。LCMS (ET44598-26-P1A) は反応が完了したことを示した。反応混合物を減圧下で濃縮することにより、残渣を得た。化合物240 (15g、50.1mmol、収率87.8%)を黄色油状物として得た。
【0797】

化合物241



TMSCl (28.2g、260mmol、33mL、6.0当量)を化合物240 (6.5g、21.7mmol、1.00当量)のPy (65mL) 溶液に20℃で加えてから、2時間攪拌した。次に、2-メチルプロパノイルクロリド (9.26g、86.8mmol、9.08mL、2当量)を0℃で加え、次に20℃で2時間攪拌した。次に、H₂O (56mL)を上記の溶液に0℃で加え、0℃で20分間攪拌してから、NH₃·H₂O (106g、762mmol、117mL、純度25%、17.5当量)を加えて、20℃で30分間攪拌した。TLC (ジクロロメタン:メタノール=4:1、R_fのR_f=0.20、P1のR_f=0.50)は反応が完了したことを示した。TLC (ジクロロメタン:メタノール=10:1、R_fのR_f=0.20、P1のR_f=0.70)は反応が完了したことを示した。TLC (ジクロロメタン:メタノール=10:1、R_fのR_f=0.70、P1のR_f=0.20)は反応が完了したことを示した。反応混合物を減圧下で濃縮することにより、残渣を得た。残渣をカラムクロマトグラフィー (SiO₂、DCM:MeOH=100/1、30/1、10/1)で精製した。241 (6.5g、粗製)を黄色固形物として得た。
【0798】

化合物242



DMTCl (4.13g、12.1mmol、1.00当量)を241 (4.5g、12.2mmol、1.00当量)のPy (45mL) 溶液に20℃で加えてから、20℃で16時間攪拌した。TLC (ジクロロメタン:メタノール=10:1、R_fのR_f=0.20、P1のR_f=0.70)は反応が完了したことを示した。NaHCO₃ (100mL)の添加によって反応混合物をクエンチし、DCM (50mL×3)で抽出した。合わせた有機層をブライン (50mL)で洗浄し、乾燥し、濾過し、減圧下で濃縮することにより、残渣を得た。その残渣を分取用HPLC (カラム:Phenomenex Titank C18 Bulk 250×100mm 10u、移動相:[水 (10mM NH₄HCO₃)-ACN];B%:50%-70%、20分)で精製した。化合物242 (3.8g、5.66mmol、収率46.

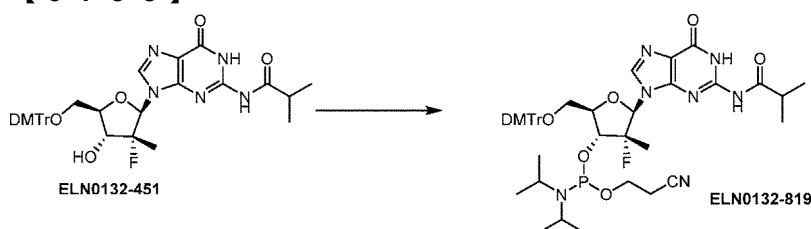
4%)を黄色固形物として得た。LCMS:ET44598-40-P1C1。

¹H NMR: ET44598-40-P1A1, 400 MHz, MeOH-*d*₄ δ 8.19 (s, 1 H), 7.39-7.49

(m, 2 H), 7.14-7.37 (m, 7 H), 6.73-6.90 (m, 4 H), 6.19 (d, *J* = 18.0 Hz, 1 H), 4.37-4.54 (m, 1 H),

4.19 (m, 1 H), 3.70-3.80 (m, 6 H), 3.45-3.63 (m, 2 H), 2.58-2.81 (m, 1 H), 1.17-1.24 (m, 8 H).

【0799】



N- [9- [(2R,3R,4R,5R) -5- [[ビス (4-メトキシフェニル) -フェニル-メトキシ] メチル] -4- [2-シアノエトキシ- (ジイソプロピルアミノ) ホスファニル] オキシ-3-フルオロ-3-メチル-テトラヒドロフラン-2-イル] -6-オキソ-1H-プリン-2-イル] -2-メチル-プロパンアミド243:透明な242 (1.0 g、1.49 mmol) のDCM (30 mL) 溶液にN-メチルイミダゾール (244.45 mg、2.98 mmol、237.33 μL) およびジイソプロピルエチルアミン (962.02 mg、7.44 mmol、1.30 mL) を一度に加えた。反応混合物を22℃で5分間攪拌した後、2-シアノエチルN,N-ジイソプロピルクロロホスホラミダイト (704.71 mg、2.98 mmol、664.82 μL) を加え、攪拌を0.5時間続けて、TLCをチェックした。出発物質は消費されていた。反応混合物をDCM (20 mL) で希釈した。DCM層を10% NaHCO₃ (25 mL×2) 溶液およびブライン (30 mL) で洗浄した。有機層を分離し、無水Na₂SO₄で乾燥し、濾過し、濾液を36℃で蒸発させることで得た粗化合物をフラッシュクロマトグラフィー (ヘキサン中、60-90% EtOAc) で精製することにより、243 (1.04 g、収率80%) を白色泡状物として得た。

¹H NMR (600 MHz, CD₃CN) δ 12.07 (s, 1H), 9.40 (s, 1H),

8.07 – 7.76 (m, 1H), 7.45 (ddt, *J* = 9.8, 8.1, 1.3 Hz, 2H), 7.36 – 7.18 (m, 7H), 6.20 – 5.99 (m, 1H),

4.63 – 4.48 (m, 1H), 4.25 (tdd, *J* = 11.1, 5.0, 3.1 Hz, 1H), 3.81 – 3.70 (m, 7H), 3.67 – 3.42 (m, 3H),

2.77 – 2.56 (m, 2H), 1.32 – 1.09 (m, 22H), 1.00 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H) ppm. ³¹P NMR (243 MHz,

CD₃CN) δ 150.24, 149.11 ppm. ¹⁹F NMR (565 MHz, CD₃CN) δ -172.62, -172.85 ppm. ¹³C NMR

(151 MHz, CD₃CN) δ 181.12, 180.96, 171.66, 159.74, 159.70, 159.67, 159.60, 156.32, 156.27,

149.28, 149.23, 149.15, 148.93, 145.95, 145.84, 138.10, 136.74, 136.65, 136.46, 131.27, 131.23,

131.20, 131.13, 131.10, 131.06, 129.21, 129.11, 128.99, 128.85, 128.73, 127.92, 127.86, 119.57,

114.03, 114.00, 113.90, 113.86, 102.30, 102.29, 101.89, 101.87, 101.09, 101.08, 100.68, 100.65,

91.08, 90.60, 90.33, 87.36, 87.22, 86.94, 82.09, 81.64, 81.61, 76.24, 74.94, 64.31, 63.06, 60.96,

58.92, 58.78, 58.27, 58.14, 55.90, 55.88, 55.86, 55.85, 55.32, 44.06, 43.98, 36.61, 36.42, 24.95,

24.89, 24.83, 24.80, 24.75, 24.71, 21.17, 21.15, 21.13, 20.92, 20.87, 19.38, 19.25, 19.22, 19.19,

19.16, 19.13, 18.18, 18.15, 18.01, 17.98, 17.74, 17.58, 14.51 ppm.

【0800】

化合物229

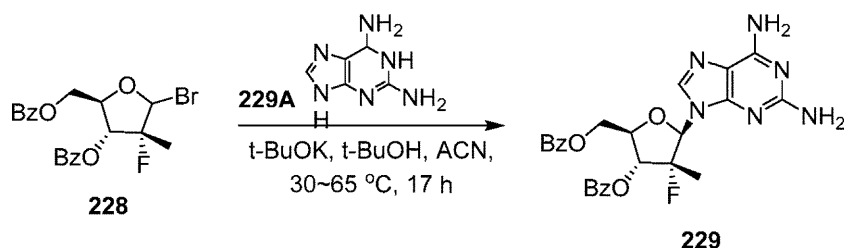
10

20

30

40

50



反応は文献の手順¹に従って実行した。t-BuOK (40.9 g、365 mmol、2.90 当量) を、t-BuOH (1265 mL) 中の化合物 229A (56.7 g、377 mmol、3.00 当量) (化合物 229A は ACN (300 mL) と共に 3 回エバポレーションした) の白色混合物に 30 °C で加え、その結果生じた黄色混合物を N₂ 下、30 °C (油浴) で 1 時間攪拌した。次に、化合物 228 (55.0 g、126 mmol、1.00 当量) の ACN (275 mL) 溶液を 30 °C で加え、次にその淡黄色混合物を 65 °C (油浴) (内部温度 50 ~ 55 °C) で 16 時間攪拌した。TLC は 228 を示さず、それより極性が高い新しい主要スポットが検出され、LCMS は約 25 % の所望の MS を示した。反応混合物を 30 °C に冷却し、攪拌した飽和 NH₄Cl (10 L) および EtOAc (6 L) に加え、キースラガーのパッドで濾過し (水層: pH 約 7)、有機層を分離し、ブライン (1 L) で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥し、濾過し、減圧下で濃縮することにより、残渣を得た。その残渣をカラムクロマトグラフィー (SiO₂、石油エーテル/酢酸エチル = 3/1、1/1、1/2、0/1) で精製した。化合物 229 (44.9 g、88.7 mmol、収率 23.5 %) を黄色固形物として得た。

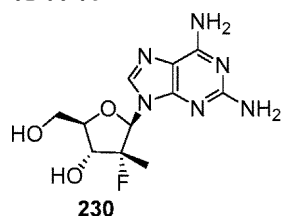
¹H NMR (ET44179-41-P1A): DMSO-*d*₆, 400 MHz, 8.08-7.99 (m, 2H),

7.95 (s, 1H), 7.93-7.87 (m, 2H), 7.75-7.68 (m, 1H), 7.64-7.52 (m, 3H), 7.46-7.37 (m, 2H), 6.89 (s, 2H), 6.26 (d, *J* = 19.6 Hz, 1H), 5.92 (s, 2H), 4.92-4.81 (m, 1H), 4.73-4.59 (m, 2H), 1.28 (d, *J* = 23.2 Hz, 3H). ¹⁹F NMR (ET44179-41-P1A): CDCl₃, 376 MHz, -155.890, -163.981, -169.424.

