(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2016 年 12 月 29 日(29.12.2016)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2016/208773 A1

(51) 国際特許分類:
C07H 21/00 (2006.01)　*C12N 15/113* (2010.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2016/069057

(22) 国際出願日: 2016 年 6 月 27 日(27.06.2016)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2015-128416 2015 年 6 月 26 日(26.06.2015)　JP

(71) 出願人: 協和発酵キリン株式会社 (KYOWA HAKKO KIRIN CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1008185 東京都千代田区大手町一丁目６番１号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 山本　潤一郎(YAMAMOTO, Junichiro); 〒1008185 東京都千代田区大手町一丁目６番１号 協和発酵キリン株式会社本社内 Tokyo (JP). 澤田 貴史(SAWADA, Takashi); 〒1008185 東京都千代田区大手町一丁目６番１号　協和発酵キリン株式会社本社内 Tokyo (JP). 萩原　健司(HAGIWARA, Kenji); 〒1008185 東京都千代田区大手町一丁目６番１号　協和発酵キリン株式会社本社内 Tokyo (JP). 渥美　敏幸(ATSUMI, Toshiyuki); 〒1008185 東京都千代田区大手町一丁目６番１号　協和発酵キリン株式会社本社内 Tokyo (JP). 篠原　史一(SHINOHARA, Fumikazu); 〒1008185 東京都千代田区大手町一丁目６番１号　協和発酵キリン株式会社本社内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 稲葉　良幸，外(INABA, Yoshiyuki et al.); 〒1066123 東京都港区六本木６－１０－１　六本木ヒルズ森タワー２３階　ＴＭＩ総合法律事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告（条約第 21 条(3)）
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則 5.2(a)）

(54) **Title**: OLIGONUCLEOTIDE DERIVATIVE

(54) 発明の名称 : オリゴヌクレオチド誘導体

(I)

(57) **Abstract**: Provided is: an oligonucleotide derivative having, at an oxygen atom of at least one phosphate group in an oligonucleotide, a group represented by formula (I) (wherein, R^1 represents a lower alkyl or the like, R^2 and R^3 are identical or different and each represent an electron-withdrawing group or the like); or a salt or the like thereof.

(57) 要約: オリゴヌクレオチドの少なくとも 1 つのリン酸基の酸素原子上に式(I) (式中、R^1は低級アルキル等を表し、R^2およびR^3は、同一または異なって、それぞれ電子吸引基等を表す)で表される基を有するオリゴヌクレオチド誘導体またはその塩等を提供する。

WO 2016/208773 A1

明　細　書

発明の名称 ： オリゴヌクレオチド誘導体

技術分野

[0001]　本発明は、オリゴヌクレオチドのリン酸基の1つ以上が修飾されているオリゴヌクレオチド誘導体等に関する。

背景技術

[0002]　短鎖干渉性RNA（small interfering RNA、以下siRNA）は、RNA干渉（RNA interference、以下RNAi）に関与しており、標的遺伝子の発現を抑制するためのガイドとしての機能を有するRNAである［ネイチャー(Nature)、第411巻、第6836号、494-498頁(2001年)］。siRNAはメッセンジャーRNA(mRNA)の切断を介して、そのmRNAが発現を担う蛋白質の発現を選択的に抑制(ノックダウン)し得ることから、医薬への応用が期待されている[ネイチャー・レビューズ・キャンサー(Nature Reviews Cancer)、第11巻、59-67頁(2011年)]。

[0003]　siRNAは通常、RNA induced silencing complex(RISC)と呼ばれる複合体に取り込まれ、その機能を発現する。RISCに取り込まれたsiRNAは、センス鎖が切断されアンチセンス鎖のみの一本鎖となった後、アンチセンス鎖と相補性を有する標的mRNAと結合する。標的mRNAは、Argonaute2(AGO2)と呼ばれるタンパク質中のRNaseドメインによって切断され、標的mRNAからの蛋白質の発現が抑制される[サイレンス(Silence)、第1巻、3頁(2010年)]ことが知られている[サイレンス(Silence)、第1巻、3頁(2010年)]。

[0004]　ところで、siRNAやアンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)等のオリゴヌクレオチドは、脂溶性が乏しく、複数のリン酸ジエステル部位を有するポリアニオン分子であるため、細胞膜透過性が乏しい。そこで、siRNAもしくはASOのリン酸ジエステル部位の非架橋酸素原子を保護基で保護することで細胞膜透過性が向上することが知られている（特許文献1および非特許文献1～3）。上記文献記載のsiRNAやASOは、細胞内環境において、例えば細胞内に高濃度存在するグルタチオン等により保護基が除去されて、RNAi活性またはRNaseH

によるノックダウン活性に必要となるリン酸ジエステル部位を有する化合物へ変換されるため、細胞内でRNAi活性またはRNaseHによるノックダウン活性を示す(特許文献1および非特許文献1～3)。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：国際公開第2008/008476号

非特許文献

[0006] 非特許文献1：「ケミカル・コミュニケーション(Chem. Commun.)」, 2009年, p.3216-3218

非特許文献2：「ネーチャー・バイオテクノロジー(Nature Biotechnology)」、2014年、第32巻、p.1256-1261

非特許文献3：「アンチセンス・アンド・ヌクレイック・アシッド・ドラッグ・デベロップメント(Antisense & Nucleic Acid Drug Development)」、2002年、第12巻、p.33-41

発明の概要

発明が解決しようとする課題

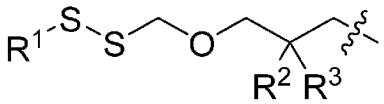
[0007] 本発明は、オリゴヌクレオチドのリン酸基の1つ以上が修飾されているオリゴヌクレオチド誘導体等を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明は、以下の(1)～(41)に関する。

(1) オリゴヌクレオチドの少なくとも1つのリン酸基の酸素原子上に式(I)

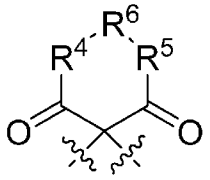
[化1]



(I)

{式中、R^1は低級アルコキシで置換されていてもよい低級アルキルを表し、R^2およびR^3は、同一または異なって、それぞれ電子吸引基を表すか、R^2、R^3および隣接する炭素原子が一緒になって、式(II)

[化2]



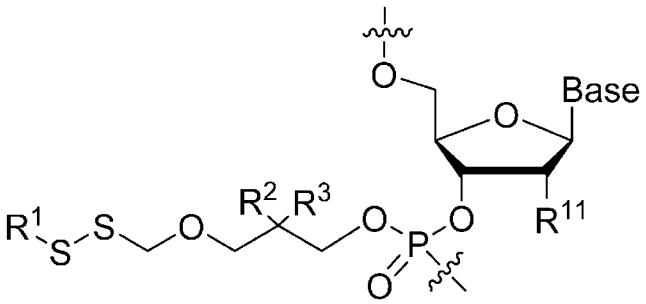
(II)

［式中、R^4およびR^5は、同一または異なって、それぞれ酸素原子、CH_2またはNR^7(式中、R^7は、水素原子または低級アルキルを表す)を表し、R^6は、結合またはCR^8R^9(式中、R^8およびR^9は、同一または異なって、それぞれ水素原子または低級アルキルを表す)を表す］を表す｝で表される基を有するオリゴヌクレオチド誘導体またはその塩。

(2) オリゴヌクレオチドの1つのリン酸基の酸素原子上に式(I)で表される基を有する(1)に記載のオリゴヌクレオチド誘導体またはその塩。

(3) 下記式(III)

[化3]

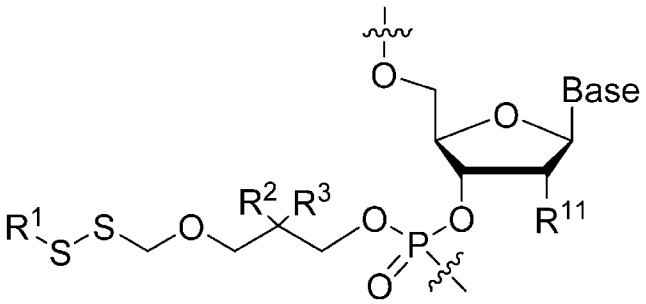


(III)

(式中、Baseは核酸塩基を表し、R^1、R^2およびR^3は、それぞれ前記と同義であり、R^{11}は水素原子、フッ素原子または低級アルコキシを表す)で表される構造を1つ以上含有するオリゴヌクレオチド誘導体またはその塩。ただし、当該オリゴヌクレオチド誘導体またはその塩が、式(III)で表される構造の1種以上を2つ以上含有する場合は、当該構造間でBase、R^1、R^2、R^3およびR^{11}は、それぞれ、同一または異なっていてもよい。

(4)式(III)

[化4]



(III)

(式中、Baseは核酸塩基を表し、R^1、R^2およびR^3は、それぞれ前記と同義であり、R^{11}は水素原子、フッ素原子または低級アルコキシを表す)で表される構造を1つ以上含有する(1)に記載のオリゴヌクレオチド誘導体またはその塩（ただし、当該オリゴヌクレオチド誘導体またはその塩が、式(III)で表される構造を2つ以上含有する場合は、当該構造間でBase、R^1、R^2、R^3およびR^{11}は、それぞれ、同一または異なっていてもよい。）。

(5) R^1が低級アルキルである(1)～(4)のいずれか１つに記載のオリゴヌクレオチド誘導体またはその塩。

(6) R^2およびR^3が、同一または異なって、それぞれカルボキシまたは低級アルコキシカルボニルである(1)～(5)のいずれか1つに記載のオリゴヌクレオチド誘導体またはその塩。

(7) R^2およびR^3が、同一または異なって、それぞれシアノ、ニトロ、低級アルカノイルまたは低級アルキルスルホニルである(1)～(5)のいずれか1つに記載のオリゴヌクレオチド誘導体またはその塩。

(8) 式(III)で表される構造を1つだけ含有する(3)～(7)のいずれか1つに記載のオリゴヌクレオチド誘導体またはその塩。

(9) 5～100の塩基長を有する(1)～(8)のいずれか1つに記載のオリゴヌクレオチド誘導体またはその塩。

(10) 10～80の塩基長を有する(1)～(8)のいずれか1つに記載のオリゴヌクレオチド誘導体またはその塩。

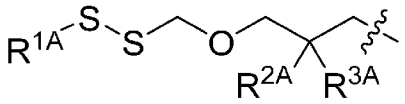
[0009] (11) オリゴヌクレオチドが2本鎖である、(1)～(10)のいずれか1つに記載のオリゴヌクレオチド誘導体またはその塩。

(12) オリゴヌクレオチドが1本鎖である、(1)～(10)のいずれか1つに記載のオリゴヌクレオチド誘導体またはその塩。

(13) オリゴヌクレオチドが短鎖干渉性RNA(siRNA)である、(1)～(12)のいずれか1つに記載のオリゴヌクレオチド誘導体またはその塩。

(14) オリゴヌクレオチドの少なくとも1つのリン酸基の酸素原子上に式(I-0)

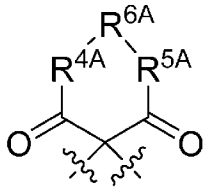
[化5]



(I-0)

{式中、R^{1A}は置換基を有していてもよい低級アルキル、置換基を有していてもよい低級アルケニルまたは置換基を有していてもよい低級アルキニルを表し、R^{2A}およびR^{3A}は、同一または異なって、それぞれ電子吸引基を表すか、R^{2A}、R^{3A}および隣接する炭素原子が一緒になって、式(II-0)

[化6]



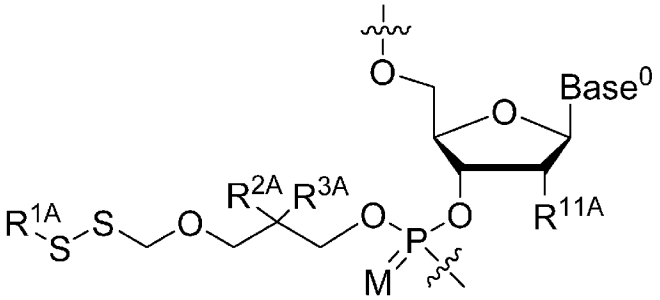
(II-0)

[式中、R^{4A}およびR^{5A}は、同一または異なって、それぞれ酸素原子、CH_2またはNR^{7A}(式中、R^{7A}は、水素原子または低級アルキルを表す)を表し、R^{6A}は、結合または$CR^{8A}R^{9A}$(式中、R^{8A}およびR^{9A}は、同一または異なって、それぞれ水素原子または低級アルキルを表す)を表す]を表す}で表される基を有するオリゴヌクレオチド誘導体またはその塩。

(15) オリゴヌクレオチドの1つのリン酸基の酸素原子上に式(I-0)で表される基を有する(14)に記載のオリゴヌクレオチド誘導体またはその塩。

(16) 式(III-0)

[化7]



(III-0)

(式中、$Base^0$は核酸塩基を表し、Mは酸素原子または硫黄原子を表し、R^{1A}、R^{2A}およびR^{3A}は、それぞれ前記と同義であり、R^{11A}は水素原子、フッ素原子または低級アルコキシを表す)で表される構造を1つ以上含有する(13)記載のオリゴヌクレオチド誘導体またはその塩。ただし、当該オリゴヌクレオチド誘導体またはその塩が、式(III-0)で表される構造を2つ以上含有する場合は、当該構造間で$Base^0$、M、R^{1A}、R^{2A}、R^{3A}およびR^{11A}は、それぞれ、同一または異なっていてもよい。

(17) R^{1A}が置換基を有していてもよい低級アルキルである(14)～(16)のいずれか1つに記載のオリゴヌクレオチド誘導体またはその塩。

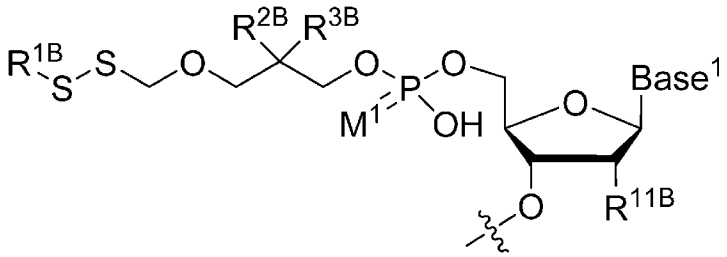
(18) R^{2A}およびR^{3A}が、同一または異なって、それぞれカルボキシ、置換基を有していてもよいアラルキルオキシカルボニル、低級アルコキシカルボニル、低級アルケニルオキシカルボニルまたは低級アルキニルオキシカルボニルである(14)～(17)のいずれか1つに記載のオリゴヌクレオチド誘導体またはその塩。

(19) R^{2A}およびR^{3A}が、同一または異なって、それぞれシアノ、ニトロ、低級アルカノイルまたは低級アルキルスルホニルである(14)～(17)のいずれか1つに記載のオリゴヌクレオチド誘導体またはその塩。

(20) 式(III-0)で表される構造を1つだけ含有する(16)～(19)のいずれか1つに記載のオリゴヌクレオチド誘導体またはその塩。

[0010] (21) 式(III-1)

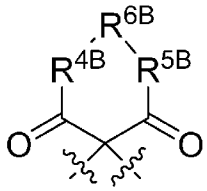
[化8]



(III-1)

{式中、Base[1]は核酸塩基を表し、M[1]は酸素原子または硫黄原子を表し、R[1B]は置換基を有していてもよい低級アルキル、置換基を有していてもよい低級アルケニルまたは置換基を有していてもよい低級アルキニルを表し、R[2B]およびR[3B]は、同一または異なって、それぞれ電子吸引基を表すか、R[2B]、R[3B]および隣接する炭素原子が一緒になって、式(II-1)

[化9]



(II-1)

[式中、R[4B]およびR[5B]は、同一または異なって、それぞれ酸素原子、CH_2またはNR[7B](式中、R[7B]は、水素原子または低級アルキルを表す)を表し、R[6B]は、結合またはCR[8B]R[9B](式中、R[8B]およびR[9B]は、同一または異なって、それぞれ水素原子または低級アルキルを表す)を表す]を表し、R[11B]は水素原子、フッ素原子または低級アルコキシを表す}で表される構造を含有する(14)に記載のオリゴヌクレオチド誘導体またはその塩。

(22) R[1B]が置換基を有していてもよい低級アルキルである(21)に記載のオリゴヌクレオチド誘導体またはその塩。

(23) R[2B]およびR[3B]が、同一または異なって、それぞれカルボキシ、置換基を有していてもよいアラルキルオキシカルボニル、低級アルコキシカルボニル、低級アルケニルオキシカルボニルまたは低級アルキニルオキシカルボニルである(21)または(22)に記載のオリゴヌクレオチド誘導体またはその塩。

(24) R[2B]およびR[3B]が、同一または異なって、それぞれシアノ、ニトロ、低級ア

ルカノイルまたは低級アルキルスルホニルである(21)または(22)に記載のオリゴヌクレオチド誘導体またはその塩。

(25) 5～100の塩基長を有する(14)～(24)のいずれか1つに記載のオリゴヌクレオチド誘導体またはその塩。

(26) 10～80の塩基長を有する(14)～(24)のいずれか1つに記載のオリゴヌクレオチド誘導体またはその塩。

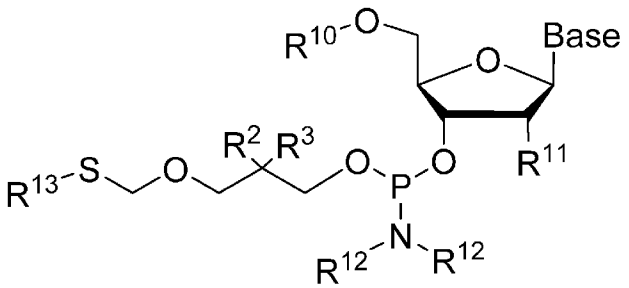
(27) オリゴヌクレオチドが2本鎖である、(14)～(26)のいずれか1つに記載のオリゴヌクレオチド誘導体またはその塩。

(28) オリゴヌクレオチドが1本鎖である、(14)～(26)のいずれか1つに記載のオリゴヌクレオチド誘導体またはその塩。

(29) オリゴヌクレオチドが短鎖干渉性RNA(siRNA)である、(14)～(28)のいずれか1つに記載のオリゴヌクレオチド誘導体またはその塩。

(30) 式(IV)

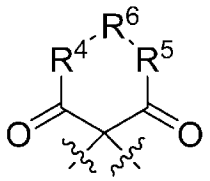
[化10]



(IV)

{式中、Baseは核酸塩基を表し、R^2およびR^3は、同一または異なって、それぞれ電子吸引基を表すか、R^2、R^3および隣接する炭素原子が一緒になって、式(II)

[化11]



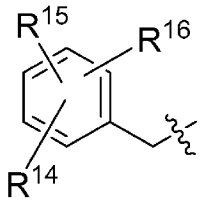
(II)

[式中、R^4およびR^5は、同一または異なって、それぞれ酸素原子、CH_2またはNR^7（式中、R^7は、水素原子または低級アルキルを表す)を表し、R^6は、結合また

はCR^{8}R^{9}(式中、R^{8}およびR^{9}は、同一または異なって、それぞれ水素原子または低級アルキルを表す)を表す]を表し、R^{10}は水酸基の保護基を表し、R^{11}は水素原子、フッ素原子または低級アルコキシを表し、R^{12}は低級アルキルを表し、R^{13}は低級アルキルチオまたは

式(V)

[化12]

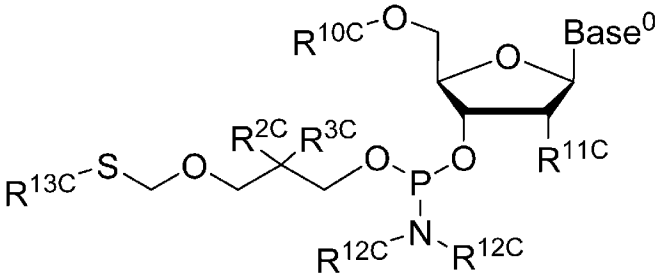


(V)

[式中、R^{14}、R^{15}およびR^{16}は、同一または異なって、それぞれ、水素原子、低級アルキル、低級アルコキシ、またはNR^{17}R^{18}(式中、R^{17}およびR^{18}は、同一または異なって、それぞれ低級アルキルを表す)を表す]を表す}で表される化合物またはその塩。

[0011] (31) 式(IV-0)

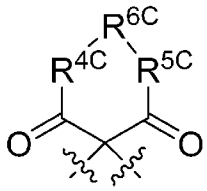
[化13]



(IV-0)

{式中、Base^{0}は核酸塩基を表し、R^{2C}およびR^{3C}は、同一または異なって、それぞれ電子吸引基を表すか、R^{2C}、R^{3C}および隣接する炭素原子が一緒になって、式(II-2)

[化14]



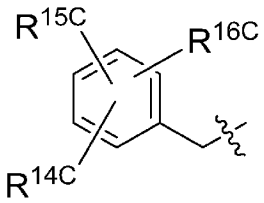
(II-2)

[式中、R^{4C}およびR^{5C}は、同一または異なって、それぞれ酸素原子、CH_2またはNR

^{7C}（式中、R^{7C}は、水素原子または低級アルキルを表す）を表し、R^{6C}は、結合または$CR^{8C}R^{9C}$（式中、R^{8C}およびR^{9C}は、同一または異なって、それぞれ水素原子または低級アルキルを表す）を表す]を表し、R^{10C}は水酸基の保護基を表し、R^{11C}は水素原子、フッ素原子または低級アルコキシを表し、R^{12C}は低級アルキルを表し、R^{13C}は置換基を有していてもよい低級アルキルチオ、置換基を有していてもよい低級アルケニルチオ、置換基を有していてもよい低級アルキニルチオまたは

式(V-0)

[化15]



(V-0)

[式中、R^{14C}、R^{15C}およびR^{16C}は、同一または異なって、それぞれ、水素原子、低級アルキル、低級アルコキシ、または$NR^{17C}R^{18C}$（式中、R^{17C}およびR^{18C}は、同一または異なって、それぞれ低級アルキルを表す）を表す]を表す}で表される化合物またはその塩。

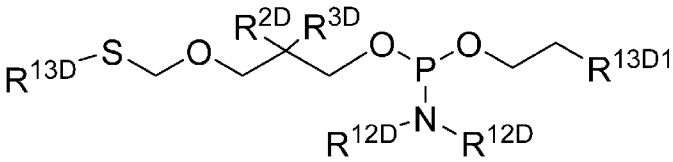
(32) R^{2C}およびR^{3C}が、同一または異なって、それぞれカルボキシ、置換基を有していてもよいアラルキルオキシカルボニル、低級アルコキシカルボニル、低級アルケニルオキシカルボニルまたは低級アルキニルオキシカルボニルである(31)に記載の化合物またはその塩。

(33) R^{2C}およびR^{3C}が、同一または異なって、それぞれシアノ、ニトロ、低級アルカノイルまたは低級アルキルスルホニルである(31)に記載の化合物またはその塩。

(34) R^{10C}が、トリチル、4-メトキシトリチルまたは4,4’-ジメトキシトリチルである(31)～(33)のいずれか1つに記載の化合物またはその塩。

(35) 式(IV-1)

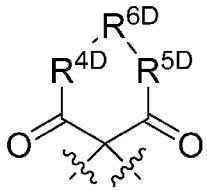
[化16]



(IV-1)

{式中、R^{2D}およびR^{3D}は、同一または異なって、それぞれ電子吸引基を表すか、R^{2D}、R^{3D}および隣接する炭素原子が一緒になって、式(II-3)

[化17]

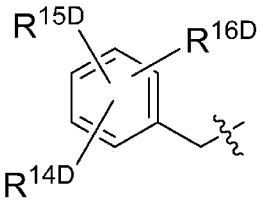


(II-3)

[式中、R^{4D}およびR^{5D}は、同一または異なって、それぞれ酸素原子、CH_2またはNR^{7D}（式中、R^{7D}は、水素原子または低級アルキルを表す)を表し、R^{6D}は、結合または$CR^{8D}R^{9D}$(式中、R^{8D}およびR^{9D}は、同一または異なって、それぞれ水素原子または低級アルキルを表す)を表す]を表し、R^{12D}は低級アルキルを表し、R^{13D}は置換基を有していてもよい低級アルキルチオ、置換基を有していてもよい低級アルケニルチオ、置換基を有していてもよい低級アルキニルチオまたは

式(V-1)

[化18]



(V-1)

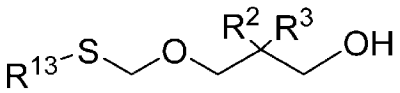
[式中、R^{14D}、R^{15D}およびR^{16D}は、同一または異なって、それぞれ、水素原子、低級アルキル、低級アルコキシ、または$NR^{17D}R^{18D}$(式中、R^{17D}およびR^{18D}は、同一または異なって、それぞれ低級アルキルを表す)を表す]を表し、R^{13D1}はシアノ、ニトロ、カルボキシ、低級アルコキシカルボニル、低級アルキルスルホニル、または置換基を有していてもよいアリールスルホニルを表す}で表される化合物またはその塩。

(36) R^{2D}およびR^{3D}が、同一または異なって、それぞれカルボキシ、置換基を有していてもよいアラルキルオキシカルボニル、低級アルコキシカルボニル、低級アルケニルオキシカルボニルまたは低級アルキニルオキシカルボニルである(35)に記載の化合物またはその塩。

(37) R^{2D}およびR^{3D}が、同一または異なって、それぞれシアノ、ニトロ、低級アルカノイルまたは低級アルキルスルホニルである(35)に記載の化合物またはその塩。

(38) 式(VI)

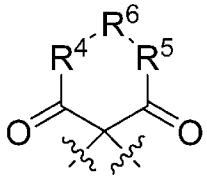
[化19]



(VI)

{式中、R^2およびR^3は、同一または異なって、それぞれ電子吸引基を表すか、R^2、R^3および隣接する炭素原子が一緒になって、式(II)

[化20]

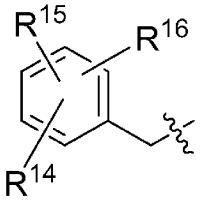


(II)

[式中、R^4およびR^5は、同一または異なって、それぞれ酸素原子、CH_2またはNR^7(式中、R^7は、水素原子または低級アルキルを表す)を表し、R^6は、結合またはCR^8R^9(式中、R^8およびR^9は、同一または異なって、それぞれ水素原子または低級アルキルを表す)を表す] を表し、R^{13}は低級アルキルチオまたは

式(V)

[化21]



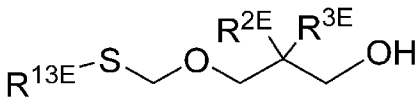
(V)

[式中、R^{14}、R^{15}およびR^{16}は、同一または異なって、それぞれ、水素原子、低級アルキル、低級アルコキシ、または$NR^{17}R^{18}$(式中、R^{17}およびR^{18}は、同一または

異なって、それぞれ低級アルキルを表す)を表す]を表す}で表される化合物またはその塩。

(39) 式(VI-0)

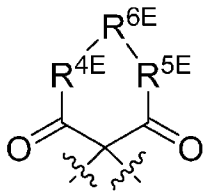
[化22]



(VI-0)

{式中、R^{2E}およびR^{3E}は、同一または異なって、それぞれ電子吸引基を表すか、R^{2E}、R^{3E}および隣接する炭素原子が一緒になって、式(II-4)

[化23]

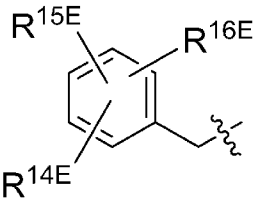


(II-4)

[式中、R^{4E}およびR^{5E}は、同一または異なって、それぞれ酸素原子、CH_2またはNR^{7E}(式中、R^{7E}は、水素原子または低級アルキルを表す)を表し、R^{6E}は、結合または$CR^{8E}R^{9E}$(式中、R^{8E}およびR^{9E}は、同一または異なって、それぞれ水素原子または低級アルキルを表す)を表す]を表し、R^{13E}は置換基を有していてもよい低級アルキルチオ、置換基を有していてもよい低級アルケニルチオ、置換基を有していてもよい低級アルキニルチオまたは

式(V-2)

[化24]



(V-2)

[式中、R^{14E}、R^{15E}およびR^{16E}は、同一または異なって、それぞれ、水素原子、低級アルキル、低級アルコキシ、または$NR^{17E}R^{18E}$(式中、R^{17E}およびR^{18E}は、同一または異なって、それぞれ低級アルキルを表す)を表す]を表す}で表される化合物またはその塩。

(40) R^{2E}およびR^{3E}が、同一または異なって、それぞれ、カルボキシ、置換基を有していてもよいアラルキルオキシカルボニル、低級アルコキシカルボニル、低級アルケニルオキシカルボニルまたは低級アルキニルオキシカルボニルである(39)に記載の化合物またはその塩。

(41) R^{2E}およびR^{3E}が、同一または異なって、それぞれ、シアノ、ニトロ、低級アルカノイルまたは低級アルキルスルホニルである(39)に記載の化合物またはその塩。

発明の効果

[0012] 本発明により、オリゴヌクレオチドのリン酸基の1つ以上が修飾されているオリゴヌクレオチド誘導体等が提供される。

図面の簡単な説明

[0013] [図1]図1は、HepG2細胞中でのヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ1(HPRT1)標的siRNA(1-fU)、siRNA(3-Y)およびsiRNA(4-Z)によるノックダウン活性を示す。図1の横軸は、siRNA(1-fU)、siRNA(3-Y)およびsiRNA(4-Z)をそれぞれ300 pmol/L、94.9 pmol/L、30 pmol/Lおよび9.49 pmol/Lの濃度においてトランスフェクション試薬を用いて培養細胞への導入を行った試験結果を示し、ntはsiRNA未導入群（陰性対照群)での試験結果を示す。縦軸は、siRNA未導入群(陰性対照群)のHPRT1のmRNA量を1としたときの上記各siRNA導入検体のHPRT1のmRNA量の相対的な割合を平均±標準偏差で示したものである。siRNA(1-fU)は陽性対照群であり、一方、siRNA(3-Y)は、陰性対照群として用いている。

[図2]図2は、HeLa細胞中でのHPRT1 標的siRNA(1-fU)、siRNA(3-Y)およびsiRNA(4-Z)によるノックダウン活性を示す。図2の横軸は、siRNA(1-fU)、siRNA(3-Y)およびsiRNA(4-Z)をそれぞれ300 pmol/L、94.9 pmol/L、30 pmol/Lおよび9.49 pmol/Lの濃度においてトランスフェクション試薬を用いて培養細胞への導入を行った試験結果を示し、ntはsiRNA未導入群（陰性対照群)での試験結果を示す。縦軸は、siRNA未導入群(陰性対照群)のHPRT1のmRNA量を1としたときの上記各siRNA導入検体のHPRT1のmRNA量の相対的な割合を平均±標準偏差

で示したものである。siRNA(1-fU)は陽性対照群である一方、siRNA(3-Y)は、陰性対照群として用いている。

[図3]図3は、HeLa細胞中でのHPRT1標的コレステロール修飾siRNA(6-fU)およびsiRNA(5-Y)によるノックダウン活性を示す。図3の横軸は、siRNA(6-fU)およびsiRNA(5-Y)をそれぞれ1000 nmol/L、316 nmol/L、100 nmol/L、31.6 nmol/L、10 nmol/Lおよび3.16 nmol/Lの濃度において培養細胞への導入を行った試験結果を示す。縦軸は、siRNA未導入群(陰性対照群)のHPRT1のmRNA量を1としたときの上記各siRNA導入検体のHPRT1のmRNA量の相対的な割合を平均±標準偏差で示したものである。siRNA(6-fU)は陽性対照群であり、一方、siRNA(5-Y)は陰性対照群として用いている。

[図4]図4は、THP-1細胞中でのCD45標的ASOであるCD45 ABC、CD45 x2POおよびCD45 x2ICによるノックダウン活性を示す。図4の横軸は、CD45 ABC、CD45 x2POおよびCD45 x2ICをそれぞれ94.9 nmol/L、30.0 nmol/L、9.49 nmol/L、3.00 nmol/Lおよび0.95 nmol/Lの濃度において培養細胞への導入を行った試験結果を示し、ntはASO未導入群（陰性対照群)での試験結果を示す。縦軸は、ACTBのmRNA増幅量(nt)を1としたときの上記各ASO導入検体のCD45のmRNA量の相対的な割合を平均±標準偏差で示したものである。

[図5]図5は、HepG2細胞中でのFGFR4標的ASOであるFGFR4 PS(黒)、FGFR PO(灰色)およびFGFR4 IC（白)によるノックダウン活性を示す。図5の横軸は、FGFR4 PS、FGFR POおよびFGFR4 ICをそれぞれ30.0 nmol/L、9.49 nmol/L、3.00 nmol/Lおよび0.95 nmol/Lの濃度において培養細胞への導入を行った試験結果を示す。縦軸は、ACTBのmRNA増幅量を1としたときの上記各ASO導入検体のFGFR4のmRNA量の相対的な割合を平均±標準偏差で示したものである。

[図6]図6は、HuH-7細胞中でのFGFR4標的ASOであるFGFR4 PS(黒)、FGFR PO(灰色)およびFGFR4 IC（白)によるノックダウン活性を示す。図6の横軸は、FGFR4 PS、FGFR POおよびFGFR4 ICをそれぞれ30.0 nmol/L、9.49 nmol/L、3.00 nmol/Lおよび0.95 nmol/Lの濃度において培養細胞への導入を行った試験結果を示す。縦軸は、ACTBのmRNA増幅量を1としたときの上記各ASO導入検体のFGF

R4のmRNA量の相対的な割合を平均±標準偏差で示したものである。

[図7]図7は、HeLa細胞中でのPhosphatase and Tensin Homolog Deleted from Chromosome 10 (PTEN)標的ASOであるKON708(黒), wt KON708(濃灰色)、KON715(薄灰色)およびwt KON715(白)によるノックダウン活性を示す。図7の横軸は、KON708, wt KON708、KON715およびwt KON715をそれぞれ300 nmol/L、94.9 nmol/L、30.0 nmol/Lおよび9.49 nmol/Lの濃度において培養細胞への導入を行った試験結果を示す。縦軸は、ACTBのmRNA増幅量を1としたときの上記各ASO導入検体のPTENのmRNA量の相対的な割合を平均±標準偏差で示したものである。

[図8]図8は、HeLa細胞、HuH-7細胞およびHepG2細胞中でのHPRT1標的siRNAであるCtrl(5', 3' dT)、KON788およびKON789によるノックダウン活性を示す。図8の横軸は、Ctrl(5', 3' dT)、KON788およびKON789をそれぞれ1000 pmol/L、316 pmol/L、100 pmol/L、31.6 pmol/L、10 pmol/Lおよび3.16 pmol/Lの濃度において培養細胞への導入を行った試験結果を示し、ntはsiRNA未導入群（陰性対照群)での試験結果を示す。縦軸は、siRNA未導入群(陰性対照群：nt)のHPRT1のmRNA量を1としたときの上記各siRNA導入検体のHPRT1のmRNA量の相対的な割合を平均±標準偏差で示したものである。Ctrl(5', 3' dT)は陽性対照群であり、一方、KON788はsiRNA導入群でかつ陰性対照群として用いている。

[図9]図9は、HeLa細胞、HuH-7細胞およびHepG2細胞中でのHPRT1標的siRNAであるCtrl(5', 3' dT)、KON789、KON816およびKON788によるノックダウン活性を示す。図9の横軸は、Ctrl(5', 3' dT)、KON789、KON816およびKON788をそれぞれ300 pmol/L、94.9 pmol/L、30 pmol/Lおよび9.49 pmol/Lの濃度において培養細胞への導入を行った試験結果を示し、ntはsiRNA未導入群（陰性対照群)での試験結果を示す。縦軸は、siRNA未導入群(陰性対照群：nt)のHPRT1のmRNA量を1としたときの上記各siRNA導入検体のHPRT1のmRNA量の相対的な割合を平均±標準偏差で示したものである。Ctrl(5', 3' dT)は陽性対照群であり、一方、KON788はsiRNA導入群でかつ陰性対照群として用いている。

[図10]図10は、HeLa細胞、HuH-7細胞およびHepG2細胞中でのHPRT1標的siRNAであるCtrl(5', 3' dT)、KON816、KON818およびKON788によるノックダウン活性を示す。図10の横軸は、Ctrl(5', 3' dT)、KON816、KON818およびKON788をそれぞれ300 pmol/L、94.9 pmol/L、30 pmol/Lおよび9.49 pmol/Lの濃度において培養細胞への導入を行った試験結果を示し、ntはsiRNA未導入群（陰性対照群)での試験結果を示す。縦軸は、siRNA未導入群(陰性対照群：nt)のHPRT1のmRNA量を1としたときの上記各siRNA導入検体のHPRT1のmRNA量の相対的な割合を平均±標準偏差で示したものである。Ctrl(5', 3' dT)は陽性対照群であり、一方、KON788はsiRNA導入群でかつ陰性対照群として用いている。

[図11]図11は、HeLa細胞中でのHPRT1標的siRNAであるCtrl(5', 3' dT)、KON818、KON788、KON857、KON840およびKON846によるノックダウン活性を示す。図11の横軸は、Ctrl(5', 3' dT)、KON818、KON788、KON857、KON840およびKON846をそれぞれ1000 pmol/L、316 pmol/L、100 pmol/L、31.6 pmol/L、10 pmol/Lおよび3.16 pmol/Lの濃度において培養細胞への導入を行った試験結果を示し、ntはsiRNA未導入群（陰性対照群)での試験結果を示す。縦軸は、siRNA未導入群(陰性対照群：nt)のHPRT1のmRNA量を1としたときの上記各siRNA導入検体のHPRT1のmRNA量の相対的な割合を平均±標準偏差で示したものである。Ctrl(5', 3' dT)は陽性対照群であり、一方、KON788はsiRNA導入群でかつ陰性対照群として用いている。

[図12]図12は、HuH-7細胞中でのHPRT1標的siRNAであるCtrl(5', 3' dT)、KON818、KON788、KON857、KON840およびKON846によるノックダウン活性を示す。図12の横軸は、Ctrl(5', 3' dT)、KON818、KON788、KON857、KON840およびKON846をそれぞれ1000 pmol/L、316 pmol/L、100 pmol/L、31.6 pmol/L、10 pmol/Lおよび3.16 pmol/Lの濃度において培養細胞への導入を行った試験結果を示し、ntはsiRNA未導入群（陰性対照群)での試験結果を示す。縦軸は、siRNA未導入群(陰性対照群：nt)のHPRT1のmRNA量を1としたときの上記各siRNA導入検体のHPRT1のmRNA量の相対的な割合を平均±標準偏差で示したものである。Ctrl(5', 3' dT)は陽性対照群であり、一方、KON788はsiRNA導入群でかつ陰

性対照群として用いている。

[図13]図13は、HepG2細胞中でのHPRT1標的siRNAであるCtrl(5', 3' dT)、KON818、KON788、KON857、KON840およびKON846によるノックダウン活性を示す。図13の横軸は、Ctrl(5', 3' dT)、KON818、KON788、KON857、KON840およびKON846をそれぞれ1000 pmol/L、316 pmol/L、100 pmol/L、31.6 pmol/L、10 pmol/Lおよび3.16 pmol/Lの濃度において培養細胞への導入を行った試験結果を示し、ntはsiRNA未導入群（陰性対照群)での試験結果を示す。縦軸は、siRNA未導入群(陰性対照群：nt)のHPRT1のmRNA量を1としたときの上記各siRNA導入検体のHPRT1のmRNA量の相対的な割合を平均±標準偏差で示したものである。Ctrl(5', 3' dT)は陽性対照群であり、一方、KON788はsiRNA導入群でかつ陰性対照群として用いている。

[図14]図14は、HeLa細胞中でのHPRT1標的siRNAであるCtrl(5'-F)、KON880、KON881、KON882、KON883およびKON884によるノックダウン活性を示す。図14の横軸は、Ctrl(5'-F)、KON880、KON881、KON882、KON883およびKON884をそれぞれ1000 pmol/L、316 pmol/L、100 pmol/L、31.6 pmol/L、10 pmol/Lおよび3.16 pmol/Lの濃度において培養細胞への導入を行った試験結果を示し、ntはsiRNA未導入群（陰性対照群)での試験結果を示す。縦軸は、siRNA未導入群(陰性対照群：nt)のHPRT1のmRNA量を1としたときの上記各siRNA導入検体のHPRT1のmRNA量の相対的な割合を平均±標準偏差で示したものである。Ctrl(5'-F)は陽性対照群として用いている。

[図15]図15は、HuH-7細胞中でのHPRT1標的siRNAであるCtrl(5'-F)、KON880、KON881、KON882、KON883およびKON884によるノックダウン活性を示す。図15の横軸は、Ctrl(5'-F)、KON880、KON881、KON882、KON883およびKON884をそれぞれ1000 pmol/L、316 pmol/L、100 pmol/L、31.6 pmol/L、10 pmol/Lおよび3.16 pmol/Lの濃度において培養細胞への導入を行った試験結果を示し、ntはsiRNA未導入群（陰性対照群)での試験結果を示す。縦軸は、siRNA未導入群(陰性対照群：nt)のHPRT1のmRNA量を1としたときの上記各siRNA導入検体のHPRT1のmRNA量の相対的な割合を平均±標準偏差で示したものである。Ctrl(5'-

F)は陽性対照群として用いている。

[図16]図16は、HepG2細胞中でのHPRT1標的siRNAであるCtrl(5'-F)、KON880、KON881、KON882、KON883およびKON884によるノックダウン活性を示す。図16の横軸は、Ctrl(5'-F)、KON880、KON881、KON882、KON883およびKON884をそれぞれ1000 pmol/L、316 pmol/L、100 pmol/L、31.6 pmol/L、10 pmol/Lおよび3.16 pmol/Lの濃度において培養細胞への導入を行った試験結果を示し、ntはsiRNA未導入群（陰性対照群)での試験結果を示す。縦軸は、siRNA未導入群(陰性対照群：nt)のHPRT1のmRNA量を1としたときの上記各siRNA導入検体のHPRT1のmRNA量の相対的な割合を平均±標準偏差で示したものである。Ctrl(5'-F)は陽性対照群として用いている。

[図17]図17は、HeLa細胞中でのHPRT1標的siRNAであるCtrl(5'-F)、KON846、KON891、KON892、KON903およびKON905によるノックダウン活性を示す。図17の横軸は、Ctrl(5'-F)、KON846、KON891、KON892、KON903およびKON905をそれぞれ1000 pmol/L、316 pmol/L、100 pmol/L、31.6 pmol/L、10 pmol/Lおよび3.16 pmol/Lの濃度において培養細胞への導入を行った試験結果を示し、ntはsiRNA未導入群（陰性対照群)での試験結果を示す。縦軸は、siRNA未導入群(陰性対照群：nt)のHPRT1のmRNA量を1としたときの上記各siRNA導入検体のHPRT1のmRNA量の相対的な割合を平均±標準偏差で示したものである。Ctrl(5'-F)は陽性対照群として用いている。

[図18]図18は、HuH-7細胞中でのHPRT1標的siRNAであるCtrl(5'-F)、KON846、KON891、KON892、KON903およびKON905によるノックダウン活性を示す。図18の横軸は、Ctrl(5'-F)、KON846、KON891、KON892、KON903およびKON905をそれぞれ1000 pmol/L、316 pmol/L、100 pmol/L、31.6 pmol/L、10 pmol/Lおよび3.16 pmol/Lの濃度において培養細胞への導入を行った試験結果を示し、ntはsiRNA未導入群（陰性対照群)での試験結果を示す。縦軸は、siRNA未導入群(陰性対照群：nt)のHPRT1のmRNA量を1としたときの上記各siRNA導入検体のHPRT1のmRNA量の相対的な割合を平均±標準偏差で示したものである。Ctrl(5'-F)は陽性対照群として用いている。

