202202622

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 202202622 A

(43)公開日： 中華民國 111 (2022) 年 01 月 16 日

(21)申請案號：110137469 (22)申請日： 中華民國 108 (2019) 年 03 月 08 日

(51)Int. Cl.： *C12N15/113 (2010.01)* *A61K31/7088 (2006.01)*
A61P3/10 (2006.01)

(30)優先權：2018/03/09 日本 2018-043524
2018/07/05 日本 2018-128015

(71)申請人：日商第一三共股份有限公司 (日本) DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED (JP)
日本
學校法人神戶學院 (日本) KOBE GAKUIN EDUCATIONAL FOUNDATION (JP)
日本

(72)發明人：小泉誠 KOIZUMI, MAKOTO (JP) ；大西朗之 ONISHI, YOSHIYUKI (JP) ；益田剛 MASUDA, TAKESHI (JP) ；岩本充広 IWAMOTO, MITSUHIRO (JP) ；関口幸子 SEKIGUCHI, YUKIKO (JP) ；伊藤健太郎 ITO, KENTARO (JP) ；辻真之介 TSUJI, SHINNOSUKE (JP) ；松尾雅文 MATSUO, MASAFUMI (JP)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：30 項 圖式數：26 共 308 頁

(54)名稱

糖原病 Ia 型治療藥

(57)摘要

本發明確立一種糖原病 Ia 型之分子治療法。本發明係一種寡核苷酸、其藥理上容許之鹽或溶劑合物，上述寡核苷酸係含有與具有 c.648G ＞ T 變異之 G6PC 基因之 cDNA 互補之核苷酸序列的鹼基數為 15 ～ 30 者，且含有與具有 c.648G ＞ T 變異之 G6PC 基因之包含外顯子 5 之 5'末端起第 82 號至第 92 號之任一部位之區域互補的序列。本發明之醫藥(例如，糖原病 Ia 型治療藥)包含上述寡核苷酸、其醫藥上可容許之鹽或溶劑合物。

20220622
專利案號：110137469
原申請案號：108107814
202202622

【發明摘要】

【中文發明名稱】

糖原病Ia型治療藥

【中文】

本發明確立一種糖原病Ia型之分子治療法。本發明係一種寡核苷酸、其藥理上容許之鹽或溶劑合物，上述寡核苷酸係含有與具有c.648G＞T變異之G6PC基因之cDNA互補之核苷酸序列的鹼基數為15～30者，且含有與具有c.648G＞T變異之G6PC基因之包含外顯子5之5'末端起第82號至第92號之任一部位之區域互補的序列。本發明之醫藥(例如，糖原病Ia型治療藥)包含上述寡核苷酸、其醫藥上可容許之鹽或溶劑合物。

【指定代表圖】

無

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

糖原病Ia型治療藥

【技術領域】

【0001】本發明係關於一種糖原病Ia型治療藥，更詳細而言，本發明係關於一種將糖原病Ia型患者中具有c.648G＞T變異之G6PC基因於mRNA水準修復而可使正常之G6PC蛋白質表現之寡核苷酸及含有其之醫藥。

【先前技術】

【0002】糖原病Ia型係以葡萄糖6磷酸脫磷酸化酶(G6PC)為原因基因之常染色體隱性遺傳之代謝異常症，主要症狀為低血糖、肝腫大、腎腫大。藉由利用膳食療法之血糖控制，生存預後大幅改善，但即便控制良好，其中超過一半亦呈現肝腺瘤、白蛋白尿(非專利文獻1)。報告有若干糖原病Ia型患者之好發變異，東亞地區引起剪接異常之G6PC c.648G＞T變異作為好發變異而為人所知(非專利文獻2)。

【0003】作為將寡核苷酸送達至肝臟之肝實質細胞之方法，業界報告有一種與作為可鍵結於去唾液酸醣蛋白受體(ASGPR)之配位子而藉由共價鍵上鍵結有N-乙醯基-D-半乳胺糖(GalNAc)等之核酸醫藥(反義或siRNA等)之複合體(非專利文獻3及專利文獻1～9)。於1個寡核苷酸鍵結有1至3個GalNAc。又，作為鍵結有有2個GalNAc之例，非專利文獻4中有所記載。

先前技術文獻

非專利文獻

【0004】 非專利文獻1：Eur J Pediatr. 2002年 161卷 Suppl 1:S20-34

非專利文獻2：Hum Mutat. 2008年，29卷，p.921-930.

非專利文獻3：Methods in Enzymology，1999年，313卷，297～321頁

非專利文獻4：Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 26 (2016) 3690-3693

專利文獻

【0005】 專利文獻1：國際公開第2009/073809

專利文獻2：國際公開第2014/076196

專利文獻3：國際公開第2014/179620

專利文獻4：國際公開第2015/006740

專利文獻5：國際公開第2015/105083

專利文獻6：國際公開第2016/055601

專利文獻7：國際公開第2017/023817

專利文獻8：國際公開第2017/084987

專利文獻9：國際公開第2017/131236

【發明內容】

[發明所欲解決之問題]

【0006】 本發明之目的在於確立一種糖原病Ia型之分子治療法。

[解決問題之技術手段]

【0007】 本發明者等人確立了如下治療法(圖1)，其藉由對具有G6PC c.648G＞T變異之糖原病Ia型患者投予反義寡核苷酸(ASO)，而修復mRNA之異常剪接，誘導正常之G6PC蛋白質之產生。G6PC c.648G＞T變異中產生mRNA之異常剪接，自內含子(intron)4與外顯子(exon)5之接

合處(junction)缺損外顯子(exon)5部分之91個鹼基，引起框移(frame shift)導致之酶之失活。於mRNA之異常剪接經修正之情形時，可期待該轉譯之胺基酸序列與正常型相同(CUG(Leu)→CUU(Leu))，因此於具有G6PC c.648G＞T變異之患者中，藉由該修復mRNA之異常剪接之治療法，產生具有活性之正常之G6PC蛋白質，而可實現糖原病Ia型患者之低血糖發作之風險降低、器官腫大之改善、肝腺瘤風險之降低。本研究成為針對糖原病Ia型之世界首次之分子治療之開發研究。

【0008】 本發明之主旨如以下所述。

(1)一種寡核苷酸、其藥理上容許之鹽或溶劑合物，上述寡核苷酸含有與具有c.648G＞T變異之G6PC基因之cDNA互補之核苷酸序列且鹼基數為15～30，其含有與具有c.648G＞T變異之G6PC基因之包含外顯子5之5'末端起第82號至第92號之任一部位之區域互補的序列。

(2)如(1)所記載之寡核苷酸、其藥理上容許之鹽或溶劑合物，其中上述寡核苷酸係鹼基數為15～21者，其含有與具有c.648G＞T變異之G6PC基因之包含外顯子5之5'末端起第86號至第92號之任一部位之區域互補的序列。

(3)如(1)所記載之寡核苷酸、其藥理上容許之鹽或溶劑合物，其中上述寡核苷酸係鹼基數為15～21者，其含有與具有c.648G＞T變異之G6PC基因之包含外顯子5之5'末端起第92號之部位之區域互補的序列。

(4)如(1)所記載之寡核苷酸、其藥理上容許之鹽或溶劑合物，其中上述寡核苷酸係鹼基數為15～18者，其含有與具有c.648G＞T變異之G6PC基因之包含外顯子5之5'末端起第92號之部位之區域互補的序列。

(5)如(1)所記載之寡核苷酸、其藥理上容許之鹽或溶劑合物，其中上

述寡核苷酸係鹼基數為18者，其含有與具有c.648G＞T變異之G6PC基因之包含外顯子5之5'末端起第92號之部位之區域互補的序列。

(6)如(1)所記載之寡核苷酸、其藥理上容許之鹽或溶劑合物，其中上述寡核苷酸係鹼基數為17者，其含有與具有c.648G＞T變異之G6PC基因之包含外顯子5之5'末端起第92號之部位之區域互補的序列。

(7)如(1)所記載之寡核苷酸、其藥理上容許之鹽或溶劑合物，其中上述寡核苷酸係鹼基數為16者，其含有與具有c.648G＞T變異之G6PC基因之包含外顯子5之5'末端起第92號之部位之區域互補的序列。

(8)如(1)所記載之寡核苷酸、其藥理上容許之鹽或溶劑合物，其中上述寡核苷酸係鹼基數為15者，其含有與具有c.648G＞T變異之G6PC基因之包含外顯子5之5'末端起第92號之部位之區域互補的序列。

(9)如(1)所記載之寡核苷酸、其藥理上容許之鹽或溶劑合物，其中上述寡核苷酸含有序列編號1～32、40～42、44～48之任一序列(其中，序列中之t亦可為u，u亦可為t)中連續之至少15個核苷酸之序列。

(10)如(1)至(9)之任一項所記載之寡核苷酸、其藥理上容許之鹽或溶劑合物，其中上述寡核苷酸進而於5'末端及/或3'末端附加有可於生物體內切斷之寡核苷酸。

(11)如(1)至(10)之任一項所記載之寡核苷酸、其藥理上容許之鹽或溶劑合物，其中構成寡核苷酸之糖及/或磷酸二酯鍵之至少1個經修飾。

(12)如(1)至(10)之任一項所記載之寡核苷酸、其藥理上容許之鹽或溶劑合物，其中構成寡核苷酸之糖係D-核呋喃糖，糖之修飾係D-核呋喃糖之2'位之羥基之修飾。

(13)如(1)至(10)之任一項所記載之寡核苷酸、其藥理上容許之鹽或

溶劑合物，其中構成寡核苷酸之糖係D-核呋喃糖，糖之修飾係D-核呋喃糖之2'-O-烷基化及/或2'-,4'-交聯化。

(14)如(1)至(10)之任一項所記載之寡核苷酸、其藥理上容許之鹽或溶劑合物，其中構成寡核苷酸之糖係D-核呋喃糖，糖之修飾係D-核呋喃糖之2'-O-烷基化及/或2'-O,4'-C-伸烷基化。

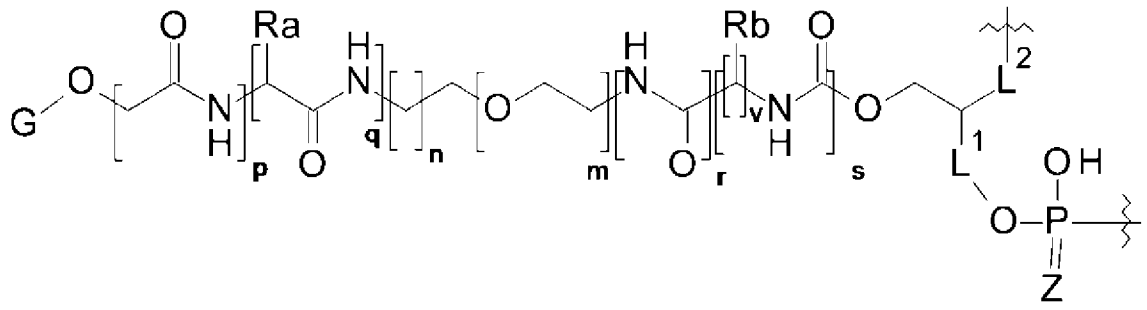
(15)如(1)至(14)之任一項所記載之寡核苷酸、其藥理上容許之鹽或溶劑合物，其中磷酸二酯鍵之修飾係硫代磷酸酯。

(16)如(1)至(15)之任一項所記載之寡核苷酸、其藥理上容許之鹽或溶劑合物，其中上述寡核苷酸於5'末端及/或3'末端結合有GalNAc單元。

(17)如(1)至(15)之任一項所記載之寡核苷酸、其藥理上容許之鹽或溶劑合物，其中上述寡核苷酸於5'末端結合有GalNAc單元。

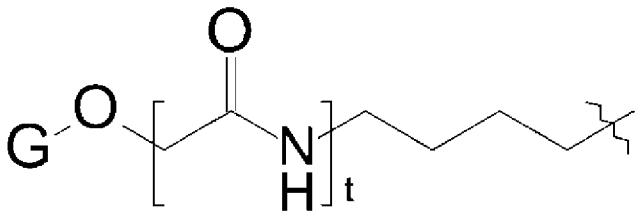
(18)如(16)或(17)所記載之寡核苷酸、其藥理上容許之鹽或溶劑合物，其中GalNAc單元係式

[化1]



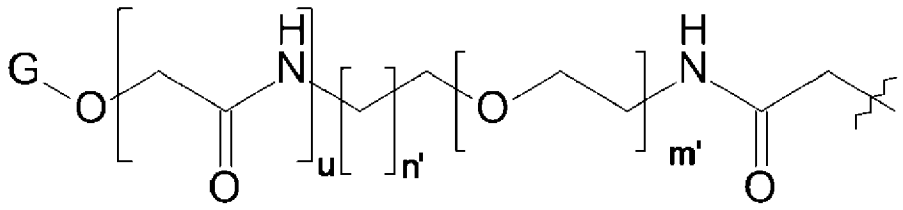
[式中，Ra表示式

[化2]



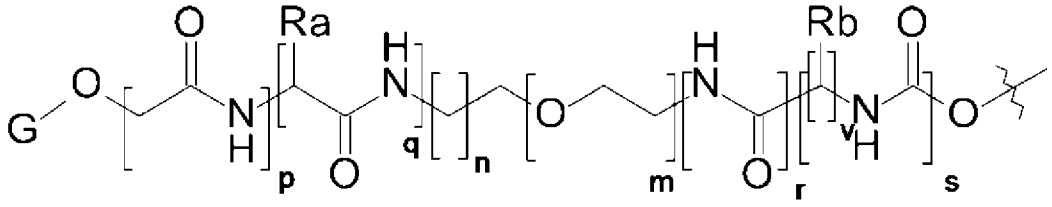
所表示之基，Rb表示式

[化3]



所表示之基或氫原子，XX表示式

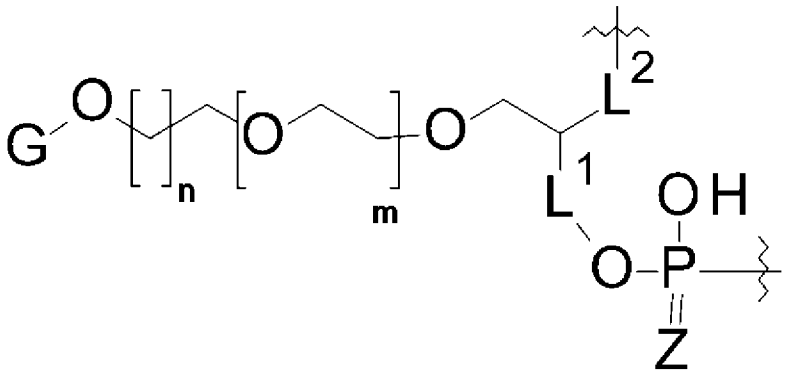
[化4]



所表示之基，G表示5-乙醯胺-2-羥基甲基-3,4-二羥基四氫吡喃-6-基(GalNAc)，Z表示氧原子或硫原子，L^1及L^2中一者表示亞甲基(CH_2)，另一者表示不隔著原子，p、q、r、s、t及u互相獨立地表示0或1，n及n'互相獨立地表示1～15之整數，m及m'互相獨立地表示0～5之整數，於Rb不為氫原子時，v表示1，於Rb為氫原子時，v表示1～7；其中，於n為1時，m為0～5之整數，於n為2～15之整數時，m為0，於n'為1時，m'為1～5之整數，於n'為2～15之整數時，m'為0；可於距磷原子較遠之鍵結鍵上鍵結羥基、XX基、或OG基]所表示之基。

(19)如(16)或(17)所記載之寡核苷酸、其藥理上容許之鹽或溶劑合物，其中GalNAc單元係式

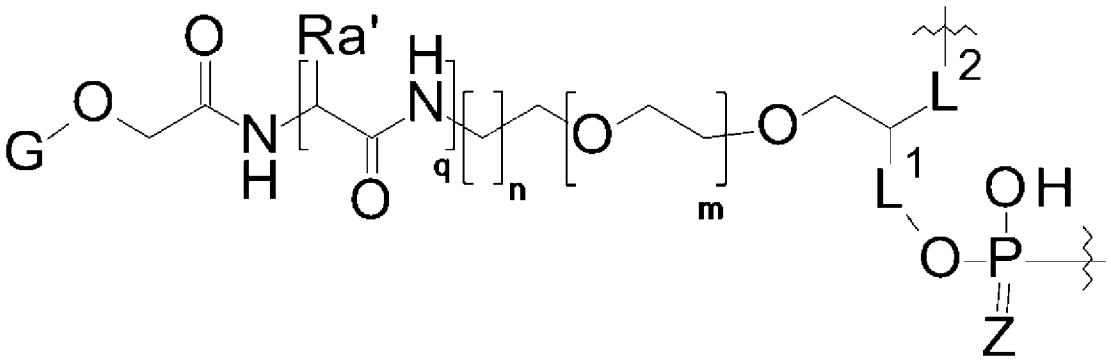
[化5]



[式中，G、Z、L^1、L^2、n及m表示與上述相同之含義]所表示之基。

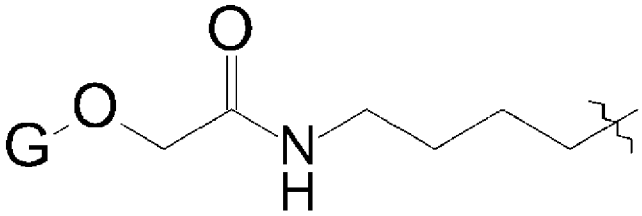
(20)如(16)或(17)所記載之寡核苷酸、其藥理上容許之鹽或溶劑合物，其中GalNAc單元係式

[化6]



[式中，G、Z、L^1、L^2、q、n及m表示與上述相同之含義，Ra'表示式

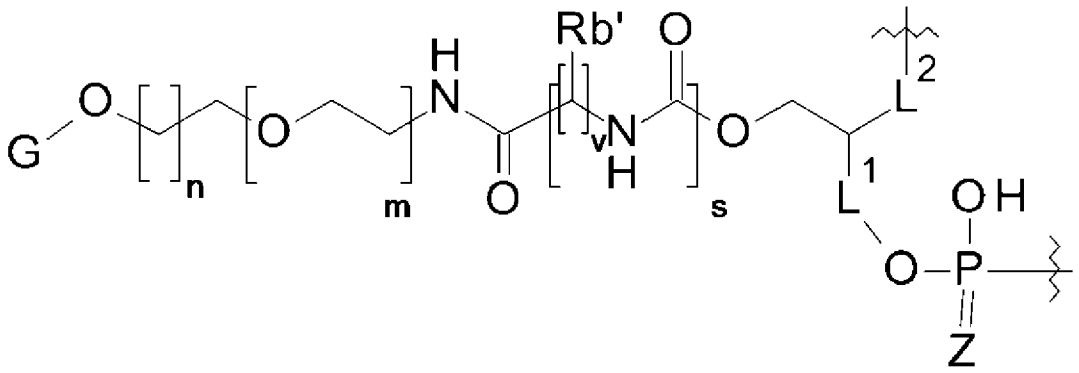
[化7]



所表示之基]所表示之基。

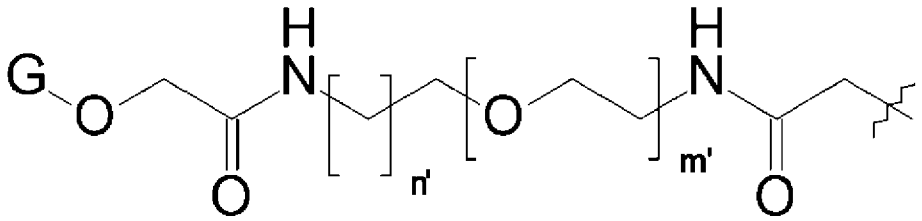
(21)如(16)或(17)所記載之寡核苷酸、其藥理上容許之鹽或溶劑合物，其中GalNAc單元係式

[化8]



[式中，G、Z、L^1、L^2、s、n、m及v表示與上述相同之含義，Rb'表示式

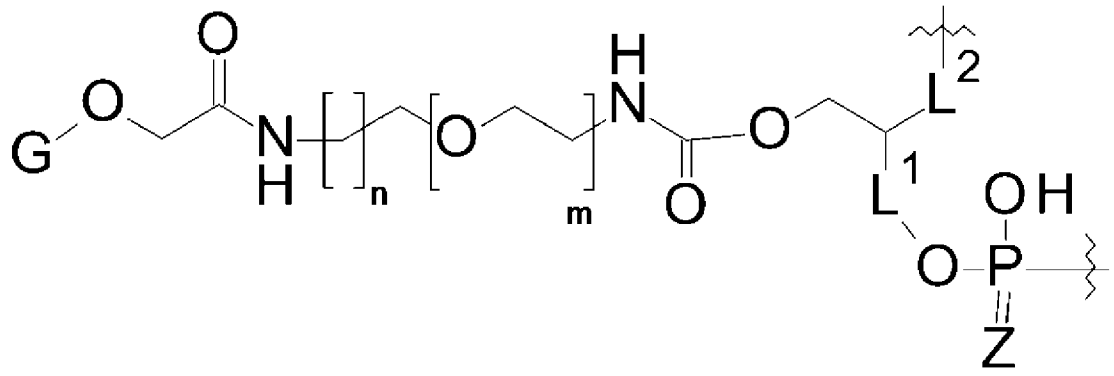
[化9]



(式中，n'及m'表示與上述相同之含義)所表示之基或氫原子]所表示之基。

(22)如(16)或(17)所記載之寡核苷酸、其藥理上容許之鹽或溶劑合物，其中GalNAc單元係或式

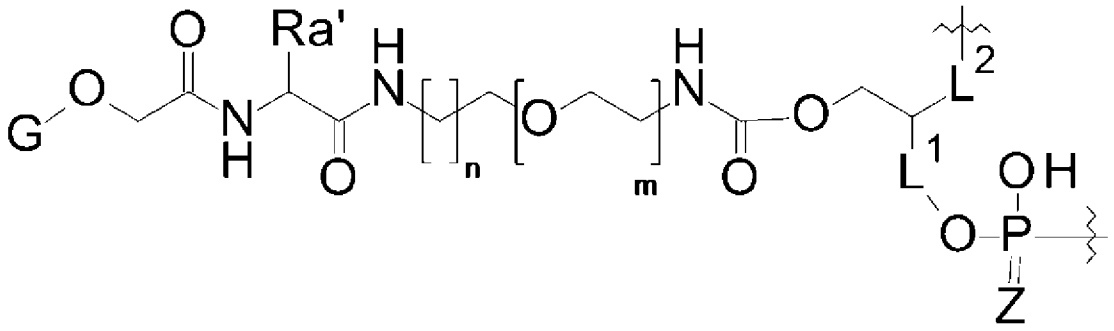
[化10]



[式中，G、Z、L^1、L^2、n及m表示與上述相同之含義]所表示之基。

(23)如(16)或(17)所記載之寡核苷酸、其藥理上容許之鹽或溶劑合物，其中GalNAc單元係式

[化11]



[式中，G、Z、L^1、L^2、n、m及Ra'表示與上述相同之含義]所表示之基。

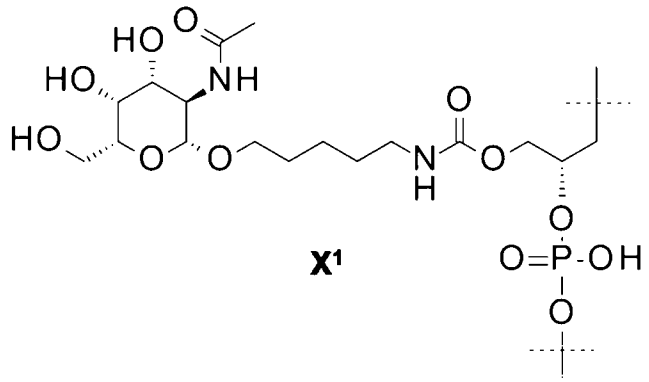
(24)如(1)所記載之寡核苷酸、其藥理上容許之鹽或溶劑合物，其中上述寡核苷酸係以式

[化12]

RO－Xg－Xf－Xe－Xd－Xc－Xb－Xa－T

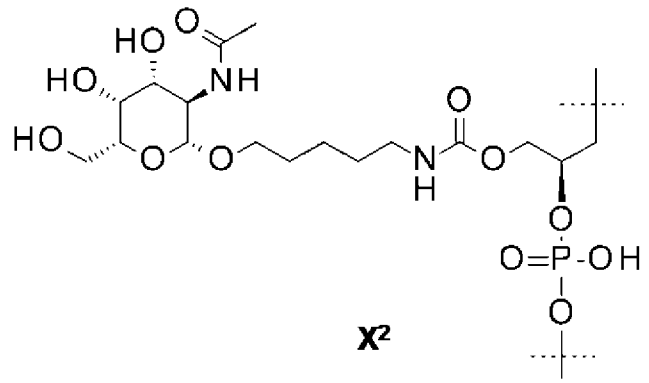
[式中，R表示氫原子、XX基、或G基，T表示5'末端不具有羥基之寡核苷酸，Xg表示選自由X^1～X^6及X^9～X^{17}所組成之群中之GalNAc單元，或RO-Xg表示選自由X^7、X^8、X^{18}、X^{19}、X^{20}、X^{21}及X^{22}所組成之群中之GalNAc單元，Xa、Xb、Xc、Xd、Xe及Xf互相獨立地表示選自由X^1～X^6及X^9～X^{17}或該等之光學異構物所組成之群中之GalNAc單元或單鍵]表示，

[化13]



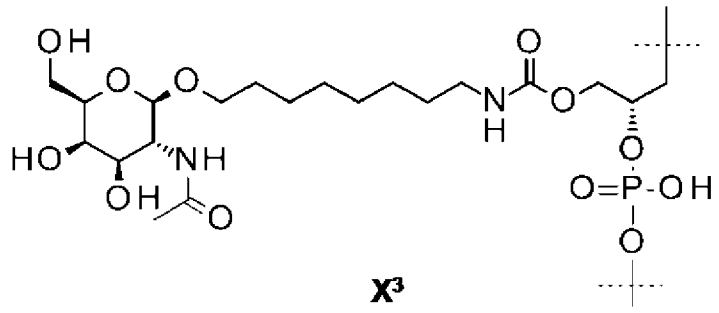
X^1

[化14]



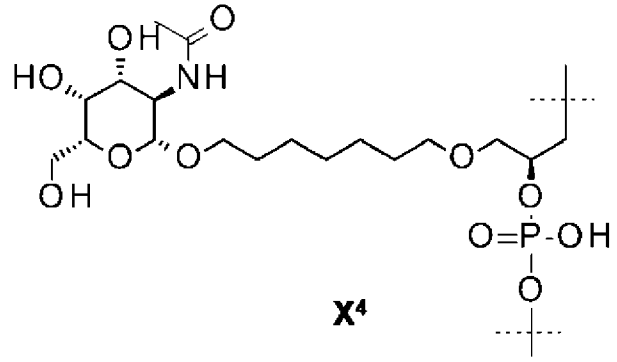
X^2

[化15]



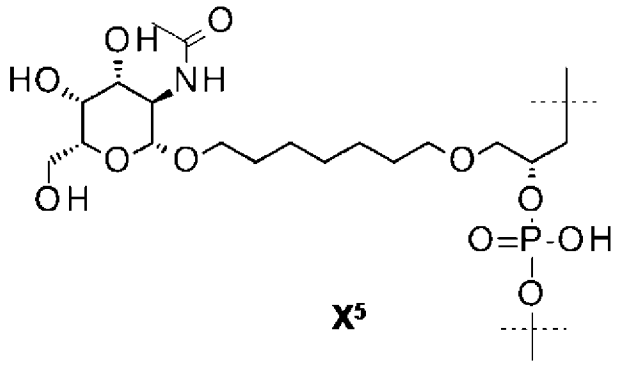
X^3

[化16]



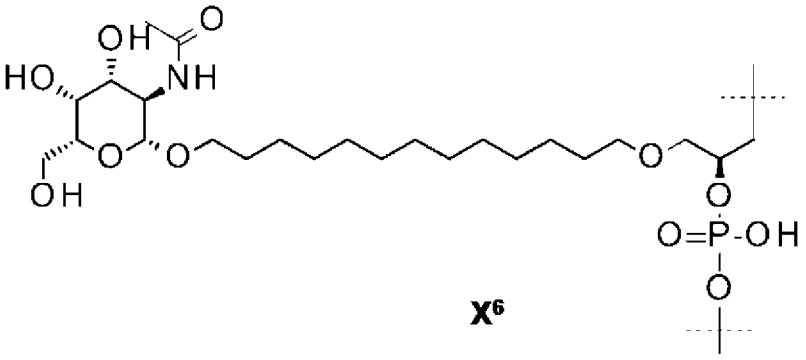
X^4

[化17]



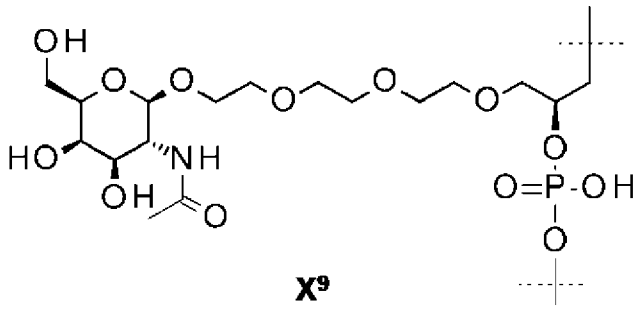
X^5

[化18]



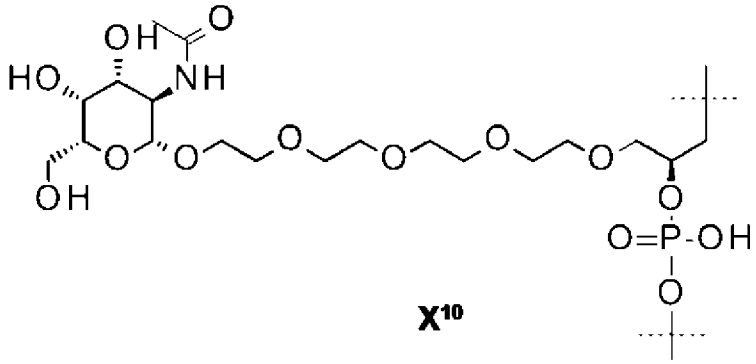
X^6

[化19]



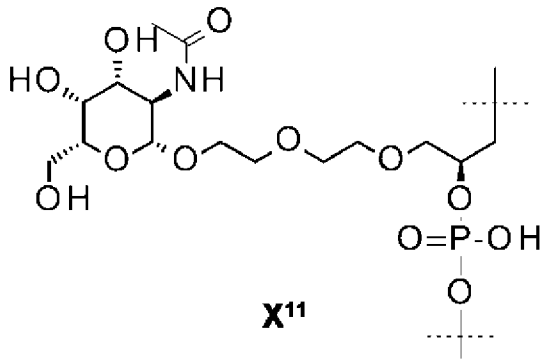
X^9

[化20]



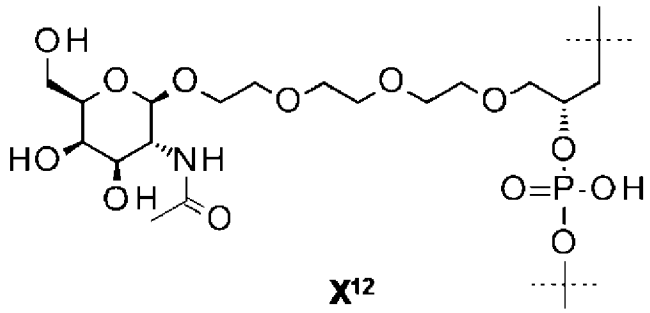
X^{10}

[化21]



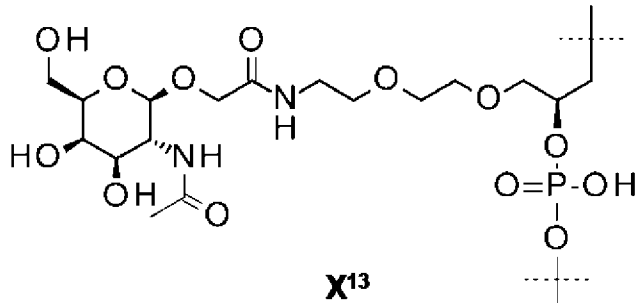
X^{11}

[化22]



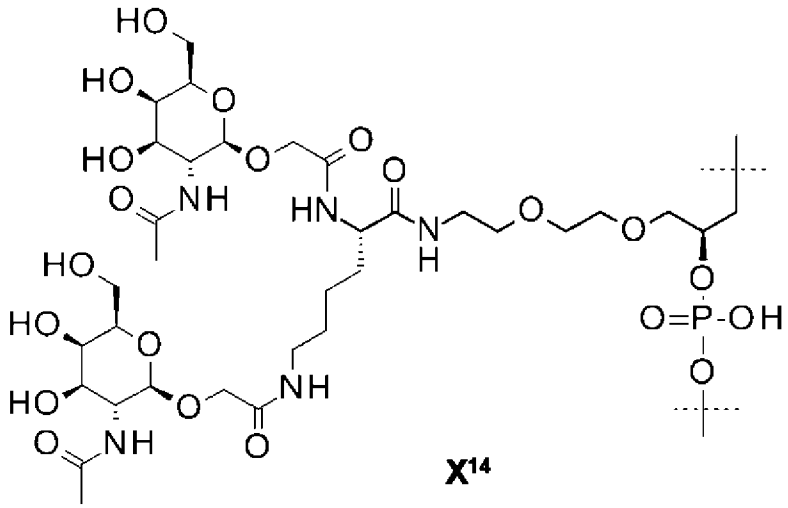
X^{12}

[化23]



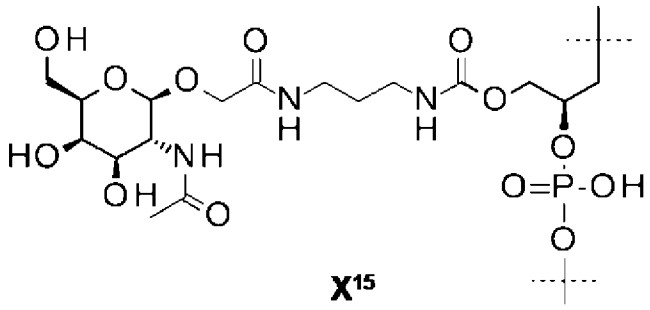
X^{13}

[化24]



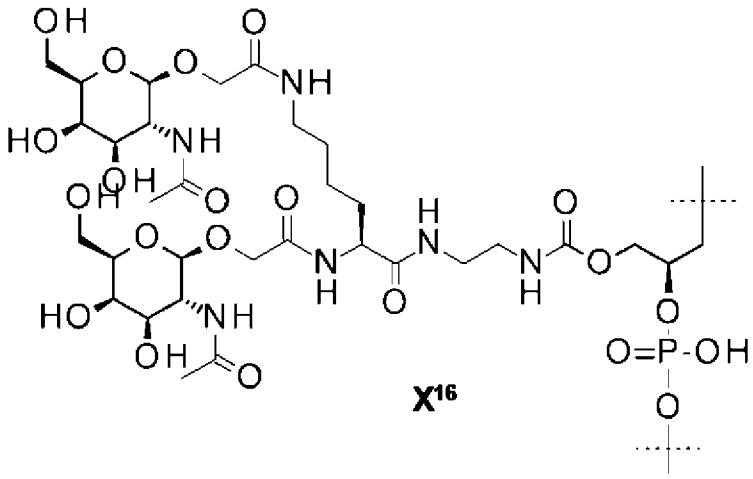
X^{14}

[化25]



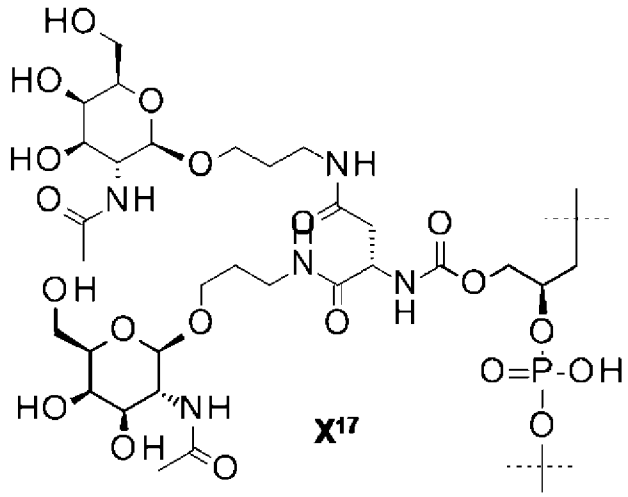
X15

[化26]



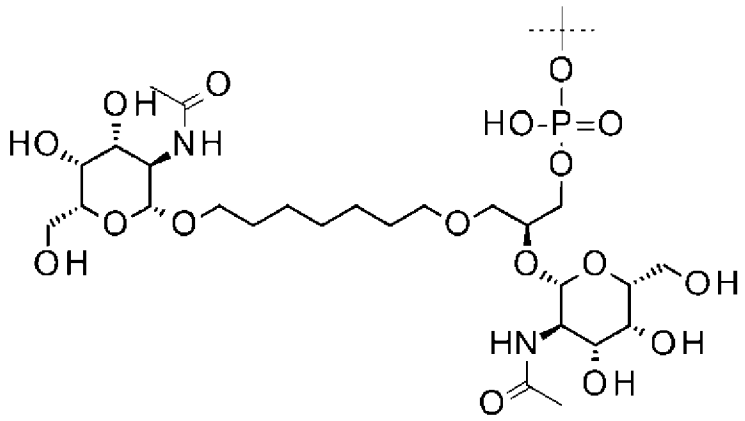
X16

[化27]



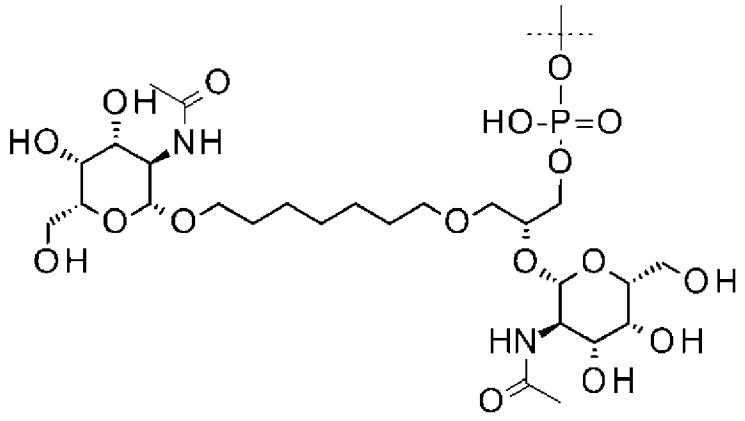
X17

[化28]



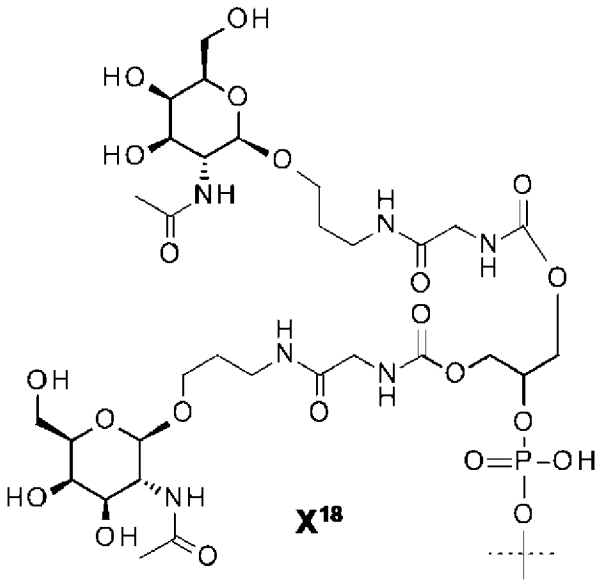
X^7

[化29]



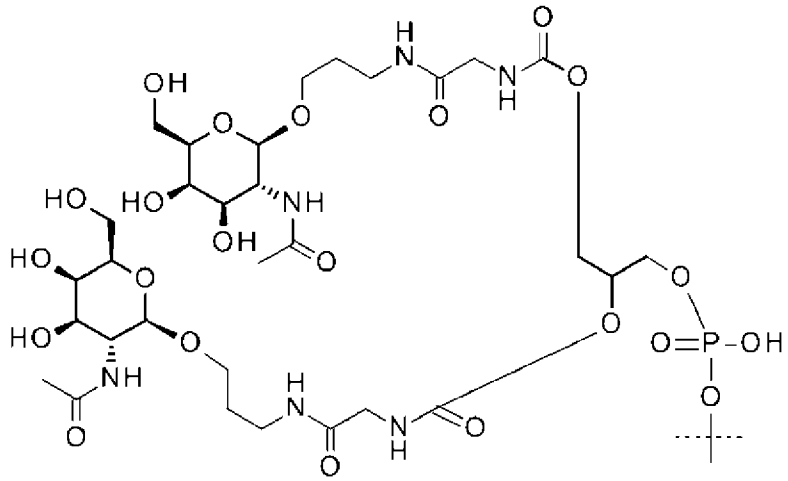
X^8

[化30]



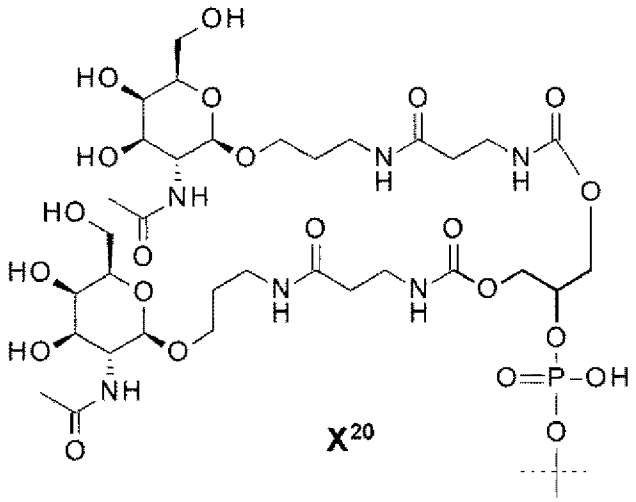
X^{18}

[化31]



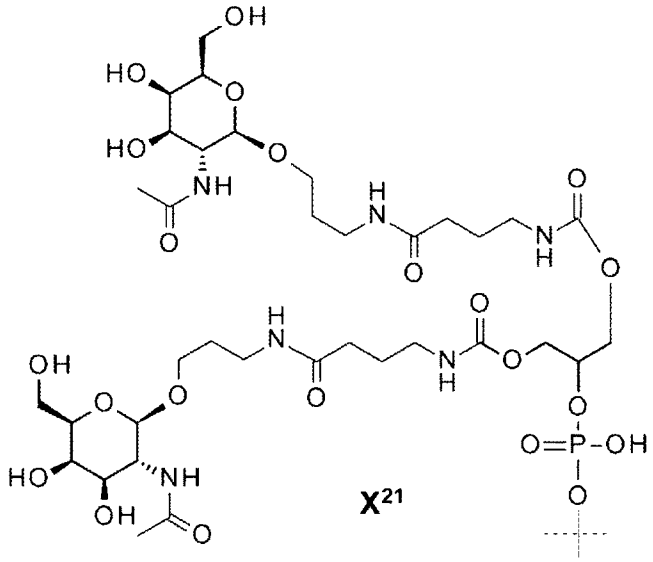
X19

[化32]



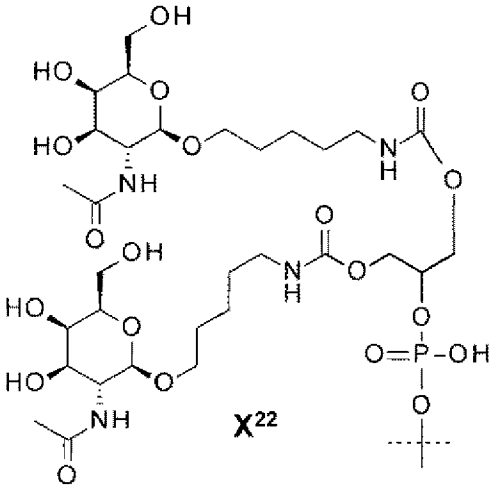
X20

[化33]



X21

[化34]



(25)一種醫藥，其包含如(1)至(24)之任一項所記載之寡核苷酸、其藥理上容許之鹽或溶劑合物。

(26)一種糖原病Ia型治療藥，其包含如(1)至(24)之任一項所記載之寡核苷酸、其藥理上容許之鹽或溶劑合物。

(27)一種糖原病Ia型之治療方法，其包括以醫藥上有效之量對受驗者投予如(1)至(24)之任一項所記載之寡核苷酸、其藥理上容許之鹽或溶劑合物。

(28)如(1)至(24)之任一項所記載之寡核苷酸、其藥理上容許之鹽或溶劑合物，其用於糖原病Ia型之治療方法。

(29)一種用於經口或非經口投予之調配物，其包含如(1)至(24)之任一項所記載之寡核苷酸、其藥理上容許之鹽或溶劑合物。

(30)如(1)至(24)之任一項所記載之寡核苷酸、其藥理上容許之鹽或溶劑合物，其用於作為醫藥使用。

[發明之效果]

【0009】 根據本發明，於糖原病Ia型患者中，可將糖原病Ia型患者中具有c.648G＞T變異之G6PC基因於mRNA水準修復，其結果，可表現

G6PC蛋白質，實現糖原病Ia型患者之低血糖之正常化、肝肥大之正常化，抑制向肝癌之發展。

本說明書包含作為本案之優先權之基礎的日本專利申請案、日本專利特願2018-43524及日本專利特願2018-128015之說明書及/或圖式所記載之內容。

【圖式簡單說明】

【0010】

圖1(A)係對由G6PC基因生成G6PC蛋白質之過程進行說明之圖。(B)係表示糖原病Ia型患者中具有c.648G＞T變異之G6PC基因之mRNA之剪接模式的圖。

圖2表示對利用本發明之糖原病Ia型治療藥ASO進行治療之原理進行說明之模式圖。

圖3係表示ASO(21e_001～21e_012)可鍵結於具有c.648G＞T變異之G6PC基因之mRNA之外顯子5之序列的圖。

圖4係表示ASO(21m_001～21m_012)可鍵結於具有c.648G＞T變異之G6PC基因之mRNA之外顯子5之序列的圖。

圖5係使用ASO，表現出利用qRT-PCR(quantitative real time polymerase chain reaction，定量即時聚合酶鏈鎖反應)測得之修正G6PC mRNA之異常剪接之效果的圖。(A)係使用ASO(21e_001～21e_012)之情形。(B)係使用ASO(21m_001～21m_012)之情形。RQ：相對定量(Relative Quantification)

圖6係使用ASO修復G6PC mRNA之異常剪接，表現出利用LC-MS/MS(Liquid chromatography-mass spectrometry/Mass Spectrometry，

液相層析-質譜法/質譜法)測得之產生正常人G6PC特異性肽之效果之圖。(A)係使用ASO(21e_001～21e_012)之情形。(B)係使用ASO(21m_001～21m_012)之情形。

圖7係使用ASO修復G6PC mRNA之異常剪接而表現出G6PC酵素活性之圖。(A)係使用ASO(21e_001～21e_012)之情形。(B)係使用ASO(21m_001～21m_012)之情形。

圖8係表示ASO(21e_001～21e_006及21e_013～21e_022)可鍵結於具有c.648G＞T變異之G6PC基因之mRNA之外顯子5上之序列的圖。

圖9係使用ASO(21e_001～21e_006及21e_013～21e_022)，表現出利用qRT-PCR測得之修正G6PC mRNA之異常剪接之效果的圖。RQ：相對定量(Relative Quantification)

圖10係使用ASO(21e_001～21e_006及21e_013～21e_022)修復G6PC mRNA之異常剪接，表現出利用LC-MS/MS測得之產生正常人G6PC特異性肽之效果之圖。

圖11係表示ASO(18e_001～18e_017)可鍵結於具有c.648G＞T變異之G6PC基因之mRNA之外顯子5之序列的圖。

圖12係表示ASO(18m_001～18m_017)可鍵結於具有c.648G＞T變異之G6PC基因之mRNA之外顯子5之序列的圖。

圖13(A)係使用ASO(18e_001～18e_017)，表現出利用qRT-PCR測得之修正G6PC mRNA之異常剪接之效果的圖。(B)係使用ASO(18m_001～18m_017)，表現出利用qRT-PCR測得之修正G6PC mRNA之異常剪接之效果的圖。RQ：相對定量(Relative Quantification)

圖14(A)係使用ASO(18e_001～18e_017)修復G6PC mRNA之異常剪

接，表現出利用LC-MS/MS測得之產生正常人G6PC特異性肽之效果之圖。(B)係使用ASO(18m_001～18m_017)修復G6PC mRNA之異常剪接，表現出利用LC-MS/MS測得之產生正常人G6PC特異性肽之效果之圖。

圖15係表示ASO(18e_018～18e_031)可鍵結於具有c.648G＞T變異之G6PC基因之mRNA之外顯子5之序列的圖。

圖16(A)係使用ASO(18e_018～18e_031)，表現出利用qRT-PCR測得之修正G6PC mRNA之異常剪接之效果的圖。(B)係使用ASO(18e_018～18e_031)修復G6PC mRNA之異常剪接，表現出利用LC-MS/MS測得之產生正常人G6PC特異性肽之效果之圖。RQ：相對定量(Relative Quantification)

圖17係　表　示ASO(21e_002、18e_005、21m_002、18e_022、18m_005、15e_001、15ed_001、18e_008、18e_025、18m_008、15e_002及15ed_002)可鍵結於具有c.648G＞T變異之G6PC基因之mRNA之外顯子5之序列的圖。

圖18係　使　用ASO(21e_002、18e_005、21m_002、18m_005、18e_022、15e_001、15ed_001、18e_008、18e_025、18m_008、15e_002、及15ed_002)，表現出利用qRT-PCR測得之修正G6PC mRNA之異常剪接之效果的圖。RQ：相對定量(Relative Quantification)；Actn：β-肌動蛋白

圖19係表示將實施例91至95之化合物向異型敲入小鼠投予時利用qRT-PCR測得之修正肝臟中之G6PC mRNA之異常剪接之效果的圖。RQ：相對定量(Relative Quantification)；Actn：β-肌動蛋白；mpk：mg/kg

圖20係表示將實施例91、及實施例96至103之化合物向異型敲入小鼠投予時利用qRT-PCR測得之修正肝臟中之G6PC mRNA之異常剪接之效果的圖。RQ：相對定量(Relative Quantification)；Actn：β-肌動蛋白；mpk：mg/kg

圖21係表示將實施例83、實施例87至91、及實施例104至107之化合物向異型敲入小鼠投予時利用qRT-PCR測得之修正肝臟中之G6PC mRNA之異常剪接之效果的圖。RQ：相對定量(Relative Quantification)；Actn：β-肌動蛋白；mpk：mg/kg

圖22係表示將實施例104、及實施108至115之化合物向異型敲入小鼠投予時利用qRT-PCR測得之修正肝臟中之G6PC mRNA之異常剪接之效果的圖。RQ：相對定量(Relative Quantification)；Actn：β-肌動蛋白；mpk：mg/kg

圖23係表示將實施例105、113、及131至137之化合物向異型敲入小鼠投予時利用qRT-PCR測得之修正肝臟中之G6PC mRNA之異常剪接之效果的圖。RQ：相對定量(Relative Quantification)；Actn：β-肌動蛋白；mpk：mg/kg

圖24係表示利用實施例1之化合物所得之培養細胞中之異常剪接修復序列之片段解析之圖。

圖25係表示將實施例133、及143至149之化合物向異型敲入小鼠投予時利用qRT-PCR測得之修正肝臟中之G6PC mRNA之異常剪接之效果的圖。RQ：相對定量(Relative Quantification)；mpk：mg/kg

圖26係表示將實施例149、及152至160之化合物向異型敲入小鼠投予時利用qRT-PCR測得之修正肝臟中之G6PC mRNA之異常剪接之效果的

圖。RQ：相對定量(Relative Quantification)；mpk：mg/kg

【實施方式】

【0011】 以下，對本發明之實施形態進一步詳細說明。

【0012】 本發明提供一種將糖原病Ia型患者中具有c.648G＞T變異之G6PC基因於mRNA水準修復而可使正常之G6PC蛋白質表現之寡核苷酸、其藥理上容許之鹽或溶劑合物。本發明之寡核苷酸係含有與具有c.648G＞T變異之G6PC基因之cDNA互補之核苷酸序列的鹼基數為15～30者，含有與具有c.648G＞T變異之G6PC基因之包含外顯子5之5'末端起第82號至第92號之任一部位之區域互補的序列。

【0013】 於本發明中，可以糖原病Ia型患者中進行c.648G＞T變異之患者作為對象。不僅c.648G＞T變異之同型接合之患者，而且亦可以c.648G＞T變異與其他變異之複合異型接合之患者作為對象。

【0014】 G6PC基因之c.648G＞T變異係智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(Homo sapiens glucose-6-phosphatase catalytic subunit)(G6PC)，轉錄變體(transcript variant)1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G向T之變異。位於自外顯子5之5'末端起第86號。本發明之寡核苷酸含有與具有c.648G＞T變異之G6PC基因之包含外顯子5之5'末端起第86號至第92號之任一部位之區域互補的序列即可，較佳為含有與包含第92號之部位之區域互補的序列。

【0015】 作為含有與具有c.648G＞T變異之G6PC基因之cDNA互補之核苷酸序列且鹼基數為15～30、並且含有與具有c.648G＞T變異之G6PC基因之包含外顯子5之5'末端起第82號至第92號之任一部位之區域互補之序列的寡核苷酸，可例示包含序列編號1～32、40～42、44～48之任

一序列(其中，序列中之t或T亦可為u或U，u或U亦可為t或T)之全部或一部分者。於本發明中，所謂「序列之一部分」通常為該序列整體之80%以上，適宜為85%，進而適宜為90%，最適宜為94%。本發明之寡核苷酸之鹼基數為15～30較為適當，較佳為15～21，更佳為15～18。

【0016】 構成本發明之寡核苷酸(反義寡核苷酸)之核苷酸可為天然型DNA、天然型RNA、DNA/RNA之嵌合體、該等之修飾體之任一者，較佳為至少1個為修飾核苷酸。

【0017】 作為本發明中之修飾核苷酸，可例示糖經修飾者(例如，D-核呋喃糖經2'-O-烷基化者、D-核呋喃糖經2'-O,4'-C-伸烷基化者、D-核呋喃糖經2'-,4'-交聯者)、磷酸二酯鍵經修飾(例如，硫代酯化)者、鹼基經修飾者、將該等組合而成者等。構成反義寡核苷酸之至少1個D-核呋喃糖經2'-O-烷基化而成者或經2'-O,4'-C-伸烷基化而成者對RNA之結合力較高，對核酸酶之耐性較高，因此可期待高於天然型之核苷酸(即，寡DNA、寡RNA)之治療效果。又，構成寡核苷酸之至少1個磷酸二酯鍵經硫代酯化而成者對核酸酶之耐性亦較高，因此可期待高於天然型之核苷酸(即，寡DNA、寡RNA)之治療效果。包含如上所述之經修飾之糖與經修飾之磷酸之兩者的寡核苷酸對核酸酶之耐性更高，因此可期待更高之治療效果。

【0018】 關於本發明之寡核苷酸(反義寡核苷酸)，作為糖之修飾之例，可列舉：D-核呋喃糖之2'-O-烷基化(例如，2'-O-甲基化、2'-O-胺基乙基化、2'-O-丙基化、2'-O-烯丙基化、2'-O-甲氧基乙基化、2'-O-丁基化、2'-O-戊基化、2'-O-炔丙基化等)、D-核呋喃糖之2'-O,4'-C-伸烷基化(例如，2'-O,4'-C-伸乙基化、2'-O,4'-C-亞甲基化、2'-O,4'-C-伸丙基化、

2'-O,4'-C-四亞甲基化、2'-O,4'-C-五亞甲基化等)、D-核呋喃糖之2'-去氧-2'-C,4'-C-亞甲氧基亞甲基化、S-cEt(2',4'-constrained ethyl，2',4'-限制性乙基)、AmNA(Amide-bridged nucleic acid，醯胺交聯核酸)、3'-去氧-3'-胺基-2'-去氧-D-核呋喃糖、3'-去氧-3'-胺基-2'-去氧-2'-氟-D-核呋喃糖等。

【0019】 關於本發明之寡核苷酸(反義寡核苷酸)，作為糖之2'-,4'-交聯修飾之例，可列舉：D-核呋喃糖之2'-O,4'-C-伸烷基化(例如，2'-O,4'-C-伸乙基化、2'-O,4'-C-亞甲基化、2'-O,4'-C-伸丙基化、2'-O,4'-C-四亞甲基化、2'-O,4'-C-五亞甲基化等)、D-核呋喃糖之2'-去氧-2'-C,4'-C-亞甲氧基亞甲基化、S-cEt(2',4'-限制性乙基)、AmNA等。

【0020】 關於本發明之寡核苷酸(反義寡核苷酸)，作為磷酸二酯鍵之修飾之例，可列舉：硫代磷酸酯鍵、甲基膦酸酯鍵、甲基硫代膦酸酯鍵、二硫代磷酸酯鍵、胺基磷酸酯(Phosphoroamidate)鍵等。

【0021】 於本發明中，作為鹼基之修飾之例，可列舉：胞嘧啶之5-甲基化、5-氟化、5-溴化、5-碘化、N4-甲基化，胸腺嘧啶之5-去甲基化(尿嘧啶)、5-氟化、5-溴化、5-碘化，腺嘌呤之N6-甲基化、8-溴化，鳥嘌呤之N2-甲基化、8-溴化等。

【0022】 本發明之寡核苷酸(反義寡核苷酸)可使用市售之合成儀(例如，PerkinElmer公司之利用亞磷醯胺(phosphoramidite)法獲得之模型392)等，依照文獻(Nucleic Acids Research, 12, 4539 (1984))所記載之方法而合成。關於此時可使用之亞磷醯胺試劑，天然型之核苷及2'-O-甲基核苷(即，2'-O-甲基鳥苷、2'-O-甲基腺苷、2'-O-甲基胞苷、2'-O-甲基尿苷)可使用市售之試劑。關於烷基之碳數為2～6個之2'-O-烷基鳥苷、腺

苷、胞苷及尿苷，如以下所述。

【0023】 2'-O-胺基乙基鳥苷、腺苷、胞苷、尿苷可依照文獻(Blommers et al. Biochemistry (1998), 37, 17714-17725.)而合成。

【0024】 2'-O-丙基鳥苷、腺苷、胞苷、尿苷可依照文獻(Lesnik, E.A. et al. Biochemistry (1993), 32, 7832-7838.)而合成。

【0025】 2'-O-烯丙基鳥苷、腺苷、胞苷、尿苷可使用市售之試劑。

【0026】 2'-O-甲氧基乙基鳥苷、腺苷、胞苷、尿苷可依照專利(US6261840)或文獻(Martin, P. Helv. Chim. Acta. (1995) 78, 486-504.)而合成。

【0027】 2'-O-丁基鳥苷、腺苷、胞苷、尿苷可依照文獻(Lesnik,E.A. et al. Biochemistry (1993), 32, 7832-7838.)而合成。

【0028】 2'-O-戊基鳥苷、腺苷、胞苷、尿苷可依照文獻(Lesnik,E.A. et al. Biochemistry (1993), 32, 7832-7838.)而合成。

【0029】 2'-O-炔丙基鳥苷、腺苷、胞苷、尿苷可使用市售之試劑。

【0030】 關於2'-O,4'-C-亞甲基鳥苷、腺苷、胞苷、5-甲基胞苷及胸苷，可依照WO99/14226所記載之方法而製造，關於伸烷基之碳數為2～5個之2'-O,4'-C-伸烷基鳥苷、腺苷、胞苷、5-甲基胞苷及胸苷，可依照WO00/47599所記載之方法而製造。

【0031】 D-核呋喃糖之經2'-去氧-2'-C,4'-C-亞甲氧基亞甲基化之核苷可依照文獻(Wang,G. et al. Tetrahedron (1999), 55, 7707-7724)而合成。

【0032】 S-cEt(constrained ethyl，限制性乙基)可依照文獻(Seth,P.P. et al. J.Org.Chem (2010), 75, 1569-1581.)而合成。

【0033】 AmNA可依照文獻(Yahara,A. et al. ChemBioChem (2012), 13, 2513-2516.)或WO2014/109384而合成。

【0034】 於本發明中，核酸鹼基序列可將腺嘌呤記載為(A)或(a)，將鳥嘌呤記載為(G)或(g)，將胞嘧啶記載為(C)或(c)，將胸腺嘧啶記載為(T)或(t)，及將尿嘧啶記載為(U)或(u)。可使用5-甲基胞嘧啶代替胞嘧啶。核酸鹼基中尿嘧啶(U)或(u)與胸腺嘧啶(T)或(t)具有相容性。尿嘧啶(U)或(u)與胸腺嘧啶(T)或(t)之任一者均可用於與互補鏈之腺嘌呤(A)或(a)形成鹼基對。

【0035】 使亞磷醯胺試劑偶合後，使硫、二硫化四乙基秋蘭姆(TETD，Applied Biosystems公司)、Beaucage試劑(Glen Research公司)、或氫化黃原素(Xanthane Hydride)等試劑進行反應，藉此可合成具有硫代磷酸酯鍵之反義寡核苷酸(Tetrahedron Letters, 32, 3005 (1991), J. Am. Chem. Soc. 112, 1253 (1990), PCT/WO98/54198)。

【0036】 作為合成儀所使用之受控微孔玻璃(CPG)，鍵結有2'-O-甲基核苷者可利用市售者。又，可依照文獻(Oligonucleotide Synthesis, Edited by M.J.Gait, Oxford University Press, 1984)，將關於2'-O,4'-C-亞甲基鳥苷、腺苷、5-甲基胞苷及胸苷而依照WO99/14226所記載之方法所製造之核苷，關於伸烷基之碳數為2～5個之2'-O,4'-C-伸烷基鳥苷、腺苷、5-甲基胞苷及胸苷而依照WO00/47599所記載之方法所製造之核苷鍵結於CPG。藉由使用經修飾之CPG(日本專利特開平7-87982之實施例12b所記載)，可合成於3'末端結合有2-羥基乙基磷酸基之寡核苷酸。又，若使用3'-胺基-修飾基C3 CPG、3'-胺基-修飾基C7 CPG、甘油CPG(Glen Research)、3'-間隔基C3 SynBase CPG 1000、3'-間隔基C9 SynBase

CPG 1000(link technologies)，則可合成於3'末端結合有羥基烷基磷酸基、或胺基烷基磷酸基之寡核苷酸。

【0037】 本發明之寡核苷酸(反義寡核苷酸)可經由連接子及磷酸部而鍵結有GalNAc。

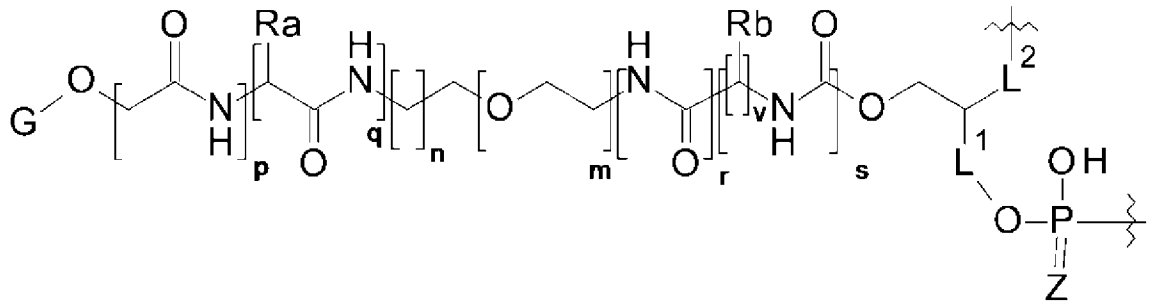
【0038】 本發明中之所謂GalNAc單元係鍵結有鍵結了GalNAc之連接子之磷酸基，可進而具有1個鍵結鍵。GalNAc單元之磷酸基可與寡核苷酸之5'末端及/或3'末端鍵結，適宜為鍵結於寡核苷酸之5'末端。於GalNAc單元具有鍵結鍵之情形時，該鍵結鍵可與羥基、GalNAc、鍵結有GalNAc之連接子、其他GalNAc單元之磷酸基、或寡核苷酸之3'末端之磷酸基鍵結。作為鍵結於1個GalNAc單元之GalNAc之個數，適宜為1至7個，更適宜為1至5個，尤其適宜為1至3個，最佳個數為2個。

【0039】 於本發明中，1個GalNAc單元亦可鍵結於寡核苷酸，複數個GalNAc單元亦可連續鍵結而鍵結於寡核苷酸。作為鍵結於1個寡核苷酸之GalNAc單元之個數，適宜為1至7個，更適宜為1至5個，尤其適宜為1至3個，最佳個數為1個。

【0040】 於本發明中，可於與GalNAc單元鍵結之寡核苷酸(反義寡核苷酸)之5'末端及/或3'末端具有鹼基序列與反義寡核苷酸不同、包含磷酸二酯鍵、且可於生物體內切斷之寡核苷酸序列。作為可切斷之寡核苷酸之鏈長，適宜為1至6個核苷酸，進而適宜為1至3個核苷酸。可切斷之寡核苷酸只要可切斷，則無特別限定，可列舉全部包含DNA之天然型寡去氧核苷酸、及全部包含RNA之天然型寡核苷酸等。作為鹼基序列，只要為可切斷之序列，則無特別限定，可列舉5'-TCATCA-3'、5'-CATCA-3'、5'-ATCA-3'5'-TCA-3'、5'-CA-3'、5'-A-3'等。

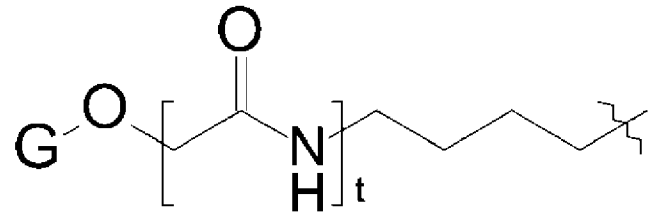
【0041】 作為本發明之GalNAc單元之例，例如為通式

[化35]



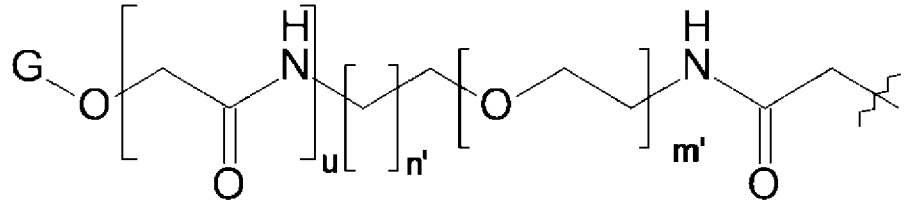
[式中，Ra表示式

[化36]



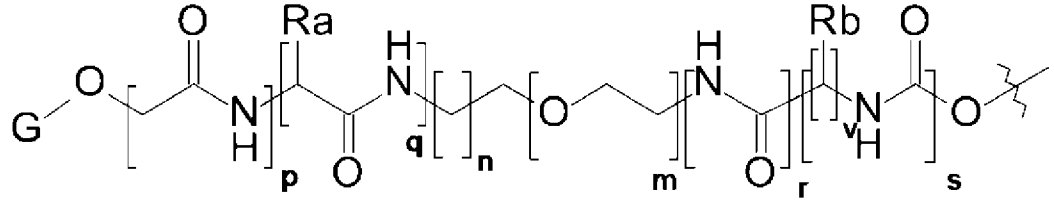
所表示之基，Rb表示式

[化37]



所表示之基或氫原子，XX表示式

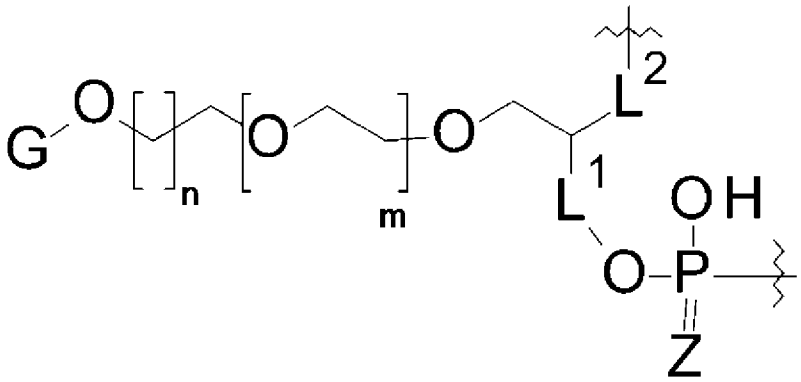
[化38]



所表示之基，G表示5-乙醯胺-2-羥基甲基-3,4-二羥基四氫吡喃-6-基(GalNAc)，Z表示氧原子或硫原子，L^1及L^2中一者表示亞甲基(CH_2)，另一者表示不隔著原子，p、q、r、s、t及u互相獨立地表示0或1，n及n'互相

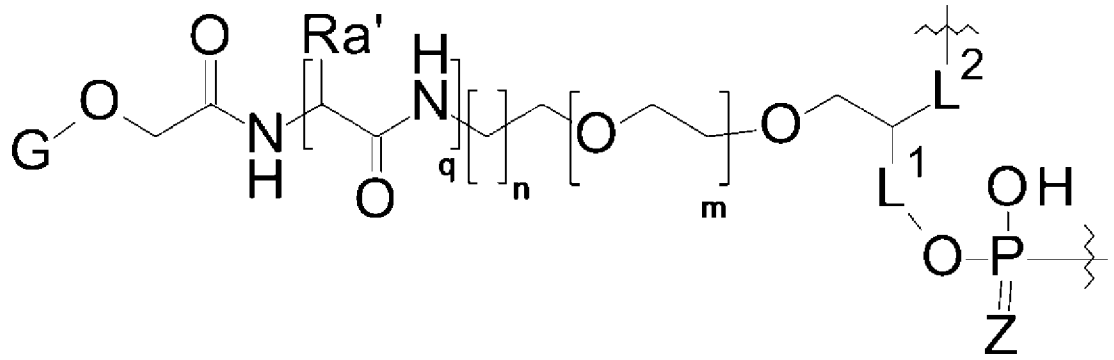
獨立地表示1～15之整數，m及m'互相獨立地表示0～5之整數，於Rb不為氫原子時，v表示1，於Rb為氫原子時，v表示1～7；其中，於n為1時，m為0～5之整數，於n為2～15之整數時，m為0，於n'為1時，m'為1～5之整數，於n'為2～15之整數時，m'為0；可於距磷原子較遠之鍵結鍵上鍵結羥基、XX基、或OG基]所表示之基，適宜為式

[化39]



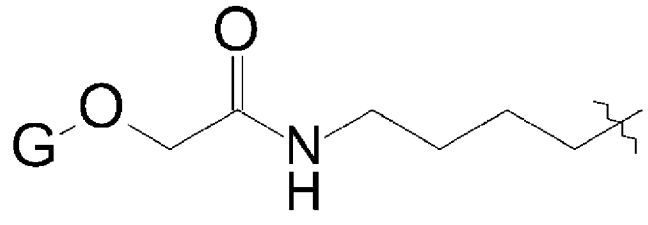
[式中，G、Z、L^1、L^2、n及m表示與上述相同之含義]所表示之基、式

[化40]



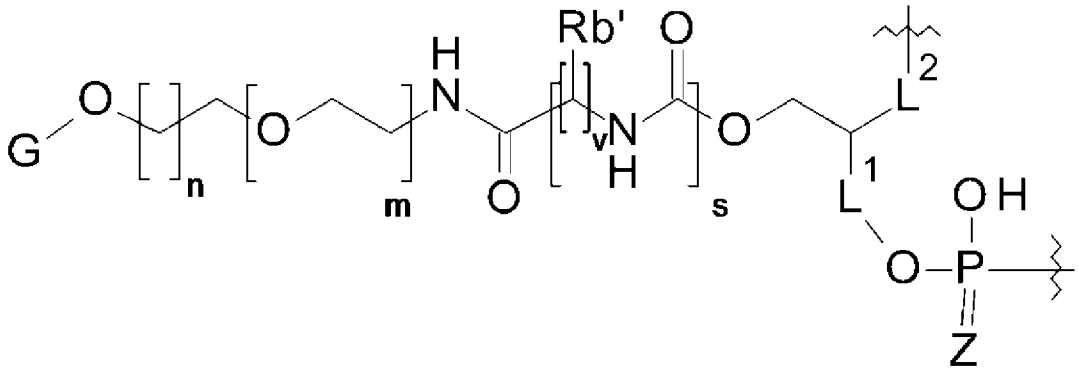
[式中，G、Z、L^1、L^2、q、n及m表示與上述相同之含義，Ra'表示式

[化41]



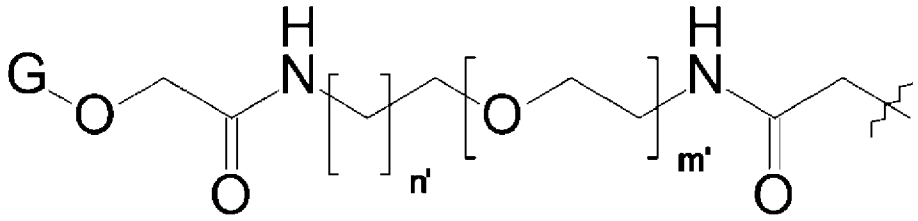
所表示之基]所表示之基、式

[化42]



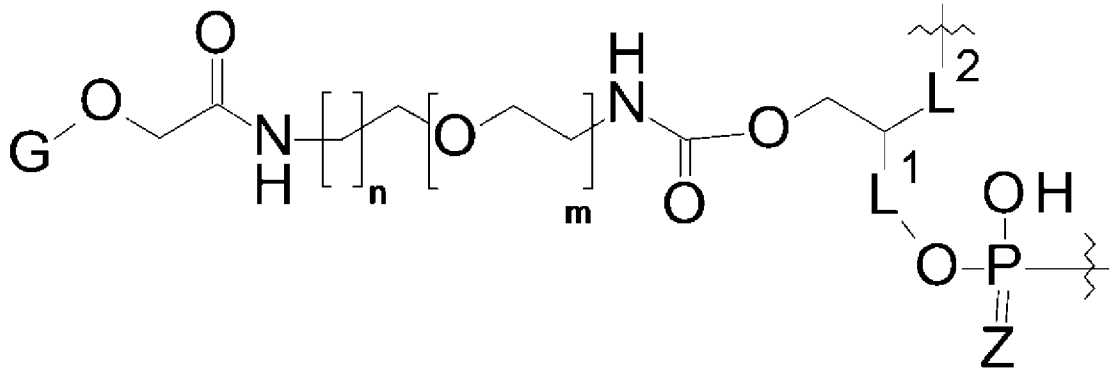
[式中，G、Z、L^1、L^2、s、n、m及v表示與上述相同之含義，Rb'表示式

[化43]



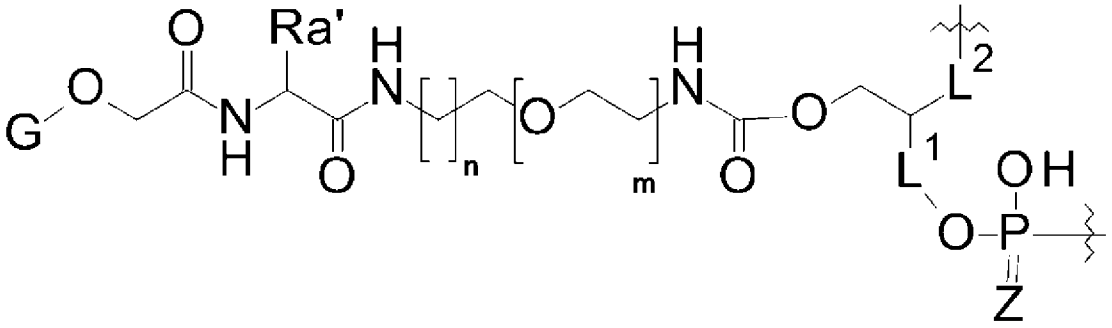
(式中，n'及m'表示與上述相同之含義)所表示之基或氫原子]所表示之基、式

[化44]



[式中，G、Z、L^1、L^2、n及m表示與上述相同之含義]所表示之基、或式

[化45]