LCMS calculated for C₂₅H₂₃FN₆O₅ [M+H]⁺ *m/z* = 507.17, found 507.10/548.10.

【 0 8 0 1 】

化合物 230



化合物 229 (44.9 g、88.6 mmol、1.00 当量) を MeOH (449 mL) に溶解し、MeOH (10 mL) 中の NaOMe (6.39 g、35.5 mmol、純度 30 %、0.40 当量) を 16 ~ 20 °C で滴下し、N₂ 下、16 °C で 1 時間攪拌し、白色固形物を検出した。TLC (DCM/MeOH = 20/1) は化合物 229 が完全に消費されたことを示し、LCMS は所望の MS を示した。AcOH (約 2.13 g) を反応に滴下し、pH = 6 ~ 7 に調節し、固形物を ACN で洗浄し、収集した。化合物 230 (18.5 g、62.0 mmol、収率 70.0 %) を白色固形物として得た。

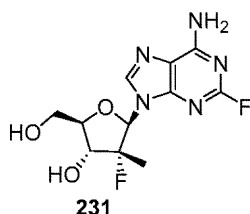
¹H NMR : DMSO-*d*₆, 400 MHz, 7.99 (s, 1H), 6.97 (s, 2H), 6.00 (d, *J* = 18.4 Hz, 1H), 5.89

(s, 2H), 5.62 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 5.25 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H), 4.30-4.13 (m, 1H), 3.94-3.80 (m, 2H), 3.74-3.64 (m, 1H), 1.07 (dd, *J* = 22.4 Hz, 3H). ¹⁹F NMR : DMSO-*d*₆, 376 MHz, -161.215, -

174.032. LCMS calculated for C₁₁H₁₅FN₆O₃ [M+H]⁺ *m/z* = 298.12, found 299.1.

【 0 8 0 2 】

化合物 231

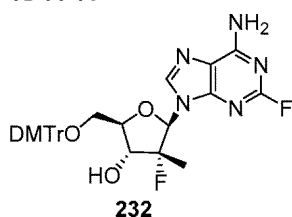


Py (122 mL) を三口ポリエチレンボトルに加え、N₂下で-20℃に冷却し、HF-Py (134 g、949 mmol、122 mL、純度70%、15.3当量) (70% HF、30% Py) をそのボトルに0℃未満で加え、化合物230 (18.5 g、62.0 mmol、1.00当量) を加えてから、亜硝酸tert-ブチル (22.4 g、217 mmol、25.8 mL、3.50当量) を一度に加え、その黄色溶液 (pH約4) をN₂下、0~10℃で、2時間攪拌した。TLC (DCM/MeOH=5/1、230のR_f=0.24、231のR_f=0.50) は化合物230が完全に消費されたことを示した。反応を攪拌した水 (1000 mL) およびNaHCO₃固形物 (700 g) にゆっくり加え、その結果生じた溶液 (pH=7~8) をEtOAc (1000 mL×4) で抽出し、合わせた有機層をブライン (500 mL) で洗浄し、Na₂SO₄で乾燥し、濾過し、減圧下で濃縮することにより、45℃で残渣を得た。粗生成物を20℃の石油エーテル/酢酸エチル=1/1 (80 mL) で2時間摩砕してから、20℃のMeOH (60 mL) で2時間摩砕した。231 (15.0 g、49.8 mmol、収率80.3%) を白色固形物として得た。

¹H NMR: DMSO-*d*₆, 400 MHz, 8.41 (s, 1H), 7.93 (br s, 2H), 6.07 (d, *J*=17.6 Hz, 1H), 5.71 (d, *J*=7.2 Hz, 1H), 5.22 (t, *J*=4.8 Hz, 1H), 4.32-4.15 (m, 1H), 3.94 (d, *J*=9.2 Hz, 1H), 3.90-3.82 (m, 1H), 3.74-3.65 (m, 1H), 1.08 (d, *J*=22.4 Hz, 3H). ¹⁹F NMR: DMSO-*d*₆, 376 MHz, -51.643, -161.322. LCMS calculated for C₁₁H₁₃F₂N₅O₃ [M+H]⁺ *m/z* = 302.10, found 302.1/324.1.

【 0 8 0 3 】

化合物 232



化合物231 (14.8 g、49.1 mmol、1.00当量) を無水Py (160 mL×4) と共に45℃でエバポレーションしてから、Py (148 mL) に溶解し、次に20℃でDMTrCl (18.3 g、54.0 mmol、1.10当量) を加え、そのオレンジ色の溶液をN₂下、20℃で、4時間攪拌した。TLC (DCM/MeOH=10/1、231のR_f=0.24、232のR_f=0.90) は231が完全に消費されたことを示した。飽和NaHCO₃ (300 mL) を反応に加え、攪拌し、その結果生じた溶液 (pH=8) をEtOAc (300 mL、200 mL、100 mL) で抽出し、合わせた有機層をブライン (150 mL) で洗浄し、Na₂SO₄で乾燥し、濾過し、減圧下で濃縮することにより、45℃で残渣を得た。その残渣をカラムクロマトグラフィー (SiO₂、石油エーテル/酢酸エチル (0.5% TEA、DCM) = 5/1、3/1、2/1、1/1、0/1) で精製した。232 (15.3 g、25.4 mmol、収率51.6%) を黄色固形物として得た。

10

20

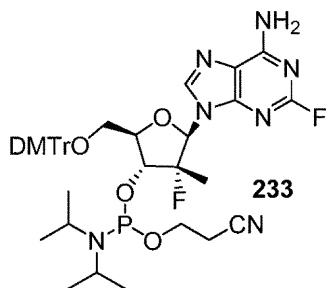
30

40

50

^1H NMR: DMSO- d_6 , 400 MHz, 8.27 (s, 1H), 8.09-7.80 (m, 2H), 7.40 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H), 7.33-7.15 (m, 7H), 6.81 (dd, $J = 8.4, 16.4$ Hz, 4H), 6.20 (d, $J = 18.8$ Hz, 1H), 5.74 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 4.54-4.34 (m, 1H), 4.14 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 3.72 (d, $J = 3.6$ Hz, 6H), 3.65-3.52 (m, 1H), 3.25 (d, $J = 10.0$ Hz, 1H), 1.15 (d, $J = 22.4$ Hz, 3H). ^{19}F NMR: DMSO- d_6 , 376 MHz, -51.601, -160.025. LCMS calculated for $\text{C}_{32}\text{H}_{31}\text{F}_2\text{N}_5\text{O}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 603.23$, found 604.2/303.1.

【 0 8 0 4 】



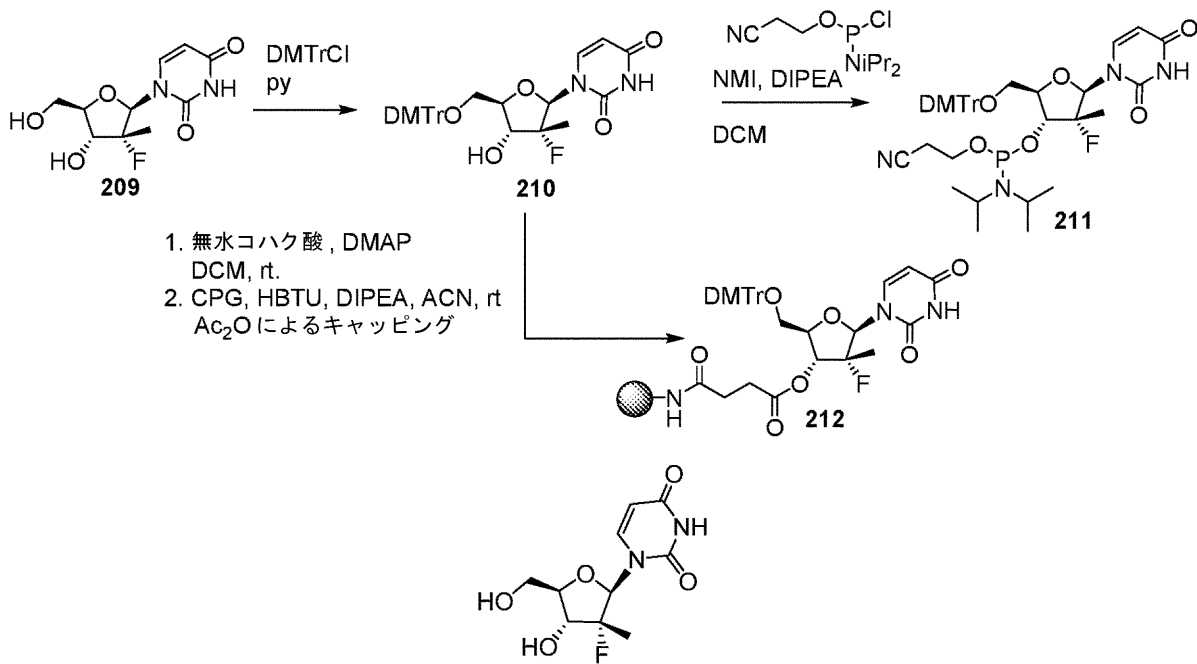
3- [[(2R,3R,5R) -5- [(9S) -6-アミノ-2-フルオロ-プリン-9-イル] -2- [[ビス (4-メトキシフェニル) -フェニル-メトキシ] メチル] -4-フルオロ-4-メチル-テトラヒドロフラン-3-イル] オキシ- [ビス (1-メチルエチル) アミノ] ホスファニル] オキシプロパンニトリル 233: 透明な 232 (1.0 g、1.66 mmol) の DCM (30 mL) 溶液に N-メチルイミダゾール (272.03 mg、3.31 mmol、263.85 μL) およびジイソプロピルエチルアミン (1.07 g、8.28 mmol、1.44 mL) を一度に加えた。反応混合物を 22℃ で 5 分間攪拌した後、2-シアノエチル-N,N-ジイソプロピルクロロホスホラミダイト (784.21 mg、3.31 mmol、739.82 μL) を加え、攪拌を 0.5 時間続けて、TLC をチェックした。出発物質は消費されていた。反応混合物を DCM (20 mL) で希釈した。DCM 層を 10% NaHCO_3 (25 mL $\times$ 2) 溶液およびブライン (30 mL) で洗浄した。有機層を分離し、無水 Na_2SO_4 で乾燥し、濾過し、濾液を 36℃ で蒸発させることで得た粗化合物をフラッシュクロマトグラフィー (ヘキサン中、20-70% EtOAc) で精製することにより、233 (1.08 g、収率 81%) を白色泡状物として得た。