[図19]図19は、HepG2細胞中でのHPRT1標的siRNAであるCtrl(5'-F)、KON846、KON891、KON892、KON903およびKON905によるノックダウン活性を示す。図19の横軸は、Ctrl(5'-F)、KON846、KON891、KON892、KON903およびKON905をそれぞれ1000 pmol/L、316 pmol/L、100 pmol/L、31.6 pmol/L、10 pmol/Lおよび3.16 pmol/Lの濃度において培養細胞への導入を行った試験結果を示し、ntはsiRNA未導入群（陰性対照群)での試験結果を示す。縦軸は、siRNA未導入群(陰性対照群：nt)のHPRT1のmRNA量を1としたときの上記各siRNA導入検体のHPRT1のmRNA量の相対的な割合を平均±標準偏差で示したものである。Ctrl(5'-F)は陽性対照群として用いている。

[図20]図20は、HeLa細胞中でのHPRT1標的siRNAであるCtrl(5', 3' dT)、KON922、KON923およびKON788によるノックダウン活性を示す。図20の横軸は、Ctrl(5', 3' dT)、KON922、KON923およびKON788をそれぞれ1000 pmol/L、316 pmol/L、100 pmol/Lおよび31.6 pmol/Lの濃度において培養細胞への導入を行った試験結果を示し、ntはsiRNA未導入群（陰性対照群)での試験結果を示す。縦軸は、siRNA未導入群(陰性対照群：nt)のHPRT1のmRNA量を1としたときの上記各siRNA導入検体のHPRT1のmRNA量の相対的な割合を平均±標準偏差で示したものである。Ctrl(5', 3' dT)は陽性対照群であり、一方、KON788はsiRNA導入群でかつ陰性対照群として用いている。

[図21]図21は、HuH-7細胞中でのHPRT1標的siRNAであるCtrl(5', 3' dT)、KON922、KON923およびKON788によるノックダウン活性を示す。図21の横軸は、Ctrl(5', 3' dT)、KON922、KON923およびKON788をそれぞれ1000 pmol/L、316 pmol/L、100 pmol/Lおよび31.6 pmol/Lの濃度において培養細胞への導入を行った試験結果を示し、ntはsiRNA未導入群（陰性対照群)での試験結果を示す。縦軸は、siRNA未導入群(陰性対照群：nt)のHPRT1のmRNA量を1としたときの上記各siRNA導入検体のHPRT1のmRNA量の相対的な割合を平均±標準偏差で示したものである。Ctrl(5', 3' dT)は陽性対照群であり、一方、KON788はsiRNA導入群でかつ陰性対照群として用いている。

[図22]図22は、HepG2細胞中でのHPRT1標的siRNAであるCtrl(5', 3' dT)、KON

922、KON923およびKON788によるノックダウン活性を示す。図22の横軸は、Ctrl(5', 3' dT)、KON922、KON923およびKON788をそれぞれ1000 pmol/L、316 pmol/L、100 pmol/Lおよび31.6 pmol/Lの濃度において培養細胞への導入を行った試験結果を示し、ntはsiRNA未導入群（陰性対照群)での試験結果を示す。縦軸は、siRNA未導入群(陰性対照群：nt)のHPRT1のmRNA量を1としたときの上記各siRNA導入検体のHPRT1のmRNA量の相対的な割合を平均±標準偏差で示したものである。Ctrl(5', 3' dT)は陽性対照群であり、一方、KON788はsiRNA導入群でかつ陰性対照群として用いている。

[図23]図23は、HepG2細胞中でのアポリポタンパク質B（ApoB）標的siRNAであるwt924、KON924、wt925、KON925、wt926およびKON926によるノックダウン活性を示す。図23の横軸は、wt924、KON924、wt925、KON925、wt926およびKON926をそれぞれ1000 pmol/L、316 pmol/L、100 pmol/L、31.6 pmol/L、10 pmol/Lおよび3.16 pmol/Lの濃度において培養細胞への導入を行った試験結果を示し、ntはsiRNA未導入群（陰性対照群)での試験結果を示す。縦軸は、siRNA未導入群(陰性対照群：nt)のApoBのmRNA量を1としたときの上記各siRNA導入検体のApoBのmRNA量の相対的な割合を平均±標準偏差で示したものである。

[図24]図24は、HuH-7細胞中でのApoB標的siRNAであるwt924、KON924、wt925、KON925、wt926およびKON926によるノックダウン活性を示す。図24の横軸は、wt924、KON924、wt925、KON925、wt926およびKON926をそれぞれ1000 pmol/L、316 pmol/L、100 pmol/L、31.6 pmol/L、10 pmol/Lおよび3.16 pmol/Lの濃度において培養細胞への導入を行った試験結果を示し、ntはsiRNA未導入群（陰性対照群)での試験結果を示す。縦軸は、siRNA未導入群(陰性対照群：nt)のApoBのmRNA量を1としたときの上記各siRNA導入検体のApoBのmRNA量の相対的な割合を平均±標準偏差で示したものである。

[図25]図25は、ルシフェラーゼ発現ベクターを導入したルシフェラーゼ発現ヒーラ細胞(HeLa-Luc)中でのルシフェラーゼを標的とするsiRNAであるwt927、KON927, wt928、KON928、wt929およびKON929によるノックダウン活性を示す。図25の横軸は、wt927、KON927, wt928、KON928、wt929およびKON929をそ

れぞれ1000 pmol/L、316 pmol/L、100 pmol/L、31.6 pmol/L、10 pmol/Lおよび3.16 pmol/Lの濃度において培養細胞への導入を行った試験結果を示し、ntはsiRNA未導入群（陰性対照群)での試験結果を示す。縦軸は、siRNA未導入群(陰性対照群：nt）における発光量(cps)を1としたときの上記各siRNA導入検体の発光量(cps)の相対的な割合を平均±標準偏差で示したものである。

[図26]図26は、HeLa細胞中でのGAPDH標的siRNAであるwt930、KON930、wt931、KON931、wt932およびKON932によるノックダウン活性を示す。図26の横軸は、wt930、KON930、wt931、KON931、wt932およびKON932をそれぞれ1000 pmol/L、316 pmol/L、100 pmol/L、31.6 pmol/L、10 pmol/Lおよび3.16 pmol/Lの濃度において培養細胞への導入を行った試験結果を示し、ntはsiRNA未導入群（陰性対照群)での試験結果を示す。縦軸は、siRNA未導入群(陰性対照群：nt)のGAPDHのmRNA量を1としたときの上記各siRNA導入検体のGAPDHのmRNA量の相対的な割合を平均±標準偏差で示したものである。

[図27]図27は、HuH-7細胞中でのGAPDH標的siRNAであるwt930、KON930、wt931、KON931、wt932およびKON932によるノックダウン活性を示す。図27の横軸は、wt930、KON930、wt931、KON931、wt932およびKON932をそれぞれ1000 pmol/L、316 pmol/L、100 pmol/L、31.6 pmol/L、10 pmol/Lおよび3.16 pmol/Lの濃度において培養細胞への導入を行った試験結果を示し、ntはsiRNA未導入群（陰性対照群)での試験結果を示す。縦軸は、siRNA未導入群(陰性対照群：nt)のGAPDHのmRNA量を1としたときの上記各siRNA導入検体のGAPDHのmRNA量の相対的な割合を平均±標準偏差で示したものである。

[図28]図28は、HepG2細胞中でのGAPDH標的siRNAであるwt930、KON930、wt931、KON931、wt932およびKON932によるノックダウン活性を示す。図28の横軸は、wt930、KON930、wt931、KON931、wt932およびKON932をそれぞれ1000 pmol/L、316 pmol/L、100 pmol/L、31.6 pmol/L、10 pmol/Lおよび3.16 pmol/Lの濃度において培養細胞への導入を行った試験結果を示し、ntはsiRNA未導入群（陰性対照群)での試験結果を示す。縦軸は、siRNA未導入群(陰性対照群：nt)のGAPDHのmRNA量を1としたときの上記各siRNA導入検体のGAPDHのmRNA量の相

対的な割合を平均±標準偏差で示したものである。

発明を実施するための形態

[0014] 以下、オリゴヌクレオチドの少なくとも1つのリン酸基の酸素原子上に式(I)または式(I-0)で表される基を有するオリゴヌクレオチド誘導体をそれぞれ化合物(I)および化合物(I-0)といい、式(III)、式(III-0)または式(III-1)で表される構造を1つ以上含有するオリゴヌクレオチド誘導体をそれぞれ化合物(III)、化合物(III-0)および化合物(III-1)といい、式(IV)、式(IV-0)、式(IV-1)、式(V)、式(V-0)、式(V-1)、式(V-2)、式(VI)および式(VI-0)で表される化合物を、それぞれ化合物(IV)、化合物(IV-0)、化合物(IV-1)、化合物(V)、化合物(V-0)、化合物(V-1)、化合物(V-2)、化合物(VI)および化合物(VI-0)という。

[0015] 本明細書における各基の定義は以下のとおりである、

(i)低級アルキル、ならびに低級アルコキシ、低級アルコキシカルボニル、低級アルキルスルホニルおよび低級アルキルチオにおける低級アルキル部分としては、例えば直鎖状または分枝鎖状の炭素数1～12のアルキルが挙げられる。具体的には、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル、ノニル、デシル、ウンデシル、ドデシル等が挙げられる。

[0016] (ii)低級アルカノイルとしては、例えば直鎖または分枝鎖状の炭素数1～12のアルカノイルが挙げられる。具体的には、ホルミル、アセチル、プロピオニル、ブチリル、イソブチリル、バレリル、イソバレリル、ピバロイル、ヘキサノイル、ヘプタノイル、オクタノイル、ノナノイル、デカノイル、ウンデカノイル、ドデカノイル等が挙げられる。

[0017] (iii)低級アルケニル、ならびに低級アルケニルオキシカルボニルおよび低級アルケニルチオにおける低級アルケニル部分としては、例えば直鎖状または分枝鎖状の炭素数2～12のアルケニルが挙げられる。具体的には、ビニル、アリル、1-プロペニル、ブテニル、ペンテニル、ヘキセニル、ヘプテニル、

オクテニル、ノネニル、デセニル、ウンデセニル、ドデセニル等が挙げられる。

[0018] (iv)低級アルキニル、ならびに低級アルキニルオキシカルボニルおよび低級アルキニルチオにおける低級アルキニル部分としては、例えば直鎖状または分枝鎖状の炭素数2～12のアルキニルが挙げられる。具体的には、エチニル、1-プロピニル、プロパルギル、ブチニル、ペンチニル、ヘキシニル、ヘプチニル、オクチニル、ノニニル、デシニル、ウンデシニル、ドデシニル等が挙げられる。

[0019] (v)アラルキルオキシカルボニルにおけるアラルキル部分としては、例えば炭素数7～16のアラルキルがあげられ、より具体的にはベンジル、フェネチル、フェニルプロピル、フェニルブチル、フェニルペンチル、フェニルヘキシル、フェニルヘプチル、フェニルオクチル、フェニルノニル、フェニルデシル、ナフチルメチル、ナフチルエチル、ナフチルプロピル、ナフチルブチル、ナフチルペンチル、ナフチルヘキシル、アントリルメチル、アントリルエチルなどがあげられる。

[0020] (vi)アリールスルホニルにおけるアリール部分としては、例えば炭素数6～14のアリールがあげられ、より具体的にはフェニル、ナフチル、アズレニル、アントリルなどがあげられる。

[0021] (vii)電子吸引基としては、例えば、カルボキシ、シアノ、ニトロ、低級アルカノイル、低級アルコキシカルボニル、カルバモイル、低級アルキルカルバモイル、ジ低級アルキルカルバモイル、低級アルキルスルフィニル、低級アルキルスルホニル、スルファモイル、低級アルキルスルファモイル、ジ低級アルキルスルファモイル等が挙げられる。

[0022] (viii)水酸基の保護基としては、例えば、トリチル、4-メトキシトリチル、4,4’-ジメトキシトリチル等が挙げられる。

[0023] 電子吸引基として示した、低級アルカノイルおよび低級アルコキシカルボニルは、それぞれ前記(ii)低級アルカノイル、(i)低級アルコキシカルボニルと同義であり、低級アルキルカルバモイル、ジ低級アルキルカルバモイル、

低級アルキルスルフィニル、低級アルキルスルホニル、低級アルキルスルファモイル、およびジ低級アルキルスルファモイルにおける低級アルキル部分としては、例えば前記(i)低級アルキルの例示で挙げた基が例示される。ジ低級アルキルカルバモイルおよびジ低級アルキルスルファモイルにおける2つの低級アルキル部分は、それぞれ同一でも異なっていてもよい。

[0024] 置換基を有していてもよい低級アルキル、置換基を有していてもよい低級アルケニル、置換基を有していてもよい低級アルキニル、置換基を有していてもよい低級アルキルチオ、置換基を有していてもよい低級アルケニルチオおよび置換基を有していてもよい低級アルキニルチオにおける置換基としては、同一または異なって、それぞれ、例えば、置換数1～3の、ハロゲン、ヒドロキシ、スルファニル、ニトロ、シアノ、アジド、カルボキシ、カルバモイル、C_{3-10}シクロアルキル、C_{6-14}アリール、脂肪族複素環基、芳香族複素環基、置換基を有していてもよいC_{1-12}アルコキシ[置換基を有していてもよいC_{1-12}アルコキシにおける該置換基としては、同一または異なって、置換数1～3のそれぞれ、例えば、置換基を有していてもよいC_{6-14}アリール(置換基を有していてもよいC_{6-14}アリールにおける該置換基としては、例えば、C_{1-12}アルコキシ等が挙げられる)等が挙げられる]、C_{3-10}シクロアルコキシ、C_{6-14}アリールオキシ、C_{7-16}アラルキルオキシ、C_{1-12}アルカノイルオキシ、C_{7-15}アロイルオキシ、C_{1-12}アルキルスルファニル、$-NR^XR^Y$(式中、R^XおよびR^Yは同一または異なって、それぞれ水素原子、C_{1-12}アルキル、C_{3-10}シクロアルキル、C_{6-14}アリール、芳香族複素環基、C_{7-16}アラルキル、C_{1-12}アルカノイル、C_{7-15}アロイル、C_{1-12}アルコキシカルボニルまたはC_{7-16}アラルキルオキシカルボニルを表す)、C_{1-12}アルカノイル、C_{7-15}アロイル、C_{1-12}アルコキシカルボニル、C_{6-14}アリールオキシカルボニル、C_{1-12}アルキルカルバモイルおよびジC_{1-12}アルキルカルバモイルからなる群から選ばれる置換基が挙げられる。

[0025] 置換基を有していてもよいアリールスルホニルおよび置換基を有していてもよいアラルキルオキシカルボニルにおける置換基としては、同一または異なって、それぞれ、例えば、置換数1～3の、ハロゲン、ヒドロキシ、スルフ

ァニル、ニトロ、シアノ、カルボキシ、カルバモイル、C_{1-12}アルキル、C_{2-12}アルケニル、C_{2-12}アルキニル、トリフルオロメチル、p-トルエンスルホニルオキシ、メタンスルホニルオキシ、トリフルオロメタンスルホニルオキシ、C_{3-10}シクロアルキル、C_{6-14}アリール、脂肪族複素環基、芳香族複素環基、C_{1-12}アルコキシ、C_{3-10}シクロアルコキシ、C_{6-14}アリールオキシ、C_{7-16}アラルキルオキシ、C_{1-12}アルカノイルオキシ、C_{7-15}アロイルオキシ、C_{1-12}アルキルスルファニル、$-NR^{Xa}R^{Ya}$(式中、R^{Xa}およびR^{Ya}は同一または異なって、それぞれ水素原子、C_{1-12}アルキル、C_{3-10}シクロアルキル、C_{6-14}アリール、芳香族複素環基、C_{7-16}アラルキル、C_{1-12}アルカノイル、C_{7-15}アロイル、C_{1-12}アルコキシカルボニルまたはC_{7-16}アラルキルオキシカルボニルを表す)、C_{1-12}アルカノイル、C_{7-15}アロイル、C_{1-12}アルコキシカルボニル、C_{6-14}アリールオキシカルボニル、C_{1-12}アルキルカルバモイルおよびジC_{1-12}アルキルカルバモイルからなる群から選ばれる置換基が挙げられる。

[0026] ここで示したC_{1-12}アルキルならびにC_{1-12}アルコキシ、C_{1-12}アルカノイルオキシ、C_{1-12}アルキルスルファニル、C_{1-12}アルコキシカルボニル、C_{1-12}アルキルカルバモイルおよびジC_{1-12}アルキルカルバモイルのC_{1-12}アルキル部分としては、例えば前記(i)低級アルキルの例示で挙げた基が例示される。ジC_{1-12}アルキルカルバモイルにおける2つのC_{1-12}アルキルは同一でも異なっていてもよい。

C_{2-12}アルケニルは、例えば前記(iii)低級アルケニルの例示で挙げた基が例示される。

C_{2-12}アルキニルは、例えば前記(iv)低級アルキニルの例示で挙げた基が例示される。

C_{1-12}アルカノイルは、例えば前記(ii)低級アルカノイルの例示で挙げた基が例示される。

[0027] C_{3-10}シクロアルキルおよびC_{3-10}シクロアルコキシのシクロアルキル部分としては、例えば炭素数3～10のシクロアルキルが挙げられ、より具体的にはシクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、シクロノニル、シクロデカニル等が挙げられる。

[0028] C_{6-14}アリールならびにC_{6-14}アリールオキシ、C_{7-15}アロイル、C_{7-15}アロイルオキシおよびC_{6-14}アリールオキシカルボニルのアリール部分としては、例えば前記(vi)アリールスルホニルにおけるアリール部分の例示で挙げた基が例示される。

[0029] C_{7-16}アラルキルオキシ、C_{7-16}アラルキルおよびC_{7-16}アラルキルオキシカルボニルのアリール部分としては、例えば前記(vi)アリールスルホニルにおけるアリール部分の例示で挙げた基が例示され、アルキル部分としては、例えばC_{1-12}のアルキレンが挙げられ、より具体的には前記(i)低級アルキルの例示であげた基から水素原子を１つ除いた基が挙げられる。

[0030] 脂肪族複素環基としては、例えば窒素原子、酸素原子および硫黄原子から選ばれる少なくとも1個の原子を含む5員または6員の単環性脂肪族複素環基、3～8員の環が縮合した二環または三環性で窒素原子、酸素原子および硫黄原子から選ばれる少なくとも1個の原子を含む縮環性脂肪族複素環基などが挙げられ、より具体的にはアジリジニル、アゼチジニル、ピロリジニル、ピペリジノ、ピペリジニル、アゼパニル、1,2,5,6-テトラヒドロピリジル、イミダゾリジニル、ピラゾリジニル、ピペラジニル、ホモピペラジニル、ピラゾリニル、オキシラニル、テトラヒドロフラニル、テトラヒドロ-2H-ピラニル、5,6-ジヒドロ-2H-ピラニル、オキサゾリジニル、モルホリノ、モルホリニル、チオキサゾリジニル、チオモルホリニル、2H-オキサゾリル、2H-チオキサゾリル、ジヒドロインドリル、ジヒドロイソインドリル、ジヒドロベンゾフラニル、ベンゾイミダゾリニル、ジヒドロベンゾオキサゾリル、ジヒドロベンゾチオキサゾリル、ベンゾジオキソリル、テトラヒドロキノリル、テトラヒドロイソキノリル、ジヒドロ-2H-クロマニル、ジヒドロ-1H-クロマニル、ジヒドロ-2H-チオクロマニル、ジヒドロ-1H-チオクロマニル、テトラヒドロキノキサリニル、テトラヒドロキナゾリニル、ベンゾジオキサニル等が挙げられる。

[0031] 芳香族複素環基としては、例えば窒素原子、酸素原子および硫黄原子から選ばれる少なくとも1個の原子を含む5員または6員の単環性芳香族複素環基、

3～8員の環が縮合した二環または三環性で窒素原子、酸素原子および硫黄原子から選ばれる少なくとも1個の原子を含む縮環性芳香族複素環基などがあげられ、より具体的にはフリル、チエニル、ピロリル、イミダゾリル、ピラゾリル、オキサゾリル、イソオキサゾリル、オキサジアゾリル、チアゾリル、イソチアゾリル、チアジアゾリル、トリアゾリル、テトラゾリル、ピリジル、ピリダジニル、ピリミジニル、ピラジニル、トリアジニル、ベンゾフラニル、ベンゾチオフェニル、ベンゾオキサゾリル、ベンゾチアゾリル、イソインドリル、インドリル、インダゾリル、ベンゾイミダゾリル、ベンゾトリアゾリル、オキサゾロピリミジニル、チアゾロピリミジニル、ピロロピリジニル、ピロロピリミジニル、イミダゾピリジニル、プリニル、キノリニル、イソキノリニル、シンノリニル、フタラジニル、キナゾリニル、キノキサリニル、ナフチリジニル等が挙げられる。

ハロゲンは、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素の各原子を意味する。

[0032] 本発明のオリゴヌクレオチド誘導体は、ヌクレオチド残基からなるポリマーまたはオリゴマーを意味する。

本発明のオリゴヌクレオチド誘導体は、1本鎖オリゴヌクレオチドおよび2本鎖オリゴヌクレオチドのいずれをも包含する。2本鎖オリゴヌクレオチドにあっては、それぞれのオリゴヌクレオチド鎖の塩基長が異なっていてもよい。また、2本鎖オリゴヌクレオチドにあっては、1つ以上のミスマッチ塩基対を含んでいてもよい。さらに、3本鎖以上のオリゴヌクレオチドによって形成される複合体も本発明のオリゴヌクレオチド誘導体に包含される。

[0033] 本発明のオリゴヌクレオチド誘導体は、例えば疾患に関与する蛋白質をコードする mRNAに対するノックダウン活性を有することが好ましい。ここで、本明細書における“ノックダウン活性を有する”とは、蛋白質等をコードする遺伝子(標的遺伝子)の発現を抑制することを意味する。

[0034] 2本鎖オリゴヌクレオチドとしては、例えば構造遺伝子等の2本鎖DNA、siRNA、miRNAを始めとする小分子RNA等の2本鎖RNA等が挙げられるが、本発明はこれらに限定されるものではない。

1本鎖オリゴヌクレオチドとしては、例えばアンチセンスオリゴヌクレオチド、microRNA、アプタマー、アンタゴマー、1本鎖RNAi剤(ヘアピン構造を有するsiRNA等)等が挙げられるが、本発明はこれらに限定されるものではない。

[0035] 本発明のオリゴヌクレオチド誘導体の長さは、好ましくは5～100塩基であり、10～80塩基がより好ましく、10～50塩基がさらに好ましく、20～50塩基が特に好ましく、20～30塩基が最も好ましい。

本発明のオリゴヌクレオチド誘導体は、少なくとも1つのリン酸基の酸素原子上に式(I)または式(I-0)で表される基を有することに加え、さらに1つ以上のヌクレオチド残基が修飾されていてもよい。該修飾は、核酸塩基、糖、リン酸のいずれの部位に含まれていてもよい。

[0036] 該核酸塩基としては、例えば、アデニン、グアニン、シトシン、チミン、ウラシル等が挙げられ、必要により1つ以上の保護基により保護されていてもよく、保護基が2つ以上の場合、それぞれの保護基は同一でも異なっていてもよい。該保護基としては、例えば、シトシンの4位アミノおよびアデニンの6位アミノに対するアリルオキシカルボニル、ベンゾイル、ベンジル、アセチル、フェノキシアセチル、tert-ブチルフェノキシアセチル、グアニンの2位アミノに対するイソブチリル、アリルオキシカルボニル、フェノキシアセチル、tert-ブチルフェノキシアセチル等が挙げられる。

[0037] 該修飾が核酸塩基の部位に含まれるヌクレオチドとしては、例えば、該核酸塩基を有するヌクレオチド、およびヌクレオチドの核酸塩基(該核酸塩基としては、例えば、アデニン、グアニン、シトシン、チミン、ウラシル等が挙げられる)の化学構造の一部あるいは全てが任意の原子で置換されたもの等が挙げられ、具体的には、例えば、核酸塩基内(該核酸塩基としては、例えば、アデニン、グアニン、シトシン、チミン、ウラシル等が挙げられる)の酸素原子が硫黄原子で置換されたもの、水素原子が炭素数1～10のアルキルで置換されたもの、メチルが水素原子もしくは炭素数2～10のアルキルで置換されたもの、アミノが炭素数1～10のアルキル、炭素数1～8のアルカノイル等の保護基

で保護されたもの等が挙げられる。

[0038] 該修飾が糖の部位に含まれるヌクレオチドとしては、ヌクレオチドの糖の化学構造の一部あるいは全てに対し、任意の置換基で修飾したもの、または任意の原子で置換したものであればいかなるものでもよく、例えば、リボース環の2'位の酸素原子と4'位の炭素原子がメチレンを介して架橋された2環性のリボ核酸を示すLNA(Locked Nucleic Acid：ロックド核酸)、2'-修飾ヌクレオチド等が挙げられ、2'-修飾ヌクレオチドが好ましく用いられる。

[0039] 2'-修飾ヌクレオチドとしては、例えばリボースの2'-OHが水素原子、-OR、-R、-SH、-SR、アミノ、-NHR、$-NR_2$、N_3(アジド)、シアノ、およびハロゲンからなる群(ここで、Rは低級アルキルまたはアリールであり、ハロゲンは、フッ素、塩素、臭素、およびヨウ素の各原子を意味し、低級アルキルおよびアリールはそれぞれ前記と同義であり、$-NR_2$の2つのRは、同一でも異なっていてもよい)から選択される置換基で置換された2'-修飾ヌクレオチドが挙げられる。具体的には、2'-OHが、フッ素原子、メトキシ、2-(メトキシ)エトキシ、3-アミノプロポキシ、2-[(N,N-ジメチルアミノ)オキシ]エトキシ、3-(N,N-ジメチルアミノ)プロポキシ、2-[2-(N,N-ジメチルアミノ)エトキシ]エトキシ、2-(メチルアミノ)-2-オキソエトキシ、2-(N-メチルカルバモイル)エトキシおよび2-シアノエトキシからなる群から選択される置換基で置換された2'-修飾ヌクレオチド等が挙げられる。

[0040] 該修飾がリン酸の部位に含まれるヌクレオチドとしては、オリゴヌクレオチドのリン酸ジエステル結合の化学構造の一部あるいは全てに対し、式(I)を除く任意の置換基で修飾したもの、または任意の原子で置換したものであればいかなるものでもよく、例えば、リン酸ジエステル結合がアルキルホスホネート結合に置換されたヌクレオチド、リン酸基中の酸素原子が一部または全部、硫黄原子で置換された構造のホスホロチオエートを有するヌクレオチド等が挙げられる。

[0041] 疾患に関与する蛋白質をコードするmRNAに対するノックダウン活性を有するオリゴヌクレオチド誘導体としては、例えば蛋白質等をコードする遺伝子(

標的遺伝子)のmRNAの一部の塩基配列に対して相補的な塩基配列を含み、かつ標的遺伝子の発現を抑制するオリゴヌクレオチド誘導体であれば、例えばsiRNA(short interference RNA)、miRNA(micro RNA)等の二本鎖オリゴヌクレオチド、shRNA (short hairpin RNA)、アンチセンス核酸、リボザイム等の一本鎖オリゴヌクレオチド等、いずれの核酸を用いてもよいが、2本鎖オリゴヌクレオチドが好ましい。

[0042] 標的遺伝子のmRNAの一部の塩基配列に対して相補的な塩基配列を含むオリゴヌクレオチド鎖をアンチセンス鎖といい、アンチセンス鎖の塩基配列に対して相補的な塩基配列を含むオリゴヌクレオチドをセンス鎖という。センス鎖は、標的遺伝子の一部の塩基配列からなるオリゴヌクレオチドそのもの等、アンチセンス鎖と対合して二重鎖形成部ができるオリゴヌクレオチドをいう。標的遺伝子のmRNAの一部の塩基配列に対して相補的な塩基配列を含む2本鎖オリゴヌクレオチドにおいて、オリゴヌクレオチドの5'末端とは、アンチセンス鎖の5'末端を指す。

[0043] 本発明のオリゴヌクレオチド誘導体において、アンチセンス鎖とセンス鎖が塩基と対合して形成している二重鎖形成部は、通常15～27塩基対であり、15～25塩基対が好ましく、15～23塩基対がより好ましく、15～21塩基対がさらに好ましく、15～19塩基対が特に好ましい。該二重鎖形成部は、アンチセンス鎖とセンス鎖のそれぞれの塩基が対向していればよく、塩基対を形成していても、ミスマッチであってもよいが、アンチセンス鎖の5'末端の塩基とそれに対となるセンス鎖の塩基は、アデニン-ウラシルの塩基対であるかミスマッチであることが好ましい。

[0044] 2本鎖オリゴヌクレオチドを構成するアンチセンス鎖、センス鎖のいずれか一方、または両方のオリゴヌクレオチドは、二重鎖形成部に続く3'側または5'側に二重鎖を形成しない追加のヌクレオチドを有してもよい。この二重鎖を形成しない部分を突出部(オーバーハング)ともいう。

突出部を有する2本鎖オリゴヌクレオチドとしては、例えば少なくとも一方の鎖の3'末端または5'末端に1～4個のヌクレオチド、通常は1～3個のヌク

レオチドからなる突出部を有するものが用いられるが、2個のヌクレオチドからなる突出部を有するものが好ましく用いられ、dTdTまたはUUからなる突出部を有するものがより好ましく用いられる。突出部は、アンチセンス鎖のみ、センス鎖のみ、およびアンチセンス鎖とセンス鎖の両方に有することができるが、アンチセンス鎖とセンス鎖の両方に突出部を有する二本鎖核酸が好ましく用いられる。

[0045] また、二重鎖形成部に続いて標的遺伝子のmRNAの塩基配列と一部または全てが一致する配列、または、二重鎖形成部に続いて標的遺伝子のmRNAの相補鎖の塩基配列と一部または全てが一致する配列を用いてもよい。さらに、2本鎖オリゴヌクレオチドとして、例えばダイサー(Dicer)等のリボヌクレアーゼの作用により前記の突出部を有する2本鎖オリゴヌクレオチドを生成する核酸分子(WO2005/089287)や、3’末端や5’末端の突出部を有していない2本鎖オリゴヌクレオチド等を用いることもできる。

[0046] また、前記の2本鎖オリゴヌクレオチドにおいて、好ましくはアンチセンス鎖の5’末端側から3’末端側に向って少なくとも2～17番目の塩基(ヌクレオシド)の配列が、標的遺伝子のmRNAの連続する16塩基の配列と相補的な塩基の配列であり、より好ましくは、該アンチセンス鎖は、5’末端側から3’末端側に向って2～19番目の塩基の配列が、標的遺伝子のmRNAの連続する18塩基の配列と相補的な塩基の配列であるか、2～21番目の塩基の配列が、標的遺伝子のmRNAの連続する20塩基の配列と相補的な塩基の配列であるか、2～25番目の塩基の配列が、標的遺伝子のmRNAの連続する24塩基の配列と相補的な塩基の配列である。

[0047] アンチセンス鎖の5’末端の塩基の配列は、標的遺伝子のmRNAの塩基の配列と相補的であってもミスマッチであっても構わない。

[0048] 化合物(I)、(III)、(I-0)、(III-0)、(III-1)、(IV)、(IV-0)、(IV-1)、(VI)および(VI-0)の塩としては、例えば酸付加塩、金属塩、アンモニウム塩、有機アミン付加塩、アミノ酸付加塩等が挙げられる。

酸付加塩としては、例えば塩酸塩、硫酸塩、リン酸塩等の無機酸塩、酢酸

塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、クエン酸塩、メタンスルホン酸塩等の有機酸塩が挙げられ、金属塩としては、例えばナトリウム塩、カリウム塩等のアルカリ金属塩、マグネシウム塩、カルシウム塩等のアルカリ土類金属塩、アルミニウム塩、亜鉛塩等が挙げられ、アンモニウム塩としては、例えばアンモニウム、テトラメチルアンモニウム等の塩が挙げられ、有機アミン付加塩としては、例えば、モルホリン、ピペリジン等の付加塩が挙げられ、アミノ酸付加塩としては、例えば、リジン、グリシン、フェニルアラニン等の付加塩が挙げられる。

[0049] 化合物(I)、(III)、(I-0)、(III-0)、(III-1)、(IV)、(IV-0)、(IV-1)、(VI)および(VI-0)の中には、幾何異性体、光学異性体等の立体異性体、互変異性体等が存在し得るものもあるが、これらを含め、全ての可能な異性体およびそれらの混合物が本発明に用いられる。

[0050] 化合物(I)、(III)、(I-0)、(III-0)、(III-1)、(IV)、(IV-0)、(IV-1)、(VI)および(VI-0)中の各原子の一部またはすべては、それぞれ対応する同位体原子で置き換わっていてもよく、本発明は、これら同位体原子で置き換わった化合物が本発明に用いられる。例えば、化合物(I)、(III)、(I-0)、(III-0)、(III-1)、(IV)、(IV-0)、(IV-1)、(VI)および(VI-0)中の水素原子の一部またはすべては、原子量2の水素原子(重水素原子)であってもよい。

[0051] 化合物(I)、(III)、(I-0)、(III-0)、(III-1)、(IV)、(IV-0)、(IV-1)、(VI)および(VI-0)中の各原子の一部またはすべてが、それぞれ対応する同位体原子で置き換わった化合物は、市販のビルディングブロックを用いて、上記各製造法と同様な方法で製造することができる。また、化合物(I)、(III)、(I-0)、(III-0)、(III-1)、(IV)、(IV-0)、(IV-1)、(VI)および(VI-0)中の水素原子の一部またはすべてが重水素原子で置き換わった化合物は、例えば、1)過酸化重水素を用い、塩基性条件下にカルボン酸などを重水素化する方法(米国特許第3849458号明細書参照)、2)イリジウム錯体を触媒として用い、重水を重水素源として用いてアルコール、カルボン酸などを重水素化する方法[ジャーナル・オブ・アメリカン・ケミカル・ソサイアティ(J. Am. Chem. Soc

.), Vol. 124, No. 10, 2092 (2002) 参照]、3)パラジウムカーボンを触媒として用い、重水素源として重水素ガスのみを用いて脂肪酸を重水素化する方法[リピッズ (LIPIDS) , Vol. 9, No. 11, 913(1974)参照]、4)白金、パラジウム、ロジウム、ルテニウム、イリジウムなどの金属を触媒として用い、重水または重水および重水素ガスを重水素源として用いてアクリル酸、アクリル酸メチル、メタクリル酸、メタクリル酸メチルなどを重水素化する方法(特公平5－19536号公報、特開昭61－277648号公報および特開昭61－275241号公報参照)、5)パラジウム、ニッケル、銅または亜クロム酸銅などの触媒を用い、重水を重水素源として用いて、アクリル酸、メタクリル酸メチルなどを重水素化する方法(特開昭63－198638号公報参照)等を用いて合成することもできる。

[0052] 化合物(I)、(III)、(I-0)、(III-0)、(III-1)、(IV)、(IV-0)、(IV-1)、(VI)および(VI-0)の塩を取得したいとき、化合物(I)、(III)、(I-0)、(III-0)、(III-1)、(IV)、(IV-0)、(IV-1)、(VI)および(VI-0)が塩の形で得られるときはそのまま精製すればよく、また、遊離の形で得られるときは、化合物(I)、(III)、(I-0)、(III-0)、(III-1)、(IV)、(IV-0)、(IV-1)、(VI)および(VI-0)を適当な溶媒に溶解または懸濁し、酸または塩基を加えることにより塩を形成させて単離、精製すればよい。

また、化合物(I)、(III)、(I-0)、(III-0)、(III-1)、(IV)、(IV-0)、(IV-1)、(VI)および(VI-0)は、水または各種溶媒との付加物の形で存在することもあるが、これらの付加物も本発明に用いられる。

[0053] 次に、本発明の化合物(I)、(III)、(I-0)、(III-0)、(III-1)、(IV)、(IV-0)、(IV-1)、(VI)および(VI-0)の製造法について説明する。

化合物(I)、(I-0)、(III)および(III-0)は、例えば以下の製造法によって製造することができる。

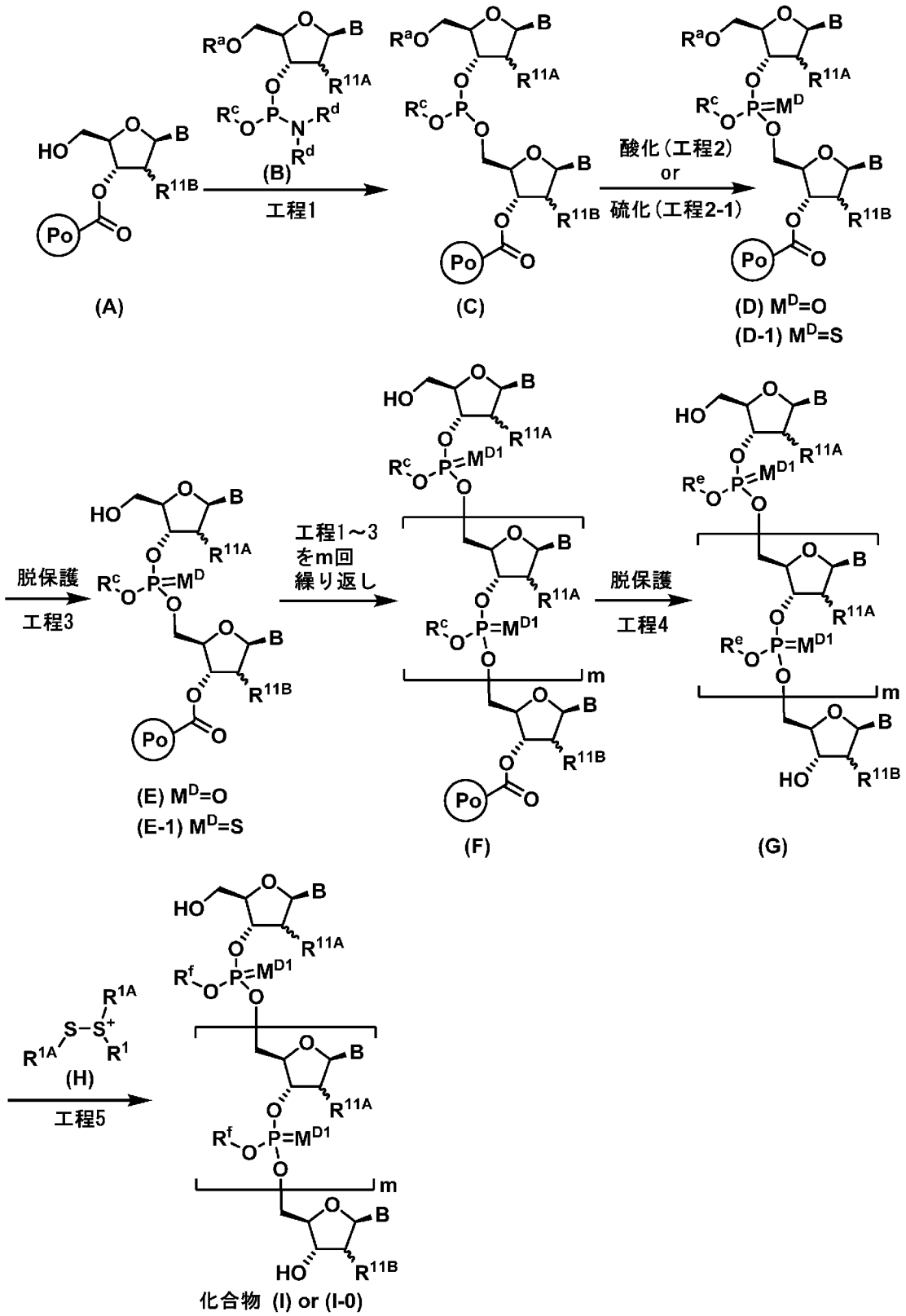
また、化合物(IV)および(IV-0)は、例えば、製造法2の化合物(B-1)または製造法4の化合物(B-2)として製造することができる。さらに化合物(IV-1)は、例えば、製造法5の化合物(B-3)として製造することができる。そして化合

物(VI)および(VI-0)は、例えば、製造法2の化合物(R)または製造法4の化合物(X)として製造することができる。

[0054] 製造法1

オリゴヌクレオチド誘導体の製造法

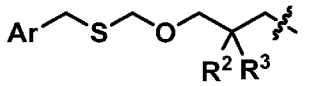
[化25]



{式中、mは例えば3～99の整数を表し、Poは例えばCPG(controlled pore glass)等の固相支持体を表しRaは例えばトリチル、4,4'-ジメトキシトリチル等

の酸処理により除去できる保護基を表し、R^1は、前記と同義であり、R^{1A}は低級アルキルを表し、R^cは、例えば2-シアノエチル等の塩基処理により除去できる保護基、式(C-1)

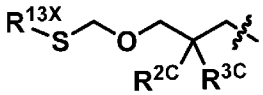
[化26]



(C-1)

（式中、Arは、低級アルキルで置換されたアリールまたは低級アルコキシで置換されたアリールを表し、R^2およびR^3は前記と同義である）または式(D-1)

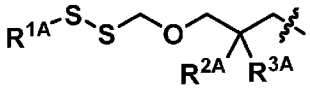
[化27]



(D-1)

(式中R^{2C}およびR^{3C}は前記と同義であり、R^{13X}は、置換基を有していてもよい低級アルキルチオ、置換基を有していてもよい低級アルケニルチオまたは置換基を有していてもよい低級アルキニルチオを表す)で表される置換基等を表し、R^dは低級アルキルを表し、R^eは、水素原子または式(C-1)で表される置換基［ただし、化合物(G)中のR^eに対応する化合物(F)中のR^cが、例えば2-シアノエチル等の塩基処理により除去できる保護基であるとき、R^eは水素原子を表し、化合物(G)中のR^eに対応する化合物(F)中の対応するR^cが式(C-1)で表される置換基であるとき、R^eは式(C-1)で表される置換基を表し、化合物(G)中のR^eに対応する化合物(F)中の対応するR^cが式(D-1)で表される置換基であるとき、R^eは式(D-1)で表される置換基を表す］を表し、R^fは、水素原子または式(I-1)

[化28]



(I-1)

（式中、R^{1A}、R^{2A}およびR^{3A}は前記と同義である）で表される置換基［ただし、化合物(I)中のR^fに対応する化合物(G)中のR^eが水素原子であるとき、R^fは水素原子を表し、化合物(I)中のR^fに対応する化合物(G)中のR^eが式(C-1)で表される置換基であるとき、R^fは式(I-1)で表される置換基を表す］を表し、Bは核酸塩基を表し、

R^{11A}は、水素原子、ヒドロキシ、フッ素原子、トリ低級アルキルシリルまたは低級アルコキシを表し［ただし、R^{11A}に隣接するリン酸基上のR^cおよびR^eが式(C-1)で表される置換基であるとき、またはR^{11A}に隣接するリン酸基上のR^fが式(I-1)で表される置換基であるときは、R^{11A}は、水素原子、フッ素原子、トリ低級アルキルシリルまたは低級アルコキシを表し、R^{11A}に隣接するリン酸基上のR^c、R^eまたはR^fが水素原子のときは、R^{11A}は、水素原子、ヒドロキシ、フッ素原子、トリ低級アルキルシリルまたは低級アルコキシを表す］、R^{11B}は、水素原子、ヒドロキシ、フッ素原子、トリ低級アルキルシリルまたは低級アルコキシを表し、