[式中，G、Z、L^1、L^2、n、m及Ra'表示與上述相同之含義]所表示之基。

【0042】 於本發明中，GalNAc單元所鍵結之寡核苷酸例如為式

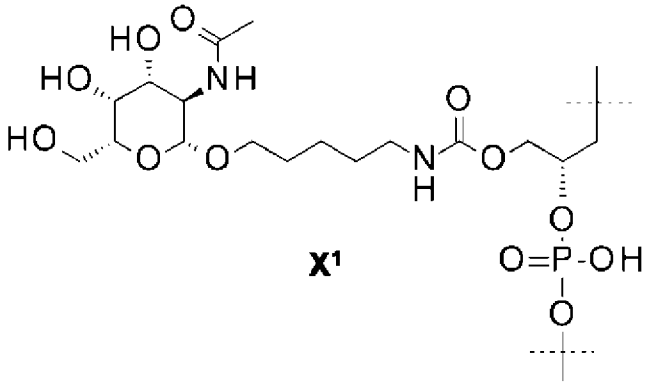
[化46]

RO－Xg－Xf－Xe－Xd－Xc－Xb－Xa－T

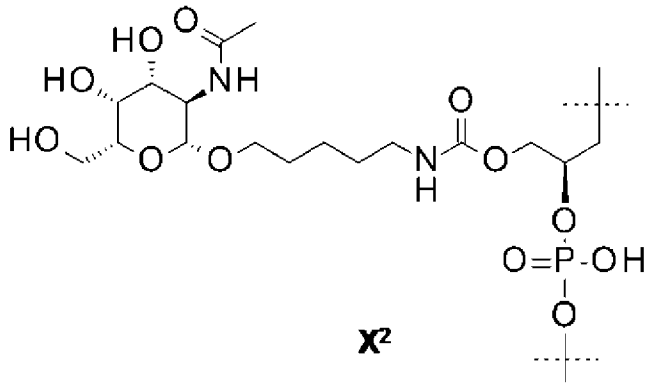
[式中，R表示氫原子、XX基、或G基，T表示5'末端不具有羥基之寡核苷酸，Xg表示具有鍵結鍵之GalNAc單元，Xa、Xb、Xc、Xd、Xe及Xf互相獨立地表示具有鍵結鍵之GalNAc單元或單鍵]所表示之寡核苷酸。

【0043】 作為Xa、Xb、Xc、Xd、Xe、Xf及Xg中之「具有鍵結鍵之GalNAc單元」，可列舉如下之基。

[化47]

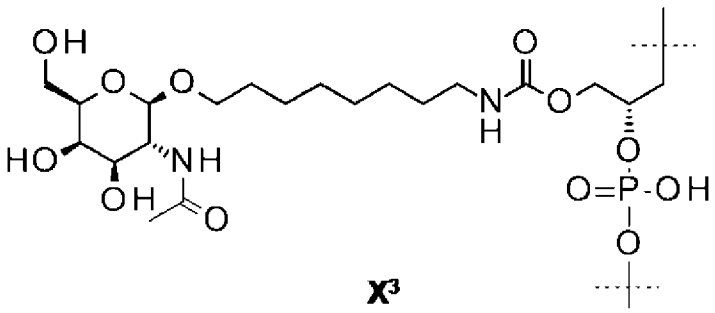


[化48]



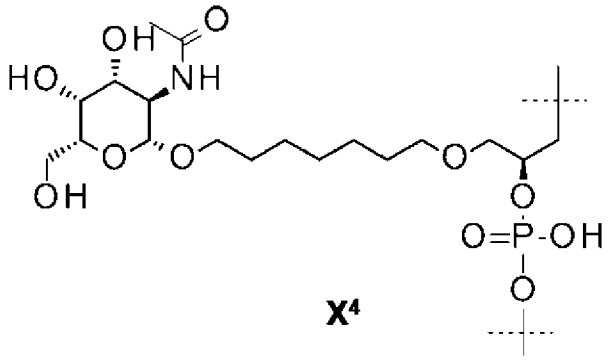
X^2

[化49]



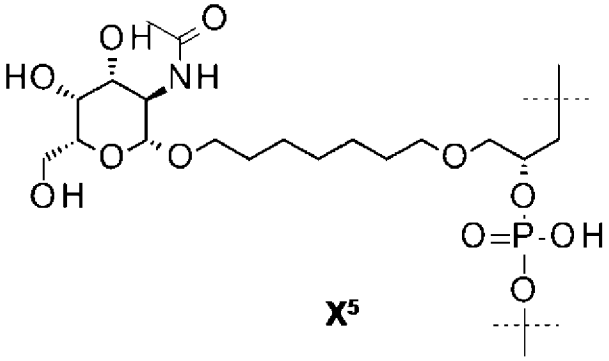
X^3

[化50]



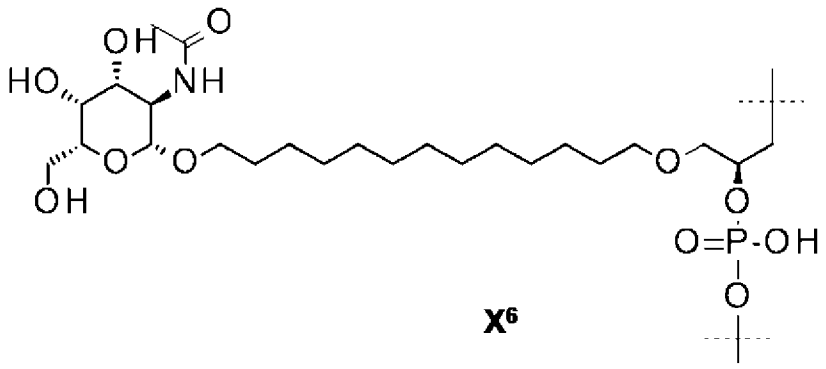
X^4

[化51]



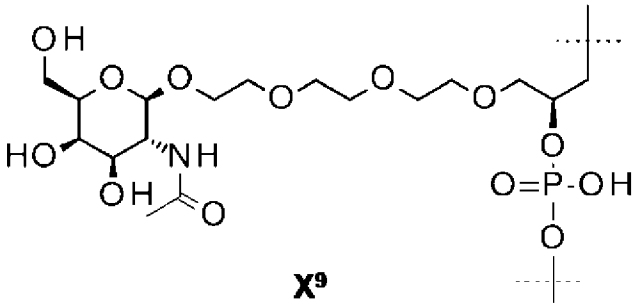
X^5

[化52]



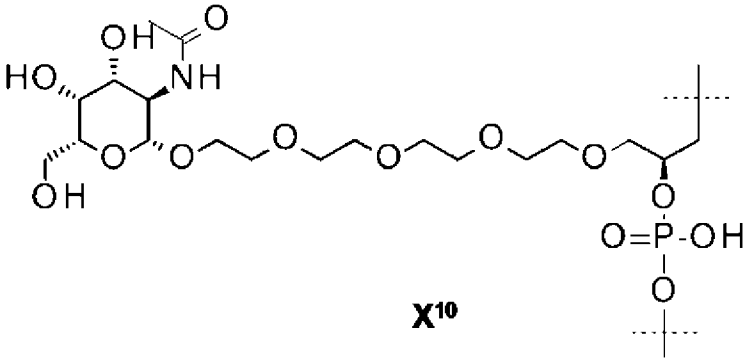
X^6

[化53]



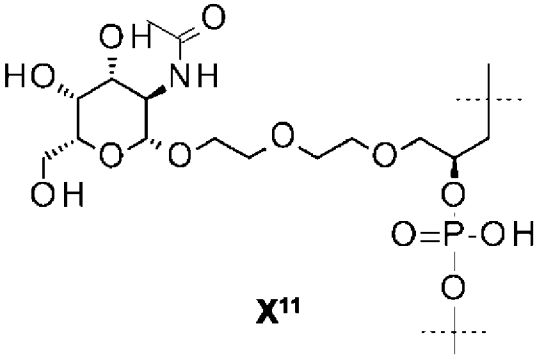
X^9

[化54]



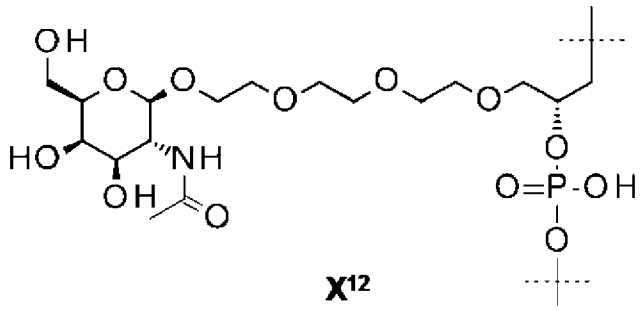
X^{10}

[化55]



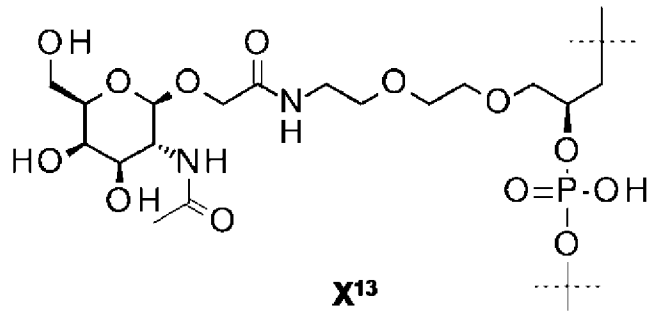
X^{11}

[化56]



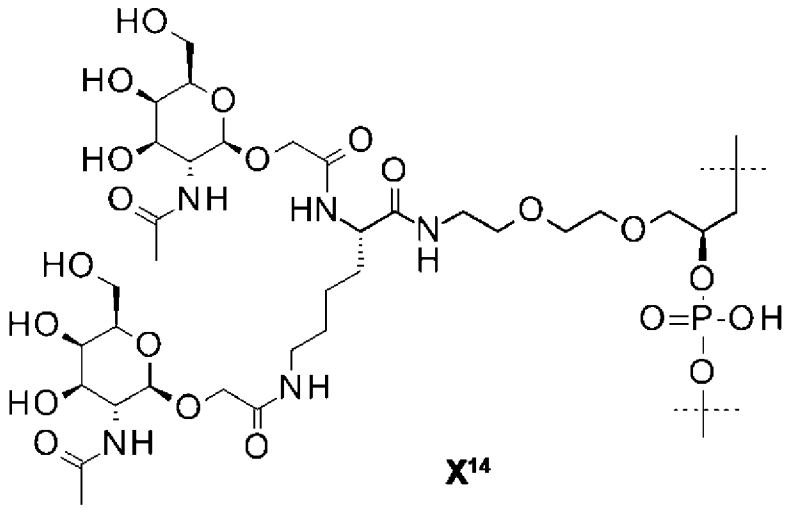
X^{12}

[化57]



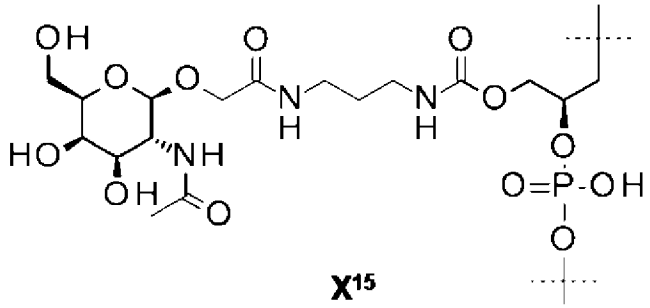
X^{13}

[化58]



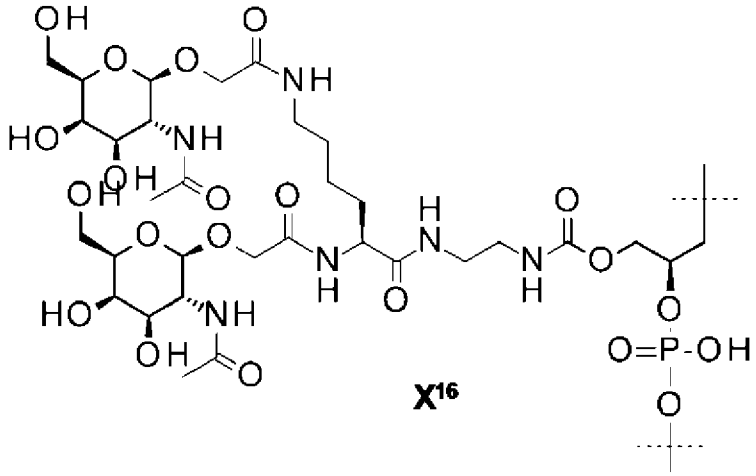
X^{14}

[化59]



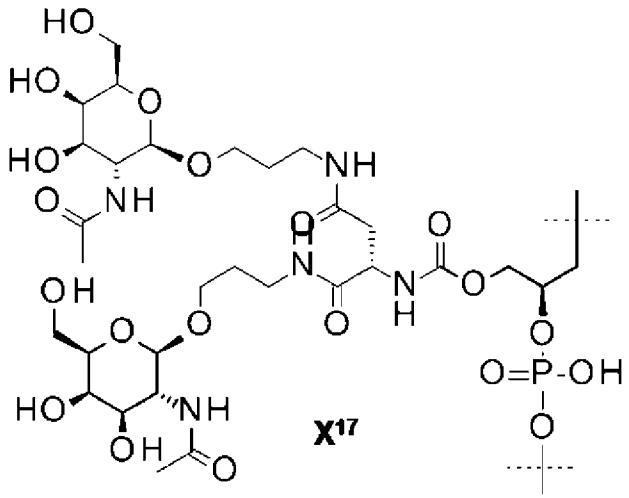
X^{15}

[化60]



X16

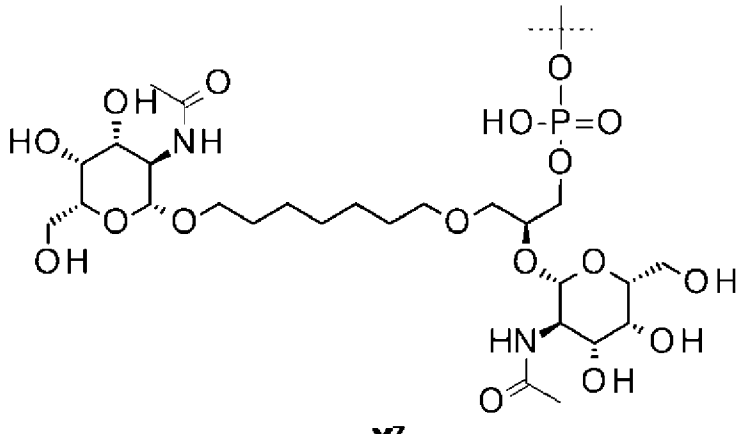
[化61]



X17

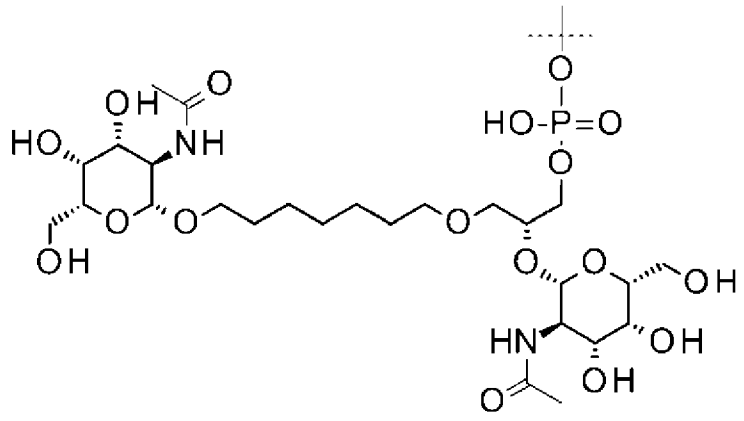
又，作為「具有鍵結鍵之GalNAc單元」之Xg、及R包含XX基或G基之RO-Xg-之「GalNAc單元」可列舉如下之基。

[化62]



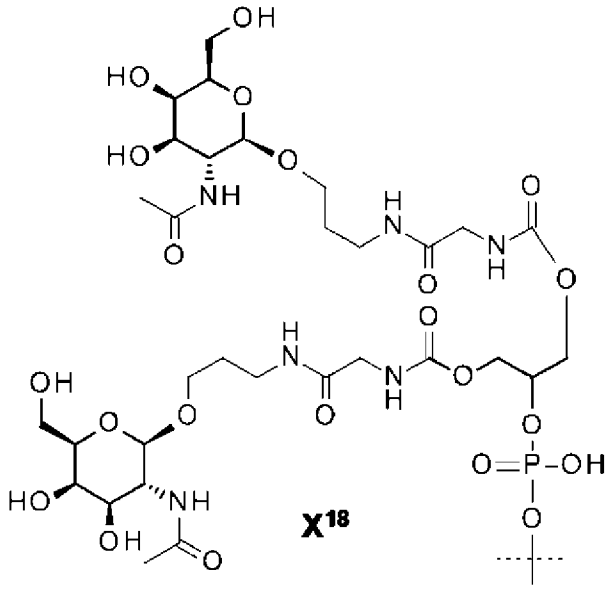
X7

[化63]



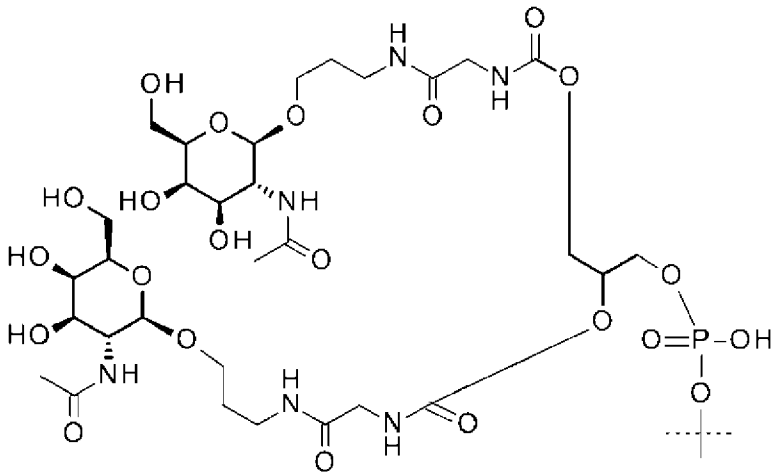
X8

[化64]



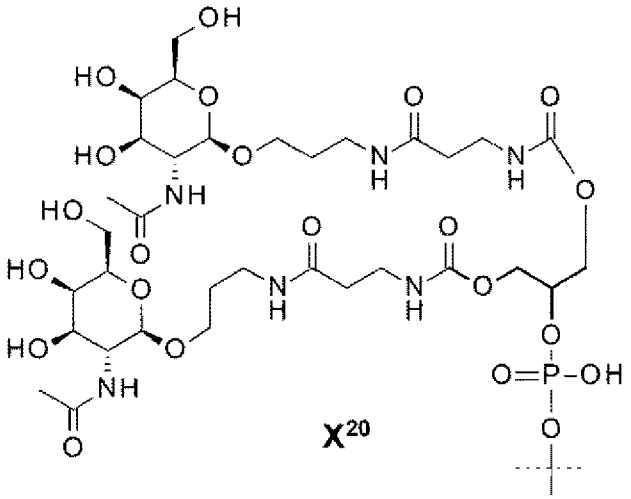
X18

[化65]

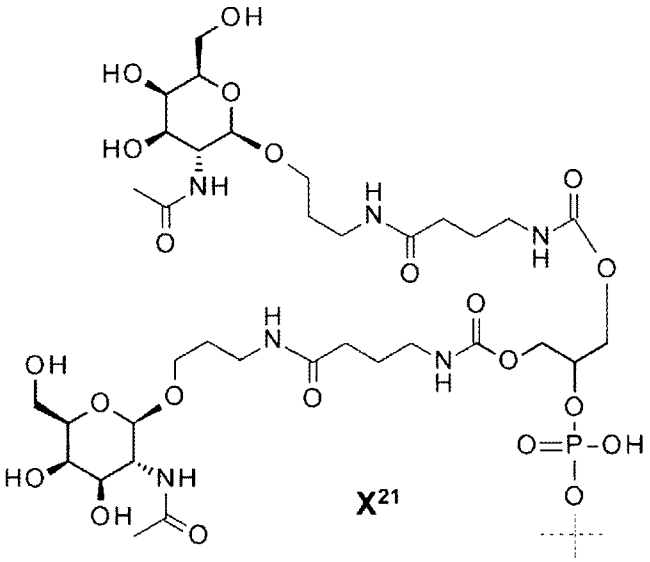


X19

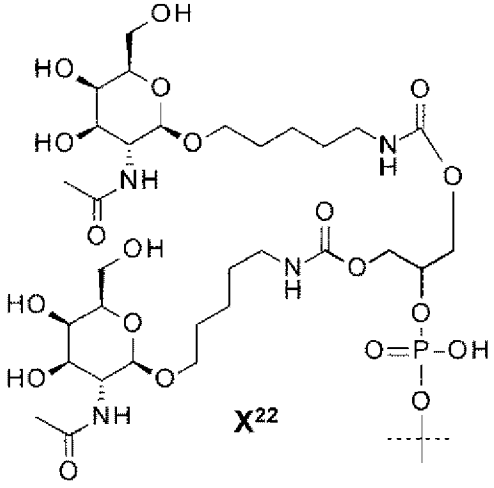
[化66]



[化67]



[化68]



本發明之GalNAc單元所鍵結之寡核苷酸藉由將含有GalNAc單元之醯胺與核苷之醯胺試劑同樣地使用，可使用市售之合成儀(例如，PerkinElmer公司之利用亞磷醯胺法獲得之模型392)等，依照文獻(Nucleic Acids Research, 12, 4539 (1984))所記載之方法而合成。於鍵結於寡核苷酸之5'末端之情形時，可藉由在結束寡核苷酸之部分之鏈伸長後，將含有GalNAc單元之醯胺進行偶合而合成。又，於鍵結於寡核苷酸之3'末端之情形時，可使用經修飾之CPG(日本專利特開平7-87982之實施例12b所記載)、3'-amino-Modifier C3 CPG, 3'-amino-Modifier C7 CPG, Glyceryl CPG, (Glen Research), 3'-specer C3 SynBase CPG 1000, 3'-specer C9 SynBase CPG 1000(link technologies)等，將含有GalNAc單元之醯胺進行偶合，其後進行寡核苷酸之部分之鏈伸長，藉此合成3'末端具有羥基烷基磷酸基、或胺基烷基磷酸基、進而鍵結有GalNAc單元之寡核苷酸。

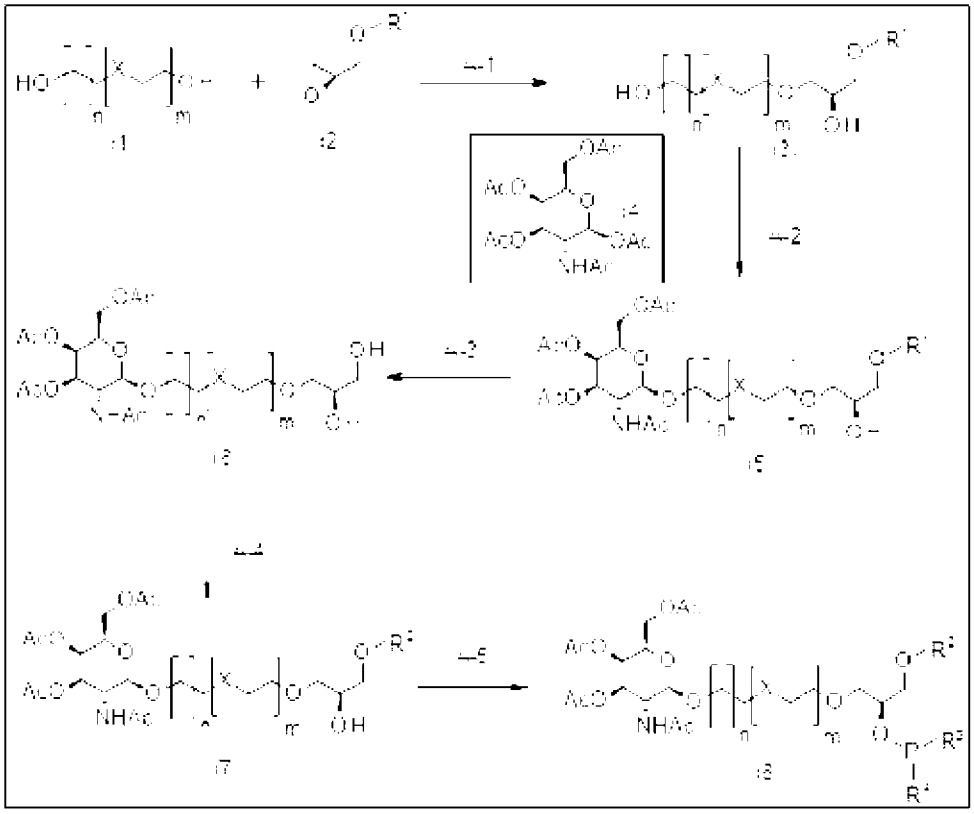
【0044】 含有GalNAc單元之醯胺之合成法

本發明之含有GalNAc單元之醯胺可依照下文所述之A法至I法而製造。於A法至I法中，各反應結束後，各反應之目標化合物係依照常規方法自反應混合物中採集。例如係藉由如下方法獲得：將反應混合物適當中和，又，於存在不溶物之情形時，藉由過濾去除後，添加如水與乙酸乙酯之不混合之有機溶劑，將含有目標物之有機層分離，利用水等洗淨後，利用無水硫酸鈉等加以乾燥後，將溶劑蒸餾去除。所獲得之化合物可視需要藉由常規方法、例如矽膠管柱層析法進行分離、精製。或可藉由再沈澱、再結晶而精製。

【0045】 A法

A法係用以製造化合物(8)之方法。若使用與化合物(2)相反之立體組態者，則化合物(8)中鍵結有-P(R^3)R^4之二級羥基之立體組態亦變得相反。

[化69]



式中R^1係羥基之通常之保護基，R^2係4,4'-二甲氧基三苯甲基。式中，-P(R^3)R^4表示：[R^3及R^4相同或不同而表示經羥基、經保護之羥基、巰基、經保護之巰基、胺基、碳數1至4個之烷氧基、碳數1至4個之烷硫基、碳數1至5個之氰基烷氧基或碳數1至4個之烷基取代之胺基]。式中X為碳原子或氧原子。式中n為1～15之整數，m為0～5之整數。其中，於n為1時，m為0～5之整數，於n為2～15之整數時，m為0。

【0046】 步驟A-1係製造化合物(3)之步驟，於惰性溶劑中在酸之存在下，使化合物(1)與化合物(2)進行反應，而於環氧化物開環時生成醚鍵。

【0047】 作為上述反應所使用之惰性溶劑，例如可列舉：烴類、芳

香族烴類、鹵化烴類、醚類、乙腈等，較佳為二氯甲烷。

【0048】 作為上述反應所使用之酸，例如可列舉有機酸類、路易斯酸等。作為有機酸，例如可列舉三氟甲磺酸等，作為路易斯酸，例如可列舉三氟化硼-二乙醚錯合物等。較佳為三氟甲磺酸。

【0049】 反應溫度根據化合物(1)及化合物(2)、酸、惰性溶劑等而不同，通常為-20℃至回流溫度。較佳為30℃至45℃。

【0050】 反應時間根據化合物(1)及化合物(2)、酸、惰性溶劑、反應溫度等而不同，通常為15分鐘至72小時，較佳為2小時至24小時。

【0051】 步驟A-2係製造化合物(5)之步驟，於惰性溶劑中在酸之存在下，使化合物(3)及化合物(4)進行反應，而生成糖苷鍵。

【0052】 作為上述反應所使用之惰性溶劑，例如可列舉：烴類、芳香族烴類、鹵化烴類、醚類、乙腈等，較佳為二氯甲烷。

【0053】 作為上述反應所使用之酸，例如可列舉有機酸類、路易斯酸等。作為有機酸，例如可列舉三氟甲磺酸等，作為路易斯酸，例如可列舉三氟化硼-二乙醚錯合物等，較佳為三氟化硼-二乙醚錯合物。

【0054】 反應溫度根據化合物(3)、酸、惰性溶劑等而不同，通常為-20℃至回流溫度。較佳為30℃至45℃。

【0055】 反應時間根據化合物(3)、酸、惰性溶劑、反應溫度等而不同，通常為15分鐘至72小時，較佳為2小時至24小時。

【0056】 步驟A-3係製造化合物(6)之步驟，去除作為化合物(5)中之羥基之保護基之R^1。保護基之去除根據其種類而不同，通常可依照有機合成化學之技術中周知之方法進行，例如可依照如T.H.Greene, P.G.Wuts, Protective Groups in organic Synthesis. Third Edition, 1999年, John

Wiley & Sons, Inc.等所記載之方法之常規方法進行。

【0057】 步驟A-4係製造化合物(7)之步驟，於惰性溶劑中在4,4'-二甲氧基三苯氯甲烷與鹼之存在下，將R^2導入化合物(6)之一級羥基中。

【0058】 作為上述反應所使用之惰性溶劑，例如可列舉：烴類、芳香族烴類、鹵化烴類、醚類、乙腈等，較佳為二氯甲烷或吡啶。

【0059】 作為上述反應所使用之鹼，例如可列舉：三乙胺、N,N-二異丙基乙基胺、吡啶、4-二甲胺基吡啶等，較佳為N,N-二異丙基乙基胺或吡啶。

【0060】 反應溫度根據鹼、惰性溶劑等而不同，通常為-20℃至回流溫度。較佳為10℃至30℃。

【0061】 反應時間根據鹼、惰性溶劑、反應溫度等而不同，通常為15分鐘至24小時，較佳為1小時至4小時。

【0062】 步驟A-5係製造化合物(8)之步驟，於惰性溶劑中在2-氰基乙基二異丙基氯亞磷醯胺與鹼之存在下，將$-P(R^3)R^4$導入化合物(7)之二級羥基中。

【0063】 作為上述反應所使用之惰性溶劑，例如可列舉：烴類、芳香族烴類、鹵化烴類、醚類、乙腈等，較佳為二氯甲烷。

【0064】 作為上述反應所使用之鹼，例如可列舉：三乙胺、N,N-二異丙基乙基胺、吡啶、4-二甲胺基吡啶等，較佳為N,N-二異丙基乙基胺。

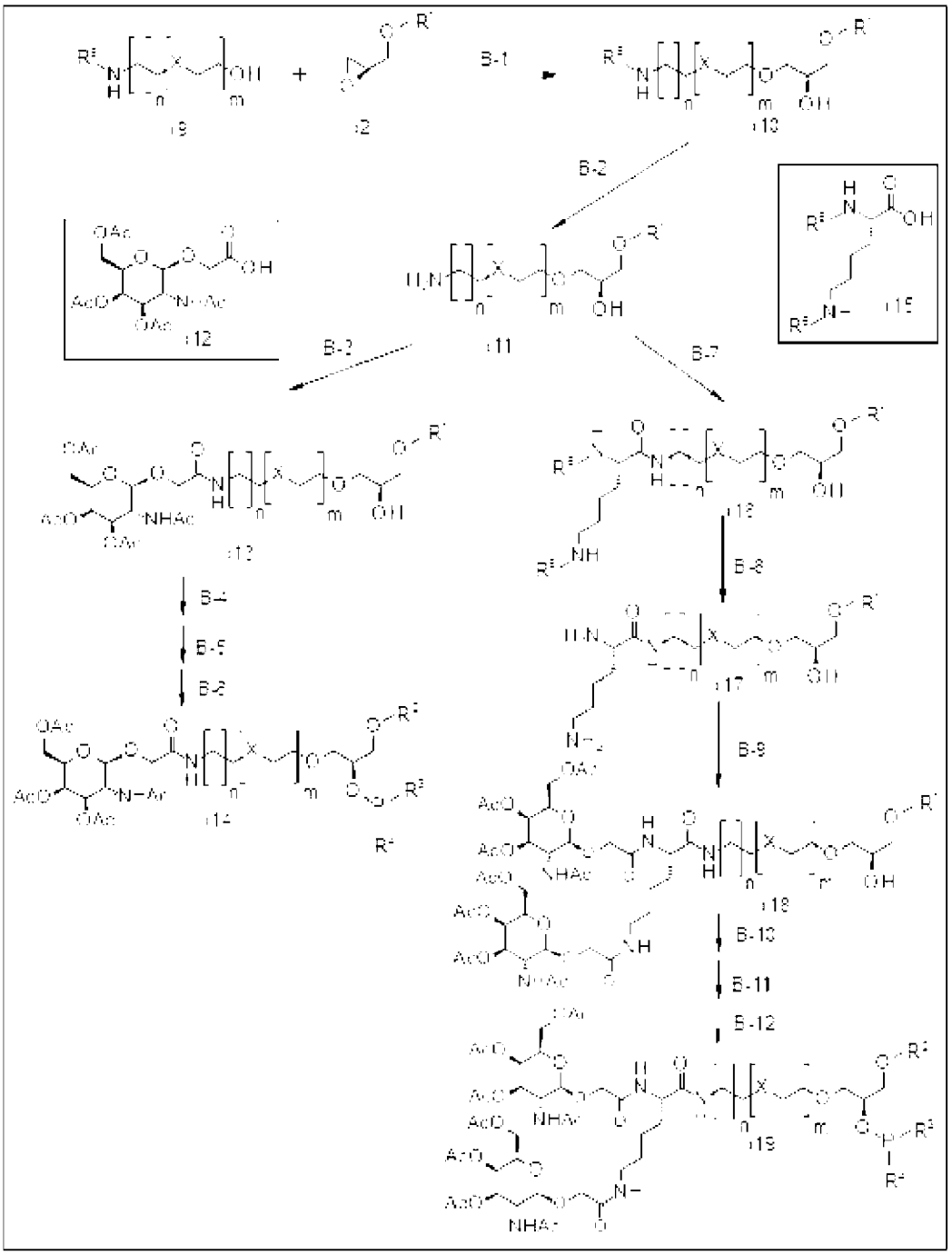
【0065】 反應溫度根據鹼、惰性溶劑等而不同，通常為-20℃至回流溫度。較佳為10℃至30℃。

【0066】 反應時間根據鹼、惰性溶劑、反應溫度等而不同，通常為15分鐘至24小時，較佳為1小時至4小時。

【0067】 B法

B法係用以製造化合物(14)或分支型之化合物(19)之方法。若使用與化合物(2)相反之立體組態者，則化合物(14)或分支型之化合物(19)中鍵結有-P(R^3)R^4之二級羥基之立體組態亦變得相反。

[化70]



式中R^1、R^2、R^3、R^4、X、n及m表示與上述相同之含義，R^5及R^6係胺基之通常之保護基。

【0068】 B-1步驟係製造化合物(10)之步驟，於惰性溶劑中在酸之存在下，使化合物(9)與化合物(2)進行反應，而於環氧化物開環時生成醚鍵。可與上文所述之步驟A-1同樣地進行。

【0069】 步驟B-2係製造化合物(11)之步驟，去除作為保護基之R^5。保護基之去除根據其種類而不同，通常可依照有機合成化學之技術中周知之方法進行，例如可依照如T.H.Greene, P.G.Wuts, Protective Groups in organic Synthesis. Third Edition, 1999年, John Wiley & Sons, Inc.等所記載之方法之常規方法進行。

【0070】 步驟B-3係製造化合物(13)之步驟，於惰性溶劑中在縮合劑、鹼之存在下，將化合物(11)及化合物(12)進行醯胺縮合。

【0071】 上述反應所使用之惰性溶劑可根據所使用之縮合劑之種類而適當選擇。例如可列舉水、醇類、非質子性極性溶劑等，較佳為二氯甲烷或N,N-二甲基甲醯胺。

【0072】 作為上述反應所使用之鹼，例如可列舉：三乙胺、N,N-二異丙基乙基胺、吡啶、4-二甲胺基吡啶等，較佳為N,N-二異丙基乙基胺。

【0073】 作為上述反應所使用之縮合劑，例如可列舉：碳二醯亞胺系縮合劑之WSC(1-[3-(二甲胺基)丙基]-3-乙基碳二醯亞胺)、DIC(N,N'-二異丙基碳二醯亞胺)、咪唑系縮合劑之CDI(N,N'-羰基二咪唑)、三吩系縮合劑之DMT-MM(4-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三吩-2-基)-4-甲基味啉鎓＝氯化物n水合物)、脲鎓系縮合劑之HATU(O-(7-氮雜苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲鎓六氟磷酸鹽)、TSTU(O-(N-丁二醯亞胺基)-

N,N,N',N'-四甲基脲鎓四氟硼酸鹽)、鏻系縮合劑之PyBOP(1H-苯并三唑-1-基氧基三吡咯啶基鏻六氟磷酸鹽)等，較佳為WSC或HATU。又，亦可視需要添加添加劑之HOAt(1-羥基-7-氮雜苯并三唑)、HOBt(1-羥基苯并三唑)、Oxyma(乙基(羥基亞胺基)氰基乙酸酯)。

【0074】 反應溫度根據縮合劑、鹼、溶劑等而不同，通常為-20℃至回流溫度。較佳為10℃至30℃。

【0075】 反應時間根據縮合劑、鹼、溶劑、反應溫度等而不同，通常為15分鐘至72小時，較佳為1小時至24小時。

【0076】 化合物(13)向化合物(14)之轉換可與上文所述之A法同樣地進行。

【0077】 步驟B-4係去除作為保護基之R^1之步驟，可與步驟A-3同樣地進行。

【0078】 步驟B-5係將R^2導入一級羥基中之步驟，可與步驟A-4同樣地進行。

【0079】 步驟B-6係將-P(R^3)R^4導入二級羥基中之步驟，可與步驟A-4同樣地進行。

【0080】 步驟B-7係製造化合物(16)之步驟，於惰性溶劑中在縮合劑、鹼之存在下，將化合物(11)與化合物(15)進行醯胺縮合。可與上文所述之步驟B-3同樣地進行。

【0081】 步驟B-8係製造化合物(17)之步驟，去除作為保護基之R^6。保護基之去除根據其種類而不同，通常可依照有機合成化學之技術中周知之方法進行，例如可依照如T.H.Greene, P.G.Wuts, Protective Groups in organic Synthesis. Third Edition, 1999年, John Wiley & Sons, Inc.等

所記載之方法之常規方法進行。

【0082】 步驟B-9係製造化合物(18)之步驟，於惰性溶劑中在縮合劑、鹼之存在下，將化合物(12)與化合物(17)進行醯胺縮合。可與上文所述之步驟B-3同樣地進行。

【0083】 化合物(18)向化合物(19)之轉換可與上文所述之A法同樣地進行。

【0084】 步驟B-10係去除作為保護基之R^1之步驟，可與步驟A-3同樣地進行。

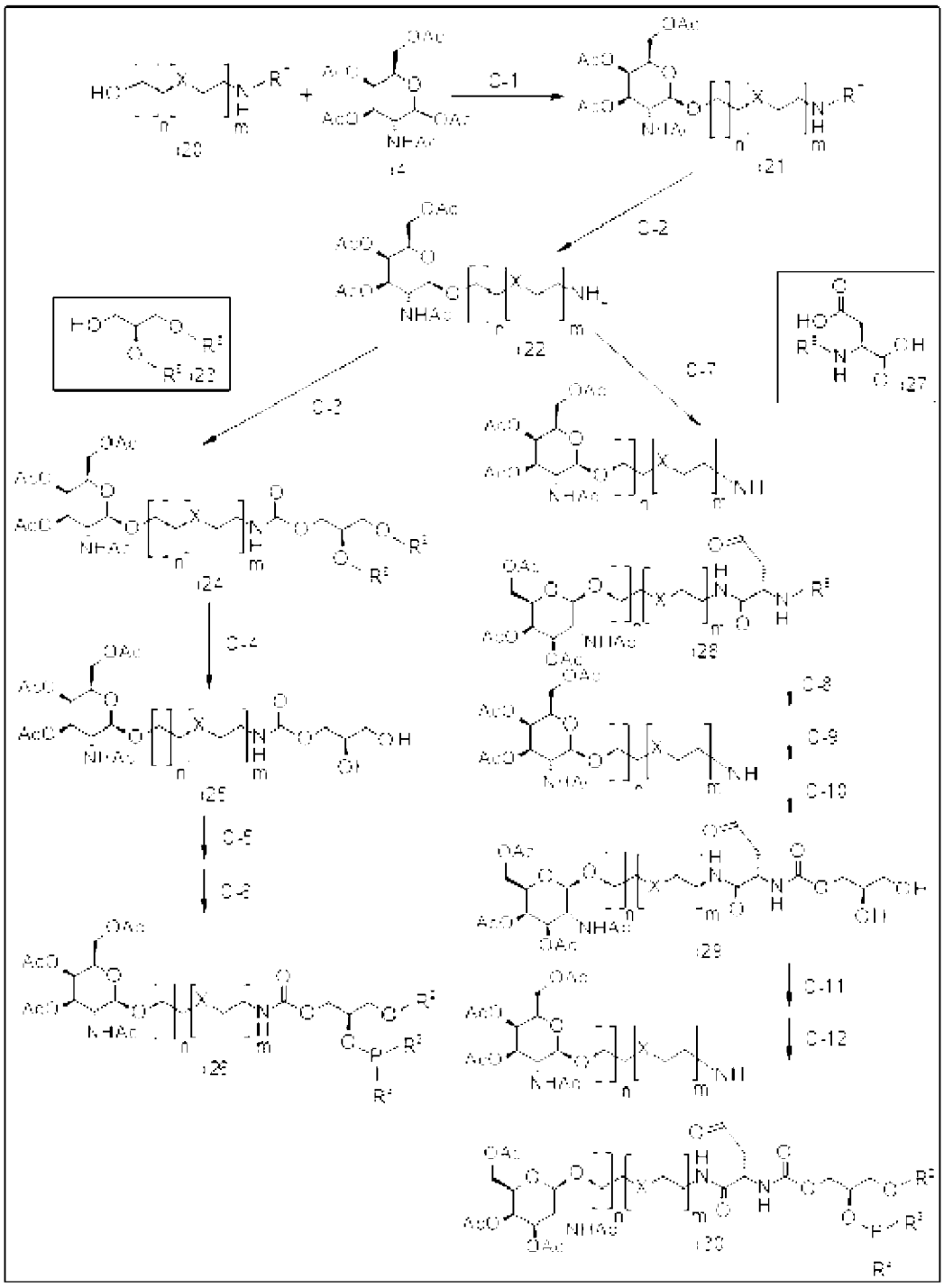
【0085】 步驟B-11係將R^2導入一級羥基中之步驟，可與步驟A-4同樣地進行。

【0086】 步驟B-12係將-P(R^3)R^4導入二級羥基中之步驟，可與步驟A-5同樣地進行。

【0087】 C法

C法係用以合成製造化合物(26)或分支型之化合物(30)之方法。若使用化合物(23)之二級羥基相反之立體組態者，則化合物(26)或分支型之化合物(30)中鍵結有-P(R^3)R^4之二級羥基之立體組態亦變得相反。

[化71]



式中R^2、R^3、R^4、X、n及m表示與上述相同之含義，R^8係羥基之通常之保護基，R^7及R^9相同或不同，為胺基之通常之保護基。

【0088】 C-1步驟係製造化合物(21)之步驟，於惰性溶劑中在酸之存在下，使化合物(20)與化合物(4)進行反應，而生成糖苷鍵。可與上文所

述之步驟A-2同樣地進行。

【0089】 步驟C-2係製造化合物(22)之步驟，去除作為化合物(21)之胺基之保護基之R^7。保護基之去除根據其種類而不同，通常可依照有機合成化學之技術中周知之方法進行，例如可依照如T.H.Greene, P.G.Wuts, Protective Groups in organic Synthesis. Third Edition, 1999年, John Wiley & Sons, Inc.等所記載之方法之常規方法進行。

【0090】 步驟C-3係製造化合物(24)之步驟，於惰性溶劑中在活化劑、鹼之存在下，使化合物(23)轉換為活性酯後，與化合物(22)進行反應，而進行胺基甲酸酯化。

【0091】 作為上述反應所使用之惰性溶劑，例如可列舉：烴類、芳香族烴類、鹵化烴類、醚類等，較佳為二氯甲烷。

【0092】 作為上述反應所使用之活化劑，只要為形成活化酯者，則無特別限定，例如可列舉：碳酸雙(五氟苯基)酯、碳酸雙(4-硝基苯基)酯、氯甲酸4-硝基苯酯等。較佳為氯甲酸4-硝基苯酯。

【0093】 作為上述反應所使用之鹼，例如可列舉：三乙胺、N,N-二異丙基乙基胺、吡啶、4-二甲胺基吡啶等，較佳為於製備活性酯時使用吡啶，繼而於與胺進行反應時追加N,N-二異丙基乙基胺。

【0094】 反應溫度根據活化劑、鹼、惰性溶劑等而不同，通常為-20℃至回流溫度。較佳為10℃至30℃。

【0095】 反應時間根據活化劑、鹼、惰性溶劑、反應溫度等而不同，通常為15分鐘至24小時，較佳為1小時至4小時。

【0096】 步驟C-4係製造化合物(25)之步驟，去除作為化合物(24)之羥基之保護基之R^8。保護基之去除根據其種類而不同，通常可依照有機合

成化學之技術中周知之方法進行，例如可依照如T.H.Greene, P.G.Wuts, Protective Groups in organic Synthesis. Third Edition, 1999年, John Wiley & Sons, Inc.等所記載之方法之常規方法進行。

【0097】 化合物(25)向化合物(26)之轉換可與上文所述之A法同樣地進行。

【0098】 步驟C-5係將R^2導入一級羥基中之步驟，可與步驟A-4同樣地進行。

【0099】 步驟C-6係將-P(R^3)R^4導入二級羥基中之步驟，可與步驟A-5同樣地進行。

【0100】 步驟C-7係製造化合物(28)之步驟，於惰性溶劑中在縮合劑、鹼之存在下，將化合物(22)與化合物(27)進行醯胺縮合。可與上文所述之B法步驟B-3同樣地進行。

【0101】 化合物(28)向化合物(29)之轉換可與上文所述之方法同樣地進行。

【0102】 步驟C-8係去除作為化合物(28)之胺基之保護基之R^9的步驟，可與步驟C-2同樣地進行。

【0103】 步驟C-9係進行胺基甲酸酯化之步驟，可與步驟C-3同樣地進行。

【0104】 步驟C-10係去除作為保護基之R^8之步驟，可與步驟C-4同樣地進行。

【0105】 化合物(29)向化合物(30)之轉換可與上文所述之A法同樣地進行。

【0106】 步驟C-11係將R^2導入一級羥基中之步驟，可與步驟A-4同

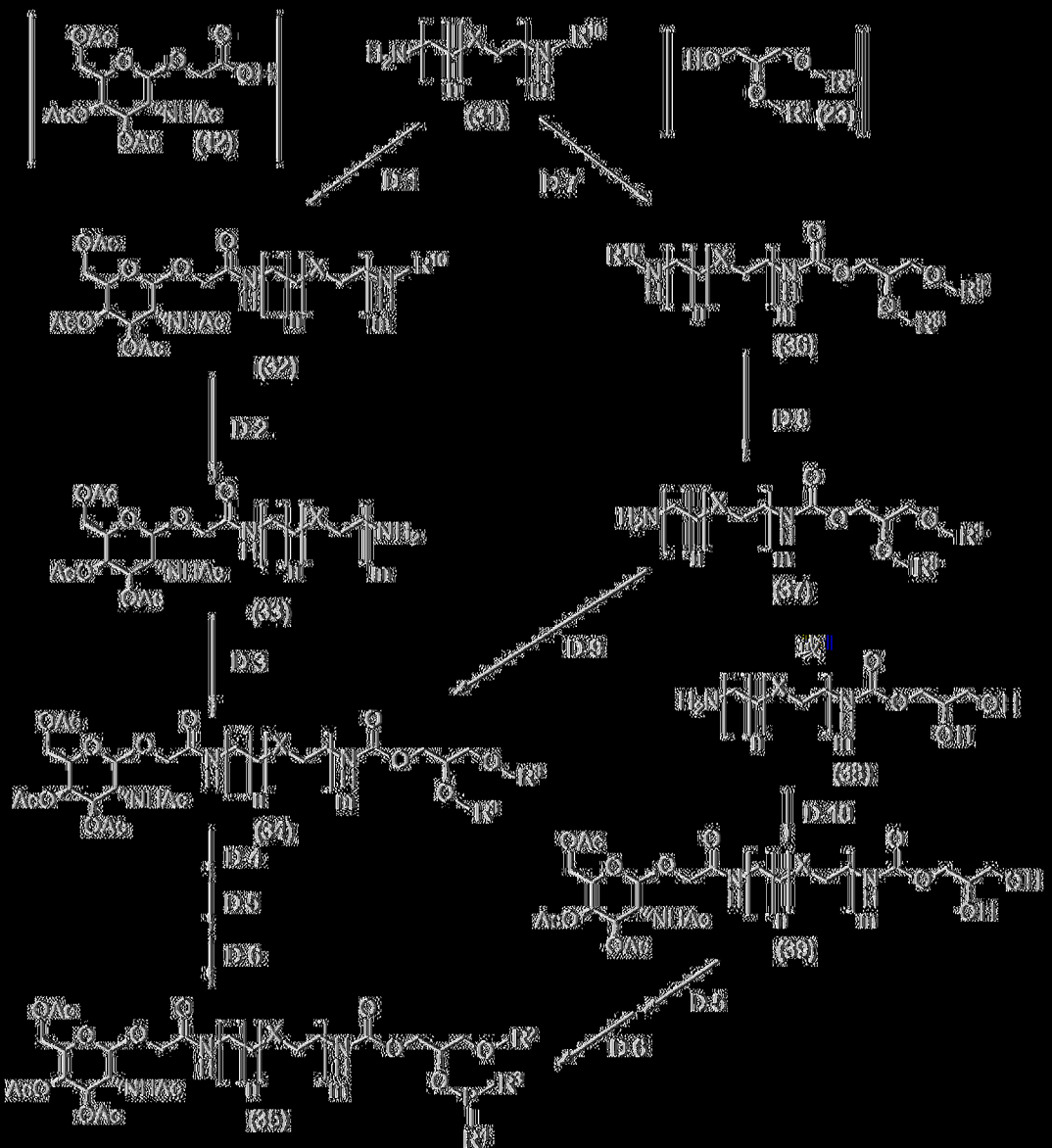
樣地進行。

[0107] 步驟C-12係將-P(R³)R⁴導入二級羥基中之步驟，可與步驟A-5同樣地進行。

[0108] D法

D法係用以製造化合物(35)之方法。可改變2次醯胺縮合之順序，或根據各化合物之保護基之狀態適當選擇步驟。若使用化合物(23)之二級羥基相反之立體組態者，則化合物(35)中鍵結有-P(R³)R⁴之二級羥基之立體組態亦變得相反。

[化72]



式中R^2、R^3、R^4、R^8、X、n及m表示與上述相同之含義，R^{10}係胺基之通常之保護基。

【0109】步驟D-1係製造化合物(32)之步驟，於惰性溶劑中在縮合劑、鹼之存在下，將化合物(31)與化合物(12)進行醯胺縮合。可與上文所述之步驟B-3同樣地進行。

【0110】步驟D-2係製造化合物(33)之步驟，去除作為化合物(32)之胺基之保護基之R^{10}。保護基之去除根據其種類而不同，通常可依照有機合成化學之技術中周知之方法進行，例如可依照如T.H.Greene, P.G.Wuts, Protective Groups in organic Synthesis. Third Edition, 1999年, John Wiley & Sons, Inc.等所記載之方法之常規方法進行。

【0111】步驟D-3係製造化合物(34)之步驟，於惰性溶劑中在活化劑、鹼之存在下，使化合物(23)轉換為活性酯後，與化合物(33)進行反應，而進行胺基甲酸酯化。可與上文所述之步驟C-3同樣地進行。

【0112】化合物(34)向化合物(35)之轉換可與上文所述之C法同樣地進行。

【0113】步驟D-4係去除作為保護基之R^8之步驟，可與步驟C-4同樣地進行。

【0114】步驟D-5係將R^2導入一級羥基中之步驟，可與步驟C-5同樣地進行。

【0115】步驟D-6係將$-P(R^3)R^4$導入二級羥基中之步驟，可與步驟C-6同樣地進行。

【0116】步驟D-7係製造化合物(36)之步驟，於惰性溶劑中在活化劑、鹼之存在下，使化合物(23)轉換為活性酯後，與化合物(31)進行反

應，而進行胺基甲酸酯化。可與上文所述之步驟C-3同樣地進行。

【0117】 步驟D-8係僅去除作為化合物(36)之胺基之保護基之R^{10}而製造化合物(37)，或同時去除作為羥基之保護基之R^{8}與作為胺基之保護基之R^{10}而製造化合物(38)。保護基之去除根據其種類而不同，通常可依照有機合成化學之技術中周知之方法進行，例如可依照如T.H.Greene, P.G.Wuts, Protective Groups in organic Synthesis. Third Edition, 1999年, John Wiley & Sons, Inc.等所記載之方法之常規方法進行。

【0118】 步驟D-9係製造化合物(34)之步驟，於惰性溶劑中在縮合劑、鹼之存在下，將化合物(37)與化合物(12)進行醯胺縮合。可與上文所述之步驟B-3同樣地進行。

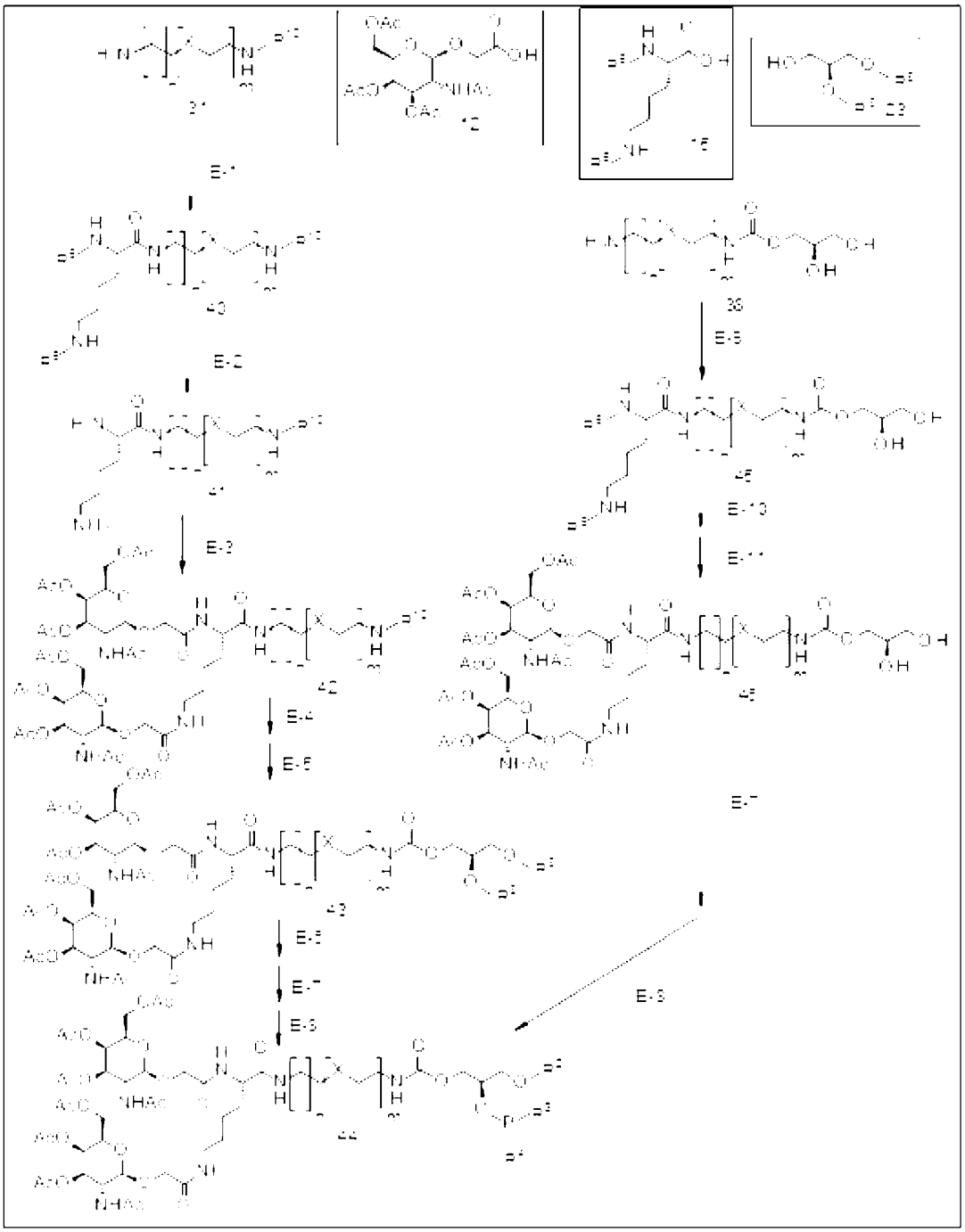
【0119】 步驟D-10係製造化合物(39)之步驟，於惰性溶劑中在縮合劑、鹼之存在下，將化合物(38)與化合物(12)進行醯胺縮合。可與上文所述之步驟B-3同樣地進行。

【0120】 化合物(39)向化合物(35)之轉換可藉由步驟D-5及D-6進行。

【0121】 E法

E法係用以利用D法所使用之化合物(31)或所合成之中間物(38)製造分支型之化合物(44)之方法。可改變2次醯胺縮合之順序，或根據各化合物之保護基之狀態適當選擇步驟。若使用化合物(23)之二級羥基相反之立體組態者，則化合物(44)中鍵結有-P(R^3)R^4之二級羥基之立體組態亦變得相反。

[化73]



式中R^2、R^3、R^4、R^6、R^8、R^{10}、X、n及m表示與上述相同之含義。

【0122】步驟E-1係製造化合物(40)之步驟，於惰性溶劑中在縮合劑、鹼之存在下，將化合物(31)與化合物(15)進行醯胺縮合。可與上文所述之步驟B-3同樣地進行。

【0123】步驟E-2係僅去除作為化合物(40)之胺基之保護基之R^6而製造化合物(41)。保護基之去除根據其種類而不同，通常可依照有機合成

化學之技術中周知之方法進行，例如可依照如T.H.Greene, P.G.Wuts, Protective Groups in organic Synthesis. Third Edition, 1999年, John Wiley & Sons, Inc.等所記載之方法之常規方法進行。

【0124】 步驟E-3係製造化合物(42)之步驟，於惰性溶劑中在縮合劑、鹼之存在下，將化合物(41)與化合物(12)進行醯胺縮合。可與上文所述之步驟B-3同樣地進行。

【0125】 化合物(42)向化合物(43)之轉換可與上文所述之D法同樣地進行。

【0126】 步驟E-4係去除作為化合物(42)之胺基之保護基之R^{10}的步驟，可與上文所述之步驟D-2同樣地進行。

【0127】 步驟E-5係進行胺基甲酸酯化之步驟。可與上文所述之D-3同樣地進行。

【0128】 化合物(43)向化合物(44)之轉換可與上文所述之C法同樣地進行。

【0129】 步驟E-6係去除作為化合物(43)之羥基之保護基之R^{8}的步驟，可與步驟C-4同樣地進行。

【0130】 步驟E-7係將R^{2}導入一級羥基中之步驟，可與步驟C-5同樣地進行。

【0131】 步驟E-8係將-P(R^{3})R^{4}導入二級羥基中之步驟，可與步驟C-6同樣地進行。

【0132】 步驟E-9係製造化合物(45)之步驟，於惰性溶劑中在縮合劑、鹼之存在下，將化合物(38)與化合物(15)進行醯胺縮合。可與上文所述之步驟B-3同樣地進行。

【0133】 化合物(45)向化合物(46)之轉換可與上文所述之步驟E-2及E-3同樣地進行。

【0134】 步驟E-10係去除作為化合物(45)之胺基之保護基之R^6。保護基之去除根據其種類而不同，通常可依照有機合成化學之技術中周知之方法進行，例如可依照如T.H.Greene, P.G.Wuts, Protective Groups in organic Synthesis. Third Edition, 1999年, John Wiley & Sons, Inc.等所記載之方法之常規方法進行。

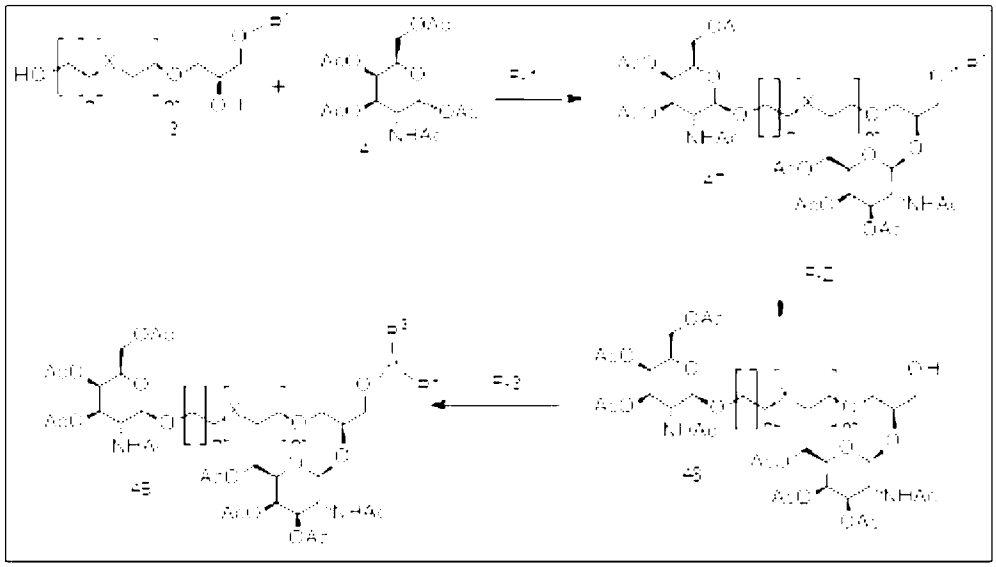
【0135】 步驟E-11係藉由醯胺縮合導入化合物(15)之步驟。可與上文所述之步驟B-3同樣地進行。

【0136】 化合物(46)向化合物(44)之轉換可藉由步驟E-7及E-8進行。

【0137】 F法

F法係用以利用A法所合成之中間物(3)製造分支型之化合物(49)之方法。若使用化合物(3)之二級羥基相反之立體組態者，則化合物(49)中鍵結有GalNAc之二級羥基之立體組態亦變得相反。

[化74]



式中R^1、R^3、R^4、X、n及m表示與上述相同之含義。

【0138】 步驟F-1係製造化合物(47)之步驟，於惰性溶劑中在酸之存在下，使化合物(3)與化合物(4)進行反應，而生成2個糖苷鍵。可與上文所述之步驟A-2同樣地進行。

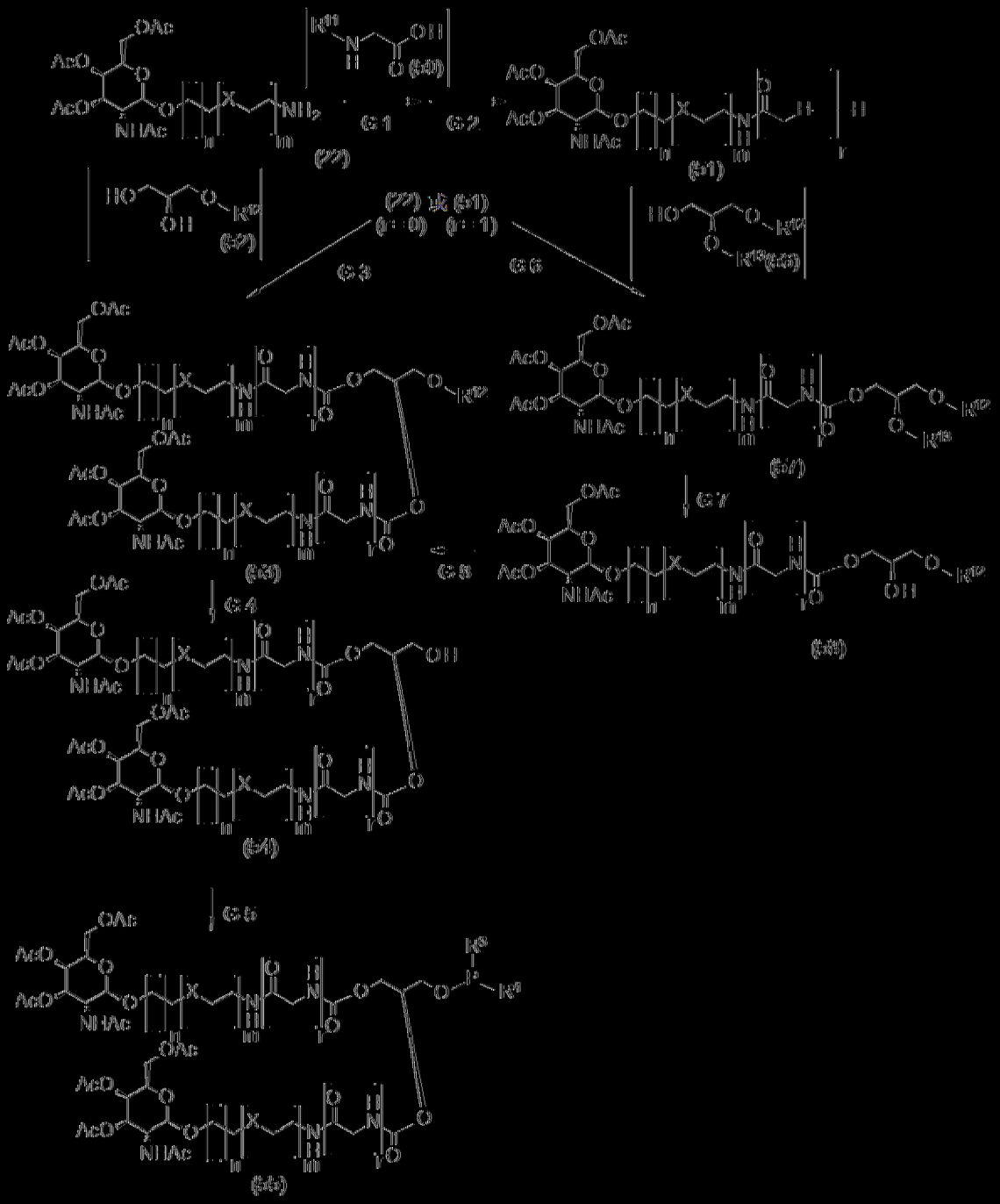
【0139】 步驟F-2係製造化合物(48)之步驟，去除作為化合物(47)之羥基之保護基之R^1。可與上文所述之步驟A-3同樣地進行。

【0140】 步驟F-3係製造化合物(49)之步驟，對羥基導入$-P(R^3)R^4$。可與上文所述之步驟A-5同樣地進行。

【0141】 G法

G法係用以利用C法所使用之中間物(22)而製造分支型之化合物(55)之方法。若使用化合物(52)或化合物(56)之二級羥基相反之立體組態者，則化合物(55)中鍵結有GalNAc之二級羥基之立體組態亦變得相反。

[化75]



式中，R^3、R^4、X、n及m表示與上述相同之含義，r表示0或1，R^{11}為胺基之通常之保護基，R^{12}及R^{13}為羥基之通常之保護基。

[0142] 步驟G-1係於惰性溶劑中在縮合劑、鹼之存在下，將化合物(22)與化合物(50)進行醯胺縮合。可與上文所述之步驟B-3同樣地進行。

[0143] 步驟G-2係去除作為保護基之R^{11}。保護基之去除根據其種

類而不同，通常可依照有機合成化學之技術中周知之方法進行，例如可依照 如T.H.Greene, P.G.Wuts, Protective Groups in organic Synthesis. Third Edition, 1999年, John Wiley & Sons, Inc.等所記載之方法之常規方法進行。

【0144】 步驟G-3係進行胺基甲酸酯化之步驟。可與上文所述之步驟C-3同樣地進行。其中，於r＝0時，將化合物(22)進行胺基甲酸酯化，於r＝1時，將化合物(52)進行胺基甲酸酯化。

【0145】 步驟G-4係去除作為保護基之R^{12}。保護基之去除根據其種類而不同，通常可依照有機合成化學之技術中周知之方法進行，例如可依照 如T.H.Greene, P.G.Wuts, Protective Groups in organic Synthesis. Third Edition, 1999年, John Wiley & Sons, Inc.等所記載之方法之常規方法進行。

【0146】 步驟G-5係製造化合物(55)之步驟，對羥基導入-P(R^3)R^4。可與上文所述之步驟A-5同樣地進行。

【0147】 步驟G-6係進行胺基甲酸酯化之步驟。可與上文所述之步驟C-3同樣地進行。其中，於r＝0時，將化合物(22)進行胺基甲酸酯化，於r＝1時，將化合物(52)進行胺基甲酸酯化。

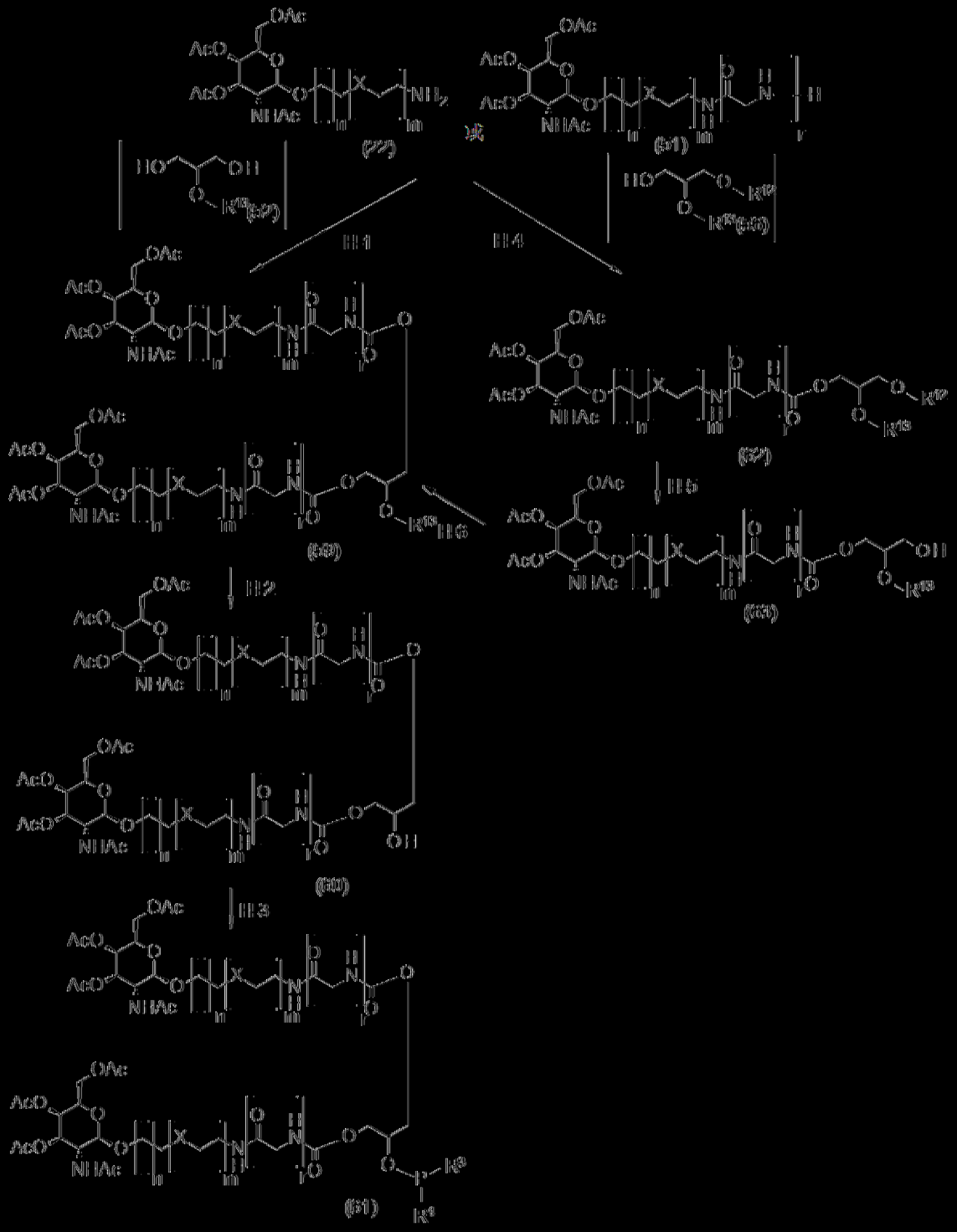
【0148】 步驟G-7係去除作為保護基之R^{13}。保護基之去除根據其種類而不同，通常可依照有機合成化學之技術中周知之方法進行，例如可依照如T.H.Greene, P.G.Wuts, Protective Groups in organic Synthesis. Third Edition, 1999年, John Wiley & Sons, Inc.等所記載之方法之常規方法進行。

【0149】 步驟G-8係進行胺基甲酸酯化之步驟。可與上文所述之C-3同樣地進行。

[0150] H法

H法係用以利用C法所使用之中間物(22)或G法所使用之中間物(51)而製造分支型之化合物(61)之方法。化合物(52)或化合物(56)之立體組態並無限定。

[化76]



式中R^3、R^4、X、n、m、r、R^{12}及R^{13}表示與上述相同之含義。

【0151】 步驟H-1係進行胺基甲酸酯化之步驟。可與上文所述之步驟C-3同樣地進行。其中，於r＝0時，將化合物(22)進行胺基甲酸酯化，於r＝1時，將化合物(51)進行胺基甲酸酯化。

【0152】 步驟H-2係去除作為保護基之R^{13}。保護基之去除根據其種類而不同，通常可依照有機合成化學之技術中周知之方法進行，例如可依照 如T.H.Greene, P.G.Wuts, Protective Groups in organic Synthesis. Third Edition, 1999年, John Wiley & Sons, Inc.等所記載之方法之常規方法進行。

【0153】 步驟H-3係製造化合物(61)之步驟，對羥基導入-P(R^3)R^4。可與上文所述之步驟A-5同樣地進行。

【0154】 步驟H-4係進行胺基甲酸酯化之步驟。可與上文所述之步驟C-3同樣地進行。其中，於r＝0時，將化合物(22)進行胺基甲酸酯化，於r＝1時，將化合物(52)進行胺基甲酸酯化。

【0155】 步驟H-5係去除作為保護基之R^{12}。保護基之去除根據其種類而不同，通常可依照有機合成化學之技術中周知之方法進行，例如可依照 如T.H.Greene, P.G.Wuts, Protective Groups in organic Synthesis. Third Edition, 1999年, John Wiley & Sons, Inc.等所記載之方法之常規方法進行。

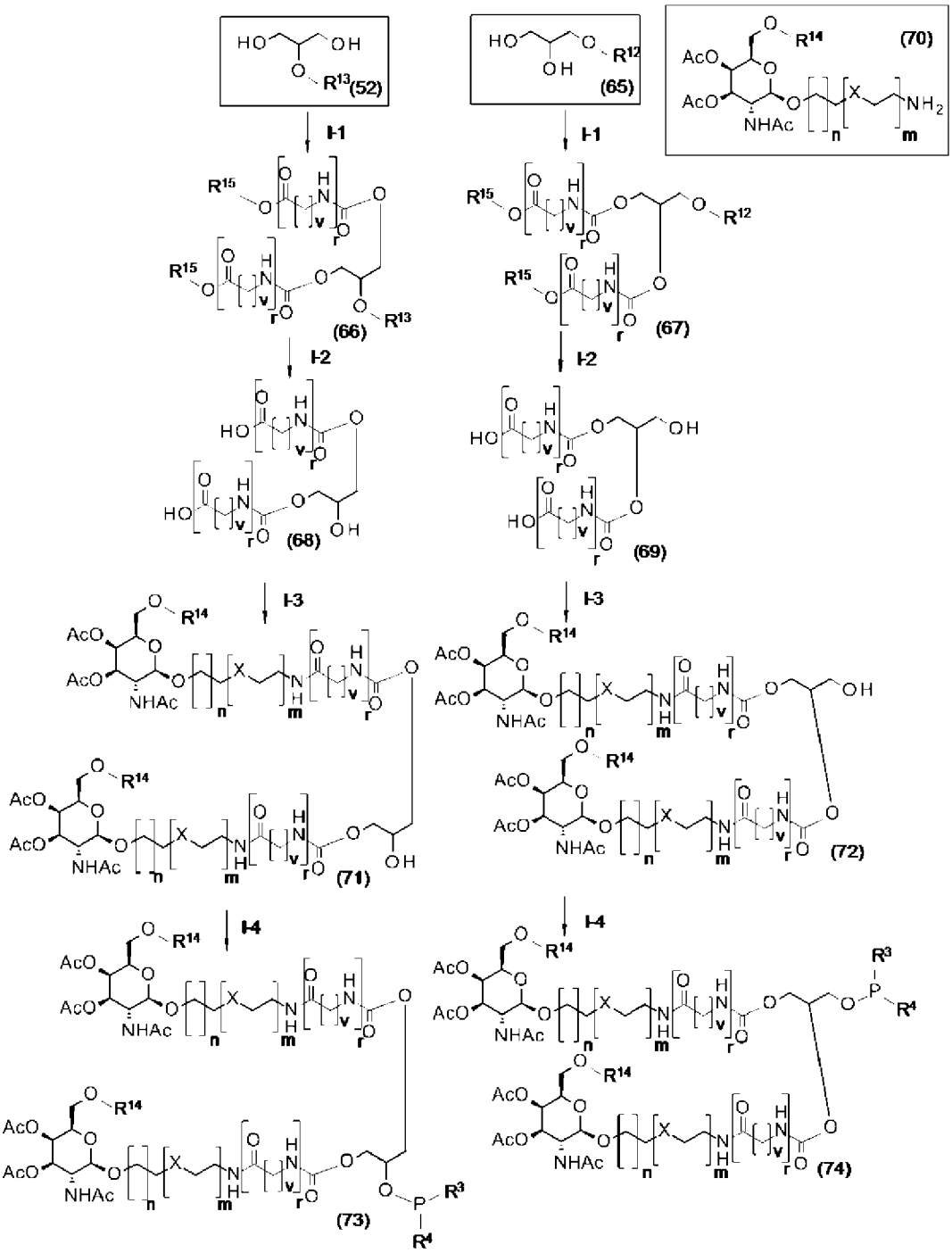
【0156】 步驟H-6係進行胺基甲酸酯化之步驟。可與上文所述之步驟C-3同樣地進行。