^1H NMR (600 MHz, CD_3CN) δ 8.07 (d, $J = 13.1$ Hz, 1H), 7.46

- 7.40 (m, 2H), 7.34 - 7.16 (m, 7H), 6.84 - 6.73 (m, 4H), 6.38 (s, 2H), 6.22 - 6.03 (m, 1H), 4.80 - 4.70 (m, 1H), 4.32 - 4.23 (m, 1H), 3.84 - 3.65 (m, 7H), 3.61 - 3.48 (m, 5H), 2.65 - 2.58 (m, 1H), 2.42 (t, $J = 6.1$ Hz, 1H), 1.31 - 1.23 (m, 4H), 1.14 - 1.08 (m, 8H), 0.97 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H). ^{19}F NMR (565 MHz, CD_3CN) δ -52.43, -52.54, -159.60, -159.75 ppm. ^{31}P NMR (243 MHz, CD_3CN) δ 150.86, 149.65 ppm. ^{13}C NMR (151 MHz, CD_3CN) δ 160.44, 159.55, 159.54, 159.49, 159.07, 158.61, 158.47, 151.42, 151.29, 151.27, 145.80, 140.74, 136.57, 136.51, 136.43, 136.37, 131.07, 131.06, 130.97, 130.96, 130.90, 129.01, 128.97, 128.93, 128.65, 128.63, 127.73, 127.70, 119.31, 119.21, 119.18, 119.16, 119.13, 119.09, 113.86, 113.83, 113.80, 113.78, 102.10, 102.08, 101.90, 101.87, 100.89, 100.69, 100.66, 90.79, 90.63, 90.53, 90.37, 87.13, 87.11, 81.86, 81.71, 81.68, 75.28, 75.19, 75.17, 75.08, 75.04, 74.94, 74.84, 63.80, 63.35, 60.86, 59.34, 59.21, 59.17, 59.04, 55.82, 55.80, 55.77, 55.75, 43.96, 43.93, 43.87, 43.85, 24.88, 24.84, 24.82, 24.80, 24.77, 24.73, 21.14, 20.83, 20.78, 20.73, 17.84, 17.81, 17.70, 17.68, 17.65, 17.54, 17.52 ppm.

【0805】

スキーム6



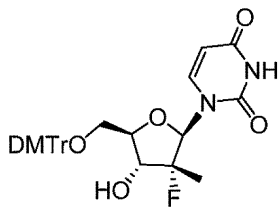
10

20

2'-デオキシ-2'-フルオロ-2'-O-メチルウリジン

2'-デオキシ-2'-フルオロ-2'-C-メチルウリジン (209) を文献の手順^{2,3}によって調製した。

【0806】



30

1- [(2R,5R)-5- [[ビス(4-メトキシフェニル)-フェニル-メトキシ]メチル]-3-フルオロ-4-ヒドロキシ-3-メチル-テトラヒドロフラン-2-イル]ピリミジン-2,4-ジオン210:透明な209 (1.0g、3.84mmol) のピリジン (30mL) 溶液に4,4'-ジメトキシトリチルクロリド (1.56g、4.61mmol) を2回に分けて加えた。反応混合物を16時間攪拌し、DCM (30mL) で希釈してから、10% NaHCO₃ (30mL) でクエンチした。有機層をブライン (20mL×2) で洗浄し、分離し、無水Na₂SO₄で乾燥し、濾過した。濾液を高真空ポンプ下で蒸発させ、得られた粗製物をフラッシュカラムクロマトグラフィー (DCM中、0-5% MeOH) で精製することにより、210 (1.95g、収率90%) を白色泡状物として得た。

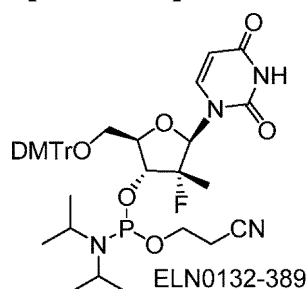
40

50

^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 11.53 – 11.50 (m, 1H), 7.84 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.40 – 7.31 (m, 4H), 7.29 – 7.22 (m, 5H), 6.94 – 6.88 (m, 4H), 6.07 – 5.97 (m, 1H), 5.78 (s, 1H), 5.14 (s, 1H), 4.12 – 4.04 (m, 1H), 4.00 – 3.97 (m, 1H), 3.74 (s, 6H), 3.41 (dd, $J = 11.1, 4.1$ Hz, 1H), 1.37 – 1.25 (m, 3H) ppm. ^{19}F NMR (565 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ -159.88 ppm. ^{13}C NMR (151 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 162.72, 158.19, 158.17, 150.45, 144.55, 135.32, 134.93, 129.81, 127.95, 127.75, 126.86, 113.29, 101.88, 101.22, 100.03, 86.02, 80.06, 71.31, 61.32, 59.75, 55.06, 16.50, 16.33 ppm.

10

【 0 8 0 7 】



20

3- [[(2R,5R) -2- [[ビス (4-メトキシフェニル) -フェニル-メトキシ] メチル] -5- (2,4-ジオキソピリミジン-1-イル) -4-フルオロ-4-メチル-テトラヒドロフラン-3-イル] オキシ- (ジイソプロピルアミノ) ホスファニル] オキシプロパンニトリル 211:2 2°Cの、透明な210 (1.9g、3.38mmol) のジクロロメタン (30mL) 溶液に、N-メチルイミダゾール (415.91mg、5.07mmol、403.80 μL) およびジイソプロピルエチルアミン (2.18g、16.89mmol、2.94mL) を加えた。反応混合物を室温で5分間攪拌し、そこに、2-シアノエチル-N,N-ジイソプロピルクロロホスホラミダイト (1.60g、6.75mmol、1.51mL) をゆっくり加えた。反応を22°Cで攪拌しつづけ、1時間後にTLCをチェックした。反応混合物をジクロロメタン (20mL) で希釈し、10% NaHCO_3 溶液 (2mL $\times$ 20) で洗浄した。有機層を分離し、無水 Na_2SO_4 で乾燥し、濾過し、濾液を蒸発乾固した。得られた粗製物をフラッシュカラムクロマトグラフィー (勾配:ヘキサン中、40-80% EtOAc) で精製することにより、211 (2.0g、収率78%) を白色泡状物として得た。

30

40

50

^1H NMR (600 MHz, CD_3CN) δ 9.15 (s, 1H), 7.93 – 7.86 (m, 1H), 7.44 (dt, $J = 8.3, 1.3$ Hz, 2H), 7.37 – 7.24 (m, 6H), 6.92 – 6.85 (m, 4H), 6.16 – 5.99 (m, 1H), 5.07 (dd, $J = 17.6, 8.1$ Hz, 1H), 4.49 – 4.32 (m, 1H), 4.17 – 4.08 (m, 1H), 3.91 – 3.64 (m, 7H), 3.63 – 3.42 (m, 2H), 2.69 – 2.64 (m, 1H), 2.48 – 2.41 (m, 1H), 1.57 – 1.35 (m, 3H), 1.21 – 1.12 (m, 10H), 1.01 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H) ppm. ^{31}P NMR (243 MHz, CD_3CN) δ 150.69, 149.37 ppm. ^{19}F NMR (565 MHz, CD_3CN) δ -159.70 ppm. ^{13}C NMR (151 MHz, CD_3CN) δ 163.57, 159.86, 159.82, 151.53, 151.51, 145.71, 140.85, 136.39, 136.31, 136.27, 136.18, 131.35, 131.29, 131.25, 129.25, 129.18, 128.99, 128.96, 128.12, 128.07, 119.62, 119.38, 114.15, 114.12, 103.10, 103.07, 102.23, 102.21, 101.95, 101.92, 101.02, 101.00, 100.73, 100.71, 90.16, 87.80, 87.75, 81.33, 81.14, 81.12, 74.67, 74.56, 74.47, 74.29, 74.19, 74.09, 61.84, 61.37, 60.96, 59.33, 59.20, 59.05, 58.92, 55.95, 55.91, 55.32, 44.09, 44.00, 24.98, 24.93, 24.90, 24.88, 24.86, 24.75, 24.71, 21.15, 20.99, 20.93, 20.88, 18.11, 18.07, 17.94, 17.91, 17.53, 17.36 ppm.

10

【 0 8 0 8 】

参考文献:

- (1) Reddy, P. G.; Chun, B.-K.; Zhang, H.-R.; Rachakonda, S.; Ross, B. S.; Sofia, M. J. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 3782.
- (2) Sofia, M. J.; Bao, D.; Chang, W.; Du, J.; Nagarathnam, D.; Rachakonda, S.; Reddy, P. G.; Ross, B. S.; Wang, P.; Zhang, H.-R.; Bansal, S.; Espiritu, C.; Keilman, M.; Lam, A. M.; Steuer, H. M. M.; Niu, C.; Otto, M. J.; Furman, P. A. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 7202.
- (3) Maiti, M.; Maiti, M.; Rozenski, J.; De Jonghe, S.; Herdewijn, P. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 5158.