M^DおよびM^{D1}は、同一または異なって、それぞれ酸素原子または硫黄原子を表し、

化合物(F)、(G)および(I)中のmが2以上の場合、m＋1個のB、m＋1個のR^{11A}、m+1個のR^c、m+1個のR^e、m＋1個のM^{D1}およびm+1個のR^fは、それぞれ同一でも異なっていてもよく、各段階におけるR^aは同一でも異なっていてもよい。ここで、該低級アルキル、該アリール、該低級アルコキシおよび該核酸塩基は、それぞれ前記低級アルキル、前記アリール、前記低級アルコキシおよび前記核酸塩基と同義であり、該トリ低級アルキルシリルの3つの低級アルキルは、同一または異なって、それぞれ前記低級アルキルと同義である}

[0055] 工程1

化合物(C)は、化合物(A)を溶媒中、好ましくは5～1000当量の添加剤存在下、0 ℃と用いる溶媒の沸点との間の温度で、10秒間から30分間、好ましくは5～1000当量の化合物(B)と反応させることにより製造することができる。

溶媒としては、例えば、ジクロロメタン、アセトニトリル、トルエン、酢酸エチル、テトラヒドロフラン(THF)、1,4-ジオキサン、N,N-ジメチルホルムアミド(DMF)、N-メチルピロリドン(NMP)、水等が挙げられ、これらを単独でまたは混合して用いることができる。

添加剤としては、例えば、1H-テトラゾール、4,5-ジシアノイミダゾール、5-エチルチオテトラゾール、5-ベンジルチオテトラゾール等が挙げられる。

化合物(A)は、例えば市販品として得られる。

化合物(B)は、R^cが2-シアノエチル等の場合、市販品として得られ、R^cが式(C-1)で表される置換基の場合、下記製造法2の化合物(B-1)として得られる。

また、上記工程1の後に、下記工程1-1を行うと、工程1～3を繰り返す際に未反応の化合物(A)が反応に関与することを防ぐことができるので好ましい。

[0056] 工程1-1

工程1で得られた化合物(C)の粗生成物を、溶媒中、0 ℃と用いる溶媒の沸点との間の温度で、10秒間から30分間、好ましくは5～1000当量のアシル化試薬(AA)および好ましくは5～1000当量の塩基と反応させることにより、未反応の化合物(A)の5'水酸基を保護することができる。この際、適当な添加物を加え、反応を促進することもできる。

アシル化試薬としては、例えば、無水酢酸や無水フェノキシ酢酸が挙げられる。

溶媒としては、例えば、ジクロロメタン、アセトニトリル、酢酸エチル、THF、1,4-ジオキサン、DMF等が挙げられ、これらを単独でまたは混合して用いられる。

塩基としては、例えば、ピリジン、2,6-ルチジン等が挙げられる。

添加剤としては、例えば、4-ジメチルアミノピリジン、1-メチルイミダゾール等が挙げられる。

[0057] 工程2

化合物(D)は、化合物(C)を溶媒中、0 ℃と用いる溶媒の沸点との間の温度で、10秒間から30分間、好ましくは5～1000当量の塩基存在下、好ましくは1～10当量の酸化剤と反応させることにより製造することができる。

酸化剤としては、例えば、ヨウ素、過酸化水素水、m-クロロ過安息香酸、過酢酸、tert-ブチルヒドロペルオキシド、(+)-カンファースルホニルオキサジリジン(CSO)等が挙げられ、これらを単独でまたは混合して用いる。

塩基および溶媒としては、例えば、前記工程1に記載のもの等が挙げられる。

[0058] 工程2-1

化合物(D-1)は、化合物(C)を溶媒中、0 ℃と用いる溶媒の沸点との間の温度で、10秒間から30分間、好ましくは5～1000当量の塩基存在下、好ましくは5～1000当量の硫化剤と反応させることにより製造することができる。

硫化剤としては、例えば、ビューケージ試薬(3H-1,2-ベンゾジチオール-3-オン-1,1-ジオキシド)、3-((N,N-ジメチルアミノメチリデン)アミノ)-3H-1,2,4-ジチアゾール-5-チオン (DDTT)、フェニルアセチルジスルフィド (PADS)等が挙げられ、これらを単独または混合して用いる。

溶媒としては、例えば、THF、アセトニトリル、ピリジン、ピコリン等が挙げられ、これらを単独または混合して用いる。

[0059] 工程3

化合物(E)は、化合物(D)を溶媒中、0 ℃と用いる溶媒の沸点との間の温度で、10秒間から30分間、好ましくは5～1000当量の酸で処理することにより製造することができる。

また、化合物(E-1)は、化合物(D-1)を溶媒中、0 ℃と用いる溶媒の沸点との間の温度で、10秒間から30分間、好ましくは1～10当量の酸で処理することにより製造することができる。

酸としては、例えば、ジクロロ酢酸、トリクロロ酢酸、トリフルオロ酢酸等が挙げられる。

溶媒としては、例えば、ジクロロメタン、クロロホルム等が挙げられる。

上記工程1、2、2-1および3をｍ回繰り返すことで、化合物(F)を製造することができる。

[0060] 工程4

化合物(G)は、化合物(F)を溶媒中、-80 ℃と200 ℃の間の温度で、10秒間から72時間、好ましくは5～1000当量の塩基で処理することにより、製造することができる。

塩基としては、例えば、アンモニア、メチルアミン、ジメチルアミン、エチルアミン、ジエチルアミン、イソプロピルアミン、ジイソプロピルアミン

、ピペリジン、トリエチルアミン、エチレンジアミン、1,8-ジアザビシクロ[5.4.0]-7-ウンデセン(DBU)、炭酸カリウム等が挙げられる。

溶媒としては、例えば、水、メタノール、エタノール、THF等が挙げられる。

化合物(G)のR^eが式(C-1)で表される置換基の場合、下記工程5により化合物(I)を製造することができる。

[0061] 工程5

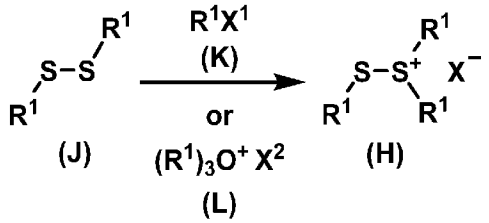
化合物(I)は、化合物(G)を溶媒中、0 ℃と用いる溶媒の沸点との間の温度で、10分間から24時間、好ましくは5～1000当量の化合物(H)と反応させることにより製造することができる。

溶媒としては、例えば、酢酸緩衝液、トリス緩衝液、クエン酸緩衝液、リン酸緩衝液、水等が挙げられ、これらを単独または混合して用いられる。

[0062] 化合物(H)は下記工程5-1により製造することができる。

工程5-1

[化29]



（式中、R^1は前記と同義であり、X^-は、X^1またはX^2に相当するアニオンを表し、X^1は、例えば、トリフルオロメタンスルホニルオキシ等を表し、X^2は、例えばテトラフルオロボラート、ヘキサフルオロホスファート等を表す）

化合物(H)は、化合物(J)を溶媒中、0 ℃と用いる溶媒の沸点との間の温度で、10分間から48時間、好ましくは5～1000当量の化合物(K)または化合物(L)と反応させることにより製造することができる。

溶媒としては、例えばジクロロメタン、アセトニトリル、トルエン、酢酸エチル、THF、1,4-ジオキサン、DMF、DMA、NMP等が挙げられ、これらを単独でまたは混合して用いられる。

化合物(K)としては、例えば、メチルトリフラート、エチルトリフラート等が挙げられ、化合物(L)としては、例えば、トリエチルオキソニウムヘキサフルオロホスファート、トリメチルオキソニウムテトラフルオロボラート、トリエチルオキソニウムテトラフルオロボラート等が挙げられる。

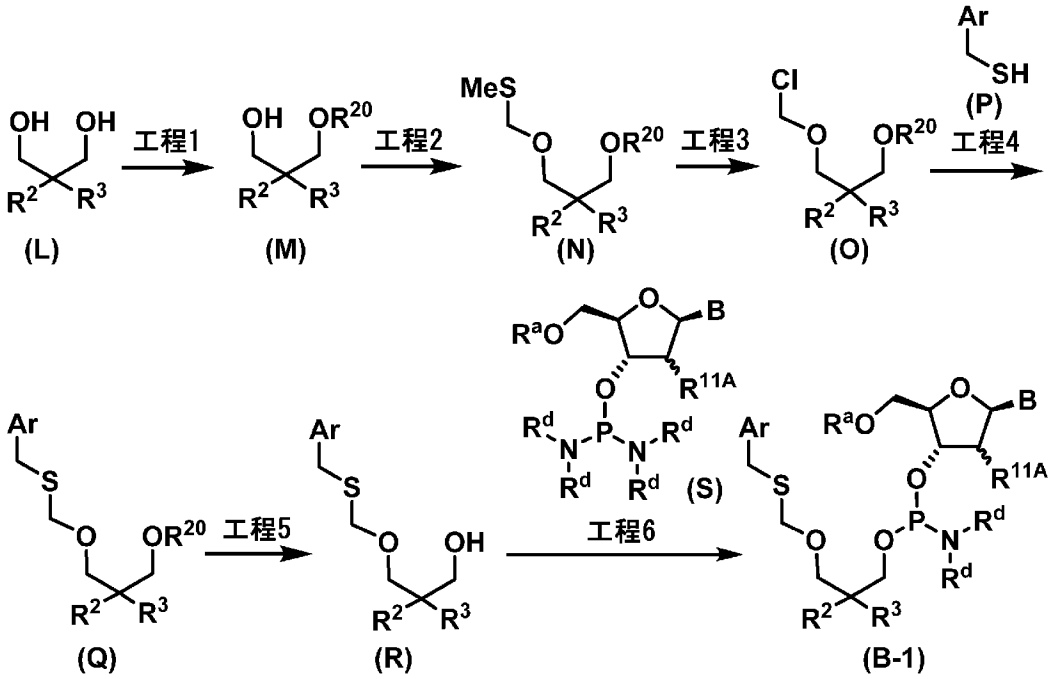
上記工程1～5および工程1-1は核酸合成機を用いて行うこともできる。

化合物(B)のうち、R^cが式(C-1)で表される置換基である化合物(B-1)は下記製造法2により製造することができる。

[0063] 製造法2

化合物(B-1)の製造法

[化30]



［式中、R^{20}はトリ低級アルキルシリル(該トリ低級アルキルシリルの3つの低級アルキルは、同一または異なって、それぞれ前記低級アルキルと同義である)を表し、R^2、R^3、R^{11A}、R^a、R^d、BおよびArは、それぞれ前記と同義であり、MeSはメチルチオを表す］

[0064] 工程1

化合物(M)は、化合物(L)を溶媒中、好ましくは1～10当量の塩基存在下、0℃と用いる溶媒の沸点との間の温度で、10分間から3日間、好ましくは1～10

当量のシリル化剤と反応させることにより製造することができる。必要により好ましくは0.1～10当量の添加物を加えて、反応を促進させることもできる。

溶媒としては、例えばDMF、ピリジン、ジクロロメタン、THF、酢酸エチル、1,4-ジオキサン、NMP等が挙げられ、これらを単独でまたは混合して用いられる。

塩基としては、例えば、ピリジン、トリエチルアミン、N-エチル-N,N-ジイソプロピルアミン、2,6-ルチジン等が挙げられる。

シリル化剤としては、例えば、tert-ブチルジメチルシリルクロリド、トリイソプロピルシリルクロリド、tert-ブチルジメチルシリルトリフラート等が挙げられる。

添加物としては、例えば、4-ジメチルアミノピリジン等が挙げられる。

化合物(L)は、例えば市販品として得られる。

[0065] 工程2

化合物(N)は、化合物(M)を溶媒中、0 ℃と用いる溶媒の沸点との間の温度で、10分間から3日間、好ましくは0.1～10当量の添加剤存在下、好ましくは1～10当量のメチルチオメチル化剤と反応させることにより製造することができる。

溶媒としては、例えば、酢酸、無水酢酸、ジメチルスルホキシド(DMSO)等が挙げられる。

メチルチオメチル化剤としては、例えば、

i)DMSOおよびDMSOに対して1～10当量の活性化剤等との組み合わせ、

ii)$MeSCH_2X^3$(式中X^3は塩素原子、臭素原子またはヨウ素原子を表し、MeSはメチルチオを表す)および$MeSCH_2X^3$に対して1～10当量の塩基の組み合わせ等が挙げられる。

活性化剤としては、例えば、無水トリフルオロ酢酸、無水酢酸等が挙げられる。

塩基としては、例えば、トリエチルアミン、N,N-ジイソプロピルエチルア

ミン等が挙げられる。

[0066] 工程3

化合物(O)は、化合物(N)を溶媒中、0 ℃と用いる溶媒の沸点との間の温度で、10分間から3日間、好ましくは1～10当量の塩素化剤と反応させることにより製造することができる。

溶媒としては、例えばジクロロメタン、クロロホルム、1,2-ジクロロエタン等が挙げられ、これらを単独でまたは混合して用いられる。

塩素化剤としては、例えば、塩化スルフリル等が挙げられる。

[0067] 工程4

化合物(Q)は、化合物(O)を溶媒中、好ましくは1～10当量の塩基存在下、-20 ℃と用いる溶媒の沸点との間の温度で、10分間から24時間、好ましくは1～10当量の化合物(P)と反応させることにより製造することができる。

溶媒としては、例えばジクロロメタン、アセトニトリル、トルエン、酢酸エチル、THF、1,4-ジオキサン、DMF、DMA、NMP等が挙げられ、これらを単独でまたは混合して用いられる。

塩基としては、例えば、水素化ナトリウム、DBU、トリエチルアミン、N,N-ジイソプロピルエチルアミン等が挙げられ、これらを単独でまたは混合して用いられる。

化合物(P)は、例えば市販品として得られる。

[0068] 工程5

化合物(R)は、化合物(Q)を溶媒中、0 ℃と用いる溶媒の沸点との間の温度で、10分間から10日間、好ましくは1～10当量の添加剤と反応させることにより製造することができる。

溶媒としては、例えば、ジクロロメタン、アセトニトリル、トルエン、酢酸エチル、THF、1,4-ジオキサン、DMF、DMA、NMP等が挙げられ、これらを単独でまたは混合して用いられる。

添加剤としては、例えば、テトラブチルアンモニウムフルオリド、トリエチルアミン三ふっ化水素酸塩等が挙げられる。

[0069] 工程6

化合物(B-1)は、化合物(R)を溶媒中、0 ℃と用いる溶媒の沸点との間の温度で、10分間から48時間、好ましくは1～10当量の添加剤存在下、好ましくは1～10当量の化合物(S)と反応させることにより製造することができる。

溶媒としては、例えば、ジクロロメタン、アセトニトリル、トルエン、酢酸エチル、THF、1,4-ジオキサン、DMF、DMA、NMP等が挙げられ、これらを単独でまたは混合して用いられる。

添加剤としては、例えば、1H-テトラゾール、4,5-ジシアノイミダゾール、5-エチルチオテトラゾール、5-ベンジルチオテトラゾール等が挙げられる。

化合物(S)は、例えば、Chem. Commun., 2014,50, 15063に記載の方法等により製造することができる。

[0070] 製造法3

二本鎖オリゴヌクレオチドの製造法

化合物(I)と、それに対して等モル量の一本鎖オリゴヌクレオチドとを溶媒中、30 ℃と120 ℃の間の温度で10秒間から72時間反応させた後、10分間から24時間を要しながら室温まで徐冷することにより、二本鎖オリゴヌクレオチドを製造することができる。

溶媒としては、例えば、酢酸緩衝液、トリス緩衝液、クエン酸緩衝液、リン酸緩衝液、水等が挙げられ、これらを単独または混合して用いられる。

化合物(I)と反応させる一本鎖オリゴヌクレオチドは、化合物(I)と相補的なオリゴヌクレオチドであるが、1つ以上のミスマッチな塩基の組み合わせを含んでいてもよい。また、塩基長が異なっていてもよい。

上記のスキームにおいて、核酸塩基、各工程の反応条件等を種々変更することにより、所望のオリゴヌクレオチドを得ることができる。

[0071] これらは、例えば、

(i)テトラヘドロン(Tetrahedron)、第48巻、第12号、2223-2311頁(1992年);

(ii)カレント・プロトコールズ・イン・ヌクレイック・アシッズ・ケミストリー(Current Protocols in Nucleic Acids Chemistry)、John Wiley & Sons

(2000年);

(iii)プロトコールズ・フォー・オリゴヌクレオチズ・アンド・アナログズ(Protocols for Oligonucleotides and Analogs)、Human Press(1993年);

(iv)ケミストリー・アンド・バイオロジー・オブ・アーティフィシャル・ヌクレイック・アシッズ(Chemistry and Biology of Artificial Nucleic Acids)、Wiley-VCH(2012年);

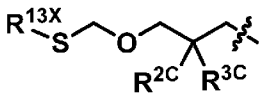
(v)ゲノムケミストリー　人工核酸を活用する科学的アプローチ、講談社(2003年);

(vi)核酸化学のニュートレンド、化学同人(2011年)

等に記載の方法に準じて行うことができる。

[0072]　また、化合物(B)のうち、R^cが下記式(D-1)

[化31]



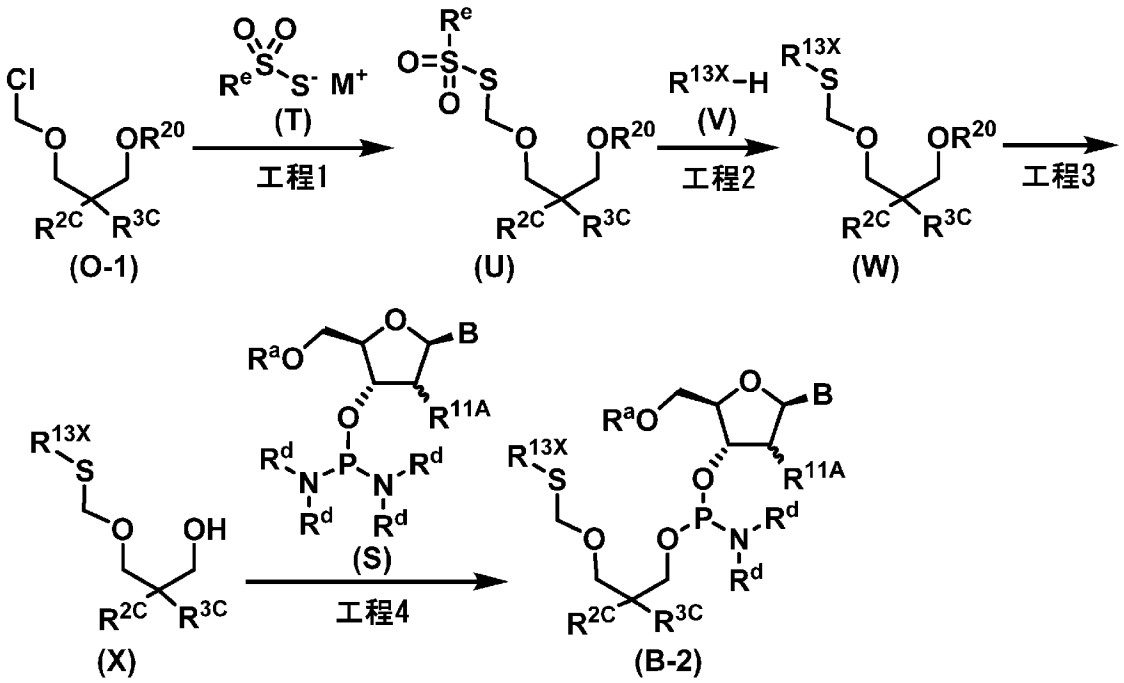
(D-1)

(式中R^{2C}、R^{3C}およびR^{13X}は、それぞれ前記と同義である)で表される置換基である化合物(B-2)は下記製造法4により製造することができる。

製造法4

化合物(B-2)の製造法

[化32]



[式中、R^{2C}、R^{3C}、R^{11A}、R^{13X}、R^{20}、R^{a}、R^{d}およびBは、それぞれ前記と同義であり、R^{e}は低級アルキルまたは置換基を有していてもよいフェニルを表し、Mは、ナトリウム原子またはカリウム原子を表す。ここで、低級アルキルは前記と同義であり、置換基を有していてもよいフェニルにおける該置換基は、前記置換基を有していてもよいアリールにおける置換基と同義である]

[0073] 工程1

化合物(U)は、化合物(O-1)を溶媒中、0 ℃と用いる溶媒の沸点との間の温度で、10分間から3日間、好ましくは1～10当量の化合物(T)と反応させることにより製造することができる。必要により好ましくは0.1～10当量の添加物を加えて、反応を促進させることもできる。

溶媒としては、例えばアセトン、THF等が挙げられ、これらを単独でまたは混合して用いられる。

添加物としては、例えば、ヨウ化ナトリウム、テトラブチルアンモニウムヨージド等が挙げられる。

化合物(O-1)は製造法3の化合物(O)と同様にして製造することができる。

化合物(T)は、例えば市販品として得られる。

[0074] 工程2

化合物(W)は、化合物(U)を溶媒中、0 ℃と用いる溶媒の沸点との間の温度で、10分間から3日間、好ましくは0.1～10当量の塩基剤存在下、好ましくは1～10当量の化合物(V)と反応させることにより製造することができる。

溶媒としては、例えば、DMF、ジクロロメタン、THF、酢酸エチル、1,4-ジオキサン、NMP、ジメチルスルホキシド(DMSO)等が挙げられる。

塩基としては、例えば、ピリジン、トリエチルアミン、N-エチル-N,N-ジイソプロピルアミン等が挙げられる。

化合物(V)は、例えば市販品として得られる。

[0075] 工程3

化合物(X)は、化合物(W)を用いて、製造法2の工程5と同様にして製造することができる。

[0076] 工程4

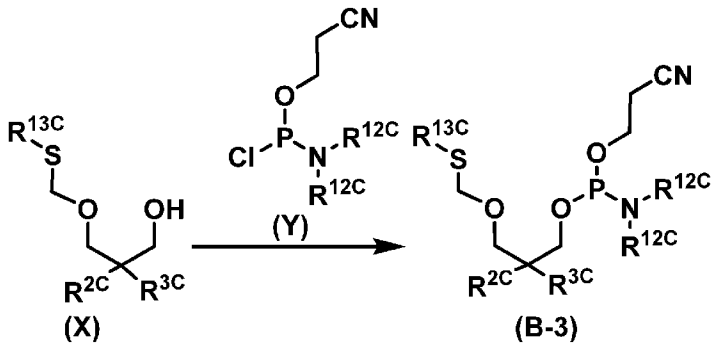
化合物(B-2)は、化合物(X)を用いて製造法2の工程6と同様にして製造することができる。

化合物(IV-1)のうちR^{13D1}がシアノである化合物(B-3)は、下記製造法5により製造することができる。

[0077] 製造法5

化合物(B-3)の製造法

[化33]



(式中、R^{13C}、R^{2C}、R^{3C}およびR^{12C}は、それぞれ前記と同義である)

化合物(B-3)は化合物(X)を溶媒中、0℃と用いる溶媒の沸点との間の温度で

、10分から3日間、好ましくは1～10当量の塩基存在下、好ましくは1～10当量の化合物(Y)を作用させることにより製造することができる。

溶媒としては、例えば、DMF、THF,、ジクロロメタン等が挙げられる。

塩基としては、例えば、ピリジン、トリエチルアミン、N-エチル-N,N-ジイソプロピルアミン等が挙げられる。

化合物(X)は、製造法4の工程3で製造することができる。

[0078] オリゴヌクレオチドの5'末端のリン酸基の酸素原子上に式(I)または式(I-0)で表される基を有する化合物(I)または化合物(I-0)、すなわち化合物(III-1)は、下記製造法6により製造することができる。

製造法6

製造法1の工程1において、化合物(B)として化合物(B-3)を用いることで、所望の化合物(I)または化合物(I-0)を得ることができる。

上記製造法1～6において、定義した基が該製造法の条件下で変化するか、または該製造法を実施するのに不適切な場合、有機合成化学で常用される保護基の導入および除去方法[例えば、プロテクティブ・グループス・イン・オーガニック・シンセシス第4版(Protective Groups in Organic Synthesis, forth edition)、グリーン(T.W.Greene)著、John Wiley & Sons Inc.(2006年)等]等を用いることにより、目的化合物を製造することができる。また、必要に応じて置換基導入等の反応工程の順序を変えることもできる。

[0079] 以下、実施例および参考例により本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

[0080] 参考例1

工程1

ジエチル2-(((tert-ブチルジメチルシリル)オキシ)メチル)-2-(ヒドロキシメチル)マロナート(化合物1B)

市販のジエチル2,2-ビス(ヒドロキシメチル)マロナート(化合物1A, 6.18 g, 28.1 mmol)をジクロロメタン(90 mL)に溶解し、ピリジン(4.44 mL, 56.1 mmol)およびtert-ブチルジメチルシリルクロリド(6.34 g, 42.1 mmol)を加え

、室温で4日間撹拌した。反応液に水を加え、クロロホルムで抽出した。有機層を水および飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧下で溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン/酢酸エチル)で精製し化合物1B(8.88 g, 95%)を得た。

ESI-MS(m/z): 335(M+1)

工程2

ジエチル2-(((tert-ブチルジメチルシリル)オキシ)メチル)-2-(((メチルチオ)メトキシ)メチル)マロナート(化合物1C)

化合物1B(9.73 g, 29.1 mmol)にDMSO(60 mL)、酢酸(30 mL)および無水酢酸(30 mL)を加え、室温で5時間撹拌した。反応液に28%アンモニア水を加え、室温で1時間撹拌した。反応液に水を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を水および飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧下で溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン/酢酸エチル)で精製し、化合物1C(7.81 g, 68%)を得た。

ESI-MS(m/z): 395(M+1)

工程3

ジエチル-2-[(tert-ブチルジメチルシリルオキシ)メチル]-2-[(クロロメトキシ)メチル]マロナート(化合物1D)

化合物1C(4.40 g, 11.2 mmol)をジクロロメタン(50 mL)に溶解し、スルフリルクロリド(1.18 mL, 14.5 mmol)を加え、室温で45分間撹拌した。反応液を減圧下で濃縮し、粗生成物の化合物1D(4.57 g)を得た。

工程4

ジエチル2-(((tert-ブチルジメチルシリル)オキシ)メチル)-2-((((2,4,6-トリメトキシベンジル)チオ)メトキシ)メチル)マロナート(化合物1E)

60%水素化ナトリウム(0.580 g, 14.5 mmol)のDMA(50 mL)懸濁液に、0 ℃で(2,4,6-トリメトキシフェニル)メタンチオール(3.11 g, 14.5 mmol)を加え、室温で1時間撹拌した。混合物に化合物1Dの粗生成物(4.57 g)のDMA(50 mL)溶液を加え、室温で1時間撹拌した。反応液に水を加え、酢酸エチルで抽出した

。有機層を水および飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧下で溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン/酢酸エチル)で精製し、化合物1E(3.78 g, 60%)を得た。

ESI-MS(m/z): 561(M+1)

[0081] 参考例2

1-((2R,3R,4R,5R)-5-((ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)メチル)-4-(ビス(ジイイソプロピルアミノ)ホスフィノオキシ)-3-フルオロテトラヒドロフラン-2-イル)ピリミジン-2,4(1H,3H)-ジオン(化合物2B)

市販の1-((2R,3R,4R,5R)-5-((ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)メチル)-3-フルオロ-4-ヒドロキシテトラヒドロフラン-2-イル)ピリミジン-2,4(1H,3H)-ジオン(化合物2A, 20.7 g, 37.9 mmol)をジクロロメタン(360 mL)に溶解させ、氷冷下、N,N-ジイソプロピルエチルアミン(6.60 mL, 37.9 mmol)およびビス(ジイソプロピルアミノ)クロロホスフィン(12.3 g, 46.1 mmol)を加え、3時間撹拌した。反応液を減圧下で溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(酢酸エチル100%)で精製し、続いてn-ヘプタンを用いてスラリー精製し、化合物2B(25.4 g, 86%)を得た。

^{31}P-NMR($CDCl_3$, 162MHz) δ (ppm): 120.6.

[0082] 参考例3

1-((2R,3R,4R,5R)-5-((ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)メチル)-4-(ビス(ジイイソプロピルアミノ)ホスフィノオキシ)-3-メトキシテトラヒドロフラン-2-イル)ピリミジン-2,4(1H,3H)-ジオン(化合物3B)

市販の1-((2R,3R,4R,5R)-5-((ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)メチル)-4-ヒドロキシ-3-メトキシテトラヒドロフラン-2-イル)ピリミジン-2,4(1H,3H)-ジオン(化合物3A, 17.8 g, 31.8 mmol)を用い、参考例2と同様にして、化合物3B(10.9 g, 43%) を得た。

^{31}P-NMR($CDCl_3$, 162MHz) δ (ppm): 119.2.

[0083] 参考例4

1-((2R,4S,5R)-5-((ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)メチル)-

4-(ビス(ジイイソプロピルアミノ)ホスフィノオキシ)-テトラヒドロフラン-2-イル)-5-メチルピリミジン-2,4(1H,3H)-ジオン(化合物4B)

市販の1-((2R,4S,5R)-5-((ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)メチル)-4-ヒドロキシテトラヒドロフラン-2-イル)-5-メチルピリミジン-2,4(1H,3H)-ジオン(化合物4A, 5.00 g, 9.18 mmol)を用い、参考例2と同様にして、化合物4B (3.80 g, 53%)を得た。

^{31}P-NMR($CDCl_3$, 162MHz) δ (ppm): 116.6.

[0084] 参考例5

1,2-ジエチル-1-メチルジスルファニウムテトラフルオロボレート(化合物5B)

トリメチルオキソニウムテトラフルオロボレート(化合物5A, 1.10 g, 7.45 mmol)をアセトニトリル(5.5 mL)に溶解させ、氷冷下、1,2-ジエチルジスルファン(0.911 g, 7.45 mmol)のアセトニトリル(2.0 mL)溶液を加え、2日間撹拌した、反応液を減圧下で濃縮し、化合物5B(1.67 g)を得た。

^{1}H-NMR($CDCl_3$, 400MHz) δ (ppm): 3.57-3.61 (m, 2H), 3.32 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 3.25 (s, 3H), 1.57 (t, J = 7.1 Hz, 3H), 1.50 (t, J = 7.1Hz, 3H).

HPRT1を標的とするsiRNA(1-fU)を以下の参考例6～8に従って合成した。

[0085] 参考例6

siRNA(1-fU), (3-Y)および(4-Z)のセンス鎖(配列番号1)は、例えば、Protocols for Oligonucleotides and Analogs: Synthesis and Properties (Methods in Molecular Biology: Volume 20, 1993)等に記載の方法に従って合成した。

[0086] 参考例7

siRNA(1-fU)のアンチセンス鎖(配列番号2)は、例えば、Protocols for Oligonucleotides and Analogs: Synthesis and Properties (Methods in Molecular Biology: Volume 20, 1993)等に記載の方法に従って合成した。

[0087] 参考例8

参考例6および7で得られた、siRNA(1-fU)のセンス鎖(配列番号1)およびア

ンチセンス鎖(配列番号2)を用いて、例えば、Protocols for Oligonucleotides and Analogs: Synthesis and Properties (Methods in Molecular Biology: Volume 20, 1993)等に記載の方法に従いsiRNA(1-fU)を得た。

[0088] [表1]

siRNA	配列番号	鎖	配列(5'→3')
1-fU	1	センス	GmCCmAGmACmUUmUGmUUmGGmAUmUAmGT
	2	アンチセンス	fUAmAUmCCmAAmCAmAAmGUmCUmGGmCUT

[0089] (表中、A、G、C、TおよびUは、それぞれアデノシン、グアノシン、シチジン、チミジンおよびウリジンを表し、mA、mG、mCおよびmUは、それぞれ2'-O-メチルアデノシン、2'-O-メチルグアノシン、2'-O-メチルシチジンおよび2'-O-メチルウリジンを表し、fUは、2'-フルオロウリジンを表す)

HPRT1を標的とするsiRNA(6-fU)を以下の参考例9～11に従って合成した。

[0090] 参考例9

siRNA(5-Z)および(6-fU)のセンス鎖(配列番号6)は、コレステリル-テグ-ホスホラミダイト(カタログ番号10-1975-xx:Glen Research社)を用いて、例えば、Protocols for Oligonucleotides and Analogs: Synthesis and Properties (Methods in Molecular Biology: Volume 20, 1993)等に記載の方法に従って合成した。

[0091] 参考例10

siRNA(6-fU)のアンチセンス鎖 (配列番号8)は例えば、Protocols for Oligonucleotides and Analogs: Synthesis and Properties (Methods in Molecular Biology: Volume 20, 1993)等に記載の方法に従って合成した。

[0092] 参考例11

参考例9および10で得られたsiRNA(6-fU)のセンス鎖(配列番号6)およびアンチセンス鎖(配列番号8) を用いて、例えばProtocols for Oligonucleotides and Analogs: Synthesis and Properties (Methods in Molecular Biology: Volume 20, 1993)等に記載の方法に従いsiRNA (6-fU)を得た。

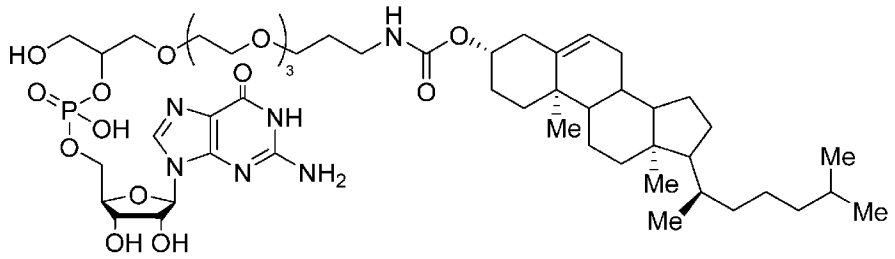
[0093]

[表2]

si RNA	配列番号	鎖	配列(5'→3')
6-fU	6	センス	Ch-GmCCmAGmACmUfUmUGmUfUmGGmAfUmUAmGT
	8	アンチセンス	fUAmAfUmCCmAAmCAmAAmGfUmCfUmGGmCfUT

[0094] [表中、A、G、C、TおよびUは、それぞれアデノシン、グアノシン、シチジン、チミジンおよびウリジンを表し、mA、mG、mCおよびmUは、それぞれ2'-O-メチルアデノシン、2'-O-メチルグアノシン、2'-O-メチルシチジンおよび2'-O-メチルウリジンを表し、fUは、2'-フルオロウリジンを表し、Ch-Gは、下記式(式中Meはメチルを表す)で表される化合物に相当する残基を表す]

[化34]



[0095] 参考例12

工程1

ジエチル 2-(((tert-ブチルジメチルシリル)オキシ)メチル)-2-(((トシルチオ)メトキシ)メチル)マロナート(化合物12A)

化合物1D (1.73 g, 4.52 mmol) をアセトン (18 mL) に溶解し、市販のp-トルエンチオスルホン酸カリウム(1.23 g, 5.42 mmol)およびヨウ化ナトリウム(68.0 mg, 0.452 mmol)を加えて、室温で30分間撹拌した。反応液に水を加え、有機層を酢酸エチルで抽出し、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧下で濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン／酢酸エチル)で精製し、化合物12A (2.26 g, 94%) を得た。

^{1}H-NMR($CDCl_3$, 400 MHz) δ(ppm): 7.83 - 7.79 (m, 2H), 7.35 - 7.31 (m, 2H), 5.29 (s, 2H), 4.14 (q, J = 7.1 Hz, 4H), 3.94 (s, 2H), 3.92 (s, 2H), 2.44 (s, 3H), 1.22 (t, J = 7.1 Hz, 6H), 0.82 (s, 9H), -0.01 (s, 6H).

工程2

ジエチル2,11,11,12,12-ペンタメチル-6,10-ジオキサ-3,4-ジチア-11-シラトリデカン-8,8-ジカルボキシラート（化合物12B）

化合物12A（500 mg, 0.935 mmol)をジクロロメタン(4.6 mL）に溶解し、トリエチルアミン（0.261 mL, 1.87 mmol)およびプロパン-2-チオール（0.130 mL, 1.43 mmol)を加え、室温で15時間撹拌した。反応液をそのままシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン／酢酸エチル)で精製し、化合物12B（403 mg, 95%）を無色油状物として得た。

ESI-MS(m/z): 455 (M+1)

^{1}H-NMR($CDCl_3$, 400 MHz) δ(ppm): 4.81 (s, 2H), 4.18 (q, J = 7.2 Hz, 4H), 4.09 (s, 2H), 4.06 (s, 2H), 3.06 - 2.96 (m, 1H), 1.29 (d, J = 6.8 Hz, 6H), 1.25 (t, J = 7.2 Hz, 6H), 0.86 (s, 9H), 0.04 (s, 6H).

[0096] 参考例13

ジエチル2,2,3,3-テトラメチル-4,8-ジオキサ-10,11-ジチア-3-シラヘキサデカ-15-イン-6,6-ジカルボキシラート(化合物13A)

化合物12A（53 mg, 0.10 mmol）を用い、参考例12の工程2と同様にして化合物13A（31 mg, 65%）を得た。

ESI-MS(m/z): 479 (M+1)

^{1}H-NMR($CDCl_3$, 400 MHz) δ(ppm): 4.83 (s, 2H), 4.19 (q, J = 7.2 Hz, 4H), 4.09 (s, 2H), 4.06 (s, 2H), 2.83 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 2.37 - 2.29 (m, 2H), 1.97 (t, J = 2.4 Hz, 1H), 1.95 - 1.88 (m, 2H), 1.25 (t, J = 7.2 Hz, 6H), 0.86 (s, 9H), 0.04 (s, 6H).

[0097] 参考例14

工程1

ジエチル 2-(((tert-ブチルジメチルシリル)オキシ)メチル)-2-((((3-ヒドロキシプロピル)ジスルファニル)メトキシ)メチル)マロナート（化合物14A）

化合物12A（50.0 mg, 94.0 μmol）および市販の3-メルカプト-1-プロパノールを用い、参考例12の工程2と同様にして化合物14A（44.0 mg, 定量的）を

得た。

^{1}H-NMR(CDCl$_3$, 400 MHz) δ(ppm): 4.84 (s, 2H), 4.19 (q, J = 7.2 Hz, 4H), 4.09 (s, 2H), 4.06 (s, 2H), 3.75 (t, J = 6.1 Hz, 2H), 2.85 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 1.98 - 1.90 (m, 2H), 1.25 (t, J = 7.2 Hz, 6H), 0.86 (s, 9H), 0.04 (s, 6H).

工程2

ジエチル 2-((((3-(ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)プロピル)ジスルファニル)メトキシ)メチル)-2-(((tert-ブチルジメチルシリル)オキシ)メチル)マロナート（化合物14B）

化合物14A（150 mg, 319 μmol）をジクロロメタン（2 mL）に溶解し、トリエチルアミン（133 μL, 956 μmol）および4,4'-ジメトキシトリチルクロリド（119 mg, 351 μmol）を加え、室温で終夜撹拌した。反応液に水を加え、有機層を酢酸エチルで抽出し、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧下で濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン／酢酸エチル）で精製し、化合物14B（212 mg, 86%）を得た。

^{1}H-NMR(CDCl$_3$, 400 MHz) δ(ppm): 7.44 - 7.39 (m, 2H), 7.33 - 7.27 (m, 6H), 7.23 - 7.19 (m, 1H), 6.85 - 6.79 (m, 4H), 4.79 (s, 2H), 4.16 (q, J = 7.2 Hz, 4H), 4.08 (s, 2H), 4.05 (s, 2H), 3.79 (s, 6H), 3.15 (t, J = 6.1 Hz, 2H), 2.83 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 1.98 - 1.92 (m, 2H), 1.23 (t, J = 7.2 Hz, 6H), 0.85 (s, 9H), 0.03 (s, 6H).

[0098] 参考例15

工程1

ジエチル 17-ヒドロキシ-2,2,3,3-テトラメチル-4,8-ジオキサ-10,11-ジチア-3-シラヘプタデカン-6,6-ジカルボキシラート（化合物15A）

化合物12A（615 mg, 1.29 mmol）を用い、参考例12の工程2と同様にして、化合物15A（438 mg, 93%）を得た。

ESI-MS(m/z): 513 (M+1)

^{1}H-NMR(CDCl$_3$, 400 MHz) δ(ppm): 4.82 (s, 2H), 4.18 (q, J = 7.2 Hz, 4H)

, 4.09 (s, 2H), 4.06 (s, 2H), 3.65 (t, J = 5.6 Hz, 2H), 2.74 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 1.72 - 1.65 (m, 2H), 1.61 - 1.54 (m, 2H), 1.47 - 1.33 (m, 5H), 1.25 (d, J = 7.2 Hz, 6H), 0.86 (s, 9H), 0.04 (s, 6H).

工程2

ジエチル 2,2,3,3-テトラメチル-17-(トシルオキシ)-4,8-ジオキサ-10,11-ジチア-3-シラヘプタデカン-6,6-ジカルボキシラート（化合物15B）

化合物15A（452 mg、883 μmol）をジクロロメタン（8.8 mL）に溶解し、ピリジン（143 μL, 1.76 mmol）およびp-トルエンスルホニルクロリド(252 mg, 1.32 mmol）を加え、室温で24時間撹拌した。反応液に水を加え30分間撹拌した後、有機層をクロロホルムで抽出し、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧下で濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン／酢酸エチル)で精製し化合物15B（300 mg, 51 %）を得た。

ESI-MS(m/z): 667 (M+1)

^{1}H-NMR($CDCl_3$, 400 MHz) δ(ppm): 7.80 - 7.77 (m, 2H), 7.36 - 7.33 (m, 2H), 4.81 (s, 2H), 4.18 (q, J = 7.2 Hz, 4H), 4.09 (s, 2H), 4.05 (s, 2H), 4.02 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 2.68 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 2.45 (s, 3H), 1.68 - 1.58 (m, 4H), 1.34 - 1.30 (m, 4H), 1.24 (t, J = 7.2 Hz, 6H), 0.86 (s, 9H), 0.04 (s, 6H).

工程3

ジエチル 17-アジド-2,2,3,3-テトラメチル-4,8-ジオキサ-10,11-ジチア-3-シラヘプタデカン-6,6-ジカルボキシラート（化合物15C）

化合物15B（296 mg、0.443 mmol）をDMF（4.4 mL）に溶解し、アジ化ナトリウム（144 mg, 2.22 mmol）を加え、室温で18時間撹拌した。反応液に水を加え、有機層を酢酸エチルで抽出し、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧下で濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン／酢酸エチル）で精製し、化合物15C（105 mg、44 %）を得た。

ESI-MS(m/z): 560 (M+Na)

^{1}H-NMR($CDCl_3$, 400 MHz) δ (ppm): 4.82 (s, 2H), 4.18 (q, J= 7.2 Hz, 4H)

, 4.09 (s, 2H), 4.06 (s, 2H), 3.27 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 2.73 (t, J= 7.2 Hz, 2H), 1.72 - 1.57 (m, 4H), 1.49 - 1.34 (m, 4H), 1.25 (t, J = 7.2 Hz, 6H), 0.86 (s, 9H), 0.04 (s, 6H).