【0157】 I法

I法係用以製造分支型之化合物(73)、及化合物(74)之方法。例如，

藉由使用化合物(70)，可適當選擇GalNAc部分之6位羥基之保護基。於R^{14}為乙醯基之情形時，使用可藉由C法合成之化合物(22)作為化合物(70)。於R^{14}為4,4'-二甲氧基三苯甲基之情形時，使用例如可依照下文所述之參考例合成之化合物作為化合物(70)。

[化77]



式中R^{12}及R^{13}為羥基之通常之保護基，較理想為苄基。式中R^{14}為羥基之通常之保護基，較理想為乙醯基、4,4'-二甲氧基三苯甲基。式中R^{15}為羰基之通常之保護基，較理想為苄基。式中，-P(R^3)R^4表示：[R^3及R^4相同或不同而表示經羥基、經保護之羥基、巰基、經保護之巰基、胺基、碳數1至4個之烷氧基、碳數1至4個之烷硫基、碳數1至5個之氰基烷氧基或碳數1至4個之烷基取代之胺基]。式中X為碳或氧。式中n為1～15之整數，m為0～5之整數。其中，於n為1時，m為0～5之整數，於n為2～15之整數時，m為0。式中r獨立為0或1。式中v為1～7。

【0158】 步驟I-1係進行胺基甲酸酯化之步驟。可與上文所述之步驟C-3同樣地進行。

【0159】 步驟I-2係去除作為保護基之R^{12}或R^{13}與R^{15}。保護基之去除根據其種類而不同，通常可依照有機合成化學之技術中周知之方法進行，例如可依照如T.H.Greene, P.G.Wuts, Protective Groups in organic Synthesis. Third Edition, 1999年, John Wiley & Sons, Inc.等所記載之方法之常規方法進行。

【0160】 步驟I-3係於惰性溶劑中在縮合劑、鹼之存在下，與化合物(22)進行醯胺縮合。可與上文所述之步驟B-3同樣地進行。

【0161】 步驟I-4係製造化合物(73)或化合物(74)之步驟，對羥基導入-P(R^3)R^4。可與上文所述之步驟A-5同樣地進行。

【0162】 本發明之寡核苷酸(反義寡核苷酸)可以醫藥之形式尤其用於糖原病Ia型之治療。治療包括預防及事後治療之任一者。

【0163】 本發明之寡核苷酸(反義寡核苷酸)亦可以藥理上容許之鹽之形態使用。所謂「藥理上容許之鹽」係指寡核苷酸(反義寡核苷酸)之

鹽，作為此種鹽，可列舉：如鈉鹽、鉀鹽、鋰鹽之鹼金屬鹽；如鈣鹽、鎂鹽之鹼土金屬鹽；鋁鹽、鐵鹽、鋅鹽、銅鹽、鎳鹽、鈷鹽等金屬鹽；如銨鹽之無機鹽；如第三辛基胺鹽、二苄基胺鹽、味啉鹽、葡糖胺鹽、苯基甘胺酸烷基酯鹽、乙二胺鹽、N-甲基還原葡糖胺鹽、胍鹽、二乙胺鹽、三乙胺鹽、二環己基胺鹽、N,N'-二苄基乙二胺鹽、氯普魯卡因鹽、普魯卡因鹽、二乙醇胺鹽、N-苄基-苯乙基胺鹽、哌啩鹽、四甲基銨鹽、三(羥甲基)胺基甲烷鹽之有機鹽等胺鹽；如氫氟酸鹽、鹽酸鹽、氫溴酸鹽、氫碘酸鹽之氫鹵酸鹽；硝酸鹽、過氯酸鹽、硫酸鹽、磷酸鹽等無機酸鹽；如甲磺酸鹽、三氟甲磺酸鹽、乙磺酸鹽之低級烷磺酸鹽；如苯磺酸鹽、對甲苯磺酸鹽之芳基磺酸鹽；乙酸鹽、蘋果酸鹽、反丁烯二酸鹽、丁二酸鹽、檸檬酸鹽、酒石酸鹽、草酸鹽、順丁烯二酸鹽等有機酸鹽；如甘胺酸鹽、離胺酸鹽、精胺酸鹽、鳥胺酸鹽、麩胺酸鹽、天冬胺酸鹽之胺基酸鹽等，較佳為鹼金屬鹽，更佳為鈉鹽。該等鹽可藉由公知之方法製造。

【0164】 又，寡核苷酸(反義寡核苷酸)及其藥理上容許之鹽有時亦以溶劑合物(例如，水合物)之形式存在，亦可為此種溶劑合物。

【0165】 於將本發明之寡核苷酸(反義寡核苷酸)、其藥理上容許之鹽或溶劑合物用於糖原病Ia之治療之情形時，可將其本身或與適宜之藥理上容許之賦形劑、稀釋劑等混合，藉由錠劑、膠囊劑、顆粒劑、散劑或糖漿劑等經口投予，或者藉由注射劑、栓劑、貼附劑或外用劑等非經口投予。

【0166】 該等製劑係使用賦形劑(例如，如以下之有機系賦形劑：如乳糖、白糖、葡萄糖、甘露糖醇、山梨糖醇之糖衍生物；如玉米澱粉、馬鈴薯澱粉、α澱粉、糊精之澱粉衍生物；如結晶纖維素之纖維素衍生物；

阿拉伯膠；葡聚糖；支鏈澱粉；如以下之無機系賦形劑：如輕質無水矽酸、合成矽酸鋁、矽酸鈣、矽酸鋁鎂之矽酸鹽衍生物；如磷酸氫鈣之磷酸鹽；如碳酸鈣之碳酸鹽；如硫酸鈣之硫酸鹽等；等)、潤滑劑(例如，硬脂酸；如硬脂酸鈣、硬脂酸鎂之硬脂酸金屬鹽；滑石；膠體二氧化矽；如蜂蠟、鯨蠟之蠟類；硼酸；己二酸；如硫酸鈉之硫酸鹽；二醇；反丁烯二酸；苯甲酸鈉；DL白胺酸；如月桂基硫酸鈉、月桂基硫酸鎂之月桂基硫酸鹽：如無水矽酸、矽酸水合物之矽酸類；上述澱粉衍生物等)、結合劑(例如，羥丙基纖維素、羥丙基甲基纖維素、聚乙烯基吡咯啶酮、聚乙二醇、與上述賦形劑同樣之化合物等)、崩解劑(例如，如低取代度羥丙基纖維素、羧甲基纖維素、羧甲基纖維素鈣、內部交聯羧甲基纖維素鈉之纖維素衍生物；如羧甲基澱粉、羧甲基澱粉鈉、交聯聚乙烯基吡咯啶酮之經化學修飾之澱粉-纖維素類等)、乳化劑(例如，如膨潤土、膠體矽酸鎂鋁之膠體性黏土；如氫氧化鎂、氫氧化鋁之金屬氫氧化物；如月桂基硫酸鈉、硬脂酸鈣之陰離子界面活性劑；如氯化苄烷銨之陽離子界面活性劑；如聚氧乙烯烷基醚、聚氧乙烯山梨糖醇酐脂肪酸酯、蔗糖脂肪酸酯之非離子界面活性劑等)、穩定劑(如對羥基苯甲酸甲酯、對羥基苯甲酸丙酯之對羥基苯甲酸酯類；如氯丁醇、苄醇、苯基乙醇之醇類；氯化苄烷銨；如苯酚、甲酚之酚類；硫柳汞；去氫乙酸；山梨酸等)、矯味除臭劑(例如，通常使用之甜味料、酸味料、香料等)、稀釋劑等添加劑，藉由周知之方法而製造。

【0167】本發明之治療藥含有0.1～250 μmoles/mL之寡核苷酸(反義寡核苷酸)即可，較佳為亦可使其含有1～50 μmoles/mL之寡核苷酸(反義寡核苷酸)、其藥理上容許之鹽或溶劑合物、0.02～10% w/v之碳水化合

物或多元醇及0.01～0.4% w/v之藥理上容許之界面活性劑。

【0168】 作為上述碳水化合物，尤佳為單糖類或二糖類。作為該等碳水化合物及多元醇之例，可列舉：葡萄糖、半乳糖、甘露糖、乳糖、麥芽糖、甘露糖醇及山梨糖醇。該等可單獨使用，亦可併用。

【0169】 又，作為本發明中之界面活性劑之較佳之例，可列舉：聚氧乙烯山梨糖醇酐單～三-酯、烷基苯基聚氧乙烯、牛膽酸鈉、膽酸鈉、及多元醇酯。其中，尤佳為聚氧乙烯山梨糖醇酐單～三-酯，其中，作為酯，尤佳為油酸酯、月桂酸酯、硬脂酸酯及棕櫚酸酯。該等可單獨使用，亦可併用。

【0170】 又，本發明之治療藥進而較佳為可含有0.03～0.09 M之藥理上容許之中性鹽、例如氯化鈉、氯化鉀及/或氯化鈣。

【0171】 又，本發明之治療藥進而較佳為可含有0.002～0.05 M之藥理上容許之緩衝劑。作為較佳之緩衝劑之例，可列舉：檸檬酸鈉、甘胺酸鈉、磷酸鈉、三(羥甲基)胺基甲烷。該等之緩衝劑可單獨使用，亦可併用。

【0172】 進而，上述治療藥可以溶液狀態供給。然而，由於存在必須保存一定時間之情形等，故而為了使寡核苷酸(反義寡核苷酸)穩定而防止治療效果之降低，通常較佳為預先冷凍乾燥，於該情形時，於使用時以溶解液(注射用蒸餾水等)再構成(reconstruction)，即製成投予之液體狀態使用即可。因此，本發明之治療藥亦包含用於以各成分成為特定之濃度範圍之方式以溶解液再構成而使用之經冷凍乾燥之狀態者。為了促進冷凍乾燥物之溶解性，可使其進而含有白蛋白、甘胺酸等胺基酸。

【0173】 本發明之寡核苷酸(反義寡核苷酸)可使用國際公開第

2015/005253所記載之脂質等將其封入，以如國際公開第2015/005253等所記載之核酸脂質奈米粒子或脂質體之形式投予。

【0174】 於將本發明之寡核苷酸(反義寡核苷酸)、其藥理上容許之鹽或溶劑合物對人投予之情形時，例如以成人每天約0.01～100 mg/kg(體重)、較佳為0.1～20 mg/kg(體重)之投予量，1次或分數次進行皮下注射、點滴靜脈注射、或靜脈注射即可，其投予量或投予次數可根據疾病之種類、症狀、年齡、投予方法等適當變更。

【0175】 本發明之寡核苷酸(反義寡核苷酸)、其藥理上容許之鹽或溶劑合物向糖原病Ia型患者之投予例如可以如下方式進行。即，藉由業者所周知之方法製造寡核苷酸(反義寡核苷酸)、其藥理上容許之鹽或溶劑合物，藉由常規方法對其進行殺菌處理，例如製備125 mg/mL之注射用溶液。以寡核苷酸(反義寡核苷酸)之投予量相對於體重每1 kg例如成為10 mg之方式，例如以輸液之形式將該溶液點滴投予至患者靜脈內。投予例如係以1週之間隔進行，其後亦一面藉由血糖值、血中乳酸值、利用CT(Computed Tomography，計算機斷層掃描技術)獲得之肝腫大/肝糖值等確認治療效果，一面適當重複該治療。

實施例

【0176】 以下，藉由實施例具體說明本發明。再者，該等實施例係用以說明本發明者，並不限定本發明之範圍。

【0177】 (實施例1～11)

HO-A^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-T^{e2s}-A^{mls}-A^{mls}-A^{e2s}-A^{mls}-U^{mls}-C^{e2s}-C^{mls}-G^{mls}-A^{e2s}-U^{mls}-G^{mls}-G^{e2s}-C^{mls}-G^{mls}-A^{e2}-$^{s}A^{mls}$-G^{e2t}-H (21e_002)(序列編號1)

使用核酸自動合成儀(「ABI 394 DNA/RNA Synthesizer」Applied

Biosystems製造)，利用亞磷醯胺法(Nucleic Acids Research, 12, 4539 (1984))進行合成。作為試劑，使用活化劑溶液-3(0.25 mol/L之5-苄硫基-1H-四唑/乙腈溶液，和光純藥工業製造，產品編號013-20011)、CAP A for AKTA(1-甲基咪唑/乙腈溶液，Sigma-Aldrich製造，產品編號L040050)、Cap B1 for AKTA(乙酸酐/乙腈溶液，Sigma-Aldrich製造，產品編號L050050)、Cap B2 for AKTA(吡啶/乙腈溶液，Sigma-Aldrich製造，產品編號L050150)、DCA Deblock(二氯乙酸/甲苯溶液，Sigma-Aldrich製造，產品編號L023050)。作為用以形成硫代磷酸酯鍵之硫化試劑，以成為0.2 M之方式使用乙腈(脫水，關東化學製造，產品編號01837-05)、吡啶(脫水，關東化學製造，產品編號11339-05)1：1(v/v)溶液溶解苯基乙醯基二硫醚(CARBOSYNTH製造，產品編號FP07495)使用。作為醯胺試劑，2'-O-Me核苷之亞磷醯胺(腺苷體產品編號ANP-5751，胞苷體產品編號ANP-5752，鳥苷體產品編號ANP-5753，尿苷體產品編號ANP-5754)係使用ChemGenes製造者。非天然型之亞磷醯胺係使用日本專利特開2000-297097之實施例14(5'-O-二甲氧基三苯甲基-2'-O,4'-C-伸乙基-6-N-苯甲醯基腺苷-3'-O-(2-氰基乙基 N,N-二異丙基)亞磷醯胺)、實施例27(5'-O-二甲氧基三苯甲基-2'-O,4'-C-伸乙基-2-N-異丁醯基鳥苷-3'-O-(2-氰基乙基 N,N-二異丙基)亞磷醯胺)、實施例22(5'-O-二甲氧基三苯甲基-2'-O,4'-C-伸乙基-4-N-苯甲醯基-5-甲基胞苷-3'-O-(2-氰基乙基 N,N-二異丙基)亞磷醯胺)、實施例9(5'-O-二甲氧基三苯甲基-2'-O,4'-C-伸乙基-5-甲基尿苷-3'-O-(2-氰基乙基 N,N-二異丙基)亞磷醯胺)之化合物。作為固相載體，使用Glen Unysupport 0.1 μmol(GlenResearch製造)，合成表述化合物。程式使用附屬於核酸自動合成儀之0.2 μmol尺度用，其中，醯胺體

之縮合所需之時間設為600秒，硫化所需之時間設為150秒。

【0178】 利用300 μL之濃氨水處理具有目標序列之經保護之寡核苷酸相關物，藉此自支持體切下低聚物，並且脫去磷原子上之保護基氰基乙基與核酸鹼基上之保護基。使用Clarity QSP(Phenomenex製造)，依照隨附之操作說明進行精製。

【0179】 本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA(NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第92號至第112號互補之序列。

【0180】 實施例2至11之化合物亦與實施例1同樣地合成。將實施例1之資料、及實施例2至11記載於表1。

【0181】 表1

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

表中之序列中大寫字母表示2'-O,4'-C-伸乙基交聯核酸，小寫字母表示2'-OMe-RNA。2'-O,4'-C-伸乙基交聯核酸之C係5-甲基胞嘧啶。開始及結束表示智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA(NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起之編號。化合物係藉由負

離子ESI(electrospray ionization，電噴灑游離)質量分析進行鑑定，將實測值示於表中。

【0182】(實施例12～22)

HO-A^{mls}-G^{mls}-A^{mls}-U^{mls}-A^{mls}-A^{mls}-A^{mls}-A^{mls}-U^{mls}-C^{mls}-C^{mls}-G^{mls}-A^{mls}-U^{mls}-G^{mls}-G^{mls}-C^{mls}-G^{mls}-A^{mls}-AG^{mlt}-H (21m_002)(序列編號1)

使用核酸自動合成儀(BioAutomation製造之MerMade 192X)，與實施例1同樣地進行合成及精製，獲得目標化合物。

【0183】本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第92號至第112號互補之序列。

【0184】實施例13至22之化合物亦與實施例12同樣地合成。將實施例12之資料、及實施例13至22記載於表2。

【0185】表2

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

表中之序列中小寫字母表示2'-OMe-RNA。開始及結束表示智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起之編號。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行

鑑定，將實測值示於表中。

【0186】(實施例23～50)

HO-G^{e2s}-A^{mls}-U^{mls}-A^{e2s}-A^{mls}-A^{mls}-A^{e2s}-U^{mls}-C^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-T^{e2s}-G^{mls}-G^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-A^{e2s}-G^{mls}-C^{e2t}-H (21e_015)(序列編號12)

與實施例12同樣地進行合成及精製，獲得目標化合物。

【0187】本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第91號至第111號互補之序列。

【0188】實施例24至50之化合物亦與實施例23同樣地合成。將實施例23之資料、及實施例24至50記載於表3。

【0189】表3

實施例	序列名稱	序列(5'-3')	開始	結束	分子量	序列編號
23	21e_015	GauAaaAucCgaTggCgaAgC	111	91	7544.88	12
24	21e_016	AuaAaaTccGauGgcGaaGcT	110	90	7477.80	13
25	21e_017	AaaAucCgaTggCgaAgcTgA	108	88	7544.87	14
26	21e_018	AaaTccGauGgcGaaGcuGaA	107	87	7506.86	15
27	21e_019	AucCgaTggCgaAgcTgaAaA	105	85	7544.86	16
28	21e_020	TccGauGgcGaaGcuGaaAaG	104	84	7518.81	17
29	21e_021	CgaTggCgaAgcTgaAaaGgA	102	81	7623.82	18
30	21e_022	GauGgcGaaGcuGaaAagGaA	101	81	7591.85	19
31	21e_002m01	Agauaaaauccgauggcgaag	112	92	7432.84	1
32	21e_002m02	agauaaaauccgauggcgaaG	112	92	7432.84	1
33	21e_002m03	AgauaaaauccgauggcgaaG	112	92	7440.85	1
34	21e_002m04	AgauaaaauccgAuggcgaaG	112	92	7452.86	1
35	21e_002m05	AgauaaaauCcgauggcgaaG	112	92	7466.86	1
36	21e_002m06	AgaTaaaauccgauggcgAaG	112	92	7482.86	1
37	21e_002m07	AgauaaaauCcgAuggcgaaG	112	92	7478.83	1
38	21e_002m08	AgauaaaauCcgaugGcgaaG	112	92	7478.84	1
39	21e_002m09	AgaTaaAauccgAuggcgaaG	112	92	7490.83	1
40	21e_002m10	AgauaaAauccgaugGcgAaG	112	92	7476.81	1
41	21e_002m11	AgauaaAauccgAugGcgaaG	112	92	7481.84	1
42	21e_002m12	AgauaaAauCcgaugGcgaaG	112	92	7490.85	1
43	21e_002m13	AgaTaaAauccgAuggcgAaG	112	92	7502.82	1
44	21e_002m14	AgaTaaaauCcgAuggcgAaG	112	92	7516.85	1
45	21e_002m15	AgauaaAauCcgAugGcgaaG	112	92	7502.82	1
46	21e_002m16	AgaTaaAauCcgAuggcgAaG	112	92	7533.87	1

47	21e_002m17	AgaTaaaauCcgAugGcgAaG	112	92	7528.84	1
48	21e_002m18	AgaTaAaaTcCgaTgGcgAaG	112	92	7584.91	1
49	21e_002m19	AgAuaAaAuCcGaTgGcgAaG	112	92	7564.84	1
50	21e_002m20	AgAuAaAaTcCgAuGgCgAaG	112	92	7594.88	1

表中之序列中大寫字母表示2'-O,4'-C-伸乙基交聯核酸，小寫字母表示2'-OMe-RNA。2'-O,4'-C-伸乙基交聯核酸之C係5-甲基胞嘧啶。開始及結束表示智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起之編號。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定，將實測值示於表中。

【0190】(實施例51～69)

HO-U^{mls}-A^{e2s}-A^{mls}-A^{mls}-A^{e2s}-U^{mls}-C^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-T^{e2s}-G^{mls}-G^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-A^{e2s}-G^{mlt}-H (18e_005)(序列編號20)

與實施例12同樣地進行合成。利用450 μL之濃氨水處理具有目標序列之經保護之寡核苷酸相關物，藉此自支持體切下低聚物，並且脫去磷原子上之保護基氰基乙基與核酸鹼基上之保護基。將低聚物之混合溶液與Clarity QSP DNA上樣緩衝液(Clarity QSP DNA Loading Buffer)(Phenomenex製造)300 μL混合並添加至Clarity SPE 96孔板(Phenomenex製造)上。依序添加Clarity QSP DNA上樣緩衝液：水＝1：1溶液1 mL、水3 mL、3%二氯乙酸(DCA)水溶液3 mL、水6 mL後，收集藉由20 mM Tris水溶液：乙腈＝9：1溶液萃取之成分。將溶劑蒸餾去除後，獲得目標化合物。

【0191】本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端

起第91號至第109號互補之序列。

【0192】 實施例52至69之化合物亦與實施例51同樣地合成。將實施例51之資料、及實施例52至69記載於表4。

【0193】 表4

實施例	序列名稱	序列(5'-3')	開始	結束	分子量	序列編號
51	18e_005	uAaaAucCgaTggCgaAg	109	92	6437.79	20
52	18e_006	aAaaTccGauGgcGaaGc	108	91	6408.78	21
53	18e_007	aAauCcgAugGcgAagCu	107	90	6399.76	22
54	18e_008	aAucCgaTggCgaAgcTg	106	89	6443.80	23
55	18e_009	aTccGauGgcGaaGcuGa	105	88	6401.74	24
56	18e_010	uCcgAugGcgAagCugAa	104	87	6415.75	25
57	18e_011	cCgaTggCgaAgcTgaAa	103	86	6466.81	26
58	18e_012	cGauGgcGaaGcuGaaAa	102	85	6434.76	27
59	18e_013	gAugGcgAagCugAaaAg	101	84	6488.79	28
60	18e_014	aTggCgaAgcTgaAaaGg	100	83	6516.82	29
61	18e_015	uGgcGaaGcuGaaAagGa	99	82	6474.78	30
62	18e_016	gGcgAagCugAaaAggAa	98	81	6511.81	31
63	18e_017	gCgaAgcTgaAaaGgaAg	97	80	6525.84	32
64	18e_022	TaaaauCCgaTggCgaag	109	92	6453.82	20
65	18e_023	aaaauCCgaTggCgaagC	108	91	6452.84	21
66	18e_024	aaauCCgaTggCgaagCT	107	90	6455.83	22
67	18e_025	aauCCgaTggCgaagCTg	106	89	6471.82	23
68	18e_026	auCCgaTggCgaagCTga	105	88	6471.83	24
69	18e_031	TaAaaTccgauGgcGaag	109	92	6411.77	20

表中之序列中大寫字母表示2'-O,4'-C-伸乙基交聯核酸，小寫字母表示2'-OMe-RNA。2'-O,4'-C-伸乙基交聯核酸之C係5-甲基胞嘧啶。開始及結束表示智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起之編號。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定，將實測值示於表中。

【0194】 (實施例70～82)

HO-U^{mls}-A^{mls}-A^{mls}-A^{mls}-A^{mls}-U^{mls}-C^{mls}-C^{mls}-G^{mls}-A^{mls}-U^{mls}-G^{mls}-G^{mls}-C^{mls}-G^{mls}-A^{mls}-A^{mls}-G^{mlt}-H (18m_005)(序列編號20)

使用核酸自動合成儀(BioAutomation製造之MerMade 192X)，與實

施例12同樣地進行合成及精製，而獲得目標化合物。

【0195】 本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第92號至第109號互補之序列。

【0196】 實施例71至82之化合物亦與實施例70同樣地合成。將實施例70之資料、及實施例71至82記載於表5。

【0197】 表5

實施例	序列名稱	序列(5'-3')	開始	結束	分子量	序列編號
70	18m_005	uaaaauccgauggcgaag	109	92	6323.74	20
71	18m_006	aaaauccgauggcgaagc	108	91	6322.76	21
72	18m_007	aaauccgauggcgaagcu	107	90	6299.74	22
73	18m_008	aauccgauggcgaagcug	106	89	6315.73	23
74	18m_009	auccgauggcgaagcuga	105	88	6315.73	24
75	18m_010	uccgauggcgaagcugaa	104	87	6315.73	25
76	18m_011	ccgauggcgaagcugaaa	103	86	6338.75	26
77	18m_012	cgauggcgaagcugaaaa	102	85	6362.76	27
78	18m_013	gauggcgaagcugaaaag	101	84	6402.77	28
79	18m_014	auggcgaagcugaaaagg	100	83	6402.77	29
80	18m_015	uggcgaagcugaaaagga	99	82	6402.77	30
81	18m_016	ggcgaagcugaaaaggaa	98	81	6425.79	31
82	18m_017	gcgaagcugaaaaggaag	97	80	6425.80	32

表中之序列中小寫字母表示2'-OMe-RNA。開始及結束表示智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起之編號。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定，將實測值示於表中。

【0198】 (參考例1)

HO-A^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-T^{e2s}-A^{mls}-A^{mls}-A^{e2s}-A^{mls}-U^{mls}-C^{e2s}-C^{mls}-G^{mls}-A^{e2s}-U^{mls}-G^{mls}-G^{e2s}-C^{mls}-G^{mls}-A^{e2}-$^{s}A^{mls}$-G^{e2t}-H (21e_001)(序列編號33)

與實施例1同樣地合成、精製，而獲得目標化合物。

【0199】 本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第95號至第115號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：7520.85)。

【0200】 (參考例2～3)

HO-G^{e2s}-C^{mls}-A^{mls}-G^{e2s}-A^{mls}-U^{mls}-A^{e2s}-A^{mls}-A^{mls}-A^{e2s}-U^{mls}-C^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-T^{e2s}-G^{mls}-G^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{e2t}-H (21e_013)(序列編號34)

與實施例12同樣地進行合成及精製，而獲得目標化合物。

【0201】 本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第94號至第114號互補之序列。

【0202】 參考例3之化合物亦與參考例2同樣地合成。將參考例2之資料、及參考例3記載於表6。

【0203】 表6

參考例	序列名稱	序列(5'-3')	開始	結束	分子量	序列編號
2	21e_013	GcaGauAaaAucCgaTggCgA	114	94	7530.86	34
3	21e_014	CagAuaAaaTccGauGgcGaA	113	93	7505.88	35

表中之序列中大寫字母表示2'-O,4'-C-伸乙基交聯核酸，小寫字母表示2'-OMe-RNA。2'-O,4'-C-伸乙基交聯核酸之C係5-甲基胞嘧啶。開始及結束表示智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起之編號。化合物係藉由負

離子ESI質量分析進行鑑定，將實測值示於表中。

【0204】 (參考例4～15)

HO-C^{mls}-A^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-T^{e2s}-A^{mls}-A^{mls}-A^{e2s}-A^{mls}-U^{mls}-C^{e2s}-C^{mls}-G^{mls}-A^{e2s}-U^{mls}-G^{mls}-G^{e2s}-C^{mlt}-H (18e_001)(序列編號36)

與實施例51同樣地進行合成及精製，而獲得目標化合物。

【0205】 本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第96號至第113號互補之序列。

【0206】 參考例5至15之化合物亦與參考例4同樣地合成。將參考例4之資料、及參考例5至15記載於表7。

【0207】 表7

參考例	序列名稱	序列(5'-3')	開始	結束	分子量	序列編號
4	18e_001	cAgaTaaAauCcgAugGc	113	96	6383.77	36
5	18e_002	aGauAaaAucCgaTggCg	112	95	6437.79	37
6	18e_003	gAuaAaaTccGauGgcGa	111	94	6409.76	38
7	18e_004	aTaaAauCcgAugGcgAa	110	93	6407.78	39
8	18e_018	CagaTaaaauCCgaTggC	113	96	6439.82	36
9	18e_019	agaTaaaauCCgaTggCg	112	95	6453.82	37
10	18e_020	gaTaaaauCCgaTggCga	111	94	6453.82	38
11	18e_021	aTaaaauCCgaTggCgaa	110	93	6437.83	39
12	18e_027	CaGauAaaaucCgaTggc	113	96	6385.78	36
13	18e_028	AgAuaAaauccGauGgcg	112	95	6383.74	37
14	18e_029	GaTaaAauccgAugGcga	111	94	6397.76	38
15	18e_030	AuAaaAuccgaTggCgaa	110	93	6395.78	39

表中之序列中大寫字母表示2'-O,4'-C-伸乙基交聯核酸，小寫字母表示2'-OMe-RNA。2'-O,4'-C-伸乙基交聯核酸之C係5-甲基胞嘧啶。開始及結束表示智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起之編號。化合物係藉由負

離子ESI質量分析進行鑑定，將實測值示於表中。

【0208】 (參考例16～20)

HO-C^{mls}-A^{mls}-G^{mls}-A^{mls}-U^{mls}-A^{mls}-A^{mls}-A^{mls}-A^{mls}-U^{mls}-C^{mls}-C^{mls}-G^{mls}-A^{mls}-U^{mls}-G^{mls}-G^{mls}-C^{mlt}-H (18m_001)(序列編號36)

與實施例70同樣地進行合成及精製，而獲得目標化合物。

【0209】 本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第96號至第113號互補之序列。

【0210】 參考例17至20之化合物亦與參考例16同樣地合成。將參考例16之資料、及參考例17至20記載於表8。

【0211】 表8

參考例	序列名稱	序列(5'-3')	開始	結束	分子量	序列編號
16	18m_001	cagauaaaauccgauggc	113	96	6283.74	36
17	18m_002	agauaaaauccgauggcg	112	95	6323.74	37
18	18m_003	gauaaaauccgauggcga	111	94	6323.75	38
19	18m_004	auaaaauccgauggcgaa	110	93	6307.75	39
20	21m_001	agcagauaaaauccgauggcg	115	95	7396.88	33

表中之序列中小寫字母表示2'-OMe-RNA。開始及結束表示智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起之編號。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定，將實測值示於表中。

【0212】 (實施例83～86)

HO-A^{mls}-A^{e2s}-U^{mls}-C^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-T^{e2s}-G^{mls}-G^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-A^{e2s}-G^{mlt}-H (15e_001)(序列編號40)

使用AKTA Oligopilot，使用Primer Support 5G Unylinker 350, 100 μmol(GE Healthcare製造)作為固相載體，與實施例1同樣地進行合成。利用25 mL之濃氨水處理具有目標序列之經保護之寡核苷酸相關物，藉此自支持體切下低聚物，並且脫去磷原子上之保護基氰基乙基與核酸鹼基上之保護基。使用phenomenex Clarity QSP 5g對低聚物之混合溶液進行脫保護、精製，將溶劑蒸餾去除後，獲得目標化合物。

【0213】 本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第92號至第106號互補之序列。

【0214】 實施例84至86之化合物亦與實施例83同樣地合成。將實施例83之資料、及實施例84至86記載於表9。

【0215】 表9

實施例	序列名稱	序列(5'-3')	開始	結束	分子量	序列編號
83	15e_001	aAucCgaTggCgaAg	106	92	5371.68	40
84	15e_002	cCgaTggCgaAgcTg	103	89	5377.68	41
85	15ed_001	aAtcCgaTggCgaAg	106	92	5099.59	40
86	15ed_002	cCgaTggCgaAgcTg	103	89	5105.60	41

表中之序列中大寫字母表示2'-O,4'-C-伸乙基交聯核酸，小寫字母表示2'-OMe-RNA，小寫字母標下劃線者表示DNA。2'-O,4'-C-伸乙基交聯核酸之C係5-甲基胞嘧啶。開始及結束表示智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起之編號。化合物係藉由負離子ESI質量分析鑑定，將實測值示於表中。

【0216】 (實施例87～90)

HO-A^{mls}-A^{e2s}-U^{mls}-C^{e2s}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{e2s}-T^{e2s}-G^{mls}-G^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-A^{e2s}-G^{mlt}-H (15e_001.1)(序列編號40)

與實施例1同樣地進行合成。但使用Primer Support 5G Unylinker 350, 10 μmol(GE Healthcare製造)作為固相載體，且使用10 μmol之程式。與實施例83同樣地進行精製，而獲得目標化合物。

【0217】 本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第92號至第106號互補之序列。

【0218】 實施例88至90之化合物亦與實施例87同樣地合成。將實施例87之資料、及實施例88至90記載於表10。

【0219】 表10

實施例	序列名稱	序列(5'-3')	開始	結束	分子量	序列編號
87	15e_001.1	aAuCCgATggCgaAg	106	92	5409.71	40
88	15e_001.2	aAucCgATggCgAAg	106	92	5395.69	40
89	15e_001.3	aAuCCgaTggCgAAg	106	92	5409.71	40
90	15e_001.4	aAuCCgATggCgAAg	106	92	5421.70	40

表中之序列中大寫字母表示2'-O,4'-C-伸乙基交聯核酸，小寫字母表示2'-OMe-RNA。2'-O,4'-C-伸乙基交聯核酸之C係5-甲基胞嘧啶。開始及結束表示智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起之編號。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定，將實測值示於表中。

【0220】 (實施例91)

HO-X-X-X-A^{p}-A^{mls}-A^{e2s}-U^{mls}-C^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-T^{e2s}-G^{mls}-G^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-A^{e2s}-G^{mlt}-H(序列編號42)

與實施例1同樣地進行合成。但使用Primer Support 5G Unylinker 350, 10 μmol(GE Healthcare製造)作為固相載體，且使用10 μmol之程式。X部分使用文獻(Bioorg. Med. Chem. (2016) 24, 26-32)所記載之GalNAc亞磷醯胺單元(phosphoramidite unit)1縮合3次。與實施例83同樣地進行精製，而獲得目標化合物。

【0221】 本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第92號至第107號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：7131.24)。

【0222】 (實施例92)

HO-X-X-X-A^{mls}-A^{e2s}-U^{mls}-C^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-T^{e2s}-G^{mls}-G^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-A^{e2s}-G^{mlt}-H(序列編號40)

與實施例91同樣地進行合成。

【0223】 本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第92號至第106號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6818.18)。

【0224】 (實施例93)

HO-X-X-X-T^{p}-C^{p}-A^{p}-A^{mls}-A^{e2s}-U^{mls}-C^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-T^{e2s}-G^{mls}-G^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-A^{e2s}-G^{mlt}-H(序列編號43)

與實施例91同樣地進行合成。

【0225】 本化合物之鹼基序列具有與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第92號至第107號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：7738.35)。

【0226】 (實施例94)

HO-X-X-X-A^{p}-A^{mls}-A^{e2s}-U^{mls}-C^{e2s}-C^{mls}-G^{e2s}-A^{mls}-T^{e2s}-G^{mls}-G^{e2s}-C^{mls}-G^{e2s}-A^{mls}-A^{e2s}-G^{mlt}-H(序列編號42)

與實施例91同樣地進行合成。

【0227】 本化合物之鹼基序列具有與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第92號至第107號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：7141.22)。

【0228】 (實施例95)

HO-X-X-X-A^{p}-A^{e2s}-A^{mls}-T^{e2s}-C^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{e2s}-U^{mls}-G^{e2s}-G^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{e2s}-A^{mls}-G^{e2t}-H(序列編號42)

與實施例91同樣地進行合成。

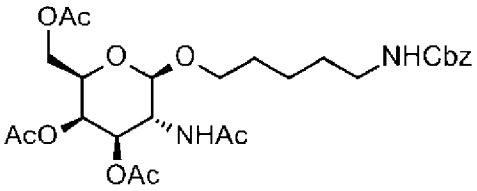
【0229】 本化合物之鹼基序列具有與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第92號至第107號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：7167.24)。

【0230】(參考例21)

(21A)

乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-3,4-二乙醯氧基-6-[5-(苄氧基羰基胺基)戊氧基]四氫吡喃-2-基]甲酯(化合物21A)之合成

[化78]



於文獻已知化合物之N-苄氧基羰基-1-羥基戊基-5-胺(J. Am. Chem. Soc., 2006, 128, 4058-4073.)(8.05 g，33.9 mmol)與文獻已知化合物之乙酸[(2R,3R,4R,5R)-5-乙醯胺-3,4,6-三乙醯氧基-四氫吡喃-2-基]甲酯(WO2011053614)(12.0 g，30.8 mmol)之二氯甲烷(200 mL)懸浮溶液中添加三氟甲磺酸(450 μL，5.23 mmol)，於45℃下整夜攪拌。反應結束後，將溶劑減壓蒸餾去除一半進行濃縮，添加至乙酸乙酯/飽和碳酸氫鈉水溶液之混合溶液中。利用飽和碳酸氫鈉水溶液、飽和食鹽水/磷酸緩衝液(pH值7.0)洗淨有機層後，利用無水硫酸鈉進行乾燥、過濾，將溶劑減壓蒸餾去除而獲得粗產物。藉由矽膠管柱層析法(己烷：乙酸乙酯＝100：0-0：100，v/v)將其進行精製，而獲得非晶狀之目標物21A(17.0 g，產率94%)。

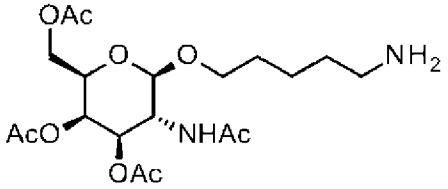
^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 7.37-7.32 (5H, m), 5.69 (1H, d, J = 9.1 Hz), 5.35 (1H, d, J = 2.4 Hz), 5.29 (1H, d, J = 11.5 Hz), 5.10 (2H, s), 4.94 (1H, br), 4.68 (1H, d, J = 7.9 Hz), 4.20-4.09 (2H, m), 3.97-3.86 (3H, m), 3.49-3.44 (1H, m), 3.20-3.17 (2H, m), 2.14 (3H, s), 2.05 (3H, s), 2.01 (3H, s), 1.93 (3H, s), 1.66-1.34 (6H, m).

$C_{27}H_{38}N_2O_{11}$: $[M+H]^+$ 計算值567，實測值567.

【0231】(21B)

乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-3,4-二乙醯氧基-6-(5-胺基戊氧基)四氫吡喃-2-基]甲酯(化合物21B)之合成

[化79]



將步驟(21A)中合成之化合物21A(17.0 g，30.0 mmol)溶解於乙醇(200 ml)中。添加10%鈀/碳(濕基)(2 g)，於氫氣環境下在室溫下遽烈攪拌。反應結束後過濾，將所獲得之通過液進行減壓蒸餾去除而獲得目標物21B(12.64 g，產率97%)之粗產物。不再進一步進行精製，用於下一反應。

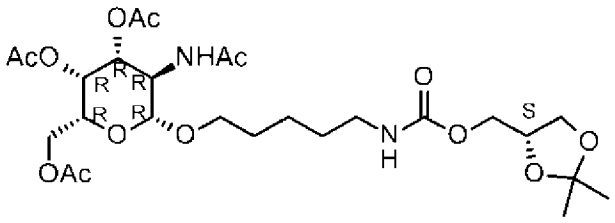
^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 5.78 (1H, d, J = 8.5 Hz), 5.36-5.32 (2H, m), 4.72 (1H, d, J = 8.5 Hz), 4.21-4.09 (2H, m), 3.96-3.88 (3H, m), 3.52-3.47 (1H, m), 2.70 (2H, t, J = 6.7 Hz), 2.15 (3H, s), 2.05 (3H, s), 2.01 (3H, s), 1.96 (3H, s), 1.75-1.36 (6H, m).

$C_{19}H_{32}N_2O_9$: $[M+H]^+$ 計算值433，實測值433.

【0232】(21C)

乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-3,4-二乙醯氧基-6-[5-[[(4S)-2,2-二甲基-1,3-二氧雜環戊烷-4-基]甲氧基羰基胺基]戊氧基]四氫吡喃-2-基]甲酯(化合物21C)之合成

[化80]



將(R)-(-)-2,2-二甲基-1,3-二氧雜環戊烷-4-甲醇(1.68 g，12.8 mmol)、三乙胺(3.22 mL，23.1 mmol)溶解於二氯甲烷(100 mL)中。添加氯甲酸4-硝基苯酯(2.56 g，12.7 mmol)，於室溫下攪拌1小時。繼而，添加三乙胺(5 mL，36 mmol)、步驟(21B)中合成之化合物21B(5.0 g，11.56 mmol)之二氯甲烷溶液(20 mL)，於45℃下攪拌1小時。反應結束後，將溶劑減壓蒸餾去除，而獲得粗產物。藉由矽膠管柱層析法(己烷：乙酸乙酯＝100：0-0：100，v/v)將其進行精製，而獲得非晶狀之目標物21C(3.46 g，產率51%)。

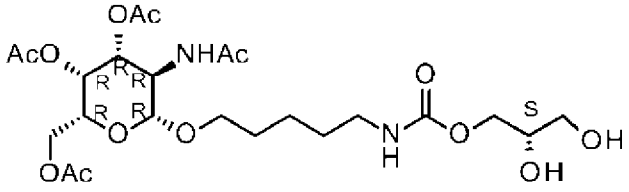
^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 5.75 (1H, d, J = 8.5 Hz), 5.36 (1H, d, J = 3.0 Hz), 5.30 (1H, dd, J = 11.2, 3.3 Hz), 4.97 (1H, br), 4.71 (1H, d, J = 8.5 Hz), 4.33-4.29 (1H, m), 4.23-3.88 (8H, m), 3.74-3.72 (1H, m), 3.49-3.46 (1H, m), 3.19-3.14 (2H, m), 2.15 (3H, s), 2.05 (3H, s), 2.01 (3H, s), 1.96 (3H, s), 1.63-1.53 (6H, m), 1.44 (3H, s), 1.37 (3H, s).

$C_{26}H_{42}N_2O_{13}$: $[M+H]^+$ 計算值591，實測值591.

【0233】(21D)

乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-3,4-二乙醯氧基-6-[5-[[(2S)-2,3-二羥基丙氧基]羰基胺基]戊氧基]四氫吡喃-2-基]甲酯(化合物21D)之合成

[化81]



於步驟(21C)中合成之化合物21C(4.38 g，7.42 mmol)中添加純水(2 mL)、三氟乙酸(6 mL)，於室溫下攪拌1.5小時。反應結束後，將溶劑減壓蒸餾去除。進而進行甲苯共沸，藉此將水去除而獲得粗產物。藉由矽膠管柱層析法(己烷：乙酸乙酯＝100：0-0：100，v/v)將其進行精製，而獲得非晶狀之目標物21D(2.47 g，產率61%)。

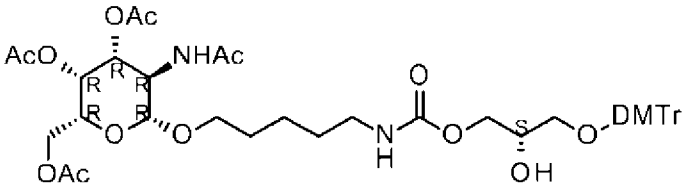
^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 5.75 (1H, d, J = 7.3 Hz), 5.35 (1H, d, J = 3.0 Hz), 5.22 (1H, dd, J = 11.5, 3.0 Hz), 5.13 (1H, br s), 4.61 (1H, d, J = 8.5 Hz), 4.23-3.87 (7H, m), 3.67-3.60 (3H, m), 3.49-3.46 (1H, m), 3.22-3.16 (2H, m), 2.16 (3H, s), 2.05 (3H, s), 2.01 (3H, s), 1.97 (3H, s), 1.61-1.50 (6H, m).

$C_{23}H_{38}N_2O_{13}$: $[M+H]^+$ 計算值551，實測值551.

【0234】(21E)

乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-3,4-二乙醯氧基-6-[5-[[(2S)-3-[雙(4-甲氧基苯基)-苯基-甲氧基]-2-羥基-丙氧基]羰基胺基]戊氧基]四氫吡喃-2-基]甲酯(化合物21E)之合成

[化82]



將步驟(21D)中合成之化合物21D(2.47 g，4.52 mmol)溶解於吡啶(15 mL)中。添加4,4'-二甲氧基三苯氯甲烷(1.82 g，5.38 mmol)，於室溫下加以攪拌。反應結束後，將溶劑減壓蒸餾去除，而獲得粗產物。藉由矽膠管柱層析法(己烷：乙酸乙酯＝100：0-0：100，v/v，其後乙酸乙酯：甲醇＝95：5，v/v)將其進行精製，而獲得非晶狀之目標物21E(1.84 g，

產率48%)。

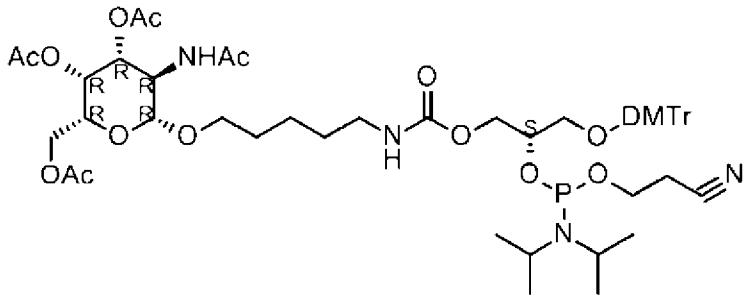
^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 7.43-7.42 (2H, m), 7.32-7.29 (6H, m), 7.24-7.19 (1H, m), 6.84-6.81 (4H, m), 5.74 (1H, d, J = 8.5 Hz), 5.35 (1H, d, J = 3.0 Hz), 5.26 (1H, dd, J = 11.2, 3.3 Hz), 4.94 (1H, br), 4.65 (1H, d, J = 8.5 Hz), 4.22-4.09 (4H, m), 3.97-3.91 (4H, m), 3.79 (6H, s), 3.47-3.43 (1H, m), 3.18-3.15 (4H, m), 3.00 (1H, d, J = 4.8 Hz), 2.14 (3H, s), 2.04 (3H, s), 1.99 (3H, s), 1.95 (3H, s), 1.65-1.34 (6H, m).

$C_{44}H_{56}N_2O_{15}$: $[M+Na]^+$ 計算值875，實測值875.

【0235】(21F)

乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-3,4-二乙醯氧基-6-[5-[[(2S)-3-[雙(4-甲氧基苯基)-苯基-甲氧基]-2-[2-氰基乙氧基-(二異丙胺基)膦基]氧基丙氧基]羰基胺基]戊氧基]四氫吡喃-2-基]甲酯(化合物21F)之合成

[化83]



將步驟(21E)中合成之化合物21E(1.84 g，2.16 mmol)添加適量之吡啶并於減壓下共沸後，溶解於二氯甲烷(21 mL)中。添加N,N-二異丙基乙基胺(2.25 mL，12.9 mmol)、2-氰基乙基二異丙基氯亞磷醯胺(0.96 mL，4.31 mmol)，於室溫下攪拌1.5小時。反應結束後，將溶劑減壓蒸餾去除。添加適量之甲苯共沸後獲得粗產物。藉由矽膠管柱層析法(己烷：乙酸乙酯＝100：0-0：100，v/v，含有1%三乙胺)將其進行精製，而獲得非

晶狀之目標物21F(1.87 g，產率82%)。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 7.46-7.40 (2H, m), 7.35-7.17 (7H, m), 6.82-6.80 (4H, m), 5.73-5.63 (1H, m), 5.37-5.35 (1H, m), 5.30-5.26 (1H, m), 4.97-4.94 (0.5H, m), 4.72-4.68 (1H, m), 4.42-4.40 (0.5H, m), 4.22-4.10 (4H, m), 3.99-3.43 (14H, m), 3.18-3.12 (4H, m), 2.67-2.62 (1H, m), 2.46-2.44 (1H, m), 2.14 (3H, s), 2.01-1.96 (9H, m), 1.65-0.97 (18H, m).

【0236】 (實施例96)

HO-X^1-X^1-X^1-A^{mls}-A^{e2s}-U^{mls}-C^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-T^{e2s}-G^{mls}-G^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-A^{e2s}-G^{mlt}-H (序列編號40)

將X之部分置換為X^1，與實施例91同樣地進行合成。X^1之部分係使用參考例21中合成之化合物21F，進行3次縮合。

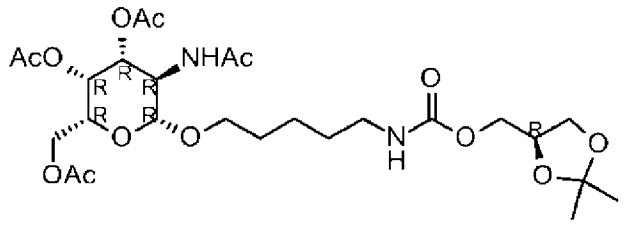
【0237】 本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第92號至第106號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6830.15)。

【0238】 (參考例22)

(22A)

乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-3,4-二乙醯氧基-6-[5-[[(4R)-2,2-二甲基-1,3-二氧雜環戊烷-4-基]甲氧基羰基胺基]戊氧基]四氫吡喃-2-基]甲酯(化合物22A)之合成

[化84]



將(S)-(+)-2,2-二甲基-1,3-二氧雜環戊烷-4-甲醇(1.68 g，2.54 mmol)、三乙胺(3.22 mL，23.1 mmol)溶解於二氯甲烷(100 mL)中。添加氯甲酸4-硝基苯酯(2.56 g，12.72 mmol)，於室溫下攪拌1小時。繼而，添加三乙胺(5 mL，36 mmol)、步驟(21B)中合成之化合物21B(5.2 g，13 mmol)，於45℃下攪拌1小時。反應結束後，將溶劑減壓蒸餾去除，而獲得粗產物。藉由矽膠管柱層析法(己烷：乙酸乙酯＝100：0-0：100，v/v)將其進行精製，而獲得非晶狀之目標物22A(3.82 g，產率54%)。

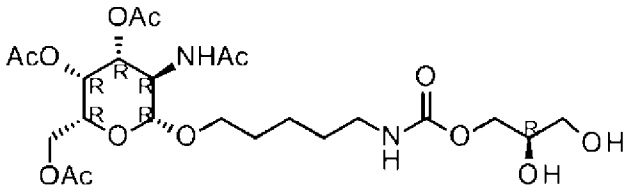
^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 5.71 (1H, d, J = 8.5 Hz), 5.36 (1H, d, J = 3.0 Hz), 5.31 (1H, dd, J = 11.2, 3.0 Hz), 4.97 (1H, br), 4.71 (1H, d, J = 8.5 Hz), 4.33-4.30 (1H, m), 4.22-3.99 (5H, m), 3.95-3.89 (3H, m), 3.74-3.71 (1H, m), 3.50-3.46 (1H, m), 3.19-3.14 (2H, m), 2.15 (3H, s), 2.05 (3H, s), 2.01 (3H, s), 1.96 (3H, s), 1.69-1.47 (6H, m), 1.44 (3H, s), 1.37 (3H, s).

$C_{26}H_{42}N_2O_{13}$: $[M+H]^+$ 計算值591，實測值591.

【0239】(22B)

乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-3,4-二乙醯氧基-6-[5-[[(2R)-2,3-二羥基丙氧基]羰基胺基]戊氧基]四氫吡喃-2-基]甲酯(化合物22B)之合成

[化85]



【0240】於步驟(22A)中合成之化合物22A(3.82 g，6.47 mmol)中添加純水(2 mL)、三氟乙酸(6 mL)，於室溫下攪拌1.5小時。反應結束後，將溶劑減壓蒸餾去除。進而進行甲苯共沸，藉此將水去除而獲得粗產物。藉由矽膠管柱層析法(己烷：乙酸乙酯＝100：0-0：100，v/v)將其進行精製，而獲得非晶狀之目標物22B(2.49 g，產率70%)。

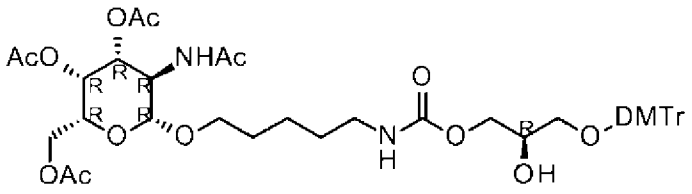
^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 5.98 (1H, d, J = 8.5 Hz), 5.37-5.20 (3H, m), 4.63 (1H, d, J = 8.5 Hz), 4.21-3.88 (7H, m), 3.69-3.57 (3H, m), 3.51-3.44 (1H, m), 3.21-3.14 (2H, m), 2.16 (3H, s), 2.05 (3H, s), 2.01 (3H, s), 1.97 (3H, s), 1.66-1.34 (6H, m).

$C_{23}H_{38}N_2O_{13}$: $[M+H]^+$ 計算值551，實測值551.

【0241】(22C)

乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-3,4-二乙醯氧基-6-[5-[[(2R)-3-[雙(4-甲氧基苯基)-苯基-甲氧基]-2-羥基-丙氧基]羰基胺基]戊氧基]四氫吡喃-2-基]甲酯(化合物22C)之合成

[化86]



將步驟(22B)中合成之化合物22B(2.49 g，4.52 mmol)溶解於吡啶(15 mL)中。添加4,4'-二甲氧基三苯氯甲烷(1.84 g，5.43 mmol)，於室溫下加

以攪拌。反應結束後，將溶劑減壓蒸餾去除，而獲得粗產物。藉由矽膠管柱層析法(己烷：乙酸乙酯＝100：0-0：100，v/v，其後乙酸乙酯：甲醇＝95：5，v/v)將其進行精製，而獲得非晶狀之目標物22C(2.1 g，產率54%)。

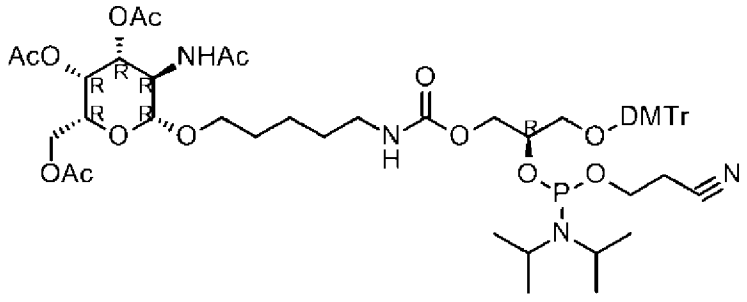
^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 7.42 (2H, d, J = 7.9 Hz), 7.32-7.16 (6H, m), 6.83 (4H, d, J = 9.1 Hz), 5.74 (1H, d, J = 8.5 Hz), 5.35 (1H, d, J = 3.0 Hz), 5.27 (1H, dd, J = 11.2, 3.0 Hz), 4.93 (1H, br), 4.66 (1H, d, J = 8.5 Hz), 4.25-4.11 (4H, m), 4.01-3.89 (4H, m), 3.79 (6H, s), 3.50-3.43 (1H, m), 3.21-3.13 (4H, m), 2.98 (1H, br), 2.13 (3H, s), 2.04 (3H, s), 1.99 (3H, s), 1.94 (3H, s), 1.65-1.34 (6H, m).

$C_{44}H_{56}N_2O_{15}$: $[M+Na]^+$ 計算值875，實測值875.

【0242】(22D)

乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-3,4-二乙醯氧基-6-[5-[[(2R)-3-[雙(4-甲氧基苯基)-苯基-甲氧基]-2-[2-氰基乙氧基-(二異丙胺基)膦基]氧基丙氧基]羰基胺基]戊氧基]四氫吡喃-2-基]甲酯(化合物22D)之合成

[化87]



將步驟(22C)中合成之化合物22C(2.10 g，2.50 mmol)添加適量之吡啶并於減壓下共沸後，溶解於二氯甲烷(20 mL)中。添加N,N-二異丙基乙基胺(2.6 mL，15 mmol)、2-氰基乙基二異丙基氯亞磷醯胺(1.L1 ml，4.9

mmol)，於室溫下攪拌1.5小時。反應結束後，將溶劑減壓蒸餾去除。添加適量之甲苯共沸後獲得粗產物。藉由矽膠管柱層析法(己烷：乙酸乙酯＝100：0-0：100，v/v，含有1%三乙胺)將其進行精製，而獲得非晶狀之目標物22D(1.63 g，產率63%)。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 7.46-7.40 (2H, m), 7.35-7.17 (7H, m), 6.85-6.78 (4H, m), 5.70-5.57 (1H, m), 5.38-5.34 (1H, m), 5.32-5.24 (1H, m), 4.96-4.91 (0.5H, m), 4.73-4.65 (1H, m), 4.44-4.38 (0.5H, m), 4.23-4.08 (4H, m), 4.00-3.41 (14H, m), 3.27-3.03 (4H, m), 2.68-2.60 (1H, m), 2.49-2.42 (1H, m), 2.14 (3H, s), 2.07-1.91 (9H, m), 1.65-0.97 (18H, m).

【0243】 (實施例97)

HO-X^2-X^2-X^2-A^{m1s}-A^{e2s}-U^{m1s}-C^{m1s}-C^{e2s}-G^{m1s}-A^{m1s}-T^{e2s}-G^{m1s}-G^{m1s}-C^{e2s}-G^{m1s}-A^{m1s}-A^{e2s}-G^{m1t}-H (序列編號40)

將X之部分置換為X^2，與實施例91同樣地進行合成。X^2之部分係使用參考例22中合成之化合物22D，進行3次縮合。

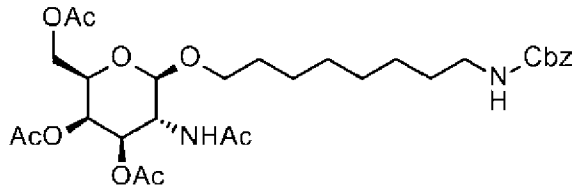
【0244】 本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第92號至第106號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6830.14)。

【0245】 (參考例23)

(23A)

乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-3,4-二乙醯氧基-6-[8-(苄氧基羰基胺基)辛氧基]四氫吡喃-2-基]甲酯(化合物23A)之合成

[化88]



於文獻已知化合物之N-(8-羥基辛基)胺基甲酸苄酯(J. Med. Chem, 1993, 36, 3721-3726.)(6.5 g，23 mmol)與文獻已知化合物之乙酸[(2R,3R,4R,5R)-5-乙醯胺-3,4,6-三氧基-四氫吡喃-2-基]甲酯(WO2011053614)(8.2 g，21 mmol)之二氯甲烷(150 mL)懸浮溶液中添加三氟甲磺酸(310 μL，3.6 mmol)，於45℃下整夜攪拌。反應結束後，將溶劑減壓蒸餾去除一半進行濃縮，添加至乙酸乙酯/飽和碳酸氫鈉水溶液之混合溶液中。利用飽和碳酸氫鈉水溶液、飽和食鹽水/磷酸緩衝液(pH值7.0)洗淨有機層後，利用無水硫酸鈉進行乾燥、過濾，將溶劑減壓蒸餾去除而獲得粗產物。藉由矽膠管柱層析法(己烷：乙酸乙酯＝100：0-0：100，v/v)將其進行精製，而獲得非晶狀之目標物23A(12.68 g，產率99%)。

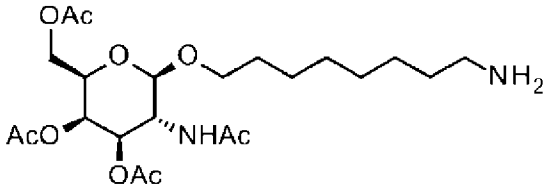
^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 7.39-7.29 (5H, m), 5.65 (1H, d, J = 8.5 Hz), 5.35 (1H, d, J = 3.0 Hz), 5.29 (1H, dd, J = 11.5, 3.0 Hz), 5.10 (2H, s), 4.83 (1H, br), 4.68 (1H, d, J = 7.9 Hz), 4.20-4.09 (2H, m), 3.99-3.85 (3H, m), 3.50-3.42 (1H, m), 3.22-3.15 (2H, m), 2.14 (3H, s), 2.05 (3H, s), 2.00 (3H, s), 1.95 (3H, s), 1.62-1.27 (12H, m).

$C_{30}H_{44}N_2O_{11}$: $[M+H]^+$ 計算值609，實測值609.

【0246】(23B)

乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-3,4-二乙醯氧基-6-(8-胺基辛氧基)四氫吡喃-2-基]甲酯(化合物23B)之合成

[化89]



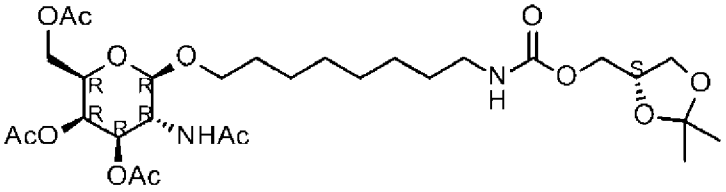
將步驟(23A)中合成之化合物23A(12.68 g，20.83 mmol)溶解於乙醇(200 mL)中。添加10%鈀/碳(濕基)(2 g)，於氫氣環境下在室溫下遽烈攪拌。反應結束後過濾，將所獲得之通過液進行減壓蒸餾去除而獲得目標物23B(10.1 g)之粗產物。不再進一步進行精製，用於下一反應。

$C_{22}H_{38}N_2O_9$: $[M+H]^+$ 計算值475，實測值475.

【0247】(23C)

乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-3,4-二乙醯氧基-6-[8-[[(4S)-2,2-二甲基-1,3-二氧雜環戊烷-4-基]甲氧基羰基胺基]辛氧基]四氫吡喃-2-基]甲酯(化合物23C)之合成

[化90]



將(R)-(-)-2,2-二甲基-1,3-二氧雜環戊烷-4-甲醇(1.6 g，12 mmol)、三乙胺(3.1 mL，22 mmol)溶解於二氯乙烷(30 mL)中。添加氯甲酸4-硝基苯酯(2.2 g，12 mmol)，於室溫下攪拌1.5小時。繼而，添加三乙胺(4.5 mL，32 mmol)、步驟(23B)中合成之化合物23B(5.1 g，11 mmol)，於45℃下攪拌4小時。反應結束後，將溶劑減壓蒸餾去除，而獲得粗產物。藉由矽膠管柱層析法(己烷：乙酸乙酯＝100：0-0：100，v/v)將其進行精製，而獲得非晶狀之目標物23C(2.45 g，產率36%)。

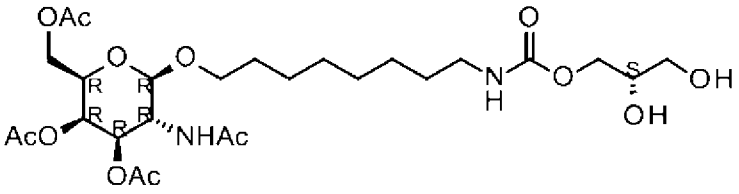
^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 5.64 (1H, d, J = 7.9 Hz), 5.36 (1H, d, J = 3.0 Hz), 5.29 (1H, dd, J = 11.2, 3.0 Hz), 4.85 (1H, br), 4.69 (1H, d, J = 7.9 Hz), 4.35-3.86 (9H, m), 3.76-3.70 (1H, m), 3.50-3.43 (1H, m), 3.20-3.12 (2H, m), 2.14 (3H, s), 2.05 (3H, s), 2.01 (3H, s), 1.96 (3H, s), 1.65-1.28 (12H, m), 1.44 (3H, s), 1.37 (3H, s).

$C_{29}H_{48}N_2O_{13}$: $[M+H]^+$ 計算值633，實測值633.

【0248】(23D)

乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-3,4-二乙醯氧基-6-[8-[[(2S)-2,3-二羥基丙氧基]羰基胺基]辛氧基]四氫吡喃-2-基]甲酯(化合物23D)之合成

[化91]



於步驟(23C)中合成之化合物23C(2.45 g，3.87 mmol)中添加純水(2 mL)、三氟乙酸(6 mL)，於室溫下攪拌1.5小時。反應結束後，將溶劑減壓蒸餾去除。進而進行甲苯共沸，藉此將水去除而獲得粗產物。藉由矽膠管柱層析法(己烷：乙酸乙酯＝100：0-0：100，v/v)將其進行精製，而獲得非晶狀之目標物23D(1.18 g，產率51%)。

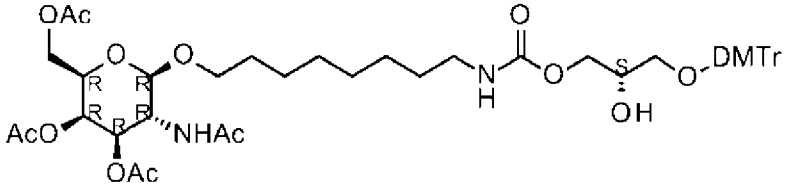
^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 5.87 (1H, d, J = 7.9 Hz), 5.35 (1H, d, J = 3.0 Hz), 5.27 (1H, dd, J = 11.2, 3.0 Hz), 5.07 (1H, br), 4.66 (1H, d, J = 8.5 Hz), 4.27-3.86 (7H, m), 3.70-3.57 (2H, m), 3.50-3.43 (2H, m), 3.24-3.13 (2H, m), 2.15 (3H, s), 2.05 (3H, s), 2.01 (3H, s), 1.96 (3H, s), 1.67-1.24 (12H, m).

$C_{26}H_{44}N_2O_{13}$: $[M+H]^+$ 計算值593，實測值593.

【0249】(23E)

乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-3,4-二乙醯氧基-6-[8-[[(2S)-3-[雙(4-甲氧基苯基)-苯基-甲氧基]-2-羥基-丙氧基]羰基胺基]辛氧基]四氫吡喃-2-基]甲酯(化合物23E)之合成

[化92]



將步驟(23D)中合成之化合物23D(1.18 g，1.99 mmol)溶解於吡啶(20 mL)中。添加4,4'-二甲氧基三苯氯甲烷(0.81 g，2.39 mmol)，於室溫下加以攪拌。反應結束後，將溶劑減壓蒸餾去除。添加適量之甲苯而共沸後，獲得粗產物。藉由矽膠管柱層析法(己烷：乙酸乙酯＝100：0-0：100，v/v，其後乙酸乙酯：甲醇＝95：5，v/v)將其進行精製，而獲得非晶狀之目標物23E(0.6 g，產率34%)。

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

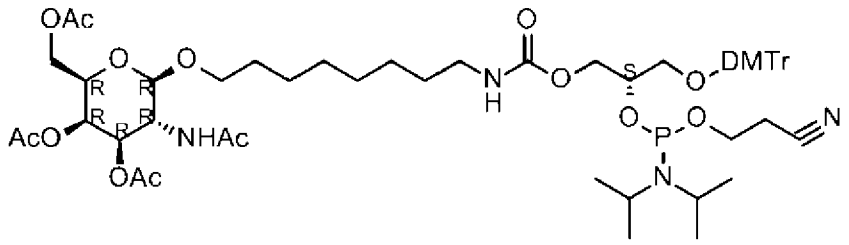
$C_{47}H_{62}N_2O_{15}$: $[M+Na]^+$ 計算值917，實測值917.

【0250】(23F)

乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-3,4-二乙醯氧基-6-[8-[[(2S)-3-[雙(4-甲氧基苯基)-苯基-甲氧基]-2-[2-氰基乙氧基-(二異丙胺基)膦基]氧基丙

氧基]羰基胺基]辛氧基]四氫吡喃-2-基]甲酯(化合物23F)之合成

[化93]



將步驟(23E)中合成之化合物23E(0.60 g，0.67 mmol)添加適量之吡啶并於減壓下共沸後，溶解於二氯乙烷(5 mL)中。添加N,N-二異丙基乙基胺(0.70 ml，4.0 mmol)、2-氰基乙基二異丙基氯亞磷醯胺(0.30 mL，1.3 mmol)，於室溫下攪拌1.5小時。反應結束後，將溶劑減壓蒸餾去除。添加適量之甲苯共沸後獲得粗產物。藉由矽膠管柱層析法(己烷：乙酸乙酯＝100：0-0：100，v/v，含有1%三乙胺)將其進行精製，而獲得非晶狀之目標物23F(0.51 g，產率69%)。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 7.46-7.40 (2H, m), 7.34-7.17 (7H, m), 6.84-6.78 (4H, m), 5.56-5.48 (1H, m), 5.37-5.34 (1H, m), 5.32-5.28 (1H, m), 4.87-4.80 (0.5H, m), 4.73-4.68 (1H, m), 4.43-4.37 (0.5H, m), 4.23-4.08 (4H, m), 3.97-3.43 (14H, m), 3.26-3.06 (4H, m), 2.66-2.61 (1H, m), 2.47-2.41 (1H, m), 2.14 (3H, s), 2.06-1.93 (9H, m), 1.64-1.23 (12H, m), 1.21-0.98 (12H, m).

【0251】(實施例98)

HO-X^3-X^3-X^3-A^{mls}-A^{e2s}-U^{mls}-C^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-T^{e2s}-G^{mls}-G^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-A^{e2s}-G^{mlt}-H (序列編號40)

將X之部分置換為X^3，與實施例91同樣地進行合成。X^3之部分係使用參考例23中合成之化合物23F，進行3次縮合。

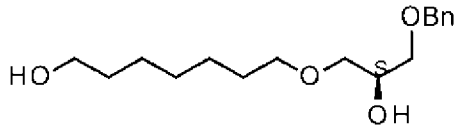
【0252】 本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第92號至第106號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6957.27)。

【0253】 (參考例24)

(24A)

7-[(2S)-3-苄氧基-2-羥基丙氧基]庚烷-1-醇(化合物24A)之合成

[化94]



將苄基(S)-(+)-縮水甘油醚(5.0 g，30 mmol)溶解於二氯甲烷(150 mL)中。添加1,7-庚二醇(6.0 g，45 mmol)、三氟化硼-二乙醚錯合物(0.76 mL，6.1 mmol)，於室溫下攪拌2天。將反應溶液添加至乙酸乙酯/飽和碳酸氫鈉水溶液之混合溶液中，利用乙酸乙酯進行萃取。利用飽和食鹽水/飽和碳酸氫鈉水溶液洗淨有機層後，利用無水硫酸鈉進行乾燥、過濾，將溶劑減壓蒸餾去除而獲得粗產物。藉由矽膠管柱層析法(己烷：乙酸乙酯＝50：50，v/v)將其進行精製，而獲得無色油狀之目標物24A(3.3 g，產率37%)。

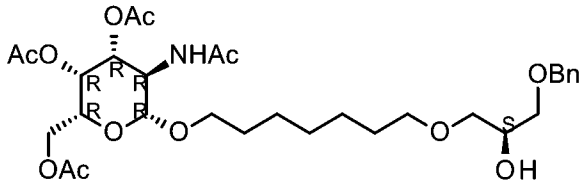
^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 7.39-7.28 (5H, m), 4.57 (2H, s), 4.02-3.96 (1H, m), 3.67-3.61 (2H, m), 3.59-3.43 (6H, m), 2.48 (1H, d, J = 4.2 Hz), 1.61-1.52 (4H, m), 1.37-1.30 (6H, m).

$C_{17}H_{28}O_4$: $[M+Na]^+$ 計算值319，實測值319.

【0254】 (24B)

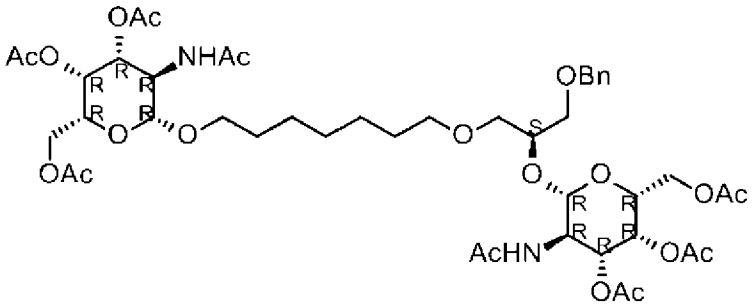
乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-3,4-二乙醯氧基-6-[7-[(2S)-3-苄氧基-2-羥基-丙氧基]庚氧基]四氫吡喃-2-基]甲酯(化合物24B-1)之合成

[化95]



及乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-6-[7-[(2S)-2-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙醯胺-4,5-二乙醯氧基-6-(乙醯氧基甲基)四氫吡喃-2-基]氧基-3-苄氧基-丙氧基]庚氧基]-3,4-二乙醯氧基四氫吡喃-2-基]甲酯(化合物24B-2)之合成

[化96]



【0255】 向步驟(24A)中合成之化合物15A(3.3 g，11 mmol)與文獻已知化合物之乙酸[(2R,3R,4R,5R)-5-乙醯胺-3,4,6-三乙醯氧基-四氫吡喃-2-基]甲酯(WO2011053614)(4.0 g，10 mmol)之二氯甲烷(200 mL)懸浮溶液中添加三氟甲磺酸(0.15 mL，1.7 mmol)，於45℃下攪拌3天。反應結束後，將溶劑減壓蒸餾去除一半進行濃縮，添加至乙酸乙酯/飽和碳酸氫鈉水溶液之混合溶液中，利用乙酸乙酯進行萃取。利用飽和碳酸氫鈉水溶液、飽和食鹽水/磷酸緩衝液(pH值7.0)洗淨有機層後，利用無水硫酸鈉進行乾燥、過濾，將溶劑減壓蒸餾去除而獲得粗產物。藉由矽膠管柱層析法

(己烷：乙酸乙酯＝100：0-0：100，v/v)將其進行精製，而獲得非晶狀之目標物24B-1(4.5 g，產率70%)及24B-2(1.9 g，產率20%)。

(化合物24B-1)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 7.39-7.28 (5H, m), 5.51 (1H, d, J = 8.5 Hz), 5.37-5.29 (2H, m), 4.71 (1H, d, J = 8.5 Hz), 4.56 (2H, s), 4.20-4.09 (2H, m), 4.03-3.85 (4H, m), 3.58-3.41 (7H, m), 2.58 (1H, d, J = 4.2 Hz), 2.14 (3H, s), 2.05 (3H, s), 2.00 (3H, s), 1.95 (3H, s), 1.63-1.52 (4H, m), 1.36-1.29 (6H, m).

$C_{31}H_{47}NO_{12}$: $[M+H]^+$ 計算值626，實測值626.

(化合物24B-2)

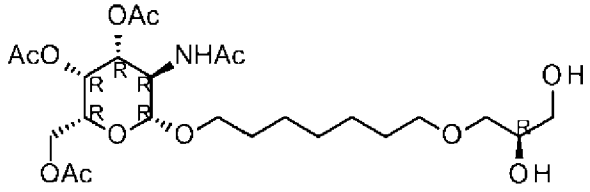
^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 7.41-7.28 (5H, m), 5.65 (1H, d, J = 8.5 Hz), 5.48 (1H, d, J = 8.5 Hz), 5.42-5.23 (4H, m), 4.84 (1H, d, J = 8.5 Hz), 4.72 (1H, d, J = 8.5 Hz), 4.59-4.49 (2H, m), 4.20-3.38 (17H, m), 2.19-1.92 (24H, m), 1.61-1.47 (4H, m), 1.38-1.26 (6H, m).

$C_{45}H_{66}N_2O_{20}$: $[M+H]^+$ 計算值955，實測值955.

【0256】(24C)

乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-3,4-二乙醯氧基-6-[7-[(2R)-2,3-二羥基丙氧基]庚氧基]四氫吡喃-2-基]甲酯(化合物24C)之合成

[化97]



將步驟(24B)中合成之化合物24B-1(4.5 g，7.2 mmol)溶解於乙醇(100 mL)中。添加10%鈀/碳(濕基)(2.0 g)，於氫氣環境下在室溫下遽烈攪

拌5小時。反應結束後過濾，將所獲得之通過液進行減壓蒸餾去除。添加適量之甲苯而共沸後，添加適量之吡啶進行共沸，而獲得目標物24C之粗產物。不再進一步進行精製，用於下一反應。

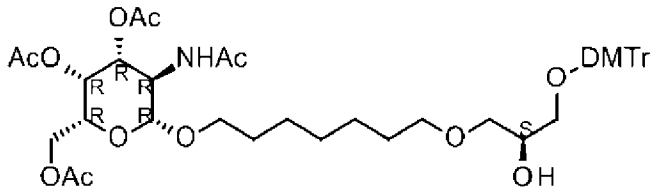
^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 5.55 (1H, d, J = 9.1 Hz), 5.37-5.27 (2H, m), 4.69 (1H, d, J = 8.5 Hz), 4.21-4.09 (2H, m), 3.99-3.42 (11H, m), 2.69 (1H, d, J = 5.4 Hz), 2.15 (3H, s), 2.05 (3H, s), 2.01 (3H, s), 1.96 (3H, s), 1.65-1.52 (4H, m), 1.40-1.29 (6H, m).