20

【 0 8 0 9 】

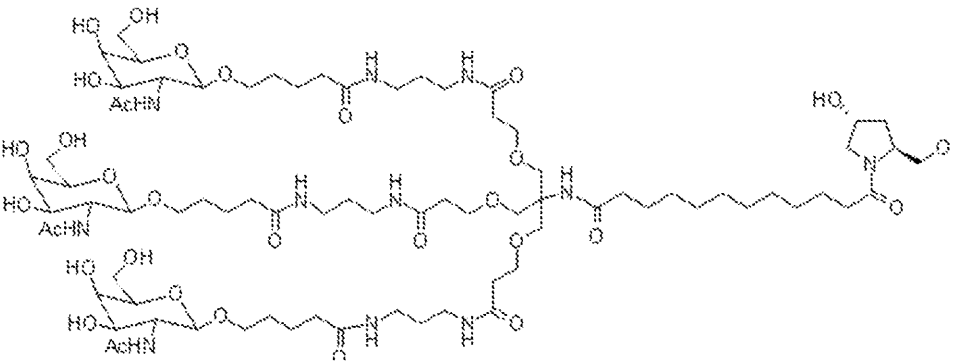
(表 1 1) 配列において使用される略号

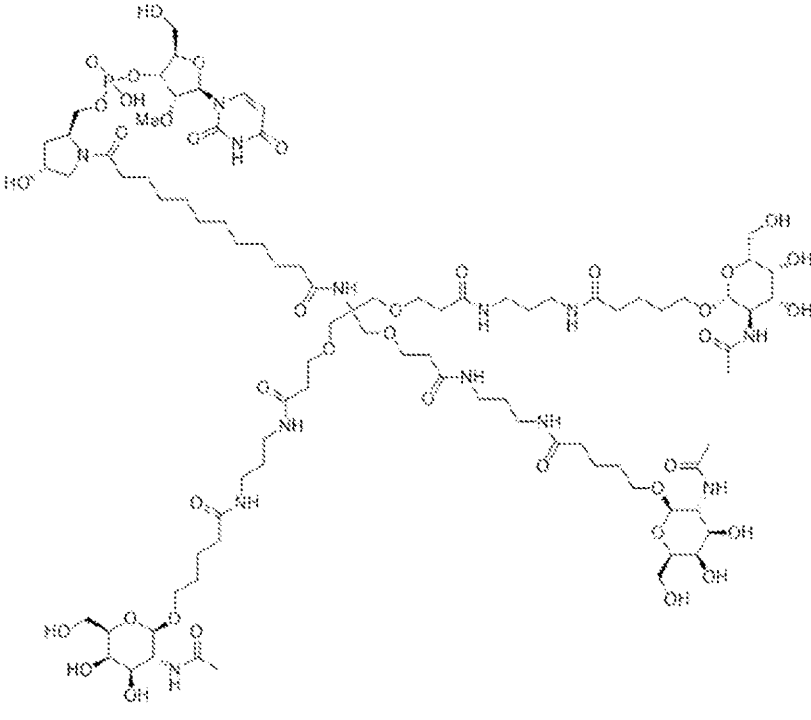
Afまたは A _F	2'-デオキシ-2'-フルオロアデノシン-3'-ホスフェート
Afs	2'-デオキシ-2'-フルオロアデノシン-3'-ホスホロチオエート
Cfまたは C _F	2'-デオキシ-2'-フルオロシチジン-3'-ホスフェート
Cfs	2'-デオキシ-2'-フルオロシチジン-3'-ホスホロチオエート
Gfまたは G _F	2'-デオキシ-2'-フルオログアノシン-3'-ホスフェート
Gfs	2'-デオキシ-2'-フルオログアノシン-3'-ホスホロチオエート
Ufまたは U _F	2'-デオキシ-2'-フルオロウリジン-3'-ホスフェート
Ufs	2'-デオキシ-2'-フルオロウリジン-3'-ホスホロチオエート
a	2'-0-メチルアデノシン-3'-ホスフェート
as	2'-0-メチルアデノシン-3'-ホスホロチオエート
c	2'-0-メチルシチジン-3'-ホスフェート
cs	2'-0-メチルシチジン-3'-ホスホロチオエート
g	2'-0-メチलगアノシン-3'-ホスフェート
gs	2'-0-メチलगアノシン-3'-ホスホロチオエート
t	2'-0-メチル-5-メチルウリジン-3'-ホスフェート

30

40

50

ts	2'-0-メチル-5-メチルウリジン-3'-ホスホロチオエート
u	2'-0-メチルウリジン-3'-ホスフェート
us	2'-0-メチルウリジン-3'-ホスホロチオエート
dA	2'-デオキシアデノシン-3'-ホスフェート (デオキシ-アデノシン)
dAs	2'-デオキシアデノシン-3'-ホスホロチオエート
dC	2'-デオキシシチジン-3'-ホスフェート (デオキシ-シチジン)
dCs	2'-デオキシシチジン-3'-ホスホロチオエート
dG	2'-デオキシグアノシン-3'-ホスフェート (デオキシ-グアノシン)
dG	2'-デオキシグアノシン-3'-ホスホロチオエート
dT	2'-デオキシチミジン-3'-ホスフェート (デオキシ-チミジン)
dTs	2'-デオキシチミジン-3'-ホスホロチオエート
VP	5'-E-ビニルホスホネート
zVP	5'-(Z)-ビニルホスホネート
U _{F/M}	2'-デオキシ-2'-フルオロ-2'-C-メチル-ウリジン-3'-ホスフェート
C _{F/M}	2'-デオキシ-2'-フルオロ-2'-C-メチル-シチジン-3'-ホスフェート
U _{F/MS}	2'-デオキシ-2'-フルオロ-2'-C-メチル-ウリジン-3'-ホスホロチオエート
C _{F/MS}	2'-デオキシ-2'-フルオロ-2'-C-メチル-シチジン-3'-ホスホロチオエート
s	ホスホロチオエート連結部 - 先行するヌクレオチド上の3'-ホスフェートの3'-ホスホロチオエートへの修飾を示す
“●” 記号	複数のホスホロチオエート連結部 - 先行するヌクレオチド上の3'-ホスフェートの3'-ホスホロチオエートへの修飾を示す
L96	(2S,4R)-1-[29-[[2-(アセチルアミノ)-2-デオキシ-β-D-ガラクトピラノシル] オキシ]-14,14-ビス[[3-[[3-[[5-[[2-(アセチルアミノ)-2-デオキシ-β-D-ガラクトピラノシル] オキシ]-1-オキソペンチル] アミノ] プロピル] アミノ]-3-オキソプロポキシ] メチル]-1,12,19,25-テトラオキソ-16-オキサ-13,20,24-トリアザノコサ-1-イル]-4-ヒドロキシ-2-ヒドロキシメチルピロリジン 

uL96	2'-O-メチルウリジン-3'-ホスフェート (2S,4R) -1- [29- [2- (アセチルアミノ) -2-デオキシ-β-D-ガラクトピラノシル] オキシ] -14,14-ビス [3- [3- [5- [2- (アセチルアミノ) -2-デオキシ-β-D-ガラクトピラノシル] オキシ] -1-オキソペンチル] アミノ] プロピル] アミノ] -3-オキソプロボキシ] メチル] -1,12,19,25-テトラオキソ-16-オキサ-13,20,24-トリアザノナコサ-1-イル] -4-ヒドロキシ-2-ピロリジニル) メチルエステル 
------	---

* 3'末端ヌクレオチドは、(L) にコンジュゲートされている場合または別段の表示がある場合を除き、3'-OHである。

【0810】

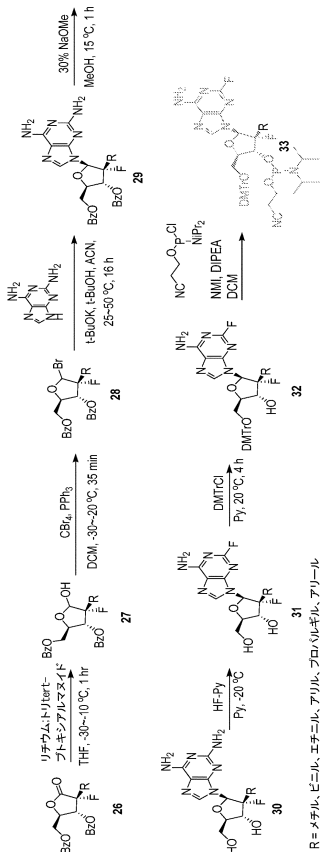
本明細書および実施例において特定された特許および他の刊行物はすべて、あらゆる目的で、参照により本明細書に、明らかに組み入れられる。これらの刊行物は、それらの開示が本願の出願日より前になされたという理由で提供されるにすぎない。この点について、本発明者らが先行発明を理由に、または他の何らかの理由で、そのような開示に先行する資格がないことの自白であるとみなすべきものは何もない。これらの文書の日付に関する陳述またはこれらの文書の内容に関する表現はいずれも出願人が入手できる情報に基づくが、これらの文書の日付または内容の正しさに関する承認を構成するものではない。

【0811】

好ましい態様を本明細書において詳細に描写し説明したが、本発明の要旨から逸脱することなくさまざまな変更、付加、置換などを行うこと、そしてそれゆえに、それらは後述する特許請求の範囲に定義される発明の範囲内にあるとみなされることは、当業者には明らかだろう。さらに、まだ示されていない範囲において、本明細書において記載され例示されるさまざまな態様のいずれか一つが、本明細書において開示される他の態様のいずれかに示される特徴を組み込むように、さらに修飾されうること、当業者には理解されるだろう。

Gem Me/F 2-F-プリンアミダイト

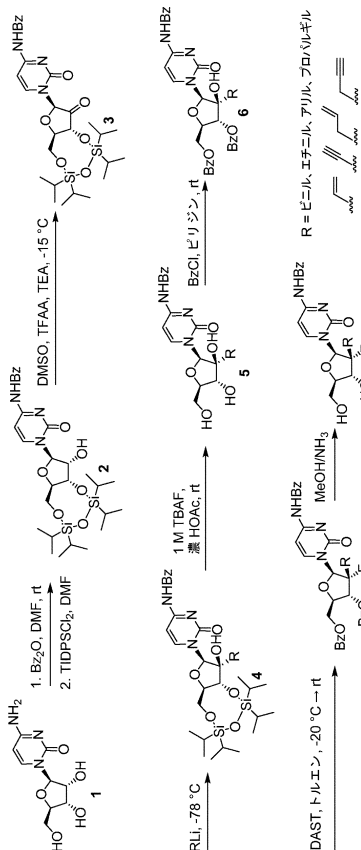
【図 3】



・ R=Meである場合の化合物31までの化合物に関する参照はReddy et. al. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 3782-3790に報告されている。