[0099] 参考例16

ジエチル 2,2,3,3-テトラメチル-4,8-ジオキサ-10,11-ジチア-3-シラトリコサン-6,6-ジカルボキシラート（化合物16A）

化合物12A（510 mg、954 μmol）を用い、参考例12の工程2と同様にして化合物16A（488 mg、88%）を得た。

^{1}H-NMR($CDCl_3$, 400 MHz) δ(ppm): 4.82 (s, 2H), 4.18 (q, J = 7.2 Hz, 4H), 4.09 (s, 2H), 4.06 (s, 2H), 2.72 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 1,69 - 1.61 (m, 2H), 1.42 - 1.32 (m, 2H), 1.30 - 1.23 (m, 16H), 1.25 (t, J = 7.2 Hz, 6H), 0.88 (t, J = 6.4 Hz, 3H), 0.86 (s, 9H), 0.04 (s, 6H).

[0100] 参考例17

工程1

ジ(プロパ-2-イン-1-イル）マロナート（化合物17A）

マロン酸（6.00 g、57.7 mmol）をジクロロメタン（180 mL）およびDMF（18 mL）の混合溶媒に溶解し、室温で1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩（25.4 g, 133 mmol）、4-ジメチルアミノピリジン（0.704 g, 5.77 mmol）および2-プロピン-1-オール（8.51 mL, 144 mmol）を順番に加えて室温で終夜撹拌した。反応液に飽和重曹水を加えて、有機層を酢酸エチルで抽出し、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧下で濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン／酢酸エチル）で精製し、化合物17A（9.51 g, 92%）を得た。^{1}H-NMR($CDCl_3$, 400 MHz) δ(ppm): 4.76 (d, J = 2.5 Hz, 4H), 3.49 (s, 2H), 2.51 (t, J = 2.5 Hz, 2H).

工程2

ジ(プロパ-2-イン-1-イル）2,2-ビス(ヒドロキシメチル)マロナート（化合物17B）

化合物17A（100 mg, 555 μmol）をTHF（2 mL）に溶解し、37%ホルムアルデヒド水溶液（165 μL, 2.22 mmol）およびトリエチルアミン（3.9 μL, 28 μmol）を加えて、室温で終夜撹拌した。反応液に1 mol/L塩酸を加え、有機層を酢酸エチルで抽出し、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧下で濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（クロロホルム／メタノール）で精製し、化合物17B（96.5 mg, 72%）を得た。

^{1}H-NMR($CDCl_3$, 400 MHz) δ(ppm): 4.79 (d, J = 2.5 Hz, 4H), 4.17 (d, J = 7.1 Hz, 4H), 2.65 (t, J = 7.1 Hz, 2H), 2.51 (t, J = 2.5 Hz, 2H).

工程3

ジ(プロパ-2-イン-1-イル) 2-(((tert-ブチルジメチルシリル)オキシ)メチル)-2-(ヒドロキシメチル)マロナート（化合物17C）

化合物17B（95.0 mg, 395 μmol）を用い、参考例1の工程1と同様にして化合物17C（73.1 mg, 52%）を得た。

^{1}H-NMR($CDCl_3$, 400 MHz) δ(ppm): 4.76 (d, J = 2.4 Hz, 2H), 4.75 (d, J = 2.4 Hz, 2H), 4.16 (d, J = 6.8 Hz, 2H), 4.11 (s, 2H), 2.48 (t, J = 2.4 Hz, 2H), 2.40 (t, J = 6.8 Hz, 1H), 0.86 (s, 9H), 0.07 (s, 6H).

工程4

ジ(プロパ-2-イン-1-イル) 2-(((tert-ブチルジメチルシリル)オキシ)メチル)-2-(((メチルチオ)メトキシ)メチル)マロナート（化合物17D）

化合物17C（1.04 g, 2.93 mmol）を用い、参考例1の工程2と同様にして、化合物17D（0.795 g, 65%）を得た。

^{1}H-NMR($CDCl_3$, 400 MHz) δ(ppm): 4.72 (d, J = 2.4 Hz, 4H), 4.64 (s, 2H), 4.13 (s, 2H), 4.06 (s, 2H), 2.46 (t, J = 2.4 Hz, 2H), 2.10 (s, 3H), 0.86 (s, 9H), 0.05 (s, 6H).

工程5

ジ(プロパ-2-イン-1-イル) 2-(((tert-ブチルジメチルシリル)オキシ)メチル)-2-((クロロメトキシ)メチル)マロナート（化合物17E）

化合物17D（6.26 g, 15.1 mmol）をジクロロメタン（44 mL）に溶解し、シ

クロヘキセン（1.99 mL, 19.6 mmol)およびスルフリルクロリド（1.59 mL, 19.6 mmol）を氷冷下で加え、室温で2.5時間撹拌した。反応液を減圧下で濃縮し、化合物17Eの粗生成物（10.6 g）を得た。粗生成物は精製することなく、そのまま次の工程に用いた。

^{1}H-NMR($CDCl_3$, 400 MHz) δ(ppm): 5.45 (s, 2H), 4.73 (d, J = 2.5 Hz, 4H), 4.22 (s, 2H), 4.11 (s, 2H), 2.47 (t, J = 2.5 Hz, 2H), 0.86 (s, 9H), 0.06 (s, 6H).

工程6

ジ(プロパ-2-イン-1-イル) 2-(((tert-ブチルジメチルシリル)オキシ)メチル)-2-(((トシルチオ)メトキシ)メチル)マロナート（化合物17F)

粗生成物の化合物17E（10.6 g）を用い、参考例12の工程1と同様にして、化合物17F（6.23 g, , 2工程70%）を得た。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ(ppm): 7.81 (d, J= 8.7 Hz, 2H), 7.34 (d, J= 8.7 Hz, 2H), 5.28 (s, 2H), 4.70 (dd, J = 15.5, 2.5 Hz, 2H), 4.65 (dd, J = 15.5, 2.5 Hz, 2H), 3.96 (s, 2H), 3.93 (s, 2H), 2.47 (t, J= 2.5 Hz, 2H), 2.45 (s, 3H), 0.82 (s, 9H), -0.01 (s, 6H).

工程7

ジ(プロパ-2-イン-1-イル) 2-(((tert-ブチルジメチルシリル)オキシ)メチル)-2-(((イソプロピルジスルファニル)メトキシ)メチル)マロナート（化合物17G)

化合物17F（1.20 g, 2.16 mmol）および2-プロパンチオール（0.241 mL, 2.60 mmol）を用い、参考例12の工程2と同様にして、化合物17G（0.883 g, 86%）を得た。

^{1}H-NMR($CDCl_3$, 400 MHz) δ(ppm): δ: 4.82 (s, 2H), 4.73 (d, J = 2.5Hz, 2H), 4.72 (d, J = 2.5Hz, 2H), 4.13 (s, 2H), 4.10 (s, 2H), 3.02 (sep, J = 6.8 Hz, 1H), 2.46 (t, J = 2.5 Hz, 2H), 1.30 (d, J = 6.8 Hz, 6H), 0.86 (s, 9H), 0.06 (s, 6H).

[0101] 参考例18

工程1

ビス(4-エチニルベンジル) マロナート (化合物18A)

ジクロロメタン (100 mL) に4-エチニルベンジルアルコール (7.00 g, 53.0 mmol) およびN,N-ジイソプロピルエチルアミン (18.5 mL, 106 mmol) を氷冷下で溶解し、マロニルクロリド (3.86 mL,39.7 mmol) を加えて氷冷下で45分間撹拌した。反応液に飽和重曹水を加え、有機層をジクロロメタンで抽出し、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧下で濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘプタン／酢酸エチル) で精製し、化合物18A (4.53 g, 51%) を得た。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ(ppm): 7.47 (d, J= 8.2 Hz, 4H), 7.27 (d, J= 8.2 Hz, 4H), 5.16 (s, 4H), 3.48 (s, 2H), 3.10 (s, 2H).

工程2

ビス(4-エチニルベンジル) 2,2-ビス(ヒドロキシメチル)マロナート (化合物18B)

化合物18A (5.35 g, 16.1 mmol) を用い、参考例17の工程2と同様にして、粗生成物の化合物18B (8.29 g) を得た。粗生成物は精製することなく、そのまま次の工程に用いた。

工程3

ビス(4-エチニルベンジル) 2-(((tert-ブチルジメチルシリル)オキシ)メチル)-2-(ヒドロキシメチル)マロナート(化合物18C)

工程2で得られた粗生成物の化合物18B(8.29 g)を用い、参考例1の工程1と同様にして、化合物18C (1.45 g, 2工程18%) を得た。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ(ppm): 7.45 - 7.41(m, 4H), 7.22 - 7.18 (m, 4H), 5.13 (s, 4H), 4.16 (s, 2H), 4.10 (s, 2H), 3.09 (s, 2H), 0.83 (s, 9H), 0.01 (s, 6H).

工程4

ビス(4-エチニルベンジル) 2-(((tert-ブチルジメチルシリル)オキシ)メチル)-2-(((メチルチオ)メトキシ)メチル)マロナート (化合物18D)

化合物18C（2.92 g，5.76 mmol）を用い、参考例1の工程2と同様にして粗生成物の化合物18D（2.10 g）を得た。

^{1}H-NMR（$CDCl_3$，400 MHz）δ(ppm)：7.44 - 7.41(m，4H)，7.22 - 7.18（m，4H)，5.10（s，4H)，4.58（s，2H)，4.13（s，2H)，4.05（s，2H)，3.09（s，2H)，2.02（s，3H)，0.83（s，9H)，0.00（s，6H).

工程5

ビス(4-エチニルベンジル) 2-(((tert-ブチルジメチルシリル)オキシ)メチル)-2-((クロロメトキシ)メチル)マロナート（化合物18E）

工程4で得られた粗生成物の化合物18D（2.10 g）を用い、参考例1の工程3と同様にして、粗生成物の化合物18E（2.53 g）を得た。

^{1}H-NMR（$CDCl_3$，400 MHz）δ（ppm)：7.45 - 7.41(m，4H)，7.21 - 7.17（m，4H)，5.38（s，2H)，5.10（s，4H)，4.21（s，2H)，4.10（s，2H)，3.10（s，2H)，0.83（s，9H)，0.00（s，6H).

工程6

ビス(4-エチニルベンジル) 2-(((tert-ブチルジメチルシリル)オキシ)メチル)-2-(((トシルチオ)メトキシ)メチル)マロナート（化合物18F）

化合物18E（2.43 g）を用い、参考例12の工程1と同様にして、化合物18F（1.83 g，3工程47%）を得た。

^{1}H-NMR（$CDCl_3$，400 MHz）δ(ppm)：7.79 - 7.75(m，2H)，7.44 - 7.40(m，4H)，7.30 - 7.26(m，2H)，7.18 - 7.14(m，4H)，5.22（s，2H)，5.06（d，J = 12.8 Hz，2H)，5.02（d，J= 12.8 Hz，2H)，3.99（s，2H)，3.97（s，2H)，3.10（s，2H)，2.41（s，3H)，0.80（s，9H)，-0.04（s，6H).

工程7

ビス(4-エチニルベンジル) 2-(((tert-ブチルジメチルシリル)オキシ)メチル)-2-(((イソプロピルジスルファニル)メトキシ)メチル)マロナート（化合物18G）

化合物18F（1.83 g，2.59 mmol）および2-プロパンチオール（0.361 mL，3.88 mmol）を用い、参考例12の工程2と同様にして、化合物18G（1.41 g，87%

）を得た。

^{1}H-NMR (CDCl$_3$, 400 MHz) δ(ppm): 7.45 - 7.41(m, 4H), 7.21 - 7.17 (m, 4H), 5.10 (s, 4H), 4.75 (s, 2H), 4.12 (s, 2H), 4.09 (s, 2H), 3.09 (s, 2H), 2.99 (sep, J= 6.9 Hz, 1H), 1.27 (d, J= 6.9 Hz, 6H), 0.83 (s, 9H), 0.01 (s, 6H).

[0102] 参考例19

工程1

エチル 2-シアノ-3-ヒドロキシ-2-(ヒドロキシメチル)プロパノアート（化合物19A)

シアノ酢酸エチル（56.6 g, 500 mmol）を用い、参考例17の工程2と同様にして、粗生成物の化合物19A（97.8 g）を得た。粗生成物は精製することなく次の反応に用いた。

工程2

エチル 3-((tert-ブチルジメチルシリル)オキシ)-2-シアノ-2-(ヒドロキシメチル)プロパノアート（化合物19B)

粗生成物の化合物19A（97.8 g）を用い、参考例1の工程1と同様にして、化合物19B（33.0 g, , 2工程22%）を得た。

^{1}H-NMR (CDCl$_3$, 400 MHz) δ(ppm): 4.30 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 4.07 (dd, J = 11.0, 6.6 Hz, 1H), 4.02 (s, 2H), 3.99 (dd, J = 11.0, 6.6 Hz, 1H), 2.43 (br t, J = 6.6 Hz, 1H), 1.34 (t, J= 7.2 Hz, 3H), 0.90 (s, 9H), 0.10 (s, 6H).

工程3

エチル 3-((tert-ブチルジメチルシリル)オキシ)-2-シアノ-2-(((メチルチオ)メトキシ)メチル)プロパノアート（化合物19C)

化合物19B（33.0 g, , 108 mmol）を用い、参考例1の工程2と同様にして、化合物19C（11.1 g, , 26%）を得た。

^{1}H-NMR (CDCl$_3$, 400 MHz) δ(ppm): 4.69 (s, 2H), 4.31-4.26 (m, 2H), 4.01 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 3.98 (d, J= 9.6 Hz, 1H), 3.93 (d, J= 9.2 Hz, 1H

), 3.86 (d, J= 9.2 Hz, 1H), 2.15 (s, 3H), 1.34 (t, J = 7.1 Hz, 3H), 0.89 (s, 9H), 0.09 (s, 3H), 0.09 (s, 3H).

工程4

エチル 3-((tert-ブチルジメチルシリル)オキシ)-2-((クロロメトキシ)メチル)-2-シアノプロパノアート（化合物19D）

化合物19C（8.00 g, , 20.5 mmol）を用い、参考例1の工程3と同様にして、粗生成物の化合物19D（7.93 g）を得た。

^{1}H-NMR（$CDCl_3$, 400 MHz）δ(ppm): 5.49 (d, J= 12.8 Hz, 1H), 5.47 (d, J= 12.8 Hz, 1H),4.29 (q, J= 7.1 Hz, 2H), 4.05 (s, 2H), 4.00 (s, 2H), 1.34 (t, J = 7.1 Hz, 3H), 0.89 (s, 9H), 0.09 (s, 6H).

工程5

エチル 3-((tert-ブチルジメチルシリル)オキシ)-2-シアノ-2-((((2,4,6-トリメトキシベンジル)チオ)メトキシ)メチル)プロパノアート（化合物19E）

粗生成物の化合物19D（7.40 g）を用い、参考例1の工程4と同様にして、化合物19E（6.62 g, 2工程63%）を得た。

ESI-MS(m/z): 536 (M+Na)

^{1}H-NMR（$CDCl_3$, 400 MHz）δ(ppm): 6.12 (s, 2H), 4.74 (d, J = 11.6 Hz, 1H), 4.70 (d, J = 11.6 Hz, 1H), 4.31-4.26 (m, 2H), 4.02 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 3.99 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 3.91 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 3.87 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 3.83 (s, 6H), 3.81 (s, 2H), 3.81 (s, 3H), 1.34 (t, J = 7.3 Hz, 3H), 0.90 (s, 9H), 0.10 (s, 3H), 0.09 (s, 3H).

工程6

エチル 3-((tert-ブチルジメチルシリル)オキシ)-2-シアノ-2-(((イソプロピルジスルファニル)メトキシ)メチル)プロパノアート（化合物19F）

アルゴン雰囲気下、トリメチルオキソニウムテトラフルオロボラート（9.31 g, 63.0 mmol）をアセトニトリル（65 mL）に溶解し、氷冷下でジイソプロピルジスルフィド（10.0 mL, 63.0 mmol）を2 分間かけて滴下し、氷冷下で5.5 時間撹拌した。反応液の内温をドライアイス／アセトンバスで－40 ℃～

−45 ℃に保ちながら、化合物19E (6.47 g, 12.6 mmol) をアセトニトリル (65 mL) に溶解した溶液を滴下ロートを用いて、9分間かけて滴下した。滴下ロートをアセトニトリル (20 mL) で洗い込み、−40 ℃で30分間撹拌した。−40 ℃で反応液に飽和重曹水を2 分間かけて加えた後、室温まで昇温させた。反応液に水を加え、有機層を酢酸エチルで抽出し、水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧下で濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘプタン／酢酸エチル) で精製し、化合物19E (1.48 g, 29%) を得た。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ(ppm): 4.89 (d, J= 11.3 Hz, 1H), 4.86 (d, J= 11.3 Hz, 1H),4.31-4.26 (m, 2H), 4.01 (d, J= 9.1 Hz, 1H), 3.98 (d, J= 9.1 Hz, 1H), 3.95 (d, J= 9.6 Hz, 1H), 3.92 (d, J= 9.6 Hz, 1H), 3.08 (sep, J= 6.6 Hz, 1H), 1.33 (t, J= 7.1 Hz, 3H), 1.31 (d, J= 6.6 Hz, 6H), 0.89 (s, 9H), 0.10 (s, 3H), 0.09 (s, 3H).

[0103] 参考例20

工程1

エチル3-(tert-ブチルジメチルシリルオキシ)-2-シアノ-2-((トシルチオメトキシ)メチル)プロパナート(化合物20A)

化合物19D (371 mg, 1.10 mmol) を用い、参考例12の工程1と同様にして化合物20A (515 mg, 96%) を得た。

ESI-MS(m/z): 488 (M+1)

工程2

エチル 6-シアノ-14-ヒドロキシ-2,2,3,3-テトラメチル-4,8-ジオキサ-10,11-ジチア-3-シラテトラデカン-6-カルボキシラート(化合物20B)

化合物20A (555 mg, 1.14 mmol) を用い、参考例12の工程1と同様にして化合物20B (407 mg, 84%) を得た。

ESI-MS(m/z): 424 (M+1)

^{1}H-NMR($CDCl_3$, 400 MHz) δ(ppm): 4.91 (s, 2H), 4.35 - 4.24 (m, 2H), 3.99 (dd, J= 12.0, 9.6 Hz, 2H), 3.93 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 3.75 (t br, J

= 5.6 Hz, 2H), 2.92 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 1.99 - 1.92 (m, 2H), 1.34 (t, J = 7.2 Hz, 3H), 0.89 (s, 9H), 0.09 (d, J = 3.2 Hz, 6H).

工程3

エチル 11-シアノ-1,1-ビス(4-メトキシフェニル)-14,14,15,15-テトラメチル-1-フェニル-2,9,13-トリオキサ-6,7-ジチア-14-シラヘキサデカン-11-カルボキシラート（化合物20C）

化合物20B（1.55 g, 3.66 mmol）を用い、参考例14の工程2と同様にして化合物20C（2.63 g, 99%）を得た。

ESI-MS(m/z): 748 (M+Na)

^{1}H-NMR($CDCl_3$, 400 MHz) δ(ppm): 7.43 - 7.39 (m, 2H), 7.32 - 7.28 (m, 6H), 7.22 - 7.19 (m, 1H), 6.84 - 6.80 (m, 4H), 4.85 (d, J = 1.2 Hz, 2H), 4.31 - 4.19 (m, 2H), 3.97 (d, J = 2.0 Hz, 2H), 3.91 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 3.79 (s, 6H), 3.16 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 2.88 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 2.00 - 1.93 (m, 2H), 1.31 (t, J = 7.2 Hz, 3H), 0.88 (s, 9H), 0.08 (d, J = 2.4 Hz, 6H).

[0104] 参考例21

ジイソプロパ-2-イニル 2,2,3,3-テトラメチル-4,8-ジオキサ-10,11-ジチア-3-シラヘキサデカ-15-イン-6,6-ジカルボキシラート（化合物21A）

化合物17F（247 mg, 0.497 mmol）を用い、参考例12の工程2と同様にして化合物21A（112 mg, 58 %）を得た。

ESI-MS(m/z): 521 (M+Na)

^{1}H-NMR($CDCl_3$, 400 MHz) δ(ppm): 4.83 (s, 2H), 4.73 (dd, J = 2.4, 1.2 Hz, 4H), 4.13 (s, 2H), 4.10 (s, 2H), 2.84 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 2.47 (t, J = 2.4 Hz, 2H), 2.35 - 2.31 (m, 2H), 1.98 (t, J = 2.8 Hz, 1H), 1.95 - 1.88 (m, 2H), 0.86 (s, 9H), 0.06 (s, 6H).

[0105] 参考例22

工程1

Ctrl(5',3'dT)のセンス鎖(配列番号19)は、例えば、Protocols for Oligon

ucleotides and Analogs: Synthesis and Properties (Methods in Molecular Biology: Volume 20, 1993)等に記載の方法に従って合成した。

工程2

Ctrl(5',3'dT)のアンチセンス鎖(配列番号20)は、例えば、Protocols for Oligonucleotides and Analogs:
Synthesis and Properties (Methods in Molecular Biology: Volume 20, 1993)等に記載の方法に従って合成した。

工程3

工程1および2で得られた、Ctrl(5',3'dT)のセンス鎖およびアンチセンス鎖を用いて、例えば、Protocols for Oligonucleotides and Analogs: Synthesis and Properties (Methods in Molecular Biology: Volume 20, 1993)等に記載の方法に従いCtrl(5',3'dT)を得た。

[0106] [表3]

si RNA	配列番号	鎖	配列 (5'→3')
Ctrl(5',3' dT)	19	センス	GCCAGACUUUGUUGGAUUAGT
	20	アンチセンス	TAAUCCAACAAAGUCUGGCUT

[0107] (表中、A、G、C、TおよびUは、それぞれアデノシン、グアノシン、シチジン、チミジンおよびウリジンを表す)

[0108] 参考例23

工程1

化合物3を用いて、実施例5の工程1と同様にして、KON788のアンチセンス鎖(配列番号21)を得た。

ESI-MS 理論値 7065 実測値 7065

工程2

KON788のアンチセンス鎖を用い、実施例5の工程2と同様にして、KON788を得た。

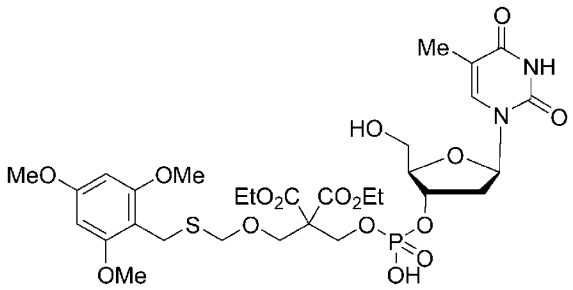
[0109]

[表4]

si RNA	配列番号	鎖	配列 (5'→3')
KON788	19	センス	GCCAGACUUUGUUGGAUUAGT
	21	アンチセンス	X^4AAUCCAACAAAGUCUGGCUT

[0110] (表中、A、G、C、TおよびUは、それぞれアデノシン、グアノシン、シチジン、チミジンおよびウリジンを表し、X^4は下記式で表される化合物に相当する残基を表す)

[化35]



[0111] 参考例24

工程1

ジエチル 2-((tert-ブチルジメチルシリルオキシ)メチル)-2-((ジスルファニルメトキシ)メチル)マロナート (化合物23A)

化合物1D (2.48 g, 6.21 mmol)をDMA (54.5 mL)に溶解し、ジソディウムジスルフィド (684 mg, 6.21 mmol)を加え、室温で90分間撹拌した。反応液に水を加え、有機層を酢酸エチルで抽出し、水および飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧下で溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン / 酢酸エチル)で精製し、化合物23A (1.85 g, 72%)を得た。

ESI-MS(m/z): 413 (M+H)

工程2

ジエチル 19-アジド-2,2,3,3-テトラメチル-4,8,14,17-テトラオキサ-10,11-ジチア-3-シラノナデカン-6,6-ジカルボキシラート (化合物23B)

化合物23A (1.52 g, 4.68 mmol)をDMA (20mL)に溶解し、1-アジド-2-(2-(2

-ヨードエトキシ)エトキシ)エタン (1.14 g, 4.00 mmol)およびDBU (3.01 mL, 20.0 mmol)を加え、室温で24時間撹拌した。反応液に水を加え、有機層を酢酸エチルで抽出し、水および飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧下で溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン / 酢酸エチル)で精製し、化合物23B (230 mg, 10%)を得た。

ESI-MS(m/z): 570 (M+H)

工程3

ジエチル 2-(13-アジド-2,8,11-トリオキサ-4,5-ジチアトリデシル)-2-(ヒドロキシメチル)マロナート (化合物23C)

化合物23B (285 mg, 0.500 mmol)を用いて、実施例1と同様にして化合物23C (120 mg, 53%) を得た。

ESI-MS(m/z): 455 (M+H)

工程4

ジエチル 19-アジド-4-((2R,3S,5R)-2-((ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)メチル)-5-(5-メチル-2,4-ジオキソ-3,4-ジヒドロピリミジン-1(2H)-イル)テトラヒドロフラン-3-イルオキシ)-3-イソプロピル-2-メチル-5,9,14,17-テトラオキサ-11-チア-3-アザ-4-ホスファノナデカン-7,7-ジカルボキシラート (化合物23D)

化合物23C (119 mg, 0.261 mmol)および化合物4B (263 mg, 0.343 mmol)を用いて、実施例2と同様にして、化合物23D (112 mg, 39%)を得た。

ESI-MS(m/z): 1090 (M+Na)

工程5

化合物23Dを用いて、実施例5の工程1と同様にして、KON840のアンチセンス鎖(配列番号25)を得た。

ESI-MS 理論値 7042 実測値 7041

工程6

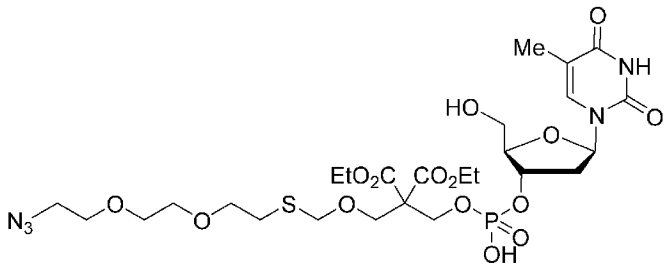
KON840のアンチセンス鎖を用いて、実施例5の工程2と同様にして、KON840を得た。

[0112] [表5]

si RNA	配列番号	鎖	配列 (5'→3')
KON840	19	センス	GCCAGACUUUGUUGGAUUAGT
	25	アンチセンス	X^5AAUCCAACAAAGUCUGGCUT

[0113] [表中、A、G、C、TおよびUは、それぞれアデノシン、グアノシン、シチジン、チミジンおよびウリジンを表し、X^5は下記式(式中Meはメチルを表し、Etはエチルを表し、N_3はアジドを表す)で表される化合物に相当する残基を表す]

[化36]



[0114] 参考例25

工程1

Ctrl(5'-F)のセンス鎖(配列番号19)は、例えば、Protocols for Oligonucleotides and Analogs:
Synthesis and Properties (Methods in Molecular Biology: Volume 20, 1993)等に記載の方法に従って合成した。

工程2

Ctrl(5'-F)のアンチセンス鎖(配列番号28)は、例えば、Protocols for Oligonucleotides and Analogs:
Synthesis and Properties (Methods in Molecular Biology: Volume 20, 1993)等に記載の方法に従って合成した。

工程3

工程1および2で得られた、Ctrl(5'-F)のセンス鎖およびアンチセンス鎖を用いて、例えば、Protocols for Oligonucleotides and Analogs: Synthesis and Properties (Methods in Molecular Biology: Volume 20, 1993)等に記

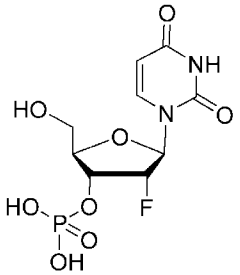
載の方法に従いCtrl(5’-F)を得た。

[0115] [表6]

si RNA	配列番号	鎖	配列 (5’→3’)
Ctrl(5′-F)	19	センス	GCCAGACUUUGUUGGAUUAGT
	28	アンチセンス	X^6AAUCCAACAAAGUCUGGCUT

[0116] (表中、A、G、C、TおよびUは、それぞれアデノシン、グアノシン、シチジン、チミジンおよびウリジンを表し、X^6は下記式で表される化合物に相当する残基を表す)

[化37]



[0117] 参考例26

工程1

wt924のセンス鎖(配列番号40)は、例えば、Protocols for Oligonucleotides and Analogs: Synthesis and Properties (Methods in Molecular Biology: Volume 20, 1993)等に記載の方法に従って合成した。

工程2

wt924のアンチセンス鎖(配列番号41)は、例えば、Protocols for Oligonucleotides and Analogs:
Synthesis and Properties (Methods in Molecular Biology: Volume 20, 1993)等に記載の方法に従って合成した。

工程3

工程1および2で得られた、wt924のセンス鎖およびアンチセンス鎖を用いて、例えば、Protocols for Oligonucleotides and Analogs: Synthesis and Properties (Methods in Molecular Biology: Volume 20, 1993)等に記載の方

法に従いwt924を得た。

[0118] 参考例27

工程1

wt925のアンチセンス鎖(配列番号42)は、例えば、Protocols for Oligonucleotides and Analogs:
Synthesis and Properties (Methods in Molecular Biology: Volume 20, 1993)等に記載の方法に従って合成した。

工程2

上記工程1および参考例26の工程1で得られた、wt925のアンチセンス鎖およびセンス鎖を用いて、
例えば、Protocols for Oligonucleotides and Analogs: Synthesis and Properties (Methods in Molecular Biology: Volume 20, 1993)等に記載の方法に従いwt925を得た。

[0119] 参考例28

工程1

wt926のアンチセンス鎖(配列番号43)は、例えば、Protocols for Oligonucleotides and Analogs: Synthesis and Properties (Methods in Molecular Biology: Volume 20, 1993)等に記載の方法に従って合成した。

工程2

上記工程1および参考例26の工程1で得られた、wt926のセンス鎖およびアンチセンス鎖を用いて、
例えば、Protocols for Oligonucleotides and Analogs: Synthesis and Properties (Methods in Molecular Biology: Volume 20, 1993)等に記載の方法に従いwt926を得た。

[0120]

[表7]

si RNA	配列番号	鎖	配列(5'-3')
wt924	40	センス	GUCAUCACACUGAAUACCAAU
	41	アンチセンス	TUUGGUAUUCAGUGUGAUGACAT
wt925	40	センス	GUCAUCACACUGAAUACCAAU
	42	アンチセンス	TsUUGGUAUUCAGUGUGAUGACAT
wt926	40	センス	GUCAUCACACUGAAUACCAAU
	43	アンチセンス	pTUUGGUAUUCAGUGUGAUGACAT

[0121] (表中A、G、C、TおよびUは、それぞれアデノシン、グアノシン、シチジン、チミジンおよびウリジンを表し、sはホスホロチオエート結合を表し、pは、5'-リン酸基を表す)

[0122] 参考例29

工程1

wt927のセンス鎖(配列番号47)は、例えば、Protocols for Oligonucleotides and Analogs: Synthesis and Properties (Methods in Molecular Biology: Volume 20, 1993)等に記載の方法に従って合成した。

工程2

wt927のアンチセンス鎖(配列番号48)は、例えば、Protocols for Oligonucleotides and Analogs:
Synthesis and Properties (Methods in Molecular Biology: Volume 20, 1993)等に記載の方法に従って合成した。

工程3

工程1および2で得られた、wt927のセンス鎖およびアンチセンス鎖を用いて、例えば、Protocols for Oligonucleotides and Analogs: Synthesis and Properties (Methods in Molecular Biology: Volume 20, 1993)等に記載の方法に従いwt927を得た。

[0123] 参考例30

工程1

wt928のアンチセンス鎖(配列番号49)は、例えば、Protocols for Oligonuc

leotides and Analogs:
Synthesis and Properties (Methods in Molecular Biology: Volume 20, 1993)等に記載の方法に従って合成した。

工程2

上記工程1および参考例29の工程1で得られた、wt928のアンチセンス鎖およびセンス鎖を用いて、
例えば、Protocols for Oligonucleotides and Analogs: Synthesis and Properties (Methods in Molecular Biology: Volume 20, 1993)等に記載の方法に従いwt928を得た。

[0124] 参考例31

工程1

参考例28の工程1と同様にして、wt929のアンチセンス鎖(配列番号50)を得た。

工程2

上記工程1および参考例29の工程1で得られた、wt929のアンチセンス鎖およびセンス鎖を用いて、
例えば、Protocols for Oligonucleotides and Analogs: Synthesis and Properties (Methods in Molecular Biology: Volume 20, 1993)等に記載の方法に従いwt929を得た。

[0125] [表8]

siRNA	配列番号	鎖	配列(5'-3')
wt927	47	センス	CCGUCGUAUUCGUGAGCAAGA
	48	アンチセンス	TUGCUCACGAAUACGACGGUT
wt928	47	センス	CCGUCGUAUUCGUGAGCAAGA
	49	アンチセンス	TsUGCUCACGAAUACGACGGUT
wt929	47	センス	CCGUCGUAUUCGUGAGCAAGA
	50	アンチセンス	pTUGCUCACGAAUACGACGGUT

[0126] (表中A、G、C、TおよびUは、それぞれアデノシン、グアノシン、シチジン、チミジンおよびウリジンを表し、sはホスホロチオエート結合を表し、pは5'-

リン酸基を表す)

[0127] 参考例32

工程1

wt930のセンス鎖(配列番号54)は、例えば、Protocols for Oligonucleotides and Analogs: Synthesis and Properties (Methods in Molecular Biology: Volume 20, 1993)等に記載の方法に従って合成した。

工程2

wt930のアンチセンス鎖(配列番号55)は、例えば、Protocols for Oligonucleotides and Analogs:
Synthesis and Properties (Methods in Molecular Biology: Volume 20, 1993)等に記載の方法に従って合成した。

工程3

工程1および2で得られた、wt930のセンス鎖およびアンチセンス鎖を用いて、例えば、Protocols for Oligonucleotides and Analogs: Synthesis and Properties (Methods in Molecular Biology: Volume 20, 1993)等に記載の方法に従いwt930を得た。

[0128] 参考例33

工程1

wt931のアンチセンス鎖(配列番号56)は、例えば、Protocols for Oligonucleotides and Analogs:
Synthesis and Properties (Methods in Molecular Biology: Volume 20, 1993)等に記載の方法に従って合成した。

工程2

上記工程1および参考例29の工程1で得られた、wt931のアンチセンス鎖およびセンス鎖を用いて、
例えば、Protocols for Oligonucleotides and Analogs: Synthesis and Properties (Methods in Molecular Biology: Volume 20, 1993)等に記載の方法に従いwt931を得た。

[0129] 参考例34

工程1

wt932のアンチセンス鎖(配列番号57)は、例えば、Protocols for Oligonucleotides and Analogs:
Synthesis and Properties (Methods in Molecular Biology: Volume 20, 1993)等に記載の方法に従って合成した。

工程2

上記工程1および参考例29の工程1で得られた、wt932のアンチセンス鎖およびセンス鎖を用いて、
例えば、Protocols for Oligonucleotides and Analogs: Synthesis and Properties (Methods in Molecular Biology: Volume 20, 1993)等に記載の方法に従いwt932を得た。

[0130] [表9]

si RNA	配列番号	鎖	配列(5'-3')
wt930	54	センス	CCUUCAUUGACCUCAACUACA
	55	アンチセンス	TAGUUGAGGUCAAUGAAGGGT
wt931	54	センス	CCUUCAUUGACCUCAACUACA
	56	アンチセンス	TsAGUUGAGGUCAAUGAAGGGT
wt932	54	センス	CCUUCAUUGACCUCAACUACA
	57	アンチセンス	pTAGUUGAGGUCAAUGAAGGGT

[0131] (表中A、G、C、TおよびUは、それぞれアデノシン、グアノシン、シチジン、チミジンおよびウリジンを表し、sはホスホロチオエート結合を表し、pは5'-リン酸基を表す)

[0132] 参考例35

実施例5の工程1および2と同様にして、CD45を標的とするオリゴヌクレオチドCD45 ABC (配列番号9)を得た。

ホスホロチオエート製造時の硫化剤としては、ピリジンおよびアセトニトリル混合溶媒中で3-((N,N-ジメチルアミノメチリデン)アミノ)-3H-1,2,4-ジ

チアゾール-5-チオン(DDTT) を用い、5分間反応させた。

[0133] 参考例36

参考例35と同様にして、CD45を標的とするオリゴヌクレオチド CD45 x2PO (配列番号10)を得た。

[0134] [表10]

オリゴヌクレオチド	配列番号	配列 (5'→3')
CD45 ABC	9	mCsmCsmAsmAsAsTsGsCsCsAsAsGsmAsmGsmUsT
CD45 X2PO	10	mCsmCsmAsmAsmAsTGsCsCsAsAsGsmAsmGsmUT

[0135] (表中、A、G、CおよびTは、それぞれ2'-デオキシアデノシン、2'-デオキシグアノシン、2'-デオキシシチジンおよびチミジンを表し、mA、mG、mCおよびmUはそれぞれ前記と同義であり、sはホスホロチオエート結合を表す)

[0136] 参考例37

参考例35と同様にして、FGFR4を標的とするオリゴヌクレオチドFGFR4 PS (配列番号12)を得た。

[0137] 参考例38

参考例35と同様にして、FGFR4を標的とするオリゴヌクレオチドFGFR4 PO (配列番号13)を得た。

[0138] [表11]

オリゴヌクレオチド	配列番号	配列 (5'→3')
FGFR4 PS	12	(T)s[C]s(T)s[C]s(T)sTsTsGsGsTsCsAsCsAsCs[C]s[G]s(T)s[C]sT
FGFR4 PO	13	(T)s[C]s(T)s[C]s(T)sTsTsGsGsTCsAsCsAsCs[C]s[G]s(T)s[C]sT

[0139] {表中、A、G、CおよびTは、それぞれ2'-デオキシアデノシン、2'-デオキシグアノシン、2'-デオキシシチジンおよびチミジンを表し、sは、それぞれ前記と同義であり、[ ]は、[ ]内で表されるヌクレオシドの2'位にメトキシを有するヌクレオシドを表し、( )は( )内で表されるヌクレオシドのリボース部分がLNAであるヌクレオシドを表す}

[0140] 参考例39

参考例35と同様にして、PTENを標的とするオリゴヌクレオチドwtKON708 (

配列番号15)を得た。

[0141] 参考例40

参考例35と同様にして、PTENを標的とするオリゴヌクレオチドwtKON715（配列番号16）を得た。

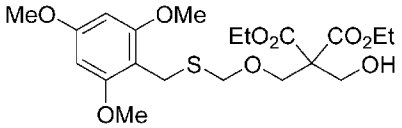
[0142] [表12]

オリゴヌクレオチド	配列番号	配列（5'→3'）
wtKON708	15	mTsmTsdAsdGsdCsdAsdCsTsdGsdGsmCsmCsT
wtKON715	16	mUmUsdAsdGsdCsdAsdCsTsdGsdGsmCsmCsT

[0143] (表中、Tは、チミジンを表し、mC、mU、mTおよびsはそれぞれ前記と同義であり、dA、dGおよびdCは、それぞれ2'-デオキシアデノシン、2'-デオキシグアノシンおよび2'-デオキシシチジンを表す)

[0144] 実施例1

[化38]



化合物1F

(式中、Meはメチルを表し、Etはエチルを表す)

ジエチル2-(ヒドロキシメチル)-2-((((2,4,6-トリメトキシベンジル)チオ)メトキシ)メチル)マロナート(化合物1F)

参考例1の工程4で得られた化合物1E(3.78 g, 6.74 mmol)をTHF (35 mL)に溶解させ、トリエチルアミン三ふっ化水素酸塩(3.26 g, 20.2 mmol)を加え、室温で3日間撹拌した。反応液に2 mol/L トリエチルアミン酢酸塩水溶液および水を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を水および飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧下で溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン / 酢酸エチル)で精製し化合物1F(2.43 g, 81%)を得た。

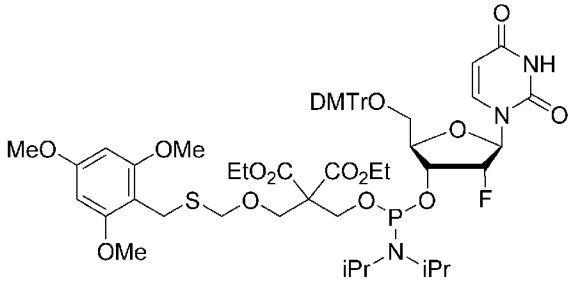
ESI-MS(m/z): 447(M+1)

^{1}H-NMR($CDCl_3$, 400MHz) δ: 6.12 (s, 2H), 4.70 (s, 2H), 4.23 (q, J = 7.1

Hz, 4H), 4.07 (d, J = 7.0 Hz,2H), 4.00 (s, 2H), 3.84 (s, 2H), 3.82 (s, 6H), 3.81 (s, 3H), 2.71 (t, J = 7.0 Hz, 1H), 1.27 (t, J = 7.1 Hz, 3H).

[0145] 実施例2

[化39]



化合物1

［式中、MeおよびEtは、それぞれ前記と同義であり、iPrはイソプロピルを表し、DMTrはジ(p-メトキシフェニル)フェニルメチルを表す］

ジエチル-9-((2R,3R,4R,5R)-2-((ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)メチル)-5-(2,4-ジオキソ-3,4-ジヒドロピリミジン-1(2H)-イル)-4-フルオロテトラヒドロフラン-3-イルオキシ)-10-イソプロピル-11-メチル-1-(2,4,6-トリメトキシフェニル)-4,8-ジオキサ-2-チア-10-アザ-9-ホスファドデカン-6,6-カルボキシラート（化合物1）

実施例1で得られた化合物1F(2.43 g, 5.44 mmol)および参考例2で得られた化合物2B(5.51 g, 7.07 mmol)をアセトニトリル(31 mL)に溶解させ、室温で1H-テトラゾール(0.762 g, 10.9 mmol)を加え、室温で1時間撹拌した。反応液に水を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を水および飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧下で溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン / 酢酸エチル)で精製し、化合物1(3.18 g, 52%)を得た。

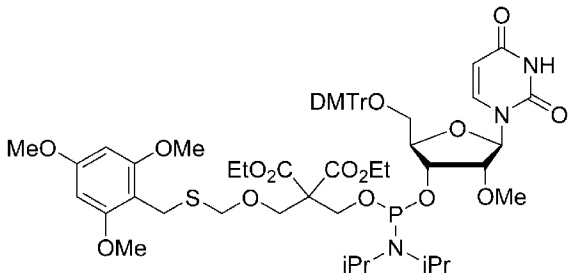
ESI-MS(m/z): 1125 (M+1)

^{1}H-NMR($CDCl_3$, 400MHz) δ (ppm): 7.96 - 8.06 (m, 2H), 7.13 - 7.43 (m, 12H), 6.81 - 6.86 (m, 4H), 6.01 - 6.10 (m, 2H), 4.90 - 5.30 (m ,2H), 4.48 - 4.55 (m, 2H), 3.92 - 4.27 (m, 9H), 3.75 - 3.80 (m, 15H), 3.43 -

3.70 (m, 5H), 1.05 - 1.27 (m, 18H).