$C_{24}H_{41}NO_{12}$: $[M+H]^+$ 計算值536，實測值536.

【0257】(24D)

乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-3,4-二乙醯氧基-6-[7-[(2S)-3-[雙(4-甲氧基苯基)-苯基-甲氧基]-2-羥基-丙氧基]庚氧基]四氫吡喃-2-基]甲酯(化合物24D)之合成

[化98]



將步驟(24C)中合成之化合物24C之粗產物溶解於吡啶(30 mL)中。添加4,4'-二甲氧基三苯氯甲烷(2.7 g，7.9 mmol)，於室溫下攪拌13小時。反應結束後，將溶劑減壓蒸餾去除。添加甲苯而共沸後，獲得粗產物。藉由矽膠管柱層析法(己烷：乙酸乙酯＝50：50-0：100，v/v，含有1%三乙胺)將其進行精製，而獲得非晶狀之目標物24D(3.0 g，產率2步49%)。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 7.45-7.41 (2H, m), 7.34-7.20 (7H, m), 6.85-6.80 (4H, m), 5.50 (1H, d, J = 8.5 Hz), 5.37-5.29 (2H, m), 4.71 (1H, d, J = 8.5 Hz), 4.20-4.09 (2H, m), 3.98-3.85 (4H, m), 3.79 (6H, s), 3.55-3.40

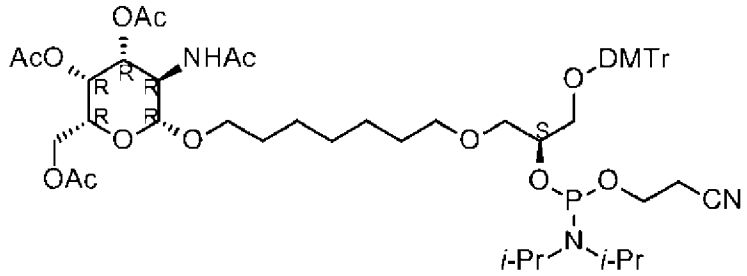
(5H, m), 3.22-3.13 (2H, m), 2.51 (1H, d, J = 4.2 Hz), 2.14 (3H, s), 2.05 (3H, s), 2.00 (3H, s), 1.93 (3H, s), 1.60-1.52 (4H, m), 1.35-1.27 (6H, m).

$C_{45}H_{59}NO_{14}$: $[M+Na]^+$ 計算值860，實測值860.

【0258】 (24E)

乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-3,4-二乙醯氧基-6-[7-[(2S)-3-[雙(4-甲氧基苯基)-苯基-甲氧基]-2-[2-氰基乙基-(二異丙胺基)膦基]氧基丙氧基]庚氧基]四氫吡喃-2-基]甲酯(化合物24E)之合成

[化99]



【0259】 將步驟(24D)中合成之化合物24D(3.0 g，3.6 mmol)藉由適量之吡啶共沸後，溶解於二氯甲烷(50 mL)中。添加N,N-二異丙基乙基胺(2.5 mL，14 mmol)、2-氰基乙基二異丙基氯亞磷醯胺(0.88 mL，3.9 mmol)，於室溫下攪拌1.5小時。反應結束後，將溶劑減壓蒸餾去除，而獲得粗產物。藉由矽膠管柱層析法(己烷：乙酸乙酯＝50：50-0：100，v/v，含有1%三乙胺)將其進行精製，而獲得非晶狀之目標物24E(3.0 g，產率82%)。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 7.48-7.41 (2H, m), 7.36-7.15 (7H, m), 6.85-6.77 (4H, m), 5.59-5.41 (1H, m), 5.38-5.26 (2H, m), 4.75-4.68 (1H, m), 4.20-4.07 (2H, m), 3.97-3.06 (21H, m), 2.67-2.40 (2H, m), 2.14 (3H, s), 2.04 (3H, s), 2.00 (3H, s), 1.92 (3H, s), 1.64-1.46 (4H, m), 1.37-1.22 (6H, m), 1.22-0.97 (12H, m).

【0260】 (實施例99)

HO-X^4-X^4-X^4-A^{mls}-A^{e2s}-U^{mls}-C^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-T^{e2s}-G^{mls}-G^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-A^{e2s}-G^{mlt}-H (序列編號40)

將X之部分置換為X^4，與實施例91同樣地進行合成。X^4之部分係使用參考例24中合成之化合物24E，進行3次縮合。

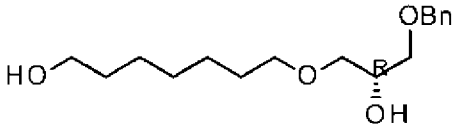
【0261】 本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第92號至第106號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6785.22)

【0262】 (參考例25)

(25A)

7-[(2R)-3-苄氧基-2-羥基丙氧基]庚烷-1-醇(化合物25A)之合成

[化100]



將苄基(R)-(-)-縮水甘油醚(5.0 g，30 mmol)溶解於二氯甲烷(150 mL)中。添加1,7-庚二醇(6.0 g，45 mmol)、三氟化硼-二乙醚錯合物(0.76 mL，6.1 mmol)，於室溫下攪拌2天。將反應溶液添加至乙酸乙酯/飽和碳酸氫鈉水溶液之混合溶液中，利用乙酸乙酯進行萃取。利用飽和食鹽水/飽和碳酸氫鈉水溶液洗淨有機層後，利用無水硫酸鈉進行乾燥、過濾，將溶劑減壓蒸餾去除而獲得粗產物。藉由矽膠管柱層析法(己烷：乙酸乙酯＝50：50，v/v)將其進行精製，而獲得無色油狀之目標物25A(4.0 g，產

率44%)。

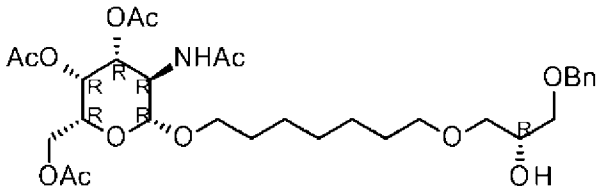
^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 7.39-7.27 (5H, m), 4.56 (2H, s), 4.04-3.94 (1H, m), 3.67-3.59 (2H, m), 3.58-3.40 (6H, m), 2.51 (1H, d, J = 4.2 Hz), 1.63-1.49 (4H, m), 1.41-1.30 (6H, m).

$C_{17}H_{28}O_4$: $[M+Na]^+$ 計算值319，實測值319.

【0263】(25B)

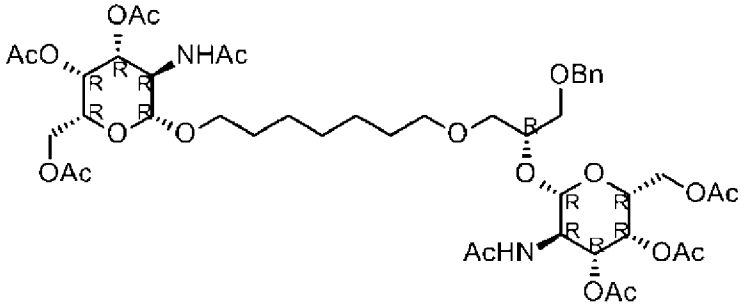
乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-3,4-二乙醯氧基-6-[7-[(2R)-3-苄氧基-2-羥基-丙氧基]庚氧基]四氫吡喃-2-基]甲酯(化合物25B-1)之合成

[化101]



乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-6-[7-[(2R)-2-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙醯胺-4,5-二乙醯氧基-6-(乙醯氧基甲基)四氫吡喃-2-基]氧基-3-苄氧基-丙氧基]庚氧基]-3,4-二乙醯氧基四氫吡喃-2-基]甲酯(化合物25B-2)之合成

[化102]



【0264】於步驟(25A)中合成之化合物25A(4.0 g，14 mmol)與文獻已知化合物之乙酸[(2R,3R,4R,5R)-5-乙醯胺-3,4,6-三乙醯氧基-四氫吡喃-2-基]甲酯(WO2011053614)(4.8 g，12 mmol)之二氯甲烷(200 mL)懸浮溶

液中添加三氟甲磺酸(0.18 mL，2.1 mmol)，於45℃下攪拌3天。反應結束後，將溶劑減壓蒸餾去除一半進行濃縮，添加至乙酸乙酯/飽和碳酸氫鈉水溶液之混合溶液中，利用乙酸乙酯進行萃取。利用飽和碳酸氫鈉水溶液、飽和食鹽水/磷酸緩衝液(pH值7.0)洗淨有機層後，利用無水硫酸鈉進行乾燥、過濾，將溶劑減壓蒸餾去除而獲得粗產物。藉由矽膠管柱層析法(己烷：乙酸乙酯＝100：0-0：100，v/v)將其進行精製，而獲得非晶狀之目標物25B-1(4.8 g，產率62%)及25B-2(1.9 g，產率16%)。

(化合物25B-1)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 7.39-7.27 (5H, m), 5.50 (1H, d, J = 9.1 Hz), 5.37-5.28 (2H, m), 4.70 (1H, d, J = 8.5 Hz), 4.57 (2H, s), 4.20-4.08 (2H, m), 4.03-3.85 (4H, m), 3.58-3.42 (7H, m), 2.58 (1H, d, J = 4.2 Hz), 2.14 (3H, s), 2.05 (3H, s), 2.00 (3H, s), 1.95 (3H, s), 1.64-1.50 (4H, m), 1.38-1.29 (6H, m).

$C_{31}H_{47}NO_{12}$: $[M+H]^+$ 計算值626，實測值626.

(化合物25B-2)

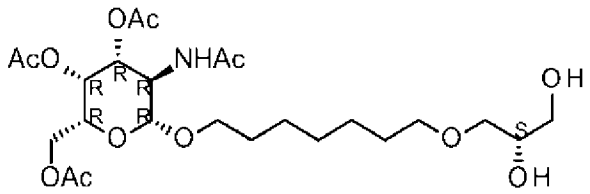
^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 7.39-7.28 (5H, m), 5.85-5.21 (6H, m), 4.90-4.73 (2H, m), 4.53 (2H, s), 4.22-3.38 (17H, m), 2.20-1.91 (24H, m), 1.63-1.51 (4H, m), 1.41-1.30 (6H, m).

$C_{45}H_{66}N_2O_{20}$: $[M+H]^+$ 計算值955，實測值955.

【0265】(25C)

乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-3,4-二乙醯氧基-6-[7-[(2S)-2,3-二羥基丙氧基]庚氧基]四氫吡喃-2-基]甲酯(化合物25C)之合成

[化103]



將步驟(25B)中合成之化合物25B-1(4.8 g，7.7 mmol)溶解於乙醇(100 mL)中。添加10%鈀/碳(濕基)(2.0 g)，於氫氣環境下在室溫下遽烈攪拌5小時。反應結束後過濾，將所獲得之通過液進行減壓蒸餾去除。添加適量之甲苯而共沸後，添加適量之吡啶進行共沸，而獲得目標物25C之粗產物。不再進一步進行精製，用於下一反應。

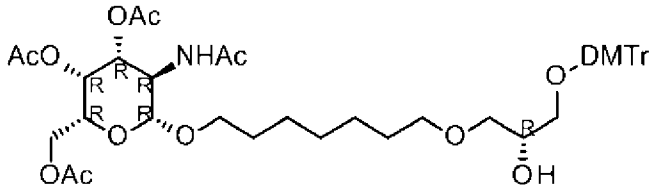
^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 5.62 (1H, d, J = 8.5 Hz), 5.38-5.26 (2H, m), 4.69 (1H, d, J = 8.5 Hz), 4.21-4.09 (2H, m), 4.00-3.43 (11H, m), 2.74 (1H, br s), 2.15 (3H, s), 2.05 (3H, s), 2.01 (3H, s), 1.96 (3H, s), 1.68-1.50 (4H, m), 1.41-1.29 (6H, m).

$C_{24}H_{41}NO_{12}$: $[M+H]^+$ 計算值536，實測值536.

【0266】(25D)

乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-3,4-二乙醯氧基-6-[7-[(2R)-3-[雙(4-甲氧基苯基)-苯基-甲氧基]-2-羥基-丙氧基]庚氧基]四氫吡喃-2-基]甲酯(化合物25D)之合成

[化104]



將步驟(25C)中合成之化合物25C之粗產物溶解於吡啶(30 mL)中。添加4,4'-二甲氧基三苯氯甲烷(2.7 g，8.0 mmol)，於室溫下攪拌1.5小時。

反應結束後，將溶劑減壓蒸餾去除。添加甲苯而共沸後，獲得粗產物。藉由矽膠管柱層析法(己烷：乙酸乙酯＝50：50-0：100，v/v，含有1%三乙胺)將其進行精製，而獲得非晶狀之目標物25D(4.5 g，產率2步70%)。

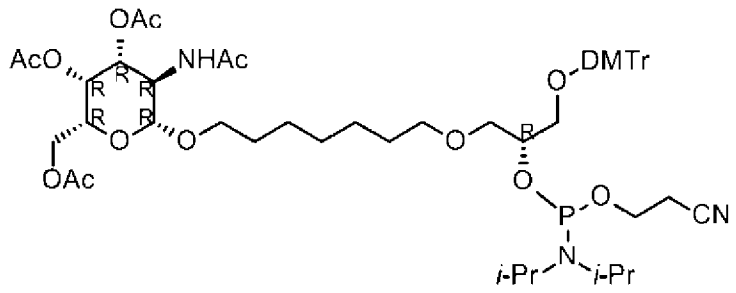
^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 7.46-7.40 (2H, m), 7.34-7.18 (7H, m), 6.86-6.79 (4H, m), 5.50 (1H, d, J = 8.5 Hz), 5.37-5.28 (2H, m), 4.70 (1H, d, J = 8.5 Hz), 4.20-4.08 (2H, m), 3.98-3.84 (4H, m), 3.79 (6H, s), 3.55-3.39 (5H, m), 3.21-3.14 (2H, m),2.51 (1H, d, J = 4.2 Hz), 2.14 (3H, s), 2.04 (3H, s), 2.00 (3H, s), 1.94 (3H, s), 1.65-1.47 (4H, m), 1.36-1.27 (6H, m).

$C_{45}H_{59}NO_{14}$: $[M+Na]^+$ 計算值860，實測值860.

【0267】(25E)

乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-3,4-二乙醯氧基-6-[7-[(2R)-3-[雙(4-甲氧基苯基)-苯基-甲氧基]-2-[2-氰基乙基-(二異丙胺基)膦基]氧基丙氧基]庚氧基]四氫吡喃-2-基]甲酯(化合物25E)之合成

[化105]



將步驟(25D)中合成之化合物25D(4.5 g，5.4 mmol)藉由適量之吡啶共沸後，溶解於二氯甲烷(50 mL)中。添加N,N-二異丙基乙基胺(3.7 mL，21 mmol)、2-氰基乙基二異丙基氯亞磷醯胺(1.3 ml，5.9 mmol)，於室溫下攪拌1小時。反應結束後，將溶劑減壓蒸餾去除。添加適量之甲苯共沸後獲得粗產物。藉由矽膠管柱層析法(己烷：乙酸乙酯＝50：50-

0：100，v/v，含有1%三乙胺)將其進行精製，而獲得非晶狀之目標物25E(4.5 g，產率81%)。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 7.48-7.40 (2H, m), 7.36-7.16 (7H, m), 6.84-6.77 (4H, m), 5.58-5.42 (1H, m), 5.37-5.27 (2H, m), 4.74-4.68 (1H, m), 4.20-4.07 (2H, m), 3.97-3.06 (21H, m), 2.67-2.39 (2H, m), 2.14 (3H, s), 2.05 (3H, s), 2.00 (3H, s), 1.92 (3H, s), 1.63-1.45 (4H, m), 1.36-1.23 (6H, m), 1.21-0.98 (12H, m).

【0268】 (實施例100)

HO-X^5-X^5-X^5-A^{mls}-A^{e2s}-U^{mls}-C^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-T^{e2s}-G^{mls}-G^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-A^{e2s}-G^{mlt}-H (序列編號40)

將X之部分置換為X^5，與實施例91同樣地進行合成。X^5之部分係使用參考例16中合成之化合物25E，進行3次縮合。

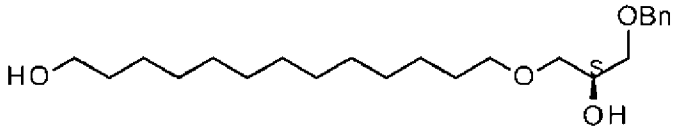
【0269】 本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第92號至第106號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6785.21)。

【0270】 (參考例26)

(26A)

13-[(2S)-3-苄氧基-2-羥基丙氧基]十三烷-1-醇(化合物26A)之合成

[化106]



將苄基(S)-(+)-縮水甘油醚(4.0 g，24 mmol)溶解於二氯甲烷(150 mL)中。添加十三烷-1,13-二醇(7.6 g，35 mmol)、三氟化硼-二乙醚錯合物(0.61 mL，4.9 mmol)，於室溫下攪拌2天。將反應溶液添加至乙酸乙酯/飽和碳酸氫鈉水溶液之混合溶液中，利用乙酸乙酯進行萃取。利用飽和食鹽水/飽和碳酸氫鈉水溶液洗淨有機層後，利用無水硫酸鈉進行乾燥、過濾，將溶劑減壓蒸餾去除而獲得粗產物。藉由矽膠管柱層析法(己烷：乙酸乙酯＝50：50，v/v)將其進行精製，而獲得無色油狀之目標物26A(3.8 g，產率41%)。

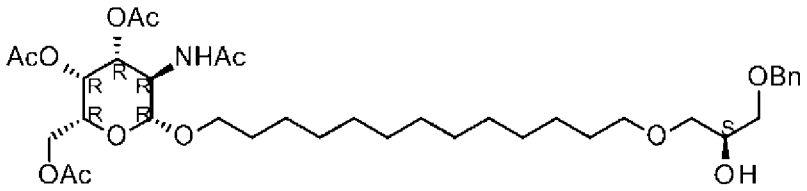
^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 7.38-7.27 (5H, m), 4.56 (2H, s), 4.02-3.94 (1H, m), 3.69-3.39 (8H, m), 2.49 (1H, d, J = 4.2 Hz), 1.61-1.50 (4H, m), 1.39-1.21 (18H, m).

$C_{23}H_{40}O_4$: $[M+H]^+$ 計算值381，實測值381.

【0271】(26B)

乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-3,4-二乙醯氧基-6-[13-[(2S)-3-苄氧基-2-羥基-丙氧基]十三烷氧基]四氫吡喃-2-基]甲酯(化合物26B)之合成

[化107]



於步驟(26A)中合成之化合物26A(3.8 g，9.9 mmol)與文獻已知化合物之乙酸[(2R,3R,4R,5R)-5-乙醯胺-3,4,6-三乙醯氧基-四氫吡喃-2-基]甲酯(WO2011053614)(3.5 g，9.0 mmol)之二氯甲烷(60 mL)懸浮溶液中添加三氟甲磺酸(0.13 mL，1.5 mmol)，於45℃下攪拌17小時。反應結束後，將溶劑減壓蒸餾去除一半進行濃縮，添加至乙酸乙酯/飽和碳酸氫鈉

水溶液之混合溶液中，利用乙酸乙酯進行萃取。利用飽和碳酸氫鈉水溶液、飽和食鹽水/磷酸緩衝液(pH值7.0)洗淨有機層後，利用無水硫酸鈉進行乾燥、過濾，將溶劑減壓蒸餾去除而獲得粗產物。藉由矽膠管柱層析法(己烷：乙酸乙酯＝100：0-0：100，v/v)將其進行精製，而獲得非晶狀之目標物26B(3.7 g，產率58%)。

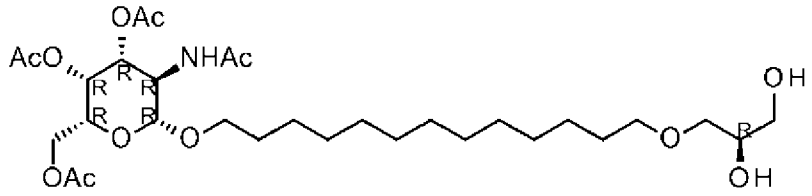
^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 7.38-7.27 (5H, m), 5.39-5.30 (3H, m), 4.72 (1H, d, J = 8.5 Hz), 4.57 (2H, s), 4.20-4.09 (2H, m), 4.02-3.85 (4H, m), 3.58-3.40 (7H, m), 2.48 (1H, d, J = 4.2 Hz), 2.14 (3H, s), 2.05 (3H, s), 2.01 (3H, s), 1.96 (3H, s), 1.63-1.51 (4H, m), 1.37-1.21 (18H, m).

$C_{37}H_{59}NO_{12}$: $[M+H]^+$ 計算值710，實測值710.

【0272】(26C)

乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-3,4-二乙醯氧基-6-[13-[(2R)-2,3-二羥基丙氧基]十三烷氧基]四氫吡喃-2-基]甲酯(化合物26C)之合成

[化108]



將步驟(26B)中合成之化合物26B(3.7 g，5.2 mmol)溶解於乙醇(100 mL)中。添加10%鈀/碳(濕基)(2.0 g)，於氫氣環境下在室溫下遽烈攪拌5小時。反應結束後過濾，將所獲得之通過液進行減壓蒸餾去除，而獲得粗產物。藉由矽膠管柱層析法(乙酸乙酯：甲醇＝100：0-90：10，v/v)將其進行精製，而獲得無色油狀之目標物26C(1.4 g，產率43%)。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 5.42-5.29 (3H, m), 4.57 (1H, d, J = 8.5 Hz), 4.21-4.09 (2H, m), 3.95-3.44 (11H, m), 2.60 (1H, d, J = 4.8 Hz), 2.14 (3H, s),

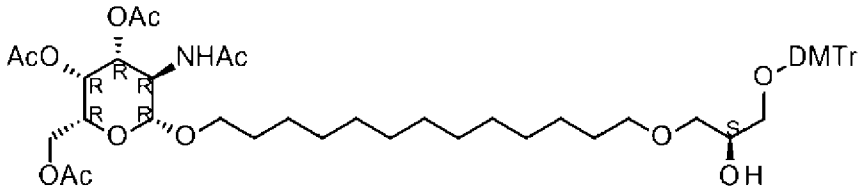
2.05 (3H, s), 2.01 (3H, s), 1.96 (3H, s), 1.64-1.51 (4H, m), 1.37-1.22 (18H, m).

$C_{30}H_{53}NO_{12}$: $[M+Na]^+$ 計算值642，實測值642.

【0273】(26D)

乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-3,4-二乙醯氧基-6-[13-[(2S)-3-[雙(4-甲氧基苯基)-苯基甲氧基]-2-羥基-丙氧基]十三烷氧基]四氫吡喃-2-基]甲酯(化合物26D)之合成

[化109]



將步驟(26C)中合成之化合物26C(1.4 g，2.3 mmol)溶解於吡啶(10 mL)中。添加4,4'-二甲氧基三苯氯甲烷(0.84 g，2.5 mmol)，於室溫下攪拌15小時。反應結束後，將溶劑減壓蒸餾去除。添加甲苯而共沸後，獲得粗產物。藉由矽膠管柱層析法(己烷：乙酸乙酯＝50：50-20：80，v/v，含有1%三乙胺)將其進行精製，而獲得非晶狀之目標物26D(1.9 g，產率91%)。

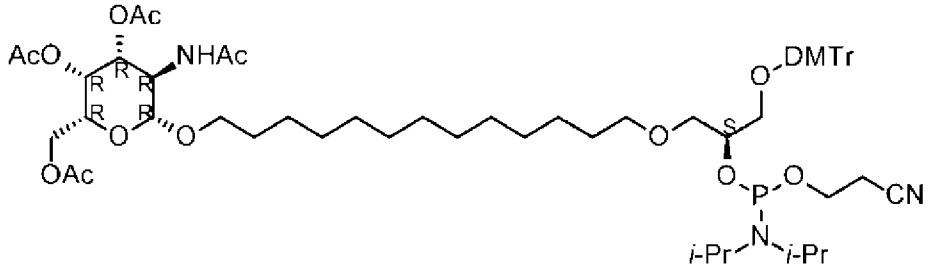
^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 7.45-7.41 (2H, m), 7.34-7.18 (7H, m), 6.85-6.80 (4H, m), 5.40-5.30 (3H, m), 4.72 (1H, d, J = 8.5 Hz), 4.20-4.09 (2H, m), 3.97-3.84 (4H, m), 3.79 (6H, s), 3.56-3.40 (5H, m), 3.22-3.13 (2H, m),2.43 (1H, d, J = 4.8 Hz), 2.14 (3H, s), 2.05 (3H, s), 2.01 (3H, s), 1.95 (3H, s), 1.63-1.50 (4H, m), 1.35-1.21 (18H, m).

$C_{51}H_{71}NO_{14}$: $[M+Na]^+$ 計算值944，實測值944.

【0274】(26E)

乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-3,4-二乙醯氧基-6-[13-[(2S)-3-[雙(4-甲氧基苯基)-苯基甲氧基]-2-[2-氰基乙基-(二異丙胺基)膦基]氧基丙氧基]十三烷氧基]四氫吡喃-2-基]甲酯(化合物26E)之合成

[化110]



將步驟(26D)中合成之化合物26D(1.9 g，2.1 mmol)藉由適量之吡啶共沸後，溶解於二氯甲烷(50 mL)中。添加N,N-二異丙基乙基胺(1.4 mL，8.0 mmol)、2-氰基乙基二異丙基氯亞磷醯胺(0.49 mL，2.2 mmol)，於室溫下攪拌1.5小時。反應結束後，將溶劑減壓蒸餾去除，而獲得粗產物。藉由矽膠管柱層析法(己烷：乙酸乙酯＝100：0-50：50，v/v，含有1%三乙胺)將其進行精製，而獲得非晶狀之目標物26E(1.7 g，產率75%)。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 7.48-7.41 (2H, m), 7.36-7.16 (7H, m), 6.84-6.78 (4H, m), 5.41-5.30 (3H, m), 4.72 (1H, d, J = 8.5 Hz), 4.20-4.09 (2H, m), 3.95-3.07 (21H, m), 2.66-2.40 (2H, m), 2.14 (3H, s), 2.05 (3H, s), 2.00 (3H, s), 1.95 (3H, s), 1.63-1.45 (4H, m), 1.35-1.21 (18H, m), 1.21-0.99 (12H, m).

【0275】(實施例101)

HO-X^6-X^6-X^6-A^{mls}-A^{e2s}-U^{mls}-C^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-T^{e2s}-G^{mls}-G^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-A^{e2s}-G^{mlt}-H (序列編號40)

將X之部分置換為X^6，與實施例91同樣地進行合成。X^6之部分係使

用參考例26中合成之化合物26E，進行3次縮合。

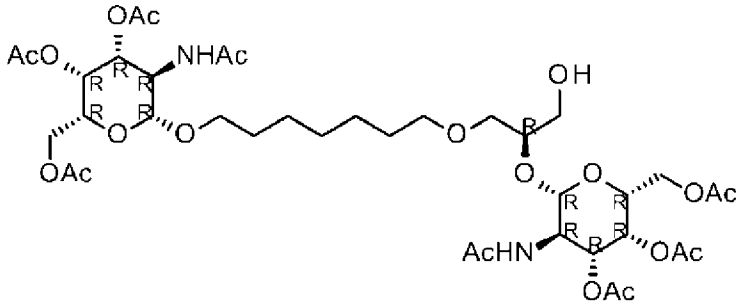
【0276】 本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第92號至第106號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：7037.48)。

【0277】 (參考例27)

(27A)

乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-6-[7-[(2R)-2-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙醯胺-4,5-二乙醯氧基-6-(乙醯氧基甲基)四氫吡喃-2-基]氧基-3-羥基-丙氧基]庚氧基]-3,4-二乙醯氧基四氫吡喃-2-基]甲酯(化合物27A)之合成

[化111]



將步驟(24B)中合成之化合物24B-2(1.9 g，2.0 mmol)溶解於乙醇(60 mL)中。添加10%鈀/碳(濕基)(2.0 g)，於氫氣環境下在室溫下遽烈攪拌8小時。反應結束後過濾，將所獲得之通過液進行減壓蒸餾去除。添加適量之甲苯而共沸後，添加適量之吡啶進行共沸，而獲得目標物27A之粗產物(1.3 g)。不再進一步進行精製，用於下一反應。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 5.84 (1H, d, J = 8.5 Hz), 5.69 (1H, d, J = 8.5 Hz), 5.41-5.14 (4H, m), 4.85 (1H, d, J = 8.5 Hz), 4.70 (1H, d, J = 8.5

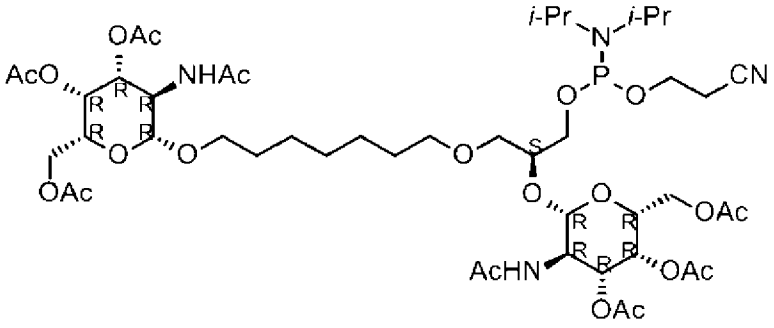
Hz), 4.22-3.40 (17H, m), 2.86-2.81 (1H, m), 2.20-1.93 (24H, m), 1.65-1.49 (4H, m), 1.39-1.23 (6H, m).

$C_{38}H_{60}N_2O_{20}$: $[M+H]^+$ 計算值865，實測值865.

【0278】(27B)

乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-6-[7-[(2S)-2-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙醯胺-4,5-二乙醯氧基-6-(乙醯氧基甲基)四氫吡喃-2-基]氧基-3-[2-氰基乙氧基-(二異丙胺基)膦基]氧基丙氧基]庚氧基]-3,4-二乙醯氧基四氫吡喃-2-基]甲酯(化合物27B)之合成

[化112]



將步驟(27A)中合成之化合物27A之粗產物(1.3 g)溶解於二氯甲烷(50 mL)中。添加二異丙基乙基胺(1.0 mL，5.8 mmol)、2-氰基乙基二異丙基氯亞磷醯胺(0.36 mL，1.6 mmol)，於室溫下攪拌1小時。進而，添加2-氰基乙基二異丙基氯亞磷醯胺(0.36 mL，1.6 mmol)，於室溫下攪拌1小時。反應結束後，將溶劑減壓蒸餾去除。添加適量之甲苯共沸後獲得粗產物。藉由矽膠管柱層析法(乙酸乙酯：乙腈＝100：0-90：10，v/v)將其進行精製，而獲得非晶狀之目標物27B(0.56 g，產率2步26%)。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 6.04-5.69 (2H, m), 5.39-5.06 (4H, m), 4.86-4.69 (2H, m), 4.25-3.40 (21H, m), 2.80-2.67 (2H, m), 2.21-1.92 (24H, m), 1.66-1.48 (4H, m), 1.38-1.15 (18H, m).

【0279】 (實施例102)

HO-X^7-X^4-A^{mls}-A^{e2s}-U^{mls}-C^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-T^{e2s}-G^{mls}-G^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-A^{e2s}-G^{mlt}-H (序列編號40)

將X之部分置換為X^4與X^7，與實施例91同樣地進行合成。X^4之部分係使用參考例15中合成之化合物24E，進行1次縮合。X^7之部分係使用參考例27中合成之化合物27B，進行1次縮合。

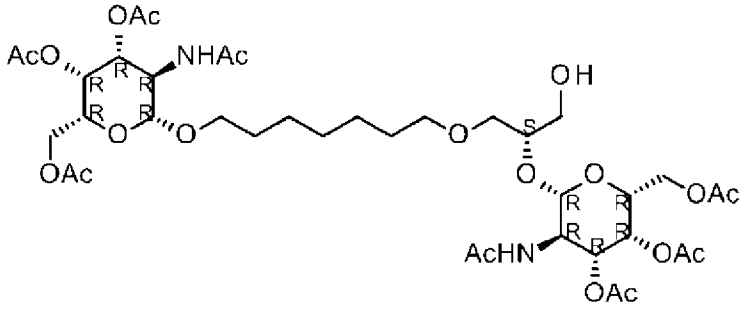
【0280】 本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第92號至第106號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6517.17)。

【0281】 (參考例28)

(28A)

乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-6-[7-[(2S)-2-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙醯胺-4,5-二乙醯氧基-6-(乙醯氧基甲基)四氫吡喃-2-基]氧基-3-羥基-丙氧基]庚氧基]-3,4-二乙醯氧基四氫吡喃-2-基]甲酯(化合物28A)之合成

[化113]



將步驟(25B)中合成之化合物25B-2(1.9 g，2.0 mmol)溶解於乙醇(60 mL)中。添加10%鈀/碳(濕基)(2.0 g)，於氫氣環境下在室溫下遽烈攪拌5

小時。反應結束後過濾，將所獲得之通過液進行減壓蒸餾去除。添加適量之甲苯而共沸後，添加適量之吡啶進行共沸，而獲得目標物28A之粗產物(1.8 g)。不再進一步進行精製，用於下一反應。

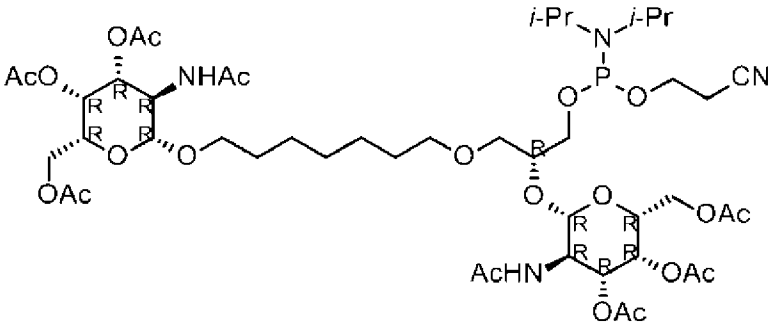
^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 5.93 (1H, d, J = 8.5 Hz), 5.71 (1H, d, J = 8.5 Hz), 5.42-5.22 (4H, m), 4.82-4.73 (2H, m), 4.23-3.35 (17H, m), 2.98-2.92 (1H, m), 2.21-1.92 (24H, m), 1.66-1.48 (4H, m), 1.42-1.23 (6H, m).

$C_{38}H_{60}N_2O_{20}$: $[M+H]^+$ 計算值865，實測值865.

【0282】(28B)

乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-6-[7-[(2R)-2-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙醯胺-4,5-二乙醯氧基-6-(乙醯氧基甲基)四氫吡喃-2-基]氧基-3-[2-氰基乙氧基-(二異丙胺基)膦基]氧基丙氧基]庚氧基]-3,4-二乙醯氧基四氫吡喃-2-基]甲酯(化合物28B)之合成

[化114]



將步驟(28A)中合成之化合物28A之粗產物(1.8 g)溶解於二氯甲烷(50 mL)中。添加二異丙基乙基胺(1.5 mL，8.4 mmol)、2-氰基乙基二異丙基氯亞磷醯胺(0.51 mL，2.3 mmol)，於室溫下攪拌5.5小時。進而，添加2-氰基乙基二異丙基氯亞磷醯胺(0.51 mL，2.3 mmol)，於室溫下攪拌1小時。反應結束後，將溶劑減壓蒸餾去除。添加適量之甲苯共沸後獲得粗產物。藉由矽膠管柱層析法(乙酸乙酯：乙腈＝100：0-90：10，v/v)將其進

行精製，而獲得非晶狀之目標物28B(1.5 g，產率2步71%)。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 5.91-5.67 (2H, m), 5.41-5.18 (4H, m), 4.91-4.72 (2H, m), 4.26-3.35 (21H, m), 2.79-2.63 (2H, m), 2.20-1.92 (24H, m), 1.67-1.50 (4H, m), 1.40-1.13 (18H, m).

【0283】 (實施例103)

HO-X^8-X^5-A^{mls}-A^{e2s}-U^{mls}-C^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-T^{e2s}-G^{mls}-G^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-A^{e2s}-G^{mlt}-H (序列編號40)

將X之部分置換為X^5與X^8，與實施例91同樣地進行合成。X^5之部分係使用參考例25中合成之化合物25E，進行1次縮合。X^8之部分係使用參考例28中合成之化合物28B，進行1次縮合。

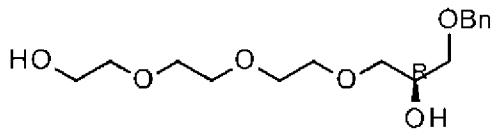
【0284】 本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第92號至第106號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6517.10)。

【0285】 (參考例29)

(29A)

(2R)-1-苄氧基-3-[2-[2-(2-羥基乙氧基)乙氧基]乙氧基]丙烷-2-醇(化合物29A)之合成

[化115]



將三乙二醇(6.9 g，46 mmol)、苄基(S)-(+)-縮水甘油醚(5.0 g，30

mmol)溶解於二氯甲烷(75 mL)中，添加三氟化硼-二乙醚錯合物(0.77 mL，6.1 mmol)，於室溫下攪拌16小時。反應結束後，添加飽和碳酸氫鈉水溶液，並利用二氯甲烷進行萃取。利用飽和食鹽水/飽和碳酸氫鈉水溶液洗淨有機層後，利用無水硫酸鈉進行乾燥、過濾，將溶劑減壓蒸餾去除而獲得粗產物。藉由以0.1%三氟乙酸水溶液與0.1%三氟乙酸乙腈溶液作為溶離液之逆相HPLC(high performance liquid chromatography，高效液相層析法)(GL Science，Inertsil ODS-3)進行分離精製，將含有目標物之組分彙集，將溶劑減壓蒸餾去除。將目標物溶解於二氯甲烷中，利用飽和食鹽水、飽和食鹽水/飽和碳酸氫鈉水溶液洗淨有機層後，利用無水硫酸鈉進行乾燥、過濾，將溶劑減壓蒸餾去除，而獲得油狀之目標物29A(5.6 g，產率58%)。

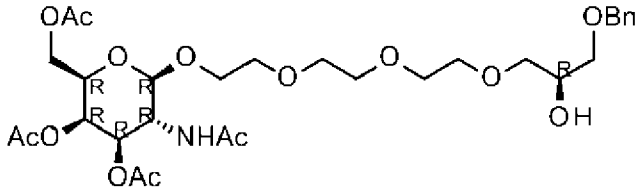
^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 7.37-7.25 (5H, m), 4.55 (2H, s), 4.05-3.97 (1H, m), 3.65-3.56 (16H, m).

$C_{16}H_{26}O_6$: $[M+H]^+$ 計算值315，實測值315.

【0286】(29B)

乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-3,4-二乙醯氧基-6-[2-[2-[2-[(2R)-3-苄氧基-2-羥基-丙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]四氫吡喃-2-基]甲酯(化合物29B)之合成

[化116]



於步驟(29A)中合成之化合物29A(5.6 g，18 mmol)與文獻已知化合物之乙酸[(2R,3R,4R,5R)-5-乙醯胺-3,4,6-三乙醯氧基-四氫吡喃-2-基]甲

酯(WO2011053614)(6.3 g，16 mmol)之二氯甲烷(100 mL)懸浮溶液中添加三氟甲磺酸(0.24 mL，2.8 mmol)，於45℃下攪拌16小時。反應結束後，添加飽和碳酸氫鈉水溶液，並利用二氯甲烷進行萃取。利用飽和食鹽水/飽和碳酸氫鈉水溶液洗淨有機層後，利用無水硫酸鈉進行乾燥、過濾，將溶劑減壓蒸餾去除而獲得粗產物。藉由以0.1%三氟乙酸水溶液與0.1%三氟乙酸乙腈溶液作為溶離液之逆相HPLC(GL Science，Inertsil ODS-3)進行分離精製，將含有目標物之組分彙集，將溶劑減壓蒸餾去除。將目標物溶解於乙酸乙酯中，利用飽和食鹽水、飽和食鹽水/飽和碳酸氫鈉水溶液洗淨有機層後，利用無水硫酸鈉進行乾燥、過濾，將溶劑減壓蒸餾去除，而獲得非晶狀之目標物29B(4.9 g，產率47%)。

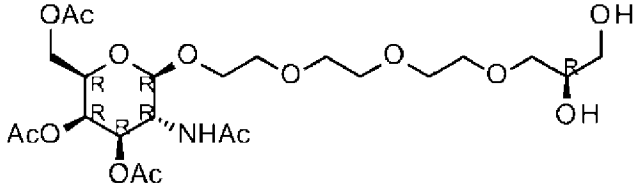
^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 7.38-7.27 (5H, m), 6.69 (1H, d, J = 9.1 Hz), 5.28 (1H, d, J = 3.0 Hz), 5.02 (1H, dd, J = 11.2, 3.0 Hz), 4.77 (1H, d, J = 8.5 Hz), 4.56 (2H, s), 4.29-3.47 (21H, m), 2.15 (3H, s), 2.04 (3H, s), 1.97 (3H, s), 1.96 (3H, s).

$C_{30}H_{45}NO_{14}$: $[M+H]^+$ 計算值644，實測值644.

【0287】 (29C)

乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-3,4-二乙醯氧基-6-[2-[2-[2-[(2R)-2,3-二羥基丙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]四氫吡喃-2-基]甲酯(化合物29C)之合成

[化117]



將步驟(29B)中合成之化合物29B(4.9 g，7.6 mmol)溶解於乙醇(100

mL)中。添加10%鈀/碳(濕基)(4.0 g)，於氫氣環境下在室溫下遽烈攪拌8小時。反應結束後過濾，將所獲得之通過液進行減壓蒸餾去除。添加適量之甲苯進行共沸，而獲得油狀之目標物29C(4.0 g，產率95%)。

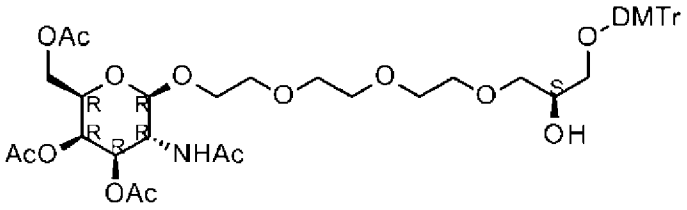
^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 6.83-6.76 (1H, m), 5.32 (1H, d, J = 3.0 Hz), 5.11 (1H, dd, J = 11.2, 3.0 Hz), 4.79 (1H, d, J = 9.1 Hz), 4.27-4.08 (3H, m), 3.97-3.53 (18H, m), 2.16 (3H, s), 2.06 (3H, s), 2.00 (3H, s), 1.97 (3H, s).

$C_{23}H_{39}NO_{14}$: $[M+H]^+$ 計算值554，實測值554.

【0288】(29D)

乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-3,4-二乙醯氧基-6-[2-[2-[2-[(2S)-3-[雙(4-甲氧基苯基)-苯基甲氧基]-2-羥基-丙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]四氫吡喃-2-基]甲酯(化合物29D)之合成

[化118]



於步驟(29C)中合成之化合物29C(4.0 g，7.2 mmol)中添加適量之吡啶，於減壓下進行共沸。溶解於吡啶(30 mL)中，添加4,4'-二甲氧基三苯氯甲烷(2.7 g，8.0 mmol)，於室溫下攪拌3小時。反應結束後，將溶劑減壓蒸餾去除。添加適量之甲苯而共沸後，獲得粗產物。藉由矽膠管柱層析法(乙酸乙酯：乙酸乙酯/甲醇(5/1)＝100：0-50：50，v/v，含有1%三乙胺)將其進行精製，而獲得非晶狀之目標物29D(3.5 g，產率57%)。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 7.44-7.40 (2H, m), 7.33-7.18 (7H, m), 6.85-

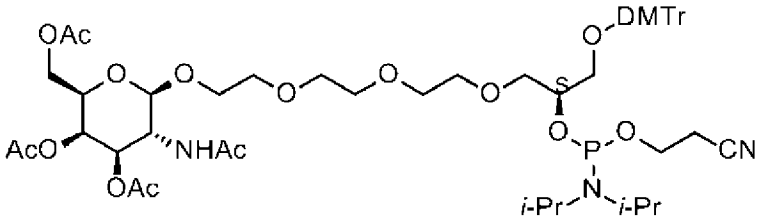
6.80 (4H, m), 6.59 (1H, d, J = 9.7 Hz), 5.29 (1H, d, J = 3.0 Hz), 5.00 (1H, dd, J = 11.2, 3.0 Hz), 4.77 (1H, d, J = 8.5 Hz), 4.27-4.07 (3H, m), 4.00-3.82 (4H, m), 3.79 (6H, s), 3.71-3.49 (12H, m), 3.20-3.10 (2H, m), 2.14 (3H, s), 2.01 (3H, s), 1.93 (6H, s).

$C_{44}H_{57}NO_{16}$: $[M+Na]^+$ 計算值878，實測值878.

【0289】(29E)

乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-3,4-二乙醯氧基-6-[2-[2-[2-[(2S)-3-[雙(4-甲氧基苯基)-苯基甲氧基]-2-[2-氰基乙氧基-(二異丙胺基)膦基]氧基丙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]四氫吡喃-2-基]甲酯(化合物29E)之合成

[化119]



將步驟(29D)中合成之化合物29D(3.5 g，4.1 mmol)藉由適量之吡啶共沸後，溶解於二氯甲烷(40 mL)中。添加N,N-二異丙基乙基胺(2.8 mL，16 mmol)、2-氰基乙基二異丙基氯亞磷醯胺(1.1 mL，4.9 mmol)，於室溫下攪拌3小時。反應結束後，將溶劑減壓蒸餾去除。添加適量之甲苯共沸後獲得粗產物。藉由矽膠管柱層析法(己烷：乙酸乙酯＝50：50-0：100，v/v，含有1%三乙胺)將其進行精製，而獲得非晶狀之目標物29E(2.2 g，產率51%)。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 7.47-7.40 (2H, m), 7.35-7.16 (7H, m), 6.85-6.77 (4H, m), 6.40 (1H, d, J = 9.1 Hz), 5.33-5.28 (1H, m), 5.03-4.93 (1H, m), 4.81-4.74 (1H, m), 4.28-4.08 (3H, m), 3.96-3.46 (26H, m),

3.27-3.04 (2H, m), 2.69-2.41 (2H, m), 2.15 (3H, s), 2.04 (3H, s), 1.97-1.90 (6H, m), 1.30-0.98 (12H, m).

【0290】 (實施例104)

HO-X^9-X^9-X^9-A^{mls}-A^{e2s}-U^{mls}-C^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-T^{e2s}-G^{mls}-G^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-A^{e2s}-G^{mlt}-H (序列編號40)

將X之部分置換為X^9，與實施例91同樣地進行合成。X^9之部分係使用參考例29中合成之化合物29E，進行3次縮合。

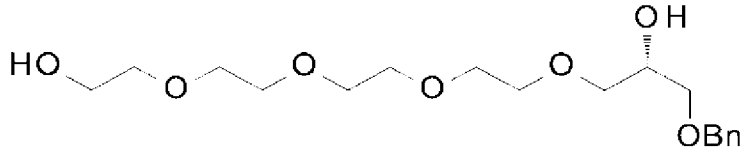
【0291】 本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第92號至第106號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6839.16)。

【0292】 (參考例30)

(30A)

(2R)-1-苄氧基-3-[2-[2-[2-(2-羥基乙氧基)乙氧基]乙氧基]乙氧基]丙烷-2-醇(化合物30A之合成)

[化120]



將四乙二醇(8.87 g，45.7 mmol)、苄基(S)-(+)-縮水甘油醚(4.66 mL，30.5 mmol)溶解於二氯甲烷(75 mL)中，添加三氟化硼-二乙醚錯合物(0.76 mL，6.1 mmol)，於室溫下整夜攪拌。反應結束後，添加飽和碳酸氫鈉水溶液。利用飽和碳酸氫鈉水溶液、飽和食鹽水洗淨有機層後，利

用無水硫酸鈉進行乾燥、過濾，將溶劑減壓蒸餾去除而獲得粗產物。藉由以0.1%三氟乙酸水溶液與0.1%三氟乙酸乙腈溶液作為溶離液之逆相HPLC(GL Science，Inertsil ODS-3)進行分離精製，將含有目標物之組分彙集，將溶劑減壓蒸餾去除。將目標物溶解於二氯甲烷中，利用飽和碳酸氫鈉水溶液、飽和食鹽水洗淨有機層後，利用無水硫酸鈉進行乾燥、過濾，將溶劑減壓蒸餾去除，而獲得油狀之目標物30A(5.3 g，產率49%)。

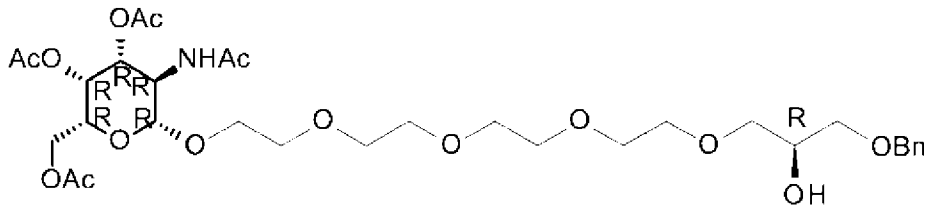
^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 7.37-7.23 (5H, m), 4.56 (2H, s), 4.01 (1H, br), 3.75-3.41 (20H, m).

$C_{18}H_{30}O_7$: $[M+H]^+$ 計算值359，實測值359.

【0293】(30B)

乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-3,4-二乙醯氧基-6-[2-[2-[2-[2-[(2R)-3-苄氧基-2-羥基-丙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]四氫吡喃-2-基]甲酯(化合物30B之合成)

[化121]



於步驟30A中合成之化合物(5.3 g，15 mmol)與文獻已知化合物之乙酸[(2R,3R,4R,5R)-5-乙醯胺-3,4,6-三乙醯氧基-四氫吡喃-2-基]甲酯(WO2011053614)(5.2 g，13 mmol)之二氯甲烷(100 mL)懸浮溶液中添加三氟甲磺酸(0.2 mL，2.3 mmol)，於45℃下攪拌22小時。反應結束後，將溶劑減壓蒸餾去除並進行濃縮，添加乙酸乙酯。利用飽和碳酸氫鈉水溶液、飽和食鹽水洗淨有機層後，利用無水硫酸鈉進行乾燥、過濾，將溶劑

減壓蒸餾去除而獲得粗產物。藉由以0.1%三氟乙酸水溶液與0.1%三氟乙酸乙腈溶液作為溶離液之逆相HPLC(GL Science，Inertsil ODS-3)進行分離精製，將含有目標物之組分彙集，將溶劑減壓蒸餾去除。將目標物溶解於二氯甲烷中，利用飽和碳酸氫鈉水溶液、飽和食鹽水洗淨有機層後，利用無水硫酸鈉進行乾燥、過濾，將溶劑減壓蒸餾去除，而獲得非晶狀之目標物30B(4.5 g，產率49%)。

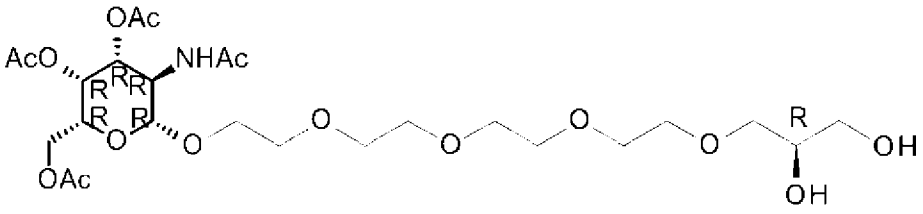
^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 7.38-7.24 (5H, m), 6.72 (1H, d, J = 8.5 Hz), 5.29 (1H, d, J = 3.0 Hz), 5.00 (1H, dd, J = 11.2, 3.3 Hz), 4.76 (1H, d, J = 8.5 Hz), 4.56 (2H, s), 4.31-4.21 (1H, m), 4.18-3.46 (24H, m), 2.15 (3H, s), 2.04 (3H, s), 1.97 (6H, s).

$C_{32}H_{49}NO_{15}$: $[M+H]^+$ 計算值688，實測值688.

【0294】(30C)

乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-3,4-二乙醯氧基-6-[2-[2-[2-[2-[(2R)-2,3-二羥基丙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]四氫吡喃-2-基]甲酯(30C之合成)

[化122]



將步驟(30B)中合成之化合物30B(4.5 g，6.5 mmol)溶解於乙醇(80 mL)中。添加10%鈀/碳(濕基)(4 g)，於氫氣環境下在室溫下遽烈攪拌8小時。反應結束後過濾，將所獲得之通過液進行減壓蒸餾去除而獲得目標物30C(3.9 g，產率定量)之粗產物。不再進一步進行精製，用於下一反應。

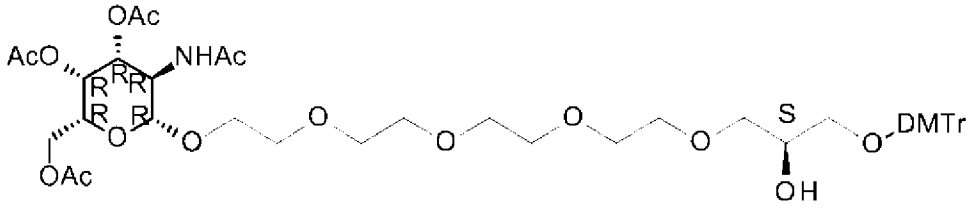
^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 6.85 (1H, d, J = 9.7 Hz), 5.32 (1H, d, J = 3.0 Hz), 5.10 (1H, dd, J = 11.2, 3.0 Hz), 4.74 (1H, d, J = 8.5 Hz), 4.32-4.09 (2H, m), 3.99-3.56 (23H, m), 2.16 (3H, s), 2.05 (3H, s), 2.00 (3H, s), 1.99 (3H, s).

$C_{25}H_{43}NO_{15}$: $[M+H]^+$ 計算值598，實測值598.

【0295】(30D)

乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-3,4-二乙醯氧基-6-[2-[2-[2-[2-[(2S)-3-[雙(4-甲氧基苯基)-苯基-甲氧基]-2-羥基-丙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]四氫吡喃-2-基]甲酯(化合物30D之合成)

[化123]



於步驟(30C)中合成之化合物30C(3.9 g，6.5 mmol)添加適量之吡啶，於減壓下進行共沸。溶解於吡啶(22 mL)中，添加4,4'-二甲氧基三苯氯甲烷(4,4'-Dimethoxytrityl Chloride)(2.4 g，7.2 mmol)，於室溫下攪拌2小時。反應結束後，將溶劑減壓蒸餾去除。添加適量之甲苯而共沸後，獲得粗產物。藉由矽膠管柱層析法(乙酸乙酯：乙酸乙酯/甲醇(5/1)＝100：0-50：50，v/v，含有1%三乙胺)將其進行精製，而獲得非晶狀之目標物30D(3.12 g，產率53%)。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 7.44-7.40 (2H, m), 7.33-7.18 (7H, m), 6.85-6.79 (4H, m), 6.63 (1H, d, J = 9.1 Hz), 5.29 (1H, d, J = 3.0 Hz), 4.96 (1H, dd, J = 11.2, 3.3 Hz), 4.75 (1H, d, J = 8.5 Hz), 4.29-4.21 (1H, m),

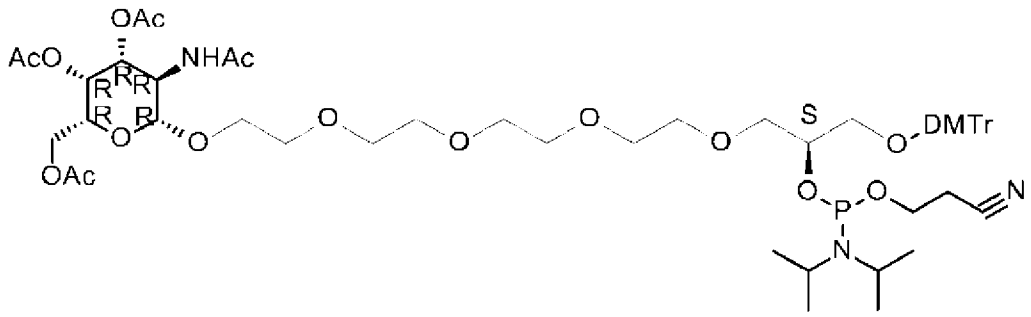
4.17-4.07 (2H, m), 4.00-3.81 (4H, m), 3.79 (6H, s), 3.71-3.58 (14H, m), 3.53-3.43 (2H, m), 3.21-3.10 (2H, m), 2.14 (3H, s), 2.02 (3H, s), 1.95 (6H, s).

$C_{46}H_{61}NO_{17}$: $[M+Na]^+$ 計算值922，實測值922.

【0296】(30E)

乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-3,4-二乙醯氧基-6-[2-[2-[2-[2-[(2S)-3-[雙(4-甲氧基苯基)-苯基-甲氧基]-2-[2-氰基乙氧基-(二異丙胺基)膦基]氧基-丙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]四氫吡喃-2-基]甲酯(化合物30E之合成)

[化124]



於步驟(30D)中合成之化合物30D(3.12 g，3.47 mmol)中添加適量之吡啶，於減壓下共沸後溶解於二氯甲烷(35 mL)中。添加N,N-二異丙基乙基胺(2.42 mL，13.9 mmol)、2-氰基乙基二異丙基氯亞磷醯胺(0.93 mL，4.16 mmol)，於室溫下攪拌1小時。反應結束後，將溶劑減壓蒸餾去除。添加適量之甲苯，於減壓下共沸後獲得粗產物。藉由矽膠管柱層析法(己烷：乙酸乙酯＝100：0-0：100，v/v，含有1%三乙胺)將其進行精製，而獲得非晶狀之目標物30E(2.98 g，產率78%)。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 7.46-7.40 (2H, m), 7.35-7.17 (7H, m), 6.84-6.78 (4H, m), 6.43 (1H, d, J = 9.1 Hz), 5.31 (1H, br), 5.00-4.93 (1H, m),

4.78 (1H, d, J = 8.5 Hz), 4.29-4.08 (3H, m), 3.91-3.48 (30H, m), 3.27-3.04 (2H, m), 2.67-2.62 (1H, m), 2.46-2.41 (1H, m), 2.15 (3H, s), 2.04 (3H, s),1.97-1.94 (6H, m), 1.30-0.99 (12H, m).

【0297】 (實施例105)

HO-X^{10}-X^{10}-X^{10}-A^{m1s}-A^{e2s}-U^{m1s}-C^{m1s}-C^{e2s}-G^{m1s}-A^{m1s}-T^{e2s}-G^{m1s}-G^{m1s}-C^{e2s}-G^{m1s}-A^{m1s}-A^{e2s}-G^{m1t}-H (序列編號40)

將X之部分置換為X^{10}，與實施例91同樣地進行合成。X^{10}之部分係使用參考例30中合成之化合物30E，進行3次縮合。

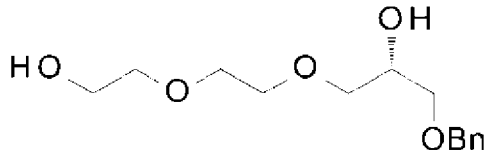
【0298】 本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第92號至第106號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6971.21)。

【0299】 (參考例31)

(31A)

(2R)-1-苄氧基-3-[2-(2-羥基乙氧基)乙氧基]丙烷-2-醇(化合物31A之合成)

[化125]



將二乙二醇(5.0 g，30.5 mmol)、苄基(S)-(+)-縮水甘油醚(6.5，60.9 mmol)溶解於二氯甲烷(75 mL)中，添加三氟化硼-二乙醚錯合物(0.76 mL，6.1 mmol)，於室溫下攪拌2小時。反應結束後，添加飽和碳酸氫鈉

水溶液。利用飽和碳酸氫鈉水溶液、飽和食鹽水洗淨有機層後，利用無水硫酸鈉進行乾燥、過濾，將溶劑減壓蒸餾去除而獲得粗產物。藉由以0.1%三氟乙酸水溶液與0.1%三氟乙酸乙腈溶液作為溶離液之逆相HPLC(GL Science，Inertsil ODS-3)進行分離精製，將含有目標物之組分彙集，將溶劑減壓蒸餾去除。將目標物溶解於二氯甲烷中，利用飽和碳酸氫鈉水溶液、飽和食鹽水洗淨有機層後，利用無水硫酸鈉進行乾燥、過濾，將溶劑減壓蒸餾去除，而獲得油狀之目標物31A(5.3 g，產率64%)。

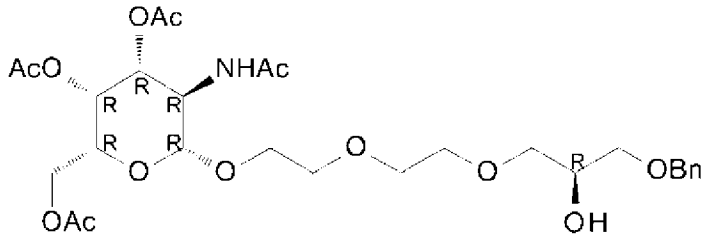
^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 7.38-7.27 (5H, m), 4.56 (2H, s), 4.05-3.97 (1H, m), 3.77-3.48 (12H, m), 2.85-2.82 (1H, m), 2.47-2.42 (1H, m).

$C_{14}H_{22}O_5$: $[M+Na]^+$ 計算值293，實測值293.

【0300】(31B)

乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-3,4-二乙醯氧基-6-[2-[2-[(2R)-3-苄氧基-2-羥基-丙氧基]乙氧基]乙氧基]四氫吡喃-2-基]甲酯(化合物31B之合成)

[化126]



於步驟31A中合成之化合物(4.0 g，15 mmol)與文獻已知化合物之乙酸[(2R,3R,4R,5R)-5-乙醯胺-3,4,6-三乙醯氧基-四氫吡喃-2-基]甲酯(WO2011053614)(5.2 g，13 mmol)之二氯甲烷(100 mL)懸浮溶液中添加三氟甲磺酸(0.2 mL，2.3 mmol)，於45℃下攪拌22小時。反應結束後，將溶劑減壓蒸餾去除並進行濃縮，添加乙酸乙酯。利用飽和碳酸氫鈉水溶

液、飽和食鹽水洗淨有機層後，利用無水硫酸鈉進行乾燥、過濾，將溶劑減壓蒸餾去除而獲得粗產物。藉由以0.1%三氟乙酸水溶液與0.1%三氟乙酸乙腈溶液作為溶離液之逆相HPLC(GL Science，Inertsil ODS-3)進行分離精製，將含有目標物之組分彙集，將溶劑減壓蒸餾去除。將目標物溶解於二氯甲烷中，利用飽和碳酸氫鈉水溶液、飽和食鹽水洗淨有機層後，利用無水硫酸鈉進行乾燥、過濾，將溶劑減壓蒸餾去除，而獲得非晶狀之目標物31B(4.15 g，產率52%)。

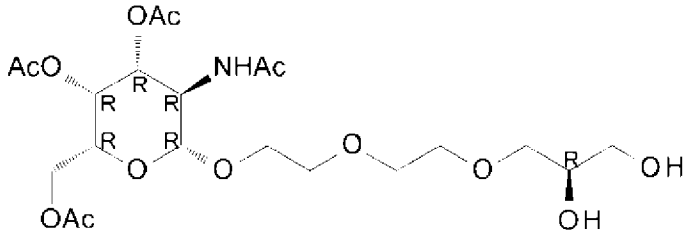
^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 7.37-7.28 (5H, m), 6.71 (1H, d, J = 9.7 Hz), 5.30 (1H, d, J = 3.0 Hz), 5.12 (1H, dd, J = 11.2, 3.3 Hz), 4.77 (1H, d, J = 8.5 Hz), 4.57 (2H, s), 4.27-4.05 (1H, m), 3.93-3.45 (16H, m), 2.15 (3H, s), 2.05 (3H, s), 1.98 (3H, s), 1.95 (3H, s).

$C_{28}H_{41}NO_{13}$: $[M+Na]^+$ 計算值622，實測值622.

【0301】(31C)

乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-3,4-二乙醯氧基-6-[2-[2-[(2R)-2,3-二羥基丙氧基]乙氧基]乙氧基]四氫吡喃-2-基]甲酯(化合物31C之合成)

[化127]



將步驟(31B)中合成之化合物31B(4.15 g，6.9 mmol)溶解於乙醇(80 mL)中。添加10%鈀/碳(濕基)(4 g)，於氫氣環境下在室溫下遽烈攪拌8小時。進而添加10%鈀/碳(濕基)(1 g)，於氫氣環境下在50℃下遽烈攪拌4小時。進而，添加10%鈀/碳(濕基)(1 g)，於氫氣環境下在50℃下遽烈攪拌8

小時。反應結束後過濾，將所獲得之通過液進行減壓蒸餾去除而獲得目標物31C(3.0 g，產率86%)之粗產物。不再進一步進行精製，用於下一反應。

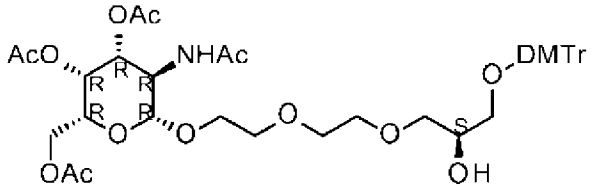
^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 6.58 (1H, d, J = 9.1 Hz), 5.32-5.30 (1H, m), 5.16 (1H, dd, J = 11.2, 3.3 Hz), 4.78 (1H, d, J = 8.5 Hz), 4.26-4.09 (2H, m), 3.95-3.58 (15H, m), 2.16 (3H, s), 2.06 (3H, s), 2.01 (3H, s), 1.98 (3H, s).

$C_{21}H_{35}NO_{13}$: $[M+H]^+$ 計算值510，實測值510.

【0302】(31D)

乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-3,4-二乙醯氧基-6-[2-[2-[(2S)-3-[雙(4-甲氧基苯基)-苯基甲氧基]-2-羥基-丙氧基]乙氧基]乙氧基]四氫吡喃-2-基]甲酯(化合物31D)之合成

[化128]



於步驟(31C)中合成之化合物31C(3.0 g，5.9 mmol)中添加適量之吡啶，於減壓下進行共沸。溶解於吡啶(25 mL)中，添加4,4'-二甲氧基三苯氯甲烷(2.2 g，6.5 mmol)，於室溫下攪拌2小時。反應結束後，將溶劑減壓蒸餾去除。添加適量之甲苯而共沸後，獲得粗產物。藉由矽膠管柱層析法(乙酸乙酯：乙酸乙酯/甲醇(5/1)＝100：0-50：50，v/v，含有1%三乙胺)將其進行精製，而獲得非晶狀之目標物31D(1.7 g，產率36%)。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 7.47-7.42 (2H, m), 7.35-7.18 (7H, m), 6.86-6.80 (4H, m), 6.73 (1H, d, J = 9.7 Hz), 5.31 (1H, d, J = 3.0 Hz), 5.14

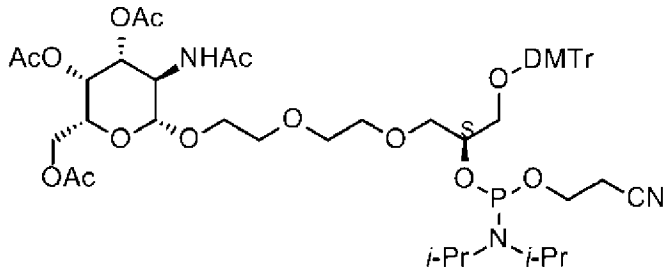
(1H, dd, J = 11.2, 3.0 Hz), 4.76 (1H, d, J = 8.5 Hz), 4.28-4.09 (3H, m), 4.07-3.83 (4H, m), 3.79 (6H, s), 3.72-3.49 (8H, m), 3.26 (1H, d, J = 3.6 Hz), 3.18-3.13 (2H, m), 2.14 (3H, s), 2.04 (3H, s), 1.94 (3H, s), 1.90 (3H, s).

$C_{42}H_{53}NO_{15}$: $[M+Na]^+$ 計算值834，實測值834.

【0303】(31E)

乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-3,4-二乙醯氧基-6-[2-[2-[(2S)-3-[雙(4-甲氧基苯基)-苯基甲氧基]-2-[2-氰基乙氧基-(二異丙胺基)膦基]氧基丙氧基]乙氧基]乙氧基]四氫吡喃-2-基]甲酯(化合物31E)之合成

[化129]



將步驟(31D)中合成之化合物31D(1.7 g，2.1 mmol)藉由適量之吡啶共沸後，溶解於二氯甲烷(20 mL)中。添加N,N-二異丙基乙基胺(1.5 mL，8.4 mmol)、2-氰基乙基二異丙基氯亞磷醯胺(0.56 mL，2.5 mmol)，於室溫下攪拌3小時。反應結束後，將溶劑減壓蒸餾去除。添加適量之甲苯共沸後獲得粗產物。藉由矽膠管柱層析法(己烷：乙酸乙酯＝50：50-0：100，v/v，含有1%三乙胺)將其進行精製，而獲得非晶狀之目標物31E(1.5 g，產率71%)。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 7.47-7.40 (2H, m), 7.37-7.17 (7H, m), 6.86-6.77 (4H, m), 6.08-5.95 (1H, m), 5.34-5.29 (1H, m), 5.16-5.06 (1H, m), 4.76-4.69 (1H, m), 4.20-4.02 (3H, m), 3.95-3.47 (22H, m), 3.31-3.08

(2H, m), 2.69-2.40 (2H, m), 2.14 (3H, s), 2.04-2.02 (3H, m), 1.97-1.94 (3H, m), 1.91-1.88 (3H, m), 1.21-1.01 (12H, m).

【0304】(實施例106)

HO-X^{11}-X^{11}-X^{11}-A^{mls}-A^{e2s}-U^{mls}-C^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-T^{e2s}-G^{mls}-G^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-A^{e2s}-G^{mlt}-H (序列編號40)

將X之部分置換為X^{11}，與實施例91同樣地進行合成。X^{11}之部分係使用參考例31中合成之化合物31E，進行3次縮合。

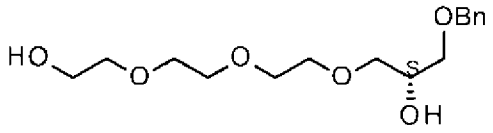
【0305】本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第92號至第106號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6708.09)。

【0306】(參考例32)

(32A)

(2S)-1-苄氧基-3-[2-[2-(2-羥基乙氧基)乙氧基]乙氧基]丙烷-2-醇(化合物32A)之合成

[化130]



將三乙二醇(9.2 g，61 mmol)、苄基(R)-(-)-縮水甘油醚(5.0 g，30 mmol)溶解於二氯甲烷(75 mL)中，添加三氟化硼-二乙醚錯合物(0.77 mL，6.1 mmol)，於室溫下攪拌4小時。反應結束後，添加飽和碳酸氫鈉水溶液，並利用二氯甲烷進行萃取。利用飽和食鹽水/飽和碳酸氫鈉水溶

液洗淨有機層後，利用無水硫酸鈉進行乾燥、過濾，將溶劑減壓蒸餾去除而獲得粗產物。藉由以0.1%三氟乙酸水溶液與0.1%三氟乙酸乙腈溶液作為溶離液之逆相HPLC(GL Science，Inertsil ODS-3)進行分離精製，將含有目標物之組分彙集，將溶劑減壓蒸餾去除。將目標物溶解於二氯甲烷中，利用飽和食鹽水、飽和食鹽水/飽和碳酸氫鈉水溶液洗淨有機層後，利用無水硫酸鈉進行乾燥、過濾，將溶劑減壓蒸餾去除，而獲得油狀之目標物32A(6.4 g，產率67%)。

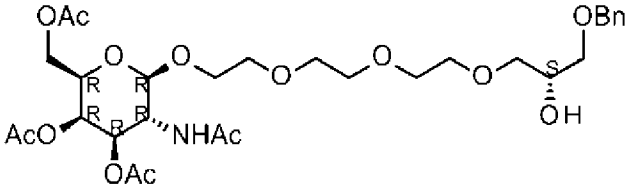
^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 7.38-7.25 (5H, m), 4.56 (2H, s), 4.19-3.45 (17H, m).

$C_{16}H_{26}O_6$: $[M+H]^+$ 計算值315，實測值315.

【0307】(32B)

乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-3,4-二乙醯氧基-6-[2-[2-[2-[(2S)-3-苄氧基-2-羥基-丙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]四氫吡喃-2-基]甲酯(化合物32B)之合成

[化131]



於步驟(32A)中合成之化合物32A(6.4 g，20 mmol)與文獻已知化合物之乙酸[(2R,3R,4R,5R)-5-乙醯胺-3,4,6-三乙醯氧基-四氫吡喃-2-基]甲酯(WO2011053614)(7.2 g，18 mmol)之二氯甲烷(200 mL)懸浮溶液中添加三氟甲磺酸(0.28 mL，3.1 mmol)，於45℃下攪拌20小時。反應結束後，添加飽和碳酸氫鈉水溶液，並利用二氯甲烷進行萃取。利用飽和食鹽水/飽和碳酸氫鈉水溶液洗淨有機層後，利用無水硫酸鈉進行乾燥、過

濾，將溶劑減壓蒸餾去除而獲得粗產物。藉由以0.1%三氟乙酸水溶液與0.1%三氟乙酸乙腈溶液作為溶離液之逆相HPLC(GL Science，Inertsil ODS-3)進行分離精製，將含有目標物之組分彙集，將溶劑減壓蒸餾去除。將目標物溶解於乙酸乙酯中，利用飽和食鹽水、飽和食鹽水/飽和碳酸氫鈉水溶液洗淨有機層後，利用無水硫酸鈉進行乾燥、過濾，將溶劑減壓蒸餾去除，而獲得非晶狀之目標物32B(5.6 g，產率47%)。

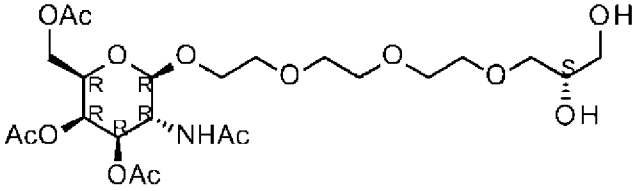
^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 7.39-7.25 (5H, m), 6.68 (1H, d, J = 9.1 Hz), 5.33-5.27 (1H, m), 5.07-4.95 (1H, m), 4.78 (1H, d, J = 8.5 Hz), 4.55 (2H, s), 4.25-3.24 (21H, m), 2.15 (3H, s), 2.04 (3H, s), 1.97 (3H, s), 1.96 (3H, s).

$C_{30}H_{45}NO_{14}$: $[M+H]^+$ 計算值644，實測值644.

【0308】(32C)

乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-3,4-二乙醯氧基-6-[2-[2-[2-[(2S)-2,3-二羥基丙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]四氫吡喃-2-基]甲酯(化合物32C)之合成

[化132]



將步驟(32B)中合成之化合物32B(5.6 g，8.7 mmol)溶解於乙醇(100 mL)中。添加20%氫氧化鈀/碳(濕基)(1.5 g)，於氫氣環境下在50℃下遽烈攪拌8小時。反應結束後過濾，將所獲得之通過液進行減壓蒸餾去除。添加適量之甲苯進行共沸，而獲得油狀之目標物32C(4.1 g，產率85%)。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 6.80 (1H, d, J = 9.1 Hz), 5.34-5.30 (1H, m),

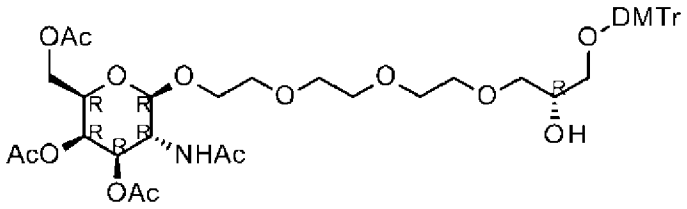
5.15-5.03 (1H, m), 4.81 (1H, d, J = 8.5 Hz), 4.33-4.08 (3H, m), 3.99-3.48 (18H, m), 2.16 (3H, s), 2.06 (3H, s), 2.00 (3H, s), 1.98 (3H, s).

$C_{23}H_{39}NO_{14}$: $[M+H]^+$ 計算值554，實測值554.