Gem R/F -ウリジンおよびシチジン

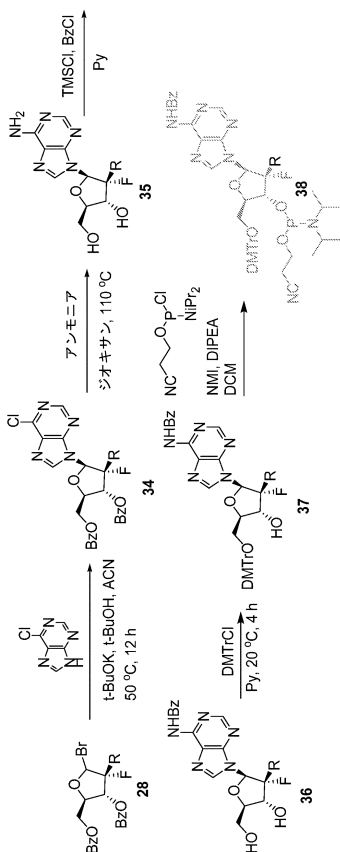
【図 1】



・ R=Meである場合の化合物8に関する参照はClark et. al. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 5504-5508に報告されている。

Gem Me/F -アデノシンアミダイト

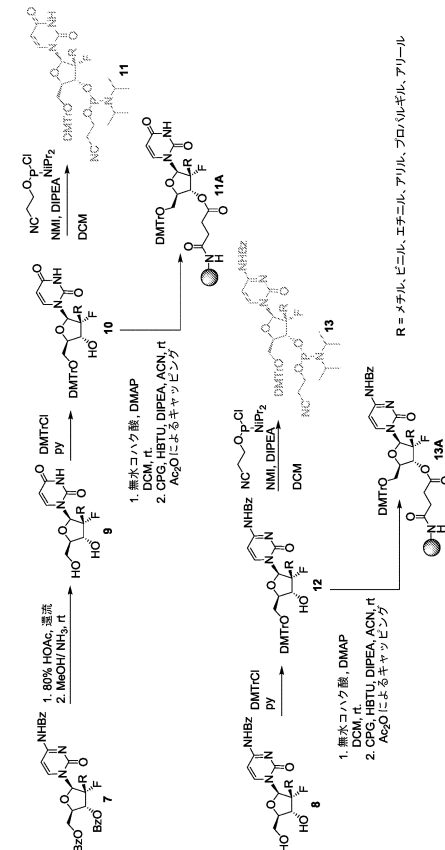
【図 4】



・ R=Meである場合の化合物36までの化合物に関する参照はReddy et. al. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 3782-3790に要いされる。

Gem R/F -ウリジンおよびシチジンミダイトならびにCPG

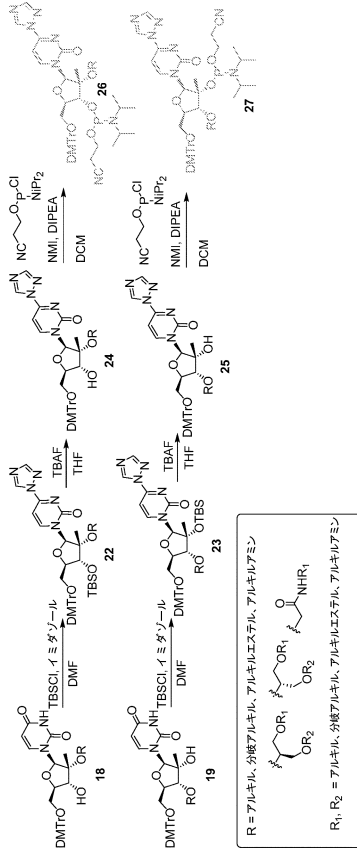
【図 2】



・ R=Meである場合の化合物9および10に関する参照はClark et. al. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 5504-5508に要いされる。

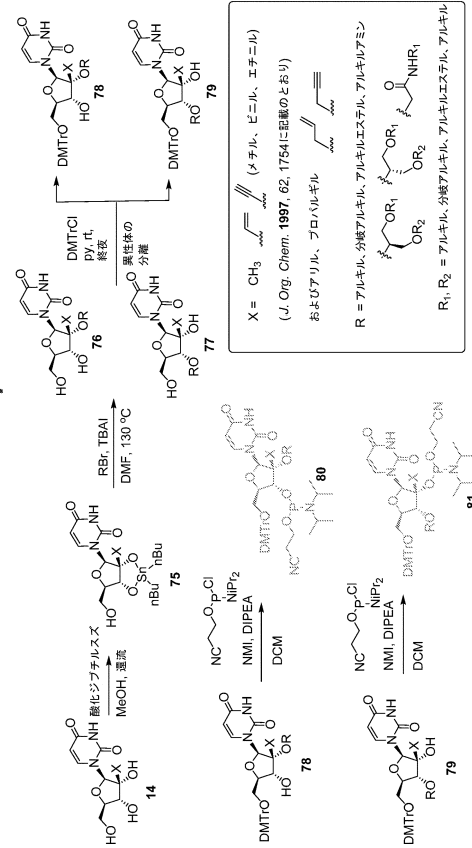
【図 1 3】

2'-および 3'-Gem Me/OR-C アミダイト



【図 1 4】

2'-および 3'-Gem R/OR-U アミダイト

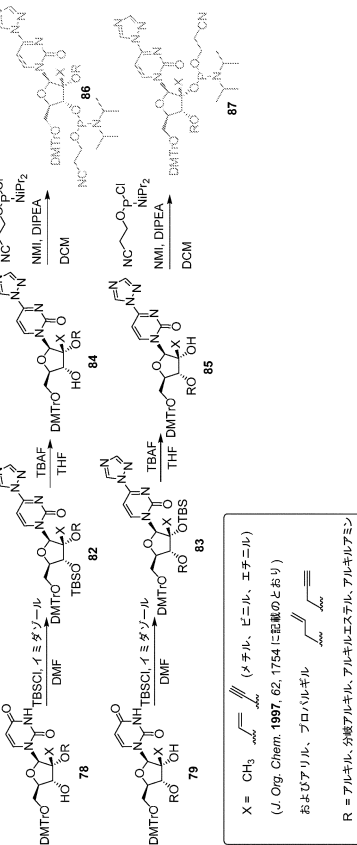


10

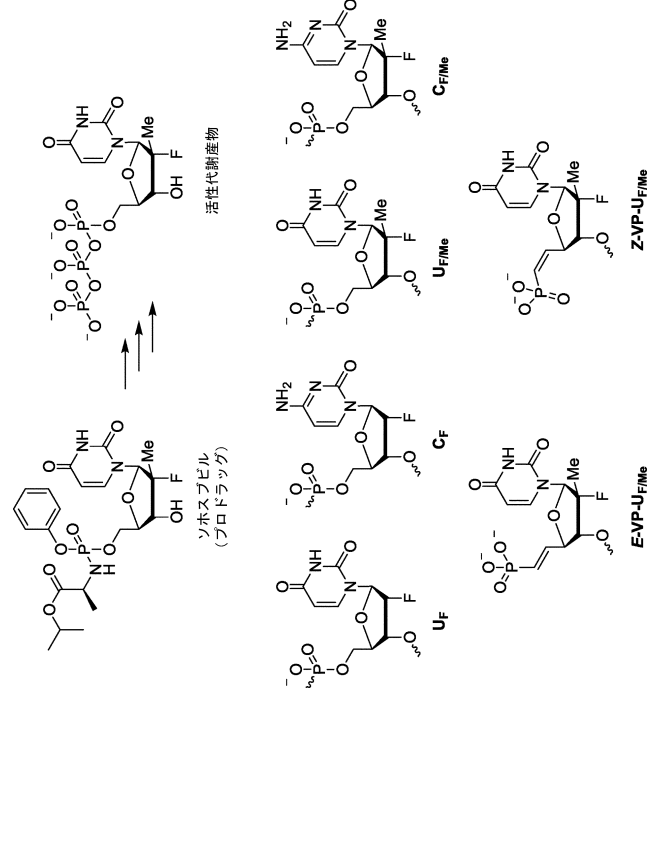
20

【図 1 5】

2'-および 3'-Gem R/OR-C アミダイト



【図 1 6】

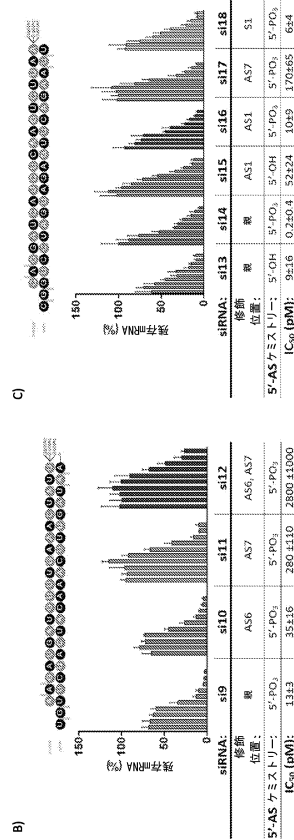
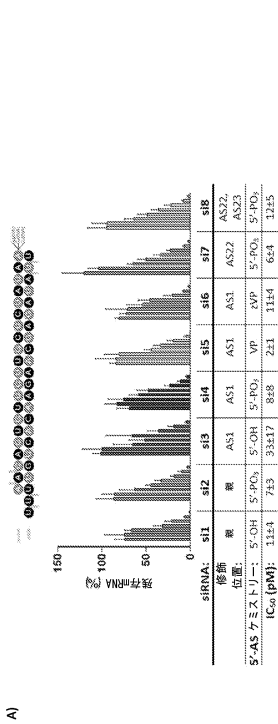