[0146] 実施例3

[化40]



化合物2

(式中Me、Et、iPrおよびDMTrは、それぞれ前記と同義である)

ジエチル-9-((2R,3R,4R,5R)-2-((ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)メチル)-5-(2,4-ジオキソ-3,4-ジヒドロピリミジン-1(2H)-イル)-4-メトキシテトラヒドロフラン-3-イルオキシ)-10-イソプロピル-11-メチル-1-(2,4,6-トリメトキシフェニル)-4,8-ジオキサ-2-チア-10-アザ-9-ホスファドデカン-6,6-カルボキシラート(化合物2)

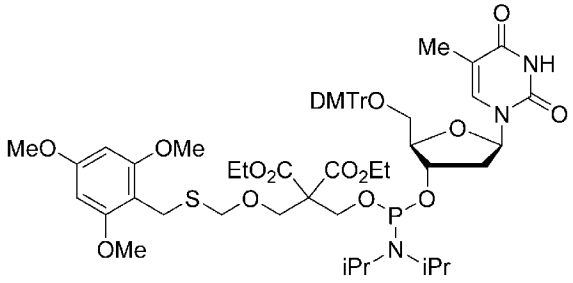
実施例1で得られた化合物1F(0.498 g, 1.12 mmol)および参考例3で得られた化合物3B(0.970 g, 1.23 mmol)を用い、実施例2の工程1と同様にして、化合物2 (0.298 g, 24%)を得た。

ESI-MS(m/z): 1137 (M+1)

^{1}H-NMR($CDCl_3$, 400MHz) δ (ppm): 7.89 - 8.08 (m, 2H), 7.20 - 7.52 (m, 12H), 6.78 - 6.86 (m, 4H), 6.10 (s, 1.5H), 6.09 (s, 0.5H), 5.93 - 5.99 (m, 1H), 5.18 - 5.28 (m, 1H), 4.38 - 4.60 (m, 2H), 3.91 - 4.31 (m, 7H), 3.40 - 3.80 (25H), 0.96 - 1.28 (m, 18H).

[0147] 実施例4

[化41]



化合物3

(式中Me、Et、iPrおよびDMTrは、それぞれ前記と同義である)

ジエチル-9-((2R,3S,5R)-2-((ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)メチル)-5-(5-メチル-2,4-ジオキソ-3,4-ジヒドロピリミジン-1(2H)-イル)-テトラヒドロフラン-3-イルオキシ)-10-イソプロピル-11-メチル-1-(2,4,6-トリメトキシフェニル)-4,8-ジオキサ-2-チア-10-アザ-9-ホスファドデカン-6,6-カルボキシラート(化合物3)

実施例1で得られた化合物1F(0.400 g, 0.896 mmol)および参考例4で得られた化合物4B(0.902 g, 1.17 mmol)を用い、実施例2の工程1と同様にして、化合物3(0.458 g, 46%)を得た。

ESI-MS(m/z): 1121 (M+1)

^{1}H-NMR($CDCl_3$, 400MHz) δ (ppm): 7.92 (br s, 1H), 7.48 - 7.63 (m, 1H), 7.20 - 7.41 (m, 12H), 6.80 - 6.84 (m, 4H), 6.36 - 6.40 (m, 1H), 6.10 (s, 1.5H), 6.10 (s, 0.5H), 4.50 - 4.70 (m, 3H), 3.95 - 4.26 (m, 8H), 3.28 - 3.84 (m, 22H), 2.26 - 2.53 (m, 2H), 1.02 - 1.44 (m, 18H).

[0148] 実施例5

HPRT1を標的とするsiRNA (3-Y)を以下の工程1および2に従って合成した。

工程1

実施例2で得られた化合物1、および固相担体としてCPG 500オングストローム, dT-Q-CPG (Glen Research社)を用い、DMT-2'-O-TBDMS-rA(tac)アミダイト(SAFC-PROLIGO社)、DMT-2'-O-TBDMS-rG(tac)アミダイト(SAFC-PROLIGO社)、DMT-2'-O-TBDMS-rC(tac)アミダイト(SAFC-PROLIGO社)、およびDMT-2'-O-TBDMS-rUアミダイト(SAFC-PROLIGO社)は、それぞれ0.1 mol/Lアセトニトリル

溶液となるように調製し、ホスホロアミダイト(Glen Research社)は0.1 mol/Lアセトニトリル溶液となるように調製した。核酸合成装置(日本テクノサービス社製、以下M-7)および、固相担体を0.2 μmol用いて合成を行った。ホスホロアミダイトのアクチベーターとしてアクチベーター42(SAFC-PROLIGO社)を用い、縮合時間は、各10分間とした。リン酸エステルを製造する際の酸化剤としては、ピリジン、THF、水およびヨウ素を含有する溶液(例えば、アルドリッチ社製　オキシダイザー 0.02 M等)を用い、10秒間反応させた。生成物をトリクロロ酢酸を用いてトリチルオフした後、ジイソプロピルアミンで処理し、トリエチルアミン三ふっ化水素酸塩を用いてTBS（tert-ブチルジメチルシリル）基を脱保護し、逆相液体クロマトグラフィー（Waters, XBridge (R) C18, 4.6 mm x 250 mm、A液:0.1%酢酸トリエチルアンモニウム緩衝液、B液:アセトニトリルによるグラジエント)で精製し、siRNA (3-Y)のアンチセンス鎖(配列番号4)を得た。

ESI-MS 理論値 7196 実測値 7196.

工程2

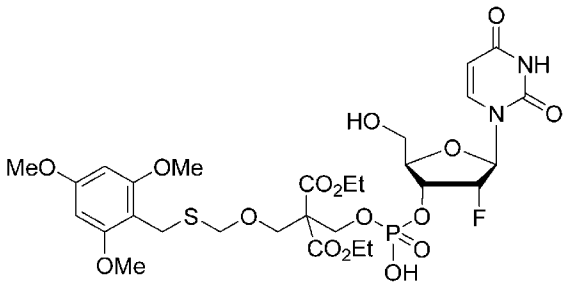
siRNA(3-Y)のアンチセンス鎖(配列番号4)およびセンス鎖(配列番号1)を各々等量混合し、PBS緩衝液に溶解し、85 ℃で5分間静置した。徐々に温度を下げ、反応物を37 ℃で1時間静置し、siRNA (3-Y)を得た。

[0149] [表13]

siRNA	配列番号	鎖	配列 (5'→3')
3-Y	1	センス	GmCCmAGmACmUUmUGmUUmGGmAUmUAmGT
	4	アンチセンス	YAmAUmCCmAAmCAmAAmGUmCUmGGmCUT

[0150] [表中、A、G、C、TおよびUは、それぞれ、アデノシン、グアノシン、シチジン、チミジンおよびウリジンを表し、mA、mG、mCおよびmUは、それぞれ前記と同義であり、Yは、下記式(式中MeおよびEtは、それぞれ前記と同義である)で表される化合物に相当する残基を表す]

[化42]



[0151] 実施例6

HPRT1を標的とするsiRNA (4-Z)を以下の工程1および2に従って合成した。

工程1

siRNA (3-Y)のアンチセンス鎖(150μmol/L)を200 mmol/L 酢酸緩衝液(pH4)に、30 mmol/Lとなるようにテトラフルオロほう酸ジメチル(メチルチオ)スルホニウムを加え、室温で3時間静置した。逆相液体クロマトグラフィー(Waters, XBridge(R) C18, 4.6 mm x 250 mm、A液:0.1%酢酸トリエチルアンモニウム緩衝液、B液:アセトニトリルによるグラジエント)を用いて精製し、siRNA(4-Z)のアンチセンス鎖(配列番号5)を得た。

ESI-MS 理論値 7061 実測値 7062.

工程2

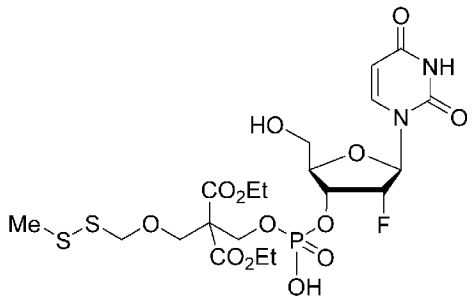
実施例5の工程2と同様にして、siRNA (4-Z) のアンチセンス鎖(配列番号5)およびセンス鎖(配列番号1)からsiRNA (4-Z)を得た。

[0152] [表14]

si RNA	配列番号	鎖	配列 (5'→3')
4-Z	1	センス	GmCCmAGmACmUUmUGmUUmGGmAUmUAmGT
	5	アンチセンス	ZAmAUmCCmAAmCAmAAmGUmCUmGGmCUT

[0153] [表中、A、G、C、TおよびUは、それぞれ、アデノシン、グアノシン、シチジン、チミジンおよびウリジンを表し、mA、mG、mCおよびmUは、それぞれ前記と同義であり、Zは下記式(式中MeおよびEtは、それぞれ前記と同義である)で表される化合物に相当する残基を表す]

[化43]



[0154] 実施例7

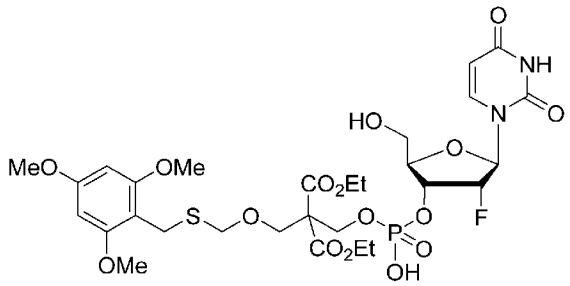
HPRT1を標的とするsiRNA(5-Z)を以下の工程1および2に従って合成した。

工程1

実施例5の工程1と同様にして、5'末端に下記式で表される構造に相当する残基を有するsiRNA(5-Z)のアンチセンス鎖の前駆体(配列番号6の前駆体)を得た。

ESI-MS 理論値 7203 実測値 7202.

[化44]



(式中、MeおよびEtは前記と同義である)

工程2

実施例6の工程1と同様にして、上記siRNA(5-Z)のアンチセンス鎖の前駆体(配列番号6の前駆体)からsiRNA(5-Z)のアンチセンス鎖(配列番号7)を得た。

ESI-MS 理論値 7069 実測値 7068.

工程3

実施例5の工程2と同様にして、上記siRNA(5-Z)のアンチセンス鎖(配列番号7)および参考例9のsiRNA (5-Z)のセンス鎖(配列番号6)を用いて、siRNA (5-Z)を得た。

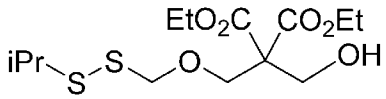
[0155] [表15]

si RNA	配列番号	鎖	配列 (5'→3')
5-Z	6	センス	Ch-GmCCmAGmACmUfUmUGmUfUmGGmAfUmUAmGT
	7	アンチセンス	ZAmAfUmCCmAAmCAmAAmGfUmCfUmGGmCfUT

[0156] (表中、A、G、C、TおよびUは、それぞれ、アデノシン、グアノシン、シチジン、チミジンおよびウリジンを表し、mA、mG、mC、mU、fU、Ch-GおよびZはそれぞれ前記と同義である)

[0157] 実施例8

[化45]



化合物6

(式中、EtおよびiPrは前記と同義である)

ジエチル 2-(ヒドロキシメチル)-2-(((イソプロピルジスルファニル)メトキシ)メチル)マロナート(化合物6)

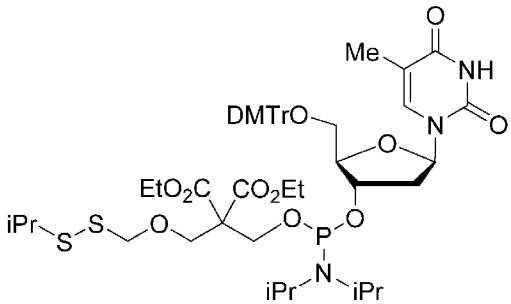
化合物12B (0.489 g, 1.08 mmol) を用い、実施例1の工程1と同様にして、化合物6 (0.286 g, 78%) を得た。

ESI-MS(m/z): 341 (M+1)

^{1}H-NMR($CDCl_3$, 400 MHz) δ(ppm): 4.81 (s, 2H), 4.24 (q, J = 7.2 Hz, 4H), 4.11 (d, J= 6.3 Hz, 2H), 4.04 (s, 2H), 3.09 - 3.00 (m, 1H), 2.46 - 2.26 (m, 1H), 1.31 - 1.26 (m, 12H).

[0158] 実施例9

[化46]



化合物7

(式中、Me、Et、iPrおよびDMTrは、それぞれ前記と同義である)

ジエチル 4-((2R,3S,5R)-2-((ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)メチル)-5-(5-メチル-2,4-ジオキソ-3,4-ジヒドロピリミジン-1(2H)-イル)テトラヒドロフラン-3-イルオキシ)-3-イソプロピル-2,13-ジメチル-5,9-ジオキサ-11,12-ジチア-3-アザ-4-ホスファテトラデカン-7,7-ジカルボキシラート (化合物7)

化合物4B (0.605 g, 0.701 mmol) および化合物6 (0.205 g, 0.601 mmol) を用い、実施例2の工程1と同様にして、化合物8 (0.380 g, 62%) を得た。

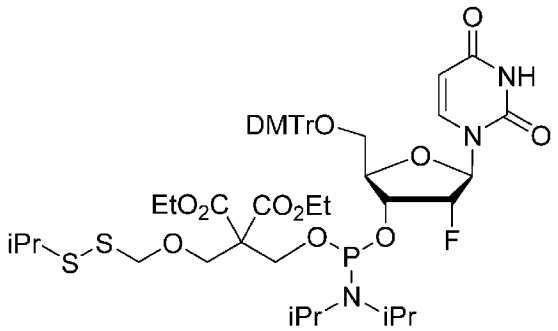
ESI-MS(m/z): 1015 (M+1)

^{1}H-NMR($CDCl_3$, 400 MHz) δ(ppm): 8.62 - 8.00 (m, 1H), 7.50 - 7.25 (m, 9H), 6.89 - 6.83 (m, 4H), 5.98 - 5.88 (m, 1H), 5.36 - 5.31 (m, 1H), 5.00 (d, J = 3.3 Hz, 0.5H), 4.87 (d, J = 3.3 Hz, 0.5H) , 4.77 - 4.48 (m, 2H), 4.28 - 3.93 (m, 10H), 3.81 - 3.79 (m, 6H), 3.66 - 3.42 (m, 4H), 3.00 - 2.76 (m, 4H), 1.28 - 1.06 (m, 23H).

^{31}P-NMR($CDCl_3$, 162MHz) δ (ppm): 150.6, 149.1.

[0159] 実施例10

[化47]



化合物8

(式中、Et、iPrおよびDMTrは、それぞれ前記と同義である)

ジエチル 2-((((((2R,3R,4R,5R)-2-((ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)メチル)-5-(2,4-イオキソ-3,4-ジヒドロピミジン-1(2H)-イル)-4-フルオロテトラヒドロフラニル-3-イル)オキシ)(ジイソプロピルアミノ)ホスファニル)オキシ)メチル)-2-(((イソプロピルジスルファニル)メトキシ)メチ

ル)マロナート（化合物8）

化合物2B（422 mg, 542 μmol）および化合物6（142 mg, 417 μmol）を用い、実施例2の工程1と同様にして、化合物8（98 mg, 23%）を得た。

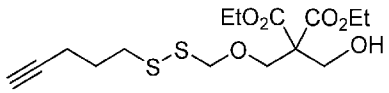
ESI-MS(m/z): 1019 (M+1)

^{1}H-NMR($CDCl_3$, 400 MHz) δ(ppm): 8.60 - 8.00 (m, 1H), 7.48 - 7.22 (m, 10H), 6.88 - 6.82 (m, 4H), 6.01 - 5.98 (m, 1H), 5.34 - 5.31 (m, 1H), 5.00 (d, J = 3.3 Hz, 0.5H), 4.87 (d, J = 3.3 Hz, 0.5H) , 4.74 - 4.45 (m, 2H), 4.25 - 3.93 (m, 10H), 3.80 - 3.79 (m, 6H), 3.64 - 3.43 (m, 4H), 3.00 - 2.87 (m, 1H), 1.28 - 1.06 (m, 23H).

^{31}P-NMR($CDCl_3$, 162MHz) δ (ppm): 150.9, 149.3.

[0160] 実施例11

[化48]



化合物9

(式中、Etは、前記と同義である)

ジエチル 2-(ヒドロキシメチル)-2-(((ペンタ-4-イニルジスルファニル)メトキシ)メチル)マロナート（化合物9）

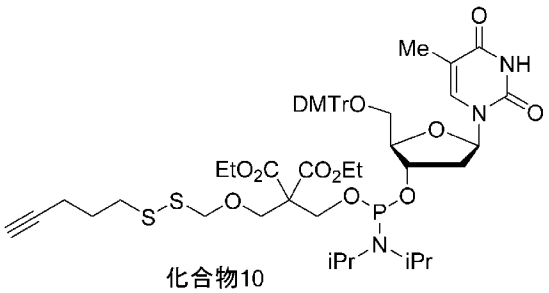
化合物13A（0.615 g, 1.29 mmol）を用い、実施例1と同様にして、化合物9（0.438 g, 93%）を得た。

ESI-MS(m/z): 365 (M+1)

^{1}H-NMR($CDCl_3$, 400 MHz) δ(ppm): 4.83 (s, 2H), 4.24 (q, J = 7.2 Hz, 4H), 4.13 (d, J= 6.8 Hz, 2H), 4.04 (s, 2H), 3.00 (t, J= 6.8 Hz, 1H), 2.85 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 2.37 - 2.31 (m, 2H), 1.98 (t, J= 2.4 Hz, 1H), 1.95 - 1.88 (m, 2H), 1.28 (t, J = 7.2 Hz, 6H).

[0161] 実施例12

[化49]



化合物10

(式中、Me、Et、iPrおよびDMTrは、それぞれ前記と同義である)

ジエチル 4-((2R,3S,5R)-2-((ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)メチル)-5-(5-メチル-2,4-ジオキソ-3,4-ジヒドロピリミジン-1(2H)-イル)テトラヒドロフラン-3-イルオキシ)-3-イソプロピル-2-メチル-5,9-ジオキサ-11,12-ジチア-3-アザ-4-ホスファヘプタデカ-16-イン-7,7-ジカルボキシラート (化合物10)

化合物4B (0.152 g, 0.196 mmol) および化合物9 (55.0 mg, 0.151 mmol) を用い、実施例2の工程1と同様にして、化合物10 (44 mg, 28%) を得た。

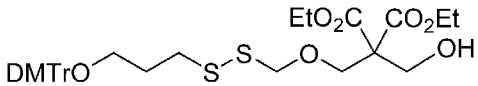
ESI-MS(m/z): 1038 (M+1)

^{1}H-NMR($CDCl_3$, 400 MHz) δ (ppm): 8.09 -7.86 (m, 2H), 7.50 - 7.20 (m, 10H), 6.88 - 6.79 (m, 4H), 6.06 - 6.02 (m, 1H), 5.42 - 5.32 (m, 1H), 5.33 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 5.01 (d, J = 3.8 Hz, 0.5H), 4.88 (d, J = 3.8 Hz, 0.5H), 4.72 (dd, J = 10.1, 11.2 Hz, 2H), 4.58 - 4.42 (m, 1H), 4.20 - 3.88 (m, 10H), 3.80 - 3.77 (m, 6H), 3.62 - 3.43 (m, 4H), 2.71 - 2.55 (m, 2H), 2.25 - 2.01 (m, 3H), 1.37 - 1.06 (m, 16H), 0.90 - 0.84 (m, 4H).

^{31}P-NMR($CDCl_3$, 162MHz) δ (ppm): 150.6, 149.5.

[0162] 実施例13

[化50]



化合物11

(式中、EtおよびDMTrは、それぞれ前記と同義である)

ジエチル 2-((((3-(ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)プロピル)ジスルファニル)メトキシ)メチル)-2-(ヒドロキシメチル)マロナート（化合物11）

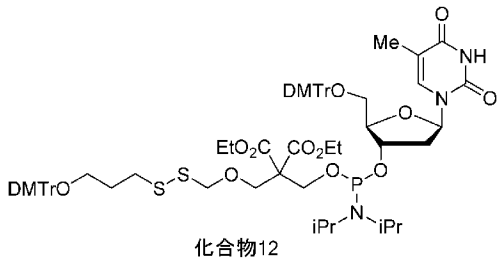
化合物14B（0.210 g, 0.272 mmol）を用いて、実施例1と同様にして化合物11（0.143 g, 80%）を得た。

ESI-MS(m/z): 657 (M-1)

^{1}H-NMR($CDCl_3$, 400 MHz) δ (ppm): 7.43 - 7.40 (m, 2H), 7.32 - 7.27 (m, 6H), 7.23 - 7.18 (m, 1H), 6.84 - 6.80 (m, 4H), 4.79 (s, 2H), 4.22 (q, J = 7.0 Hz, 4H), 4.09 (d, J = 6.6 Hz, 2H), 4.02 (s, 2H), 3.79 (s, 6H), 3.15 (t, J = 6.1 Hz, 2H), 2.85 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 2.37 (t, J = 6.8 Hz, 1H), 2.00 - 1.93 (m, 2H), 1.26 (t, J = 7.0 Hz, 6H).

[0163] 実施例14

[化51]



化合物12

（式中、Me、Et、iPrおよびDMTrは、それぞれ前記と同義である）

ジエチル 2-((((((2R, 3S, 5R)-2-((ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)メチル)-5-(5-メチル-2,4-ジオキソ-3,4-ジヒドロピリミジン-1(2H)-イル)テトラヒドロフラン-3-イル)オキシ)(ジイソプロピルアミノ)ホスファニル)オキシ)メチル)-2-((((3-(ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)プロピル)ジスルファニル)メトキシ)メチル)マロナート（化合物12）

化合物4B（0.199 g, 0.257 mmol）および化合物11（0.130 g, 0.197 mmol）を用い、実施例2と同様にして、化合物12（0.109 g, 42%）を得た。

ESI-MS(m/z): 1355 (M+Na)

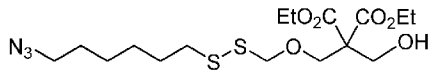
^{1}H-NMR($CDCl_3$, 400 MHz) δ (ppm): 7.89 - 7.19(m ,19H), 6.85 - 6.79(m, 8H), 6.40 - 6.35(m, 1H), 4.78 - 4.57(m, 3H), 4.19 - 3.93(m, 9H), 3.80

- 3.76(m, 12H), 3.57 - 3.27(m, 4H), 3.16 - 3.11(m, 2H), 2.82 - 2.76(m, 2H), 2.52 - 2.24(m, 4H), 1.97 - 1.88(m, 2H), 1.44 - 1.38(m, 3H), 1.29 - 1.00(m, 18H).

^{31}P-NMR($CDCl_3$, 162MHz) δ (ppm): 149.4, 147.8.

[0164] 実施例15

[化52]



化合物13

(式中、EtおよびN$_3$は、それぞれ前記と同義である)

ジエチル 2-((((6-アジドヘキシル)ジスルファニル)メトキシ)メチル)-2-(ヒドロキシメチル)マロナート (化合物13)

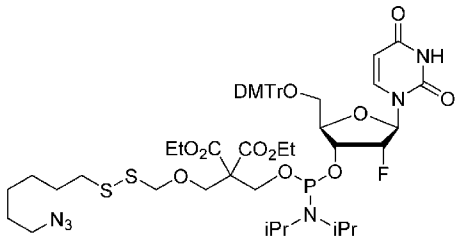
化合物15C (267 mg、0.496 mmol) をTHF (2.5mL) に溶解し、トリエチルアミントリヒドロフルオライド (400 mg、2.48 mmol) を加え、室温で7日間攪拌した。反応液に飽和重曹水を加えた後、有機層を酢酸エチルで抽出し、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧下で濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン／酢酸エチル)で精製し、化合物13 (208 mg, 99 %)を得た。

ESI-MS(m/z): 446 (M+Na)

^{1}H-NMR($CDCl_3$, 400 MHz) δ(ppm): 4.82 (s, 2H), 4.24 (q, J = 7.2 Hz, 4H), 4.12 (d, J= 6.8 Hz, 2H), 4.04 (s, 2H), 3.27 (t, J= 6.8 Hz, 2H), 2.75 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 2.42 (t, J = 6.8 Hz, 1H), 1.73 - 1.58 (m, 4H), 1.47 - 1.34 (m, 4H), 1.28 (t, J= 7.2 Hz, 6H).

[0165] 実施例16

[化53]



化合物14

(式中、Et、iPr、DMTrおよびN_3は、それぞれ前記と同義である)

ジエチル 18-アジド-4-((2R,3R,4R,5R)-2-((ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)メチル)-5-(2,4-ジオキソ-3,4-ジヒドロピリミジン-1(2H)-イル)-4-フルオロテトラヒドロフラン-3-イルオキシ)-3-イソプロピル-2-メチル-5,9-ジオキサ-11,12-ジチア-3-アザ-4-ホスファオクタデカン-7,7-ジカルボキシラート (化合物14)

化合物2B (0.497 g, 0.638 mmol)および化合物13 (0.208 g, 0.491 mmol)を用い、実施例2の工程1と同様にして、化合物14 (0.058 g, 11%)を得た。

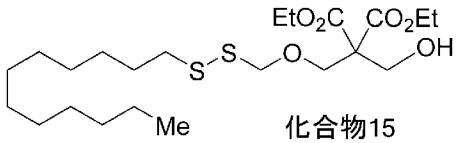
ESI-MS(m/z): 1124 (M+Na)

^{1}H-NMR($CDCl_3$, 400 MHz) δ (ppm): 8.07 (d, J= 8.1 Hz, 1H), 7.91 (br s, 1H), 7.45 - 7.22 (m, 10H), 6.87 - 6.82 (m, 1H), 6.17 (d, , J = 16.0 Hz, 1H), 5.32 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 5.00 (d, J = 3.8 Hz, 0.5H), 4.87 (d, J = 3.8 Hz, 0.5H), 4.70 (dd, J = 10.2, 11.3 Hz, 2H), 4.56 - 4.46 (m, 1H), 4.23 - 3.93 (m, 10H), 3.80 - 3.79 (m, 6H), 3.62 - 3.23 (m, 6H), 2.71 - 2.59 (m, 2H), 1.40 - 1.11 (m, 25H).

^{31}P-NMR($CDCl_3$, 162MHz) δ (ppm): 150.9.

[0166] 実施例17

[化54]



化合物15

(式中、MeおよびEtは前記と同義である)

ジエチル 2-(((ドデシルジスルファニル)メトキシ)メチル)-2-(ヒドロキシメチル)マロナート (化合物19)

化合物16A (463 mg、0.797 mmol)を用い、実施例1と同様にして化合物15 (371 mg, 100 %)を得た。

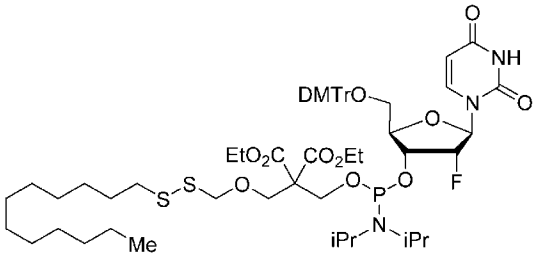
ESI-MS(m/z): 489 (M+Na)

^{1}H-NMR($CDCl_3$, 400 MHz) δ(ppm): 4.82 (s, 2H), 4.24 (q, J = 7.2 Hz, 4H), 4.12 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 4.04 (s, 2H), 2.74 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 2

.45 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 1.70 - 1.62 (m, 2H), 1.39 - 1.33 (m, 2H), 1.28 (t, J = 7.2 Hz, 6H), 1.30 - 1.26 (m, 16H), 0.88 (t, J = 6.4 Hz, 3H).

[0167] 実施例18

[化55]



化合物16

(式中、Me、Et、iPrおよびDMTrはそれぞれ前記と同義である)

ジエチル 2-((((((2R,3R,4R,5R)-2-((ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)メチル)-5-(2,4-ジオキソ-3,4-ジヒドロピリミジン-1(2H)-イル)-4-フルオロテトラヒドロフラニル-3-イル)オキシ)(ジイソプロピルアミノ)ホスファニル)オキシ)メチル)-2-(((ドデシルスルファニル)メトキシ)メチル)マロナート (化合物16)

化合物2B (339 mg, 0.436 mmol) および化合物15 (339 mg, 0.436 mmo) を用い、実施例2と同様にして化合物16 (62 mg, 22%) を得た。

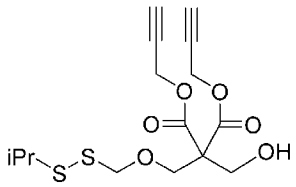
ESI-MS(m/z): 1167 (M+Na)

^{1}H-NMR($CDCl_3$, 400 MHz) δ (ppm): 8.08 -7.92 (m, 2H), 7.52 - 7.22 (m, 10H), 6.87 - 6.82 (m, 4H), 6.06 - 6.00 (m, 1H), 5.41 - 5.31 (m, 1H), 5.32 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 5.00 (d, J = 3.8 Hz, 0.5H), 4.87 (d, J = 3.8 Hz, 0.5H), 4.70 (dd, J = 10.1, 11.2 Hz, 2H), 4.57 - 4.46 (m, 1H), 4.22 - 3.93 (m, 10H), 3.80 - 3.79 (m, 6H), 3.62 - 3.43 (m, 4H), 2.74 - 2.57 (m, 2H), 1.35 - 1.06 (m, 34H), 0.90 - 0.84 (m, 4H).

^{31}P-NMR($CDCl_3$, 162MHz) δ (ppm): 150.9, 149.2.

[0168] 実施例19

[化56]



化合物17

(式中、iPrは前記と同義である)

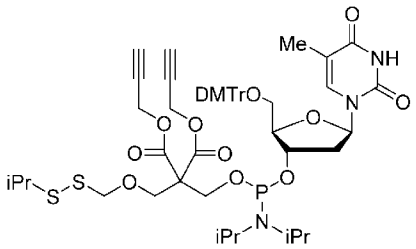
ジ(プロパ-2-イン-1-イル) 2-(ヒドロキシメチル)-2-(((イソプロピルジスルファニル)メトキシ)メチル)マロナート (化合物17)

化合物17G (20.0 mg, 42.0 μmol)を用い、実施例1と同様にして、化合物17 (5.0 mg, 33%) を得た。

^{1}H-NMR($CDCl_3$, 400 MHz) δ (ppm): 4.81 (s, 2H), 4.78 (d, J = 2.5 Hz, 4H), 4.17 (d, J = 6.3 Hz, 2H), 4.09 (s, 2H), 3.04 (sep, J = 6.6 Hz, 1H), 2.50 (t, J = 2.5 Hz, 2H), 2.37 (t, J = 6.3 Hz, 1H), 1.31 (d, J = 6.6 Hz, 6H).

[0169] 実施例20

[化57]



化合物18

(式中、Me、iPrおよびDMTrは、それぞれ前記と同義である)

ジ(プロパ-2-イン-1-イル) 2-((((((2R, 3S, 5R)-2-((ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)メチル)-5-(5-メチル-2,4-ジオキソ-3,4-ジヒドロピリミジン-1(2H)-イル)テトラヒドロフラン-3-イル)オキシ)(ジイソプロピルアミノ)ホスファニル)オキシ)メチル)-2-(((イソプロピルジスルファニル)メトキシ)メチル)マロナート (化合物18)

化合物17 (63.0 mg, 175 μmol)および参考例4で得られた化合物4B(176 mg, 227 μmol)を用いて、実施例2と同様にして、化合物18 (410 mg, 23%) を

得た。

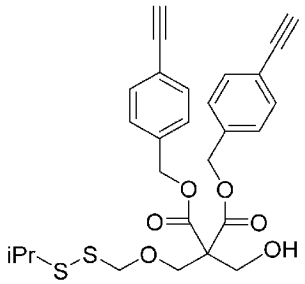
ESI-MS(m/z): 1034(M+1)

^{1}H-NMR($CDCl_3$, 400 MHz) δ (ppm): 8.04 (br s, 1H), 7.65 - 7.21(m, 10H), 6.87 - 6.81 (m, 4H), 6.41 - 6.35 (m, 1H), 4.83 - 4.59(m, 7H), 4.21 - 3.98(m, 5H), 3.81 - 3.77(m, 6H), 3.62 - 3.26(m, 4H), 3.03 - 2.94(m, 1H), 2.51 - 2.41(m, 3H), 2.36 - 2.26(m, 1H), 1.46 - 1.38(m ,3H), 1.28 - 1.02 (m, 18H).

^{31}P-NMR($CDCl_3$, 162MHz) δ (ppm): 149.6, 148.2.

[0170] 実施例21

[化58]



化合物19

(式中、iPrは前記と同義である)

ビス(4-エチニルベンジル) 2-(ヒドロキシメチル)-2-(((イソプロピルジスルファニル)メトキシ)メチル)マロナート (化合物19)

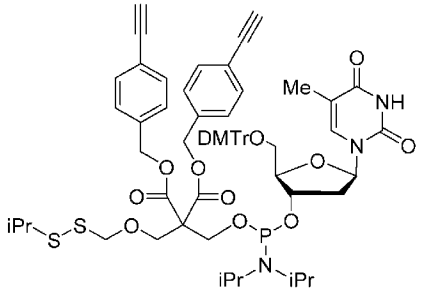
化合物18G (1.41 g, 2.25 mmol) を用い、実施例1と同様にして、化合物19 (0.951 g, 83%) を得た。

ESI-MS(m/z): 513(M+1)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ(ppm): 7.46 - 7.41(m, 4H), 7.23 - 7.19(m, 4H), 5.15 (s, 4H), 4.75 (s, 2H), 4.16 (br d, J = 6.0 Hz, 2H), 4.07 (s, 2H), 3.10 (s, 2H), 3.01 (sep, J = 6.4 Hz, 1H), 2.37 (br t, J = 6.0 Hz, 1H), 1.28 (d, J = 6.4 Hz, 6H).

[0171] 実施例22

[化59]



化合物20

(式中、Me、iPrおよびDMTrは前記と同義である)

ビス(4-エチニルベンジル) 2-((((((2R,3S,5R)-2-((ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)メチル)-5-(5-メチル-2,4-ジオキソ-3,4-ジヒドロピリミジン-1(2H)-イル)テトラヒドロフラン-3-イル)オキシ)(ジイソプロピルアミノ)ホスファニル)オキシ)メチル)-2-(((イソプロピルジスルファニル)メトキシ)メチル)マロナート (化合物20)

化合物19 (0.150 g, 0.293 mmol) および化合物4B (0.295 g, 0.380 mmol) を用い、実施例2と同様にして化合物20 (0.144 g, 42%) を得た。

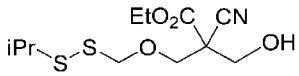
ESI-MS(m/z): 1208 (M+Na)

^{1}H-NMR($CDCl_3$, 400 MHz) δ (ppm): 7.90(br s, 1H), 7.63 - 7.10(m, 18H), 6.85 - 6.78(m, 4H), 6.41 - 6.35(m, 1H), 5.11 - 4.95(m, 4H), 4.75 - 4.57(m, 3H), 4.19 - 4.00(6H), 3.79 - 3.75(m ,6H), 3.54 - 3.26(m, 3H), 3.10 - 3.07(m, 2H), 3.00 - 2.91(m, 1H), 2.47 - 2.38(m, 1H), 2.34 - 2.23(m, 1H), 1.46 - 1.38(m, 3H), 1.29 - 0.99(m, 18H).

^{31}P-NMR($CDCl_3$, 162MHz) δ (ppm): 149.5, 148.1.

[0172] 実施例23

[化60]



化合物21

(式中、EtおよびiPrは前記と同義である)

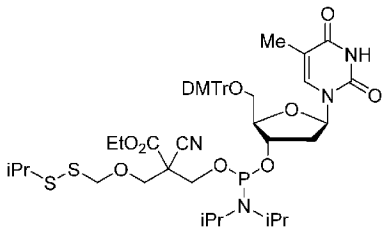
エチル 2-シアノ-3-ヒドロキシ-2-(((イソプロピルジスルファニル)メトキシ)メチル)プロパノアート (化合物21)

化合物19F(1.48 g, 3.63 mmol)を用いて、実施例1と同様にして、化合物21(0.911 g, 85%)を得た。

^{1}H-NMR (CDCl$_3$, 400 MHz) δ(ppm): 4.89 (d, J= 11.2 Hz, 1H), 4.85 (d, J= 11.2 Hz, 1H),4.33 (q, J= 7.2 Hz, 2H), 4.10 - 4.01 (m, 2H), 4.01 (d, J= 9.4 Hz, 1H), 3.98 (d, J= 9.4 Hz, 1H), 3.13 - 3.03 (m, 1H), 2.43 (br s, 1H), 1.36 (t, J= 7.2 Hz, 3H), 1.31 (d, J= 6.4 Hz, 3H), 1.31 (d, J= 6.4 Hz, 3H).

[0173] 実施例24

[化61]



化合物22

(式中、Me、Et、iPrおよびDMTrは、それぞれ、前記と同義である)

エチル3-(((((2R,3S,5R)-2-((ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)メチル)-5-(5-メチル-2,4-ジオキソ-3,4-ジヒドロピリミジン-1(2H)-イル)テトラヒドロフラン-3-イル)オキシ)(ジイソプロピルアミノ)ホスファニル)オキシ)-2-シアノ-2-(((イソプロピルジスルファニル)メトキシ)メチル)プロパナート(化合物22)

化合物 21 (0.400 g, 1.36 mmol) および化合物4B (1.268 g, 1.636 mmol) を用い、実施例2と同様にして、化合物22 (0.420 g, 32%) を得た。

ESI-MS(m/z): 968 (M+1)

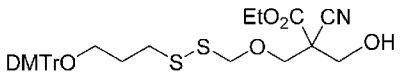
^{1}H-NMR (CDCl$_3$, 400 MHz) δ (ppm) : 7.59 - 7.55 (m, 1H), 7.43 - 7.37 (m, 2H), 7.33 - 7.26 (m, 6H), 6.85 - 6.82 (m, 4H), 6.41 - 6.37 (m, 1H), 4.90 - 4.77 (m, 2H), 4.71 - 4.65 (m, 1H), 4.34 - 4.17 (m, 3H), 4.10 - 4.06 (m, 1H), 4.04 - 3.82 (m, 4H), 3.79 (s, 6H), 3.61 - 3.45 (m, 3H), 3.38 - 3.28 (m, 1H), 3.10 - 3.03 (m, 1H), 2.48 - 2.35 (m, 2H), 1.46 - 1.41 (m, 2H), 1.39 - 1.24 (m, 11H), 1.20 - 1.12 (m, 8H), 1.07 - 1

.02 (m, 4H).

^{31}P-NMR($CDCl_3$, 162MHz) δ (ppm):150.6, 150.5.

[0174] 実施例25

[化62]



化合物23

(式中、EtおよびDMTrは、それぞれ、前記と同義である)

エチル 3-(((3-(ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)プロピル)ジスルファニル)メトキシ)-2-シアノ-2-(ヒドロキシメチル)プロパナート (化合物23)

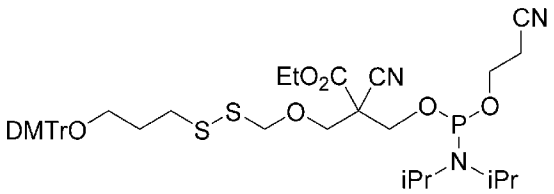
化合物20C (2.63 g、3.62 mmol)を用い、実施例1と同様にして化合物23 (2.15 g, 97%)を得た。

ESI-MS(m/z): 634 (M+Na)

^{1}H-NMR($CDCl_3$, 400 MHz) δ(ppm): 7.43 - 7.40 (m, 2H), 7.32 - 7.26 (m, 6H), 7.23 - 7.18 (m, 1H), 6.85 - 6.81 (m, 4H), 4.58 (dd, J = 21.6, 11, 6 Hz, 2H), 4.34 - 4.26 (m, 2H), 4.06 - 3.96 (m, 2H), 3.95 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 3.79 (s, 6H), 3.16 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 2.88 (t, J= 6.8 Hz, 2H), 2.38 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 2.00 - 1.93 (m, 2H), 1.33 (t, J= 7.2 Hz, 3H).

[0175] 実施例26

[化63]



化合物24

(式中、Et、iPrおよびDMTrは、それぞれ、前記と同義である)

エチル 3-(((3-(ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)プロピル)ジスルファニル)メトキシ)-2-シアノ-2-((((2-シアノエトキシ)(ジイソプロピ

ルアミノ)ホスファニル)オキシ)メチル)プロパナート（化合物24）

化合物23（166 mg, 0.271 mmol)をTHF（2.7 mL)に溶解し、N,N-ジイソプロピルエチルアミン（0.237 mL, 1.36 mmol)および3-((クロロ(ジイソプロピルアミノ)ホスファニル)オキシ)プロパンニトリル（96.0 mg, 0.407 mmol）を加え、室温で30分間撹拌した。反応液に水を加え、有機層を酢酸エチルで抽出し、水および飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧下で濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン／酢酸エチル)で精製し、化合物24（133 mg, 60%）を得た。

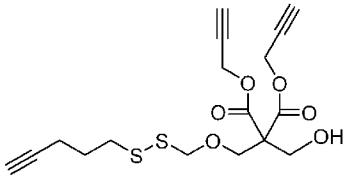
ESI-MS(m/z): 835 (M+Na)

^{1}H-NMR($CDCl_3$, 400 MHz) δ (ppm): 7.43 - 7.39 (m, 2H), 7.32 - 8.18 (m, 7H), 6.84 - 6.81 (m, 4H), 4.89 - 4.82 (m, 2H), 4.31 - 4.24 (m, 2H), 4.15 - 3.78 (m, 13Hz), 3.65 - 3.55 (m, 2H), 3.18 - 3.13 (m, 2H), 2.90 - 2.86 (m, 2H), 2.00 - 1.93 (m, 5H), 1.34 - 1.16 (m, 13H).

^{31}P-NMR($CDCl_3$, 162MHz) δ (ppm):150.2, 150.1.

[0176] 実施例27

[化64]



化合物25

ジイソプロパ-2-イニル 2-(ヒドロキシメチル)-2-(((ペンタ-4-イニルジスルファニル)メトキシ)メチル)マロナート（化合物25）

化合物21A（329 mg, 0.593 mmol）を用い、実施例1と同様にして化合物25（138 mg, 47%)を得た。

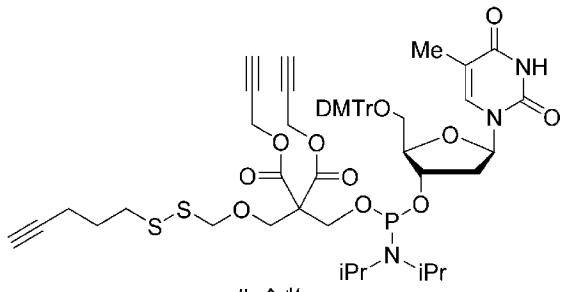
ESI-MS(m/z): 407 (M+Na)

^{1}H-NMR($CDCl_3$, 400 MHz) δ(ppm): 4.84 (s, 2H), 4.78 (d, J = 2.8 Hz, 4H), 4.17 (d, J = 6.8 Hz, 2H), 4.09 (s, 2H), 2.85 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 2.50 (t, J = 2.8 Hz, 2H), 2.36 - 2.32 (m, 3H), 1.99 (t, J = 2.8 Hz, 1H

), 1.96 - 1.88 (m, 2H).