【0309】(32D)

乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-3,4-二乙醯氧基-6-[2-[2-[2-[(2R)-3-[雙(4-甲氧基苯基)-苯基甲氧基]-2-羥基-丙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]四氫吡喃-2-基]甲酯(化合物32D)之合成

[化133]



於步驟(32C)中合成之化合物32C(4.1 g，7.4 mmol)中添加適量之吡啶，於減壓下進行共沸。溶解於吡啶(30 mL)中，添加4,4'-二甲氧基三苯氯甲烷(2.8 g，8.2 mmol)，於室溫下攪拌3小時。反應結束後，將溶劑減壓蒸餾去除。添加適量之甲苯而共沸後，獲得粗產物。藉由矽膠管柱層析法(乙酸乙酯：乙酸乙酯/甲醇(5/1)＝100：0-50：50，v/v，含有1%三乙胺)將其進行精製，而獲得非晶狀之目標物32D(1.9 g，產率30%)。

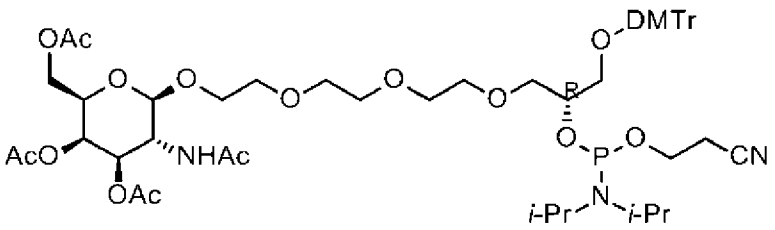
^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 7.44-7.40 (2H, m), 7.35-7.18 (7H, m), 6.86-6.79 (4H, m), 6.67 (1H, d, J = 9.1 Hz), 5.29 (1H, d, J = 3.0 Hz), 5.03 (1H, dd, J = 11.2, 3.0 Hz), 4.77 (1H, d, J = 9.1 Hz), 4.26-4.06 (3H, m), 4.00-3.81 (4H, m), 3.79 (6H, s), 3.75-3.50 (12H, m), 3.23-3.11 (2H, m), 2.15 (3H, s), 2.01 (3H, s), 1.94 (6H, s).

$C_{44}H_{57}NO_{16}$: $[M+Na]^+$ 計算值878，實測值878.

【0310】(32E)

乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-3,4-二乙醯氧基-6-[2-[2-[2-[(2R)-3-[雙(4-甲氧基苯基)-苯基甲氧基]-2-[2-氰基乙氧基-(二異丙胺基)膦基]氧基丙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]四氫吡喃-2-基]甲酯(化合物32E)之合成

[化134]



將步驟(32D)中合成之化合物32D(1.9 g，2.2 mmol)藉由適量之甲苯共沸後，溶解於二氯甲烷(22 mL)中。添加N,N-二異丙基乙基胺(1.6 mL，9.0 mmol)、2-氰基乙基二異丙基氯亞磷醯胺(0.59 mL，2.7 mmol)，於室溫下攪拌1小時。反應結束後，將溶劑減壓蒸餾去除，而獲得粗產物。藉由矽膠管柱層析法(己烷：乙酸乙酯＝50：50-0：100，v/v，含有1%三乙胺)將其進行精製，而獲得非晶狀之目標物32E(1.5 g，產率64%)。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 7.47-7.40 (2H, m), 7.36-7.16 (7H, m), 6.85-6.78 (4H, m), 6.45-6.38 (1H, m), 5.33-5.28 (1H, m), 5.03-4.94 (1H, m), 4.80-4.75 (1H, m), 4.27-4.08 (3H, m), 3.93-3.45 (26H, m), 3.28-3.04 (2H, m), 2.69-2.40 (2H, m), 2.15 (3H, s), 2.04 (3H, s), 1.97-1.92 (6H, m), 1.21-1.01 (12H, m).

【0311】(實施例107)

HO-X^{12}-X^{12}-X^{12}-A^{m1s}-A^{e2s}-U^{m1s}-C^{m1s}-C^{e2s}-G^{m1s}-A^{m1s}-T^{e2s}-G^{m1s}-G^{m1s}-C^{e2s}-G^{m1s}-A^{m1s}-A^{e2s}-G^{m1t}-H (序列編號40)

將X之部分置換為X^{12}，與實施例91同樣地進行合成。X^{12}之部分係使

用參考例32中合成之化合物32E，進行3次縮合。

【0312】本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第92號至第106號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6839.16)。

【0313】(實施例108)

HO-X^9-X^9-X^9-X^9-X^9-A^{mls}-A^{e2s}-U^{mls}-C^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-T^{e2s}-G^{mls}-G^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-A^{e2s}-G^{mlt}-H (序列編號40)

將X之部分置換為X^9，與實施例91同樣地進行合成。X^9之部分係使用參考例29中合成之化合物29E，進行5次縮合。

本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第92號至第106號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：7817.33)。

【0314】(實施例109)

HO-X^9-X^9-X^9-X^9-X^9-X^9-A^{mls}-A^{e2s}-U^{mls}-C^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-T^{e2s}-G^{mls}-G^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-A^{e2s}-G^{mlt}-H (序列編號40)

將X之部分置換為X^9，與實施例91同樣地進行合成。X^9之部分係使用參考例29中合成之化合物29E，進行7次縮合。

本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號

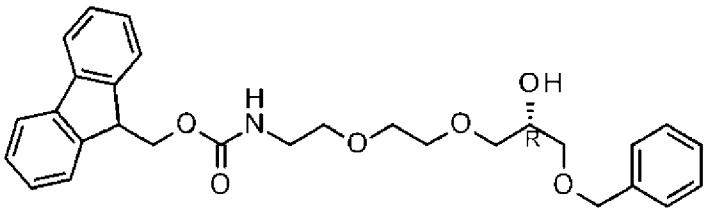
728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第92號至第106號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：8796.73)。

【0315】(參考例33)

(33A)

N-[2-[2-[(2R)-3-苄氧基-2-羥基-丙氧基]乙氧基]乙基]胺基甲酸9H-芴-9-基甲酯(化合物33A)之合成

[化135]



將文獻已知化合物之N-[2-(2-羥基乙氧基)乙基]胺基甲酸9H-芴-9-基甲酯(Bioconjugate Chemistry, 2000, 11, 755-761)(3.11 g，10 mmol)與苄基(S)-(+)-縮水甘油醚(0.8 g，5 mmol)溶解於二氯甲烷(30 mL)中，添加三氟化硼-二乙醚錯合物(0.1 mL，1 mmol)，於室溫下攪拌16小時。反應結束後，添加飽和碳酸氫鈉水溶液。利用飽和碳酸氫鈉水溶液、飽和食鹽水洗淨有機層後，利用無水硫酸鈉進行乾燥、過濾，將溶劑減壓蒸餾去除而獲得粗產物。藉由矽膠管柱層析法(己烷：乙酸乙酯＝80：20-0：100，v/v)進行精製，而獲得油狀之目標物33A(0.74 g，產率30%)。

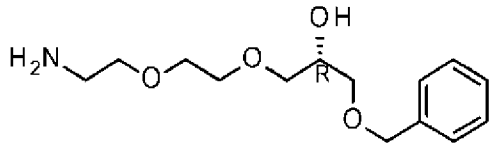
^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 7.76 (2H, d, J = 7.9 Hz), 7.60 (2H, d, J = 7.3 Hz), 7.42-7.37 (2H, m), 7.35-7.27 (7H, m), 5.40 (1H, s), 4.53 (2H, s), 4.39 (2H, d, J = 6.7 Hz), 4.25-4.19 (1H, m), 4.04-3.97 (1H, m), 3.69-3.35 (12H, m).

$C_{29}H_{33}NO_6$: $[M+H]^+$ 計算值492，實測值492.

【0316】(33B)

(2R)-1-[2-(2-胺基乙氧基)乙氧基]-3-苄氧基-丙烷-2-醇、三氟乙酸鹽(化合物33B)之合成

[化136]



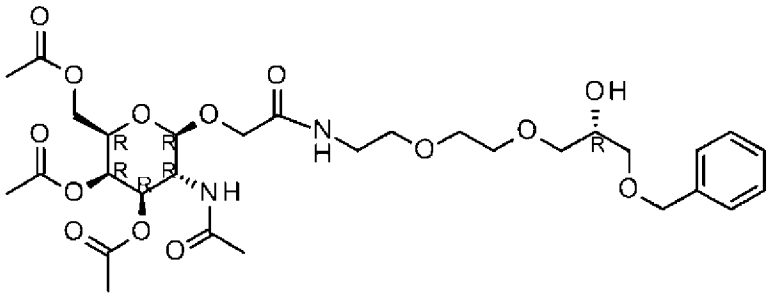
將步驟(33A)中合成之化合物33A(13.8 g，28.1 mmol)溶解於乙醇/四氫呋喃(50 mL/50 mL)中，添加1 N氫氧化鈉水溶液(100 mL)，於室溫下攪拌2小時。反應結束後，將有機溶劑減壓蒸餾去除，添加1 N鹽酸(100 mL)。藉由過濾將產生之固形物去除。利用乙酸乙酯對作為通過液之水層所含之副產物進行萃取，減壓蒸餾去除後於所獲得之殘渣中添加乙腈並過濾。將通過液進行減壓蒸餾去除而獲得粗產物。藉由以0.1%三氟乙酸水溶液與0.1%三氟乙酸乙腈溶液作為溶離液之逆相HPLC(GL Science，Inertsil ODS-3)進行分離精製，將含有目標物之組分彙集，將溶劑減壓蒸餾去除，而獲得油狀之目標物33B(7.1 g，產率66%)。

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

【0317】(33C)

乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-3,4-二乙醯氧基-6-[2-[2-[2-[(2R)-3-苄氧基-2-羥基-丙氧基]乙氧基]乙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]四氫吡喃-2-基]甲酯(化合物33C)之合成

[化137]



將文獻已知化合物之2-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙醯胺-4,5-二乙醯氧基-6-(乙醯氧基甲基)四氫吡喃-2-基]氧基乙酸(WO2012037254)(6 g，14.8 mmol)、1-(-3-二甲胺基丙基)-3-乙基碳二醯亞胺鹽酸鹽(3.4 g，17.8 mmol)、3H-1,2,3-三唑[4,5-b]吡啶-3-醇(2.0 g，14.8 mmol)、N,N-二異丙基乙基胺(9.0 mL，51.8 mmol)、步驟(33B)中合成之化合物33B(6.7 g，17.5 mmol)溶解於二氯甲烷(130 mL)中，於室溫下攪拌4小時。反應結束後，利用1 N鹽酸、飽和碳酸氫鈉水溶液、飽和食鹽水洗淨有機層後，利用無水硫酸鈉進行乾燥、過濾，將溶劑減壓蒸餾去除而獲得粗產物。將溶劑減壓蒸餾去除，而獲得粗產物。藉由矽膠管柱層析法(乙酸乙酯：甲醇＝100：0-90：10，v/v)進行精製，而獲得非晶狀之目標物33C(7.9 g，產率81%)。

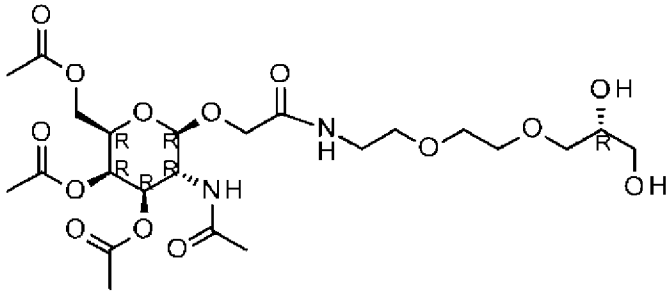
^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 7.39-7.28 (5H, m), 7.00-6.93 (1H, m), 6.50-6.44 (1H, m), 5.33-5.29 (1H, m), 5.16 (1H, dd, J = 11.5, 3.6 Hz), 4.63-4.53 (3H, m), 4.34 (1H, d, J = 15.1 Hz), 4.22-3.83 (5H, m), 3.73-3.26 (13H, m), 2.15 (3H, s), 2.05 (3H, s), 1.99 (6H, s).

$C_{30}H_{44}N_2O_{14}$: $[M+H]^+$ 計算值657，實測值657.

【0318】(33D)

乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-3,4-二乙醯氧基-6-[2-[2-[2-[(2R)-2,3-二羥基丙氧基]乙氧基]乙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]四氫吡喃-2-基]甲酯乙酸酯(化合物33D)之合成

[化138]



將步驟(33C)中合成之化合物33C(7.9 g，12 mmol)溶解於乙醇(80 mL)中。添加20%氫氧化鈀/碳(濕基)(2.0 g)，於氫氣環境下在50℃下遽烈攪拌8小時。反應結束後過濾，將所獲得之通過液進行減壓蒸餾去除。獲得非晶狀之目標物33D(6.7 g，產率98%)。

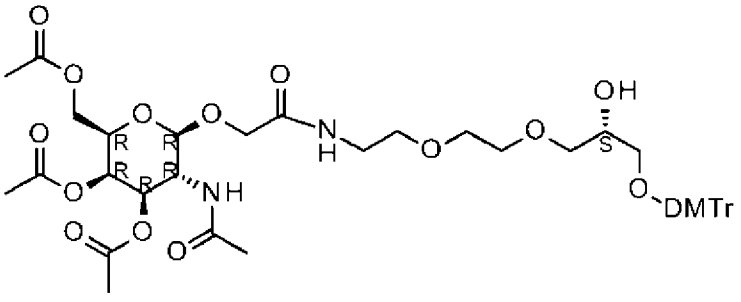
^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 7.03-6.98 (1H, m), 6.43 (1H, d, J = 9.1 Hz), 5.35 (1H, d, J = 3.3 Hz), 5.15 (1H, dd, J = 11.2, 3.3 Hz), 4.58 (1H, d, J = 7.9 Hz), 4.35 (1H, d, J = 15.7 Hz), 4.28-3.82 (5H, m), 3.77-3.34 (13H, m), 2.18 (3H, s), 2.06 (3H, s), 2.03 (3H, s), 2.01 (3H, s).

$C_{23}H_{38}N_2O_{14}$: $[M+H]^+$ 計算值568，實測值568.

【0319】(33E)

乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-3,4-二乙醯氧基-6-[2-[2-[2-[(2S)-3-[雙(4-甲氧基苯基)-苯基-甲氧基]-2-羥基-丙氧基]乙氧基]乙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]四氫吡喃-2-基]甲酯(化合物33E)之合成

[化139]



於步驟(33D)中合成之化合物33D(6.8 g，12 mmol)中添加適量之吡啶，於減壓下進行共沸。溶解於吡啶(40 mL)中，添加4,4'-二甲氧基三苯氯甲烷(4.5 g，13 mmol)，於室溫下攪拌2小時。反應結束後，將溶劑減壓蒸餾去除。添加適量之甲苯而共沸後，獲得粗產物。藉由矽膠管柱層析法(乙酸乙酯：乙酸乙酯/甲醇(5/1)＝100：0-50：50，v/v，含有1%三乙胺)將其進行精製，而獲得非晶狀之目標物33E(6.9 g，產率66%)。

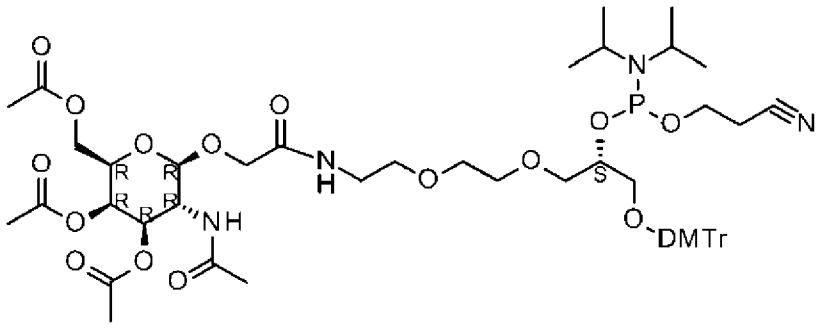
^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 7.42 (2H, d, J = 7.9 Hz), 7.33-7.19 (7H, m), 7.01-6.94 (1H, m), 6.83 (4H, d, J = 9.1 Hz), 6.37 (1H, d, J = 8.5 Hz), 5.33 (1H, d, J = 3.3 Hz), 5.15 (1H, dd, J = 11.2, 3.3 Hz), 4.58 (1H, d, J = 7.9 Hz), 4.32 (1H, d, J = 15.7 Hz), 4.22-3.86 (5H, m), 3.79 (6H, s), 3.66-3.12 (13H, m), 2.13 (3H, s), 2.03 (3H, s), 1.97 (3H, s), 1.95 (3H, s).

$C_{44}H_{56}N_2O_{16}$: $[M+Na]^+$ 計算值893，實測值892.

【0320】(33F)

乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-3,4-二乙醯氧基-6-[2-[2-[2-[(2S)-3-[雙(4-甲氧基苯基)-苯基-甲氧基]-2-[2-氰基乙氧基-(二異丙胺基)膦基]氧基-丙氧基]乙氧基]乙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]四氫吡喃-2-基]甲酯(化合物33F)之合成

[化140]



將步驟(33E)中合成之化合物33E(6.9 g，7.9 mmol)藉由適量之甲苯

共沸後，溶解於二氯甲烷(80 mL)中。添加N,N-二異丙基乙基胺(5.5 mL，32 mmol)、2-氰基乙基二異丙基氯亞磷醯胺(2.1 mL，9.5 mmol)，於室溫下攪拌1小時。反應結束後，將溶劑減壓蒸餾去除，而獲得粗產物。藉由矽膠管柱層析法(乙酸乙酯：乙酸乙酯/甲醇(5/1)＝100：0-50：50，v/v，含有1%三乙胺)將其進行精製，而獲得非晶狀之目標物33F(6.6 g，產率78%)。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 7.47-7.40 (2H, m), 7.35-7.17 (7H, m), 6.98-6.91 (1H, m), 6.85-6.78 (4H, m), 6.05-5.89 (1H, m), 5.37-5.33 (1H, m), 5.17-5.07 (1H, m), 4.59-4.49 (1H, m), 4.37-4.30 (1H, m), 4.23-3.06 (28H, m), 2.69-2.42 (2H, m), 2.15 (3H, s), 2.05 (3H, s), 2.02-1.98 (3H, m), 1.97-1.94 (3H, m), 1.30-1.00 (12H, m).

【0321】 (實施例110)

HO-X^{13}-X^{13}-X^{13}-A^{m1s}-A^{e2s}-U^{m1s}-C^{m1s}-C^{e2s}-G^{m1s}-A^{m1s}-T^{e2s}-G^{m1s}-G^{m1s}-C^{e2s}-G^{m1s}-A^{m1s}-A^{e2s}-G^{m1t}-H (序列編號40)

將X之部分置換為X^{13}，與實施例91同樣地進行合成。X^{13}之部分係使用參考例33中合成之化合物33F，進行3次縮合。

【0322】 本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第92號至第106號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6878.11)。

【0323】 (實施例111)

HO-X^{13}-X^{13}-X^{13}-X^{13}-X^{13}-A^{m1s}-A^{e2s}-U^{m1s}-C^{m1s}-C^{e2s}-G^{m1s}-A^{m1s}-T^{e2s}-G^{m1s}-

G^{m1s}-C^{e2s}-G^{m1s}-A^{m1s}-A^{e2s}-G^{m1t}-H (序列編號40)

將X之部分置換為X^{13}，與實施例91同樣地進行合成。X^{13}之部分係使用參考例33中合成之化合物33F，進行5次縮合。

【0324】 本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第92號至第106號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：7882.43)。

【0325】 (實施例112)

HO-X^{13}-X^{13}-X^{13}-X^{13}-X^{13}-X^{13}-X^{13}-A^{m1s}-A^{e2s}-U^{m1s}-C^{m1s}-C^{e2s}-G^{m1s}-A^{m1s}-T^{e2s}-G^{m1s}-G^{m1s}-C^{e2s}-G^{m1s}-A^{m1s}-A^{e2s}-G^{m1t}-H (序列編號40)

將X之部分置換為X^{13}，與實施例91同樣地進行合成。X^{13}之部分係使用參考例33中合成之化合物33F，進行7次縮合。

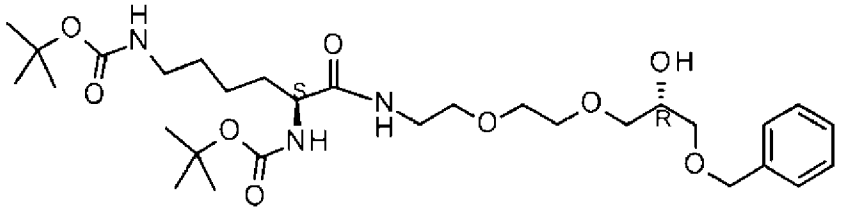
【0326】 本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第92號至第106號互補之序列。化合物係於以下之HPLC條件下進行分析。分析管柱使用Clarity Oligo-MS C18 (Phenomenex製造) (2.6 μm，50×2.1 mm)，流動相A使用100 mM六氟異丙醇、8 mM三乙胺水溶液，流動相B使用甲醇，於流動相B於4分鐘內自10%變化為25%之梯度、流速0.5 mL/min、60℃下進行分析。化合物之HPLC保持時間為3.0分鐘。

【0327】 (參考例34)

(34A)

N-[(5S)-6-[2-[2-[(2R)-3-苄氧基-2-羥基-丙氧基]乙氧基]乙基胺基]-5-(第三丁氧基羰基胺基)-6-側氧基-己基]胺基甲酸第三丁酯(化合物34A)之合成

[化141]



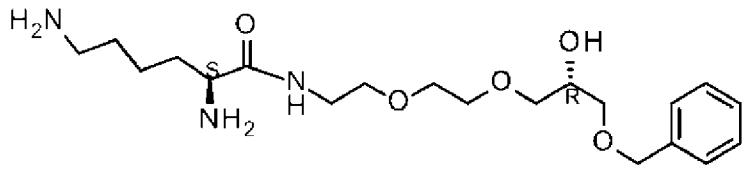
將(2S)-2,6-雙(第三丁氧基羰基胺基)己酸(1.7 g，4.9 mmol)、1-(-3-二甲胺基丙基)-3-乙基碳二醯亞胺鹽酸鹽(1.3 g，6.9 mmol)、3H-1,2,3-三唑[4,5-b]吡啶-3-醇(0.67 g，4.9 mmol)、N,N-二異丙基乙基胺(3.0 mL，17 mmol)、步驟(33B)中合成之化合物33B(2.1 g，5.4 mmol)溶解於二氯甲烷(40 mL)中，於室溫下攪拌4小時。進而，添加1-(-3-二甲胺基丙基)-3-乙基碳二醯胺鹽酸鹽(1.3 g，6.9 mmol)、N,N-二異丙基乙基胺(1.0 ml，5.7 mmol)並整夜攪拌。反應結束後，利用1 N鹽酸、飽和碳酸氫鈉水溶液、飽和食鹽水洗淨有機層後，利用無水硫酸鈉進行乾燥、過濾，將溶劑減壓蒸餾去除，而獲得含有化合物34A之粗產物(3.1 g)。不再進一步進行精製，將全部量用於下一反應中。

$C_{30}H_{51}N_3O_9$: $[M+H]^+$ 計算值599，實測值599.

【0328】(34B)

(2S)-2,6-二胺基-N-[2-[2-[(2R)-3-苄氧基-2-羥基-丙氧基]乙氧基]乙基]己醯胺TFA鹽(trifluoroacetate，三氟乙酸鹽)(化合物34B)之合成

[化142]



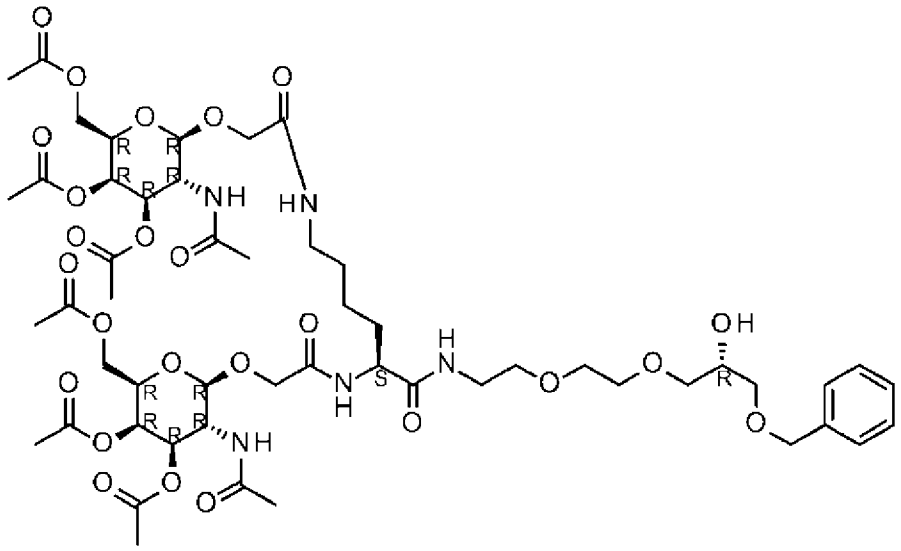
將步驟(34A)中合成之含有化合物34A之粗產物(3.1 g)溶解於二氯甲烷(24 mL)/三氟乙酸(6 mL)中，於室溫下攪拌90分鐘。反應結束後，將溶劑減壓蒸餾去除，添加適量之二氯甲烷，再次將溶劑減壓蒸餾去除。繼而，添加適量之乙腈/蒸餾水(4/1)，再次將溶劑減壓蒸餾去除。重複上述操作直至可去除過量之三氟乙酸為止。獲得含有化合物34B之粗產物(3.8 g)。不再進一步進行精製，將全部量用於下一反應中。

$C_{20}H_{35}N_3O_5$: $[M+H]^+$ 計算值399，實測值398.

【0329】(34C)

乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-6-[2-[[(5S)-5-[[2-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙醯胺-4,5-二乙醯氧基-6-(乙醯氧基甲基)四氫吡喃-2-基]氧基乙醯基]胺基]-6-[2-[2-[(2R)-3-苄氧基-2-羥基-丙氧基]乙氧基]乙基胺基]-6-側氧基-己基]胺基]-2-側氧基-乙氧基]-3,4-二乙醯氧基-四氫吡喃-2-基]甲酯(化合物34C)之合成

[化143]



將文獻已知化合物之2-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙醯胺-4,5-二乙醯氧基-6-(乙醯氧基甲基)四氫吡喃-2-基]氧基乙酸(WO2012037254)(3.5 g，8.6 mmol)、1-(-3-二甲胺基丙基)-3-乙基碳二醯亞胺鹽酸鹽(2.3 g，12 mmol)、3H-1,2,3-三唑[4,5-b]吡啶-3-醇(1.3 g，9.6 mmol)、N,N-二異丙基乙基胺(10 mL，59 mmol)、步驟(34B)中合成之含有化合物34B之粗產物溶解於二氯甲烷(80 mL)中，於室溫下整夜攪拌。反應結束後，利用1 N鹽酸、飽和碳酸氫鈉水溶液、飽和食鹽水洗淨有機層後，利用無水硫酸鈉進行乾燥、過濾，將溶劑減壓蒸餾去除而獲得粗產物。將溶劑減壓蒸餾去除，而獲得粗產物。藉由矽膠管柱層析法(乙酸乙酯：甲醇＝100：0-70：30，v/v)進行精製，而獲得非晶狀之目標物34C(3.5 g，產率62%(3步))。

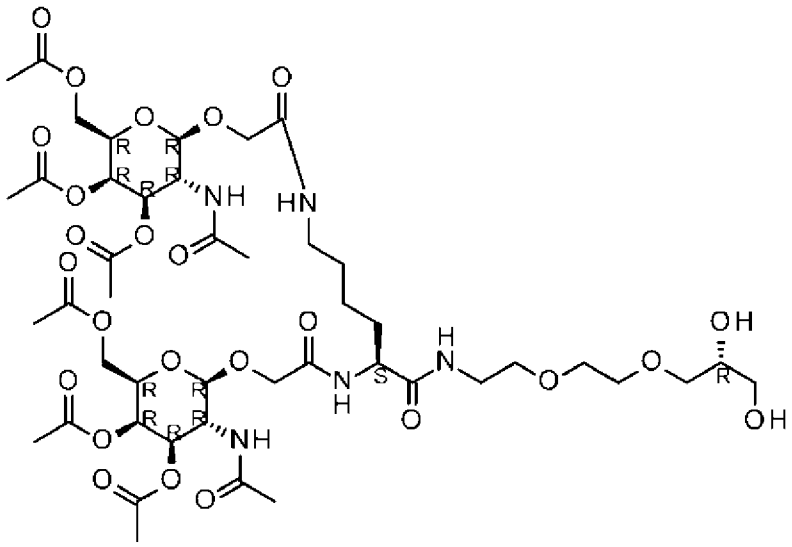
^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 7.50-7.44 (1H, m), 7.39-7.28 (5H, m), 7.17-7.11 (2H, m), 6.94-6.88 (1H, m), 6.30-6.26 (1H, m), 5.37-5.32 (2H, m), 5.09-4.99 (2H, m), 4.57 (2H, s), 4.56-3.11 (30H, m), 2.18 (3H, s), 2.16 (3H, s), 2.07-1.99 (15H, m), 1.97 (3H, s), 1.96-1.34 (6H, m).

$C_{52}H_{77}N_5O_{25}$: $[M+H]^+$ 計算值1172，實測值1173.

【0330】 (34D)

乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-6-[2-[[(5S)-5-[[2-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙醯胺-4,5-二乙醯氧基-6-(乙醯氧基甲基)四氫吡喃-2-基]氧基乙醯基]胺基]-6-[2-[2-[(2R)-2,3-二羥基丙氧基]乙氧基]乙基胺基]-6-側氧基-己基]胺基]-2-側氧基-乙氧基]-3,4-二乙醯氧基-四氫吡喃-2-基]甲酯(化合物34D)之合成

[化144]



將步驟(34C)中合成之化合物34C(3.5 g，3.0 mmol)溶解於乙醇(40 mL)中。添加20%氫氧化鈀/碳(濕基)(1.2 g)，於氫氣環境下在50℃下遽烈攪拌8小時。反應結束後過濾，將所獲得之通過液進行減壓蒸餾去除。獲得非晶狀之目標物34D(3.14 g，產率97%)。

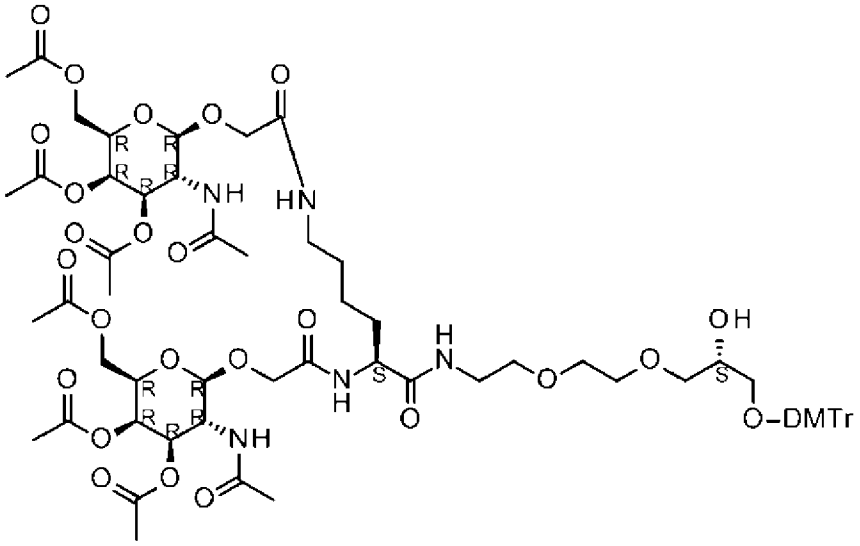
^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 7.72-7.67 (1H, m), 7.16 (2H, d, J = 9.1 Hz), 7.04-6.98 (1H, m), 6.27 (1H, d, J = 9.1 Hz), 5.36 (2H, d, J = 3.0 Hz), 5.10-4.99 (2H, m), 4.67-3.07 (30H, m), 2.18 (3H, s), 2.17 (3H, s), 2.08-2.00 (15H, m), 1.98 (3H, s), 1.93-1.33 (6H, m).

$C_{45}H_{71}N_5O_{25}$: $[M+H]^+$ 計算值1082，實測值1083.

【0331】(34E)

乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-6-[2-[[(5S)-5-[[2-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙醯胺-4,5-二乙醯氧基-6-(乙醯氧基甲基)四氫吡喃-2-基]氧基乙醯基]胺基]-6-[2-[2-[(2S)-3-[雙(4-甲氧基苯基)-苯基-甲氧基]-2-羥基-丙氧基]乙氧基]乙基胺基]-6-側氧基-己基]胺基]-2-側氧基-乙氧基]-3,4-二乙醯氧基-四氫吡喃-2-基]甲酯(化合物34E)之合成

[化145]



於步驟(34D)中合成之化合物34D(3.14 g，2.9 mmol)中添加適量之吡啶，於減壓下進行共沸。溶解於吡啶(10 ml)中，添加4,4'-二甲氧基三苯氯甲烷(1.1 g，3.2 mmol)，於室溫下攪拌2小時。反應結束後，添加甲苯(20 mL)、乙醇(1 mL)、N,N-二異丙基乙基胺(1 mL)，將溶劑進行減壓蒸餾去除後，獲得粗產物。藉由矽膠管柱層析法(乙酸乙酯：乙酸乙酯/甲醇(5/1)＝100：0-50：50，v/v，含有1%三乙胺)將其進行精製，而獲得非晶狀之目標物34E(2.5 g，產率62%)。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 7.60-7.55 (1H, m), 7.43 (2H, d, J = 7.3 Hz), 7.35-7.20 (7H, m), 7.17-7.10 (2H, m), 6.92-6.87 (1H, m), 6.83 (4H, d, J = 9.1 Hz), 6.30 (1H, d, J = 9.1 Hz), 5.36-5.30 (2H, m), 5.09-4.95 (2H, m), 4.60-3.07 (36H, m), 2.19-2.14 (6H, m), 2.06-1.99 (15H, m), 1.97 (3H, s), 1.70-1.34 (6H, m).

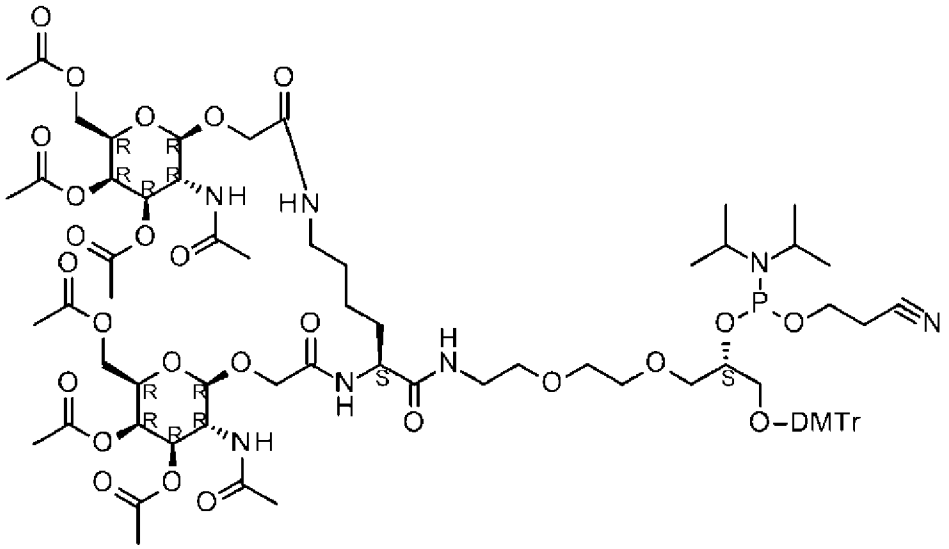
$C_{66}H_{89}N_5O_{27}$: $[M+Na]^+$ 計算值1407，實測值1407.

【0332】(34F)

乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-6-[2-[[(5S)-5-[[2-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙醯胺-4,5-二乙醯氧基-6-(乙醯氧基甲基)四氫吡喃-2-基]氧基乙醯基]胺

基]-6-[2-[2-[(2S)-3-[雙(4-甲氧基苯基)-苯基-甲氧基]-2-[2-氰基乙氧基-(二異丙胺基)膦基]氧基-丙氧基]乙氧基]乙基胺基]-6-側氧基-己基]胺基]-2-側氧基-乙氧基]-3,4-二乙醯氧基-四氫吡喃-2-基]甲酯(化合物34F)之合成

[化146]



將步驟(34E)中合成之化合物34E(2.5 g，1.8 mmol)藉由適量之甲苯/二氯甲烷(3/1)共沸後，溶解於二氯甲烷(18 mL)中。添加N,N-二異丙基乙基胺(1.3 mL，7.2 mmol)、2-氰基乙基二異丙基氯亞磷醯胺(0.48 mL，2.2 mmol)，於室溫下攪拌1小時。反應結束後，將溶劑減壓蒸餾去除，而獲得粗產物。藉由矽膠管柱層析法(乙酸乙酯：乙酸乙酯/甲醇(5/1)＝100：0-50：50，v/v，含有1%三乙胺)將其進行精製，而獲得非晶狀之目標物34F(2.1 g，產率73%)。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 7.47-7.41 (2H, m), 7.35-7.05 (10H, m), 6.89-6.78 (5H, m), 6.35-6.25 (1H, m), 5.37-5.34 (2H, m), 5.11-4.98 (2H, m), 4.55-3.08 (40H, m), 2.70-2.45 (2H, m), 2.18 (3H, s), 2.17 (3H, s), 2.07-1.99 (15H, m), 1.98-1.94 (3H, m), 1.91-1.31 (6H, m), 1.21-1.02 (12H, m).

【0333】 (實施例113)

HO-X^{14}-A^{mls}-A^{e2s}-U^{mls}-C^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-T^{e2s}-G^{mls}-G^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-A^{e2s}-G^{mlt}-H (序列編號40)

將X之部分置換為X^{14}，與實施例91同樣地進行合成。X^{14}之部分係使用參考例34中合成之化合物34F，進行1次縮合。

【0334】 本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第92號至第106號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6263.04)。

【0335】 (實施例114)

HO-X^{14}-X^{14}-A^{mls}-A^{e2s}-U^{mls}-C^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-T^{e2s}-G^{mls}-G^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-A^{e2s}-G^{mlt}-H (序列編號40)

將X之部分置換為X^{14}，與實施例91同樣地進行合成。X^{14}之部分係使用參考例34中合成之化合物34F，進行2次縮合。

【0336】 本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第92號至第106號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：7154.36)。

【0337】 (實施例115)

HO-X^{14}-X^{14}-X^{14}-A^{mls}-A^{e2s}-U^{mls}-C^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-T^{e2s}-G^{mls}-G^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-A^{e2s}-G^{mlt}-H (序列編號40)

將X之部分置換為X^{14}，與實施例91同樣地進行合成。X^{14}之部分係使

用參考例34中合成之化合物34F，進行3次縮合。

【0338】 本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第92號至第106號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：8046.64)。

【0339】 (實施例116～127)封入有寡核苷酸之核酸脂質粒子之製備

將二硬脂醯基磷脂醯膽鹼(1,2-二硬脂醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine)：以下表述為DSPC，NOF CORPORATION)、膽固醇(Cholesterol：以下表述為Chol，Sigma-Aldrich, Inc.)、國際公開第2015/005253所記載之實施例8之化合物(設為LP)、及N-[甲氧基 聚(乙二醇)2000]胺甲醯基]-1,2-二肉豆蔻氧基丙基-3-胺(以下表述為PEG-C-DMA，NOF CORPORATION)以DSPC：Chol：LP：PEG-C-DMA＝10：48：40：2之莫耳比而以於乙醇中總脂質濃度成為5 mM之方式製備脂質溶液。

【0340】 將寡核苷酸(21e_002、18e_005、21m_002、18e_005、18m_022、15e_001、15ed_001、18e_008、18e_025、18m_008、15e_002、及15ed_002)分別溶解於檸檬酸緩衝液(20 mM，檸檬酸鹽緩衝液(Citrate Buffer)，pH值4.0)中，而製備寡核苷酸溶液。

【0341】 將上述脂質溶液與寡核苷酸溶液以來自LP之氮原子(N)與來自寡核苷酸之磷原子(P)之比率(N/P)成為3之方式，使用NanoAssemblr Benchtop(註冊商標。Precision Nanosystems)，於附屬之微流路筒內加以混合(流速：12 mL/min，混合體積比率：脂質溶液：寡核苷酸溶液＝1：

3，溫度：室溫)，而獲得核酸脂質粒子之分散液。繼而，利用約2 L之磷酸緩衝液(pH值7.4)將核酸脂質粒子之分散液透析12-18小時(Float-A-Lyzer G2，MWCO：1000 kD，Spectra/Por)，藉此去除乙醇及進行中和，而獲得封入有寡核苷酸之核酸脂質粒子經精製之分散液。為了調整濃度，可適當藉由超過濾(Amicon-Ultra，MWCO：100 kD，MILLIPORE)將核酸脂質粒子之分散液濃縮。

【0342】 對實施例116～127之封入寡核苷酸之核酸脂質粒子之特性進行評價。以下對各特性評價之方法進行說明。

【0343】 (1)寡核苷酸之封入率

寡核苷酸之封入率係使用Quant-iT RiboGreen RNA分析套組(Invitrogen)，依照隨附文件進行測定。即，於0.015%Triton X-100界面活性劑存在下及非存在下，對核酸脂質粒子之分散液中之寡核苷酸進行定量，藉由下式算出封入率。

{[界面活性劑存在下之寡核苷酸量]－[界面活性劑非存在下之寡核苷酸量]}/[界面活性劑存在下之寡核苷酸量]×100(%)

(2)寡核苷酸與脂質之比率

使用磷脂質C-Test Wako(和光純藥工業股份有限公司)，依照隨附文件測定核酸脂質粒子之分散液中之磷脂質量。即，於1%Triton X-100界面活性劑存在下，對試樣中之磷脂質進行定量。

藉由逆相層析法測定核酸脂質粒子之分散液中之膽固醇及LP量(系統：Agilent 1100系列，管柱：Chromolith Performance RP-18封端100-3整體化HPLC-管柱(Merck)，緩衝液A：0.01%三氟乙酸，緩衝液B：0.01%三氟乙酸，甲醇，梯度(B%)：82-97%(0-17 min)，流速：2

mL/min，溫度：50℃，檢測：205 nm)。

根據磷脂質量、膽固醇量、及LP量與構成脂質體之脂質成分之組成比算出總脂質量，根據上述(1)之「界面活性劑存在下之寡核苷酸量」，藉由下式算出寡核苷酸與脂質之比率。

[界面活性劑存在下之寡核苷酸濃度]/[總脂質濃度] (wt/wt)

(3)平均粒徑

脂質體之粒徑係藉由ζ電位/粒子尺寸NICOMPTM 380ZLS(PARTICLE SIZING SYSTEMS)進行測定。表中之平均粒徑表示體積平均粒徑，±以下表示偏差。

【0344】 將結果示於表11。

【0345】 (表11)

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

* ASO/脂質(wt/wt)：寡核苷酸與脂質之重量比。

【0346】 根據以上之結果可明確，寡核苷酸被封入脂質粒子內，該等核酸脂質粒子具有約50 nm至約70 nm之平均粒徑。

【0347】 (實施例128)

HO-X^{14}-A^{mls}-T^{e2s}-C^{mls}-C^{mls}-G^{e2s}-A^{mls}-U^{mls}-G^{e2s}-G^{mls}-C^{mls}-G^{e2s}-

A^{mls}-A^{mls}-G^{e2s}-C^{mlt}-H (序列編號44)

使用上述序列即15e_005代替實施例113所使用之序列，與實施例113同樣地進行合成。

【0348】 本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第91號至第105號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6210.94)。

【0349】 (實施例129)

HO-X^{14}-U^{mls}-C^{e2s}-C^{mls}-G^{mls}-A^{e2s}-U^{mls}-G^{mls}-G^{e2s}-C^{mls}-G^{mls}-A^{e2s}-A^{mls}-G^{mls}-C^{e2s}-U^{mlt}-H (序列編號45)

使用上述序列即15e_006代替實施例113所使用之序列，與實施例113同樣地進行合成。

【0350】 本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第90號至第104號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6201.95)。

【0351】 (實施例130)

HO-X^{14}-C^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-T^{e2s}-G^{mls}-G^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-A^{e2s}-G^{mls}-C^{mls}-T^{e2s}-G^{mlt}-H (序列編號41)

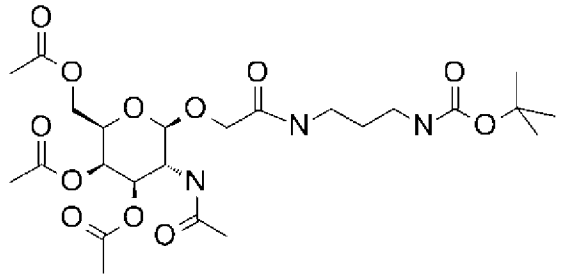
使用上述序列即15e_002代替實施例113所使用之序列，與實施例113同樣地進行合成。

【0352】 本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第89號至第103號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6268.98)。

【0353】 (參考例35)

(35A)乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-3,4-二乙醯氧基-6-[2-[3-(第三丁氧基羰基胺基)丙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]四氫吡喃-2-基]甲酯(化合物35A)之合成

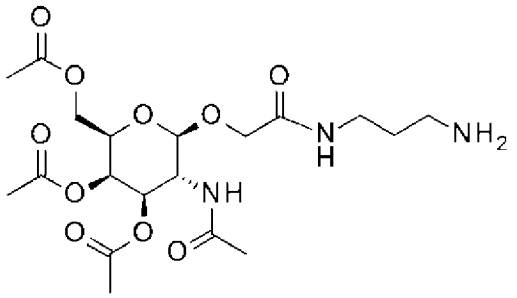
[化147]



於文獻已知化合物之2-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙醯胺-4,5-二乙醯氧基-6-(乙醯氧基甲基)四氫吡喃-2-基]氧基乙酸(WO2012037254)(10 g，24.7 mmol)、N-(3-胺基丙基)胺基甲酸第三丁酯(4.7 ml，27.1 mmol)之N,N-二甲基甲醯胺(70 ml)溶液中添加1-[雙(二甲胺基)亞甲基]-1H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶鎓3-氧化物六氟磷酸鹽(11.3 g，29.6 mmol)與N,N-二異丙基乙基胺(8.6 mL，49.3 mmol)，於室溫下攪拌40分鐘。反應結束後，添加乙酸乙酯，利用15%食鹽水、0.5 N鹽酸、飽和食鹽水、飽和碳酸氫鈉水溶液、飽和食鹽水洗淨有機層後，利用無水硫酸鈉進行乾燥、過濾，將溶劑減壓蒸餾去除而獲得粗產物。將溶劑減壓蒸餾去除，獲得含有表述目標物之粗產物約14 g。不再進一步進行精製，用於下一反應。

【0354】(35B)乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-3,4-二乙醯氧基-6-[2-(3-胺基丙基胺基)-2-側氧基-乙氧基]四氫吡喃-2-基]甲酯TFA鹽(化合物35B)之合成

[化148]

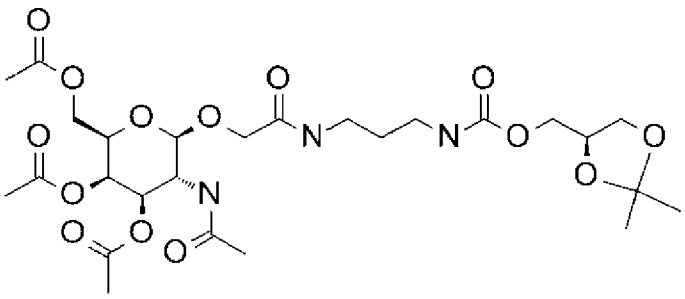


將步驟(35A)中合成之粗產物(14 g)溶解於二氯甲烷(40 ml)中，至反應結束為止，添加三氟乙酸共計16 ml。反應結束後，將溶劑減壓蒸餾去除而獲得粗產物。添加適量之二乙醚，進行傾析。添加適量之乙腈，進行減壓蒸餾去除。進而，添加適量之二氯甲烷，進行減壓蒸餾去除。獲得含有表述目標物之粗產物約15.9 g。不再進一步進行精製，用於下一反應。

$C_{19}H_{31}N_3O_{10}$: $[M+H]^+$ 計算值462，實測值462.

【0355】(35C)乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-3,4-二乙醯氧基-6-[2-[3-[[(4R)-2,2-二甲基-1,3-二氧雜環戊烷-4-基]甲氧基羰基胺基]丙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]四氫吡喃-2-基]甲酯(化合物35C)之合成

[化149]



將(S)-(+)-1,2-亞異丙基甘油(6.53 g，49.4 mmol)、氯甲酸4-硝基苯酯(9.96 g，49.4 mmol)溶解於二氯甲烷(200 ml)中，添加吡啶(7.95 ml，

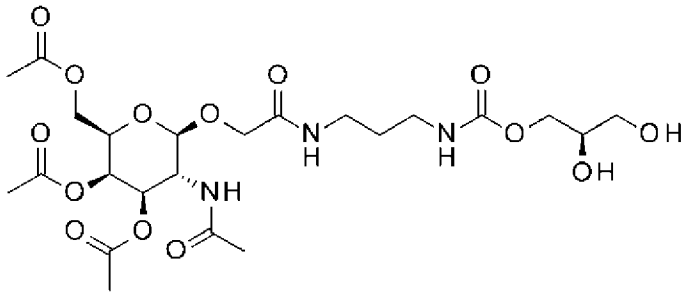
98.8 mmol)，於室溫下攪拌30分鐘。於該反應液中添加步驟(35B)中合成之粗產物(15.9 g)之二氯甲烷(100 ml)溶液、三乙胺(20.5 ml，148 mmol)，於室溫下整夜攪拌。反應結束後，利用0.5 N鹽酸、飽和食鹽水、飽和碳酸氫鈉水溶液、飽和食鹽水洗淨有機層後，利用無水硫酸鈉進行乾燥、過濾，將溶劑減壓蒸餾去除而獲得粗產物。藉由矽膠管柱層析法(乙酸乙酯：甲醇＝100：0-65：35，v/v)進行精製，而以固體之形式獲得目標物35C(9.0 g，產率59%(3步))。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 7.09-7.01 (1H, m), 6.16 (1H, d, J = 8.5 Hz), 5.53-5.46 (1H, m), 5.37 (1H, d, J = 3.6 Hz), 5.22-5.14 (1H, m), 4.53 (1H, d, J = 8.5 Hz), 4.41-3.99 (9H, m), 3.96-3.89 (1H, m), 3.79-3.71 (1H, m), 3.44-3.15 (4H, m), 2.17 (3H, s), 2.06 (3H, s), 2.04 (3H, s), 1.98 (3H, s), 1.80-1.58 (2H, m), 1.43 (3H, s), 1.37 (3H, s).

$C_{26}H_{41}N_3O_{14}$: $[M+Na]^+$ 計算值642，實測值642.

【0356】(35D)乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-3,4-二乙醯氧基-6-[2-[3-[[(2R)-2,3-二羥基丙氧基]羰基胺基]丙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]四氫吡喃-2-基]甲酯(化合物35D)之合成

[化150]



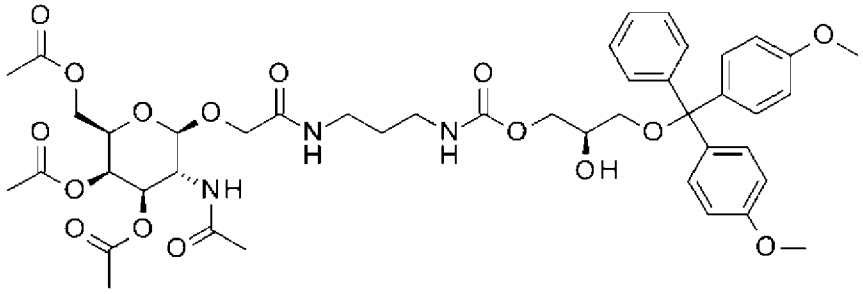
於步驟(35C)中合成之化合物(7.87 g，12.7 mmol)之甲醇溶液(160 ml)添加對甲苯磺酸(0.242 g，1.27 mmol)，進行整夜攪拌。反應結束

後，將溶劑減壓蒸餾去除，而獲得含有表述目標物之粗產物7.36 g。不再進一步進行精製，用於下一反應。

$C_{23}H_{37}N_3O_{14}$: $[M+H]^+$ 計算值580，實測值580，$[M+Na]^+$ 計算值602，實測值602.

【0357】(35E)乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-3,4-二乙醯氧基-6-[2-[3-[[(2R)-3-[雙(4-甲氧基苯基)-苯基-甲氧基]-2-羥基-丙氧基]羰基胺基]丙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]四氫吡喃-2-基]甲酯(化合物35E)之合成

[化151]



於步驟(35D)中合成之粗產物(7.36 g)中添加二氯甲烷(150 ml)、吡啶(10 ml)，將溶劑減壓蒸餾去除。其後，溶解於吡啶(60 ml)中，添加4,4'-二甲氧基三苯氯甲烷(5.59 g，16.5 mmol)，於室溫下攪拌30分鐘。反應結束後，添加甲醇(1.03 ml，25.4 mmol)、N,N-二異丙基乙基胺(4.42 mL，25.4 mmol)，將溶劑減壓蒸餾去除。藉由矽膠管柱層析法(乙酸乙酯：乙酸乙酯/甲醇(5/1)＝100：0-0：100，v/v，含有1%三乙胺)將其進行精製，而以固體之形式獲得目標物35E(4.51 g，產率40%)。

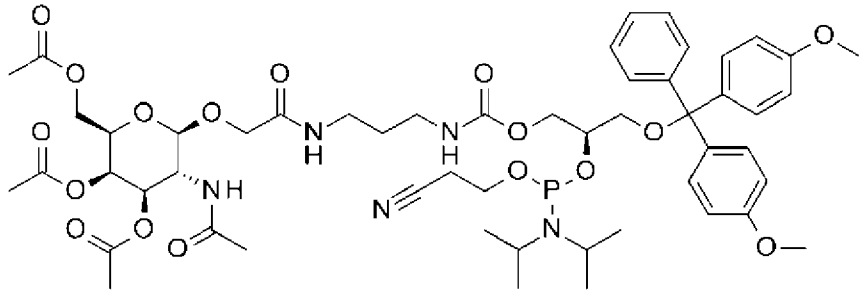
^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 7.45-7.39 (2H, m), 7.34-7.28 (6H, m), 7.24-7.18 (1H, m), 7.07-6.99 (1H, m), 6.86-6.80 (4H, m), 6.21 (1H, d, J = 8.5 Hz), 5.48-5.41 (1H, m), 5.36 (1H, d, J = 3.6 Hz), 5.19-5.13 (1H, m), 4.52 (1H, d, J = 8.5 Hz), 4.39-3.88 (9H, m), 3.79 (6H, s), 3.50-3.12 (6H,

m), 2.92 (1H, d, J = 4.8 Hz), 2.16 (3H, s), 2.05 (3H, s), 1.99 (3H, s), 1.95 (3H, s), 1.80-1.54 (2H, m).

$C_{44}H_{55}N_3O_{16}$: $[M+Na]^+$ 計算值904，實測值904.

【0358】(35F)乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-3,4-二乙醯氧基-6-[2-[3-[[(2R)-3-[雙(4-甲氧基苯基)-苯基-甲氧基]-2-[2-氰基乙氧基-(二異丙胺基)膦基]氧基-丙氧基]羰基胺基]丙基胺基]-2-側氧基-乙氧基]四氫吡喃-2-基]甲酯(化合物35F)之合成

[化152]



將步驟(35E)中合成之化合物35E(4.51 g，5.11 mmol)藉由適量之乙酸乙酯/甲苯(1/4)共沸後，溶解於二氯甲烷(90 ml)中。添加N,N-二異丙基乙基胺(3.56 ml，20.5 mmol)、2-氰基乙基二異丙基氯亞磷醯胺(1.57 ml，5.63 mmol)，於室溫下攪拌1小時。反應結束後，將溶劑減壓蒸餾去除，而獲得粗產物。藉由矽膠管柱層析法(乙酸乙酯：乙酸乙酯/甲醇(5/1)＝100：0-50：50，v/v，含有1%三乙胺)將其進行精製，而以固體之形式獲得目標物35F(3.97 g，產率72%)。

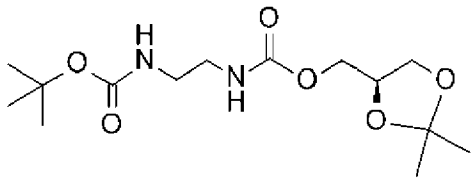
^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 7.47-7.38 (2H, m), 7.35-7.16 (7H, m), 7.12-7.04 (1H, m), 6.86-6.76 (4H, m), 6.25-6.12 (1H, m), 5.58-5.18 (3H, m), 4.61-4.53 (1H, m), 4.46-3.42 (19H, m), 3.39-3.02 (6H, m), 2.68-2.41 (2H, m), 2.19-2.13 (3H, m), 2.08-2.02 (3H, m), 2.01-1.91 (6H, m), 1.78-

1.54 (2H, m), 1.31-0.94 (12H, m).

【0359】(參考例36)

(36A)N-[2-(第三丁氧基羰基胺基)乙基]胺基甲酸[(4R)-2,2-二甲基-1,3-二氧雜環戊烷-4-基]甲酯(化合物36A)之合成

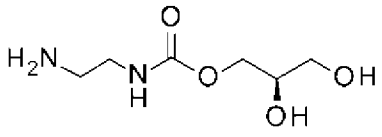
[化153]



將(S)-(+)-1,2-亞異丙基甘油(5.0 g，37.5 mmol)、氯甲酸4-硝基苯酯(7.55 g，37.5 mmol)溶解於二氯甲烷(150 ml)中，添加吡啶(5.0 ml，61.8 mmol)，於室溫下攪拌1小時。於該反應液中添加N-(2-胺基乙基)胺基甲酸第三丁酯(6 g，37.5 mmol)之二氯甲烷溶液(40 ml)、三乙胺(8.8 ml，63.7 mmol)，於室溫下攪拌1小時。反應結束後，反應結束後，利用0.5 N鹽酸、飽和食鹽水、飽和碳酸氫鈉水溶液、飽和食鹽水洗淨有機層後，利用無水硫酸鈉進行乾燥、過濾，將溶劑減壓蒸餾去除，而以固體之形式獲得含有目標物之粗產物(10.6 g)。不再進一步進行精製，用於下一反應。

【0360】(36B)N-(2-胺基乙基)胺基甲酸[(2R)-2,3-二羥基丙基]酯TFA鹽(化合物36B)之合成

[化154]

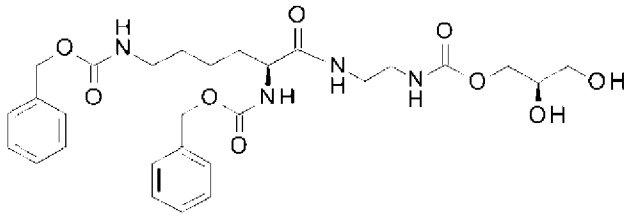


於步驟(36A)中合成之粗產物(10.6 g)中添加三氟乙酸(16.6 ml)、純水(5.55 ml)，於室溫下攪拌1小時。反應結束後，將溶劑減壓蒸餾去除。繼而，添加乙腈，將溶劑減壓蒸餾去除。進而，添加乙腈/純水(4/1)，將

溶劑進行減壓蒸餾去除後，於減壓下加以乾燥。獲得含有目標物之油狀之粗產物(14.3 g)。不再進一步進行精製，用於下一反應。

【0361】(36C)N-[(5S)-5-(苄氧基羰基胺基)-6-[2-[[(2R)-2,3-二羥基丙氧基]羰基胺基]乙基胺基]-6-側氧基-己基]胺基甲酸苄酯(化合物36C)之合成

[化155]

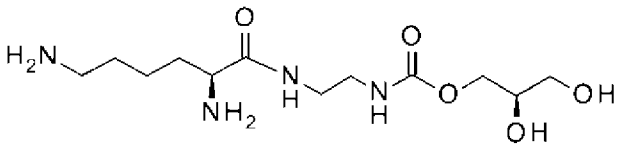


於N,N'-二-Cbz-L-離胺酸(13.7 g)之N,N-二甲基甲醯胺(100 ml)溶液中添加1-[雙(二甲胺基)亞甲基]-1H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶鎓3-氧化物六氟磷酸鹽(15.0 g，40 mmol)與N,N-二異丙基乙基胺(12 mL，66 mmol)。進而，添加步驟(36B)中合成之粗產物(9.7 g)與N,N-二異丙基乙基胺(12 mL，66 mmol)之N,N-二甲基甲醯胺(20 ml)溶液，於室溫下攪拌40分鐘。反應結束後，添加乙酸乙酯，利用15%食鹽水、0.5 N鹽酸、飽和食鹽水、飽和碳酸氫鈉水溶液、飽和食鹽水洗淨有機層後，利用無水硫酸鈉進行乾燥、過濾，將溶劑減壓蒸餾去除，而獲得固形物。利用1 N鹽酸、純水將該固形物洗淨後，利用二氯甲烷、二乙醚洗淨，其後於減壓下加以乾燥，而獲得含有目標物之粗產物(10.5 g)。

$C_{28}H_{38}N_4O_9$: $[M+H]^+$ 計算值575，實測值575.

【0362】(36D)N-[2-[[(2S)-2,6-二胺基己醯基]胺基]乙基]胺基甲酸[(2R)-2,3-二羥基丙基]酯鹽酸鹽(化合物36D)之合成

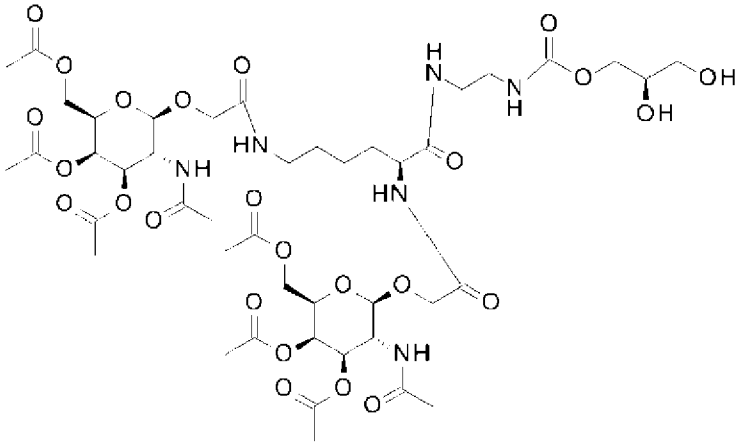
[化156]



將步驟(36C)中合成之粗產物(9.5 g)溶解於四氫呋喃/1當量濃度之鹽酸(36 ml)中，添加10%鈀碳(2.0 g)，於氫氣環境下在室溫下攪拌2.5小時。反應結束後進行過濾。將溶劑進行減壓蒸餾去除後，利用高速濃縮裝置V-10(Biotage)於減壓下加以乾燥。獲得表述目標化合物之粗產物(6.4 g)。不再進一步進行精製，用於下一反應。

【0363】(36E)乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-6-[2-[[(5S)-5-[[2-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙醯胺-4,5-二乙醯氧基-6-(乙醯氧基甲基)四氫吡喃-2-基]氧基乙醯基]胺基]-6-[2-[[(2R)-2,3-二羥基丙氧基]羰基胺基]乙基胺基]-6-側氧基-己基]胺基]-2-側氧基-乙氧基]-3,4-二乙醯氧基-四氫吡喃-2-基]甲酯(化合物36E)之合成

[化157]



於文獻已知化合物之2-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙醯胺-4,5-二乙醯氧基-6-(乙醯氧基甲基)四氫吡喃-2-基]氧基乙酸(WO2012037254)(2.64 g，6.5 mmol)、步驟(36D)中合成之粗產物(1.37 g，3.6 mmol)之N,N-二甲基甲醯胺(30 ml)溶液中添加1-[雙(二甲胺基)亞甲基]-1H-1,2,3-三唑并[4,5-b]

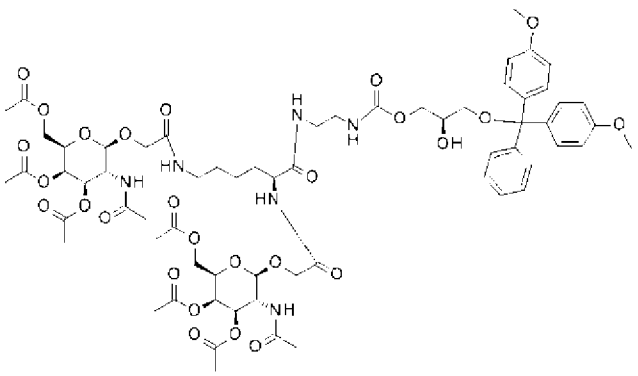
吡啶鎓3-氧化物六氟磷酸鹽(3.0 g，8.0 mmol)與N,N-二異丙基乙基胺(3.8 mL，21.7 mmol)，於室溫下攪拌40分鐘。反應結束後，添加二乙醚(500 ml)，獲得沈澱之殘渣。藉由以0.1%三氟乙酸水溶液與0.1%三氟乙酸乙腈溶液作為溶離液之逆相HPLC(GL Science，Inertsil ODS-3)進行分離精製，將含有目標物之組分彙集，將溶劑減壓蒸餾去除。獲得非晶狀之目標物(2.23 g，產率57%)。

^{1}H-NMR (DMSO-D_6) δ: 8.14-8.08 (1H, m), 8.03-7.91 (2H, m), 7.33-7.22 (2H, m), 7.16-7.10 (1H, m), 5.27-5.23 (2H, m), 5.01-4.93 (2H, m), 4.59-4.52 (2H, m), 4.26-3.55 (17H, m), 3.36-3.30 (2H, m), 3.18-2.86 (7H, m), 2.14-2.06 (6H, m), 2.04-1.98 (6H, m), 1.94-1.89 (6H, m), 1.88-1.79 (6H, m), 1.71-1.48 (2H, m), 1.47-1.35 (2H, m), 1.32-1.15 (2H, m).

$C_{44}H_{68}N_6O_{25}$: $[M+H]^+$ 計算值1081，實測值1081.

【0364】(36F)乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-6-[2-[[(5S)-5-[[2-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙醯胺-4,5-二乙醯氧基-6-(乙醯氧基甲基)四氫吡喃-2-基]氧基乙醯基]胺基]-6-[2-[[(2R)-3-[雙(4-甲氧基苯基)-苯基-甲氧基]-2-羥基-丙氧基]羰基胺基]乙基胺基]-6-側氧基-己基]胺基]-2-側氧基-乙氧基]-3,4-二乙醯氧基-四氫吡喃-2-基]甲酯(化合物36F)之合成

[化158]



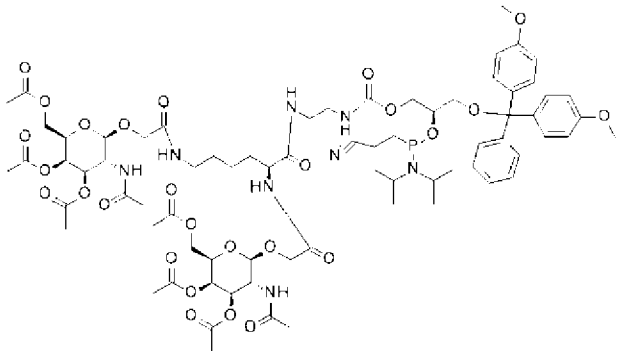
於步驟(36E)中合成之化合物(7.36 g，2.1 mmol)中添加吡啶(10 ml)，將溶劑減壓蒸餾去除。將該操作重複3次。其後，溶解於吡啶(10 ml)中，添加4,4'-二甲氧基三苯氯甲烷(0.77 g，2.3 mmol)，於室溫下攪拌30分鐘。反應結束後，添加乙醇(1.0 ml)、N,N-二異丙基乙基胺(1.0 mL)，將溶劑減壓蒸餾去除。藉由矽膠管柱層析法(乙酸乙酯：乙酸乙酯/甲醇(5/1)＝100：0-0：100，v/v，含有1%三乙胺)將其進行精製，而獲得非晶狀之目標物(1.17 g，產率41%)。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 7.47-7.38 (2H, m), 7.36-6.95 (10H, m), 6.86-6.79 (4H, m), 6.33-6.27 (1H, m), 5.53-4.99 (4H, m), 4.57-3.07 (30H, m), 2.21-2.14 (6H, m), 2.08-1.94 (18H, m), 1.92-1.07 (6H, m).

$C_{65}H_{86}N_6O_{27}$: $[M+Na]^+$ 計算值1406，實測值1406.

【0365】(36G)乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-6-[2-[[(5S)-5-[[2-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙醯胺-4,5-二乙醯氧基-6-(乙醯氧基甲基)四氫吡喃-2-基]氧基乙醯基]胺基]-6-[2-[[(2R)-3-[雙(4-甲氧基苯基)-苯基-甲氧基]-2-[2-氰基乙基-(二異丙胺基)膦基]氧基-丙氧基]羰基胺基]乙基胺基]-6-側氧基-己基]胺基]-2-側氧基-乙氧基]-3,4-二乙醯氧基-四氫吡喃-2-基]甲酯(化合物36G)之合成

[化159]



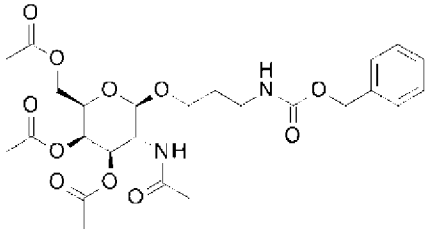
將步驟(36F)中合成之化合物36F(1.17 g，0.85 mmol)藉由適量之二氯甲烷/甲苯(1/4)共沸後，溶解於二氯甲烷(8 ml)中。添加N,N-二異丙基乙基胺(0.59 ml，3.4 mmol)、2-氰基乙基二異丙基氯亞磷醯胺(0.23 ml，1.0 mmol)，於室溫下攪拌1小時。反應結束後，將溶劑減壓蒸餾去除，而獲得粗產物。藉由矽膠管柱層析法(乙酸乙酯：乙酸乙酯/甲醇(5/1)＝100：0-0：100，v/v，含有1%三乙胺)將其進行精製，而獲得非晶狀之目標物36G(0.81 g，產率61%)。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 7.47-7.40 (2H, m), 7.36-7.10 (11H, m), 6.95-6.86 (1H, m), 6.85-6.78 (4H, m), 6.34-6.28 (1H, m), 5.56-5.33 (2H, m), 5.12-4.98 (2H, m), 4.52-3.04 (36H, m), 2.72-2.46 (2H, m), 2.20-2.15 (6H, m), 2.08-1.94 (18H, m), 1.93-1.81 (2H, m), 1.67-1.52 (2H, m), 1.46-1.34 (2H, m), 1.22-0.98 (12H, m).

【0366】(參考例37)

(37A)乙酸[(2R,3R,4R,5R)-5-乙醯胺-3,4-二乙醯氧基-6-[3-(苄氧基羰基胺基)丙氧基]四氫吡喃-2-基]甲酯(化合物37A)之合成

[化160]



於N-(3-羥基丙基)胺基甲酸苄酯(6.4 g，30.8 mmol)與文獻已知化合物之乙酸[(2R,3R,4R,5R)-5-乙醯胺-3,4,6-三乙醯氧基-四氫吡喃-2-基]甲酯(WO2011053614)(10 g，25.7 mmol)之二氯甲烷(200 ml)懸浮溶液中添加三氟甲磺酸(450 μl，5.1 mmol)，於45度下攪拌4小時。反應結束後，

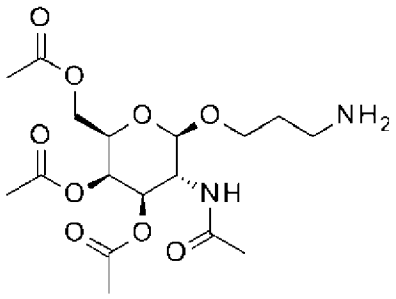
將溶劑減壓蒸餾去除一半進行濃縮。利用飽和碳酸氫鈉水溶液、飽和食鹽水洗淨有機層後，利用無水硫酸鈉進行乾燥、過濾，將溶劑減壓蒸餾去除而獲得粗產物。添加異丙醚(100 m)並攪拌3小時。將所獲得之固形物進行過濾，而獲得目標物37A(11.9 g)。不再進一步進行精製，用於下一反應。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 7.43-7.29 (5H, m), 6.26 (1H, d, J = 8.5 Hz), 5.36-5.29 (1H, m), 5.12 (1H, d, J = 12.1 Hz), 5.08 (1H, d, J = 12.1 Hz), 5.03-4.95 (2H, m), 4.33 (1H, d, J = 9.1 Hz), 4.21-4.06 (3H, m), 4.01-3.93 (1H, m), 3.80-3.73 (1H, m), 3.62-3.49 (1H, m), 3.44-3.35 (1H, m), 3.14-3.04 (1H, m), 2.15 (3H, s), 2.05 (3H, s), 2.01 (3H, s), 1.95 (3H, s), 1.88-1.75 (1H, m), 1.69-1.56 (1H, m).

$C_{25}H_{34}N_2O_{11}$: $[M+H]^+$ 計算值539，實測值539.

【0367】(37B)乙酸[(2R,3R,4R,5R)-5-乙醯胺-3,4-二乙醯氧基-6-(3-胺基丙氧基)四氫吡喃-2-基]甲酯鹽酸鹽(化合物37B)之合成

[化161]

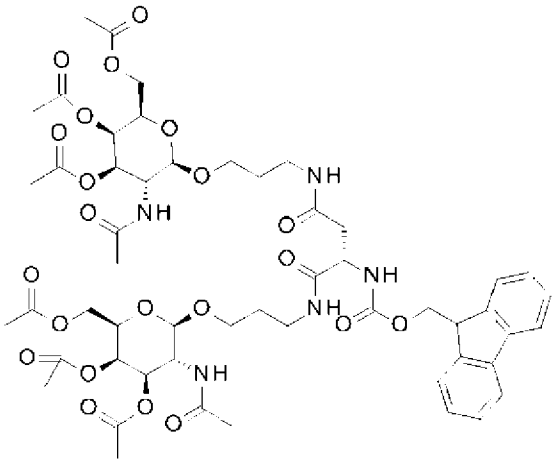


將步驟(37A)中合成之化合物37A(10 g，18.6 mmol)溶解於四氫呋喃(200 ml)/1 N鹽酸(20 ml)中。添加10%鈀/碳(濕基)(1 g)，於氫氣環境下在室溫下遽烈攪拌1小時。反應結束後過濾，將所獲得之通過液進行減壓蒸餾去除而獲得含有目標物37B之粗產物(8.97 g)。不再進一步進行精製，用於下一反應。

$C_{17}H_{28}N_2O_9$: $[M+H]^+$ 計算值405，實測值405.

【0368】(37C)乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-6-[3-[[(3S)-4-[3-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙醯胺-4,5-二乙醯氧基-6-(乙醯氧基甲基)四氫吡喃-2-基]氧基丙基醯胺]-3-(9H-茀-9-基甲氧基羰基胺基)-4-側氧基-丁醯基]胺基]丙氧基]-3,4-二乙醯氧基-四氫吡喃-2-基]甲酯(化合物37C)之合成

[化162]

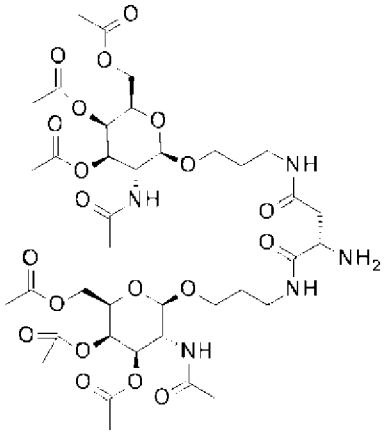


於N-[(9H-茀-9-基甲氧基)羰基]-L-天冬胺酸(1.7 g，4.78 mmol)、步驟(37B)中合成之化合物(5.48 g，12.4 mmol)之N,N-二甲基甲醯胺(15 ml)溶液中添加1-[雙(二甲胺基)亞甲基]-1H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶鎓3-氧化物六氟磷酸鹽(4.7 g，12.4 mmol)與N,N-二異丙基乙基胺(5.8 mL，33.5 mmol)，於室溫下攪拌1小時。添加乙酸乙酯，利用15%食鹽水、0.5 N鹽酸、飽和食鹽水、飽和碳酸氫鈉水溶液、飽和食鹽水洗淨有機層後，利用無水硫酸鈉進行乾燥、過濾，將溶劑減壓蒸餾去除，而獲得固形物。利用異丙醚將該固形物洗淨後，於減壓下加以乾燥，而獲得含有目標物37C之粗產物(5.4 g)。不再進一步進行精製，用於下一反應。

$C_{53}H_{69}N_5O_{22}$: $[M+H]^+$ 計算值1128，實測值1129，$[M+Na]^+$ 計算值1151，實測值1151.