30

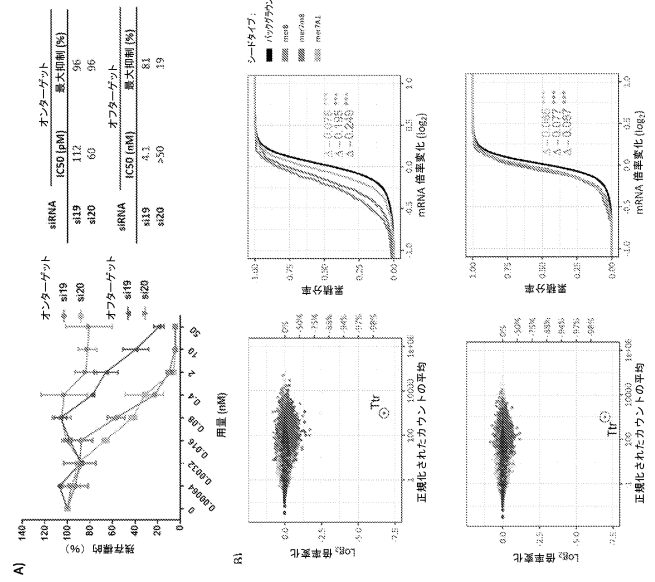
40

50

【図 17】



【図 18】



10

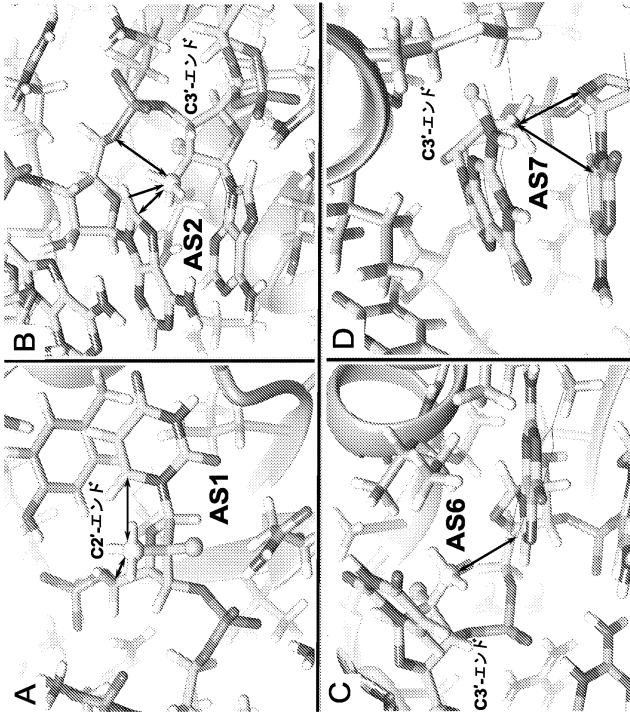
20

30

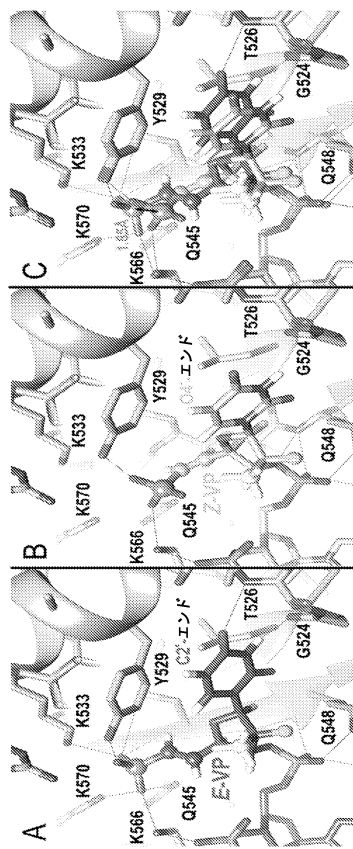
40

50

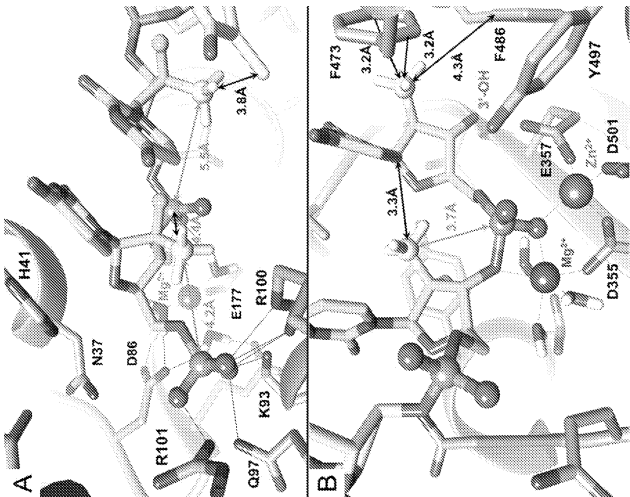
【図 2 1】



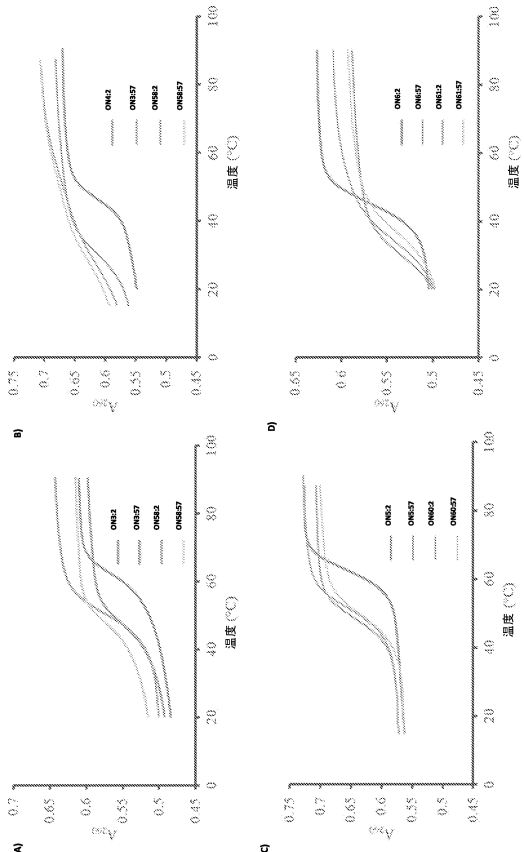
【図 2 2】



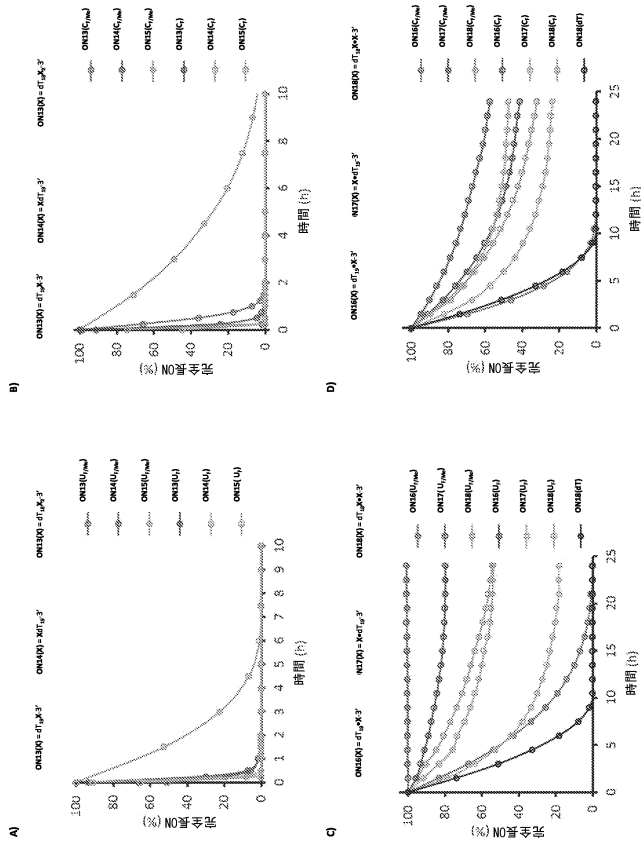
【図 2 3】



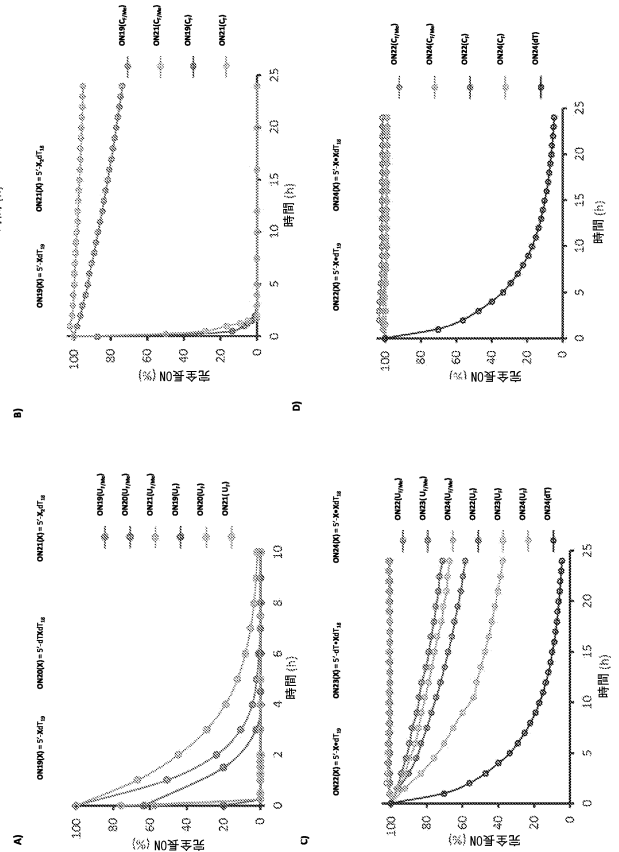
【図 2 4】



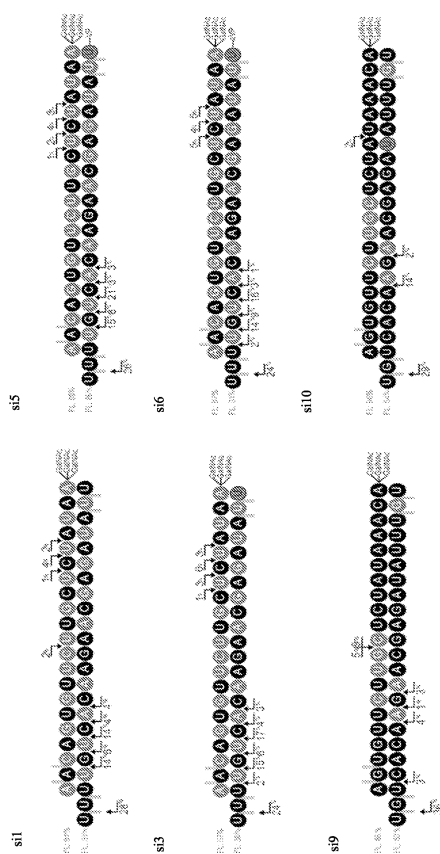
【図 25】



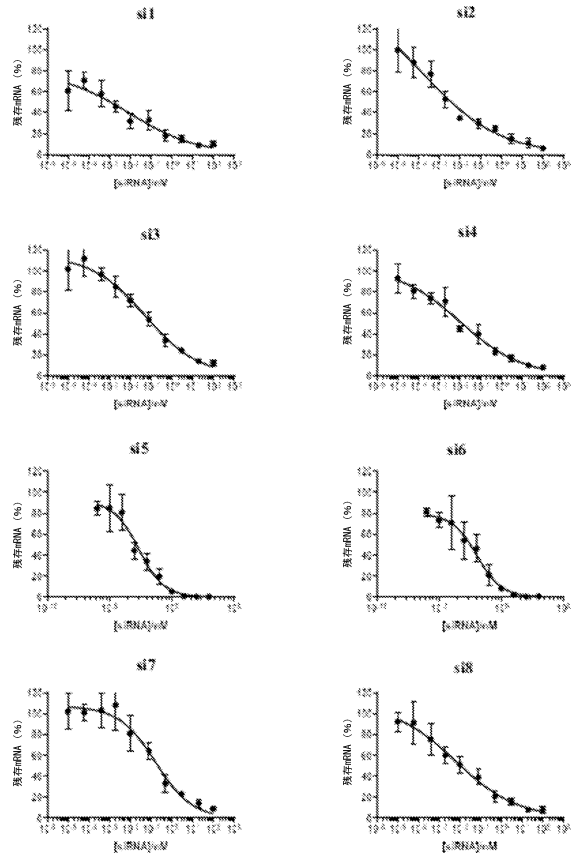
【圖 26】



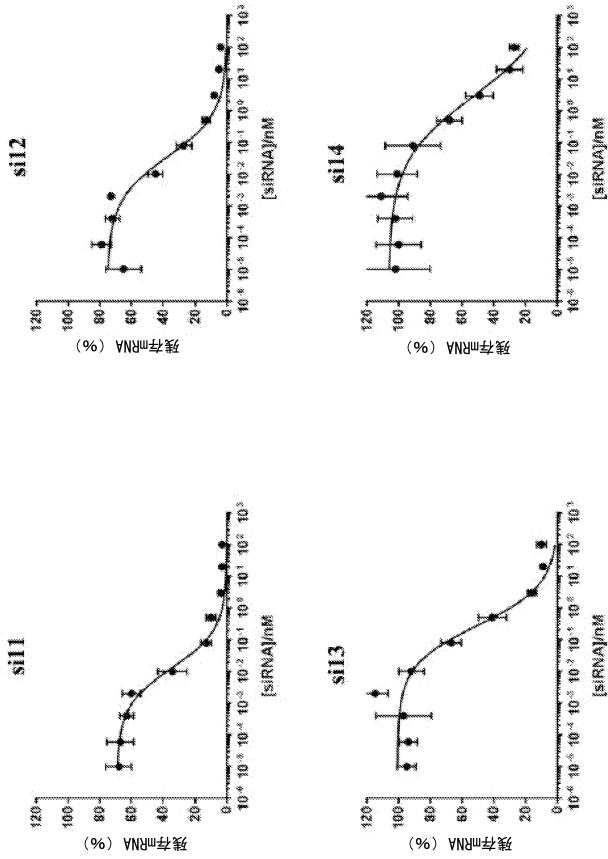
【図 27】