[0177] 実施例28

[化65]



化合物26

(式中、Me、iPrおよびDMTrは、それぞれ、前期と同義である)

ジイソプロパ-2-イニル4-((2R,3S,5R)-2-((ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)メチル)-5-(5-メチル-2,4-ジオキソ-3,4-ジヒドロピリミジン-1(2H)-イル)テトラヒドロフラン-3-イルオキシ)-3-イソプロピル-2-メチル-5,9-ジオキサ-11,12-ジチア-3-アザ-4-ホスファヘプタデカ-16-イン-7,7-ジカルボキシラート(化合物26)

化合物4B (288 mg, 0.372 mmol)および化合物25 (110 mg 0.286 mmol)を用い、実施例2と同様にして、化合物26 (175 mg, 58%)を得た。

ESI-MS(m/z): 1180 (M+Na)

^{1}H-NMR($CDCl_3$, 400 MHz) δ (ppm): 7.93 (br s, 1H), 7.64 - 7.58 (m, 1H), 7.42 - 7.22 (m, 10H), 6.86 - 6.81 (m, 4H), 6.42 - 6.36 (m, 1H), 4.80 - 4.60 (m, 6H), 4.18 - 3.97 (m, 6H), 3.80 (s, 3H), 3.79 (s, 3H), 3.61 - 3.28 (m, 4H), 2.84 - 2.77 (m, 2H), 2.52 - 2.42 (m, 3H), 2.34 - 2.27 (m, 3H), 1.98 - 1.95 (m, 3H), 1.91 - 1.84 (m, 2H), 1.45 - 1.03 (m, 12H).

^{31}P-NMR($CDCl_3$, 162MHz) δ (ppm): 149.6, 148.2.

[0178] 実施例29

実施例5の工程1および実施例6の工程1と同様にして、化合物2および3を用いて、CD45を標的とするオリゴヌクレオチドCD45 x2IC (配列番号11) を得た。ホスホロチオエート製造時の硫化剤としては、ピリジンおよびアセトニト

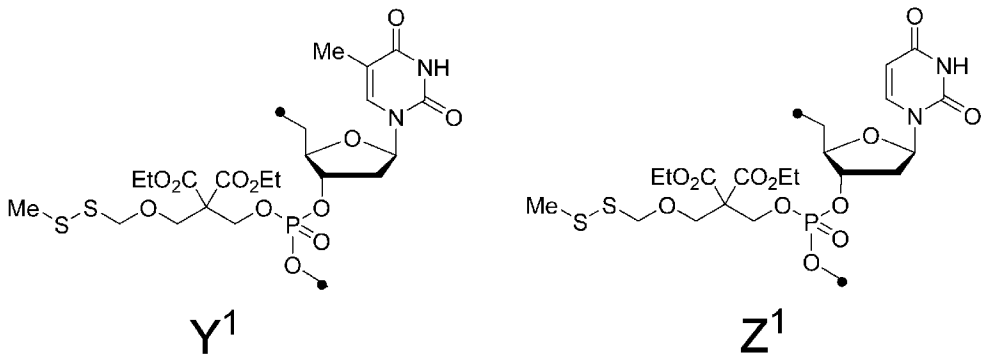
リル混合溶媒中で3-((N,N-ジメチルアミノメチリデン)アミノ)-3H-1,2,4-ジチアゾール-5-チオン(DDTT) を用い、5分間反応させた。

[0179] [表16]

オリゴヌクレオチド	配列番号	配列 (5'→3')
CD45 x2IC	11	mCsmCsmAsmAsmAsY^{1}GsCsCsAsAsGsmAsmGsZ^{1}T

[0180] (表中、A、G、CおよびTは、それぞれ2'-デオキシアデノシン、2'-デオキシグアノシン、2'-デオキシシチジンおよびチミジンを表し、mA、mGおよびmCはそれぞれ前記と同義であり、sはホスホロチオエート結合を表し、Y^{1}およびZ^{1}は、それぞれ下記式で表される2価基を表す)

[化66]



[0181] 実施例30

実施例29と同様にして、化合物2および3を用いて、FGFR4を標的とするオリゴヌクレオチドFGFR4 IC (配列番号14) を得た。

[0182] [表17]

オリゴヌクレオチド	配列番号	配列 (5'→3')
FGFR4 IC	14	(T)s[C]s(T)s[C]s(T)sTsTsGsGsY^{1}CsAsCsAsCs[C]s[G]s(T)s[C]sT

[0183] {表中、A、G、CおよびTは、それぞれ2'-デオキシアデノシン、2'-デオキシグアノシン、2'-デオキシシチジンおよびチミジンを表し、Y^{1}およびsはそれぞれ前記と同義であり、[ ]は、[ ]内で表されるヌクレオシドの2'位にメトキシを有するヌクレオシドを表し、( )は( )内で表されるヌクレオシドのリボース部分がLNAであるヌクレオシドを表す}

[0184] 実施例31

実施例29と同様にして、化合物3を用いてPTENを標的とするオリゴヌクレオチドKON708（配列番号17）を得た。

[0185] 実施例32

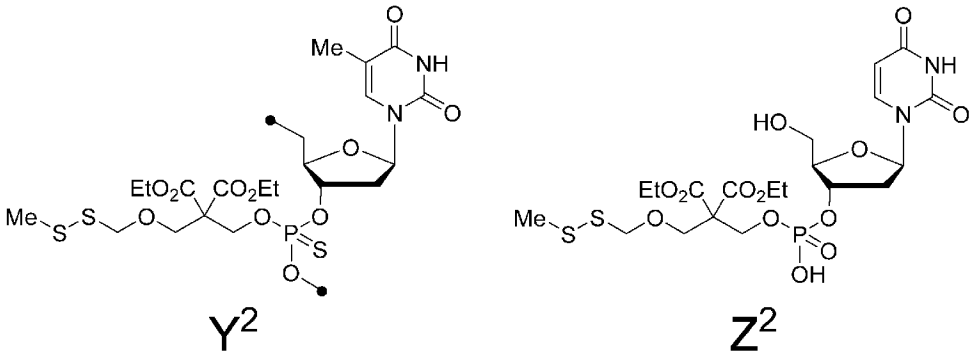
実施例5の工程1、実施例6の工程1および実施例29と同様にして、化合物3を用いてPTENを標的とするオリゴヌクレオチドKON715（配列番号18）を得た。

[0186] [表18]

オリゴヌクレオチド	配列番号	配列（5'→3'）
KON708	17	mTsmTsdAsdGsdCsdAsdCY^{2}sdGsdGsmCsmCsT
KON715	18	Z^{2}mUsdAsdGsdCsdAsdCsTsdGsdGsmCsmCsT

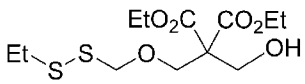
[0187] [表中、Tはチミジンを表し、mC、mU、mTおよびsはそれぞれ前記と同義であり、dA、dGおよびdCは、それぞれ、2'-デオキシアデノシン、2'-デオキシグアノシンおよび2'-デオキシシチジンを表し、Y^2およびZ^2は、それぞれ下記式(式中、Meはメチルを表し、Etはエチルを表す)で表される2価基または化合物に相当する残基を表す]

[化67]



[0188] 実施例33

[化68]



化合物27

（式中、Etは前記と同義である）

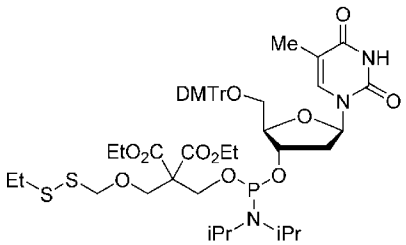
ジエチル 2-(((エチルジスルファニル)メトキシ)メチル)-2-(ヒドロキシメチル)マロナート(化合物27)

アルゴン雰囲気下、ジエチルジスルフィド（0.440 mL, 3.57 mmol）を無水アセトニトリル(2.0 mL）に溶解し、氷冷後、トリメチルオキソニウムテトラフルオロボラート（527 mg, 3.57mmol）を加えて氷冷下2.5時間撹拌し、0.4 mol/L 酢酸ナトリウム緩衝液（0.72 mL）を加えて 10分間撹拌した。反応液に、化合物1E（200 mg, 0.357 mmol）の無水アセトニトリル（2.0 mL）溶液を氷冷下で滴下し、室温まで昇温させながら1 時間撹拌した。反応液に水を加え、有機層を酢酸エチルで抽出し、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧下で溶媒を溜去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（n-ヘプタン/酢酸エチル）で精製し、化合物27（10.0 mg, 52%）を得た。

^{1}H-NMR($CDCl_3$, 400 MHz) δ(ppm): 4.83 (s, 2H), 4.24 (q, J = 7.3 Hz, 4H), 4.12 (br d, J = 6.0 Hz, 2H), 4.04 (s, 2H), 2.76 (q, J = 7.3 Hz, 2H), 1.32 (t, J = 7.3 Hz, 3H), 1.28 (t, J = 7.3 Hz, 6H).

[0189] 実施例34

[化69]



化合物28

(式中、Me、Et、iPrおよびDMTrは、それぞれ、前記と同義である)

ジエチル 4-((2R,3S,5R)-2-((ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)メチル)-5-(5-メチル-2,4-ジオキソ-3,4-ジヒドロピリミジン-1(2H)-イル)テトラヒドロフラン-3-イルオキシ)-3-イソプロピル-2-メチル-5,9-ジオキサ-11,12-ジチア-3-アザ-4-ホスファテトラデカン-7,7-ジカルボキシラート（化合物28)

化合物4B（0.598 g, 0.772 mmol)および化合物27（0.210 g, 0.643 mmol)

を用い、実施例2と同様にして、化合物28 (0.130 g, 20%)を得た。

ESI-MS(m/z): 1001 (M+H).

^{1}H-NMR($CDCl_3$, 400MHz) δ (ppm): 7.97 (1H, s), 7.65-7.54 (1H, m), 7.43-7.38 (2H, m), 7.33-7.27 (6H, m), 7.20-7.14 (2H, m), 6.87-6.80 (4H, m), 6.42-6.36 (1H, m), 4.84-4.61 (2H, m), 4.22-3.98 (7H, m), 3.79 (6H, s), 3.56-3.44 (2H, m), 3.40-3.28 (1H, m), 2.76-2.66 (2H, m), 2.51-2.43 (1H, m), 2.36 (3H, s), 2.34-2.27 (1H, m), 1.46-1.37 (2H, m), 1.32-1.13 (20H, m), 1.03 (2H, d, J= 6.8 Hz).

^{31}P-NMR($CDCl_3$, 162MHz) δ (ppm): 149.6, 148.0.

[0190] 実施例35

工程1

化合物7を用いて、実施例5の工程1と同様にして、KON789のアンチセンス鎖(配列番号22)を得た。

ESI-MS 理論値 6959 実測値 6959

工程2

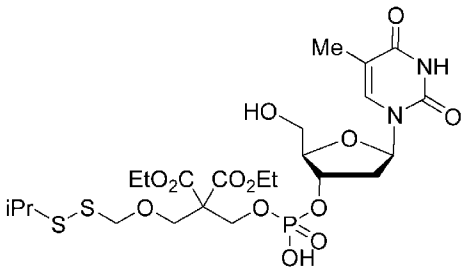
KON789のアンチセンス鎖を用いて、実施例5の工程2と同様にして、KON789を得た。

[0191] [表19]

si RNA	配列番号	鎖	配列 (5'→3')
KON789	19	センス	GCCAGACUUUGUUGGAUUAGT
	22	アンチセンス	Z^3AAUCCAACAAAGUCUGGCUT

[0192] [表中、A、G、C、TおよびUは、それぞれ、アデノシン、グアノシン、シチジン、チミジンおよびウリジンを表し、Z^3は、下記式(式中Me、EtおよびiPrはそれぞれ前記と同義である)で表される化合物に相当する残基を表す]

[化70]



[0193] 実施例36

工程1

化合物28を用いて、実施例5の工程1と同様にして、KON816のアンチセンス鎖(配列番号23)を得た。

ESI-MS 理論値 6945 実測値 6944

工程2

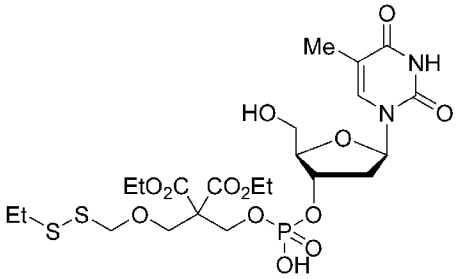
KON816のアンチセンス鎖を用いて、実施例5の工程2と同様にして、KON816を得た。

[0194] [表20]

si RNA	配列番号	鎖	配列 (5'→3')
KON816	19	センス	GCCAGACUUUGUUGGAUUAGT
	23	アンチセンス	Y^4AAUCCAACAAAGUCUGGCUT

[0195] [表中、A、G、C、TおよびUは、それぞれ、アデノシン、グアノシン、シチジン、チミジンおよびウリジンを表し、Y^4は、下記式(式中Meはメチルを表し、Etはエチルを表す)で表される化合物に相当する残基を表す]

[化71]



[0196] 実施例37

工程1

化合物10を用いて、実施例5の工程1と同様にして、KON818のアンチセンス鎖(配列番号24)を得た。

ESI-MS 理論値 6983 実測値 6982

工程2

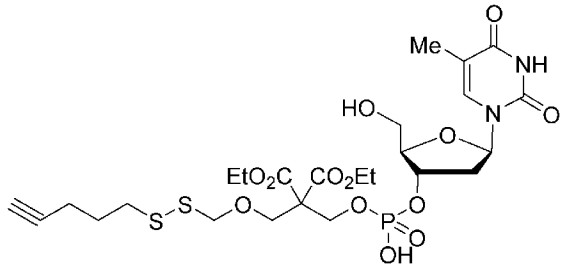
KON818のアンチセンス鎖を用いて、実施例5の工程2と同様にして、KON818を得た。

[0197] [表21]

si RNA	配列番号	鎖	配列 (5'→3')
KON818	19	センス	GCCAGACUUUGUUGGAUUAGT
	24	アンチセンス	Z^4AAUCCAACAAAGUCUGGCUT

[0198] [表中、A、G、C、TおよびUは、それぞれ、アデノシン、グアノシン、シチジン、チミジンおよびウリジンを表し、Z^4は、下記式(式中Meはメチルを表し、Etはエチルを表す）で表される化合物に相当する残基を表す。

[化72]



[0199] 実施例38

工程1

化合物18を用いて、実施例5の工程1と同様にして、KON846のアンチセンス鎖(配列番号26)を得た。

ESI-MS 理論値 6980 実測値 6979

工程2

KON846のアンチセンス鎖を用いて、実施例5の工程2と同様にして、KON846を得た。

[0200] 実施例39

工程1

化合物22を用いて、実施例5の工程1と同様にして、KON857のアンチセンス鎖(配列番号27)を得た。

ESI-MS 理論値 6898 実測値 6898

工程2

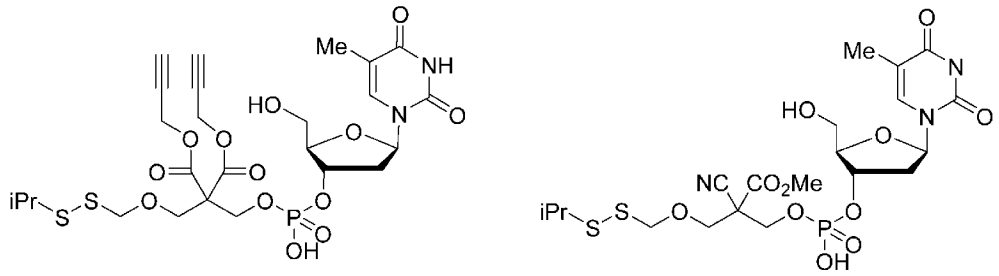
KON857のアンチセンス鎖を用いて、実施例5の工程2と同様にして、KON857を得た。

[0201] [表22]

siRNA	配列番号	鎖	配列(5'→3')
KON846	19	センス	GCCAGACUUUGUUGGAUUAGT
	26	アンチセンス	Y^5AAUCCAACAAAGUCUGGCUT
KON857	19	センス	GCCAGACUUUGUUGGAUUAGT
	27	アンチセンス	Z^5AAUCCAACAAAGUCUGGCUT

[0202] [表中、A、G、C、TおよびUは、それぞれ、アデノシン、グアノシン、シチジン、チミジンおよびウリジンを表し、Y^5およびZ^5は、それぞれ下記式(式中MeおよびiPrは、それぞれ前記と同義である)で表される化合物に相当する残基を表す]

[化73]



Y^5 Z^5

[0203] 実施例40

工程1

化合物16を用いて、実施例5の工程1と同様にして、KON880のアンチセンス

鎖(配列番号29)を得た。

ESI-MS 理論値 7090 実測値 7089

工程2

KON880のアンチセンス鎖を用いて、実施例5の工程2と同様にして、KON880を得た。

[0204] 実施例41

工程1

化合物8を用いて、実施例5の工程1と同様にして、KON881のアンチセンス鎖(配列番号30)を得た。

ESI-MS 理論値 6963 実測値 6962

工程2

KON881のアンチセンス鎖を用いて、実施例5の工程2と同様にして、KON881を得た。

[0205] 実施例42

工程1

化合物22を用いて、実施例5の工程1および実施例29と同様にして、KON882のアンチセンス鎖(配列番号31)を得た。

ESI-MS 理論値 6914 実測値 6913

工程2

KON882のアンチセンス鎖を用いて、実施例5の工程2と同様にして、KON882を得た。

[0206] 実施例43

工程1

化合物24を用いて、実施例5の工程1と同様にして、KON883のアンチセンス鎖(配列番号32)を得た。

ESI-MS 理論値 7012 実測値 7011

工程2

KON883のアンチセンス鎖を用いて、実施例5の工程2と同様にして、KON883

を得た。

[0207] 実施例44

工程1

化合物24を用いて、実施例5の工程1および実施例29と同様にして、KON884のアンチセンス鎖(配列番号33)を得た。

ESI-MS 理論値 7028 実測値 7027

工程2

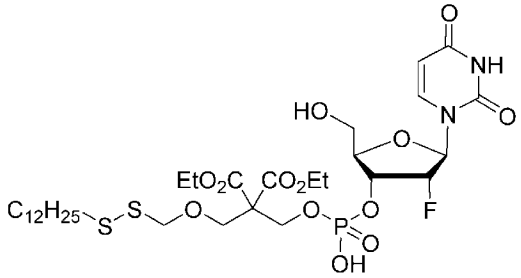
KON884のアンチセンス鎖を用いて、実施例5の工程2と同様にして、KON884を得た。

[0208] [表23]

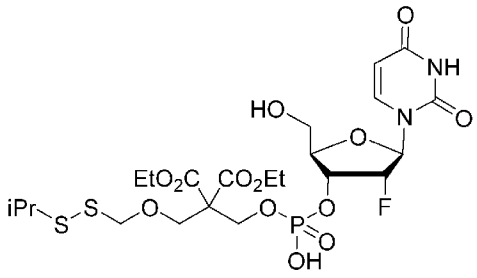
si RNA	配列番号	鎖	配列 (5'→3')
KON880	19	センス	GCCAGACUUUGUUGGAUUAGT
	29	アンチセンス	Y^6AAUCCAACAAAGUCUGGCUT
KON881	19	センス	GCCAGACUUUGUUGGAUUAGT
	30	アンチセンス	Z^6AAUCCAACAAAGUCUGGCUT
KON882	19	センス	GCCAGACUUUGUUGGAUUAGT
	31	アンチセンス	Y^7AAUCCAACAAAGUCUGGCUT
KON883	19	センス	GCCAGACUUUGUUGGAUUAGT
	32	アンチセンス	Z^7AAUCCAACAAAGUCUGGCUT
KON884	19	センス	GCCAGACUUUGUUGGAUUAGT
	33	アンチセンス	Y^8AAUCCAACAAAGUCUGGCUT

[0209] [表中、A、G、C、TおよびUは、それぞれ、アデノシン、グアノシン、シチジン、チミジンおよびウリジンを表し、Y^6、Z^6、Y^7、Z^7およびY^8は、それぞれ下記式(式中Me、EtおよびiPrはそれぞれ前記と同義である)で表される化合物に相当する残基を表す]

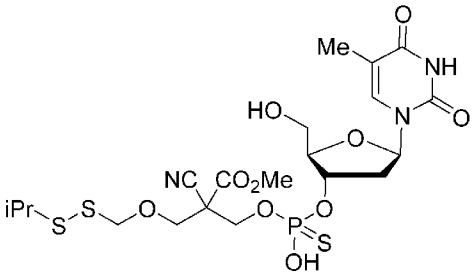
[化74]



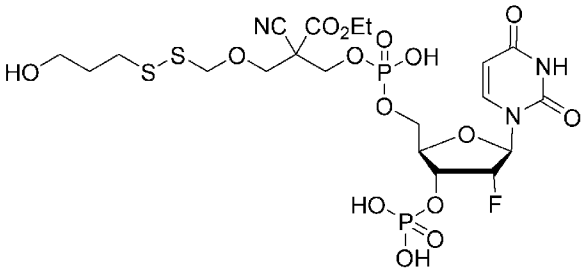
Y^6



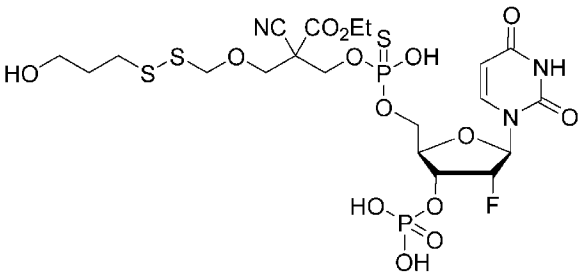
Z^6



Y^7



Z^7



Y^8

[0210] 実施例45

工程1

化合物20を用いて、実施例5の工程1と同様にして、KON891のアンチセンス鎖(配列番号34)を得た。

ESI-MS 理論値 7132 実測値 7131

工程2

KON891のアンチセンス鎖を用いて、実施例5の工程2と同様にして、KON891を得た。

[0211] 実施例46

工程1

化合物12を用いて、実施例5の工程1と同様にして、KON892のアンチセンス鎖(配列番号35)を得た。

ESI-MS 理論値 6976 実測値 6975

工程2

KON892のアンチセンス鎖を用いて、実施例5の工程2と同様にして、KON892を得た。

[0212] 実施例47

工程1

化合物14を用いて、実施例5の工程1と同様にして、KON903のアンチセンス鎖(配列番号36)を得た。

ESI-MS 理論値 7047 実測値 7046

工程2

KON903のアンチセンス鎖を用いて、実施例5の工程2と同様にして、KON903を得た。

[0213] 実施例48

工程1

化合物18を用いて、実施例5の工程1および実施例29と同様にして、KON905のアンチセンス鎖(配列番号37)を得た。

ESI-MS 理論値 6996 実測値 6995

工程2

KON905のアンチセンス鎖を用いて、実施例5の工程2と同様にして、KON905を得た。

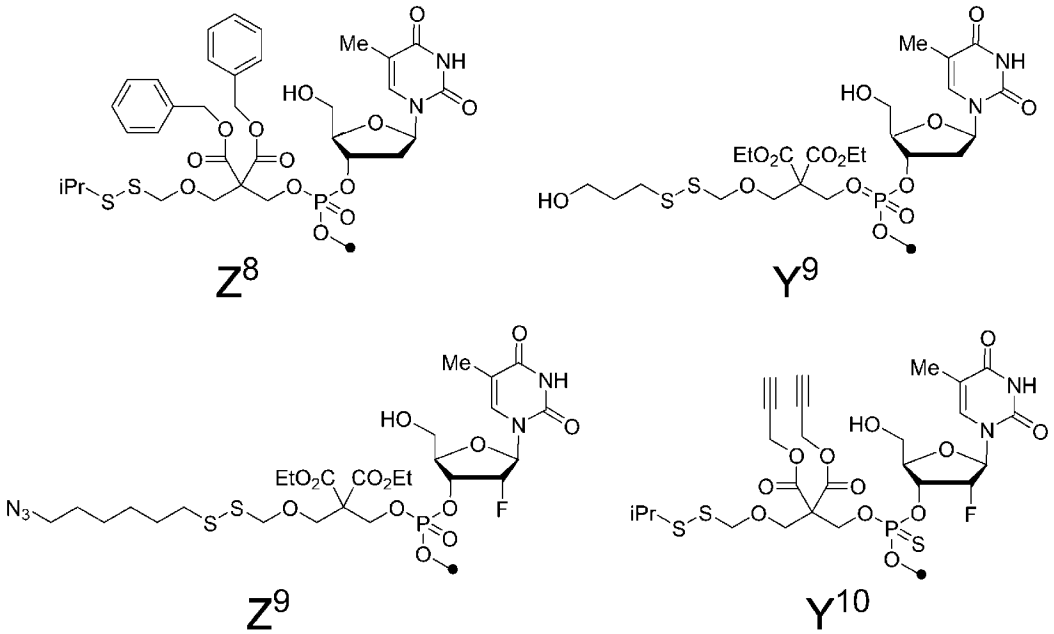
[0214]

[表24]

si RNA	配列番号	鎖	配列 (5'→3')
KON891	19	センス	GCCAGACUUUGUUGGAUUAGT
	34	アンチセンス	Z^8AAUCCAACAAAGUCUGGCUT
KON892	19	センス	GCCAGACUUUGUUGGAUUAGT
	35	アンチセンス	Y^9AAUCCAACAAAGUCUGGCUT
KON903	19	センス	GCCAGACUUUGUUGGAUUAGT
	36	アンチセンス	Z^9AAUCCAACAAAGUCUGGCUT
KON905	19	センス	GCCAGACUUUGUUGGAUUAGT
	37	アンチセンス	Y^{10}AAUCCAACAAAGUCUGGCUT

[0215] [表中、A、G、C、TおよびUは、それぞれ、アデノシン、グアノシン、シチジン、チミジンおよびウリジンを表し、Z^8、Y^9、Z^9およびY^{10}は、それぞれ下記式(式中Me、Et、iPrおよびN_3は、それぞれ前記と同義である)で表される化合物を表す]

[化75]



[0216] 実施例49

工程1

化合物26を用いて、実施例5の工程1と同様にして、KON922のアンチセンス鎖(配列番号38)を得た。

ESI-MS 理論値 7003 実測値 7002

工程2

KON922のアンチセンス鎖を用いて、実施例5の工程2と同様にして、KON922を得た。

[0217] 実施例50

工程1

化合物26を用いて、実施例5の工程1および実施例29と同様にして、KON923のアンチセンス鎖(配列番号39)を得た。

ESI-MS 理論値 7019 実測値 7019

工程2

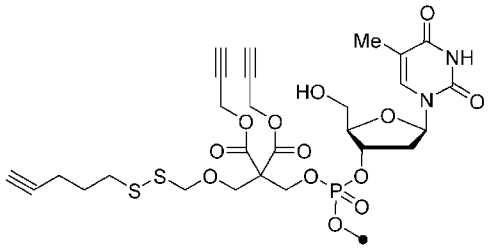
KON923のアンチセンス鎖を用いて、実施例5の工程2と同様にして、KON923を得た。

[0218] [表25]

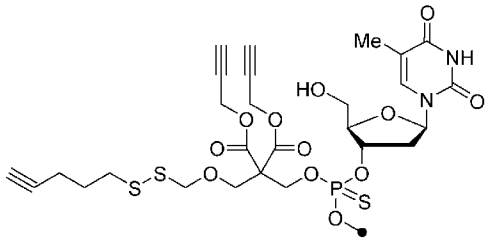
si RNA	配列番号	鎖	配列(5'-3')
KON922	19	センス	GCCAGACUUUGUUGGAUUAGT
	38	アンチセンス	Z^{10}AAUCCAACAAAGUCUGGCUT
KON923	19	センス	GCCAGACUUUGUUGGAUUAGT
	39	アンチセンス	Y^{11}AAUCCAACAAAGUCUGGCUT

[0219] [表中、A、G、C、TおよびUは、それぞれ、アデノシン、グアノシン、シチジン、チミジンおよびウリジンを表し、Z^{10}およびY^{11}は、それぞれ下記式(式中Meはメチルを表す)で表される化合物を表す]

[化76]



Z^{10}



Y^{11}

[0220] 実施例51

工程1

化合物18を用いて、実施例5の工程1と同様にして、KON924のアンチセンス鎖(配列番号44)を得た。

ESI-MS 理論値 7004 実測値 7003

工程2

KON924のアンチセンス鎖を用いて、実施例5の工程2と同様にして、KON924を得た。

[0221] 実施例52

工程1

化合物18を用いて、実施例5の工程1および実施例29と同様にして、KON925のアンチセンス鎖(配列番号45)を得た。

ESI-MS 理論値 7020 実測値 7018

工程2

KON925のアンチセンス鎖を用いて、実施例5の工程2と同様にして、KON925を得た。

[0222] 実施例53

工程1

化合物24を用いて、実施例5の工程1と同様にして、KON926のアンチセンス鎖(配列番号46)を得た。

ESI-MS 理論値 7666 実測値 7664

工程2

KON926のアンチセンス鎖を用いて、実施例5の工程2と同様にして、KON926を得た。

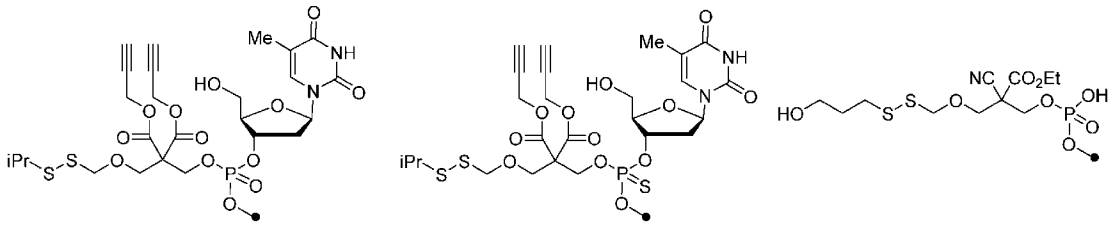
[0223]

[表26]

si RNA	配列番号	鎖	配列(5'-3')
KON924	40	センス	GUCAUCACACUGAAUACCAAU
	44	アンチセンス	Z^{11}UUGGUAUUCAGUGUGAUGACAT
KON925	40	センス	GUCAUCACACUGAAUACCAAU
	45	アンチセンス	Y^{12}UUGGUAUUCAGUGUGAUGACAT
KON926	40	センス	GUCAUCACACUGAAUACCAAU
	46	アンチセンス	Z^{12}TUUGGUAUUCAGUGUGAUGACAT

[0224] [表中、A、G、C、TおよびUは、それぞれ、アデノシン、グアノシン、シチジン、チミジンおよびウリジンを表し、Z^{11}、Y^{12}およびZ^{12}は、それぞれ下記式(式中Me、EtおよびiPrは、それぞれ前記と同義である)で表される化合物を表す]

[化77]



[0225] 実施例54

工程1

化合物18を用いて、実施例5の工程1と同様にして、KON927のアンチセンス鎖(配列番号51)を得た。

ESI-MS 理論値 7682 実測値 7681

工程2

KON927のアンチセンス鎖を用いて、実施例5の工程2と同様にして、KON927を得た。

[0226] 実施例55

工程1

化合物18を用いて、実施例5の工程1および実施例29と同様にして、KON928のアンチセンス鎖(配列番号52)を得た。

ESI-MS 理論値 7695 実測値 7694

工程2

KON928のアンチセンス鎖を用いて、実施例5の工程2と同様にして、KON928を得た。

[0227] 実施例56

工程1

化合物24を用いて、実施例5の工程1と同様にして、KON929のアンチセンス鎖(配列番号53)を得た。

ESI-MS 理論値 7111 実測値 7110

工程2

KON929のアンチセンス鎖を用いて、実施例5の工程2と同様にして、KON929を得た。

[0228] [表27]

si RNA	配列番号	鎖	配列(5'-3')
KON927	47	センス	CCGUCGUAUUCGUGAGCAAGA
	51	アンチセンス	Z^{11}UGCUCACGAAUACGACGGUT
KON928	47	センス	CCGUCGUAUUCGUGAGCAAGA
	52	アンチセンス	Y^{12}UGCUCACGAAUACGACGGUT
KON929	47	センス	CCGUCGUAUUCGUGAGCAAGA
	53	アンチセンス	Z^{12}TUGCUCACGAAUACGACGGUT

[0229] (表中、A、G、C、TおよびUは、それぞれ、アデノシン、グアノシン、シチジン、チミジンおよびウリジンを表し、Z^{11}、Y^{12}およびZ^{12}は、それぞれ前記と同義である)

[0230] 実施例57

工程1

化合物18を用いて、実施例5の工程1と同様にして、KON930のアンチセンス鎖(配列番号58)を得た。

ESI-MS 理論値 7027 実測値 7027

工程2

KON930のアンチセンス鎖を用いて、実施例5の工程2と同様にして、KON930を得た。

[0231] 実施例58

工程1

化合物18を用いて、実施例5の工程1および実施例29と同様にして、KON931のアンチセンス鎖(配列番号59)を得た。

ESI-MS 理論値 7040 実測値 7039

工程2

KON931のアンチセンス鎖を用いて、実施例5の工程2と同様にして、KON931を得た。

[0232] 実施例59

工程1

化合物24を用いて、実施例5の工程1と同様にして、KON932のアンチセンス鎖(配列番号60)を得た。

ESI-MS 理論値 7171 実測値 7170

工程2

KON932のアンチセンス鎖を用いて、実施例5の工程2と同様にして、KON932を得た。

[0233] [表28]

si RNA	配列番号	鎖	配列(5'-3')
KON930	54	センス	CCUUCAUUGACCUCAACUACA
	58	アンチセンス	Z^{11}AGUUGAGGUCAAUGAAGGGT
KON931	54	センス	CCUUCAUUGACCUCAACUACA
	59	アンチセンス	Y^{12}AGUUGAGGUCAAUGAAGGGT
KON932	54	センス	CCUUCAUUGACCUCAACUACA
	60	アンチセンス	Z^{12}TAGUUGAGGUCAAUGAAGGGT

[0234] (表中、A、G、C、TおよびUは、それぞれ、アデノシン、グアノシン、シチジン、チミジンおよびウリジンを表し、Z^{11}、Y^{12}およびZ^{12}は、それぞれ前記と同義である)

[0235] 試験例1: ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ1(HPRT1)標的siRNAによるノックダウン活性

ヒト子宮頸癌由来ヒーラ細胞(HeLa細胞)を10%ウシ胎児血清を含むアールピーエムアイ1640培地(RPMI1640 Medium, Life technologies, A10491-01)中に懸濁し、1ウェルあたり5000細胞になるよう80 μLの細胞懸濁液を培養プレート(Nunc 96マイクロウェルプレート, 167008)の各ウェルに播種した。

ヒト肝癌由来細胞株(HepG2)を10%ウシ胎児血清を含むメム培地(MEM Medium, Life technologies, 11095-080)中に懸濁し、1ウェルあたり5000細胞になるよう80 μLの細胞懸濁液を培養プレート (Nunc 96マイクロウェルプレート, 167008)の各ウェルに播種した。

HPRT1を標的とするsiRNA(1-fU)、(3-Y)および(4-Z)の各siRNAおよびリポフェクタミンRNAiマックス(Lipofectamine RNAiMAX, Life technologies, 13778-150)をそれぞれオプティーメム(Opti-MEM, Life technologies, 31985-070)で希釈した。上記で調製したsiRNA(1-fU)、(3-Y)および(4-Z)のsiRNAの各希釈液およびリポフェクタミンRNAiマックスの希釈液をそれぞれ混合し、siRNA(1-fU)、(3-Y)および(4-Z)の各siRNAとリポフェクタミンRNAiマックスとの複合体(siRNA-リポフェクタミンRNAiマックス複合体)を形成させた。細胞懸濁液を含む各ウェルに調製した上記siRNA-リポフェクタミンRNAiマックス複合体を20 μL添加することでsiRNA(1-fU)、(3-Y)および(4-Z)の各siRNAをHeLa細胞に導入した。各siRNAの最終濃度は300 pmol/L, 94.9 pmol/L, 30.0 pmol/Lおよび9.49 pmol/Lの4点とし、N=3と設定した。陰性対照にはリポフェクタミンRNAiマックスのみを添加したウェルを使用し、N=12と設定した。各siRNA導入後の細胞は、37 ℃、5%CO_2条件下で48時間培養した。

RNAを含む細胞溶解液の調製にはスーパープレップセルライシス(SuperPrep Cell Lysis, TOYOBO, SCQ-101)を用い、同キット付属のアールティーキット(RT Kit for qPCR)を用いてキットに添付された説明書に従って逆転写反応を行い、cDNAを作成した。

このcDNAをPCR反応の鋳型に用い、ABI7900HT Fast(アプライドバイオシス

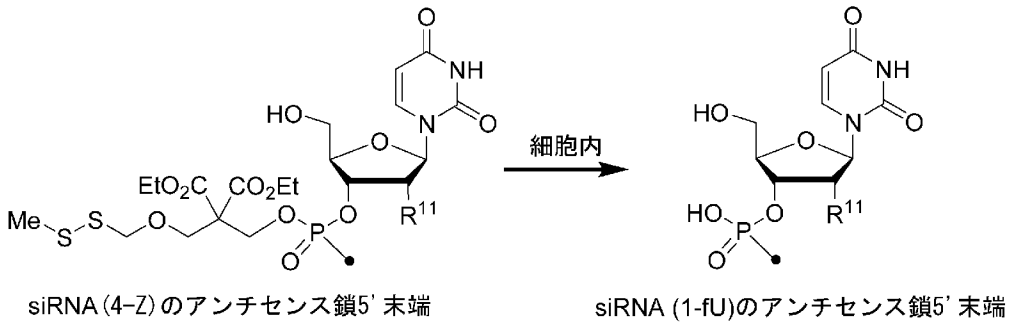
テムズ)を用いたタックマンプローブ(Taqman probe)法によりヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ1(Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase、HPRT1、ジェンバンク　アクセッション番号 NM_000194.2)の遺伝子および対照としてベータアクチン(ACTB、ジェンバンク　アクセッション番号 NM_001101.3)の遺伝子をPCR反応させてmRNA増幅量をそれぞれ測定し、ACTBのmRNA増幅量を内部対照として、HPRT1のmRNAの準定量値を算出した。

HPRT1の測定にはタックマンプローブHs02800695_m1(アプライドバイオシステムズ) を、ACTBの測定にはHs01060665_g1(アプライドバイオシステムズ)を用いた。また、陰性対照群における、HPRT1のmRNA量およびACTBのmRNA増幅量を同様にそれぞれ測定し、ACTBのmRNA増幅量を内部対照として、HPRT1のmRNAの準定量値を算出した。siRNA導入検体の標的mRNA量は、siRNA未導入群(陰性対照群)における、HPRT1のmRNA量を1としたときの相対的な割合として表した。

結果を図１および図2に示す。その結果siRNA(4-Z)は、siRNA(1-fU)と同等のノックダウン活性を示すことが分かった。また、siRNA(4-Z)は、siRNA(3-Y)よりも高いノックダウン活性を示すことが分かった。さらに、同様の結果が別の細胞株においても認められることを確認した。

以上より、siRNA(4-Z)は、細胞内でsiRNA(1-fU)へと定量的に代謝されてノックダウン活性を発揮すると推測された。

[化78]



[0236] 試験例2: HPRT1標的コレステロール修飾siRNAによるノックダウン活性

HeLa細胞を10%ウシ胎児血清を含むアールピーエムアイ1640培地(RPMI1640

Medium, Life technologies, A10491-01)中に懸濁し、1ウェルあたり5000細胞になるよう100 μLの細胞懸濁液を培養プレート(Nunc 96マイクロウェルプレート, 167008)の各ウェルに播種し37 ℃、5%CO_2条件下で24時間培養した。

HPRT1を標的とするsiRNA(5-Z)および(6-fU)をそれぞれオプティーメム(Opti-MEM, Life technologies, 31985-070)で希釈した。培養液上清を除去し、1ウェルあたり80 μLのウシ胎児血清不含アールピーエムアイ1640培地(RPMI1640 Medium, Life technologies, A10491-01)を加えた。オプティーメムで希釈した上記各siRNA溶液を1ウェルあたり20 μL添加した。各siRNAの最終濃度は1000 nmol/L, 316 nmol/L, 100 nmol/L, 31.6 nmol/L, 10.0 nmol/Lおよび 3.16 nmol/Lの6点とし、N=3に設定した。陰性対照にはオプティーメムを添加したウェルを使用し、N=6に設定した。各siRNA導入後の細胞は、37 ℃、5% CO_2条件下で48時間培養した。

試験例1と同様の手法により、細胞溶解液からcDNAを作成し、このcDNAをPCR反応の鋳型に用い、ABI7900HT Fast(アプライドバイオシステムズ)を用いたタックマンプローブ(Taqman probe)法によりHPRT1および対照としてACTBをPCR反応させてmRNA増幅量をそれぞれ測定し、ACTBのmRNA増幅量を内部対照として、HPRT1のmRNAの準定量値を算出した。

結果を図3に示す。その結果、siRNA(5-Z)は、siRNA(6-fU)と比較して同等以上のノックダウン活性を示すことが分かった。

以上よりsiRNA(5-Z)は、細胞内でsiRNA(6-fU)へと定量的に代謝されてノックダウン活性を発揮すると推測された。

また、試験例1は、トランスフェクション試薬を用いたsiRNA導入法であるのに対して、試験例2は、キャリアフリーによるsiRNA導入法であり、かつ両実験で用いているアンチセンス鎖の配列が実質同一であり、いずれの方法でもノックダウン活性が観察されたことから、siRNA導入法によらずにノックダウン活性が得られることが分かった。

[0237] 試験例3: CD45標的ASOによるノックダウン活性

ヒト急性単球性白血病細胞（THP-1）を10%ウシ胎児血清を含むアールピー

エムアイ1640培地(RPMI1640 Medium, Life technologies, A10491-01)中に懸濁し、1ウェルあたり5000細胞になるよう80 μLの細胞懸濁液を培養プレート（Nunc 96マイクロウェルプレート, 167008）の各ウェルに播種した。

CD45標的ASOであるCD45 ABC、CD45 x2POおよびCD45 x2ICならびにリポフェクタミン3000（Lipofectamine 3000, Life technologies, L3000008）のそれぞれをオプティーメム（Opti-MEM, Life technologies, 31985-070）で希釈した。上記リポフェクタミン3000のキットに付属のP3000試薬を上記CD45 ABC、CD45 x2POおよびCD45 x2ICのオプティーメム希釈溶液の各々に添加した。添加溶液および上記リポフェクタミン3000のオプティーメム溶液を混合し、CD45標的ASO（CD45 ABC、CD45 x2POおよびCD45 x2IC）の各々とリポフェクタミン3000との複合体（CD45標的ASO-リポフェクタミン3000複合体）を形成させた。上記で調製した細胞懸濁液を含む培養プレートの各ウェルに対して、上記で調製したCD45標的ASO-リポフェクタミン3000複合体を20 μL添加し、CD45標的ASOをTHP-1に導入した。各ASOの最終濃度は、94.9 nmol/L, 30.0 nmol/L, 9.49 nmol/L, 3.00 nmol/Lおよび0.95 nmol/Lの5点とし、N=3とした。陰性対照にはP3000試薬含有リポフェクタミン3000を添加したウェルを使用し、N=6に設定した。ASO導入後の細胞は、37℃、5%CO2条件下で24時間培養した。