【0369】 (37D)乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-6-[3-[[(3S)-4-[3-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙醯胺-4,5-二乙醯氧基-6-(乙醯氧基甲基)四氫吡喃-2-基]氧基丙基胺基]-3-胺基-4-側氧基-丁醯基]胺基]丙氧基]-3,4-二乙醯氧基-四氫吡喃-2-基]甲酯TFA鹽(化合物37D)之合成

[化163]



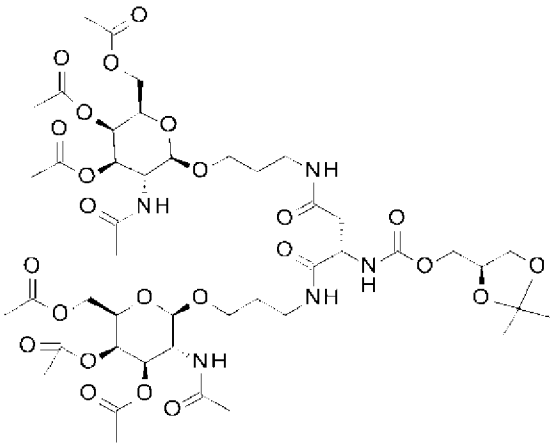
於步驟(37C)中合成之化合物(5.4 g，4.8 mmol)之N,N-二甲基甲醯胺(25 ml)溶液中添加哌啶(0.57 ml，5.7 mmol)，於室溫下攪拌1.5小時。反應結束後，添加三氟乙酸(0.31 ml)。將反應液添加於適量之二乙醚中，獲得沈澱之殘渣。藉由以0.1%三氟乙酸水溶液與0.1%三氟乙酸乙腈溶液作為溶離液之逆相HPLC(GL Science，Inertsil ODS-3)進行分離精製，將含有目標物之組分彙集，將溶劑減壓蒸餾去除。獲得非晶狀之目標物(2.7 g，產率55%)。

^{1}H-NMR (DMSO-D_6) δ: 8.34-8.26 (1H, m), 8.14-8.05 (4H, m), 7.90-7.82 (2H, m), 5.25-5.21 (2H, m), 5.00-4.92 (2H, m), 4.50-4.45 (2H, m), 4.08-3.82 (5H, m), 3.80-3.63 (3H, m), 3.51-3.39 (3H, m), 3.19-3.02 (4H, m), 2.70-2.53 (2H, m), 2.14-2.05 (6H, m), 2.04-1.96 (6H, m), 1.93-1.86 (6H, m), 1.84-1.75 (6H, m), 1.69-1.57 (4H, m).

$C_{38}H_{59}N_5O_{20}$: $[M+H]^+$ 計算值905，實測值906.

【0370】(37E)乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-6-[3-[[(3S)-4-[3-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙醯胺-4,5-二乙醯氧基-6-(乙醯氧基甲基)四氫吡喃-2-基]氧基丙基胺基]-3-[[(4R)-2,2-二甲基-1,3-二氧雜環戊烷-4-基]甲氧基羰基胺基]-4-側氧基-丁醯基]胺基]丙氧基]-3,4-二乙醯氧基-四氫吡喃-2-基]甲酯(化合物37E)之合成

[化164]



使用步驟(37D)中合成之化合物(2.7 g，2.6 mmol)，以與步驟(35C)同樣之方式，獲得非晶狀之目標物(0.77 g，產率27%)。

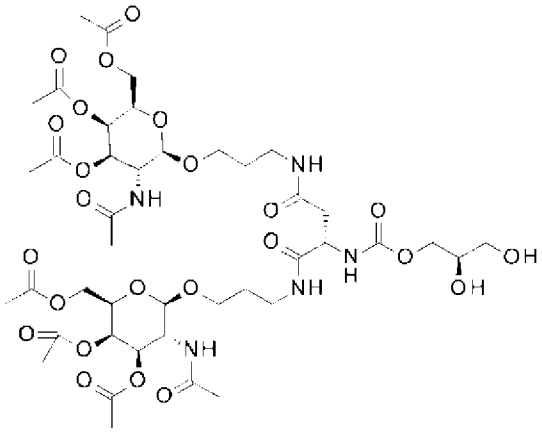
^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 7.19-7.12 (1H, m), 6.96-6.85 (2H, m), 6.83-6.75 (1H, m), 6.16 (1H, d, J = 9.1 Hz), 5.41-5.34 (2H, m), 5.25-5.08 (2H, m), 4.66 (1H, d, J = 8.5 Hz), 4.51-3.87 (16H, m), 3.79-3.72 (1H, m), 3.64-3.14 (6H, m), 3.01-2.91 (1H, m), 2.68-2.57 (1H, m), 2.22-2.14 (6H, m), 2.10-1.93 (18H,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

$C_{45}H_{69}N_5O_{24}$: $[M+Na]^+$ 計算值1086，實測值1086.

【0371】(37F)乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-6-[3-[[(3S)-4-[3-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙醯胺-4,5-二乙醯氧基-6-(乙醯氧基甲基)四氫吡喃

-2-基]氧基丙基胺基]-3-[[(2R)-2,3-二羥基丙氧基]羰基胺基]-4-側氧基-丁醯基]胺基]丙氧基]-3,4-二乙醯氧基-四氫吡喃-2-基]甲酯(化合物37F)之合成

[化165]

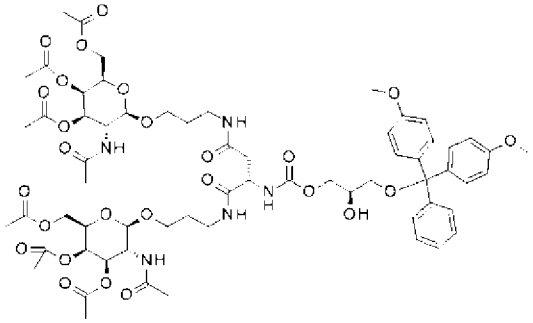


使用步驟(37E)中合成之化合物(0.77 g，0.72 mmol)，以與步驟(35D)同樣之方式，獲得含有目標物37F之粗產物(0.74 g)。不再進一步進行精製，用於下一反應。

$C_{42}H_{65}N_5O_{24}$: $[M+H]^+$ 計算值1024，實測值1024.

【0372】(37G)乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-6-[3-[[(3S)-4-[3-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙醯胺-4,5-二乙醯氧基-6-(乙醯氧基甲基)四氫吡喃-2-基]氧基丙基胺基]-3-[[(2R)-3-[雙(4-甲氧基苯基)-苯基-甲氧基]-2-羥基-丙氧基]羰基胺基]-4-側氧基-丁醯基]胺基]丙氧基]-3,4-二乙醯氧基-四氫吡喃-2-基]甲酯(化合物37G)之合成

[化166]



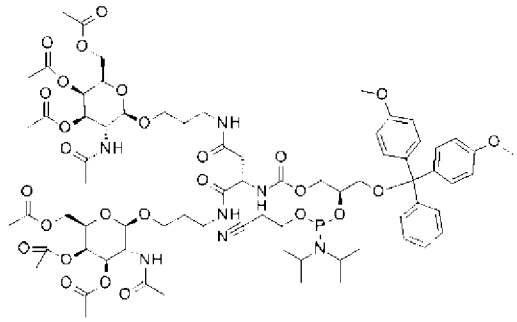
使用步驟(37F)中合成之化合物(0.74 g)，以與步驟(35E)同樣之方式，獲得非晶狀之目標物(0.63 g，產率66%(2步))。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 7.44-7.38 (2H, m), 7.33-7.09 (9H, m), 6.86-6.69 (6H, m), 6.22 (1H, d, J = 7.9 Hz), 5.38-5.33 (2H, m), 5.23-5.09 (2H, m), 4.66 (1H, d, J = 7.9 Hz), 4.54-4.42 (2H, m), 4.24-3.87 (16H, m), 3.79 (6H, s), 3.57-3.14 (8H, m), 2.97-2.87 (1H, m), 2.66-2.50 (1H, m), 2.19-2.13 (6H, m), 2.08-1.91 (10H, m), 1.87-1.65 (4H, m).

$C_{63}H_{83}N_5O_{26}$: $[M+Na]^+$ 計算值1349，實測值1349.

【0373】(37H)乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-6-[3-[[(3S)-4-[3-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙醯胺-4,5-二乙醯氧基-6-(乙醯氧基甲基)四氫吡喃-2-基]氧基丙基胺基]-3-[[(2R)-3-[雙(4-甲氧基苯基)-苯基-甲氧基]-2-[2-氰基乙氧基-(二異丙胺基)膦基]氧基-丙氧基]羰基胺基]-4-側氧基-丁醯基]胺基]丙氧基]-3,4-二乙醯氧基-四氫吡喃-2-基]甲酯(化合物37H)之合成

[化167]



使用步驟(37G)中合成之化合物(0.63 g，0.48 mmol)，以與步驟(35F)同樣之方式，獲得非晶狀之目標物(0.52 g，產率71%)。

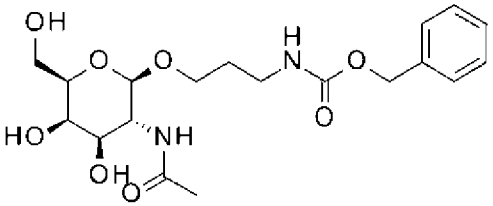
^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 7.45-7.38 (2H, m), 7.34-6.95 (9H, m), 6.88-6.62 (6H, m), 6.18-6.10 (1H, m), 5.39-5.32 (2H, m), 5.24-5.05 (2H, m), 4.69-4.60 (1H, m), 4.52-4.41 (2H, m), 4.34-2.90 (32H, m), 2.68-2.42 (3H, m),

2.20-2.14 (6H, m), 2.09-1.91 (18H, m), 1.87-1.66 (4H, m), 1.21-0.97 (12H, m).

【0374】(參考例38)

(38A)N-[3-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙醯胺-4,5-二羥基-6-(羥甲基)四氫吡喃-2-基]氧基丙基]胺基甲酸苄酯(化合物38A)之合成

[化168]



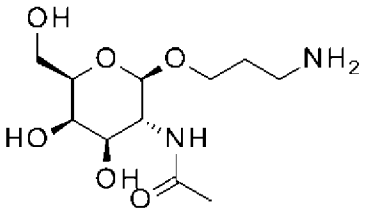
於步驟(37A)中合成之化合物(12.4 g，23 mmol)之乙醇(200 ml)懸浮溶液中添加28%甲醇鈉甲醇溶液(0.85 ml)，於室溫下加以攪拌。伴隨反應之進行，一度成為透明之溶液。若放置60分鐘，則可獲得沈澱物。將沈澱物過濾，利用乙醇、二異丙基醚洗淨後，於減壓下加以乾燥。以固體之形式獲得含有目標物38A之粗產物(10 g)。不再進一步進行精製，用於下一反應。

^{1}H-NMR (DMSO-D_6) δ: 7.60 (1H, d, J = 9.1 Hz), 7.40-7.17 (5H, m), 5.01 (2H, s), 4.62-4.55 (2H, m), 4.49 (1H, d, J = 4.2 Hz), 4.20 (1H, d, J = 8.5 Hz), 3.76-3.27 (6H, m), 3.08-2.99 (2H, m), 1.81 (3H, s), 1.66-1.56 (2H, m).

$C_{19}H_{28}N_2O_8$: $[M+Na]^+$ 計算值435，實測值435.

【0375】(38B)N-[(2R,3R,4R,5R,6R)-2-(3-胺基丙氧基)-4,5-二羥基-6-(羥甲基)四氫吡喃-3-基]乙醯胺鹽酸鹽(化合物38B)之合成

[化169]

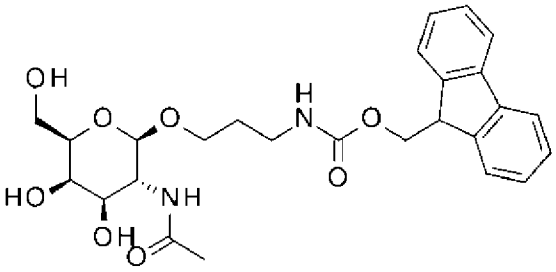


將步驟(38A)中合成之化合物(22.8 g，55.3 mmol)溶解於四氫呋喃(280 ml)/1 N鹽酸(61 ml)中。添加10%鈀/碳(濕基)(5.56 g)，於氫氣環境下在室溫下遽烈攪拌3.5小時。反應結束後過濾，將所獲得之通過液進行減壓蒸餾去除。添加適量之乙醇，將所產生之固形物過濾，利用乙醇、二乙醚洗淨後，於減壓下加以乾燥。獲得含有目標物38B之粗產物(17 g)。不再進一步進行精製，用於下一反應。

^{1}H-NMR (D_2O) δ: 4.27 (1H, d, J = 8.5 Hz), 3.90-3.50 (8H, m), 2.93 (2H, t, J = 7.0 Hz), 1.89 (3H, s), 1.82-1.75 (2H, m).

【0376】(38C)N-[3-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙醯胺-4,5-二羥基-6-(羥甲基)四氫吡喃-2-基]氧基丙基]胺基甲酸9H-茀-9-基甲酯(化合物38C)之合成

[化170]



將步驟(38B)中合成之化合物(16.4 g，52.1 mmol)溶解於四氫呋喃(200 ml)/純水(50 ml)中，添加N,N-二異丙基乙基胺(12.7 mL，72.9 mmol)。於冰浴冷卻下添加N-[(9H-茀-9-基甲氧基)羰氧基]丁二醯亞胺(21.1 g，62.5 mmol)，於室溫下攪拌1.5小時。反應結束後，將溶劑減壓蒸餾去除。添加二乙醚(100 ml)，並攪拌1小時。利用乙醇、乙酸乙酯、

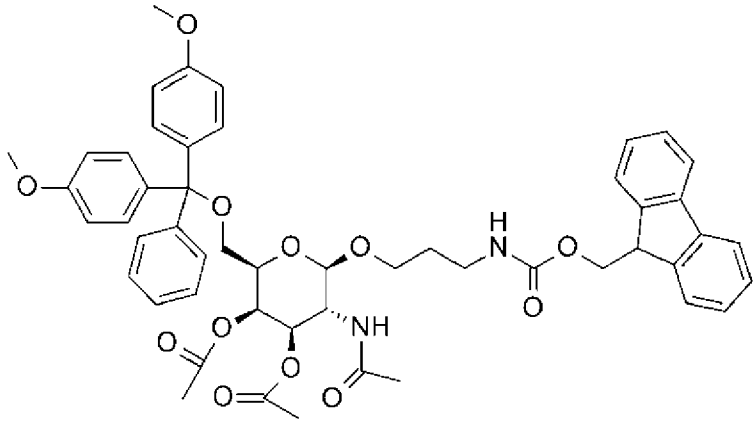
二乙醚依序洗淨固形物後，於減壓下加以乾燥，而獲得含有目標物38C之粗產物(22.9 g)。

^{1}H-NMR (DMSO-D_6) δ: 7.89 (2H, d, J = 7.3 Hz), 7.69 (2H, d, J = 7.3 Hz), 7.61 (1H, d, J = 9.1 Hz), 7.42 (2H, t, J = 7.3 Hz), 7.33 (2H, t, J = 7.3 Hz), 7.24 (1H, t, J = 5.7 Hz), 4.60-4.57 (2H, m), 4.49 (1H, d, J = 4.2 Hz), 4.31-4.18 (4H, m), 3.76-3.28 (8H, m), 3.05-2.97 (2H, m), 1.81 (3H, s), 1.62-1.57 (2H, m).

$C_{26}H_{32}N_2O_8$: $[M+Na]^+$ 計算值523，實測值523.

【0377】(38D)乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-4-乙醯氧基-2-[[雙(4-甲氧基苯基)-苯基-甲氧基]甲基]-6-[3-(9H-茀-9-基甲氧基羰基胺基)丙氧基]四氫吡喃-3-基]酯(化合物38D)之合成

[化171]



於步驟(38C)中合成之化合物(1.56 g，3.1 mmol)之吡啶(20 ml)懸浮液中添加4,4'-二甲氧基三苯氯甲烷(1.27 g，3.7 mmol)，於室溫下攪拌30分鐘。繼而，添加乙酸酐(1.18 ml，12.5 mmol)，於室溫下攪拌20小時。反應結束後，添加N,N-二異丙基乙基胺(1.1 mL，6.2 mmol)、乙醇(2 ml)，將溶劑減壓蒸餾去除，而獲得粗產物。藉由矽膠管柱層析法(己烷：乙酸乙酯＝75：25-0：100，v/v，含有1%三乙胺)將其進行精製，而獲得

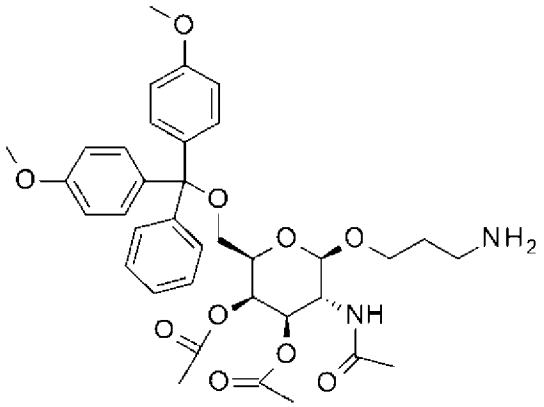
非晶狀之目標物38D(2.8 g，定量)。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 7.77 (2H, d, J = 7.3 Hz), 7.62 (2H, d, J = 7.3 Hz), 7.43-7.18 (13H, m), 6.83-6.79 (4H, m), 6.03 (1H, d, J = 9.1 Hz), 5.55 (1H, d, J = 3.0 Hz), 5.14-5.03 (2H, m), 4.46-4.43 (3H, m), 4.24-4.04 (2H, m), 3.97-3.91 (1H, m), 3.85-3.82 (1H, m), 3.77 (6H, s), 3.72-3.71 (1H, m),3.54-3.33 (3H, m), 3.09-3.04 (2H, m), 2.03 (3H, s), 1.89 (6H, s), 1.65-1.56 (2H, m).

$C_{52}H_{55}NO_{12}$: $[M+Na]^+$ 計算值908，實測值909.

【0378】(38E)乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-4-乙醯氧基-6-(3-胺基丙氧基)-2-[[雙(4-甲氧基苯基)-苯基-甲氧基]甲基]四氫吡喃-3-基]酯(化合物38D)之合成

[化172]



於步驟(38D)中合成之化合物(2.49 g，2.8 mmol)之二氯甲烷(8 ml)溶液中添加哌啶(0.45 ml，4.5 mmol)，於室溫下加以攪拌。於反應未結束之情形時，適當追加哌啶。反應結束後，將溶劑減壓蒸餾去除，而獲得粗產物。藉由NH-矽膠管柱層析法(二氯甲烷：甲醇＝100：0-85：15，v/v)將其進行精製，而獲得非晶狀之目標物38E(1.48 g，產率79%)。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 7.39-7.18 (9H, m), 6.83-6.80 (4H, m), 5.55

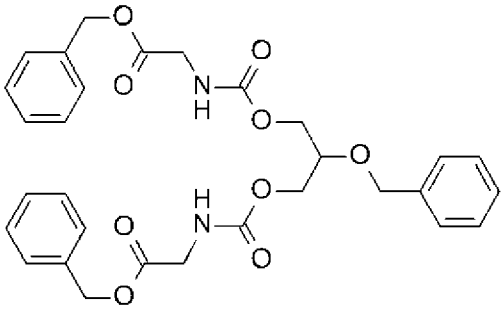
(1H, d, J = 3.0 Hz), 5.51 (1H, d, J = 9.1 Hz), 5.27 (1H, dd, J = 11.2, 3.3 Hz), 4.64 (1H, d, J = 8.5 Hz), 3.98-3.90 (2H, m), 3.84-3.82 (1H, m), 3.79 (6H, s), 3.75-3.74 (1H, m), 3.58-3.56 (1H, m), 3.35 (1H, dd, J = 9.1, 5.4 Hz), 3.07 (1H, t, J = 8.5 Hz), 2.82-2.74 (4H, m), 2.01 (3H, s), 1.96 (3H, s), 1.89 (3H, s), 1.74-1.69 (2H, m).

$C_{37}H_{45}NO_{10}$: $[M+Na]^+$ 計算值687，實測值687.

【0379】(參考例39)

(39A)2-[[2-苄氧基-3-[(2-苄氧基-2-側氧基-乙基)胺甲醯氧基]丙氧基]羰基胺基]乙酸苄酯(化合物39A)之合成

[化173]



將2-苄氧基-1,3-丙二醇(2.5 g，14 mmol)、氯甲酸4-硝基苯酯(5.8 g，29 mmol)溶解於四氫呋喃(100 ml)中，添加吡啶(5.0 ml，61.8 mmol)，於室溫下攪拌20分鐘。將所析出之固體過濾後，添加四氫呋喃(70 ml)。繼而，添加甘胺酸苄酯TFA鹽(9.2 g，33 mmol)與N,N-二異丙基乙基胺(9.6 mL，55 mmol)，於室溫下整夜攪拌。反應結束後，將溶劑減壓蒸餾去除，而獲得粗產物。藉由矽膠管柱層析法(己烷：乙酸乙酯＝100：0-40：60，v/v)將其進行精製，而獲得橡膠狀之目標物39A(6.5 g，產率84%)。

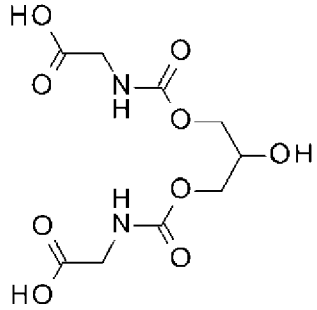
^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 7.37-7.33 (15H, m), 5.48 (2H, t, J = 5.4 Hz),

5.18 (4H, s), 4.64 (2H, s), 4.23 (4H, d, J = 5.4 Hz), 3.99 (4H, d, J = 5.4 Hz), 3.84 (1H, t, J = 5.4 Hz).

$C_{30}H_{32}N_2O_9$: $[M+H]^+$ 計算值565，實測值565，$[M+Na]^+$ 計算值587，實測值587

【0380】(39B)2-[[3-(羧甲基胺甲醯氧基)-2-羥基-丙氧基]羰基胺基]乙酸(化合物39B)之合成

[化174]

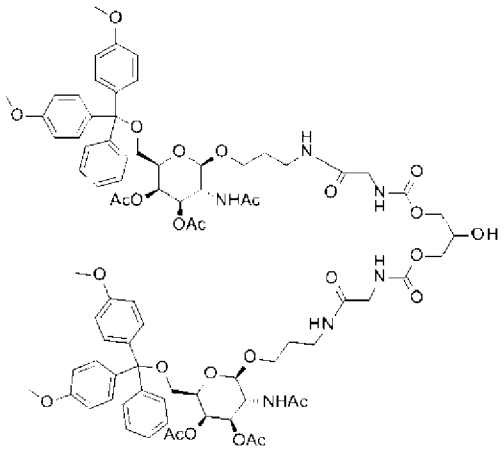


將步驟(39A)中合成之化合物39A(7.3 g，2.8 mmol)溶解於四氫呋喃(200 ml)/純水(50 ml)中。添加20%氫氧化鈀-活性碳(約50%含水)(3 g)，於氫氣環境下在室溫下遽烈攪拌5小時。反應結束後過濾，將所獲得之通過液進行減壓蒸餾去除而獲得含有目標物39B之粗產物(3.2 g)。不再進一步進行精製，用於下一反應。

^{1}H-NMR (D_2O) δ: 4.21-4.14 (5H, m), 3.86 (4H, s).

【0381】(39C)乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-6-[3-[[2-[[3-[[2-[3-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙醯胺-4,5-二乙醯氧基-6-[[雙(4-甲氧基苯基)-苯基l-甲氧基]甲基]四氫吡喃-2-基]氧基丙基胺基]-2-側氧基-乙基]胺甲醯氧基]-2-羥基-丙氧基]羰基胺基]乙醯基]胺基]丙氧基]-4-乙醯氧基-2-[[雙(4-甲氧基苯基)-苯基-甲氧基]甲基]四氫吡喃-3-基]酯(化合物39C)之合成

[化175]



於步驟(39B)中合成之化合物39B(0.31 g，1.05 mmol)、步驟(38E)中合成之化合物38E(1.47 g，2.21 mmol)、N,N-二異丙基乙基胺(0.91 mL，5.27 mmol)之N,N-二甲基甲醯胺(9 ml)溶液中添加1-[雙(二甲胺基)亞甲基]-1H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶鎓3-氧化物六氟磷酸鹽(11.3 g，29.6 mmol)，於室溫下攪拌3小時。反應結束後，將反應液滴加至二乙醚(共計185 ml)中。將上清液之溶劑去除後，藉由矽膠管柱層析法(二氯甲烷：甲醇＝100：0-15：85，v/v，含有1%三乙胺)將所獲得之凝膠狀之粗產物進行精製，而以固體之形式獲得目標物39C(1.05 g，產率63%)。

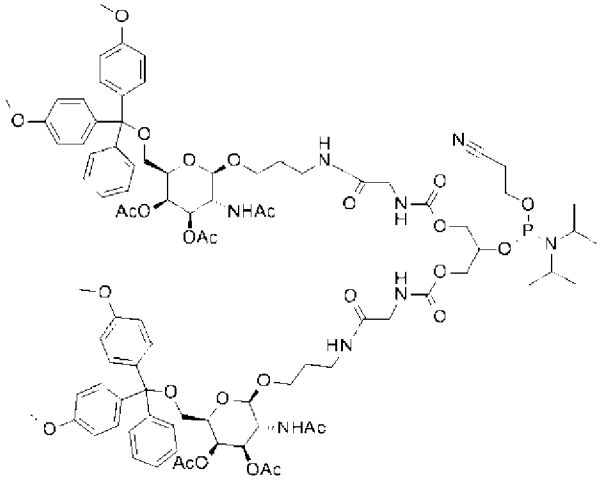
^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 7.39-7.17 (18H, m), 6.83-6.80 (8H, m), 6.70-6.27 (2H, m), 5.56-5.54 (2H, m), 5.10 (2H, d, J = 10.9 Hz), 4.49-3.02 (44H, m), 2.01 (6H, s), 1.96 (6H, s), 1.90 (6H, s), 1.80-1.63 (4H, m).

$C_{81}H_{98}N_6O_{27}$: $[M+Na]^+$ 計算值1611，實測值1611

【0382】(39D)乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-6-[3-[[2-[[3-[[2-[3-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙醯胺-4,5-二乙醯氧基-6-[[雙(4-甲氧基苯基)-苯基-甲氧基]甲基]四氫吡喃-2-基]氧基丙基胺基]-2-側氧基-乙基]胺甲醯氧基]-2-[2-氰基乙氧基-(二異丙胺基)膦基]氧基-丙氧基]羰基胺基]乙醯基]胺基]丙氧基]-4-乙醯氧基-2-[[雙(4-甲氧基苯基)-苯基-甲氧基]甲基]四氫

吡喃-3-基]酯(化合物39D)之合成

[化176]

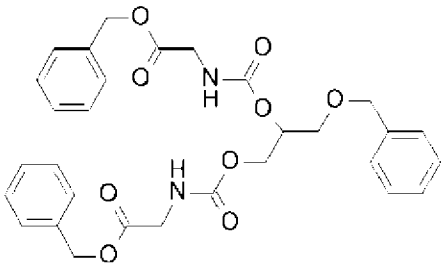


將步驟(39C)中合成之化合物39C(0.47 g，0.30 mmol)藉由適量之乙酸乙酯/甲苯(1/1)共沸後，溶解於二氯甲烷(3 ml)中。添加N,N-二異丙基乙基胺(210 μl，1.18 mmol)、2-氰基乙基二異丙基氯亞磷醯胺(79 μl，0.36 mmol)，於室溫下攪拌1小時。進而，添加2-氰基乙基二異丙基氯亞磷醯胺(20 μl，0.09 mmol)，於室溫下攪拌15分鐘。反應結束後，將溶劑減壓蒸餾去除，而獲得粗產物。藉由矽膠管柱層析法(乙酸乙酯：甲醇＝100：0-85：15，v/v，含有1%三乙胺)將其進行精製，而獲得非晶狀之目標物39D(0.34 g，產率64%)。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 7.39-7.17 (18H, m), 6.87-6.70 (8H, m), 6.29-6.06 (2H, m), 5.55 (2H, d, J = 3.0 Hz), 5.11 (2H, d, J = 10.9 Hz), 4.47-3.02 (47H, m), 2.63 (2H, t, J = 6.3 Hz), 2.02 (6H, s), 1.96 (6H, s), 1.90 (6H, s), 1.80-1.64 (4H, m), 1.17 (12H, d, J = 6.7 Hz).

【0383】(40A)2-[[3-苄氧基-2-[(2-苄氧基-2-側氧基-乙基)胺甲醯氧基]丙氧基]羰基胺基]乙酸苄酯(化合物40A)之合成

[化177]



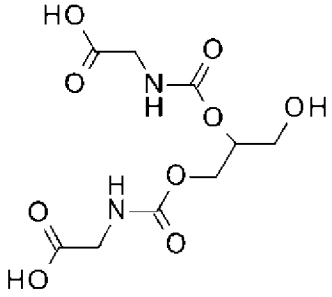
使用(+/-)-3-苄氧基-1,2-丙二醇(1.0 g，5.5 mmol)代替2-苄氧基-1,3-丙二醇，以與步驟(39A)同樣之方式，獲得目標物40A(2.8 g，產率90%)。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 7.39-7.30 (15H, m), 5.37-5.35 (2H, m), 5.17-5.12 (5H, m), 4.56-4.51 (2H, m), 4.33-4.30 (2H, m), 4.03-3.94 (4H, m), 3.61 (2H, d, J = 5.4 Hz).

$C_{30}H_{32}N_2O_9$: $[M+Na]^+$ 計算值587，實測值587

【0384】(40B)2-[[2-(羧甲基胺甲醯氧基)-3-羥基-丙氧基]羰基胺基]乙酸(化合物40B)之合成

[化178]



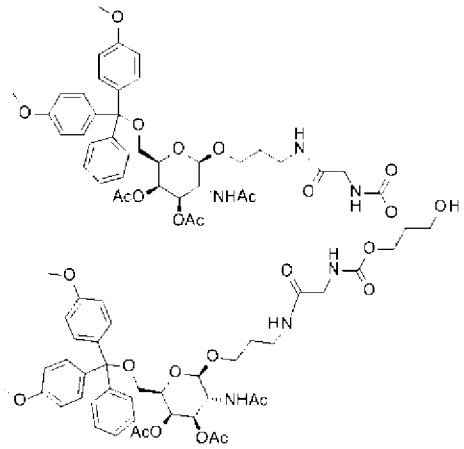
使用化合物40A(2.8 g，5.0 mmol)代替化合物39A，以與步驟(39B)同樣之方式，獲得含有目標物40B之粗產物(1.2 g)。

^{1}H-NMR (D_2O) δ: 4.32-4.19 (3H, m), 3.94-3.87 (4H, m), 3.81-3.71 (2H, m).

【0385】(40C)乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-6-[3-[[2-[[2-[[2-[3-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙醯胺-4,5-二乙醯氧基-6-[[雙(4-甲氧基苯基)-

苯基-甲氧基]甲基]四氫吡喃-2-基]氧基丙基胺基]-2-側氧基-乙基]胺甲醯氧基]-3-羥基-丙氧基]羰基胺基]乙醯基]胺基]丙氧基]-4-乙醯氧基-2-[[雙(4-甲氧基苯基)-苯基l-甲氧基]甲基]四氫吡喃-3-基]酯(化合物40C)之合成

[化179]



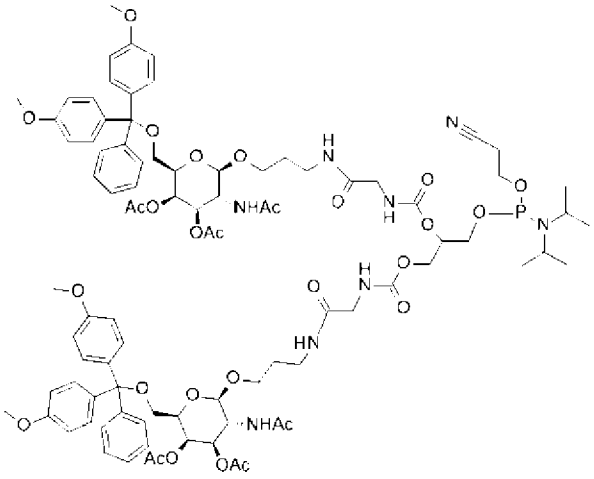
使用化合物40B(0.31 g，1.05 mmol)代替化合物39B，以與步驟(39C)同樣之方式，獲得目標物40C(0.74 g，產率44%)。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 7.40-7.18 (18H, m), 6.81 (8H, dd, J = 9.1, 3.0 Hz), 6.70-6.50 (1H, m), 6.16-6.02 (1H, m), 5.56-5.54 (2H, br), 5.11-5.00 (2H, m), 4.53-2.99 (44H, m), 2.01 (6H, s), 1.95 (6H, s), 1.88 (6H, s), 1.77-1.68 (4H, m).

$C_{81}H_{98}N_6O_{27}$: $[M+Na]^+$ 計算值1611，實測值1611

【0386】(40D)乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-6-[3-[[2-[[2-[[2-[3-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙醯胺-4,5-二乙醯氧基-6-[[雙(4-甲氧基苯基)-苯基-甲氧基]甲基]四氫吡喃-2-基]氧基丙基胺基]-2-側氧基-乙基]胺甲醯氧基]-3-[2-氰基乙氧基-(二異丙胺基)膦基]氧基-丙氧基]羰基胺基]乙醯基]胺基]丙氧基]-4-乙醯氧基-2-[[雙(4-甲氧基苯基)-苯基-甲氧基]甲基]四氫吡喃-3-基]酯(化合物40D)之合成

[化180]



使用化合物40C(0.31 g，1.05 mmol)代替化合物39C，以與步驟(39D)同樣之方式，獲得目標物40D(0.60 g，產率72%)。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 7.38-7.18 (18H, m), 7.13-6.97 (1H, m), 6.83-6.81 (8H, m), 6.58-6.36 (1H, m), 5.56-5.52 (2H, m), 5.10-5.04 (2H, m), 4.46-2.97 (47H, m), 2.65-2.63 (2H, m), 2.02 (6H, s), 1.95 (3H, s), 1.94 (3H, s), 1.90 (3H, s), 1.89 (3H, s), 1.77-1.67 (4H, m), 1.20-1.16 (12H, m).

【0387】 (實施例131)

HO-X^{16}-A^{m1s}-A^{e2s}-U^{m1s}-C^{m1s}-C^{e2s}-G^{m1s}-A^{m1s}-T^{e2s}-G^{m1s}-G^{m1s}-C^{e2s}-G^{m1s}-A^{m1s}-A^{e2s}-G^{m1t}-H(序列編號40)

將X之部分置換為X^{16}，與實施例91同樣地進行合成。X^{16}之部分係使用參考例36中合成之化合物36G，進行1次縮合。

【0388】 本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第92號至第106號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6261.97)

【0389】(實施例132)

HO-X^{15}-X^{15}-X^{15}-A^{m1s}-A^{e2s}-U^{m1s}-C^{m1s}-C^{e2s}-G^{m1s}-A^{m1s}-T^{e2s}-G^{m1s}-G^{m1s}-C^{e2s}-G^{m1s}-A^{m1s}-A^{e2s}-G^{m1t}-H(序列編號40)

將X之部分置換為X^{15}，與實施例91同樣地進行合成。X^{15}之部分係使用參考例35中合成之化合物35F，進行3次縮合。

【0390】本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第92號至第106號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6917.09)

【0391】(實施例133)

X^{18}-A^{m1s}-A^{e2s}-U^{m1s}-C^{m1s}-C^{e2s}-G^{m1s}-A^{m1s}-T^{e2s}-G^{m1s}-G^{m1s}-C^{e2s}-G^{m1s}-A^{m1s}-A^{e2s}-G^{m1t}-H(序列編號40)

將X之部分置換為X^{18}，與實施例91同樣地進行合成。X^{18}之部分係使用參考例39中合成之化合物39D，進行1次縮合。

【0392】本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第92號至第106號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6247.96)

【0393】(實施例134)

HO-X^{15}-X^{15}-X^{15}-A^{e2s}-U^{m1s}-C^{m1s}-C^{e2s}-G^{m1s}-A^{m1s}-T^{e2s}-G^{m1s}-G^{m1s}-C^{e2s}-G^{m1s}-A^{m1s}-A^{e2s}-G^{m1s}-C^{e2t}-H(序列編號44)

使用上述序列即15e_005.1代替實施例132所使用之序列，與實施例132同樣地進行合成。

【0394】 本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第91號至第105號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6919.09)

【0395】 (實施例135)

HO-X^{15}-X^{15}-X^{15}-U^{m1s}-C^{m1s}-C^{e2s}-G^{m1s}-A^{m1s}-T^{e2s}-G^{m1s}-G^{m1s}-C^{e2s}-G^{m1s}-A^{m1s}-A^{e2s}-G^{m1t}-C^{e2s}-U^{m1t}-H(序列編號45)

使用上述序列即15e_006.1代替實施例132所使用之序列，與實施例132同樣地進行合成。

【0396】 本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第90號至第104號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6884.07)

【0397】 (實施例136)

HO-X^{15}-X^{15}-X^{15}-A^{m1s}-A^{m1s}-A^{e2s}-U^{m1s}-C^{m1s}-C^{e2s}-G^{m1s}-A^{m1s}-T^{e2s}-G^{m1s}-G^{m1s}-C^{e2s}-G^{m1s}-A^{m1s}-A^{e2s}-G^{m1t}-H(序列編號42)

使用上述序列即16e_001代替實施例132所使用之序列，與實施例132同樣地進行合成。

【0398】 本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元

(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第92號至第107號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：7276.10)

【0399】 (實施例137)

HO-X^{15}-X^{15}-X^{15}-A^{mls}-A^{mls}-A^{mls}-A^{e2s}-U^{mls}-C^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-T^{e2s}-G^{mls}-G^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-A^{e2s}-G^{mlt}-H(序列編號46)

使用上述序列即17e_001代替實施例132所使用之序列，與實施例132同樣地進行合成。

【0400】 本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第92號至第108號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：7636.19)

【0401】 (實施例138)

X^{18}-A^{e2s}-U^{mls}-C^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-T^{e2s}-G^{mls}-G^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-A^{e2s}-G^{mls}-C^{e2t}-H(序列編號44)

使用上述序列即15e_005.1代替實施例133所使用之序列，與實施例133同樣地進行合成。

本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第91號至第105號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測

值：6250.00)

【0402】(實施例139)

X^{18}-U^{mls}-C^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-T^{e2s}-G^{mls}-G^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-A^{e2s}-G^{mls}-C^{e2s}-U^{mlt}-H(序列編號45)

使用上述序列即15e_006.1代替實施例133所使用之序列，與實施例133同樣地進行合成。

【0403】本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第90號至第104號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6214.96)

【0404】(實施例140)

X^{18}-A^{mls}-A^{mls}-A^{e2s}-U^{mls}-C^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-T^{e2s}-G^{mls}-G^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-A^{e2s}-G^{mlt}-H(序列編號42)

使用上述序列即16e_001代替實施例133所使用之序列，與實施例133同樣地進行合成。

【0405】本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第92號至第107號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6607.02)

【0406】(實施例141)

X^{18}-A^{mls}-A^{e2s}-U^{mls}-C^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-T^{e2s}-G^{mls}-G^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-

A^{m1s}-A^{e2s}-G^{m1s}-C^{e2t}-H(序列編號47)

使用上述序列即16e_002代替實施例133所使用之序列，與實施例133同樣地進行合成。

【0407】 本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第91號至第106號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6609.03)

【0408】 (實施例142)

X^{18}-A^{e2s}-U^{m1s}-C^{m1s}-C^{e2s}-G^{m1s}-A^{m1s}-T^{e2s}-G^{m1s}-G^{m1s}-C^{e2s}-G^{m1s}-A^{m1s}-A^{e2s}-G^{m1s}-C^{e2s}-U^{m1t}-H(序列編號48)

使用上述序列即16e_003代替實施例133所使用之序列，與實施例133同樣地進行合成。

【0409】 本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第90號至第105號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6586.00)

【0410】 (實施例143)

X^{18}-A^{m1s}-A^{e2s}-U^{m1s}-C^{m1s}-C^{e2s}-G^{m1s}-A^{e2s}-U^{m1s}-G^{m1s}-G^{m1s}-C^{e2s}-G^{m1s}-A^{m1s}-A^{e2s}-G^{m1t}-H(序列編號40)

使用上述序列即15e_001.5代替實施例133所使用之序列，與實施例133同樣地進行合成。

【0411】 本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第92號至第106號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6233.97)

【0412】 (實施例144)

X^{18}-A^{e2s}-U^{m1s}-C^{m1s}-C^{e2s}-G^{m1s}-A^{e2s}-U^{m1s}-G^{m1s}-G^{m1s}-C^{e2s}-G^{m1s}-A^{m1s}-A^{e2s}-G^{m1s}-C^{e2t}-H(序列編號44)

使用上述序列即15e_005.5代替實施例133所使用之序列，與實施例133同樣地進行合成。

【0413】 本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第91號至第105號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6235.97)

【0414】 (實施例145)

X^{18}-U^{m1s}-C^{m1s}-C^{e2s}-G^{m1s}-A^{e2s}-U^{m1s}-G^{m1s}-G^{m1s}-C^{e2s}-G^{m1s}-A^{m1s}-A^{e2s}-G^{m1s}-C^{e2s}-U^{m1t}-H(序列編號45)

使用上述序列即15e_006.5代替實施例133所使用之序列，與實施例133同樣地進行合成。

【0415】 本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端

起第90號至第104號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6200.94)

【0416】(實施例146)

X^{18}-A^{mls}-A^{mls}-A^{e2s}-U^{mls}-C^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{e2s}-U^{mls}-G^{mls}-G^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-A^{e2s}-G^{mlt}-H(序列編號42)

使用上述序列即16e_001.5代替實施例133所使用之序列，與實施例133同樣地進行合成。

【0417】本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第92號至第107號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6593.02)

【0418】(實施例147)

X^{18}-A^{mls}-A^{e2s}-U^{mls}-C^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{e2s}-U^{mls}-G^{mls}-G^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-A^{e2s}-G^{mls}-C^{e2t}-H(序列編號47)

使用上述序列即16e_002.5代替實施例133所使用之序列，與實施例133同樣地進行合成。

【0419】本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第91號至第106號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6595.01)

【0420】(實施例148)

X^{18}-A^{e2s}-U^{mls}-C^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{e2s}-U^{mls}-G^{mls}-G^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-A^{e2s}-G^{mls}-C^{e2s}-U^{mlt}-H(序列編號48)

使用上述序列即16e_003.5代替實施例133所使用之序列，與實施例133同樣地進行合成。

【0421】 本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第90號至第105號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6571.98)

【0422】 (實施例149)

HO-X^{16}-A^{mls}-A^{e2s}-U^{mls}-C^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{e2s}-U^{mls}-G^{mls}-G^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-A^{e2s}-G^{mlt}-H(序列編號40)

使用上述序列即15e_001.5代替實施例131所使用之序列，與實施例131同樣地進行合成。

【0423】 本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第92號至第106號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6247.99)

【0424】 (實施例150)

X^{19}-A^{mls}-A^{e2s}-U^{mls}-C^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-T^{e2s}-G^{mls}-G^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-A^{e2s}-G^{mlt}-H(序列編號40)

將X之部分置換為X^{19}，與實施例91同樣地進行合成。X^{19}之部分係使

用參考例40中合成之化合物40D，進行1次縮合。

【0425】 本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第92號至第106號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6247.99)

【0426】 (實施例151)

X^{17}-A^{m1s}-A^{e2s}-U^{m1s}-C^{m1s}-C^{e2s}-G^{m1s}-A^{m1s}-T^{e2s}-G^{m1s}-G^{m1s}-C^{e2s}-G^{m1s}-A^{m1s}-A^{e2s}-G^{m1t}-H(序列編號40)

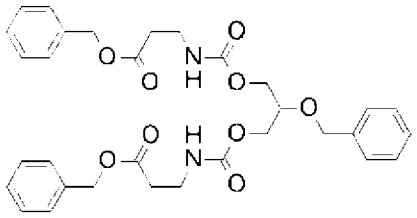
將X之部分置換為X^{17}，與實施例91同樣地進行合成。X^{17}之部分係使用參考例37中合成之化合物37H，進行1次縮合。

【0427】 本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第92號至第106號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6204.97)

(參考例41)

(41A)3-[[2-苄氧基-3-[(3-苄氧基-3-側氧基-丙基)胺甲醯氧基]丙氧基]羰基胺基]丙酸苄酯(化合物41A)之合成

[化181]



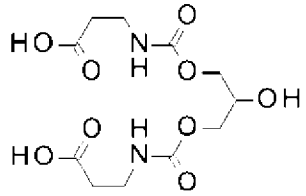
使用3-胺基丙酸苄酯TFA鹽(2.4 g，8.17 mmol)代替步驟(39A)所使用之甘胺酸苄酯TFA鹽，以與步驟(39A)同樣之方式，獲得目標物41A(1.62 g，產率80%)。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 7.39-7.27 (15H, m), 5.21 (2H, br s), 5.14 (4H, s), 4.63 (2H, s), 4.24-4.10 (4H, m), 3.79-3.74 (1H, m), 3.48-3.44 (4H, m), 2.59 (4H, t, J = 6.0 Hz).

$C_{32}H_{36}N_2O_9$: $[M+H]^+$ 計算值593，實測值593，$[M+Na]^+$ 計算值615，實測值615

(41B)3-[[3-(2-羧基乙基胺甲醯氧基)-2-羥基-丙氧基]羰基胺基]丙酸(化合物41B)之合成

[化182]

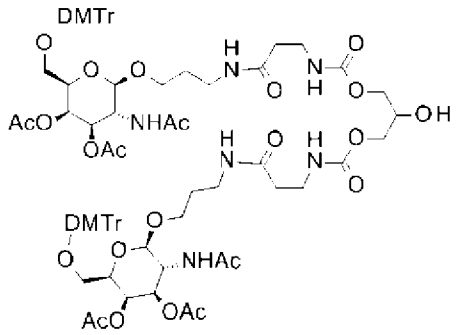


使用化合物41A(1.62 g，2.73 mmol)代替步驟(39B)所使用之化合物39A，以與步驟(39B)同樣之方式，獲得目標物41B(0.89 g，定量)。

^{1}H-NMR (D_2O) δ: 4.22-4.04 (5H, m), 3.46-3.32 (4H, m), 2.57 (4H, t, J = 6.7 Hz).

(41C)乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-6-[3-[3-[[3-[[3-[3-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙醯胺-4,5-二乙醯氧基-6-[[雙(4-甲氧基苯基)-苯基-甲氧基]甲基]四氫吡喃-2-基]氧基丙基胺基]-3-側氧基-丙基]胺甲醯氧基]-2-羥基-丙氧基]羰基胺基]丙醯基胺基]丙氧基]-4-乙醯氧基-2-[[雙(4-甲氧基苯基)-苯基-甲氧基]甲基]四氫吡喃-3-基]酯(化合物41C)之合成

[化183]



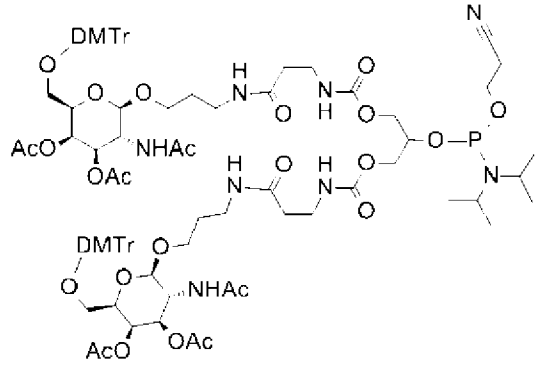
使用化合物41B(300 mg，0.93 mmol)代替步驟(39C)所使用之化合物39B，以與步驟(39C)同樣之方式，獲得目標物41C(950 mg，產率63%)。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 7.32-7.24 (18H, m), 6.82-6.80 (8H, m), 6.64-6.61 (1H, br), 6.27-6.24 (1H, br), 5.91-5.88 (1H, br), 5.56 (2H, d, J = 3.0 Hz), 5.10 (2H, d, J = 11.5 Hz), 4.46-3.05 (43H, m), 2.47-2.37 (4H, m), 2.02 (6H, s), 1.98 (6H, s), 1.90 (6H, s), 1.78-1.67 (4H, m).

$C_{83}H_{102}N_6O_{27}$: $[M+Na]^+$ 計算值1638，實測值1638

(41D)乙　酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙　醯　胺-6-[3-[3-[[3-[[3-[3-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙醯胺-4,5-二乙醯氧基-6-[[雙(4-甲氧基苯基)-苯基-甲氧基]甲基]四氫吡喃-2-基]氧基丙基胺基]-3-側氧基-丙基]胺甲醯氧基]-2-[2-氰基乙氧基-(二異丙胺基) 膦基]氧基-丙氧基]羰基胺基]丙醯基胺基]丙氧基]-4-乙醯氧基-2-[[雙(4-甲氧基苯基)-苯基-甲氧基]甲基]四氫吡喃-3-基]酯(化合物41D)之合成

[化184]



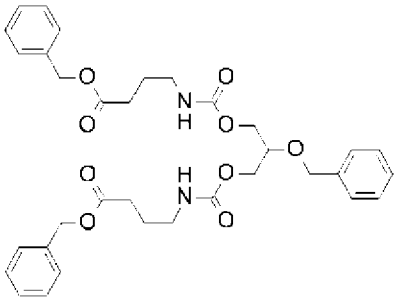
使用化合物41C(945 mg，0.58 mmol)代替步驟(39D)所使用之化合物39C，以與步驟(39D)同樣之方式，獲得目標物41D(638 mg，產率60%)。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 7.39-7.18 (18H, m), 6.85-6.78 (8H, m), 6.73-6.64 (1H, m), 6.40-6.23 (1H, m), 5.83-5.72 (1H, m), 5.56 (2H, d, J = 3.0 Hz), 5.13-5.04 (2H, m), 4.45-4.35 (2H, m), 4.22-3.30 (40H, m), 3.22-3.03 (4H, m), 2.64 (2H, t, J = 6.0 Hz), 2.54-2.32 (4H, m), 2.02 (6H, s), 2.00-1.95 (6H, m), 1.90 (6H, s), 1.83-1.59 (4H, m), 1.20-1.10 (12H, m).

(參考例42)

(42A)4-[[2-苄氧基-3-[(4-苄氧基-4-側氧基-丁基)胺甲醯氧基]丙氧基]羰基胺基]丁酸苄酯(化合物42A)之合成

[化185]



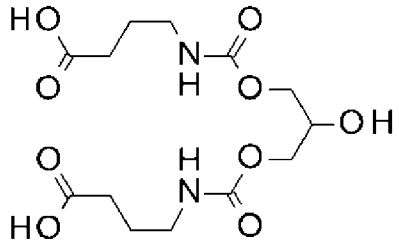
使用4-胺基丁酸苄酯TFA鹽(1.30 g，4.21 mmol)代替步驟(39A)所使用之甘胺酸苄酯TFA鹽，以與步驟(39A)同樣之方式，獲得目標物42A(0.85 g，產率78%)。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 7.38-7.27 (15H, m), 5.11 (4H, s), 4.80 (2H, br s), 4.63 (2H, s), 4.19-4.15 (4H, m), 3.77-3.75 (1H, m), 3.23-3.18 (4H, m), 2.40 (4H, t, J = 7.3 Hz), 1.88-1.81 (4H, m).

$C_{34}H_{40}N_2O_9$: $[M+H]^+$ 計算值621，實測值622，$[M+Na]^+$ 計算值643，實測值644

(42B)4-[[3-(3-羧基丙基胺甲醯氧基)-2-羥基-丙氧基]羰基胺基]丁酸(化合物42B)之合成

[化186]

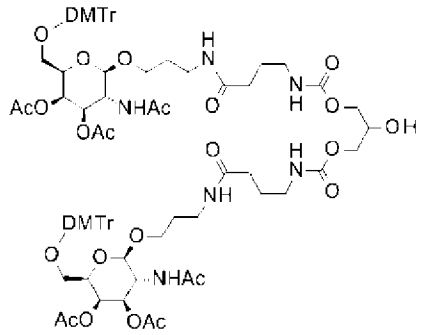


使用化合物42A(0.85 g，1.4 mmol)代替步驟(39B)所使用之化合物39A，以與步驟(39B)同樣之方式，獲得目標物42B(0.49 g，定量)。

^{1}H-NMR (D_2O) δ: 4.19-4.05 (5H, m), 3.19-3.12 (4H, m), 2.36-2.27 (4H, m), 1.83-1.73 (4H, m).

(42C)乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-6-[3-[4-[[3-[[4-[3-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙醯胺-4,5-二乙醯氧基-6-[[雙(4-甲氧基苯基)-苯基-甲氧基]甲基]四氫吡喃-2-基]氧基丙基胺基]-4-側氧基-丁基]胺甲醯氧基]-2-羥基-丙氧基]羰基胺基]丁醯基胺基] 丙氧基]-4-乙醯氧基-2-[[雙(4-甲氧基苯基)-苯基-甲氧基]甲基]四氫吡喃-3-基]酯(化合物42C)之合成

[化187]



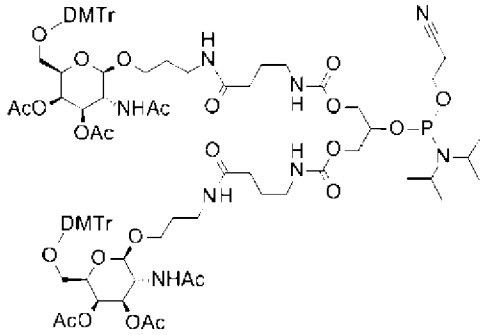
使用化合物42B(300 mg，0.86 mmol)代替步驟(39C)所使用之化合物39B，以與步驟(39C)同樣之方式，獲得目標物42C(1.16 g，產率82%)。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 7.31-7.24 (18H, m), 6.82-6.80 (8H, m), 6.68-6.65 (3H, m), 5.91-5.84 (1H, m), 5.56 (2H, d, J = 3.0 Hz), 5.10 (2H, d, J = 10.9 Hz), 4.45 (2H, d, J = 8.5 Hz), 4.23-3.12 (40H, m), 2.31-2.22 (4H, m), 2.01 (6H, s), 1.98 (6H, s), 1.90 (6H, s), 1.81-1.68 (8H, m).

$C_{85}H_{106}N_6O_{27}$: $[M+Na]^+$ 計算值1666，實測值1667

(42D)乙　酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙　醯　胺-6-[3-[3-[[3-[[3-[3-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙醯胺-4,5-二乙醯氧基-6-[[雙(4-甲氧基苯基)-苯基-甲氧基]甲基]四氫吡喃-2-基]氧基丙基胺基]-4-側氧基-丁基]胺甲醯氧基]-2-[2-氰基乙氧基-(二異丙胺基) 膦基]氧基-丙氧基]羰基胺基]丁醯基胺基]丙氧基]-4-乙醯氧基-2-[[雙(4-甲氧基苯基)-苯基-甲氧基]甲基]四氫吡喃-3-基]酯(化合物42D)之合成

[化188]



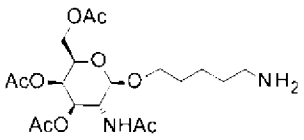
使用化合物42C(1.16 g，0.71 mmol)代替步驟(39D)所使用之化合物39C，以與步驟(39D)同樣之方式，獲得目標物42D(795 mg，產率61%)。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 7.40-7.17 (18H, m), 6.85-6.77 (8H, m), 6.72-5.65 (5H, m), 5.56 (2H, d, J = 3.0 Hz), 5.11-5.03 (2H, m), 4.46-4.35 (2H, m), 4.25-3.02 (42H, m), 2.65 (2H, t, J = 6.0 Hz), 2.39-2.16 (4H, m), 2.02 (6H, s), 1.99-1.94 (6H, m), 1.90 (6H, s), 1.87-1.59 (8H, m), 1.18 (12H, d, J = 6.7 Hz).

(參考例43)

(43A)乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-3,4-二乙醯氧基-6-(5-胺基戊氧基)四氫吡喃-2-基]甲酯鹽酸鹽(化合物43A)之合成

[化189]

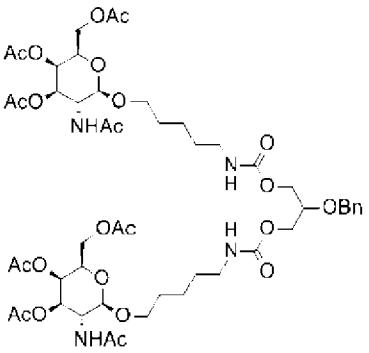


將步驟(21A)中合成之化合物21A(3.87 g，6.83 mmol)溶解於四氫吡喃(32 ml)/1 N鹽酸(8 ml)中。添加10%鈀/碳(濕基)(2 g)，於氫氣環境下在室溫下遽烈攪拌。反應結束後過濾，將所獲得之通過液進行減壓蒸餾去除而獲得目標物43A(3.1 g，產率97%)之粗產物。不再進一步進行精製，用於下一反應。

$C_{19}H_{32}N_2O_9$: $[M+H]^+$ 計算值433，實測值433.

(43B)乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-6-[5-[[3-[5-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙醯胺-4,5-二乙醯氧基-6-(乙醯氧基甲基)四氫吡喃-2-基]氧基戊基胺甲醯氧基]-2-苄氧基-丙氧基]胺甲醯基胺基]戊氧基]-3,4-二乙醯氧基-四氫吡喃-2-基]甲酯(化合物43B)之合成

[化190]



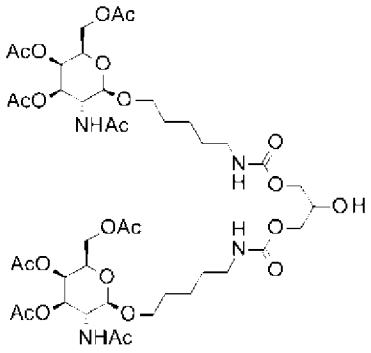
將2-苄氧基-1,3-丙二醇(600 mg，3.29 mmol)、氯甲酸4-硝基苯酯

(1.39 g，6.91 mmol)溶解於四氫呋喃(22 ml)中，添加吡啶(1.1 ml，13.2 mmol)，於室溫下攪拌15分鐘。將所析出之固體過濾後，添加四氫呋喃(16 ml)。繼而，添加步驟(43A)中合成之化合物(43A) (3.09 g，6.59 mmol)之四氫呋喃(15 ml)/二氯甲烷(5 ml)溶液與N,N-二異丙基乙基胺(3.4 mL，19.8 mmol)，於40℃下攪拌2小時。反應結束後，將溶劑減壓蒸餾去除。添加二氯甲烷，利用0.5 N鹽酸、飽和食鹽水、0.2 N氫氧化鈉水溶液、飽和食鹽水洗淨有機層後，利用無水硫酸鈉進行乾燥、過濾，將溶劑減壓蒸餾去除，而獲得粗產物。藉由矽膠管柱層析法(二氯甲烷：甲醇＝100：0-90：10，v/v)將其進行精製，而獲得主要含有目標物43B之混合物(2.1 g)。

$C_{50}H_{74}N_4O_{23}$：$[M+H]^+$ 計算值1099，實測值1099. $[M+Na]^+$ 計算值1121，實測值1121.

(43C)乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-6-[5-[[3-[5-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙醯胺-4,5-二乙醯氧基-6-(乙醯氧基甲基)四氫吡喃-2-基]氧基戊基胺甲醯氧基]-2-羥基-丙氧基]羰基胺基]戊氧基]-3,4-二乙醯氧基-四氫吡喃-2-基]甲酯(化合物43C)之合成

[化191]



將步驟(43B)中獲得之含有43B之混合物(2.1 g)溶解於四氫吡喃(20 ml)/純水(1 ml)中。添加1 N鹽酸(0.38 ml)、10%鈀/碳(濕基)(1 g)，於氫

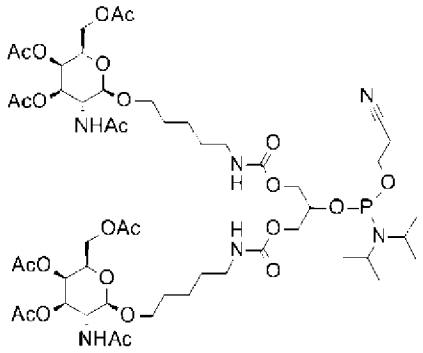
氣環境下在室溫下遽烈攪拌。反應結束後過濾，將所獲得之通過液進行減壓蒸餾去除，而獲得粗產物。藉由矽膠管柱層析法(乙酸乙酯：甲醇＝100：0-90：15，v/v)將其進行精製，而以固體之形式獲得目標物43C(1.38 g，產率72%)。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 6.10-5.96 (1H, m), 5.38-4.94 (6H, m), 4.70-4.64 (2H, m), 4.23-3.44 (19H, m), 3.20-3.15 (4H, m), 2.15 (6H, s), 2.05 (6H, s), 2.01 (6H, s), 1.97 (6H, s), 1.67-1.38 (12H, m).

$C_{43}H_{68}N_4O_{23}$：$[M+H]^+$ 計算值1009，實測值1009. $[M+Na]^+$ 計算值1031，實測值1031.

(43D)乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-6-[5-[[3-[5-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙醯胺-4,5-二乙醯氧基-6-(乙醯氧基甲基)四氫吡喃-2-基]氧基戊基胺甲醯氧基]-2-[2-氰基乙氧基-(二異丙胺基)膦基]氧基-丙氧基]胺甲醯基胺基]戊氧基]-3,4-二乙醯氧基-四氫吡喃-2-基]甲酯(化合物43D)之合成

[化192]



使用化合物43C(1.38 g，1.37 mmol)代替步驟(39D)所使用之化合物39C，以與步驟(39D)同樣之方式，獲得目標物43D(850 mg，產率51%)。

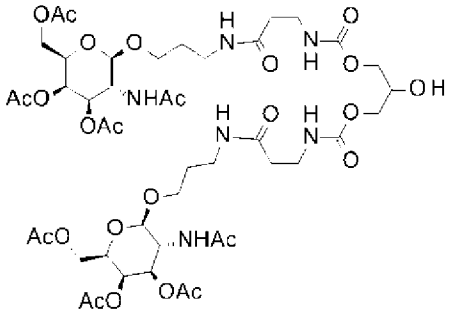
^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 5.95-5.89 (1H, m), 5.38-5.26 (4H, m), 5.20-5.16 (1H, m), 5.00-4.95 (1H, m), 4.71-4.68 (2H, m), 4.36-3.44 (22H, m), 3.15 (4H, q, J = 6.4 Hz), 2.67 (2H, t, J = 6.3 Hz), 2.15 (6H, s), 2.05 (6H,

s), 2.01 (6H, s), 1.96 (6H, s), 1.67-1.33 (12H, m), 1.18 (12H, d, J = 6.7 Hz).

(參考例44)

(44A)乙　酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙　醯　胺-6-[3-[3-[[3-[[3-[3-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙醯胺-4,5-二乙醯氧基-6-(乙醯氧基甲基)四氫吡喃-2-基]氧基丙基胺基]-3-側氧基-丙基]胺甲醯氧基]-2-羥基-丙氧基]羰基胺基]丙醯基胺基]丙氧基]-3,4-二乙醯氧基-四氫吡喃-2-基]甲酯(化合物44A)之合成

[化193]



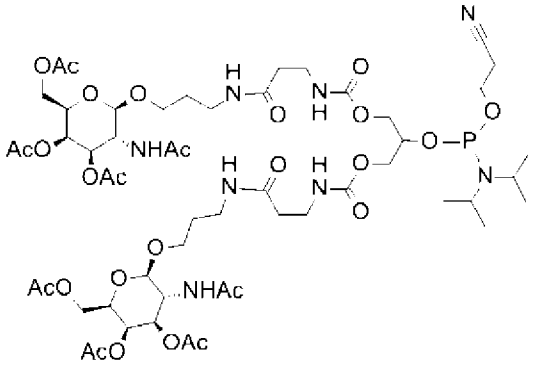
於步驟(41B)中合成之化合物41B(200 mg，0.62 mmol)之N,N-二甲基甲醯胺(2 ml)溶液中添加O-(N-丁二醯亞胺基)-N,N,N',N'-四甲基脲鎓四氟硼酸鹽(411 mg，1.37 mmol)、N,N-二異丙基乙基胺(0.32 ml，1.86 mmol)，於室溫下攪拌20分鐘。將該反應液添加至步驟(37B)中合成之化合物37B(657 mg，1.49 mmol)之N,N-二甲基甲醯胺(2 ml)溶液中後，添加N,N-二異丙基乙基胺(0.32 ml，1.86 mmol)，於室溫下攪拌60分鐘。反應結束後，將反應液滴加至二乙醚(共計80 ml)中。將上清液之溶劑去除後，藉由矽膠管柱層析法(二氯甲烷：甲醇＝100：0-75：25，v/v)將所獲得之凝膠狀之粗產物進行精製，而獲得非晶狀之目標物44A(408 mg，產率60%)。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 6.76 (2H, br), 6.69-6.63 (2H, m), 5.96 (1H, br), 5.36 (2H, d, J = 3.0 Hz), 5.13-5.08 (2H, m), 4.53 (2H, d, J = 8.5 Hz), 4.25-3.07 (27H, m), 2.51-2.44 (4H, m), 2.17 (6H, s), 2.06 (6H, s), 2.02 (6H, s), 2.00 (6H, s), 1.86-1.73 (4H, m).

$C_{45}H_{70}N_6O_{25}$: $[M+H]^+$ 計算值1095，實測值1096. $[M+Na]^+$ 計算值1117，實測值1117.

(44B)乙酸[(2R,3R,4R,5R,6R)-5-乙醯胺-6-[3-[3-[[3-[[3-[3-[(2R,3R,4R,5R,6R)-3-乙醯胺-4,5-二乙醯氧基-6-(乙醯氧基甲基)四氫吡喃-2-基]氧基丙基胺基]-3-側氧基-丙基]胺甲醯氧基]-2-[2-氰基乙氧基-(二異丙胺基)膦基]氧基-丙氧基]羰基胺基]丙醯基胺基]丙氧基]-3,4-二乙醯氧基-四氫吡喃-2-基]甲酯(化合物44B)之合成

[化194]



使用化合物44A(1.53 g，1.40 mmol)代替步驟(39D)所使用之化合物39C，以與步驟(39D)同樣之方式，獲得目標物44B(510 mg，產率28%)。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 6.60-6.44 (4H, m), 5.76-5.68 (1H, m), 5.36 (2H, d, J = 3.0 Hz), 5.09-5.05 (2H, m), 4.50-4.45 (2H, m), 4.26-3.37 (28H, m), 3.17 (2H, br), 2.67 (2H, t, J = 6.3 Hz), 2.52-2.42 (4H, m), 2.17 (6H, s), 2.05 (6H, s), 2.02 (6H, s), 1.99 (6H, s), 1.81-1.70 (4H, m), 1.18 (12H, d, J = 6.7 Hz).