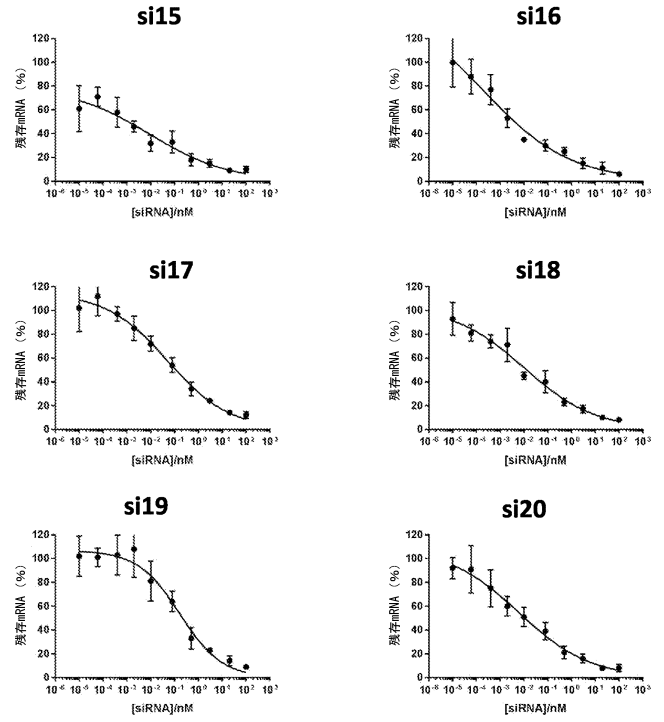
【圖 28】



【図 2 9】



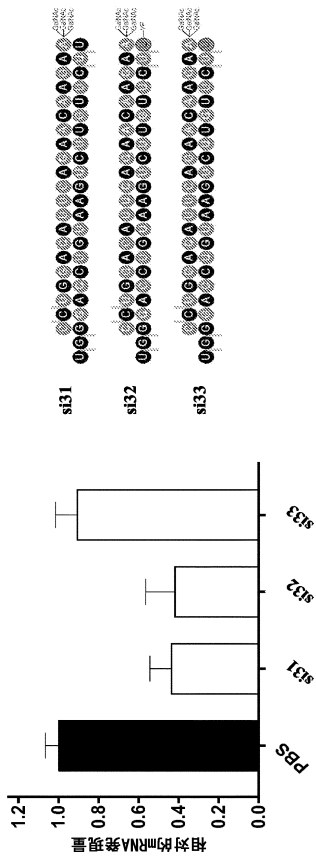
【図 3 0】



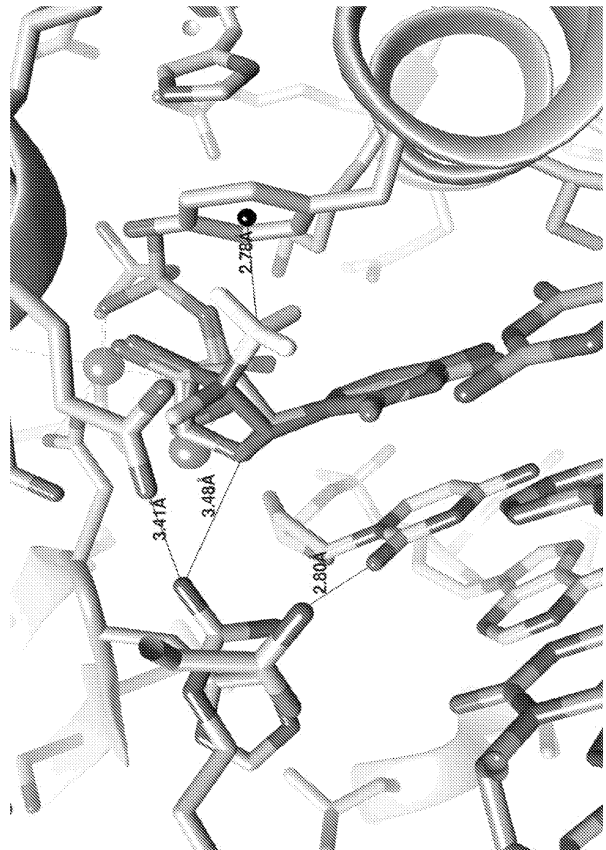
10

20

【図 3 1】



【図 3 2】

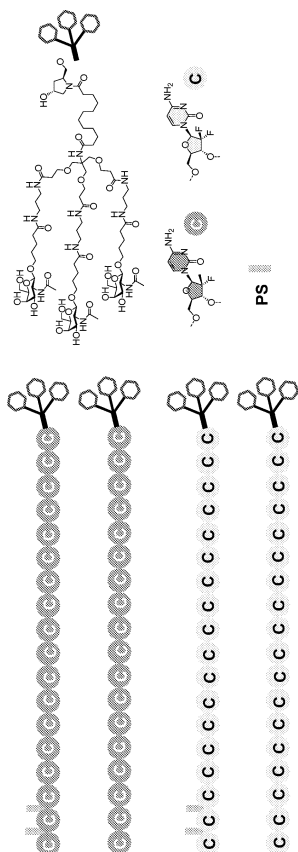


30

40

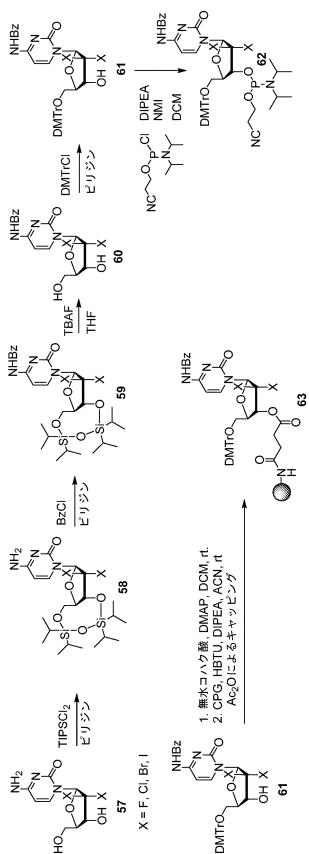
50

ヌクレオシドビルディングブロックを使った治療的有用性のための
プロ-オリゴヌクレオチド



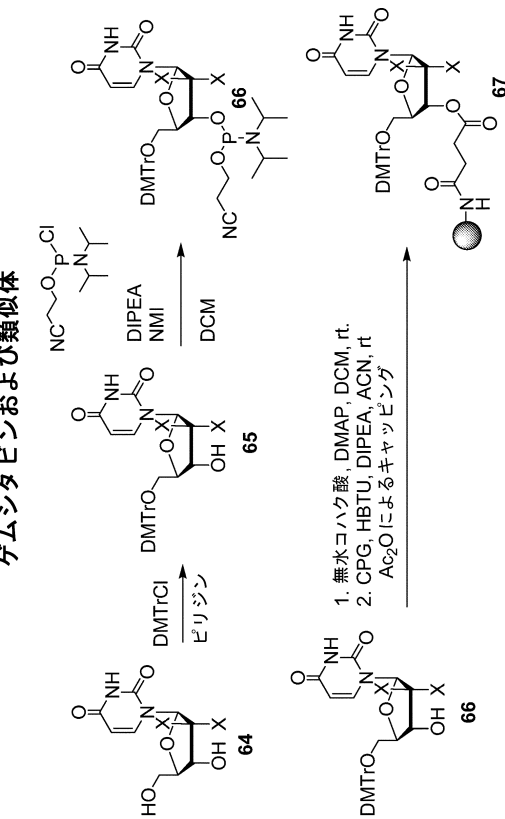
【図 3 4】

ゲムシタビンおよび類似体



- 化合物57はX=Fのものは市販されており、X=Cl、Brの場合は報告されている [Bloorg. Med. Chem. 2020, 28, 115208]
- 化合物60はX=Fの場合は報告されている [Eur. J. Med. Chem. 2021, 213, 113135]