試験例1と同様の手法により、細胞溶解液からcDNAを作成し、このcDNAをPCR反応の鋳型に用い、ABI7900HT Fast（アプライドバイオシステムズ）を用いたタックマンプローブ（Taqman probe）法によりCD45（PTPRC、プロテインチロシンホスファターゼレセプタータイプC、ジェンバンク　アクセッション番号NM_002838.4）遺伝子及び対照としてACTB（ベータアクチン、ジェンバンク　アクセッション番号 NM_001101.3）をPCR反応させてmRNA増幅量をそれぞれ測定し、ACTBのmRNA増幅量を内部対照として、PTPRCのmRNAの準定量値を算出した。結果を図4に示す。その結果CD45 x2ICは、CD45 ABCおよびCD45 x2POと同等のノックダウン活性を示すことが分かった。

[0238] 試験例4: フィブロブラストグロースファクターレセプター4（FGFR4)標的ASO

のノックダウン活性

ヒト肝癌由来細胞株（HepG2）を10%ウシ胎児血清を含むメム培地（MEM Medium, Life technologies, 11095-080）中に懸濁し、1ウェルあたり5000細胞になるよう80 μLの細胞懸濁液を培養プレート（Nunc 96マイクロウェルプレート, 167008）の各ウェルに播種した。

ヒト肝癌由来細胞株（HuH-7）を10%ウシ胎児血清を含むディーメム培地（DMEM Medium, nacalai tesque, 08458-16）中に懸濁し、1ウェルあたり5000細胞になるよう80 μLの細胞懸濁液を培養プレート（Nunc 96マイクロウェルプレート, 167008）の各ウェルに播種した。

試験例3と同様の手法により、FGFR4標的ASO（FGFR4 PS、FGFR POおよびFGFR4 IC）の各々とリポフェクタミン3000との複合体を調製し、細胞懸濁液を含む上記各ウェルに添加することでFGFR4標的ASOをそれぞれの細胞に導入した。ASOの最終濃度は30.0 nmol/L, 9.49 nmol/L, 3.00 nmol/L, および0.95 nmol/Lの4点とし、N=3に設定した。陰性対照にはP3000試薬含有リポフェクタミン3000を添加したウェルを使用し、N=6に設定した。FGFR4標的ASO導入後の細胞は、37℃、5%CO2条件下で24時間培養した。

試験例1と同様の手法により、細胞溶解液からcDNAを作成し、このcDNAをPCR反応の鋳型に用い、ABI7900HT Fast（アプライドバイオシステムズ）を用いたタックマンプローブ（Taqman probe）法によりFGFR4（ジェンバンク　アクセッション番号NM_002011.4）遺伝子および対照としてACTB（ベータアクチン、ジェンバンク　アクセッション番号 NM_001101.3）をPCR反応させてmRNA増幅量をそれぞれ測定し、ACTBのmRNA増幅量を内部対照として、FGFR4のmRNAの準定量値を算出した。

結果を図5および6に示す。その結果FGFR4 ICは、FGFR4 PSおよびFGFR4 POと、同等のノックダウン活性を示すことが分かった。

[0239] 試験例5: Phosphatase and Tensin Homolog Deleted from Chromosome 10（PTEN）標的ASOのノックダウン活性

ヒト子宮頸癌由来ヒーラ細胞（HeLa細胞）を10%ウシ胎児血清を含むアール

ピーエムアイ1640培地(RPMI1640 Medium, Life technologies, A10491-01)中に懸濁し、1ウェルあたり5000細胞になるよう100 μLの細胞懸濁液を培養プレート(Nunc 96マイクロウェルプレート, 167008)の各ウェルに播種し37℃、5%CO2条件下で24時間培養した。

試験例3と同様の手法により、PTEN標的ASOであるKON708, wt KON708、KON715およびwt KON715の各々とリポフェクタミン3000との複合体を調製し、細胞懸濁液を含む各ウェルに添加することでPTEN標的ASOをそれぞれの細胞に導入した。PTEN標的ASOの最終濃度は300 nmol/L, 94.9 nmol/L, 30.0 nmol/L,および9.49 nmol/Lの4点とし、N=3に設定した。陰性対照にはP3000試薬含有リポフェクタミン3000を添加したウェルを使用し、N=12に設定した。PTEN標的ASO導入後の細胞は、37℃、5%CO2条件下で24時間培養した。

試験例1と同様の手法により、細胞溶解液からcDNAを作成し、このcDNAをPCR反応の鋳型に用い、ABI7900HT Fast（アプライドバイオシステムズ）を用いたタックマンプローブ(Taqman probe）法によりPTEN（ジェンバンク　アクセッション番号NM_000314.5）遺伝子および対照としてACTB（ベータアクチン、Beta-Actin, ジェンバンク　アクセッション番号 NM_001101.3）をPCR反応させてmRNA増幅量をそれぞれ測定し、ACTBのmRNA増幅量を内部対照として、PTENのmRNAの準定量値を算出した。

結果を図7に示す。その結果KON708およびKON715は、比較対照となるwt KON708およびwt KON715と比較して、強いノックダウン活性を示すことが分かった。

[0240] 試験例6: HPRT1標的siRNAによるノックダウン活性

ヒト子宮頸癌由来ヒーラ細胞（HeLa細胞）およびヒト肝癌由来細胞株(HepG2）の播種は試験例1と同様に行なった。

ヒト肝癌由来細胞株(HuH-7）を10%ウシ胎児血清を含むディーメム培地（DMEM High Glucose Medium, Nacalai tesque, 08458-16）中に懸濁し、1ウェルあたり5000細胞になるよう80 μLの細胞懸濁液を培養プレート(Nunc 96マイクロウェルプレート, 167008)の各ウェルに播種した。HPRT1を標的とするsiR

NAであるCtrl(5’,3’ dT)、KON788およびKON789を用いて、試験例1と同様にして、HPRT1標的siRNAの各々とリポフェクタミンRNAiマックスとの複合体を形成させ、細胞懸濁液を含む各ウェルに調製した上記siRNA-リポフェクタミンRNAiマックス複合体を添加することでCtrl(5’, 3’ dT)、KON788およびKON789の各々をそれぞれHeLa細胞、HuH-7細胞およびHepG2細胞の各々に導入した。

各siRNAの最終濃度は1000 pmol/L, 316 pmol/L, 100 pmol/L, 31.6 pmol/L, 10 pmol/Lおよび3.16 pmol/Lの6点とし、N=3に設定した。陰性対照(nt)にはリポフェクタミンRNAiマックスのみを添加したウェルを使用し、N=6に設定し試験例1と同様の手法でノックダウン活性を評価した。

結果を図8に示す。その結果KON789は、HeLa細胞、HuH-7細胞およびHepG2細胞の細胞株においてCtrl(5’,3’ dT)およびKON788と、同等のノックダウン活性を示すことが分かった。

[0241] 試験例7: HPRT1標的siRNAによるノックダウン活性

HPRT1を標的とするsiRNAであるCtrl(5’, 3’ dT)、KON789、KON816およびKON788を用いて、試験例1と同様にして、各siRNAとリポフェクタミンRNAiマックスとの複合体を形成させ、細胞懸濁液を含む各ウェルに調製した上記siRNA-リポフェクタミンRNAiマックス複合体を添加することでCtrl(5’, 3’ dT)、KON789、KON816およびKON788の各々をそれぞれHeLa細胞、HuH-7細胞およびHepG2細胞の各々に導入した。

各siRNAの最終濃度は300 pmol/L, 94.9 pmol/L, 30.0 pmol/Lおよび9.49 pmol/Lの4点とし、N=3に設定した。陰性対照(nt)にはリポフェクタミンRNAiマックスのみを添加したウェルを使用し、N=12に設定し試験例6と同様の手法でノックダウン活性を評価した。

結果を図9に示す。その結果、HeLa細胞、HuH-7細胞およびHepG2細胞においてネガティブコントロールであるKON788はCtrl(5’, 3’ dT)よりもノックダウン活性が減弱したのに対し、KON789およびKON816は、Ctrl(5’, 3’ dT)と同等のノックダウン活性を示すことが分かった。

[0242] 試験例8: HPRT1標的siRNAによるノックダウン活性

HPRT1を標的とするsiRNAであるCtrl(5', 3' dT)、KON816、KON818およびKON788を用いて、試験例7と同様の手法によりノックダウン活性を評価した。

結果を図10に示す。その結果、HeLa細胞、HuH-7細胞およびHepG2細胞においてネガティブコントロールであるKON788はCtrl(5', 3' dT)よりもノックダウン活性が減弱したのに対し、KON816およびKON818は、Ctrl(5', 3' dT)と同等のノックダウン活性を示すことが分かった。

[0243] 試験例9: HPRT1標的siRNAによるノックダウン活性

HPRT1を標的とするsiRNAであるCtrl(5', 3' dT)、KON818、KON788、KON857、KON840およびKON846を用いて、試験例6と同様の手法によりノックダウン活性を評価した。

結果を図11(HeLa細胞)、図12（HuH-7細胞）および図13（HepG2細胞）に示す。その結果、HeLa細胞、HuH-7細胞およびHepG2細胞においてネガティブコントロールであるKON788およびKON840はCtrl(5', 3' dT)よりもノックダウン活性が減弱したのに対し、KON818、KON857およびKON846は、Ctrl(5', 3' dT)と同等のノックダウン活性を示すことが分かった。

[0244] 試験例10: HPRT1標的siRNAによるノックダウン活性

HPRT1を標的とするsiRNAであるCtrl(5'-F)およびKON880～KON884を用いて、試験例6と同様の手法によりノックダウン活性を評価した。

結果を図14（HeLa細胞)、図15(HuH-7細胞)および図16（HepG2細胞）に示す。その結果KON880～KON884は、HeLa細胞、HuH-7細胞およびHepG2細胞においてCtrl(5'-F)と、同等のノックダウン活性を示すことが分かった。

[0245] 試験例11: HPRT1標的siRNAによるノックダウン活性

HPRT1を標的とするsiRNAであるCtrl(5'-F)、KON846、KON891、KON892、KON903およびKO905を用いて、試験例6と同様の手法によりノックダウン活性を評価した。

結果を図17（HeLa細胞)、図18（HuH-7細胞）および図19（HepG2細胞）に示す。その結果KON846、KON891、KON892、KON903およびKON905は、HeLa細胞、H

uH-7細胞およびHepG2細胞においてCtrl(5'-F)と、同等のノックダウン活性を示すことが分かった。

[0246] 試験例12: HPRT1標的siRNAによるノックダウン活性

HPRT1を標的とするsiRNAであるCtrl(5', 3' dT)、KON922、KON923およびKON788を用いて、各siRNAの最終濃度は1000 pmol/L, 316 pmol/L, 100 pmol/Lおよび31.6 pmol/Lの4点とし、N=3に設定した。陰性対照にはリポフェクタミンRNAiマックスのみを添加したウェルを使用し、N=12に設定し試験例6と同様の手法でノックダウン活性を評価した。

結果を図20 (HeLa細胞)、図21 (HuH-7細胞)、図22 (HepG2細胞)に示す。その結果KON922およびKON923は、HeLa細胞、HuH-7細胞およびHepG2細胞においてCtrl(5', 3' dT)と同等のノックダウン活性を示すことが分かった。

[0247] 試験例13: アポリポタンパク質B(ApoB)標的siRNAによるノックダウン活性

ApoBを標的とするsiRNAであるwt924、KON924, wt925、KON925、wt926およびKON926ならびにApoB mRNAの測定用タックマンプローブHs01071209_m1(アプライドバイオシステムズ)を用いて試験例6と同様の手法によりノックダウン活性を評価した。

結果を図23 (HepG2細胞) および図24 (HuH-7細胞) に示す。その結果KON924, KON925およびKON926は、HepG2細胞およびHuH-7細胞においてそれぞれ対応するwt924、wt925およびwt926と同等のノックダウン活性を示すことが分かった。

[0248] 試験例14: ルシフェラーゼ標的siRNAによるノックダウン活性

ルシフェラーゼを標的とするsiRNAであるwt927、KON927, wt928、KON928、wt929およびKON929を用いて以下の通りノックダウン活性を評価した。ヒト子宮頸癌由来ヒーラ細胞 (HeLa細胞)に対しルシフェラーゼ発現ベクター[pGL4.50 (luc2/CMV/Hygro) Vector、プロメガ]を導入したルシフェラーゼ発現ヒーラ細胞(HeLa-Luc)を、10%ウシ胎仔血清を含むアールピーエムアイ(RPMI)培地(インビトロジェン、11875093)中に懸濁し、1ウェルあたり7500細胞数となるよう80 μLの細胞懸濁液を培養プレート (Culture Plate 96, PerkinElmer,

9005680）の各ウェルに播種した。siRNAの最終濃度は1000 pmol/L、316 pmol/L、100 pmol/L、31.6 pmol/L、10 pmol/Lおよび3.16 pmol/Lとし、試験例1と同様の手法により核酸溶液を細胞に添加し37 ℃、5%CO_2条件下で48時間培養した。培養後の細胞に対して市販のルシフェラーゼ定量試薬であるステディーグロルシフェラーゼアッセイシステム（Steady-Glo Luciferase Assay System、Promega、E2520)を、上記定量試薬に添付のプロトコルに従って、各ウェルに40μL添加した。10分間のインキュベーション後、ARVO（パーキンエルマー）を用いて、各ウェルの1秒あたり発光量(cps)を測定した。ルシフェラーゼ標的siRNA処理群の発光量と同時に、陰性対照群の発光量も測定することでsiRNA導入検体のRNAi効果を、siRNA未導入群(陰性対照群)における発光量を1としたときの相対的な割合として表した。

結果を図25に示す。その結果、KON927, KON928およびKON929は、それぞれ対応するwt927、wt928およびwt929と同等のノックダウン活性を示すことが分かった。

[0249] 試験例15: グリセルアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)標的siRNAによるノックダウン活性

GAPDHを標的とするsiRNAであるwt930、KON930, wt931、KON931、wt932およびKON932ならびにGAPDH mRNAの測定用タックマンプローブHs02758991_g1(アプライドバイオシステムズ)を用いて試験例6と同様の手法によりノックダウン活性を評価した。

結果を図26（HeLa細胞)、図27（HuH-7細胞）および図28（HepG2細胞）に示す。その結果、KON930, KON931およびKON932は、HeLa細胞、HuH-7細胞およびHepG2細胞において、それぞれ対応するwt930、wt931およびwt932と同等のノックダウン活性を示すことが分かった。

産業上の利用可能性

[0250] 本発明のオリゴヌクレオチド誘導体等は、核酸医薬として有用である。

配列表フリーテキスト

[0251] 配列番号１は、siRNA(1-fU), (3-Y)および(4-Z)のセンス鎖の塩基配列を示す

。

配列番号２は、siRNA(1-fU)のアンチセンス鎖の塩基配列を示す。

配列番号４は、siRNA (3-Y)のアンチセンス鎖の塩基配列を示す。

配列番号５は、siRNA(4-Z)のアンチセンス鎖の塩基配列を示す。

配列場号６は、siRNA (5-Z)および(6-fU)のセンス鎖の塩基配列を示す。

配列番号７は、siRNA(5-Z)のアンチセンス鎖の塩基配列を示す。

配列番号８は、siRNA(6-fU)のアンチセンス鎖の塩基配列を示す。

配列番号９は、CD45を標的とするオリゴヌクレオチドCD45 ABCの塩基配列を示す。

配列番号１０は、CD45を標的とするオリゴヌクレオチドCD45 x2POの塩基配列を示す。

配列番号１１は、CD45を標的とするオリゴヌクレオチドCD45 x2ICの塩基配列を示す。

配列番号１２は、FGFR4を標的とするオリゴヌクレオチドFGFR4 PSの塩基配列を示す。

配列番号１３は、FGFR4を標的とするオリゴヌクレオチドFGFR4 POの塩基配列を示す。

配列番号１４は、CD45を標的とするオリゴヌクレオチドFGFR4 ICの塩基配列を示す。

配列番号１５は、PTENを標的とするオリゴヌクレオチドwtKON708の塩基配列を示す。

配列番号１６は、PTENを標的とするオリゴヌクレオチドwtKON715の塩基配列を示す。

配列番号１７は、PTENを標的とするオリゴヌクレオチドKON708の塩基配列を示す。

配列番号１８は、PTENを標的とするオリゴヌクレオチドKON715の塩基配列を示す。

配列番号１９は、Ctrl(5',3'dT)のセンス鎖の塩基配列を示す。

配列番号２０は、Ctrl(5',3'dT)のアンチセンス鎖の塩基配列を示す。

配列番号２１は、KON788のアンチセンス鎖の塩基配列を示す。

配列番号２２は、KON789のアンチセンス鎖の塩基配列を示す。

配列番号２３は、KON816のアンチセンス鎖の塩基配列を示す。

配列番号２４は、KON818のアンチセンス鎖の塩基配列を示す。

配列番号２５は、KON840のアンチセンス鎖の塩基配列を示す。

配列番号２６は、KON846のアンチセンス鎖の塩基配列を示す。

配列番号２７は、KON857のアンチセンス鎖の塩基配列を示す。

配列番号２８は、Ctrl(5' -F)のアンチセンス鎖の塩基配列を示す。

配列番号２９は、KON880のアンチセンス鎖の塩基配列を示す。

配列番号３０は、KON881のアンチセンス鎖の塩基配列を示す。

配列番号３１は、KON882のアンチセンス鎖の塩基配列を示す。

配列番号３２は、KON883のアンチセンス鎖の塩基配列を示す。

配列番号３３は、KON884のアンチセンス鎖の塩基配列を示す。

配列番号３４は、KON891のアンチセンス鎖の塩基配列を示す。

配列番号３５は、KON892のアンチセンス鎖の塩基配列を示す。

配列番号３６は、KON903のアンチセンス鎖の塩基配列を示す。

配列番号３７は、KON905のアンチセンス鎖の塩基配列を示す。

配列番号３８は、KON922のアンチセンス鎖の塩基配列を示す。

配列番号３９は、KON923のアンチセンス鎖の塩基配列を示す。

配列番号４０は、wt924のセンス鎖の塩基配列を示す。

配列番号４１は、wt924のアンチセンス鎖の塩基配列を示す。

配列番号４２は、wt925のアンチセンス鎖の塩基配列を示す。

配列番号４３は、wt926のアンチセンス鎖の塩基配列を示す。

配列番号４４は、KON924のアンチセンス鎖の塩基配列を示す。

配列番号４５は、KON925のアンチセンス鎖の塩基配列を示す。

配列番号４６は、KON926のアンチセンス鎖の塩基配列を示す。

配列番号４７は、wt927のセンス鎖の塩基配列を示す。

配列番号４８は、wt927のアンチセンス鎖の塩基配列を示す。

配列番号４９は、wt928のアンチセンス鎖の塩基配列を示す。

配列番号５０は、wt929のアンチセンス鎖の塩基配列を示す。

配列番号５１は、KON 927のアンチセンス鎖の塩基配列を示す。

配列番号５２は、KON 928のアンチセンス鎖の塩基配列を示す。

配列番号５３は、KON 929のアンチセンス鎖の塩基配列を示す。

配列番号５４は、wt930のセンス鎖の塩基配列を示す。

配列番号５５は、wt930のアンチセンス鎖の塩基配列を示す。

配列番号５６は、wt931のアンチセンス鎖の塩基配列を示す。

配列番号５７は、wt932のアンチセンス鎖の塩基配列を示す。

配列番号５８は、KON930のアンチセンス鎖の塩基配列を示す。

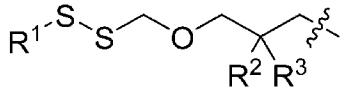
配列番号５９は、KON931のアンチセンス鎖の塩基配列を示す。

配列番号６０は、KON932のアンチセンス鎖の塩基配列を示す。

請求の範囲

[請求項1] オリゴヌクレオチドの少なくとも1つのリン酸基の酸素原子上に式(I)

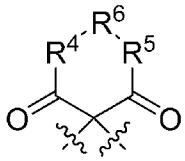
[化1]



(I)

{式中、R^1は低級アルコキシで置換されていてもよい低級アルキルを表し、R^2およびR^3は、同一または異なって、それぞれ電子吸引基を表すか、R^2、R^3および隣接する炭素原子が一緒になって、式(II)

[化2]



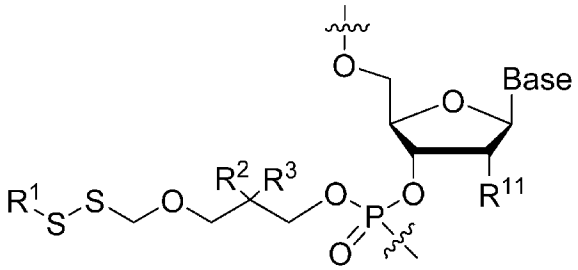
(II)

[式中、R^4およびR^5は、同一または異なって、それぞれ酸素原子、CH_2またはNR^7(式中、R^7は、水素原子または低級アルキルを表す)を表し、R^6は、結合またはCR^8R^9(式中、R^8およびR^9は、同一または異なって、それぞれ水素原子または低級アルキルを表す)を表す] を表す} で表される基を有するオリゴヌクレオチド誘導体またはその塩。

[請求項2] オリゴヌクレオチドの1つのリン酸基の酸素原子上に式(I)で表される基を有する請求項1に記載のオリゴヌクレオチド誘導体またはその塩。

[請求項3] 下記式(III)

[化3]



(III)

(式中、Baseは核酸塩基を表し、R^1、R^2およびR^3は、それぞれ前記と同

義であり、R^{11}は水素原子、フッ素原子または低級アルコキシを表す）で表される構造を1つ以上含有する請求項１に記載のオリゴヌクレオチド誘導体またはその塩（ただし、当該オリゴヌクレオチド誘導体またはその塩が、式(III)で表される構造を2つ以上含有する場合は、当該構造間でBase、R^1、R^2、R^3およびR^{11}は、それぞれ、同一または異なっていてもよい。）。

[請求項4] R^1が低級アルキルである請求項1～3のいずれか１項に記載のオリゴヌクレオチド誘導体またはその塩。

[請求項5] R^2およびR^3が、同一または異なって、それぞれカルボキシまたは低級アルコキシカルボニルである請求項1～4のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド誘導体またはその塩。

[請求項6] R^2およびR^3が、同一または異なって、それぞれシアノ、ニトロ、低級アルカノイルまたは低級アルキルスルホニルである請求項1～4のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド誘導体またはその塩。

[請求項7] 式(III)で表される構造を1つだけ含有する請求項3～6のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド誘導体またはその塩。

[請求項8] 5～100の塩基長を有する請求項1～7のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド誘導体またはその塩。

[請求項9] 10～80の塩基長を有する請求項1～7のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド誘導体またはその塩。

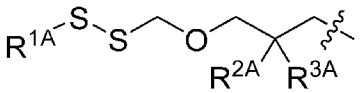
[請求項10] オリゴヌクレオチドが2本鎖である請求項1～9のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド誘導体またはその塩。

[請求項11] オリゴヌクレオチドが1本鎖である、請求項1～9のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド誘導体またはその塩。

[請求項12] オリゴヌクレオチドが短鎖干渉性RNA(siRNA)である、請求項1～11のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド誘導体またはその塩。

[請求項13] オリゴヌクレオチドの少なくとも1つのリン酸基の酸素原子上に式(I-0)

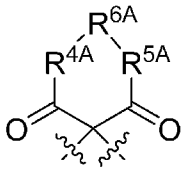
[化4]



(I-0)

{式中、R^{1A}は置換基を有していてもよい低級アルキル、置換基を有していてもよい低級アルケニルまたは置換基を有していてもよい低級アルキニルを表し、R^{2A}およびR^{3A}は、同一または異なって、それぞれ電子吸引基を表すか、R^{2A}、R^{3A}および隣接する炭素原子が一緒になって、式(II-0)

[化5]



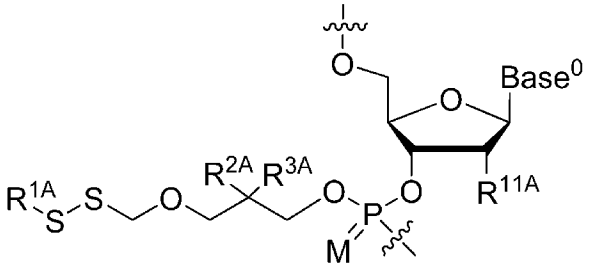
(II-0)

[式中、R^{4A}およびR^{5A}は、同一または異なって、それぞれ酸素原子、CH_2またはNR^{7A}(式中、R^{7A}は、水素原子または低級アルキルを表す)を表し、R^{6A}は、結合または$CR^{8A}R^{9A}$(式中、R^{8A}およびR^{9A}は、同一または異なって、それぞれ水素原子または低級アルキルを表す)を表す]を表す}で表される基を有するオリゴヌクレオチド誘導体またはその塩。

[請求項14] オリゴヌクレオチドの1つのリン酸基の酸素原子上に式(I-0)で表される基を有する請求項13に記載のオリゴヌクレオチド誘導体またはその塩。

[請求項15] 式(III-0)

[化6]



(III-0)

(式中、$Base^0$は核酸塩基を表し、Mは酸素原子または硫黄原子を表し、R^{1A}、R^{2A}およびR^{3A}は、それぞれ前記と同義であり、R^{11A}は水素原子、

フッ素原子または低級アルコキシを表す)で表される構造を1つ以上含有する請求項13記載のオリゴヌクレオチド誘導体またはその塩（ただし、当該オリゴヌクレオチド誘導体またはその塩が、式(III-0)で表される構造を2つ以上含有する場合は、当該構造間で$Base^0$、M、R^{1A}、R^{2A}、R^{3A}およびR^{11A}は、それぞれ、同一または異なっていてもよい。）。

[請求項16] R^{1A}が置換基を有していてもよい低級アルキルである請求項13～15のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド誘導体またはその塩。

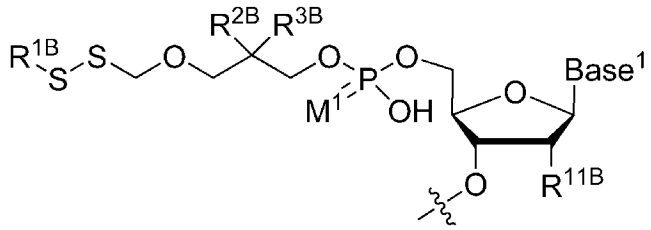
[請求項17] R^{2A}およびR^{3A}が、同一または異なって、それぞれカルボキシ、置換基を有していてもよいアラルキルオキシカルボニル、低級アルコキシカルボニル、低級アルケニルオキシカルボニルまたは低級アルキニルオキシカルボニルである請求項13～16のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド誘導体またはその塩。

[請求項18] R^{2A}およびR^{3A}が、同一または異なって、それぞれシアノ、ニトロ、低級アルカノイルまたは低級アルキルスルホニルである請求項13～16のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド誘導体またはその塩。

[請求項19] 式(III-0)で表される構造を1つだけ含有する請求項15～18のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド誘導体またはその塩。

[請求項20] 式(III-1)

[化7]

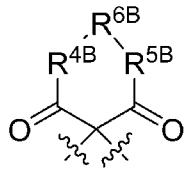


(III-1)

{式中、$Base^1$は核酸塩基を表し、M^1は酸素原子または硫黄原子を表し、R^{1B}は置換基を有していてもよい低級アルキル、置換基を有していてもよい低級アルケニルまたは置換基を有していてもよい低級アルキニルを表し、R^{2B}およびR^{3B}は、同一または異なって、それぞれ電子吸引基を表すか、R^{2B}、R^{3B}および隣接する炭素原子が一緒になって、式(II

-1)

[化8]



(II-1)

[式中、R^{4B}およびR^{5B}は、同一または異なって、それぞれ酸素原子、CH_2またはNR^{7B}(式中、R^{7B}は、水素原子または低級アルキルを表す)を表し、R^{6B}は、結合または$CR^{8B}R^{9B}$(式中、R^{8B}およびR^{9B}は、同一または異なって、それぞれ水素原子または低級アルキルを表す)を表す]を表し、R^{11B}は水素原子、フッ素原子または低級アルコキシを表す}で表される構造を含有する請求項13に記載のオリゴヌクレオチド誘導体またはその塩。

[請求項21] R^{1B}が置換基を有していてもよい低級アルキルである請求項20に記載のオリゴヌクレオチド誘導体またはその塩。

[請求項22] R^{2B}およびR^{3B}が、同一または異なって、それぞれカルボキシ、置換基を有していてもよいアラルキルオキシカルボニル、低級アルコキシカルボニル、低級アルケニルオキシカルボニルまたは低級アルキニルオキシカルボニルである請求項20または21に記載のオリゴヌクレオチド誘導体またはその塩。

[請求項23] R^{2B}およびR^{3B}が、同一または異なって、それぞれシアノ、ニトロ、低級アルカノイルまたは低級アルキルスルホニルである請求項20または21に記載のオリゴヌクレオチド誘導体またはその塩。

[請求項24] 5～100の塩基長を有する請求項13～23のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド誘導体またはその塩。

[請求項25] 10～80の塩基長を有する請求項13～23のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド誘導体またはその塩。

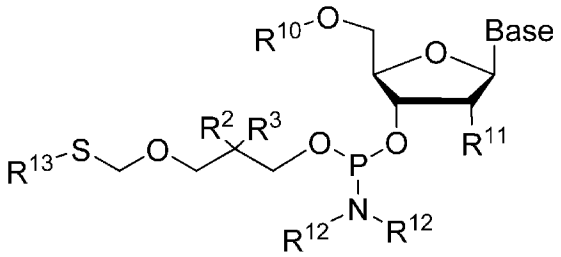
[請求項26] オリゴヌクレオチドが2本鎖である請求項13～25のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド誘導体またはその塩。

[請求項27]　オリゴヌクレオチドが1本鎖である請求項13～25のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド誘導体またはその塩。

[請求項28]　オリゴヌクレオチドが短鎖干渉性RNA(siRNA)である、請求項13～27のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド誘導体またはその塩。

[請求項29]　式(IV)

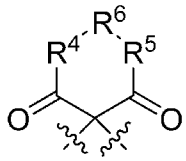
[化9]



(IV)

{式中、Baseは核酸塩基を表し、R^2およびR^3は、同一または異なって、それぞれ電子吸引基を表すか、R^2、R^3および隣接する炭素原子が一緒になって、式(II)

[化10]

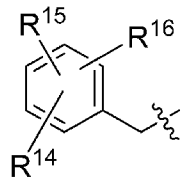


(II)

［式中、R^4およびR^5は、同一または異なって、それぞれ酸素原子、CH_2またはNR^7（式中、R^7は、水素原子または低級アルキルを表す)を表し、R^6は、結合またはCR^8R^9(式中、R^8およびR^9は、同一または異なって、それぞれ水素原子または低級アルキルを表す)を表す］を表し、R^{10}は水酸基の保護基を表し、R^{11}は水素原子、フッ素原子または低級アルコキシを表し、R^{12}は低級アルキルを表し、R^{13}は低級アルキルチオまたは

式(V)

[化11]

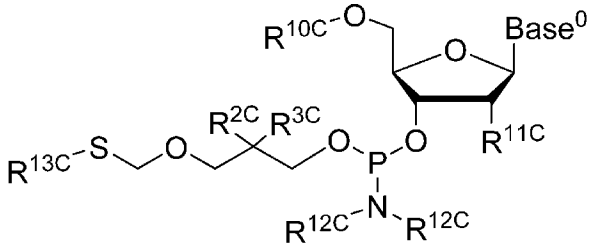


(V)

［式中、R^{14}、R^{15}およびR^{16}は、同一または異なって、それぞれ、水素原子、低級アルキル、低級アルコキシ、または$NR^{17}R^{18}$(式中、R^{17}およびR^{18}は、同一または異なって、それぞれ低級アルキルを表す)を表す］を表す｝で表される化合物またはその塩。

［請求項30］　式(IV-0)

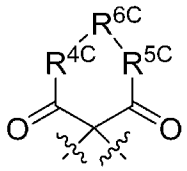
[化12]



(IV-0)

{式中、$Base^0$は核酸塩基を表し、R^{2C}およびR^{3C}は、同一または異なって、それぞれ電子吸引基を表すか、R^{2C}、R^{3C}および隣接する炭素原子が一緒になって、式(II-2)

[化13]



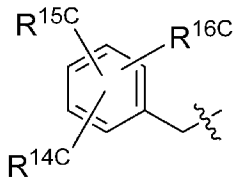
(II-2)

[式中、R^{4C}およびR^{5C}は、同一または異なって、それぞれ酸素原子、CH_2またはNR^{7C}（式中、R^{7C}は、水素原子または低級アルキルを表す)を表し、R^{6C}は、結合または$CR^{8C}R^{9C}$(式中、R^{8C}およびR^{9C}は、同一または異なって、それぞれ水素原子または低級アルキルを表す)を表す]を表し、R^{10C}は水酸基の保護基を表し、R^{11C}は水素原子、フッ素原子または低級アルコキシを表し、R^{12C}は低級アルキルを表し、R^{13C}は置換基を有していてもよい低級アルキルチオ、置換基を有していてもよい低級アルケ

ニルチオ、置換基を有していてもよい低級アルキニルチオまたは

式(V-0)

[化14]



(V-0)

[式中、R^{14C}、R^{15C}およびR^{16C}は、同一または異なって、それぞれ、水素原子、低級アルキル、低級アルコキシ、または$NR^{17C}R^{18C}$(式中、R^{17C}およびR^{18C}は、同一または異なって、それぞれ低級アルキルを表す)を表す]を表す}で表される化合物またはその塩。

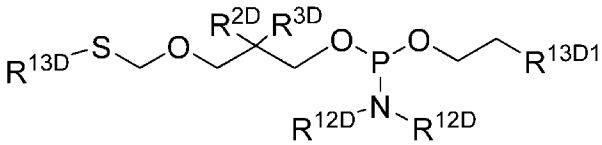
[請求項31] R^{2C}およびR^{3C}が、同一または異なって、それぞれカルボキシ、置換基を有していてもよいアラルキルオキシカルボニル、低級アルコキシカルボニル、低級アルケニルオキシカルボニルまたは低級アルキニルオキシカルボニルである請求項30に記載の化合物またはその塩。

[請求項32] R^{2C}およびR^{3C}が、同一または異なって、それぞれシアノ、ニトロ、低級アルカノイルまたは低級アルキルスルホニルである請求項30に記載の化合物またはその塩。

[請求項33] R^{10C}が、トリチル、4-メトキシトリチルまたは4,4'-ジメトキシトリチルである請求項30～32のいずれか1項に記載の化合物またはその塩。

[請求項34] 式(IV-1)

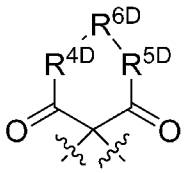
[化15]



(IV-1)

{式中、R^{2D}およびR^{3D}は、同一または異なって、それぞれ電子吸引基を表すか、R^{2D}、R^{3D}および隣接する炭素原子が一緒になって、式(II-3)

[化16]

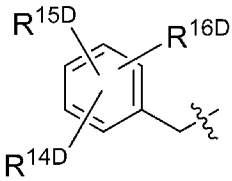


(II-3)

[式中、R^{4D}およびR^{5D}は、同一または異なって、それぞれ酸素原子、CH_2またはNR^{7D}（式中、R^{7D}は、水素原子または低級アルキルを表す)を表し、R^{6D}は、結合または$CR^{8D}R^{9D}$(式中、R^{8D}およびR^{9D}は、同一または異なって、それぞれ水素原子または低級アルキルを表す)を表す]を表し、R^{12D}は低級アルキルを表し、R^{13D}は置換基を有していてもよい低級アルキルチオ、置換基を有していてもよい低級アルケニルチオ、置換基を有していてもよい低級アルキニルチオまたは

式(V-1)

[化17]



(V-1)

[式中、R^{14D}、R^{15D}およびR^{16D}は、同一または異なって、それぞれ、水素原子、低級アルキル、低級アルコキシ、または$NR^{17D}R^{18D}$(式中、R^{17D}およびR^{18D}は、同一または異なって、それぞれ低級アルキルを表す)を表す]を表し、R^{13D1}はシアノ、ニトロ、カルボキシ、低級アルコキシカルボニル、低級アルキルスルホニル、または置換基を有していてもよいアリールスルホニルを表す}で表される化合物またはその塩。

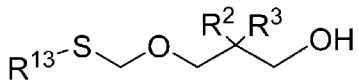
[請求項35] R^{2D}およびR^{3D}が、同一または異なって、それぞれカルボキシ、置換基を有していてもよいアラルキルオキシカルボニル、低級アルコキシカルボニル、低級アルケニルオキシカルボニルまたは低級アルキニルオキシカルボニルである請求項34に記載の化合物またはその塩。

[請求項36] R^{2D}およびR^{3D}が、同一または異なって、それぞれシアノ、ニトロ、低級アルカノイルまたは低級アルキルスルホニルである請求項34に記

載の化合物またはその塩。

[請求項37] 式(VI)

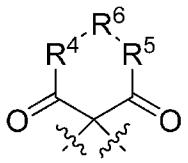
[化18]



(VI)

{式中、R^2およびR^3は、同一または異なって、それぞれ電子吸引基を表すか、R^2、R^3および隣接する炭素原子が一緒になって、式(II)

[化19]

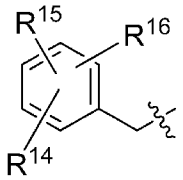


(II)

[式中、R^4およびR^5は、同一または異なって、それぞれ酸素原子、CH_2またはNR^7(式中、R^7は、水素原子または低級アルキルを表す)を表し、R^6は、結合またはCR^8R^9(式中、R^8およびR^9は、同一または異なって、それぞれ水素原子または低級アルキルを表す)を表す] を表し、R^{13}は低級アルキルチオまたは

式(V)

[化20]

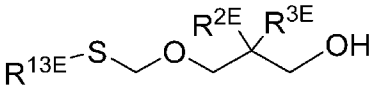


(V)

[式中、R^{14}、R^{15}およびR^{16}は、同一または異なって、それぞれ、水素原子、低級アルキル、低級アルコキシ、または$NR^{17}R^{18}$(式中、R^{17}およびR^{18}は、同一または異なって、それぞれ低級アルキルを表す)を表す]を表す}で表される化合物またはその塩。

[請求項38] 式(VI-0)

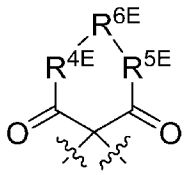
[化21]



(VI-0)

{式中、R^{2E}およびR^{3E}は、同一または異なって、それぞれ電子吸引基を表すか、R^{2E}、R^{3E}および隣接する炭素原子が一緒になって、式(II-4)

[化22]

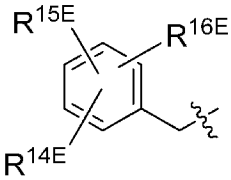


(II-4)

[式中、R^{4E}およびR^{5E}は、同一または異なって、それぞれ酸素原子、CH_2またはNR^{7E}(式中、R^{7E}は、水素原子または低級アルキルを表す)を表し、R^{6E}は、結合または$CR^{8E}R^{9E}$(式中、R^{8E}およびR^{9E}は、同一または異なって、それぞれ水素原子または低級アルキルを表す)を表す]を表し、R^{13E}は置換基を有していてもよい低級アルキルチオ、置換基を有していてもよい低級アルケニルチオ、置換基を有していてもよい低級アルキニルチオまたは

式(V-2)

[化23]



(V-2)

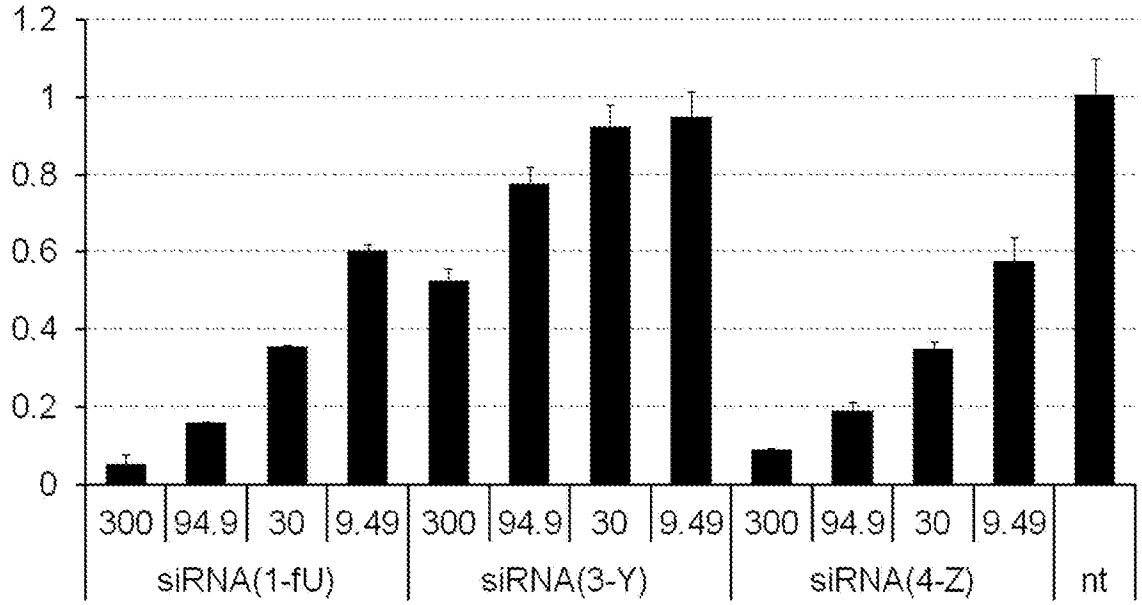
[式中、R^{14E}、R^{15E}およびR^{16E}は、同一または異なって、それぞれ、水素原子、低級アルキル、低級アルコキシ、または$NR^{17E}R^{18E}$(式中、R^{17E}およびR^{18E}は、同一または異なって、それぞれ低級アルキルを表す)を表す]を表す}で表される化合物またはその塩。

[請求項39] R^{2E}およびR^{3E}が、同一または異なって、それぞれ、カルボキシ、置換基を有していてもよいアラルキルオキシカルボニル、低級アルコキシカルボニル、低級アルケニルオキシカルボニルまたは低級アルキニルオキシカルボニルである請求項38に記載の化合物またはその塩。

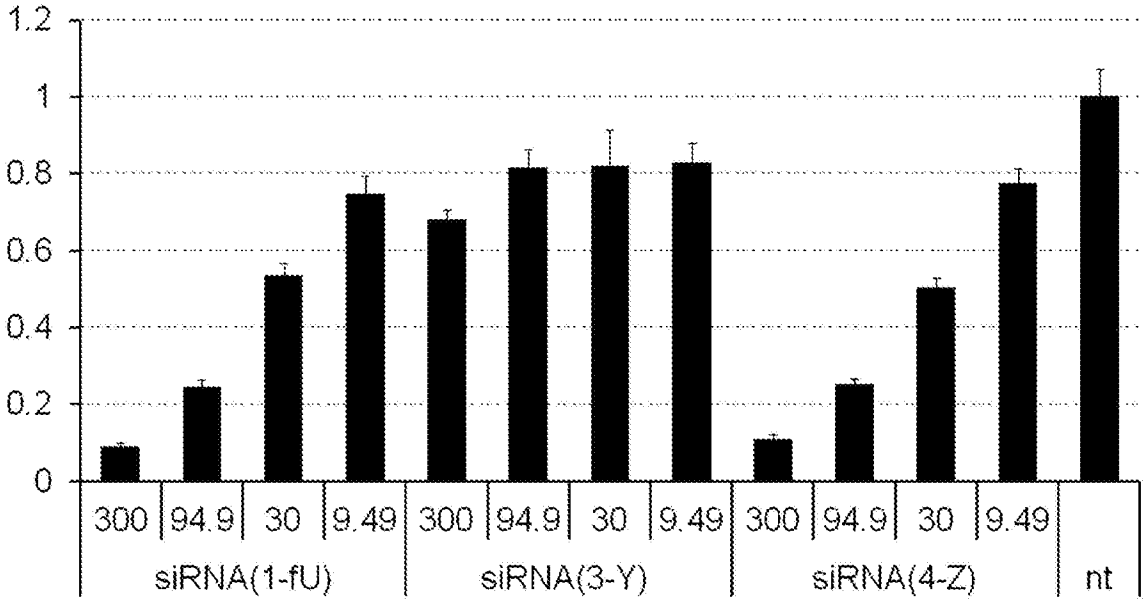
[請求項40] R^{2E}およびR^{3E}が、同一または異なって、それぞれ、シアノ、ニトロ、低級アルカノイルまたは低級アルキルスルホニルである請求項38に