(實施例152)

X^{20}-A^{mls}-A^{e2s}-U^{mls}-C^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{e2s}-U^{mls}-G^{mls}-G^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-A^{e2s}-G^{mlt}-H(序列編號40)

將X^{18}之部分置換為X^{20}，與實施例143同樣地進行合成。所使用之序列為上述序列15e_001.5。

本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第92號至第106號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6261.98)

(實施例153)

X^{20}-A^{e2s}-U^{mls}-C^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{e2s}-U^{mls}-G^{mls}-G^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-A^{e2s}-G^{mls}-C^{e2t}-H(序列編號44)

將X^{18}之部分置換為X^{20}，與實施例144同樣地進行合成。所使用之序列為上述序列15e_005.5。

本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第91號至第105號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6264.00)

(實施例154)

X^{20}-A^{mls}-A^{mls}-A^{e2s}-U^{mls}-C^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{e2s}-U^{mls}-G^{mls}-G^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-A^{e2s}-G^{mlt}-H(序列編號42)

將X^{18}之部分置換為X^{20}，與實施例146同樣地進行合成。所使用之序列為上述序列16e_001.5。

本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第92號至第107號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6621.04)

(實施例155)

X^{20}-A^{m1s}-A^{e2s}-U^{m1s}-C^{m1s}-C^{e2s}-G^{m1s}-A^{e2s}-U^{m1s}-G^{m1s}-G^{m1s}-C^{e2s}-G^{m1s}-A^{m1s}-A^{e2s}-G^{m1s}-C^{e2t}-H(序列編號47)

將X^{18}之部分置換為X^{20}，與實施例147同樣地進行合成。所使用之序列為上述序列16e_002.5。

本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第91號至第106號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6623.05)

(實施例156)

X^{21}-A^{m1s}-A^{e2s}-U^{m1s}-C^{m1s}-C^{e2s}-G^{m1s}-A^{e2s}-U^{m1s}-G^{m1s}-G^{m1s}-C^{e2s}-G^{m1s}-A^{m1s}-A^{e2s}-G^{m1t}-H(序列編號40)

將X^{18}之部分置換為X^{21}，與實施例143同樣地進行合成。所使用之序列為上述序列15e_001.5。

本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，

轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第92號至第106號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6290.02)

(實施例157)

X^{22}-A^{m1s}-A^{e2s}-U^{m1s}-C^{m1s}-C^{e2s}-G^{m1s}-A^{e2s}-U^{m1s}-G^{m1s}-G^{m1s}-C^{e2s}-G^{m1s}-A^{m1s}-A^{e2s}-G^{m1t}-H(序列編號40)

將X^{18}之部分置換為X^{22}，與實施例143同樣地進行合成。所使用之序列為上述序列15e_001.5。

本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第92號至第106號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6175.96)

(實施例158)

X^{22}-A^{e2s}-U^{m1s}-C^{m1s}-C^{e2s}-G^{m1s}-A^{e2s}-U^{m1s}-G^{m1s}-G^{m1s}-C^{e2s}-G^{m1s}-A^{m1s}-A^{e2s}-G^{m1s}-C^{e2t}-H(序列編號44)

將X^{18}之部分置換為X^{22}，與實施例144同樣地進行合成。所使用之序列為上述序列15e_005.5。

本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第91號至第105號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測

值：6177.98)

(實施例159)

X^{22}-A^{mls}-A^{mls}-A^{e2s}-U^{mls}-C^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{e2s}-U^{mls}-G^{mls}-G^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-A^{e2s}-G^{mlt}-H(序列編號42)

將X^{18}之部分置換為X^{22}，與實施例146同樣地進行合成。所使用之序列為上述序列16e_001.5。

本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第92號至第107號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6535.03)

(實施例160)

X^{22}-A^{mls}-A^{e2s}-U^{mls}-C^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{e2s}-U^{mls}-G^{mls}-G^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-A^{e2s}-G^{mls}-C^{e2t}-H(序列編號47)

將X^{18}之部分置換為X^{22}，與實施例147同樣地進行合成。所使用之序列為上述序列16e_002.5。

本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第91號至第106號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6537.05)

【0428】(試驗例1)使用培養細胞之利用實施例化合物之異常剪接之修復評價

293A細胞(人胚胎腎細胞)之培養

以如下方式進行293A細胞(R705-07 invitrogen)之培養。

將293A細胞於維持培養基(DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium，達爾伯克改良伊格爾培養基)、10%FBS(Fetal Bovine Serum，胎牛血清))中維持培養。實驗中以2×10^5 cells/well之密度於6孔板中接種細胞，以1×10^5 cells/well之密度於12孔板中接種細胞，第二天，以下文所述之方式同時導入實施例之化合物、及質粒載體而用於評價。

【0429】

人G6PC全長質粒載體之製作

以如下方式製作人G6PC全長質粒載體(pcDNA hG6PC, pcDNA hG6PC (c.648G＞T)＋Int4)。

以人多組織(Human Multiple Tissue)cDNA板作為模板，使用下述G6PC cDNA擴增引子(Amplified primer)將G6PC cDNA擴增後，進而藉由G6PC cDNA IF引子進行擴增。藉由InFusion系統將經擴增之片段插入至pcDNA3.1之BamHI位點(pcDNA hG6PC)。

G6PC cDNA擴增引子：

前置引子5'-ATAGCAGAGCAATCACCACCAAGCC-3' (序列編號49)

反置引子5'-ATTCCACGACGGCAGAATGGATGGC-3' (序列編號50)

G6PC IF引子：

前置引子5'-TACCGAGCTCGGATCCACCACCAAGCCTGGAATAACTGC-3'(序列編號51)

反置引子5'-CTGGACTAGTGGATCCTGGCATGGTTGTTGACTTTAAAC-3'(序列編號52)

以人基因組DNA作為模板，使用下述G6PC Int4擴增引子將G6PC內含子4與包含一部分外顯子5之區域擴增，進而藉由G6PC Int4 IF引子將G6PC內含子4進行擴增。又，使用下述hG6PC載體IF引子將STEP1-1製作之pcDNA hG6PC進行擴增。再者，對InFusion引子導入外顯子5內之c.648G＞T變異。藉由InFusion系統將兩片段連結，將G6PC內含子4序列插入至pcDNA hG6PC內(pcDNA hG6PC (c.648G＞T)＋Int4)。

G6PC Int4擴增引子：

前置引子5'-TCTGGGCTGTGCAGCTGAATGTCTG-3' (序列編號53)

反置引子5'-GTAGGGGATGACACTGACGGATGCC-3' (序列編號54)

G6PC Int4 IF引子：

前置引子5'-CTGGAGTCCTGTCAGGTATGGGC-3' (序列編號55)

反置引子5'-AGCTGAAAAGGAAGAAGGTAATGAG-3' (序列編號56)

hG6PC載體IF引子：

前置引子5'-TCTTCCTTTTCAGCTTCGCCATCGG-3' (序列編號57)

反置引子5'-CTGACAGGACTCCAGCAACAAC-3' (序列編號58)

【0430】

實施例之化合物、及質粒載體之共轉染

以如下方式將實施例之化合物、及質粒載體進行共轉染。

製作下述A液與B液後加以混合。

於藉由6孔板實施之情形時，對於每孔，準備250 μL之Opti-MEM培養基(gibco)、0.50 μL質粒載體(1 mg/mL)、4.0 μL(最終：20 nM)實施例中製造之化合物(12.5 μM)作為A液，準備250 μL之Opti-MEM培養基(gibco)、6.0 μL Lipofectamine 2000(Invitrogen)作為B液，並將A液與B

液加以混合。於藉由12孔板實施之情形時，對於每孔，準備125 μL之Opti-MEM培養基(gibco)、0.25 μL質粒載體(1 mg/mL)、2.0 μL(最終：20 nM)實施例中製造之化合物(12.5 μM)作為A液，準備125 μL之Opti-MEM培養基(gibco)、3.0 μL Lipofectamine 2000(Invitrogen)作為B液，並將A液與B液加以混合。

將上述混合液於室溫下培養20分鐘後，添加至繼代第二天之細胞中(共轉染)。添加6小時後，更換為新鮮之維持培養基，自上述混合液添加起於CO_2培養箱中培養24小時。

【0431】

RNA萃取(體外)

以如下方式進行RNA之萃取。

【0432】 藉由冷PBS(Phosphate Buffered Saline，磷酸鹽緩衝鹽水)將共轉染後培養24小時之細胞洗淨1次。將RNeasy迷你套組或RNeasy 96套組(Qiagen)之細胞溶解液以每孔300 μL之方式逐孔添加，於室溫下培養5分鐘後回收。對於回收液，依照包含DNase處理之套組之操作說明進行RNA精製。DNase處理係使用RNase-Free DNase set (Qiagen 89254)。經精製、溶出之RNA係進行下文所述之反轉錄反應。

【0433】

反轉錄反應

以如下方式進行反轉錄反應。

【0434】 將萃取RNA調整為25～100 mg/mL後，使用高容量RNA-to-cDNA套組(High Capacity RNA-to-cDNA kit)(Applied biosystems)，以每份樣品成為10 μL緩衝液混合物(Buffer mix)、1 μL酶混合物(Enzyme

mix)、9 μL純化水、＋萃取RNA之方式混合，進行反轉錄反應(37℃下60 min、95℃下5 min、4℃下保持)。

相對於反轉錄反應產物20 μL，藉由純化水80 μL稀釋成5倍，於-30℃下保存。

【0435】

qRT-PCR(SYBR Green)

以下述方式設計qRT PCR引子(SYBR Green)。

修復hG6PC引子(SYBR)：

前置引子5'-TTGTGGTTGGGATTCTGGGC-3' (序列編號59)

反置引子5'-ATGCTGTGGATGTGGCTGAA-3' (序列編號60)

hActin引子(SYBR)：

前置引子5'-TGGCACCCAGCACAATGAA-3' (序列編號61)

反置引子5'-CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA-3' (序列編號62)

又，關於PCR反應液，每孔懸浮5 μL之2× FAST SYBR Green Master Mix(Applied Biosystems)、2 μL純化水、1 μL之引子混合物(Primer mix)(10 μM)、2 μL之cDNA(經5倍稀釋)，藉由viia7(Applied Biosystems)進行PCR反應(程式：SYBR Green Regents，FAST，包括熔解曲線)。

【0436】

qRT-PCR(Taqman分析)

以下述方式設計修復hG6PC引子組、總hG6PC引子組，調整20×引子探針混合物(primer probe mix)(引子濃度：1000 nM，探針濃度：250 nM)。hActin引子組、mActin引子組係直接使用原液。

修復hG6PC引子組(Taqman)：

前置引子5'-GCTGCTCATTTTCCTCATCAAGTT-3' (序列編號63)

反置引子5'-TGGATGTGGCTGAAAGTTTCTGTA-3' (序列編號64)

探針5'-TCCTGTCAGGCATTGC-3' FAM (序列編號65)

hActin引子組(Taqman)：ABI Hs01060665_g1 FAM

mActin引子組(Taqman)：ABI Mm02619580_g1 FAM

18s引子組(Taqman)：ABI Hs99999901_s1 FAM

又，每孔懸浮5 μL之2×Taqman Fast Advanced Master Mix(Applied Biosystems)、2.5 μL純化水、0.5 μL之20×引子探針混合物(10 μM)、2 μL之cDNA(經5倍稀釋)，調整PCR反應液(相對於每管)，藉由viia7或Quantstadio7(Applied Biosystems公司)進行PCR反應(程式：Taqman regents，FAST)。

【0437】

利用LC-MS/MS之正常人G6PC特異性肽之定量

以如下方式進行蛋白質之萃取及正常人G6PC特異性肽之LC-MS/MS定量。

【0438】

蛋白質溶解物之萃取、調整

藉由冷PBS將共轉染後培養24小時之細胞洗淨1次。將RIPA(Radioimmunoprecipitation Assay，放射免疫沈澱分析)緩衝液(Nacalai Tesque)以每孔100 μL之方式逐孔添加，於冰上培養後回收。對於回收液，於冰上培養20分鐘後，將10000 g於4℃下離心10分析並將上清液回收。對上清液測定總蛋白質量，以成為0.4 mg/mL之方式進行調整

而製成蛋白質溶解物。

【0439】

試劑之調整

DS264_100u：將穩定同位素標記肽GLGVD(L*)LWT(L*)EK(Scrum，L*：L-白胺酸-$^{13}C_6$,^{15}N)藉由50%cn(純化水/乙腈)調整為100 μM。

DS266_100u：將穩定同位素標記肽WCEQPEW(V*)HIDTTPFAS(L*)LK(L*：L-白胺酸-$^{13}C_6$,^{15}N，V*：L-纈胺酸-$^{13}C_5$,^{15}N)藉由50%cn(純化水/乙腈)調整為100 μM。

DS268_100u：將穩定同位素標記肽NLGTLFG(L*)GLA(L*)NSSMYR(Scrum，L*：L-白胺酸-$^{13}C_6$,^{15}N)藉由50%cn(純化水/乙腈)調整為100 μM。

IS溶液-1：懸浮50 mL乙腈、0.5 mL三氟乙酸(Nacalai)、20 μL之DS264_100u、20 μL之DS266_100u、20 μL之DS268_100u。

IS溶液-2：懸浮50 mL乙腈、50 mL純化水、0.5 mL三氟乙酸(Nacalai)、20 μL之DS264_100u、20 μL之DS266_100u、20 μL之DS268_100u。

0.1 M Tris-HCl：將5 mL之1 M Tris-HCl緩衝溶液(pH值8.0)添加懸浮於45 mL之純化水中。

脲/EDTA(ethylenediamine tetraacetic acid，四乙酸乙二胺)溶液：將2.4 g脲(Nacalai)、100 μL之0.5M EDTA(sigma-aldorich)添加、懸浮於4.9 mL之0.1 M Tris-HCl中。

DTT溶液(20 mg/mL)：將20 mg之DTT(dithiothreitol，二硫蘇糖

醇)(Wako)添加懸浮於1 mL之純化水中。

IAA溶液(50 mg/mL)：將50 mg之IAA(iodoacetamide，碘乙醯胺)(sigma-aldorich)添加懸浮於1 mL純化水中。

胰蛋白酶/LysC Mix溶液(200 μg/mL)：將20 μg胰蛋白酶/Lys-C Mix(1小瓶)(Promega)添加懸浮於100 μL之再懸浮緩衝液(Promega)中。

【0440】

消化處理

依照下述實施酶消化反應，調整LC-MS注射樣品(相對於每份樣品)。

【0441】懸浮20 μL脲/EDTA溶液、10 μL蛋白質溶解物、10 μL之DTT溶液，於室溫下靜置60分鐘後，添加懸浮2.5 μL之IAA溶液並於室溫下靜置60分鐘。其後，對於懸浮液，添加懸浮112.5 μL之0.1 M Tris-HCl與2.5 μL胰蛋白酶/LysC Mix溶液，於37℃下培養一晚後，添加150 μL之IS溶液-1、300 μL之IS溶液-2製成LC-MS注射樣品。

【0442】

LC-MS分析、試樣中濃度測定

使用Ultimate 3000(Thermo Fisher), Q Exactive plus(Thermo Fisher)實施LC-MS注射樣品之LC-MS分析。使用內部標準法由質量範圍(Mass range)820.0632-820.0782 (m/z)算出下述肽(DS265)之試樣中濃度。

DS265：WCEQPEWVHIDTTPFASLLK(序列編號66)

【0443】

G6PC酵素活性之測定

以下述方式實施所萃取之各檢體之微粒體組分的G6PC之活性測定。

【0444】 (1)試劑之製備

緩衝液A：100 mM BIS-TRIS緩衝液，pH值6.5，37℃

於180 mL純化水中添加4.2 g之BIS-TRIS(Sigma-Aldrich)。使用鹽酸、純化水調整為pH值6.5、37℃、200 mL。

緩衝液B：HEPES 20 mM，EDTA 1 mM，蔗糖250 mM(4℃保存)

於180 mL純化水中添加4.0 mL之1.0 M HEPES(Gibco)、0.4 mL之0.5 M EDTA(USB)、17 g蔗糖(Wako)。將純化水調整為200 mL後，進行0.22 μm過濾器之透過處理。

受質：200 mM葡萄糖6-磷酸(4℃保存)

於88.65 mL純化水中添加5 mg之D-葡萄糖6-磷酸鈉(Sigma-Aldrich)。

TCA：20%三氯乙酸(室溫、遮光保存)

於40 mL純化水中添加10 mL三氯乙酸溶液(Sigma-Aldrich)。

標準液：磷標準液(Phosphorus Standard Solution)，20 μg/ml(Sigma-Aldrich)(4℃保存)

5 M硫酸溶液(室溫、遮光保存)

於67 mL純化水中添加25 mL硫酸(Aldrich 258105)。

TSCR：Taussky-Shorr顯色劑(用時製備)

於5 M硫酸溶液20 mL中添加2.4 mg四水合鉬酸銨(Ammonium Molybdate Tetrahydrate)(Sigma-Aldrich)，將溶解液添加於140 mL之純化水中。進而添加10 g七水合硫酸亞鐵(Ferrous Sulfate Heptahydrate)(Sigma-Aldrich)，攪拌至溶解後，藉由純化水定容至200

mL。

【0445】 (2)微粒體組分之精製

依照下述程序對微粒體組分進行精製、調整。

藉由冰冷PBS洗淨實施例化合物、及已進行質粒載體之共轉染之293A細胞(於6孔板中)後，將冰冷卻緩衝液B添加於各孔中，並利用細胞刮勺進行回收。使用Dounce均質器於冰上(On ice)將所回收之細胞充分均質化後，將1000 g於4℃下離心10 min，將上清液回收。將該上清液13000 g於4℃下離心60 min，去除上清液，將顆粒於緩衝液B中懸浮。以懸浮液之蛋白濃度成為一定(0.3～1.0 mg/mL)之方式藉由緩衝液B進行調整。

【0446】 (3) G6PC酵素活性測定

藉由下述方法測定蛋白濃度經調整之微粒體組分(樣品)之G6PC酵素活性。試劑之名稱依照(1)。

對於各樣品製作測試組與空白組。於測試組中懸浮150 μL緩衝液A、50uL受質，於37℃下培養5分鐘。於其中添加、懸浮5 μL之樣品，於37℃下準確培養5分鐘後，添加45 μL之TCA。充分懸浮後，於25℃下培養5分鐘。於空白組中懸浮150 μL緩衝液A、50uL受質，於37℃下培養5分鐘。於其中添加懸浮5 μL之樣品、45 μL之TCA並於25℃培養者。將4000 g之各樣品之測試組及空白組於室溫下離心10分鐘，將該上清液分注於其他管中。對於各上清液100 μL，添加100 μL之TSCR，於室溫下培養5分鐘後，藉由讀板儀(Spectra Max M4 Molecular Devices)測定660 nm之吸光度。根據使用標準液之稀釋體系算出之校準曲線、各樣品之測試組與空白組之吸光度、樣品之蛋白濃度算出G6PC酵素活性(U/mg：樣品中之總蛋

白質1 mg於1分鐘內分解之G6P量(μmol))。

【0447】

使用人G6PC全長質粒載體(pcDNA hG6PC (c.648G＞T)＋Int4)之利用實施例化合物的G6PC mRNA之異常剪接之修復評價(1)

進行人G6PC全長質粒載體(pcDNA hG6PC (c.648G＞T)＋Int4)與寡核苷酸(21e_001～012、及21m_001～012)之共轉染，藉由qRT-PCR(SYBR Green)評價是否修復G6PC(c.648G＞T)引起之異常剪接。如圖5A及5B所示，21e_002～012、及21m_002～012之化合物中觀察到G6PC mRNA之異常剪接之正常化。又，對利用LC-MS/MS之正常人G6PC特異性肽之產生進行研究，結果如圖6A及6B所示，於21e_002～012、及21m_002～012之化合物中觀察到正常人G6PC特異性肽之產生。進而，測定G6PC酵素活性之結果為如圖7A及7B所示，於21e_002～012、及21m_002～012之化合物中觀察到G6PC酵素活性。

【0448】

使用人G6PC全長質粒載體(pcDNA hG6PC (c.648G＞T)＋Int4)之利用實施例化合物的G6PC mRNA之異常剪接之修復評價(2)

進行人G6PC全長質粒載體(pcDNA hG6PC (c.648G＞T)＋Int4)與寡核苷酸(21e_001～006、及21e_013～022)之共轉染，藉由qRT-PCR(SYBR Green)評價是否修復G6PC (c.648G＞T)引起之異常剪接。如圖9所示，21e_002～006、及21e_015～022之化合物中觀察到G6PC mRNA之異常剪接之正常化。又，對利用LC-MS/MS之正常人G6PC特異性肽之產生進行研究，結果如圖10所示，於21e_002～006、及21e_015～022之化合物中，觀察到正常人G6PC特異性肽之產生。

【0449】

使用人G6PC全長質粒載體(pcDNA hG6PC (c.648G＞T)＋Int4)之利用實施例化合物的G6PC mRNA之異常剪接之修復評價(3)

進行人G6PC全長質粒載體(pcDNA hG6PC (c.648G＞T)＋Int4)與寡核苷酸(18e_001～017、及18m_001～017)之共轉染，藉由qRT-PCR(SYBR Green)評價是否修復G6PC (c.648G＞T)引起之異常剪接。如圖13A及13B所示，18e_005～017、及18m_005～017之化合物中觀察到G6PC mRNA之異常剪接之正常化。又，對利用LC-MS/MS之正常人G6PC特異性肽之產生進行研究，結果如圖14A及14B所示，於18e_005～017、及18m_005～017之化合物中，觀察到正常人G6PC特異性肽之產生。

【0450】

使用人G6PC全長質粒載體(pcDNA hG6PC (c.648G＞T)＋Int4)之利用實施例化合物的G6PC mRNA之異常剪接之修復評價(4)

進行人G6PC全長質粒載體(pcDNA hG6PC (c.648G＞T)＋Int4)與寡核苷酸(18e_018～031)之共轉染，藉由qRT-PCR(SYBR Green)評價是否修復G6PC (c.648G＞T)引起之異常剪接。如圖16A所示，18e_022～026、及18e_031之化合物中觀察到G6PC mRNA之異常剪接之正常化。又，對利用LC-MS/MS之正常人G6PC特異性肽之產生進行研究，結果如圖16B所示，於18e_022～026、及18e_031之化合物中，觀察到正常人G6PC特異性肽之產生。

【0451】

使用人G6PC全長質粒載體(pcDNA hG6PC (c.648G＞T)＋Int4)之利用

實施例化合物的G6PC mRNA之異常剪接之修復評價(5)

進行人G6PC全長質粒載體(pcDNA hG6PC (c.648G＞T)＋Int4)與寡核苷酸(21e_002、18e_005、21m_002、18e_005、18m_022、15e_001、15ed_001、18e_008、18e_025、18m_008、15e_002、15ed_002、及作為對照之國際公開第2004/048570之實施例93之化合物)之共轉染，藉由qRT-PCR(SYBR Green)評價是否修復G6PC (c.648G＞T)引起之異常剪接。如圖18所示，21e_002、18e_005、21m_002、18e_005、18m_022、15e_001、15ed_001、18e_008、18e_025、18m_008、15e_002、及15ed_002之化合物中觀察到G6PC mRNA之異常剪接之正常化。

【0452】(試驗例2)使用模型小鼠之利用實施例化合物之異常剪接之修復評價

小鼠之製造

載體之製作

依照下述程序，製作G6PC KI載體。

以小鼠基因組DNA為模板，使用下述mG6PC 5'臂擴增引子，將G6PC 5'臂區域擴增。進而利用mG6PC 5'臂IF引子擴增後，插入pBluescriptII(+/-)之XhoI位點(G6PC 5'臂載體)。

mG6PC 5'臂擴增引子：

前置引子5'-GGGAAACATGCATGAAGCCCTGGGC-3' (序列編號67)

反置引子5'-TCCCTTGGTACCTCAGGAAGCTGCC-3' (序列編號68)

mG6PC 5'臂IF引子：

前置引子5'-CGGGCCCCCCCTCGAAAACTAGGCCTGAAGAGATGGC-3' (序列編號69)

反置引子5'-TACCGTCGACCTCGAGGGTTGGCCTTGATCCCTCTGCTA-3' (序列編號70)

繼而，以小鼠基因組DNA為模板，使用下述mG6PC 3'臂擴增引子，將G6PC 3'臂區域擴增。進而，利用mG6PC 3'臂IF引子擴增後，插入G6PC 5'臂載體之NotI位點(G6PC 5'＋3'臂載體)。

mG6PC 3'臂擴增引子：

前置引子5'-GGTTGAGTTGATCTTCTACATCTTG-3' (序列編號71)

反置引子5'-GCAAGAGAGCCTTCAGGTAGATCCC-3' (序列編號72)

mG6PC 3'臂IF引子：

前置引子5'-AGTTCTAGAGCGGCCGCCCATGCAAAGGACTAGGAACAAC-3' (序列編號73)

反置引子5'-ACCGCGGTGGCGGCCAATGTTGCCTGTCTTCCTCAATC-3' (序列編號74)

以上文所述之pcDNA hG6PC (c.648G＞T)＋Int4作為模板，使用下述hG6PC＋Int4 IF引子將hG6PC (c.648G＞T)＋內含子4進行擴增。又，以G6PC 5'＋3'臂載體作為模板，使用下述臂載體IF引子進行擴增。使用InFusion系統將兩片段連結而製作G6PC KI載體。

hG6PC＋Int4 IF引子：

前置引子5'-GGCCAACCCTGGAATAACTGCAAGGGCTCTG-3' (序列編號75)

反置引子5'-TTGCATGGTTGTTGACTTTAAACACCGAAGA-3' (序列編號76)

臂載體IF引子：

前置引子5'-TCAACAACCATGCAAAGGACTAGGAACAAC-3' (序列編號77)

反置引子5'-ATTCCAGGGTTGGCCTTGATCCCTCTGCTA-3' (序列編號78)

向pSPgRNA(addgene)之gRNA序列導入區域導入下述KI 5' gRNA、KI 3' gRNA序列，而製作pSPgRNA(KI 5')、pSPgRNA(KI 3')。

KI 5' gRNA：5'-GGGATCAAGGCCAACCGGCTGG-3' (序列編號79)

KI 3' gRNA：5'-TAAAGTCAACCGCCATGCAAAGG-3' (序列編號80)

【0453】

顯微注射

使用殺菌蒸餾水，以最終濃度成為G6PC KI載體10 ng/μL、pSPgRNA(KI 5') 5 ng/μL、pSPgRNA(KI 3') 5 ng/μL、pSPCas9(addgene)5 ng/μL之方式調整各種載體後，注射通過MILLEX-GV針筒過濾器(Millipore)者直至C57BL/6J小鼠受精卵之原核充分膨脹之程度為止(約2 pL)。將該受精卵移植至受體C57BL/6J小鼠之輸卵管，而獲得F0小鼠。

【0454】

基因型鑑定、F1系統化

藉由以下之程序實施基因型鑑定(Genotyping)並進行F1系統化。

使用核酸自動提取裝置(PI-200 Kurabo)及專用套組自F0小鼠之尾組織提取基因組DNA。使用Amplitaq Gold Master mix (Thermo fisher)及

使用下述KI篩選引子將提取DNA進行擴增(95℃下10 min，將(95℃下30 sec、60℃下30 sec、72℃下30 sec)循環35次，72℃下2 min，4℃下保持)。

KI篩選引子：

前置引子5'-TACGTCCTCTTCCCCATCTG-3' (序列編號81)、

反置引子5'-CTGACAGGACTCCAGCAACA-3' (序列編號82)

對上述PCR產物實施凝膠電泳，以於433 bp附近觀察到頻帶之個體之基因組DNA作為模板，使用PrimeSTAR GXL(takara)及下述KI基因型鑑定引子進行擴增(98℃下2 min，將(95℃下15 sec、68℃下5 min)循環38次，68℃下7 min，15℃下保持)。

KI基因型鑑定引子 (5')：

前置引子5'-TTCCTTCCAAAGCAGGGACTCTCTATGT-3' (序列編號83相同(1))

反置引子5'-CTTGCAGAAGGACAAGACGTAGAAGACC-3' (序列編號84相同(2))

KI基因型鑑定引子 (3')：

前置引子5'-GAGTCTATATTGAGGGCAGGCTGGAGTC-3' (序列編號85)、

反置引子5'-TAGTCTGCCTGCTCACTCAACCTCTCCT-3' (序列編號86)

對上述PCR產物實施凝膠電泳。使用基因分析儀(Gentetic analyzer)(Lifetechnology)及下述KI定序引子對使用KI基因型鑑定引子(5')及KI基因型鑑定引子(3')均觀察到擴增為所期待之序列長度(4705 bp、

4026 bp)之個體之基因組DNA的KI基因型鑑定引子(5')之PCR產物進行直接定序。將可確認到所期待之序列之KI者設為KI陽性F0。

KI定序引子 (5')：5'-GAGTCTATATTGAGGGCAGGCTGGAGTC-3' (序列編號87)

使KI陽性F0與C57BL/6J交配而獲得F1。使用DNeasy 96血液及組織套組(NDeasy 96 Blood & Tissue Kit)(Qiagen)自F1之耳廓組織提取基因組DNA，使用PrimeSTAR GXL(takara)及上文所述KI基因型鑑定引子(5')進行擴增(98℃下2 min，將(95℃下15 sec、68℃下5 min)循環38次，68℃下7 min，15℃下保持)。

對上述PCR產物實施凝膠電泳，將觀察到擴增為所期待之序列長度(4705 b)之個體設為KI陽性F1。使自KI陽性F1中篩選之1株進行繁殖，製成hG6PC (c.648G＞T)＋Int4 KI系統。

【0455】

hG6PC (c.648G＞T)＋Int4系統之基因型鑑定

使用DNeasy 96血液及組織套組(Qiagen)自耳廓組織提取基因組DNA，使用KOD FX(TOYOBO)及下述KI基因型鑑定引子、mG6PC WT引子進行複合擴增(98℃下2 min，將(95℃下15 sec、68℃下5.5 min)循環32次，68℃下5 min，4℃下保持)。

KI基因型鑑定引子 (5')：

前置引子5'-TTCCTTCCAAAGCAGGGACTCTCTATGT-3' (序列編號83相同(1))

反置引子5'-CTTGCAGAAGGACAAGACGTAGAAGACC-3' (序列編號84相同(2))

mG6PC WT 引子：

前置引子5'-TAAATTTGACCAATGAGCACTGGAGGTC-3' (序列編號88)

反置引子5'-AAAATCATGTGTATGCGTGCCTTTCCTA-3' (序列編號89)'

對上述PCR產物實施凝膠電泳，以4705 b附近之擴增作為KI對偶基因，以2536 bp附近之擴增作為mG6PC WT對偶基因，判斷新生小鼠之基因型鑑定(WT、Ht、Homo)。

【0456】

小鼠之取材

以如下方式進行小鼠之取材。

於取材前一天傍晚設置用以避免食糞之地網，並且開始絕食。第二天，於麻醉導入下開腹，充分放血後，摘下肝臟、腎臟。各器官利用冰冷PBS洗淨後，修整為合適之大小，保存於預先裝入有均質化珠(NIKKATO)之管中。各器官藉由液態氮瞬間冷卻後於-80℃下保管。

【0457】

RNA萃取(體內)

以如下方式進行RNA之萃取。

【0458】 對於組織保存管，逐支添加600 μL之RNeasy迷你套組或Qiacube系統(Qiagen)之細胞溶解液，藉由tissue lyserII (Qiagen)以25 kHz均質化2 min。於冰浴冷卻下培養10分鐘後，以8000 G於室溫下離心10分鐘並回收上清液。對於上清液，依照包含DNase處理之各套組之操作說明進行RNA精製。DNase處理使用RNase-Free DNase set (Qiagen)。經

精製、溶出之RNA進行上文所述之反轉錄反應，依照上文所述之qRT-PCR(Taqman分析)進行修復G6PC mRNA之定量。

【0459】

使用hG6PC (c.648G＞T)＋Int4 Ht KI小鼠之利用實施例化合物之異常剪接之修復評價(1)

對於hG6PC (c.648G＞T)＋Int4 Ht KI小鼠，可將實施例116至127之化合物溶解於PBS中，以成為3 mg/kg之方式實施尾靜脈投予。投予7天後，於絕食一晚之條件下採集小鼠之肝臟組織，可藉由qRT-PCR(Taqman)評價是否修復G6PC (c.648G＞T)引起之異常剪接。

【0460】

使用hG6PC (c.648G＞T)＋Int4 Ht KI小鼠之利用實施例化合物之異常剪接之修復評價(2)

對於hG6PC (c.648G＞T)＋Int4 Ht KI小鼠，將實施例91至95之化合物溶解於大塚生食注中，以成為25 mg/kg之方式實施皮下投予。投予7天後，於絕食一晚之條件下採集小鼠之肝臟組織，藉由qRT-PCR(Taqman)評價是否修復G6PC (c.648G＞T)引起之異常剪接，結果如圖19所示，藉由實施例91至95之化合物，於hG6PC (c.648G＞T)＋Int4 Ht KI小鼠之肝臟中可觀察到mRNA之異常剪接之正常化。

【0461】

使用hG6PC (c.648G＞T)＋Int4 Ht KI小鼠之利用實施例化合物之異常剪接之修復評價(3)

對於hG6PC (c.648G＞T)＋Int4 Ht KI小鼠，將實施例91、92、及96至103之化合物溶解於大塚生食注中，以成為25 mg/kg之方式實施皮下投

予。投予7天後，於絕食一晚之條件下採集小鼠之肝臟組織，藉由qRT-PCR(Taqman)評價是否修復G6PC (c.648G＞T)引起之異常剪接，結果如圖20所示，藉由實施例91、92、及96至103之化合物，於hG6PC (c.648G＞T)＋Int4 Ht KI小鼠之肝臟中可觀察到mRNA之異常剪接之正常化。

【0462】

使用hG6PC (c.648G＞T)＋Int4 Ht KI小鼠之利用實施例化合物之異常剪接之修復評價(4)

對於hG6PC (c.648G＞T)＋Int4 Ht KI小鼠，將實施例83至91、及104至107之化合物溶解於大塚生食注中，以成為30 mg/kg之方式實施皮下投予。投予7天後，於絕食一晚之條件下採集小鼠之肝臟組織，藉由qRT-PCR(Taqman)評價是否修復G6PC (c.648G＞T)引起之異常剪接，結果如圖21所示，藉由實施例83至91、及104至107之化合物，於hG6PC (c.648G＞T)＋Int4 Ht KI小鼠之肝臟中可觀察到mRNA之異常剪接之正常化。

【0463】

使用hG6PC (c.648G＞T)＋Int4 Ht KI小鼠之利用實施例化合物之異常剪接之修復評價(5)

對於hG6PC (c.648G＞T)＋Int4 Ht KI小鼠，將實施例104、及108至115之化合物溶解於大塚生食注中，以成為30 mg/kg之方式實施皮下投予。投予7天後，於絕食一晚之條件下採集小鼠之肝臟組織，藉由qRT-PCR(Taqman)評價是否修復G6PC (c.648G＞T)引起之異常剪接，結果如圖22所示，藉由實施例83至91、及104至107之化合物，於hG6PC (c.648G＞T)＋Int4 Ht KI小鼠之肝臟中可觀察到mRNA之異常剪接之正常

化。

【0464】

使用hG6PC (c.648G＞T)＋Int4 Ht KI小鼠之利用實施例化合物之異常剪接之修復評價(6)

對於hG6PC (c.648G＞T)＋Int4 Ht KI小鼠，將實施例105、113、及131至137之化合物溶解於大塚生食注中，以成為30 mg/kg之方式實施皮下投予。投予7天後，於絕食一晚之條件下採集小鼠之肝臟組織，藉由qRT-PCR(Taqman)評價是否修復G6PC (c.648G＞T)引起之異常剪接，結果如圖23所示，藉由實施例105、113、及131至137之化合物，於hG6PC (c.648G＞T)＋Int4 Ht KI小鼠之肝臟中可觀察到mRNA之異常剪接之正常化。

【0465】 (試驗例3)異常剪接修復序列之片段解析

PCR反應與片段序列解析

以如下方式進行PCR反應與片段序列解析。

【0466】 以下述方式設計hG6PC剪接驗證引子。

hG6PC剪接驗證引子：

前置引子5'-TTGTGGTTGGGATTCTGGGC-3' (序列編號90)

反置引子5'-TCCAGAGTCCACAGGAGGTC -3' (序列編號91)

以如下方式調整PCR反應液，進行PCR反應。

使23 μL之Platinum™ PCR SuperMix High Fidelity (thermo fisher)、2 μL引子混合物(10 μM)、1 μL之cDNA(經5倍稀釋)懸浮，進行PCR反應(95℃下5 min，將(95℃下30 sec、62℃下30 sec、68℃下30 sec)循環36次，68℃下4min，4℃下保持)。

PCR產物係使用E-Gel(註冊商標)瓊脂糖凝膠電泳系統，藉由E-gel Ex 2%瓊脂糖(Invitrogen)進行電泳並解析。各片段藉由NucleoSpin(註冊商標) Gel and PCR Clean-up (MACHEREY-NAGEL)自凝膠中萃取，添加G6PC定序引子後，使用BigDye v3.1進行定序反應。利用Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer(Life technologies)確認鹼基序列(圖24)。

G6PC定序引子 5'-GCTGTGCAGCTGAATGTCTG-3' (序列編號92)

【0467】

利用實施例1之化合物(21e_002)之培養細胞中之異常剪接修復序列之片段解析

使用由僅將於使用人G6PC全長質粒載體(pcDNA hG6PC (c.648G＞T)＋Int4)之利用實施例化合物之G6PC mRNA的異常剪接之修復評價(1)中所製作之人G6PC全長質粒載體(pcDNA hG6PC (c.648G＞T)＋Int4)轉染而成之檢體、將人G6PC全長質粒載體(pcDNA hG6PC (c.648G＞T)＋Int4)與寡核苷酸(21e_002)共轉染而成之檢體所製作之cDNA作為模板，進行PCR反應與片段序列解析。如圖24所示，藉由實施例1之化合物(21e_002)可觀察到缺損91個鹼基之異常剪接之正常化。

(試驗例4)使用模型小鼠之利用實施例化合物之異常剪接之修復評價

與試驗例2同樣地，使用模型小鼠對實施例化合物進行評價。

使用hG6PC (c.648G＞T)＋Int4 Ht KI小鼠之利用實施例化合物之異常剪接之修復評價(7)

對於hG6PC (c.648G＞T)＋Int4 Ht KI小鼠，將實施例133、及143至149之化合物溶解於大塚生食注中，以成為30 mg/kg之方式實施皮下投予。投

予7天後，於絕食一晚之條件下採集小鼠之肝臟組織，藉由qRT-PCR(Taqman)評價是否修復G6PC (c.648G＞T)引起之異常剪接，結果如圖25所示，藉由實施例133、及143至149之化合物，於hG6PC (c.648G＞T)＋Int4 Ht KI小鼠之肝臟中可觀察到mRNA之異常剪接之正常化。

使用hG6PC (c.648G＞T)＋Int4 Ht KI小鼠之利用實施例化合物之異常剪接之修復評價(8)

對於hG6PC (c.648G＞T)＋Int4 Ht KI小鼠，將實施例149、及152至160之化合物溶解於大塚生食注中，以成為30 mg/kg之方式實施皮下投予。投予7天後，於絕食一晚之條件下採集小鼠之肝臟組織，藉由qRT-PCR(Taqman)評價是否修復G6PC (c.648G＞T)引起之異常剪接，結果如圖26所示，藉由實施例149、及152至160之化合物，於hG6PC (c.648G＞T)＋Int4 Ht KI小鼠之肝臟中可觀察到mRNA之異常剪接之正常化。

【0468】(實施例161)

X^{20}-A^{m1s}-A^{m1s}-T^{e2s}-C^{m1s}-C^{e2s}-G^{m1s}-A^{m1s}-T^{e2s}-G^{m1s}-G^{m1s}-C^{e2s}-G^{m1s}-A^{m1s}-A^{m1s}-G^{m1t}-H(序列編號93)

使用上述序列即15e_001.6代替實施例133所使用之序列，將X^{18}之部分置換為X^{20}，與實施例133同樣地進行合成。

本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第92號至第106號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6278.03)

(實施例162)

X^{20}-A^{m1s}-T^{e2s}-C^{m1s}-C^{e2s}-G^{m1s}-A^{m1s}-T^{e2s}-G^{m1s}-G^{m1s}-C^{e2s}-G^{m1s}-A^{m1s}-A^{m1s}-G^{m1s}-C^{e2t}-H(序列編號94)

使用上述序列即15e_005.6代替實施例133所使用之序列，將X^{18}之部分置換為X^{20}，與實施例133同樣地進行合成。

本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第91號至第105號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6280.03)

(實施例163)

X^{20}-A^{m1s}-A^{m1s}-T^{e2s}-C^{e2s}-C^{e2s}-G^{m1s}-A^{m1s}-T^{e2s}-G^{m1s}-G^{m1s}-C^{e2s}-G^{m1s}-A^{m1s}-A^{m1s}-G^{m1t}-H(序列編號93)

使用上述序列即15e_001.7代替實施例133所使用之序列，將X^{18}之部分置換為X^{20}，與實施例133同樣地進行合成。

本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第92號至第106號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6304.04)

(實施例164)

X^{20}-A^{m1s}-T^{e2s}-C^{e2s}-C^{e2s}-G^{m1s}-A^{m1s}-T^{e2s}-G^{m1s}-G^{m1s}-C^{e2s}-G^{m1s}-A^{m1s}-A^{m1s}-G^{m1s}-C^{e2t}-H(序列編號94)

使用上述序列即15e_005.7代替實施例133所使用之序列，將X^{18}之部

分置換為X^{20}，與實施例133同樣地進行合成。

本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第91號至第105號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6306.03)

(實施例165)

X^{20}-A^{mls}-U^{mls}-C^{mls}-C^{mls}-G^{mls}-A^{mls}-U^{mls}-G^{mls}-G^{mls}-C^{mls}-G^{mls}-A^{mls}-A^{mls}-G^{mls}-C^{mlt}-H(序列編號95)

使用上述序列即15e_005.8代替實施例133所使用之序列，將X^{18}之部分置換為X^{20}，與實施例133同樣地進行合成。

本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第91號至第105號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6149.93)

(實施例166)

X^{20}-A^{e2s}-U^{mlp}-C^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{e2s}-U^{mls}-G^{mls}-G^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-A^{e2s}-G^{mls}-C^{e2t}-H(序列編號95)

使用上述序列即15e_005.5.01代替實施例153所使用之序列，與實施例153同樣地進行合成。但於核酸自動合成儀所使用之試劑中，作為表述序列合成所需之部分之氧化劑，以成為OXDIZER 0.05 M(Sigma-Aldrich製造，產品編號L560250-04)、或0.02 M之方式，使用四氫呋喃(脫水，

關東化學製造，產品編號40993-05)、吡啶(脫水，關東化學製造，產品編號11339-05)、蒸餾水78：20：2(v/v/v)溶液溶解碘(關東化學製造，產品編號20035-00)而適當使用。

本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第91號至第105號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6248.00)

(實施例167)

X^{20}-A^{e2s}-U^{m1s}-C^{m1s}-C^{e2s}-G^{m1s}-A^{e2s}-U^{m1p}-G^{m1s}-G^{m1s}-C^{e2s}-G^{m1s}-A^{m1s}-A^{e2s}-G^{m1s}-C^{e2t}-H(序列編號95)

使用上述序列即15e_005.5.02代替實施例166所使用之序列，與實施例166同樣地進行合成。

本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第91號至第105號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6248.00)

(實施例168)

X^{20}-A^{e2s}-U^{m1s}-C^{m1s}-C^{e2s}-G^{m1s}-A^{e2s}-U^{m1s}-G^{m1p}-G^{m1s}-C^{e2s}-G^{m1s}-A^{m1s}-A^{e2s}-G^{m1s}-C^{e2t}-H(序列編號95)

使用上述序列即15e_005.5.03代替實施例166所使用之序列，與實施例166同樣地進行合成。

本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第91號至第105號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6247.99)

(實施例169)

X^{20}-A^{e2s}-U^{mls}-C^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{e2s}-U^{mls}-G^{mls}-G^{mls}-C^{e2s}-G^{mlp}-A^{mls}-A^{e2s}-G^{mls}-C^{e2t}-H(序列編號95)

使用上述序列即15e_005.5.04代替實施例166所使用之序列，與實施例166同樣地進行合成。

本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第91號至第105號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6248.00)

(實施例170)

X^{20}-A^{e2s}-U^{mlp}-C^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{e2s}-U^{mlp}-G^{mls}-G^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-A^{e2s}-G^{mls}-C^{e2t}-H(序列編號95)

使用上述序列即15e_005.5.05代替實施例166所使用之序列，與實施例166同樣地進行合成。

本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第91號

至第105號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6232.02)

(實施例171)

X^{20}-A^{e2s}-U^{mlp}-C^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{e2s}-U^{mls}-G^{mlp}-G^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-A^{e2s}-G^{mls}-C^{e2t}-H(序列編號95)

使用上述序列即15e_005.5.06代替實施例166所使用之序列，與實施例166同樣地進行合成。

本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第91號至第105號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6232.02)

(實施例172)

X^{20}-A^{e2s}-U^{mlp}-C^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{e2s}-U^{mls}-G^{mls}-G^{mls}-C^{e2s}-G^{mlp}-A^{mls}-A^{e2s}-G^{mls}-C^{e2t}-H(序列編號95)

使用上述序列即15e_005.5.07代替實施例166所使用之序列，與實施例166同樣地進行合成。

本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第91號至第105號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6232.02)

(實施例173)

X^{20}-A^{e2s}-U^{mls}-C^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{e2s}-U^{mlp}-G^{mlp}-G^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-A^{e2s}-G^{mls}-C^{e2t}-H(序列編號95)

使用上述序列即15e_005.5.08代替實施例166所使用之序列，與實施例166同樣地進行合成。

本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第91號至第105號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6232.02)

(實施例174)

X^{20}-A^{e2s}-U^{mls}-C^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{e2s}-U^{mlp}-G^{mls}-G^{mls}-C^{e2s}-G^{mlp}-A^{mls}-A^{e2s}-G^{mls}-C^{e2t}-H(序列編號95)

使用上述序列即15e_005.5.09代替實施例166所使用之序列，與實施例166同樣地進行合成。

本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第91號至第105號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6232.01)

(實施例175)

X^{20}-A^{e2s}-U^{mls}-C^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{e2s}-U^{mls}-G^{mlp}-G^{mls}-C^{e2s}-G^{mlp}-A^{mls}-A^{e2s}-G^{mls}-C^{e2t}-H(序列編號95)

使用上述序列即15e_005.5.10代替實施例166所使用之序列，與實施

例166同樣地進行合成。所使用之序列為上述序列15e_005.5.10。

本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第91號至第105號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6232.01)

(實施例176)

X^{20}-A^{e2s}-U^{mlp}-C^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{e2s}-U^{mlp}-G^{mlp}-G^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-A^{e2s}-G^{mls}-C^{e2t}-H(序列編號95)

使用上述序列即15e_005.5.11代替實施例166所使用之序列，與實施例166同樣地進行合成。

本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第91號至第105號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6216.00)

(實施例177)

X^{20}-A^{e2s}-U^{mlp}-C^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{e2s}-U^{mlp}-G^{mls}-G^{mls}-C^{e2s}-G^{mlp}-A^{mls}-A^{e2s}-G^{mls}-C^{e2t}-H(序列編號95)

使用上述序列即15e_005.5.12代替實施例166所使用之序列，與實施例166同樣地進行合成。

本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號

728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第91號至第105號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6216.03)

(實施例178)

X^{20}-A^{e2s}-U^{mlp}-C^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{e2s}-U^{mls}-G^{mlp}-G^{mls}-C^{e2s}-G^{mlp}-A^{mls}-A^{e2s}-G^{mls}-C^{e2t}-H(序列編號95)

使用上述序列即15e_005.5.13代替實施例166所使用之序列，與實施例166同樣地進行合成。

本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第91號至第105號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6216.02)

(實施例179)

X^{20}-A^{e2s}-U^{mls}-C^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{e2s}-U^{mlp}-G^{mlp}-G^{mls}-C^{e2s}-G^{mlp}-A^{mls}-A^{e2s}-G^{mls}-C^{e2t}-H(序列編號95)

使用上述序列即15e_005.5.14代替實施例166所使用之序列，與實施例166同樣地進行合成。

本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第91號至第105號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6216.03)

(實施例180)

X^{20}-A^{e2s}-U^{mlp}-C^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{e2s}-U^{mlp}-G^{mlp}-G^{mls}-C^{e2s}-G^{mlp}-A^{mls}-A^{e2s}-G^{mls}-C^{e2t}-H(序列編號95)

使用上述序列即15e_005.5.15代替實施例166所使用之序列，與實施例166同樣地進行合成。

本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第91號至第105號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6200.06)

(實施例181)

X^{20}-A^{e2p}-U^{mls}-C^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{e2s}-U^{mls}-G^{mls}-G^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-A^{e2s}-G^{mls}-C^{e2t}-H(序列編號95)

使用上述序列即15e_005.5.16代替實施例166所使用之序列，與實施例166同樣地進行合成。

本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第91號至第105號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6247.99)

(實施例182)

X^{20}-A^{e2s}-U^{mls}-C^{mlp}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{e2s}-U^{mls}-G^{mls}-G^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-A^{e2s}-G^{mls}-C^{e2t}-H(序列編號95)

使用上述序列即15e_005.5.17代替實施例166所使用之序列，與實施例166同樣地進行合成。

本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第91號至第105號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6248.01)

(實施例183)

X^{20}-A^{e2s}-U^{mls}-C^{mls}-C^{e2p}-G^{mls}-A^{e2s}-U^{mls}-G^{mls}-G^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-A^{e2s}-G^{mls}-C^{e2t}-H(序列編號95)

使用上述序列即15e_005.5.18代替實施例166所使用之序列，與實施例166同樣地進行合成。

本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第91號至第105號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6248.00)

(實施例184)

X^{20}-A^{e2s}-U^{mls}-C^{mls}-C^{e2s}-G^{mlp}-A^{e2s}-U^{mls}-G^{mls}-G^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-A^{e2s}-G^{mls}-C^{e2t}-H(序列編號95)

使用上述序列即15e_005.5.19代替實施例166所使用之序列，與實施例166同樣地進行合成。

本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，

轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第91號至第105號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6248.01)

(實施例185)

X^{20}-A^{e2s}-U^{mls}-C^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{e2p}-U^{mls}-G^{mls}-G^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-A^{e2s}-G^{mls}-C^{e2t}-H(序列編號95)

使用上述序列即15e_005.5.20代替實施例166所使用之序列，與實施例166同樣地進行合成。

本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第91號至第105號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6248.00)

(實施例186)

X^{20}-A^{e2s}-U^{mls}-C^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{e2s}-U^{mls}-G^{mls}-G^{mlp}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-A^{e2s}-G^{mls}-C^{e2t}-H(序列編號95)

使用上述序列即15e_005.5.21代替實施例166所使用之序列，與實施例166同樣地進行合成。

本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第91號至第105號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測

值：6248.01)

(實施例187)

X^{20}-A^{e2s}-U^{mls}-C^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{e2s}-U^{mls}-G^{mls}-G^{mls}-C^{e2p}-G^{mls}-A^{mls}-A^{e2s}-G^{mls}-C^{e2t}-H(序列編號95)

使用上述序列即15e_005.5.22代替實施例166所使用之序列，與實施例166同樣地進行合成。

本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第91號至第105號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6248.00)

(實施例188)

X^{20}-A^{e2s}-U^{mls}-C^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{e2s}-U^{mls}-G^{mls}-G^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mlp}-A^{e2s}-G^{mls}-C^{e2t}-H(序列編號95)

使用上述序列即15e_005.5.23代替實施例166所使用之序列，與實施例166同樣地進行合成。

本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第91號至第105號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6248.00)

(實施例189)

X^{20}-A^{e2s}-U^{mls}-C^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{e2s}-U^{mls}-G^{mls}-G^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-

A^{e2p}-G^{m1s}-C^{e2t}-H(序列編號95)

使用上述序列即15e_005.5.24代替實施例166所使用之序列，與實施例166同樣地進行合成。

本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第91號至第105號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6248.00)

(實施例190)

X^{20}-A^{e2s}-U^{m1s}-C^{m1s}-C^{e2s}-G^{m1s}-A^{e2s}-U^{m1s}-G^{m1s}-G^{m1s}-C^{e2s}-G^{m1s}-A^{m1s}-A^{e2s}-G^{m1p}-C^{e2t}-H(序列編號95)

使用上述序列即15e_005.5.25代替實施例166所使用之序列，與實施例166同樣地進行合成。

本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第91號至第105號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6248.00)

(實施例191)

X^{20}-A^{e2s}-U^{m1s}-C^{m1s}-C^{e2p}-G^{m1s}-A^{e2s}-U^{m1s}-G^{m1s}-G^{m1s}-C^{e2p}-G^{m1s}-A^{m1s}-A^{e2s}-G^{m1s}-C^{e2t}-H(序列編號95)

使用上述序列即15e_005.5.26代替實施例166所使用之序列，與實施例166同樣地進行合成。

本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第91號至第105號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6232.01)

(實施例192)

X^{20}-A^{e2s}-U^{mls}-C^{mls}-C^{e2p}-G^{mls}-A^{e2p}-U^{mls}-G^{mls}-G^{mls}-C^{e2p}-G^{mls}-A^{mls}-A^{e2s}-G^{mls}-C^{e2t}-H(序列編號95)

使用上述序列即15e_005.5.27代替實施例166所使用之序列，與實施例166同樣地進行合成。

本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第91號至第105號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6216.03)

(實施例193)

X^{20}-A^{e2p}-U^{mls}-C^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{e2p}-U^{mls}-G^{mls}-G^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-A^{e2p}-G^{mls}-C^{e2t}-H(序列編號95)

使用上述序列即15e_005.5.28代替實施例166所使用之序列，與實施例166同樣地進行合成。

本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第91號

至第105號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6216.03)

(實施例194)

X^{20}-A^{e2p}-U^{mls}-C^{mls}-C^{e2p}-G^{mls}-A^{e2p}-U^{mls}-G^{mls}-G^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-A^{e2p}-G^{mls}-C^{e2t}-H(序列編號95)

使用上述序列即15e_005.5.29代替實施例166所使用之序列，與實施例166同樣地進行合成。

本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第91號至第105號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6200.06)

(實施例195)

X^{20}-A^{e2p}-U^{mls}-C^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{e2p}-U^{mls}-G^{mls}-G^{mls}-C^{e2p}-G^{mls}-A^{mls}-A^{e2p}-G^{mls}-C^{e2t}-H(序列編號95)

使用上述序列即15e_005.5.30代替實施例166所使用之序列，與實施例166同樣地進行合成。

本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第91號至第105號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6200.06)

(實施例196)

X^{20}-A^{e2p}-U^{mls}-C^{mls}-C^{e2p}-G^{mls}-A^{e2p}-U^{mls}-G^{mls}-G^{mls}-C^{e2p}-G^{mls}-A^{mls}-A^{e2p}-G^{mls}-C^{e2t}-H(序列編號95)

使用上述序列即15e_005.5.31代替實施例166所使用之序列，與實施例166同樣地進行合成。

本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第91號至第105號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6184.11)

(實施例197)

X^{20}-A^{e2p}-U^{mlp}-C^{mlp}-C^{e2p}-G^{mlp}-A^{e2p}-U^{mlp}-G^{mlp}-G^{mlp}-C^{e2p}-G^{mlp}-A^{mlp}-A^{e2p}-G^{mlp}-C^{e2t}-H(序列編號95)

使用上述序列即15e_005.5.32代替實施例166所使用之序列，與實施例166同樣地進行合成。

本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第91號至第105號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6040.30)

(實施例198)

X^{20}-A^{e2p}-U^{mls}-C^{mls}-C^{e2p}-G^{mls}-A^{e2s}-U^{mls}-G^{mls}-G^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-A^{e2s}-G^{mls}-C^{e2t}-H(序列編號95)

使用上述序列即15e_005.5.33代替實施例166所使用之序列，與實施

例166同樣地進行合成。

本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第91號至第105號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6232.02)

(實施例199)

X^{20}-A^{e2p}-U^{mls}-C^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{e2p}-U^{mls}-G^{mls}-G^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-A^{e2s}-G^{mls}-C^{e2t}-H(序列編號95)

使用上述序列即15e_005.5.34代替實施例166所使用之序列，與實施例166同樣地進行合成。

本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第91號至第105號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6232.01)

(實施例200)

X^{20}-A^{e2p}-U^{mls}-C^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{e2s}-U^{mls}-G^{mls}-G^{mls}-C^{e2p}-G^{mls}-A^{mls}-A^{e2s}-G^{mls}-C^{e2t}-H(序列編號95)

使用上述序列即15e_005.5.35代替實施例166所使用之序列，與實施例166同樣地進行合成。

本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號

728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第91號至第105號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6232.04)

(實施例201)

X^{20}-A^{e2p}-U^{mls}-C^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{e2s}-U^{mls}-G^{mls}-G^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-A^{e2p}-G^{mls}-C^{e2t}-H(序列編號95)

使用上述序列即15e_005.5.36代替實施例166所使用之序列，與實施例166同樣地進行合成。

本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第91號至第105號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6232.03)

(實施例202)

X^{20}-A^{e2s}-U^{mls}-C^{mls}-C^{e2p}-G^{mls}-A^{e2p}-U^{mls}-G^{mls}-G^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-A^{e2s}-G^{mls}-C^{e2t}-H(序列編號95)

使用上述序列即15e_005.5.37代替實施例166所使用之序列，與實施例166同樣地進行合成。

本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第91號至第105號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6232.02)

(實施例203)

X^{20}-A^{e2s}-U^{mls}-C^{mls}-C^{e2p}-G^{mls}-A^{e2s}-U^{mls}-G^{mls}-G^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-A^{e2p}-G^{mls}-C^{e2t}-H(序列編號95)

使用上述序列即15e_005.5.38代替實施例166所使用之序列，與實施例166同樣地進行合成。

本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第91號至第105號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6232.01)

(實施例204)

X^{20}-A^{e2s}-U^{mls}-C^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{e2p}-U^{mls}-G^{mls}-G^{mls}-C^{e2p}-G^{mls}-A^{mls}-A^{e2s}-G^{mls}-C^{e2t}-H(序列編號95)

使用上述序列即15e_005.5.39代替實施例166所使用之序列，與實施例166同樣地進行合成。

本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第91號至第105號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6232.02)

(實施例205)

X^{20}-A^{e2s}-U^{mls}-C^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{e2p}-U^{mls}-G^{mls}-G^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{mls}-A^{e2p}-G^{mls}-C^{e2t}-H(序列編號95)

使用上述序列即15e_005.5.40代替實施例166所使用之序列，與實施例166同樣地進行合成。

本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第91號至第105號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6232.02)

(實施例206)

X^{20}-A^{e2s}-U^{mls}-C^{mls}-C^{e2s}-G^{mls}-A^{e2s}-U^{mls}-G^{mls}-G^{mls}-C^{e2p}-G^{mls}-A^{mls}-A^{e2p}-G^{mls}-C^{e2t}-H(序列編號95)

使用上述序列即15e_005.5.41代替實施例166所使用之序列，與實施例166同樣地進行合成。

本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第91號至第105號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6232.02)

(實施例207)

X^{20}-A^{e2s}-U^{mls}-C^{mls}-C^{e2p}-G^{mls}-A^{e2s}-U^{mls}-G^{mls}-G^{mls}-C^{e2p}-G^{mls}-A^{mls}-A^{e2p}-G^{mls}-C^{e2t}-H(序列編號95)

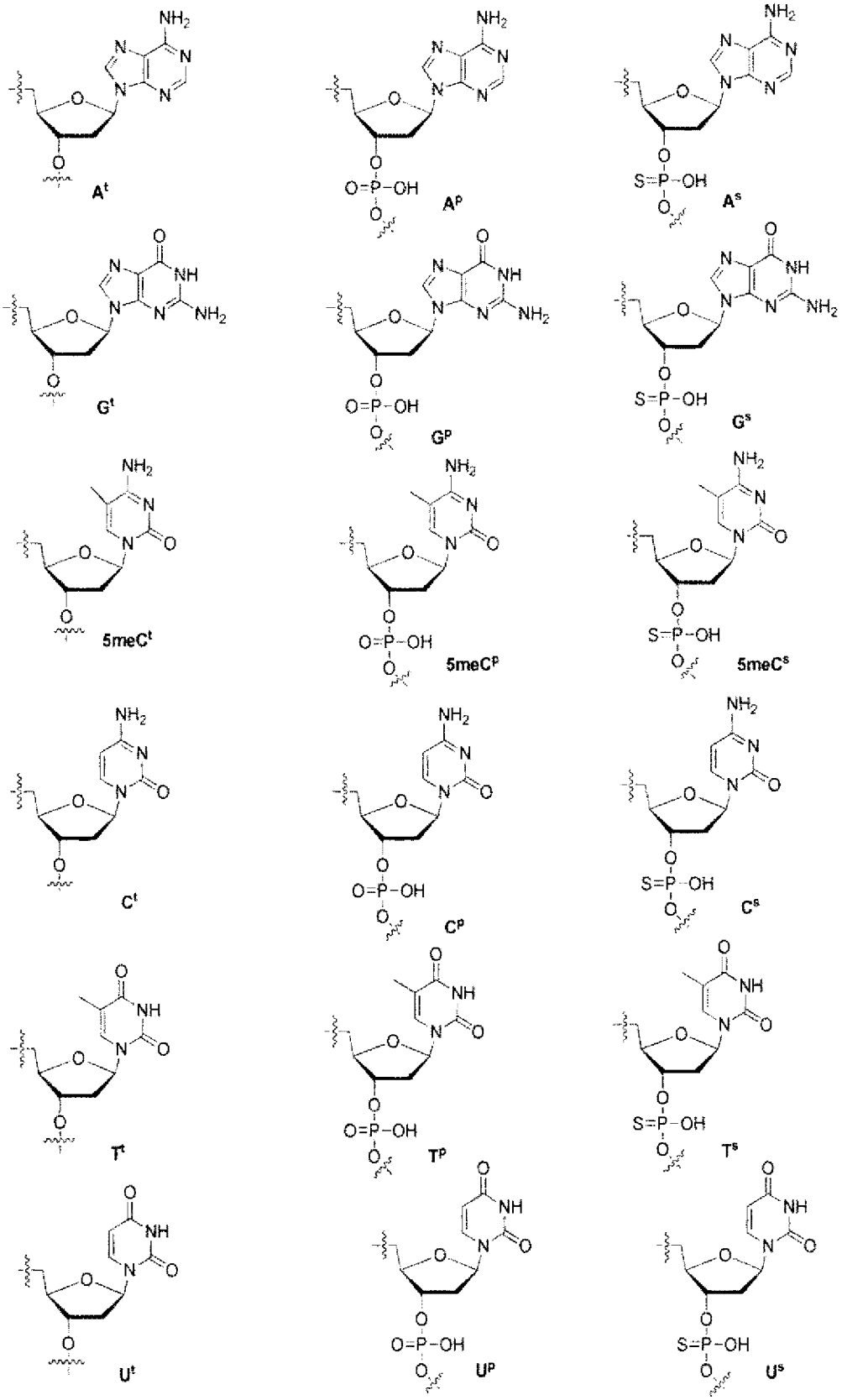
使用上述序列即15e_005.5.42代替實施例166所使用之序列，與實施例166同樣地進行合成。

本化合物之鹼基序列係與智人葡萄糖-6-磷酸酶催化次單元(G6PC)，

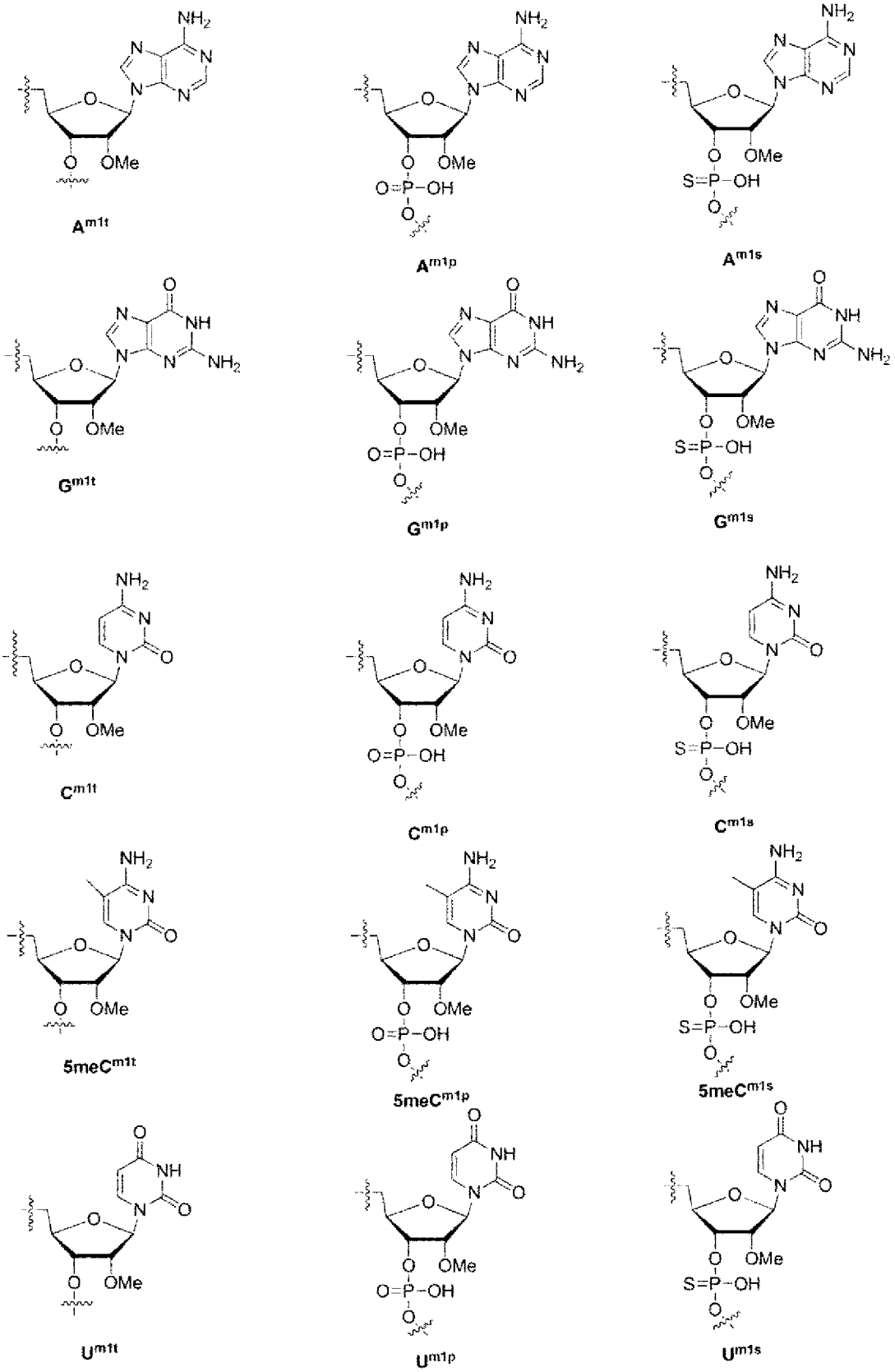
轉錄變體1，mRNA (NCBI-GenBank登錄號NM_000151.3)之核苷酸編號728之G變異為T的c.648G＞T變異G6PC基因之外顯子5之5'末端起第91號至第105號互補之序列。化合物係藉由負離子ESI質量分析進行鑑定(實測值：6216.00)

【0469】再者，於本說明書中，A^{t}、G^{t}、$5meC^{t}$、C^{t}、T^{t}、U^{t}、A^{p}、G^{p}、$5meC^{p}$、C^{p}、T^{p}、U^{p}、A^{s}、G^{s}、$5meC^{s}$、C^{s}、T^{s}、U^{s}、A^{m1t}、G^{m1t}、C^{m1t}、$5meC^{m1t}$、U^{m1t}、A^{m1p}、G^{m1p}、C^{m1p}、$5meC^{m1p}$、U^{m1p}、A^{m1s}、G^{m1s}、C^{m1s}、$5meC^{m1s}$、U^{m1s}、A^{e2t}、G^{e2t}、C^{e2t}、T^{e2t}、A^{e2p}、G^{e2p}、C^{e2p}、T^{e2p}、A^{e2s}、G^{e2s}、C^{e2s}、T^{e2s}、A^{1t}、G^{1t}、C^{1t}、T^{1t}、A^{e1p}、G^{e1p}、C^{e1p}、T^{e1p}、A^{e1s}、G^{e1s}、C^{e1s}、T^{e1s}、A^{m2t}、G^{m2t}、$5meC^{m2t}$、T^{m2t}、A^{m2p}、G^{m2p}、$5meC^{m2p}$、T^{m2p}、A^{m2s}、G^{m2s}、$5meC^{m2s}$、T^{m2s}、X、X^{1}、X^{2}、X^{3}、X^{4}、X^{5}、X^{6}、X^{7}、X^{8}、X^{9}、X^{10}、X^{11}、X^{12}、X^{13}、X^{14}、X^{15}、X^{16}、X^{17}、X^{18}、X^{19}、X^{20}、X^{21}、X^{22}係具有下述所示之結構之基。

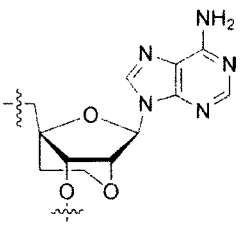
[化195]



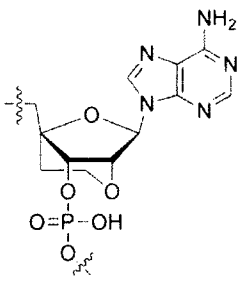
[化196]


A^m1t
A^m1p
A^m1s
G^m1t
G^m1p
G^m1s
C^m1t
C^m1p
C^m1s
5meC^m1t
5meC^m1p
5meC^m1s
U^m1t
U^m1p
U^m1s

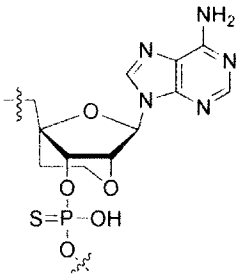
[化197]



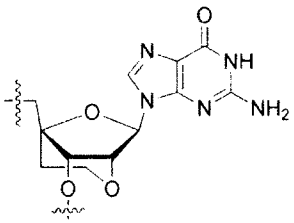
A^{2t}



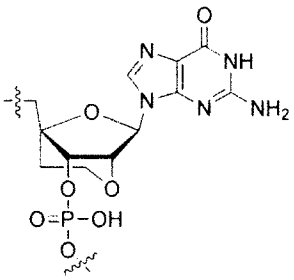
A^{e2p}



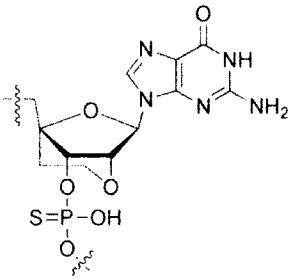
A^{e2s}



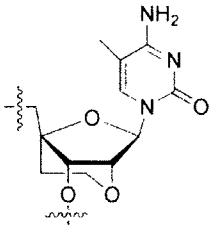
G^{2t}



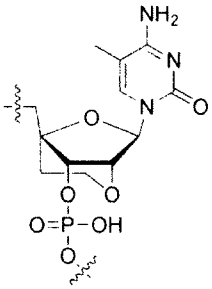
G^{e2p}



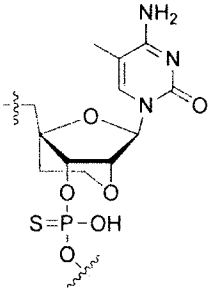
G^{e2s}



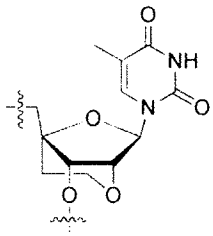
C^{2t}



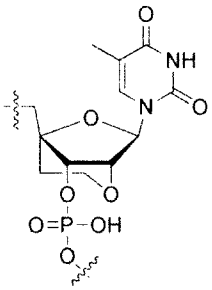
C^{e2p}



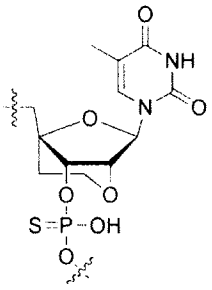
C^{e2s}



T^{2t}

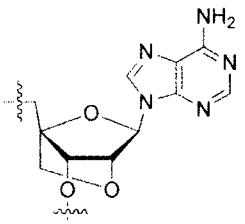


T^{e2p}

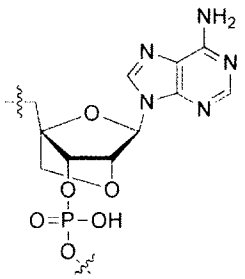


T^{e2s}

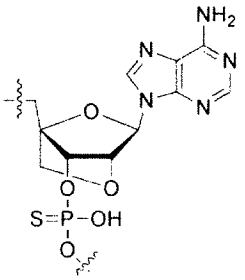
[化198]



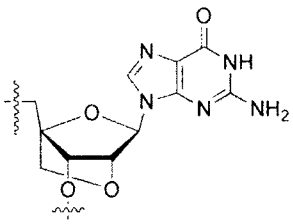
A^{1t}



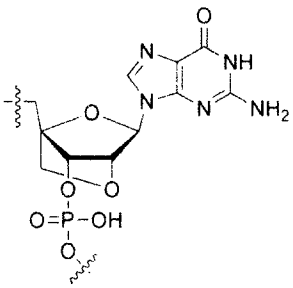
A^{e1p}



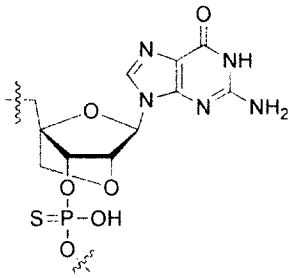
A^{e1s}



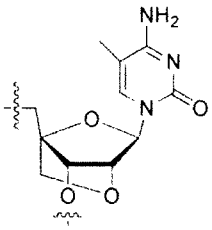
G^{1t}



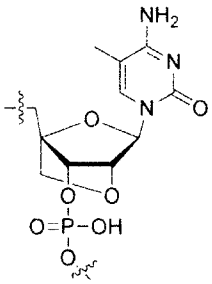
G^{e1p}



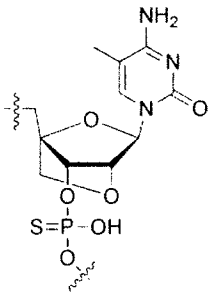
G^{e1s}



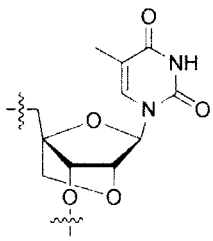
C^{1t}



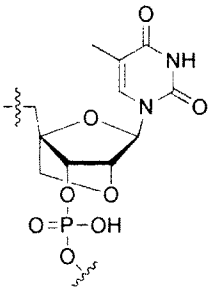
C^{e1p}



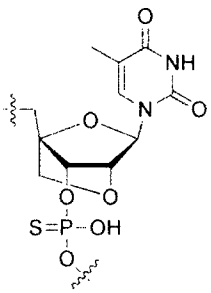
C^{e1s}



T^{1t}

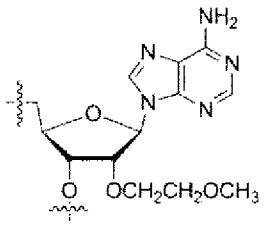


T^{e1p}

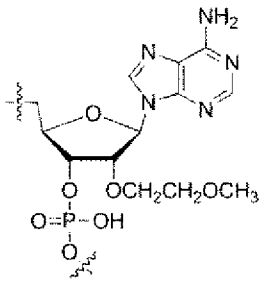


T^{e1s}

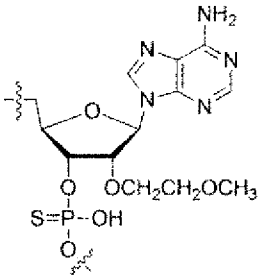
[化199]



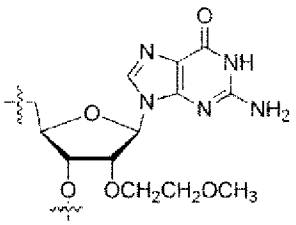
A^{m2t}



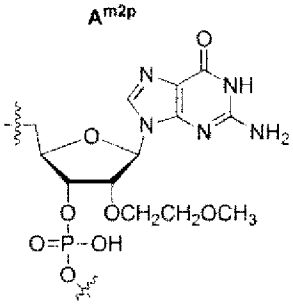
A^{m2p}



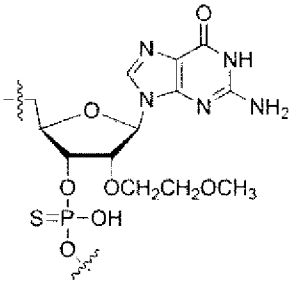
A^{m2s}



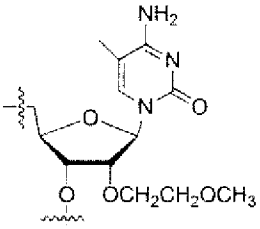
G^{m2t}



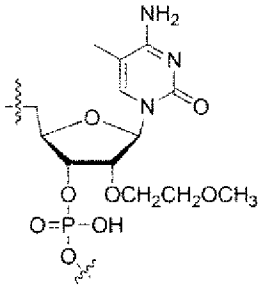
G^{m2p}



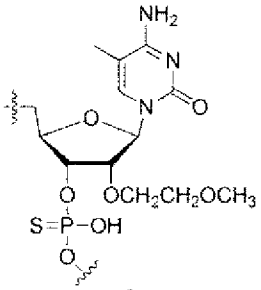
G^{m2s}



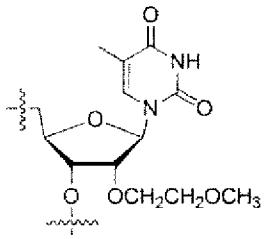
$5meC^{m2t}$



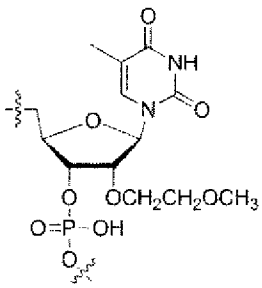
$5meC^{m2p}$



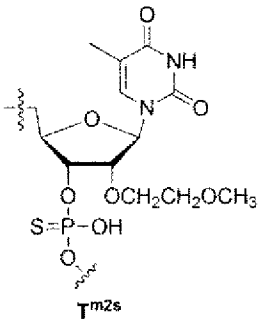
$5meC^{m2s}$



T^{m2t}

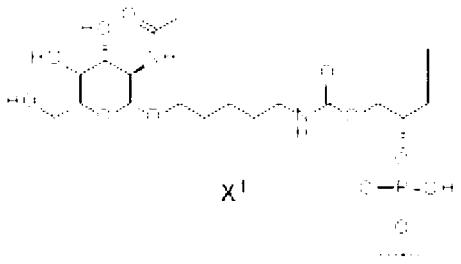


T^{m2p}

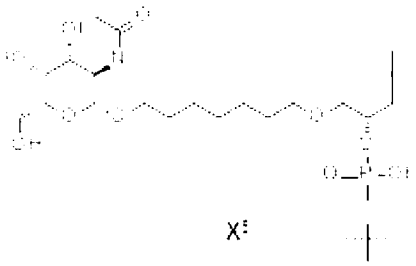


T^{m2s}

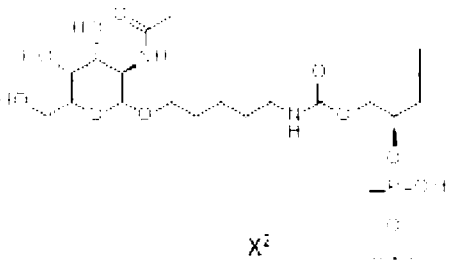
[化200]



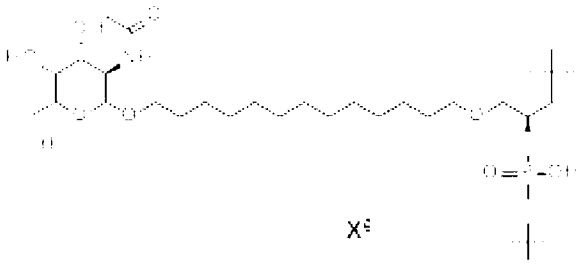
X1



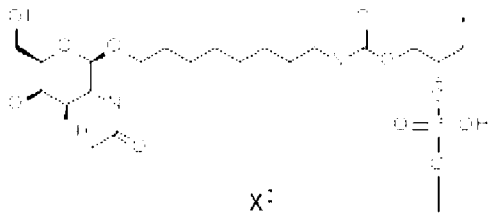
X5



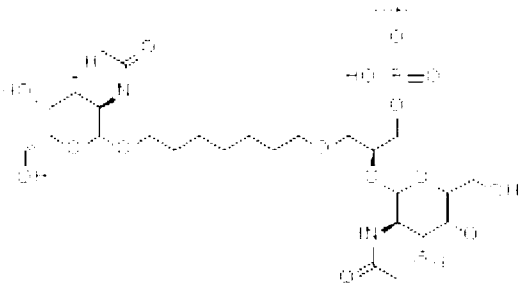
X2



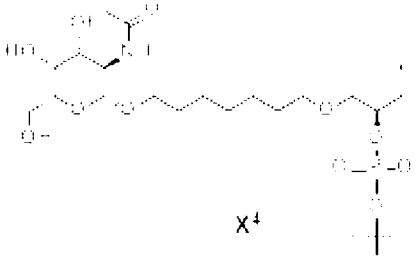
X6



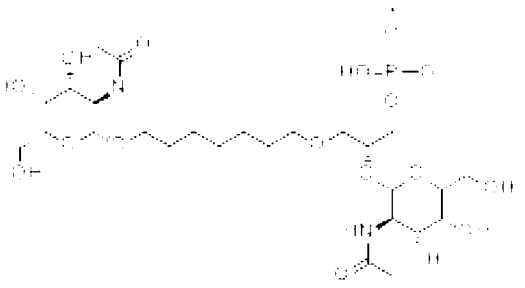
X3



X7

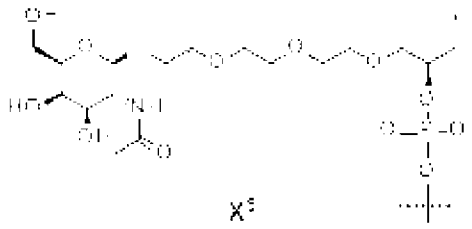


X4

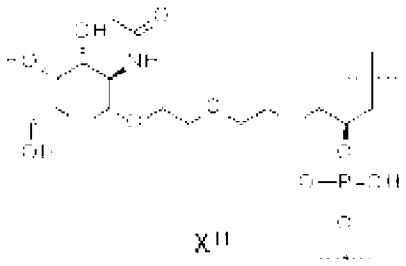


X8

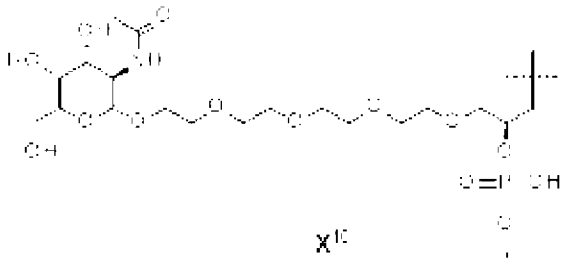
[化201]



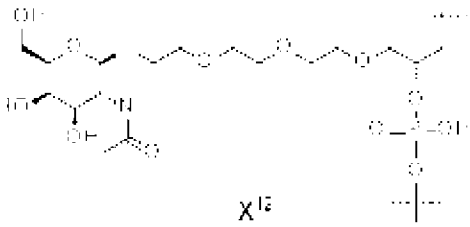
X9



X11

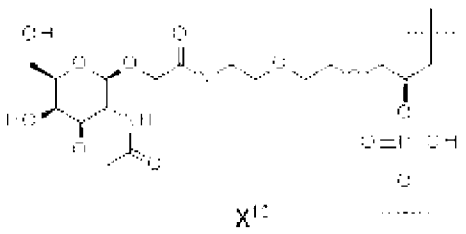


X10

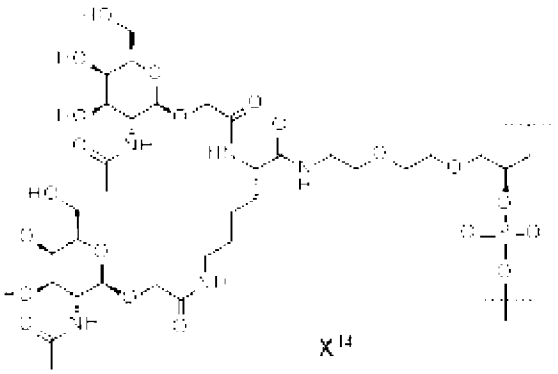


X12

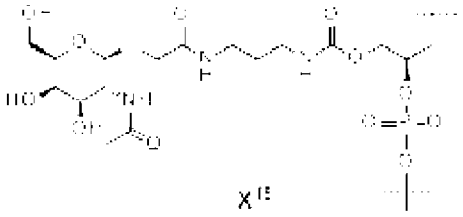
[化202]