ゲムシタビンおよび類似体



- 化合物64はX=Fのものは市販されており、X=Cl、Brの場合は報告されている [Bloorg. Med. Chem. 2020, 28, 115208]

【手続補正書】

【提出日】令和6年7月16日(2024.7.16)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2024539093000001.xml

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/047102

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - INV. - C07H 21/04 (2023.01) ADD. - C07H 19/20; C12N 15/113 (2023.01) CPC - INV. - C07H 21/04 (2023.01) ADD. - C12N 2310/322; C07H 19/20; C12N 15/1137 (2023.01) 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) See Search History document Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document Electronic database consulted during the international search (name of database and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2012/0059045 A1 (PRAKASH et al) 08 March 2012 (08.03.2012) entire document	1-3, 120
A	PUBCHEM, SID 238412335, Available Date: 13 February 2015 [retrieved on 13 February 2023], Retrieved from the Internet <URL: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/238412335 > entire document	1-3, 120
A	US 2010/0104532 A1 (CHEN et al) 29 April 2010 (29.04.2010) entire document	1-3, 120
A	US 2017/0143749 A1 (ALIOS BIOPHARMA INC.) 25 May 2017 (25.05.2017) entire document	1-3, 120
A	US 2021/0017519 A1 (ALNYLAM PHARMACEUTICALS INC.) 21 January 2021 (21.01.2021) entire document	1-3, 120
☐ 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 "D" document cited by the applicant in the international application "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 13 February 2023		Date of mailing of the international search report MAR 14 2023
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Taina Matos Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2022/047102

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

a. ☐ forming part of the international application as filed.

b. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☒ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2022/047102

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 4-119, 121-164, 168-194, 196-201
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
See extra sheet(s).

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-3, 120

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2022/047102

Continued from Box No. III Observations where unity of invention is lacking

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees need to be paid.

Group I+: claims 1-3 and 120 are drawn to double-stranded RNA (dsRNA) and oligonucleotide comprising one or both of (a) and (b).

Group II+: claims 165-167, 195, and 202-204 are drawn to compounds of formula (III) or (III').

The first invention of Group I+ is restricted to an antisense strand comprises one of (a) wherein (a) is a 5'-terminal nucleoside that is a 2'-geminal-substituted nucleoside of formula (II) wherein X is O; B is an unmodified nucleobase, wherein the nucleobase is unsubstituted adenine; Ra' is halogen, wherein the halogen is F; Rb is unsubstituted C1 alkyl; Rc is a bond to an internucleoside linkage to a subsequent nucleoside; R4 is hydrogen; and Re is optionally substituted -C2-6alkenyl-Re1, specifically -(unsubstituted CH=CH)Re1 wherein Re1 is -P(O)(ORe4)2 wherein each Re4 is hydrogen, and oligonucleotides thereof. It is believed that claims 1-3 and 120 read on this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they read on the above embodiment.

The first invention of Group II+ is restricted based on the proviso that only one of R3a, R3 and R5 is a linkage to a solid support, that only one of Ra, R3, and R5a is a solid support or linkage to a solid support; that only one of Ra, R3 and R5a is a reactive phosphorous and that the compound is not of structure shown; and is restricted to a compound of formula (III) wherein: X is O; B is an unmodified nucleobase, wherein the nucleobase is unsubstituted adenine; Ra is halogen, wherein the halogen is F; Rb is unsubstituted C1 alkyl; Rc is a bond to an internucleoside linkage to a subsequent nucleoside; R4 is hydrogen; and Re is optionally substituted -C2-6alkenyl-R5a; R5a is a phosphorous group, wherein the phosphorous group is -P(O)(ORe4)2, each Re4 is independently hydrogen.

Applicant is invited to elect additional formula(e) for each additional compound to be searched in a specific combination by paying an additional fee for each set of election. Each additional elected formula(e) requires the selection of a single definition for each compound variable. An exemplary election would be an antisense strand comprises one of (a) wherein (a) is a 5'-terminal nucleoside that is a 2'-geminal-substituted nucleoside of formula (II) wherein X is S; B is an unmodified nucleobase, wherein the nucleobase is unsubstituted adenine; Ra' is halogen, wherein the halogen is F; Rb is unsubstituted C1 alkyl; Rc is a bond to an internucleoside linkage to a subsequent nucleoside; R4 is hydrogen; and Re is optionally substituted -C2-6alkenyl-Re1, specifically -(unsubstituted CH=CH)Re1 wherein Re1 is -P(O)(ORe4)2 wherein each Re4 is hydrogen, and oligonucleotides thereof. Additional formula(e) will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that read on any additional elected inventions. Applicants must further indicate, if applicable, the claims which read on the first named invention if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined.

The inventions listed in Groups I+ and II+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1, because under PCT Rule 13.2 they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The special technical features of Group I+, double-stranded RNA (dsRNA) and oligonucleotide comprising one or both of (a) and (b), are not present in Group II+, and the special technical features of Group II+, compounds of formula (III) or (III'), are not present in Group I+.

The Groups I+ and II+ formulae do not share a significant structural element requiring the selection of alternatives for the compound variables, X, B, Ra', Re, Ra, Rb, Rc, Ra', R3, R4, R5 and accordingly these groups lack unity a priori.

Additionally, even if Groups I+ and II+ were considered to share the technical features of a double-stranded RNA (dsRNA) comprising a sense strand and an antisense strand complementary to the sense strand, wherein the dsRNA has a double-stranded region of at least about 15 base-pairs, and wherein the antisense strand comprises one or both of (a) and (b): (a) a 5'-terminal nucleoside that is a 2'-geminal-substituted nucleoside of formula (II) or (II'); and (b) a 2'-geminal-substituted nucleoside according to formula (I) or (I') at least at one of positions 2-9, counting from the 5'-end of the antisense strand; an oligonucleotide comprising one or both of (a) and (b): (a) a 5'-terminal nucleoside that is a 2'-geminal-substituted nucleoside of formula (II) and (b) at least one 2'-geminal-substituted nucleoside according to formula (I); and a compound of formula (III) or (III'), these shared technical features do not represent a contribution over the prior art as disclosed by US 2012/0059045 A1 to Prakash et al. (hereinafter, "Prakash") and US 2017/0143749 A1 to Allos Biopharma, Inc. (hereinafter, "Allos").

Prakash teaches a double-stranded RNA (dsRNA) comprising a sense strand and an antisense strand complementary to the sense strand, wherein the dsRNA has a double-stranded region of at least about 15 base-pairs, and wherein the antisense strand comprises (Para. [0163], included herein are oligomeric compounds such as antisense oligomeric compounds, antisense oligonucleotides; Para. [0024], oligomeric compounds are provided comprising from 8 to about 18 linked monomeric subunits; Para. [0133], Oligomeric compounds can form double stranded constructs such as for example two strands hybridized to form a double stranded composition) one or both of (a) and (b): (a) a 5'-terminal nucleoside that is a 2'-geminal-substituted nucleoside of formula (II) or (II'); and (b) a 2'-geminal-substituted nucleoside according to formula (I) or (I') at least at one of positions 2-9, counting from the 5'-end of the antisense strand (Para. [0011], oligomeric compound comprises at least one 2'-fluoroethoxy modified nucleoside having formula I); and an oligonucleotide comprising one or both of (a) and (b): (a) a 5'-terminal nucleoside that is a 2'-geminal-substituted nucleoside of formula (II) and (b) at least one 2'-geminal-substituted nucleoside according to formula (I) (Para. [0011], oligomeric compound comprises at least one 2'-fluoroethoxy modified nucleoside having formula I; Para. [0163], included herein are oligomeric compounds such as antisense oligomeric compounds, antisense oligonucleotides; Para. [0024], oligomeric compounds are provided comprising from 8 to about 18 linked monomeric subunits).

Allos teaches a compound of formula (III) wherein: X is O; B is nucleobase; Ra is C1 alkyl; Rb is halogen; R4 is -ORc2; Rc2 is hydrogen; R4 is hydrogen; R5 is unsubstituted C1 alkyl-R5a; R5a is -OR5b; and R5b is hydrogen (Pg. 44, see 10th shown structure).

The inventions listed in Groups I+ and II+ therefore lack unity under Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

フロントページの続き

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,
CV,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,I
T,JM,JO,JP,KE,KG,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,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,
SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100119507

弁理士 刑部 俊

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100188433

弁理士 梅村 幸輔

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100214396

弁理士 塩田 真紀

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(74)代理人 100221741

弁理士 酒井 直子

(74)代理人 100114926

弁理士 枝松 義恵

(72)発明者 マノハラン ムタイア

アメリカ合衆国 0 2 1 4 2 マサチューセッツ州 ケンブリッジ ウェスト ケンドール ストリート
6 7 5 ヘンリ エイ. ターミア スクエア アルナイラム ファーマシューティカルズ, インコー
ポレイテッド内

(72)発明者 松田 成夫

アメリカ合衆国 0 2 1 4 2 マサチューセッツ州 ケンブリッジ ウェスト ケンドール ストリート
6 7 5 ヘンリ エイ. ターミア スクエア アルナイラム ファーマシューティカルズ, インコー
ポレイテッド内

(72)発明者 ダッタ デウルバジヨティ

アメリカ合衆国 0 2 1 4 2 マサチューセッツ州 ケンブリッジ ウェスト ケンドール ストリート
6 7 5 ヘンリ エイ. ターミア スクエア アルナイラム ファーマシューティカルズ, インコー
ポレイテッド内

F ターム (参考) 4C057 AA03 AA17 AA19 BB02 CC02 LL10 LL31 MM01