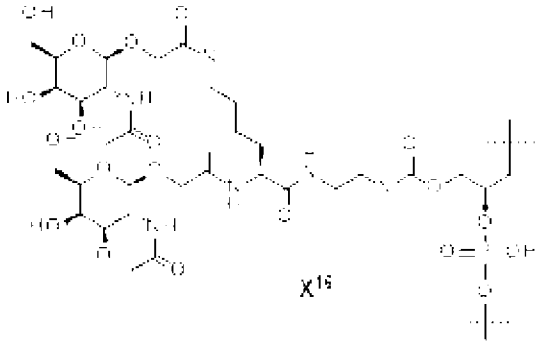
X12



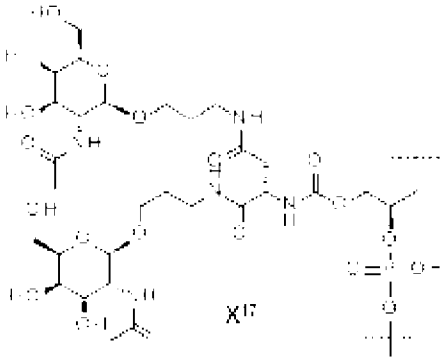
X14



X15

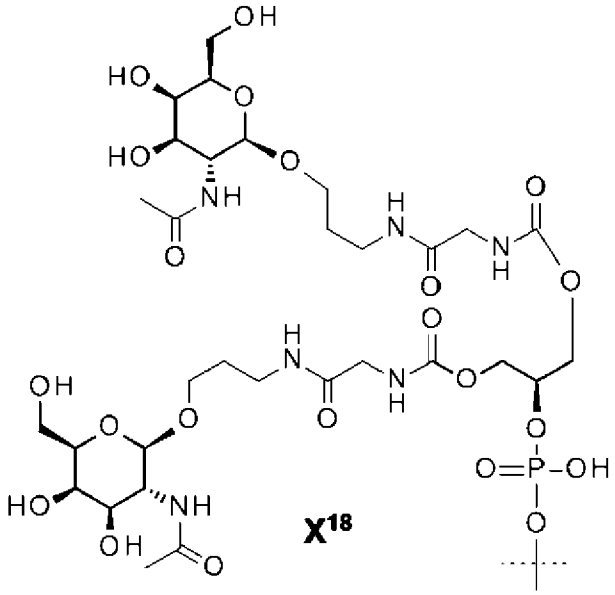


X16



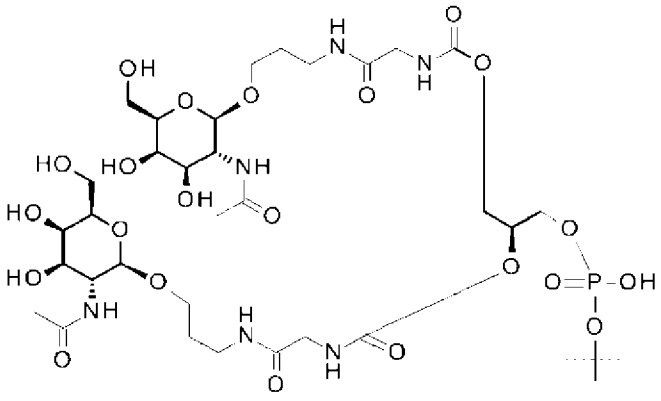
X17

[化203]



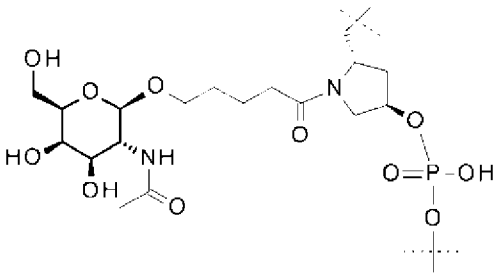
X^{18}

[化204]



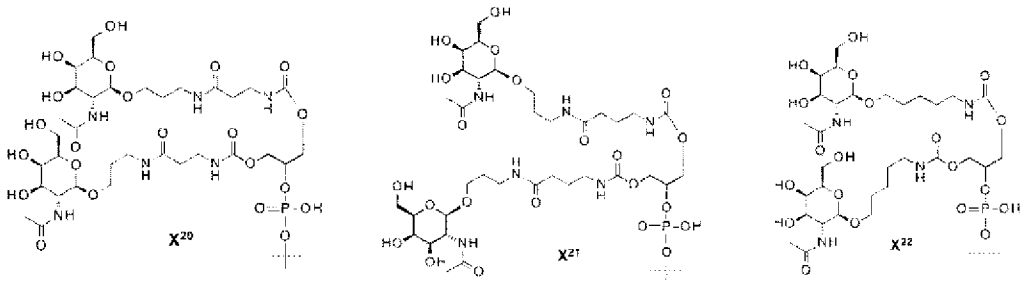
X^{19}

[化205]



X

[化206]



將本說明書所引用之全部刊物、專利及專利申請案直接作為參考而併入本說明書中。

[產業上之可利用性]

【0470】 本發明可用於糖原病Ia型之治療。

[序列表非關鍵文字]

【0471】 示出＜序列編號1～48、93～95＞反義寡核苷酸之序列。構成反義寡核苷酸之核苷酸可為天然型DNA、天然型RNA、DNA/RNA之嵌合體、該等之修飾體之任一者，較佳為至少1個為修飾核苷酸。

示出＜序列編號49～65、67～92＞引子之序列。

示出＜序列編號66＞肽之序列。

【序列表】

<110> 日商第一三共股份有限公司
神戶學院大學

<120> 糖原病Ia型治療藥

<130> FP-251PCT

<150> JP2018-43524
<151> 2018-03-09

<150> JP2018-128015
<151> 2018-07-05

<160> 95

<170> PatentIn第3.5版

<210> 1
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反義寡核苷酸

<400> 1
agataaaauc cgauggcgaa g 21

<210> 2
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反義寡核苷酸

<400> 2
taaaauccga uggcgaagcu g 21

<210> 3
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反義寡核苷酸

<400> 3
aauccgaugg cgaagcugaa a 21

<210> 4
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反義寡核苷酸

<400> 4
ccgauggcga agcugaaaag g 21

<210> 5
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反義寡核苷酸

<400> 5
auggcgaagc ugaaaaggaa g 21

<210> 6
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反義寡核苷酸

<400> 6
gcgaagcuga aaaggaagaa g 21

<210> 7
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 寡核苷酸

<400> 7

aagcugaaaa ggaagaaggu a 21

<210> 8
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反義寡核苷酸

<400> 8
cugaaaagga agaagguaau g 21

<210> 9
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反義寡核苷酸

<400> 9
aaaaggaaga agguaaugag a 21

<210> 10
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反義寡核苷酸

<400> 10
aggaagaagg uaaugagaaa a 21

<210> 11
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反義寡核苷酸

<400> 11
aagaagguaa ugagaaaata t 21

<210> 12
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反義寡核苷酸

<400> 12
gauaaaaucc gatggcgaag c 21

<210> 13
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反義寡核苷酸

<400> 13
auaaaatccg auggcgaagc t 21

<210> 14
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反義寡核苷酸

<400> 14
aaaauccgat ggcgaagctg a 21

<210> 15
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反義寡核苷酸

<400> 15
aaatccgaug gcgaagcuga a 21

<210> 16

<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反義寡核苷酸

<400> 16
auccgatggc gaagctgaaa a 21

<210> 17
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反義寡核苷酸

<400> 17
tccgauggcg aagcugaaaa g 21

<210> 18
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反義寡核苷酸

<400> 18
cgatggcgaa gctgaaaagg a 21

<210> 19
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反義寡核苷酸

<400> 19
gauggcgaag cugaaaagga a 21

<210> 20
<211> 18
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> 反義寡核苷酸

<400> 20
uaaaauccga tggcgaag 18

<210> 21
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反義寡核苷酸

<400> 21
aaaatccgau ggcgaagc 18

<210> 22
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反義寡核苷酸

<400> 22
aaauccgaug gcgaagcu 18

<210> 23
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反義寡核苷酸

<400> 23
aauccgatgg cgaagctg 18

<210> 24
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反義寡核苷酸

<400> 24
atccgauggc gaagcuga 18

<210> 25
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反義寡核苷酸

<400> 25
uccgauggcg aagcugaa 18

<210> 26
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反義寡核苷酸

<400> 26
ccgatggcga agctgaaa 18

<210> 27
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反義寡核苷酸

<400> 27
cgauggcgaa gcugaaaa 18

<210> 28
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反義寡核苷酸

<400> 28
gauggcgaag cugaaaag 18

<210> 29
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反義寡核苷酸

<400> 29
atggcgaagc tgaaaagg 18

<210> 30
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反義寡核苷酸

<400> 30
uggcgaagcu gaaaagga 18

<210> 31
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反義寡核苷酸

<400> 31
ggcgaagcug aaaaggaa 18

<210> 32
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反義寡核苷酸

<400> 32

gcgaagctga aaaggaag 18

<210> 33
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反義寡核苷酸

<400> 33
agataaaauc cgauggcgaa g 21

<210> 34
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反義寡核苷酸

<400> 34
gcagauaaaa uccgatggcg a 21

<210> 35
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反義寡核苷酸

<400> 35
cagauaaaat ccgauggcga a 21

<210> 36
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反義寡核苷酸

<400> 36
cagataaaau ccgauggc 18

<210> 37
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反義寡核苷酸

<400> 37
agauaaaauc cgatggcg 18

<210> 38
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反義寡核苷酸

<400> 38
gauaaaatcc gauggcga 18

<210> 39
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反義寡核苷酸

<400> 39
ataaaauccg auggcgaa 18

<210> 40
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反義寡核苷酸

<400> 40
aauccgatgg cgaag 15

<210> 41

<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反義寡核苷酸

<400> 41
ccgatggcga agctg 15

<210> 42
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反義寡核苷酸

<400> 42
aaauccgatg gcgaag 16

<210> 43
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反義寡核苷酸

<400> 43
tcaaauccga tggcgaag 18

<210> 44
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反義寡核苷酸

<400> 44
atccgauggc gaagc 15

<210> 45
<211> 15
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> 反義寡核苷酸

<400> 45
uccgauggcg aagcu 15

<210> 46
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反義寡核苷酸

<400> 46
aaaauccgat ggcgaag 17

<210> 47
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反義寡核苷酸

<400> 47
aauccgatgg cgaagc 16

<210> 48
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反義寡核苷酸

<400> 48
auccgatggc gaagcu 16

<210> 49
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 49
atagcagagc aatcaccacc aagcc 25

<210> 50
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 50
attccacgac ggcagaatgg atggc 25

<210> 51
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 51
taccgagctc ggatccacca ccaagcctgg aataactgc 39

<210> 52
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 52
ctggactagt ggatcctggc atggttgttg actttaaac 39

<210> 53
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 53
tctgggctgt gcagctgaat gtctg 25

<210> 54
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 54
gtaggggatg acactgacgg atgcc 25

<210> 55
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 55
ctggagtcct gtcaggtatg ggc 23

<210> 56
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 56
agctgaaaag gaagaaggta atgag 25

<210> 57
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 57

tcttcctttt cagcttcgcc atcgg 25

<210> 58
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 58
ctgacaggac tccagcaaca ac 22

<210> 59
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 59
ttgtggttgg gattctgggc 20

<210> 60
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 60
atgctgtgga tgtggctgaa 20

<210> 61
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 61
tggcacccag cacaatgaa 19

<210> 62
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 62
ctaagtcata gtccgcctag aagca 25

<210> 63
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 63
gctgctcatt ttcctcatca agtt 24

<210> 64
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 64
tggatgtggc tgaaagtttc tgta 24

<210> 65
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 65
tcctgtcagg cattgc 16

<210> 66

<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽

<400> 66

Trp Cys Glu Gln Pro Glu Trp Val His Ile Asp Thr Thr Pro Phe Ala
1 5 10 15

Ser Leu Leu Lys
20

<210> 67
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 67
gggaaacatg catgaagccc tgggc 25

<210> 68
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 68
tcccttggta cctcaggaag ctgcc 25

<210> 69
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 69

cgggcccccc ctcgaaaact aggcctgaag agatggc 37

<210> 70
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 70
taccgtcgac ctcgagggtt ggccttgatc cctctgcta 39

<210> 71
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 71
ggttgagttg atcttctaca tcttg 25

<210> 72
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 72
gcaagagagc cttcaggtag atccc 25

<210> 73
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 73
agttctagag cggccgccca tgcaaaggac taggaacaac 40

<210> 74
<211> 38
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 74
accgcggtgg cggccaatgt tgcctgtctt cctcaatc 38

<210> 75
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 75
ggccaaccct ggaataactg caagggctct g 31

<210> 76
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 76
ttgcatggtt gttgacttta aacaccgaag a 31

<210> 77
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 77
tcaacaacca tgcaaaggac taggaacaac 30

<210> 78

<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 78
attccagggt tggccttgat ccctctgcta 30

<210> 79
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 79
gggatcaagg ccaaccggct gg 22

<210> 80
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 80
taaagtcaac cgccatgcaa agg 23

<210> 81
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 81
tacgtcctct tccccatctg 20

<210> 82
<211> 20
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 82
ctgacaggac tccagcaaca 20

<210> 83
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 83
ttccttccaa agcagggact ctctatgt 28

<210> 84
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 84
cttgcagaag gacaagacgt agaagacc 28

<210> 85
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 85
gagtctatat tgagggcagg ctggagtc 28

<210> 86
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 86
tagtctgcct gctcactcaa cctctcct 28

<210> 87
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 87
gagtctatat tgagggcagg ctggagtc 28

<210> 88
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 88
taaatttgac caatgagcac tggaggtc 28

<210> 89
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 89
aaaatcatgt gtatgcgtgc ctttccta 28

<210> 90
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 90
ttgtggttgg gattctgggc 20

<210> 91
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 91
tccagagtcc acaggaggtc 20

<210> 92
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 92
gctgtgcagc tgaatgtctg 20

<210> 93
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反義寡核苷酸

<400> 93
aatccgatgg cgaag 15

<210> 94
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反義寡核苷酸

<400> 94

atccgatggc gaagc 15

<210> 95
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反義寡核苷酸

<400> 95
auccgauggc gaagc 15

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種寡核苷酸、其藥理上容許之鹽或溶劑合物，上述寡核苷酸係含有與具有c.648G＞T變異之G6PC基因之cDNA互補之核苷酸序列的鹼基數為15～30者，且含有與具有c.648G＞T變異之G6PC基因之包含外顯子5之5'末端起第82號至第92號之任一部位之區域互補的序列。

【請求項2】

如請求項1之寡核苷酸、其藥理上容許之鹽或溶劑合物，其中上述寡核苷酸係鹼基數為15～21者，且含有與具有c.648G＞T變異之G6PC基因之包含外顯子5之5'末端起第86號至第92號之任一部位之區域互補的序列。

【請求項3】

如請求項1之寡核苷酸、其藥理上容許之鹽或溶劑合物，其中上述寡核苷酸係鹼基數為15～21者，且含有與具有c.648G＞T變異之G6PC基因之包含外顯子5之5'末端起第92號之部位之區域互補的序列。

【請求項4】

如請求項1之寡核苷酸、其藥理上容許之鹽或溶劑合物，其中上述寡核苷酸係鹼基數為15～18者，且含有與具有c.648G＞T變異之G6PC基因之包含外顯子5之5'末端起第92號之部位之區域互補的序列。

【請求項5】

如請求項1之寡核苷酸、其藥理上容許之鹽或溶劑合物，其中上述寡核苷酸係鹼基數為18者，且含有與具有c.648G＞T變異之G6PC基因之包含外顯子5之5'末端起第92號之部位之區域互補的序列。

【請求項6】

如請求項1之寡核苷酸、其藥理上容許之鹽或溶劑合物，其中上述寡核苷酸係鹼基數為17者，且含有與具有c.648G＞T變異之G6PC基因之包含外顯子5之5'末端起第92號之部位之區域互補的序列。

【請求項7】

如請求項1之寡核苷酸、其藥理上容許之鹽或溶劑合物，其中上述寡核苷酸係鹼基數為16者，且含有與具有c.648G＞T變異之G6PC基因之包含外顯子5之5'末端起第92號之部位之區域互補的序列。

【請求項8】

如請求項1之寡核苷酸、其藥理上容許之鹽或溶劑合物，其中上述寡核苷酸係鹼基數為15者，且含有與具有c.648G＞T變異之G6PC基因之包含外顯子5之5'末端起第92號之部位之區域互補的序列。

【請求項9】

如請求項1之寡核苷酸、其藥理上容許之鹽或溶劑合物，其中上述寡核苷酸含有序列編號1～32、40～42、44～48之任一序列(其中，序列中之t亦可為u，u亦可為t)中連續之至少15個核苷酸之序列。

【請求項10】

如請求項1至9中任一項之寡核苷酸、其藥理上容許之鹽或溶劑合物，其中上述寡核苷酸進而於5'末端及/或3'末端附加有可於生物體內切斷之寡核苷酸。

【請求項11】

如請求項1至10中任一項之寡核苷酸、其藥理上容許之鹽或溶劑合物，其中構成寡核苷酸之糖及/或磷酸二酯鍵之至少1個經修飾。

【請求項12】

如請求項1至10中任一項之寡核苷酸、其藥理上容許之鹽或溶劑合物，其中構成寡核苷酸之糖係D-核呋喃糖，糖之修飾係D-核呋喃糖之2'位之羥基之修飾。

【請求項13】

如請求項1至10中任一項之寡核苷酸、其藥理上容許之鹽或溶劑合物，其中構成寡核苷酸之糖係D-核呋喃糖，糖之修飾係D-核呋喃糖之2'-O-烷基化及/或2'-,4'-交聯化。

【請求項14】

如請求項1至10中任一項之寡核苷酸、其藥理上容許之鹽或溶劑合物，其中構成寡核苷酸之糖係D-核呋喃糖，糖之修飾係D-核呋喃糖之2'-O-烷基化及/或2'-O,4'-C-伸烷基化。

【請求項15】

如請求項1至14中任一項之寡核苷酸、其藥理上容許之鹽或溶劑合物，其中磷酸二酯鍵之修飾係硫代磷酸酯。

【請求項16】

如請求項1至15中任一項之寡核苷酸、其藥理上容許之鹽或溶劑合物，其中上述寡核苷酸於5'末端及/或3'末端結合有GalNAc單元。

【請求項17】

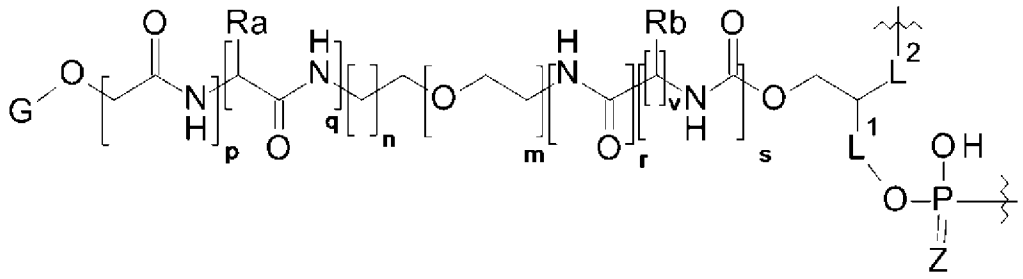
如請求項1至15中任一項之寡核苷酸、其藥理上容許之鹽或溶劑合物，其中上述寡核苷酸於5'末端結合有GalNAc單元。

【請求項18】

如請求項16或17之寡核苷酸、其藥理上容許之鹽或溶劑合物，其中

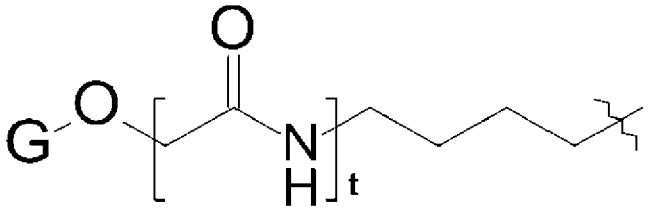
GalNAc單元係式

[化1]



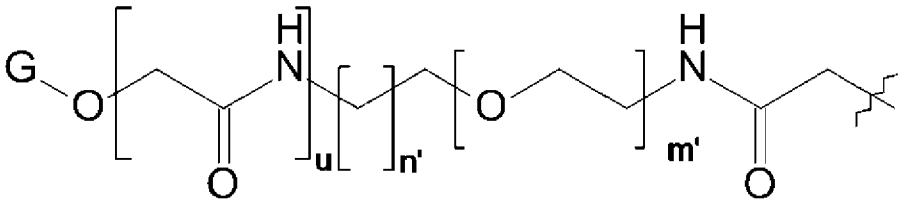
[式中，Ra表示式

[化2]



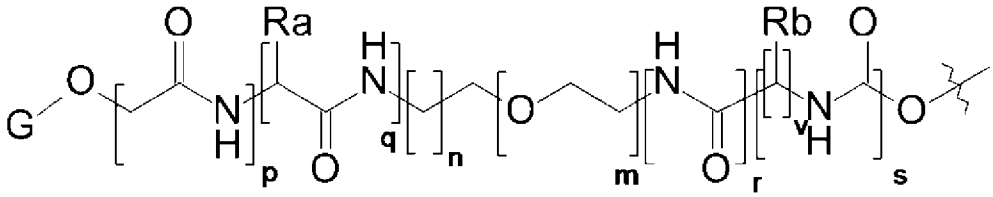
所表示之基，Rb表示式

[化3]



所表示之基或氫原子，XX表示式

[化4]



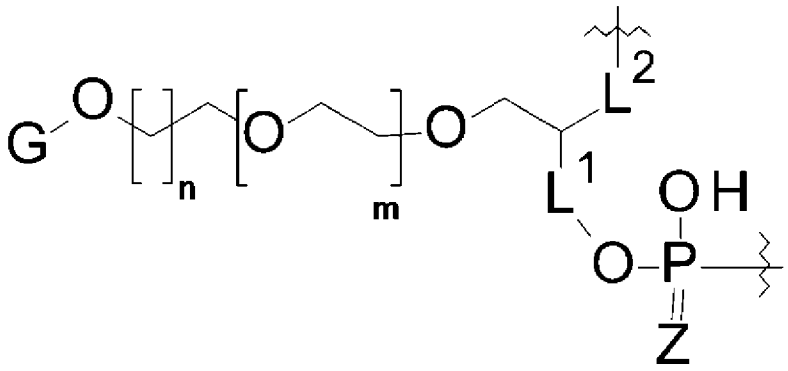
所表示之基，G表示5-乙醯胺-2-羥基甲基-3,4-二羥基四氫吡喃-6-基(GalNAc)，Z表示氧原子或硫原子，L^1及L^2中一者表示亞甲基(CH_2)，另一者表示不隔著原子，p、q、r、s、t及u互相獨立地表示0或1，n及n'互相

獨立地表示1～15之整數，m及m'互相獨立地表示0～5之整數，於Rb不為氫原子時，v表示1，於Rb為氫原子時，v表示1～7；其中，於n為1時，m為0～5之整數，於n為2～15之整數時，m為0，於n'為1時，m'為1～5之整數，於n'為2～15之整數時，m'為0；可於距磷原子較遠之鍵結鍵上鍵結羥基、XX基、或OG基]所表示之基。

【請求項19】

如請求項16或17之寡核苷酸、其藥理上容許之鹽或溶劑合物，其中GalNAc單元係式

[化5]

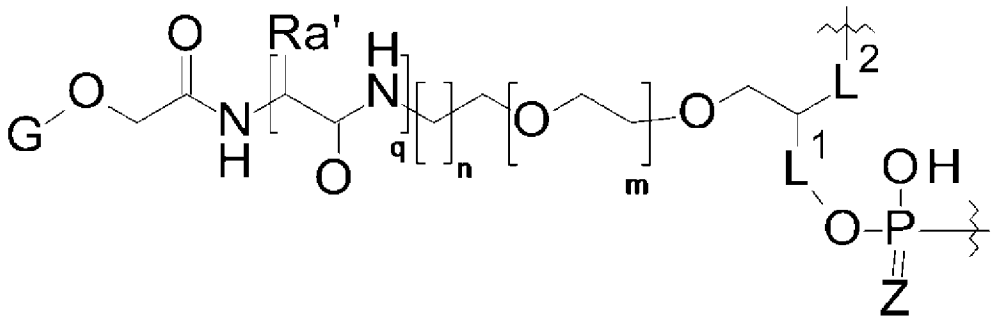


[式中，G、Z、L^1、L^2、n及m表示與上述相同之含義]所表示之基。

【請求項20】

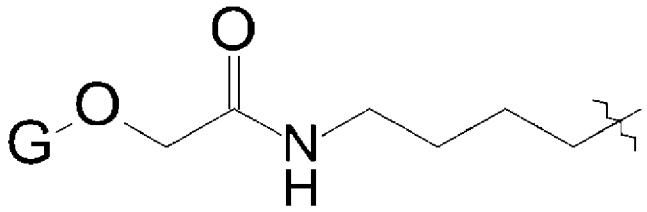
如請求項16或17之寡核苷酸、其藥理上容許之鹽或溶劑合物，其中GalNAc單元係式

[化6]



[式中，G、Z、L^1、L^2、q、n及m表示與上述相同之含義，Ra'表示式

[化7]

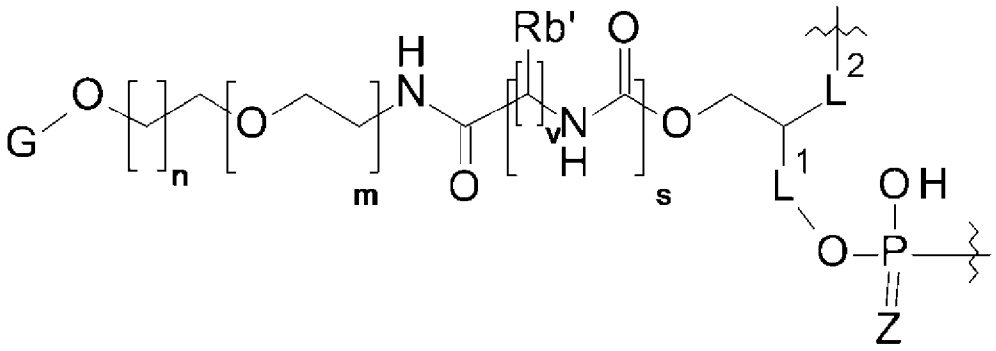


所表示之基]所表示之基。

【請求項21】

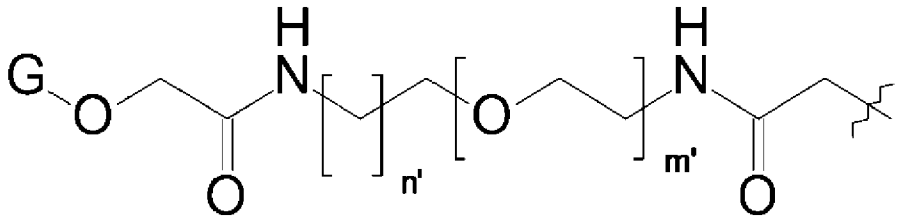
如請求項16或17之寡核苷酸、其藥理上容許之鹽或溶劑合物，其中GalNAc單元係式

[化8]



[式中，G、Z、L^1、L^2、s、n、m及v表示與上述相同之含義，Rb'表示式

[化9]

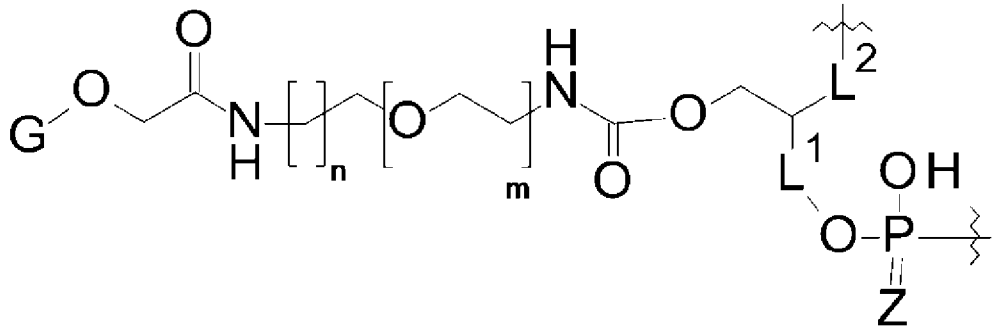


(式中，n'及m'表示與上述相同之含義)所表示之基或氫原子]所表示之基。

【請求項22】

如請求項16或17之寡核苷酸、其藥理上容許之鹽或溶劑合物，其中GalNAc單元係或式

[化10]

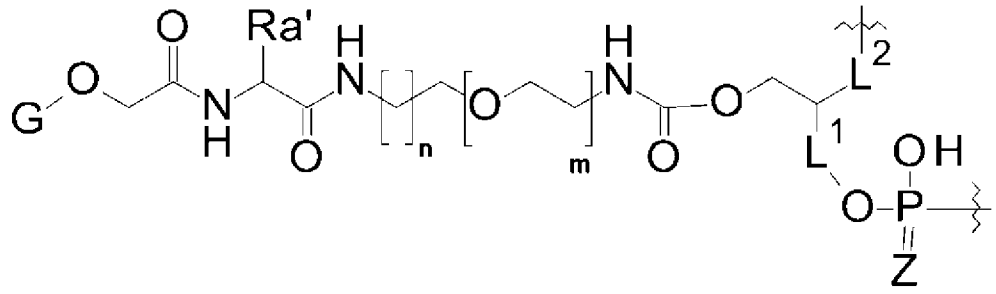


[式中，G、Z、L^1、L^2、n及m表示與上述相同之含義]所表示之基。

【請求項23】

如請求項16或17之寡核苷酸、其藥理上容許之鹽或溶劑合物，其中GalNAc單元係式

[化11]



[式中，G、Z、L^1、L^2、n、m及Ra'表示與上述相同之含義]所表示之基。

【請求項24】

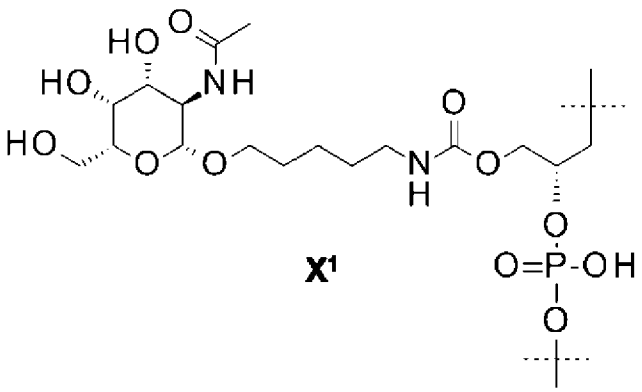
如請求項1之寡核苷酸、其藥理上容許之鹽或溶劑合物，其中上述寡核苷酸係以式

[化12]

RO－Xg－Xf－Xe－Xd－Xc－Xb－Xa－T

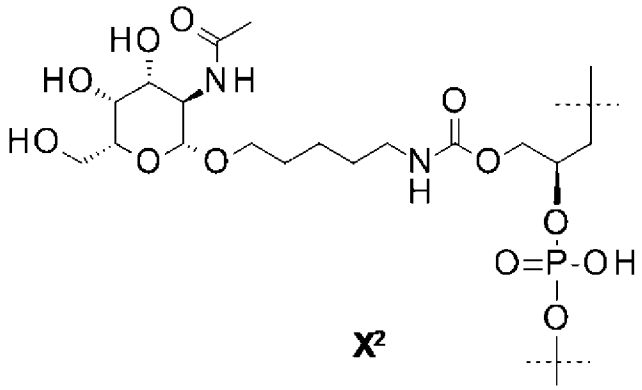
[式中，R表示氫原子、XX基、或G基，T表示5'末端不具有羥基之寡核苷酸，Xg表示選自由X^1～X^6及X^9～X^{17}所組成之群中之GalNAc單元，或RO-Xg表示選自由X^7、X^8、X^{18}、X^{19}、X^{20}、X^{21}及X^{22}所組成之群中之GalNAc單元，Xa、Xb、Xc、Xd、Xe及Xf互相獨立地表示選自由X^1～X^6及X^9～X^{17}或該等之光學異構物所組成之群中之GalNAc單元或單鍵]表示，

[化13]



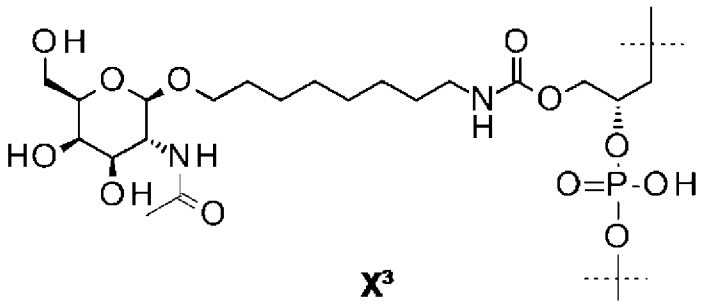
X^1

[化14]



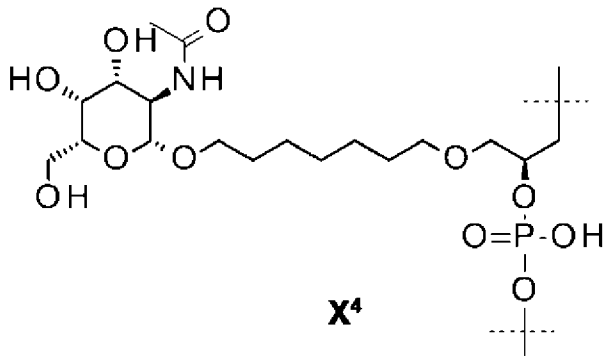
X^2

[化15]



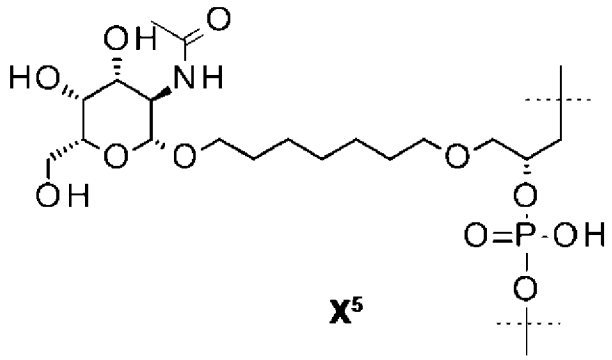
X^3

[化16]



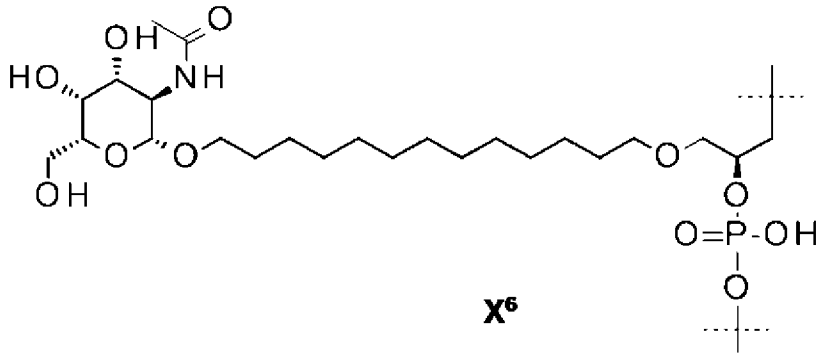
X4

[化17]



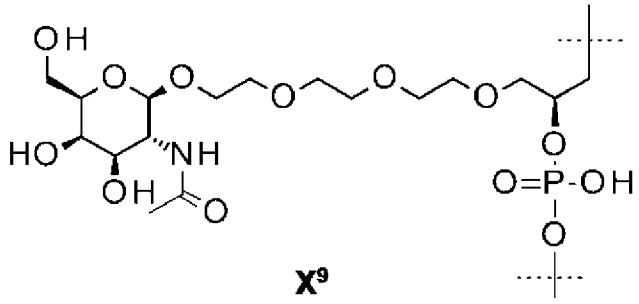
X5

[化18]



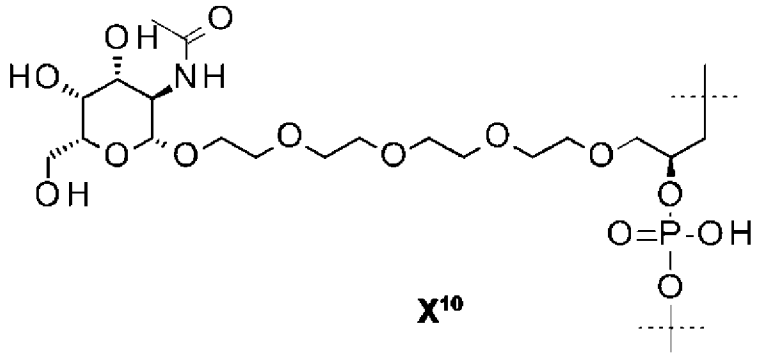
X6

[化19]



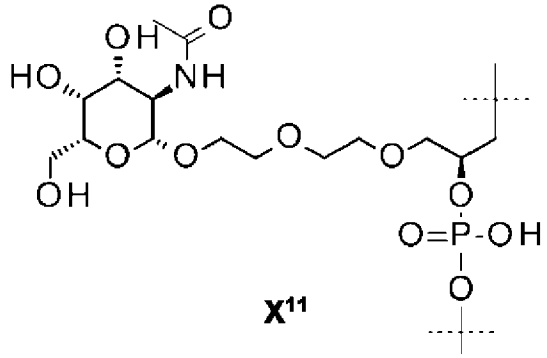
X9

[化20]



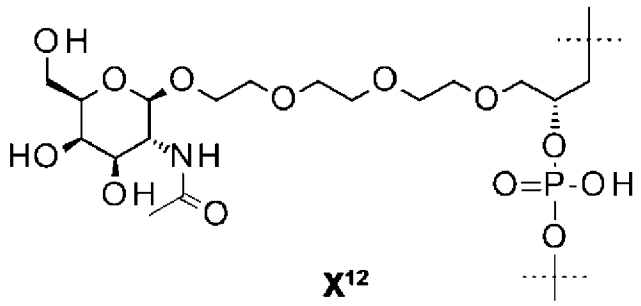
X^{10}

[化21]



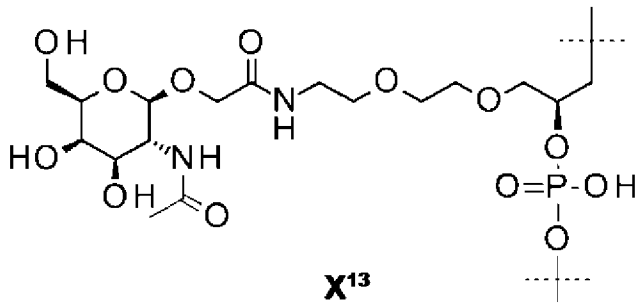
X^{11}

[化22]



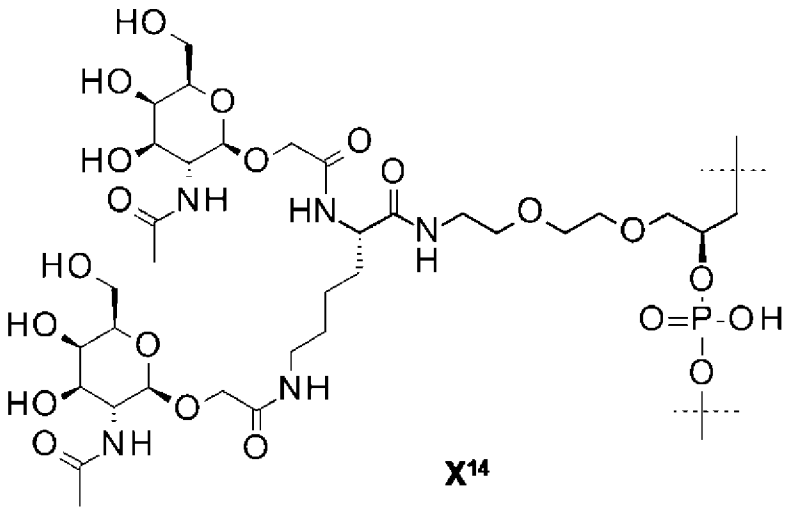
X^{12}

[化23]



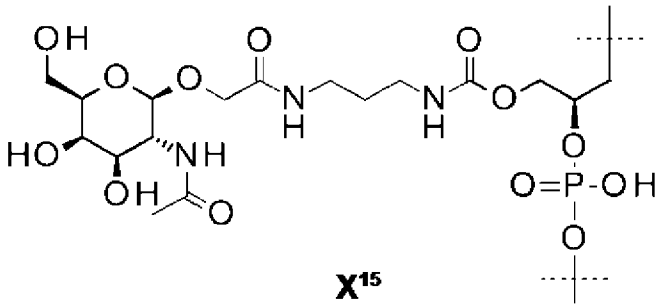
X^{13}

[化24]



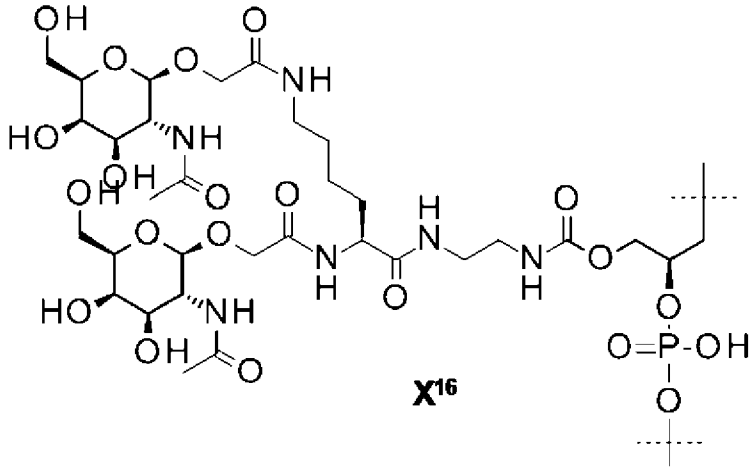
X^{14}

[化25]



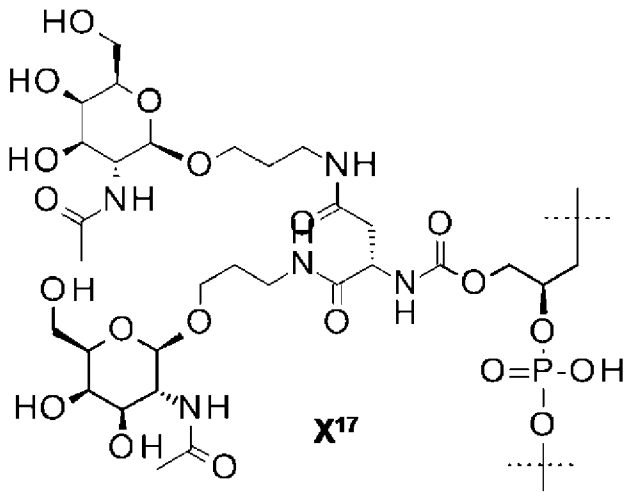
X^{15}

[化26]



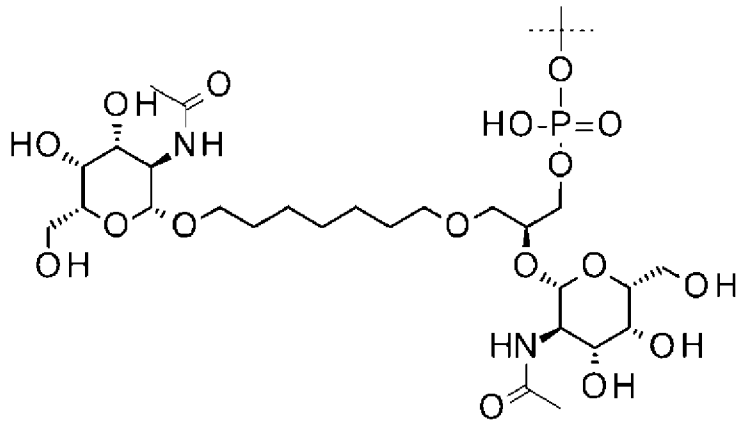
X^{16}

[化27]



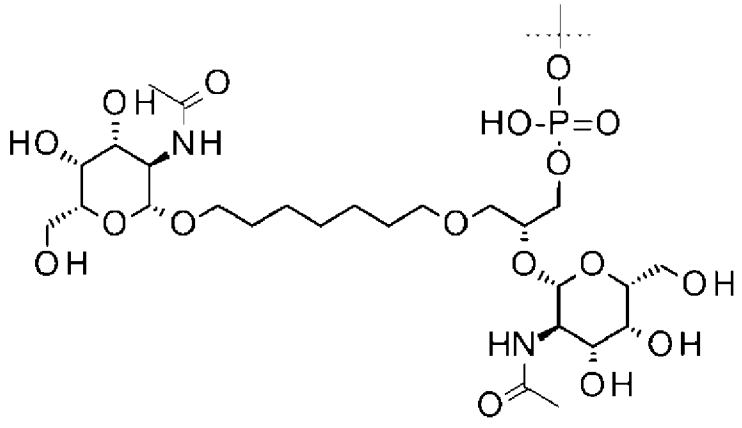
X^{17}

[化28]



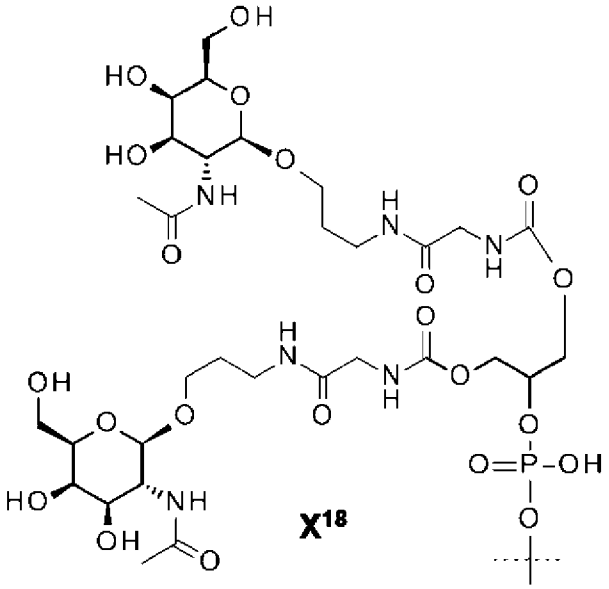
X^{7}

[化29]



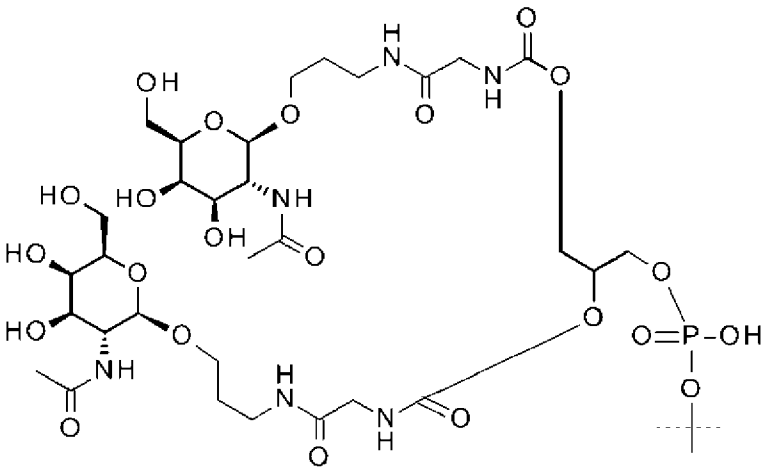
X^{8}

[化30]



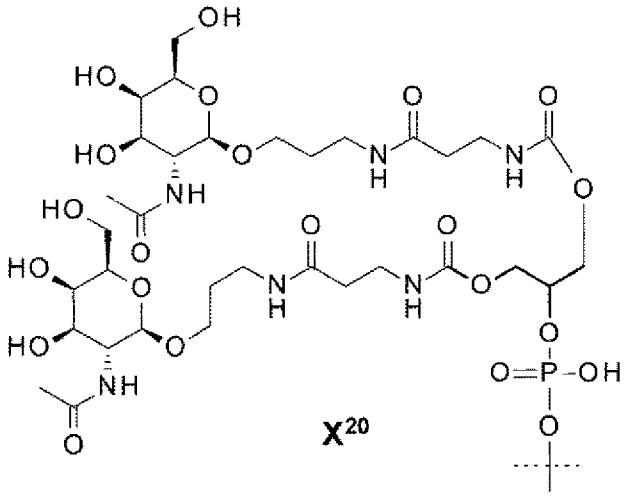
X^{18}

[化31]



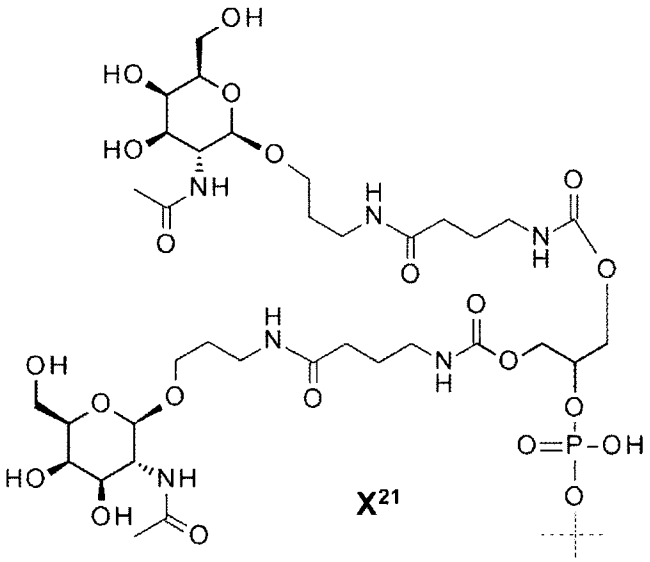
X^{19}

[化32]

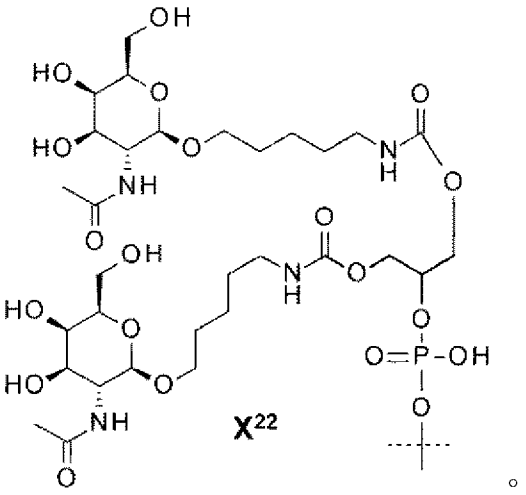


X^{20}

[化33]



[化34]



。

【請求項25】

一種醫藥，其包含如請求項1至24中任一項之寡核苷酸、其藥理上容許之鹽或溶劑合物。

【請求項26】

一種糖原病Ia型治療藥，其包含如請求項1至24中任一項之寡核苷酸、其藥理上容許之鹽或溶劑合物。

【請求項27】

一種糖原病Ia型之治療方法，其包括將如請求項1至24中任一項之寡

核苷酸、其藥理上容許之鹽或溶劑合物以醫藥上有效之量對受驗者投予。

【請求項28】

如請求項1至24中任一項之寡核苷酸、其藥理上容許之鹽或溶劑合物，其用於糖原病Ia型之治療方法。

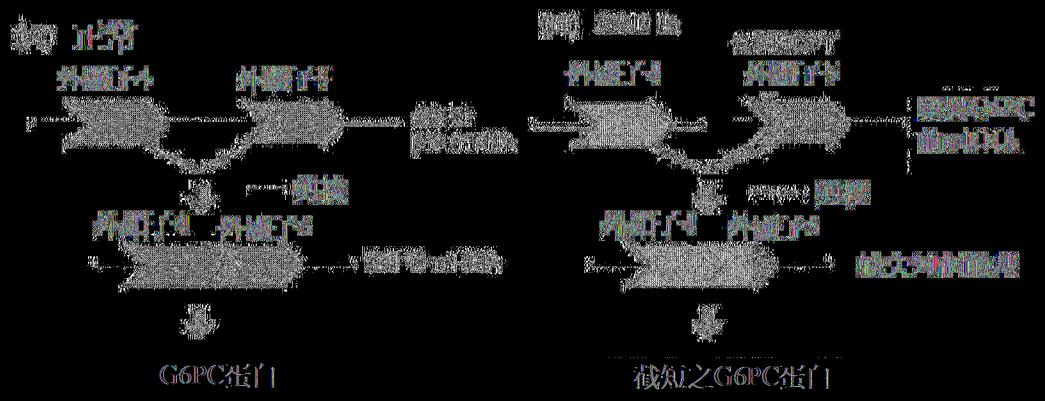
【請求項29】

一種用於經口或非經口投予之調配物，其包含如請求項1至24中任一項之寡核苷酸、其藥理上容許之鹽或溶劑合物。

【請求項30】

如請求項1至24中任一項之寡核苷酸、其藥理上容許之鹽或溶劑合物，其用於作為醫藥使用。

【發明圖式】



【圖1】



【圖2】

G6PC外顯子5

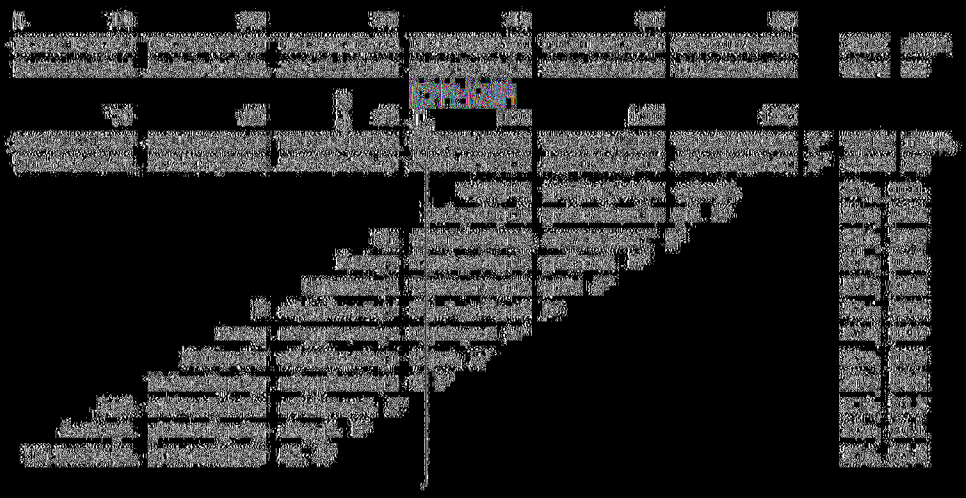
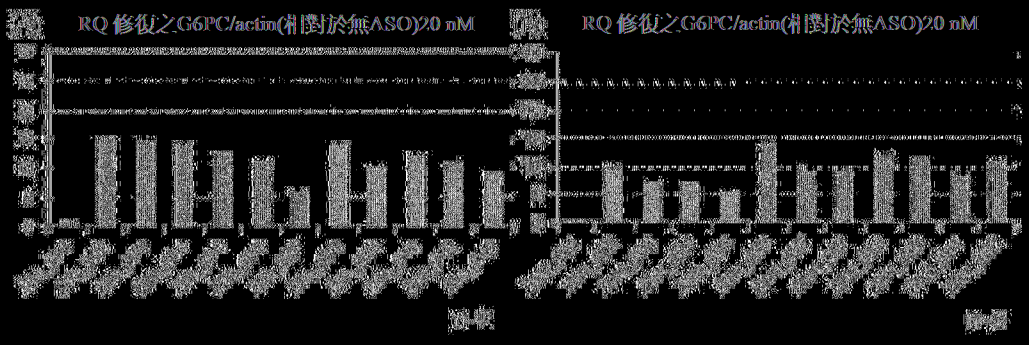


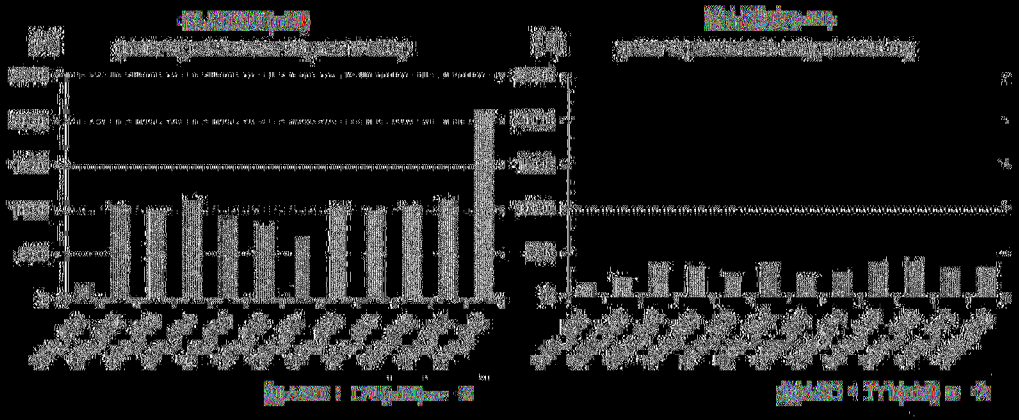
圖3



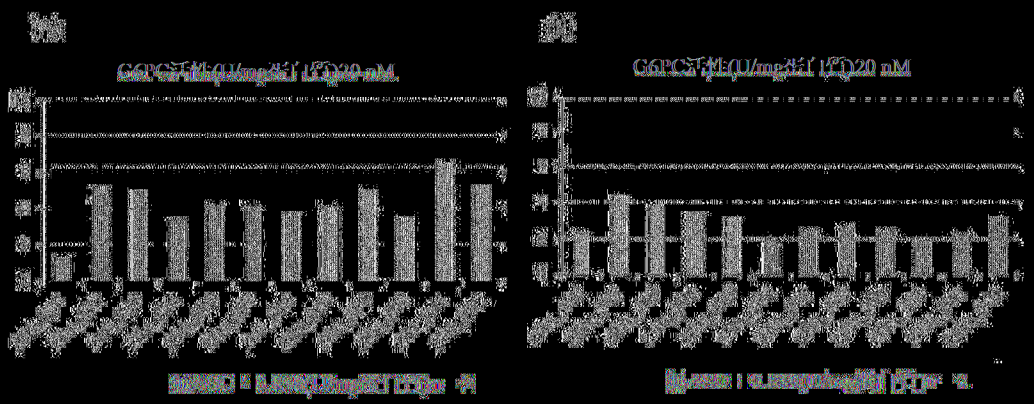
圖4


RQ 修復之G6PC/actin(相對於無ASO)20 nM
RQ 修復之G6PC/actin(相對於無ASO)20 nM

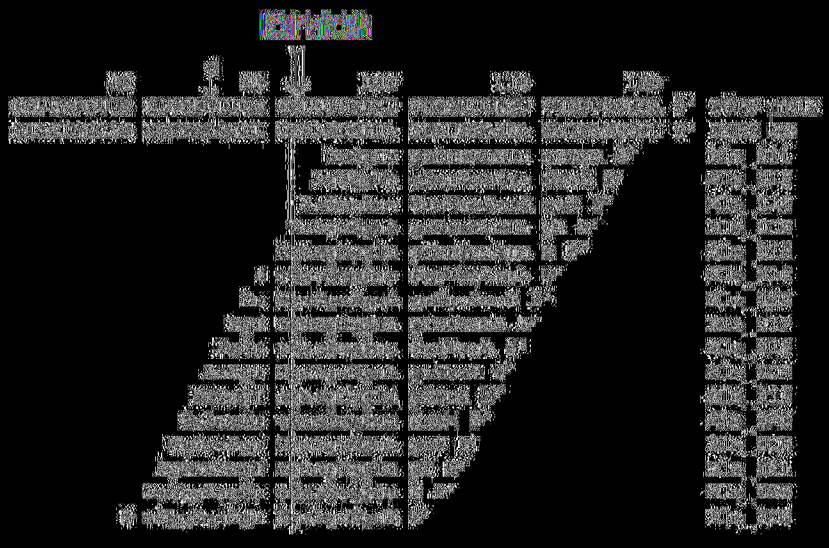
[圖5]



[圖6]



(圖1)



(圖2)

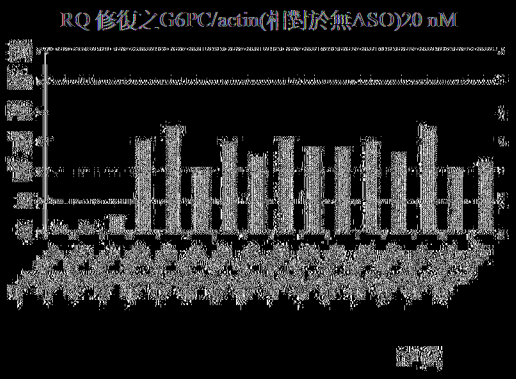


圖9

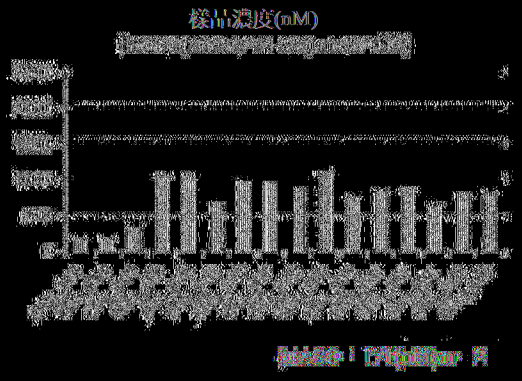
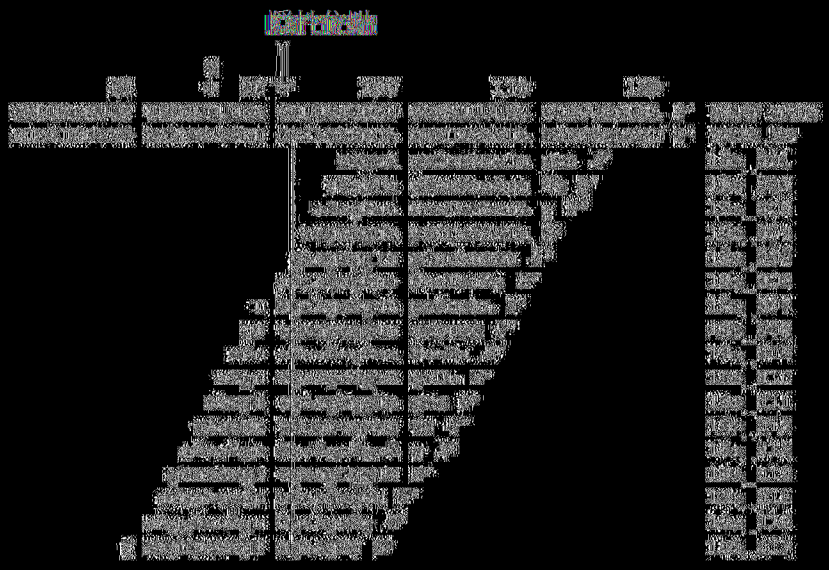


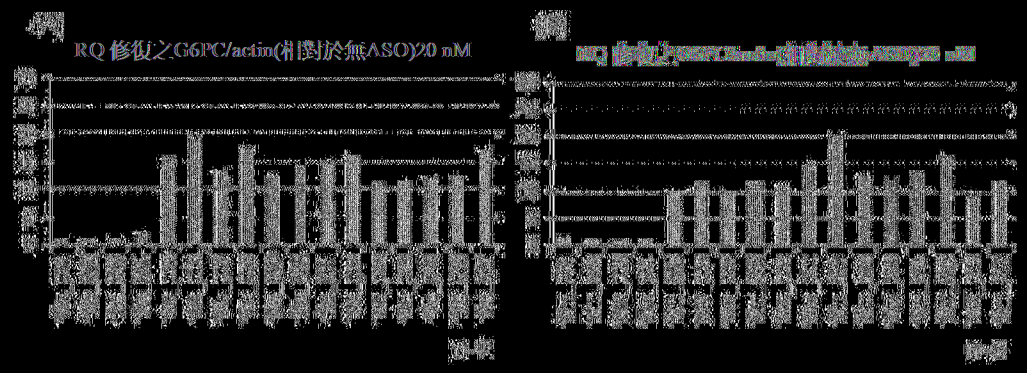
圖10



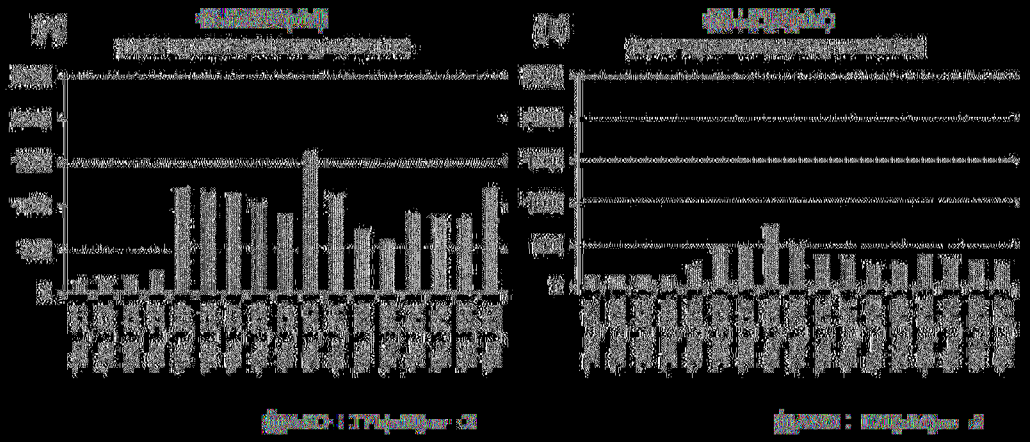
[圖11]



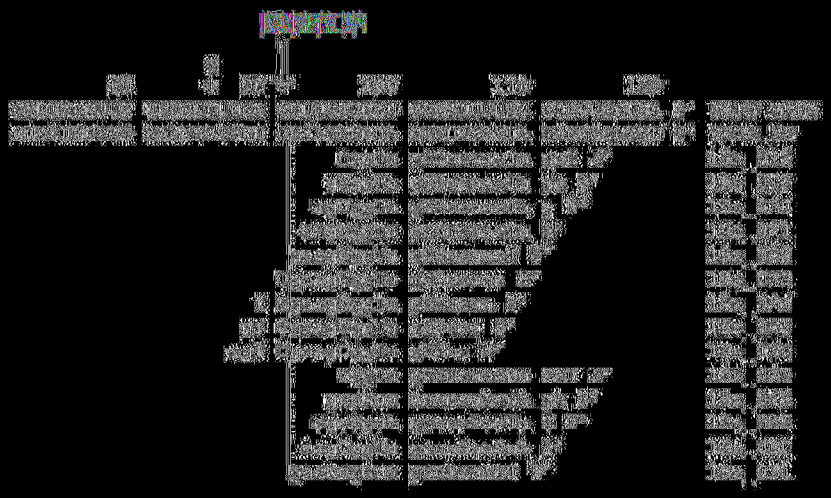
[圖12]



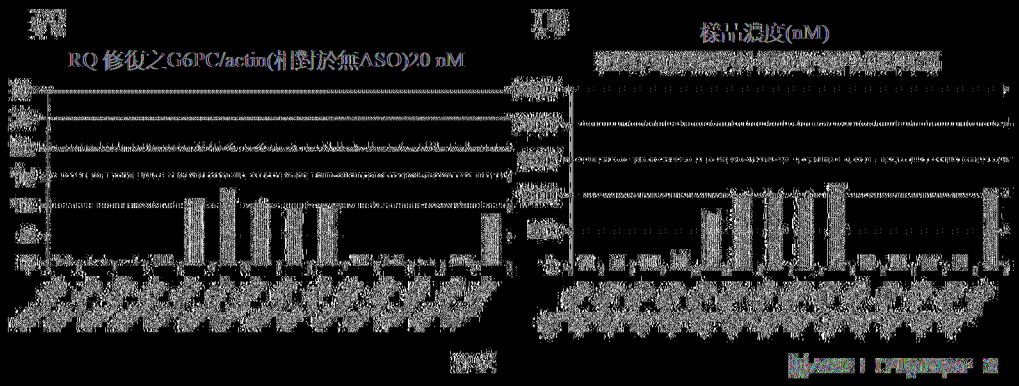
[圖13]



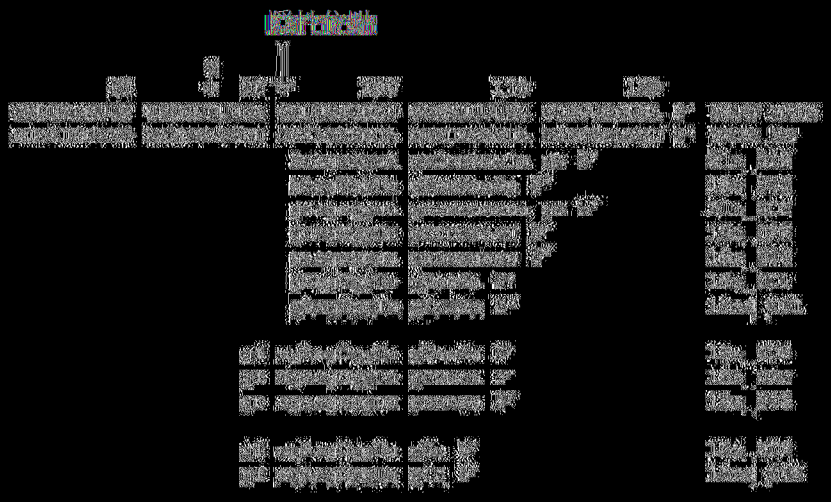
[圖14]



[圖15]

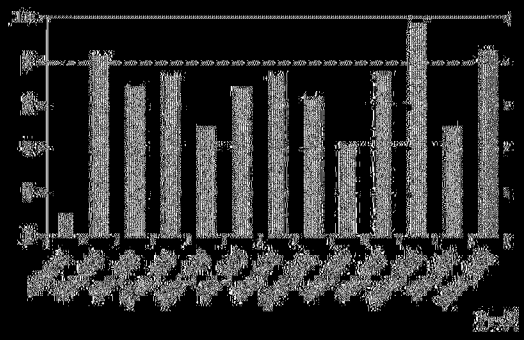


[圖16]



圖(17)

RQ 修復之G6PC/actn(相對於對照)



圖(18)

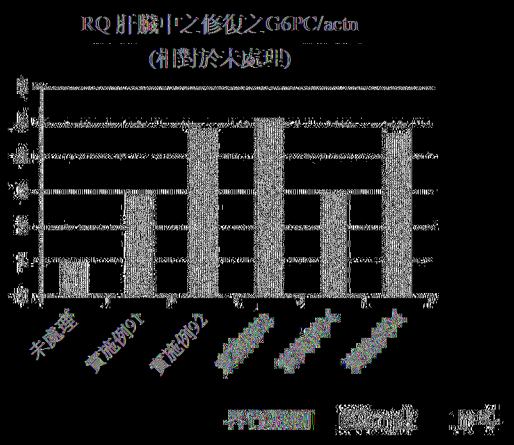

RQ 肝臟中之修復之G6PC/actn
(相對於未處理)
未處理
實施例91
實施例92

圖19

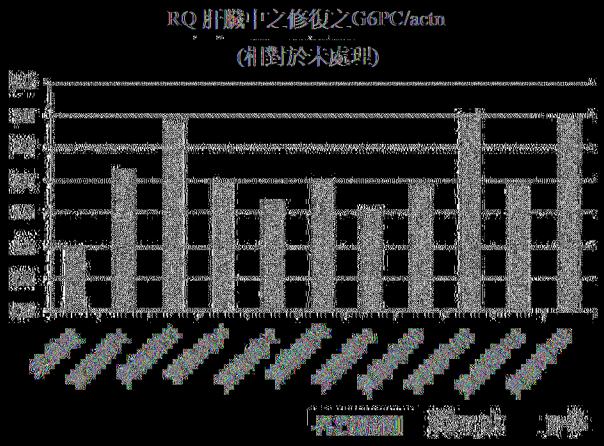

RQ 肝臟中之修復之G6PC/actn
(相對於未處理)

圖20

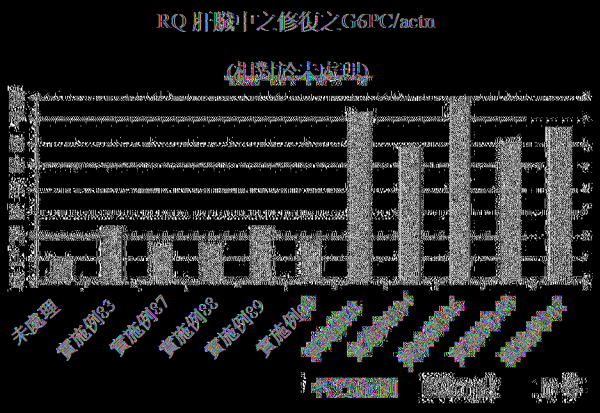

RQ 肝臟中之修復之G6PC/actn
(相對於未處理)
未處理
實施例83
實施例87
實施例88
實施例89

圖21

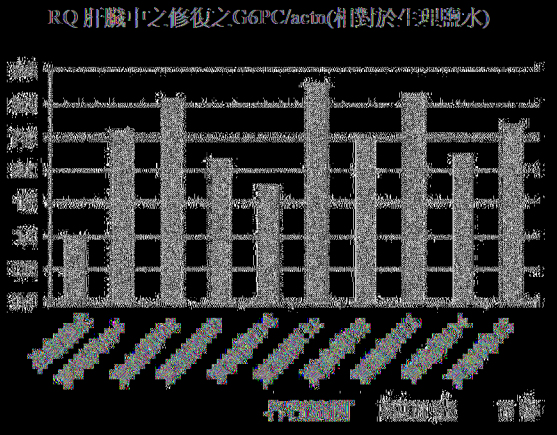
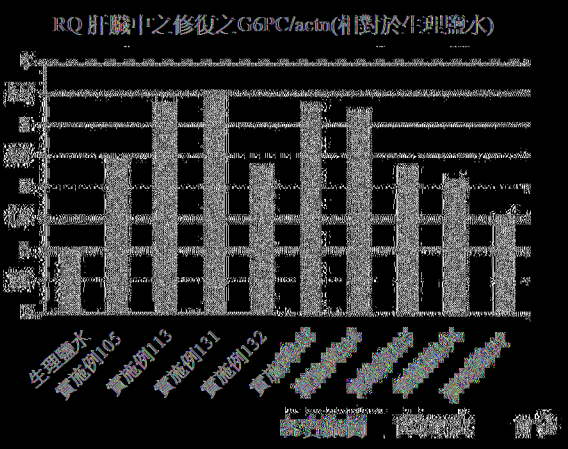
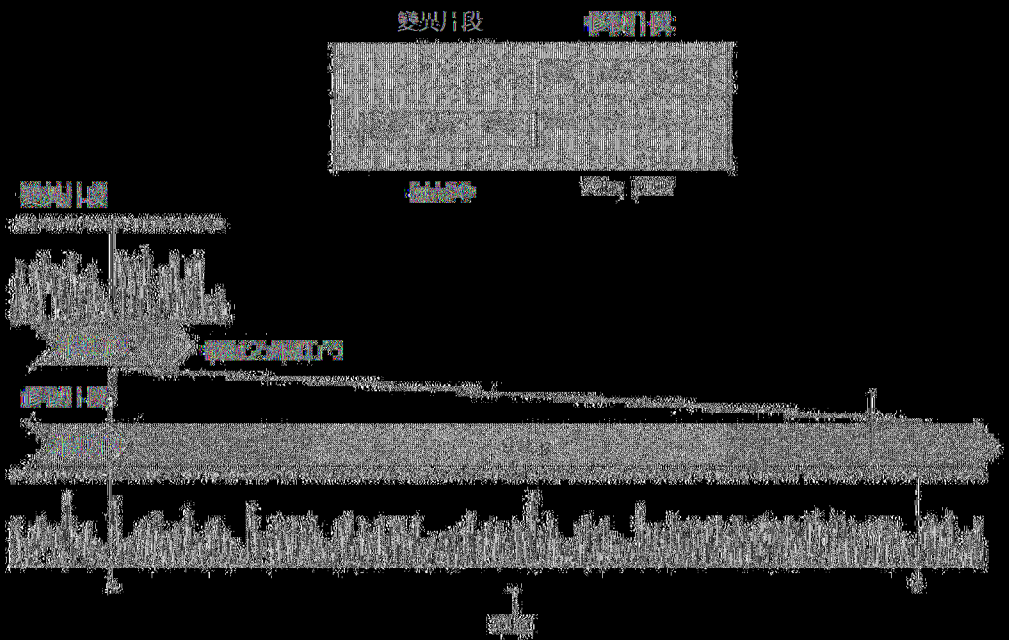

RQ 肝臟中之修復之G6PC/actn(相對於生理鹽水)

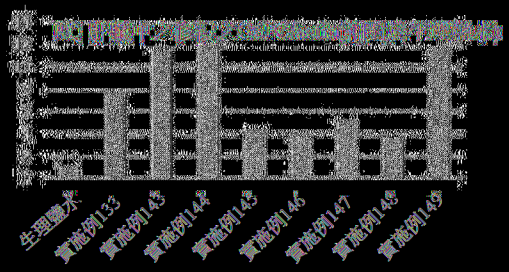
圖22


RQ 肝臟中之修復之G6PC/actn(相對於生理鹽水)
生理鹽水
實施例105
實施例113
實施例131
實施例132

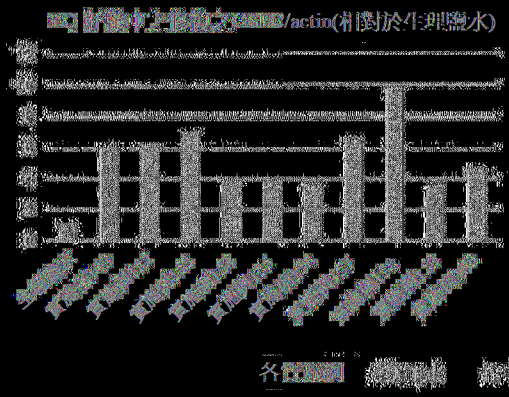
[圖23]


變異片段

[圖24]


生理鹽水
實施例133
實施例143
實施例144
實施例145
實施例146
實施例147
實施例148
實施例149

圖(圖25)


/action(相對於生理鹽水)

圖(圖26)