記載の化合物またはその塩。

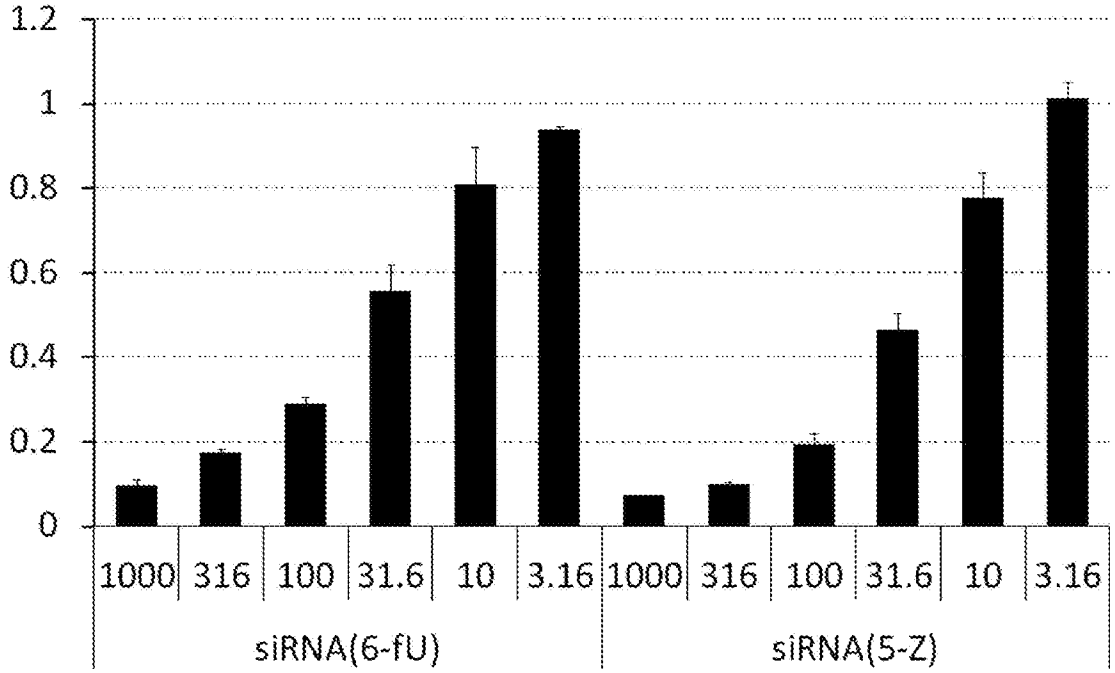
[図1]


1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
300
94.9
30
9.49
300
94.9
30
9.49
300
94.9
30
9.49
siRNA(1-fU)
siRNA(3-Y)
siRNA(4-Z)
nt

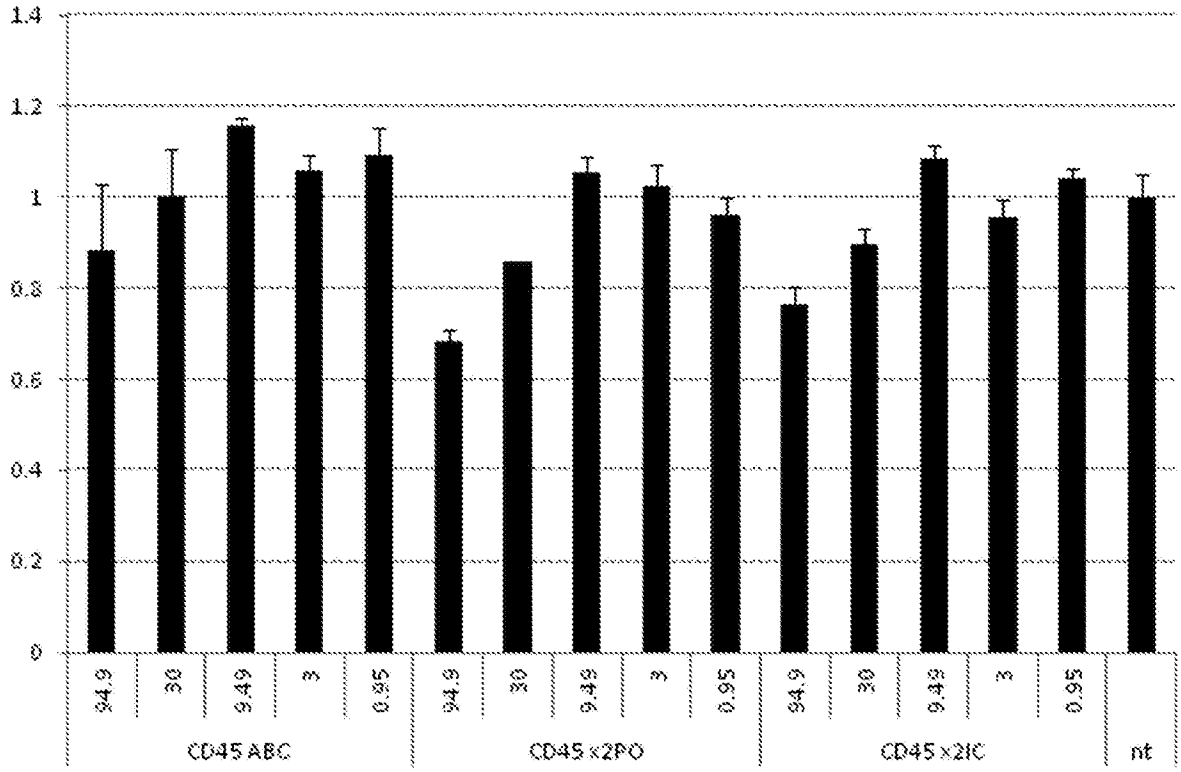
[図2]


1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
300
94.9
30
9.49
300
94.9
30
9.49
300
94.9
30
9.49
siRNA(1-fU)
siRNA(3-Y)
siRNA(4-Z)
nt

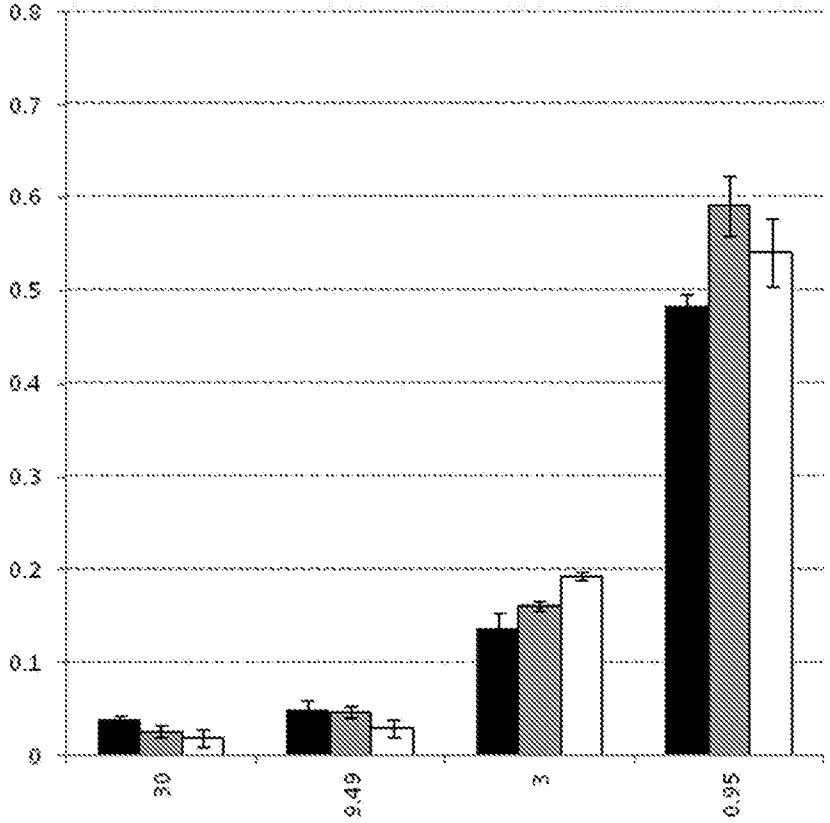
[図3]


1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
1000
316
100
31.6
10
3.16
1000
316
100
31.6
10
3.16
siRNA(6-fU)
siRNA(5-Z)

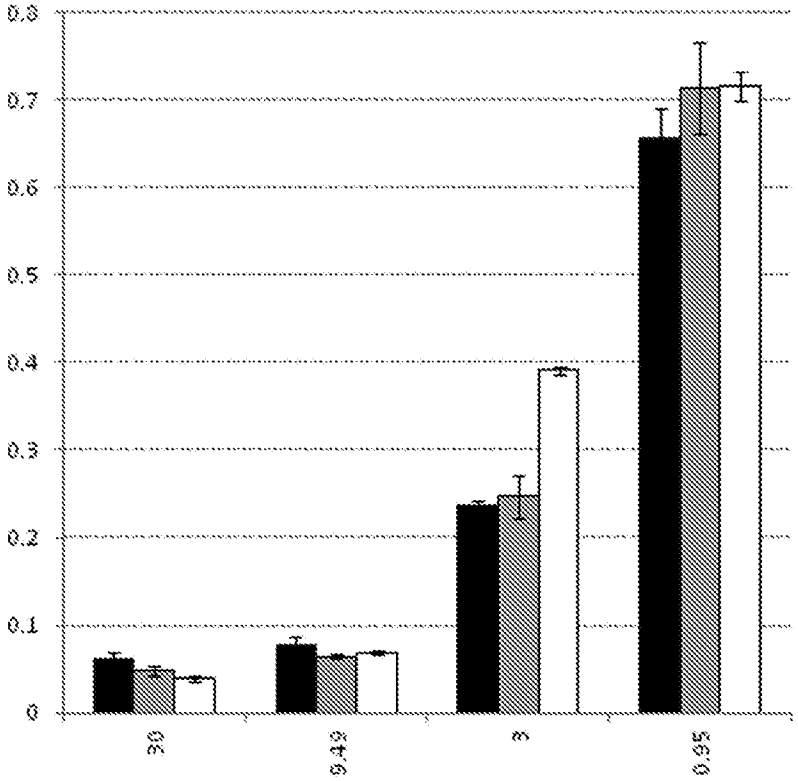
[図4]


1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
94.9
30
9.49
3
0.95
94.9
30
9.49
3
0.95
94.9
30
9.49
3
0.95
nt
CD45 ABC
CD45×2PO
CD45×2IC

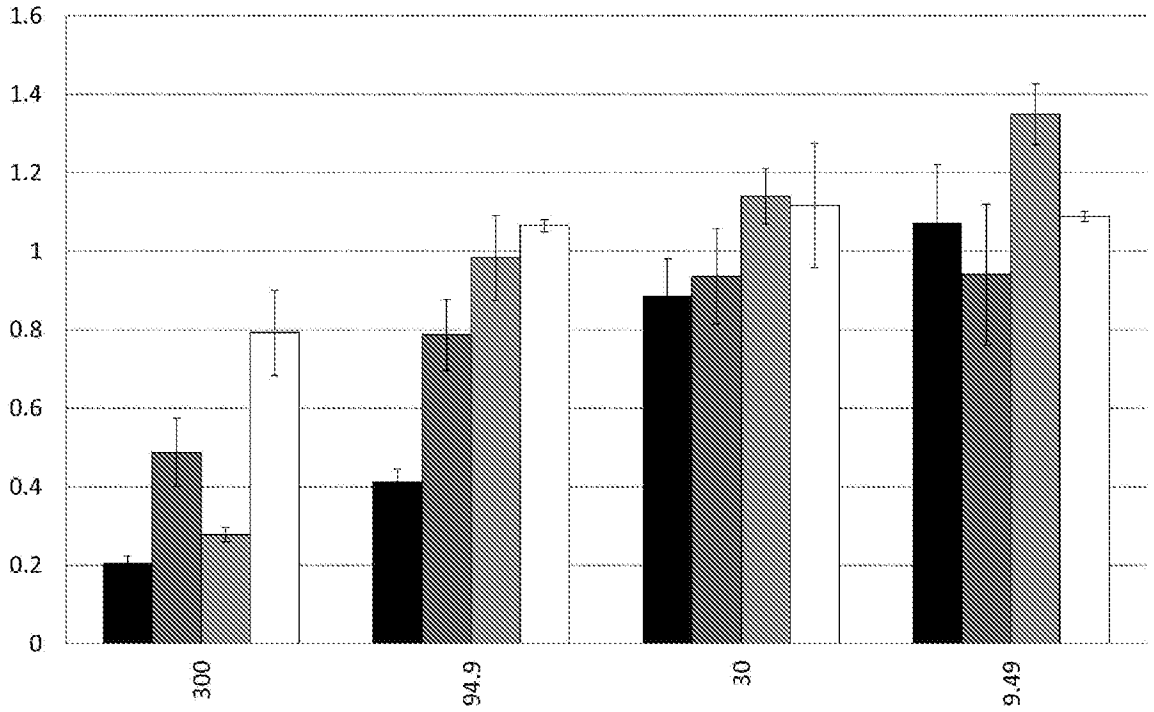
[図5]


0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
30
9.49
3
0.95

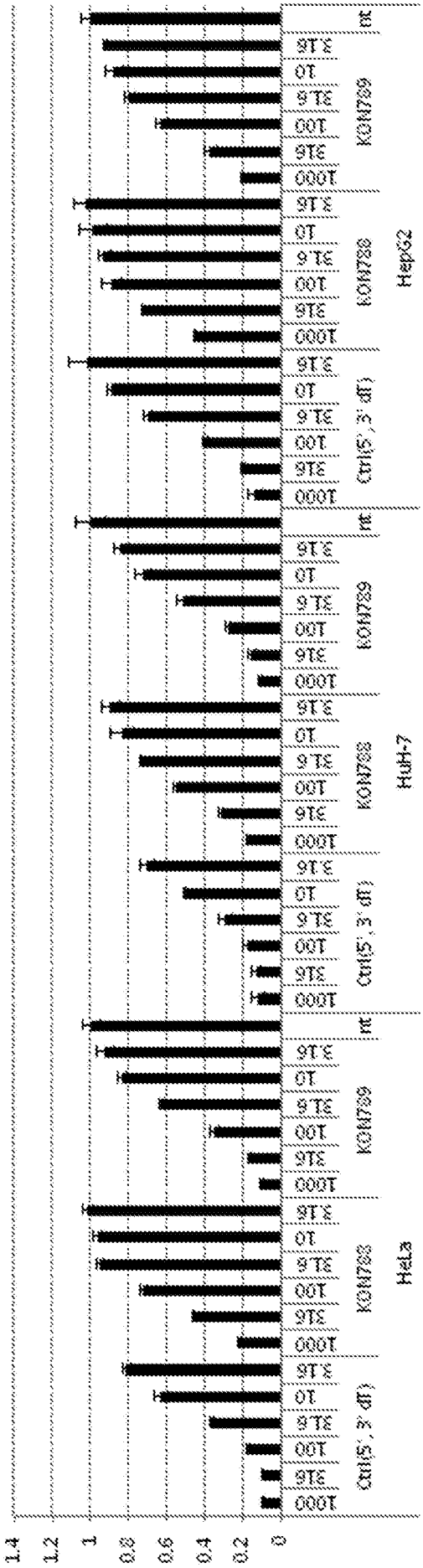
[図6]


0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
30
9.49
3
0.95

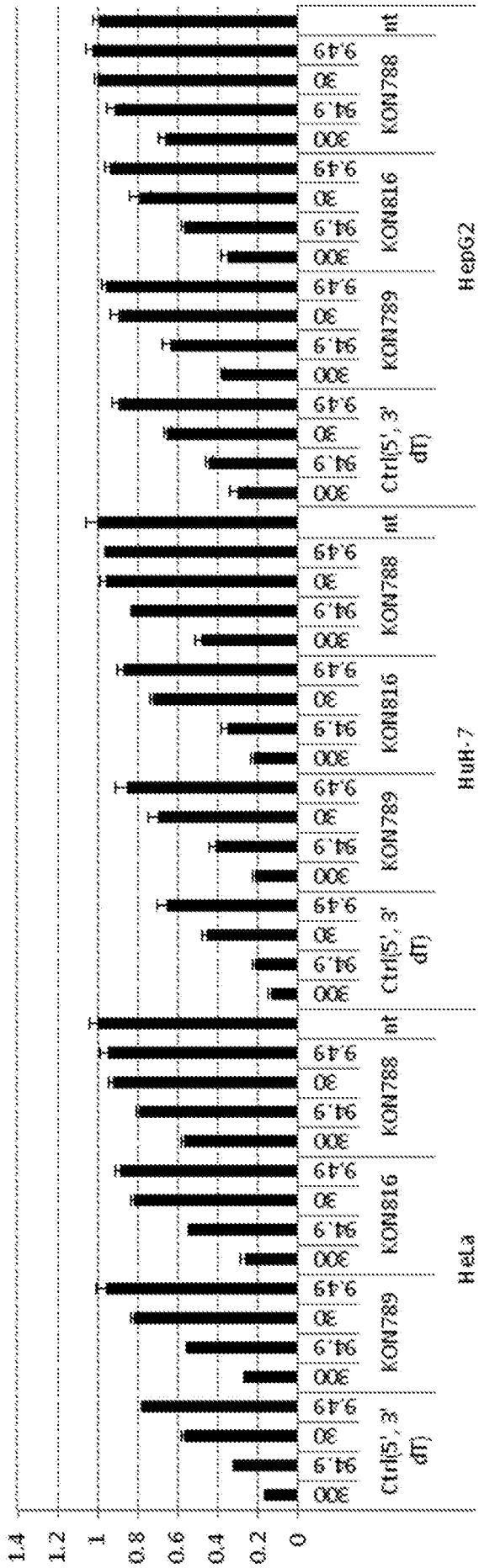
[図7]



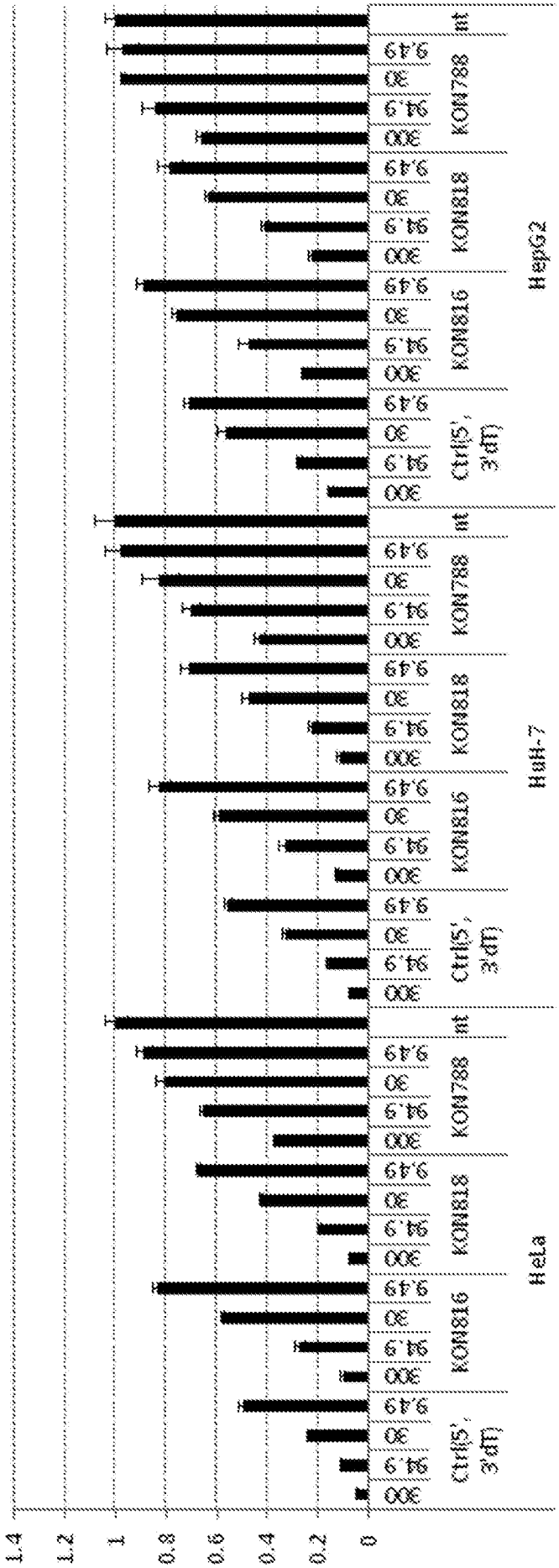
[図8]


1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
HeLa
HuH-7
HepG2
Ctrl(5', 3' dT)
KOM708
KOM709
nt
1000
316
100
31.6
10
3.16

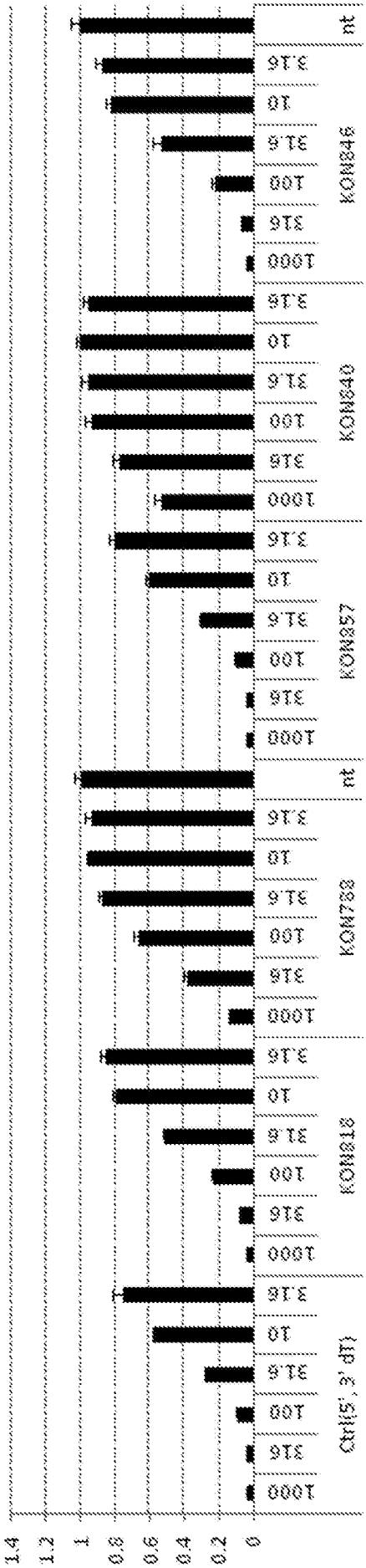
[図9]


1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
300
94.9
30
9.49
Ctrl(5', 3' dT)
KOM789
KOM816
KOM788
mt
HeLa
HuH-7
HepG2

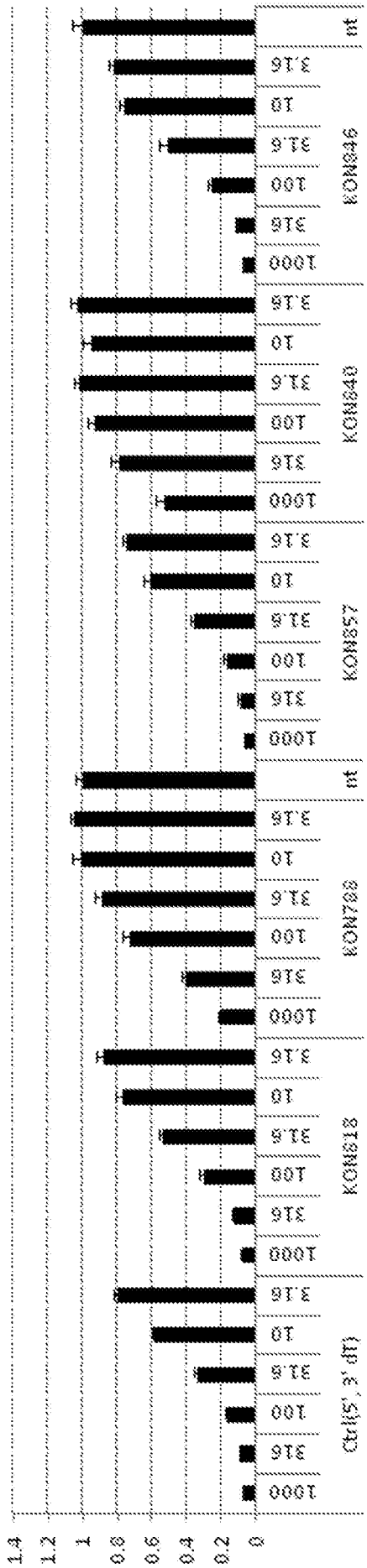
[図10]


1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
300
94.9
30
9.49
Ctrl(5', 3'dT)
KON816
KON818
KON788
mt
HeLa
HuH-7
HepG2

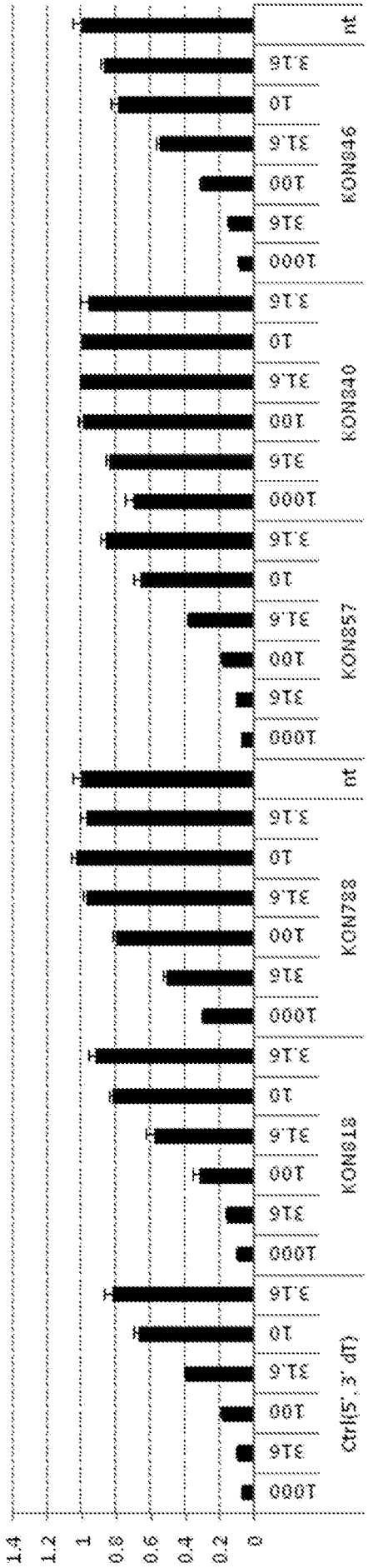
[図11]


1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Ctrl(5', 3' dT)
KOM618
KOM788
KOM857
KOM840
KOM846
1000
316
100
31.6
10
3.16
nt

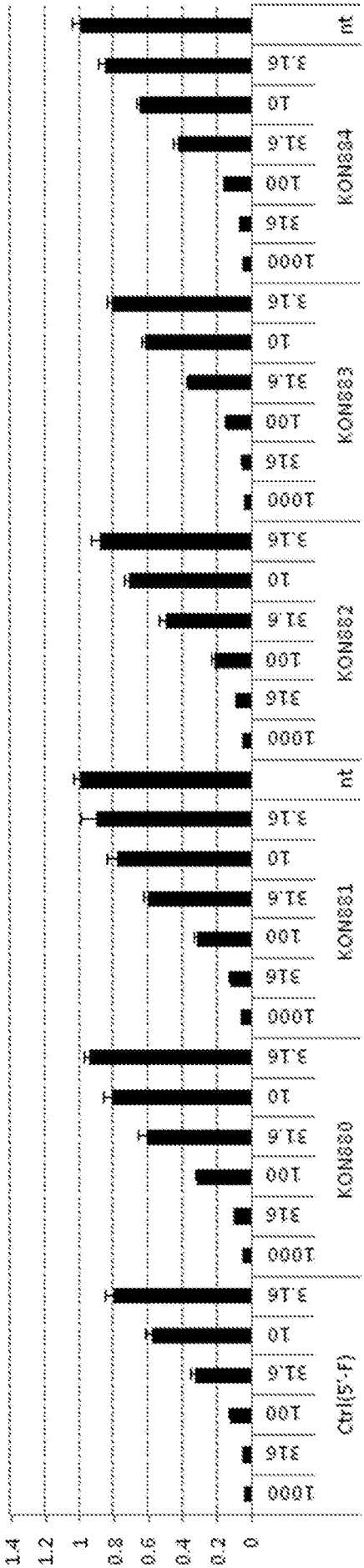
[図12]


1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
CMP(5'3'dT)
KOM718
KOM708
KOM557
KOM640
KOM636
1000
316
100
31.6
10
3.16
μM

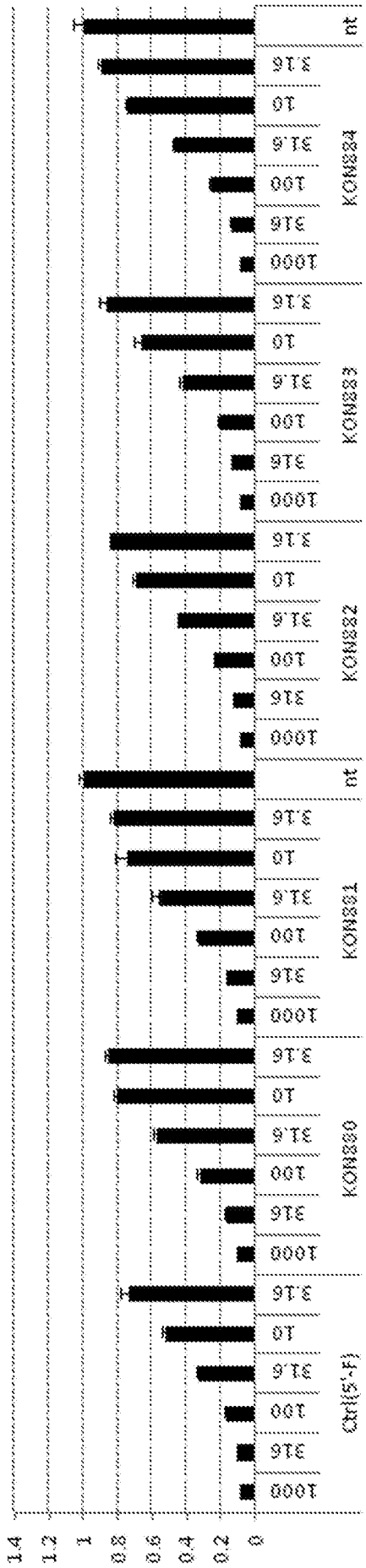
[図13]


1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Ctrl(5',3',dT)
KON018
KON788
KON857
KON840
KON846
1000
316
100
31.6
10
3.16
nt

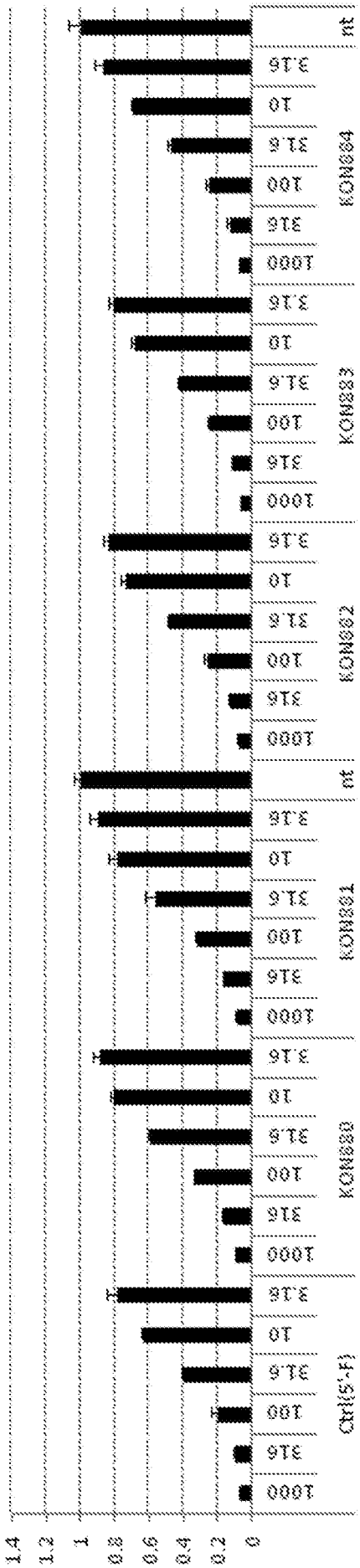
[図14]


1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Ctrl(5'-F)
KOM880
KOM881
KOM882
KOM883
KOM884
1000
316
100
31.6
10
3.16
nt

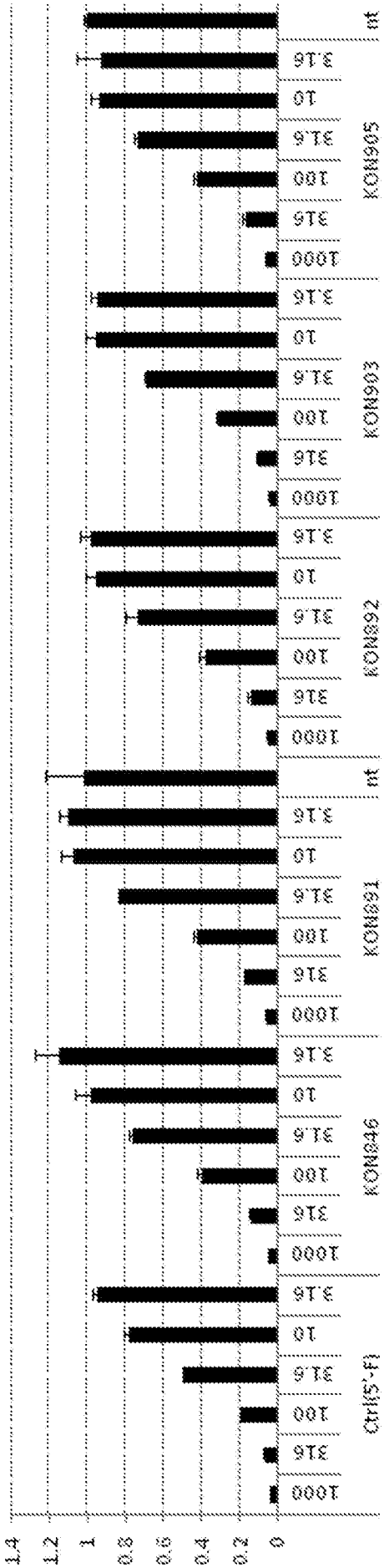
[図15]


1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Ctrl(5'-F)
KOM330
KOM331
KOM332
KOM333
KOM334
1000
316
100
31.6
10
3.16
nt

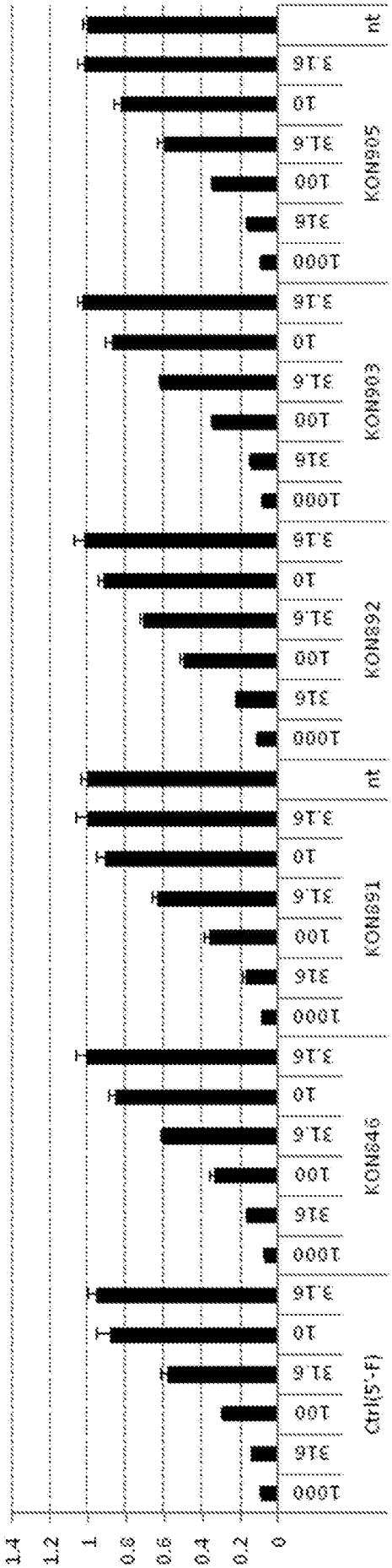
[図16]


1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Ctrl(5'-F)
KOW880
KOW881
KOW882
KOW883
KOW884
1000
316
100
31.6
10
3.16
mt

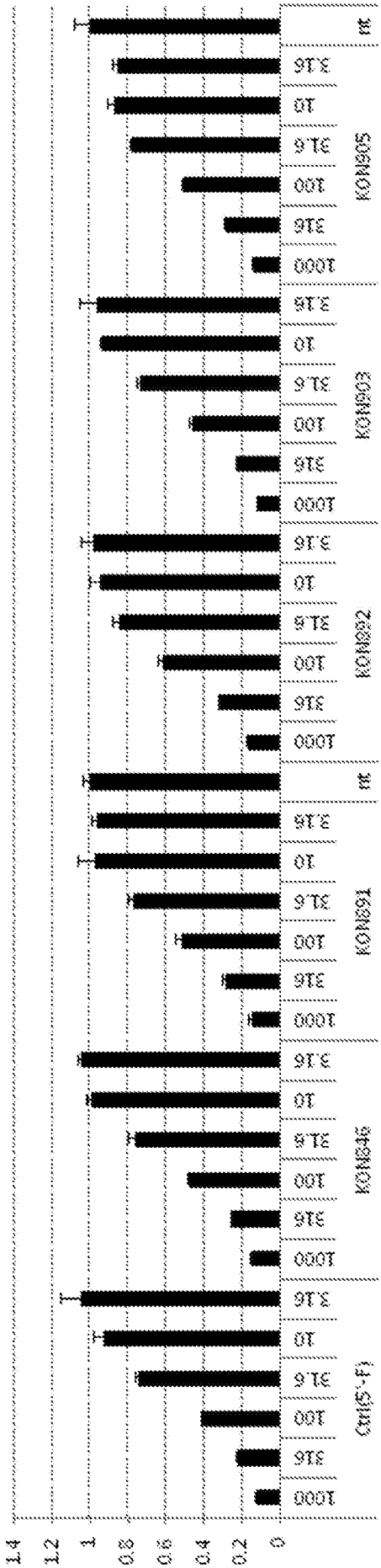
[図17]


1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
1000
316
100
31.6
10
3.16
Ctrl(S'-f)
KON846
KON891
KON892
KON903
KON905
mt

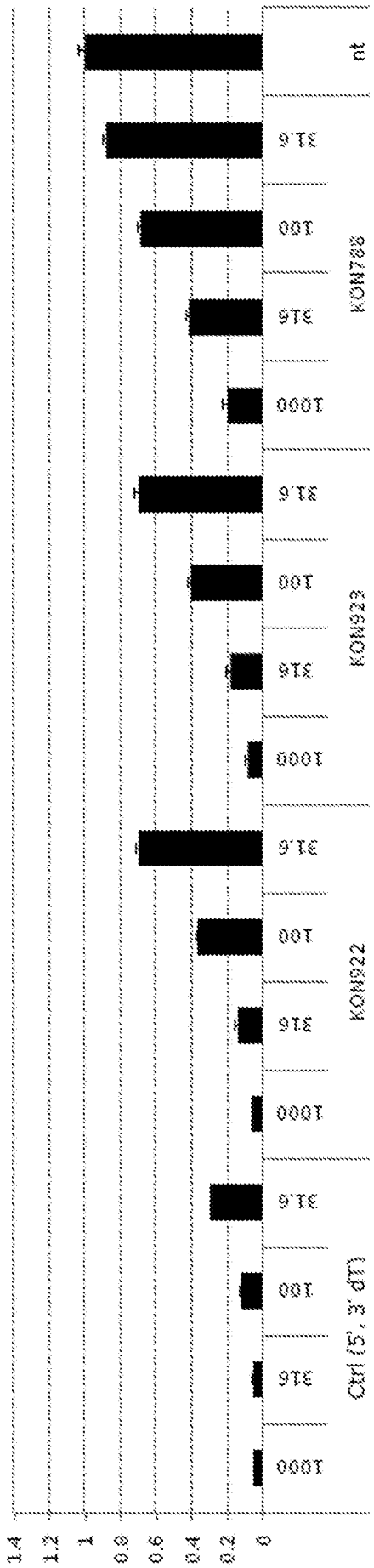
[図18]


1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Ctrl(5'-F)
KOM846
KOM851
KOM892
KOM893
KOM895
1000
316
100
31.6
10
3.16
nt

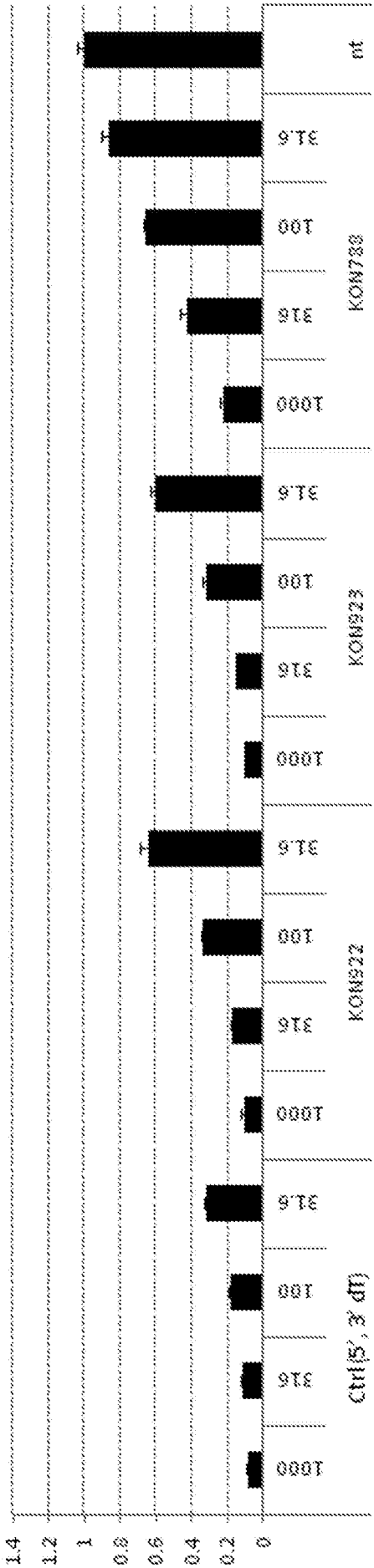
[図19]


1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Ctl(5'-F)
KON846
KON891
KON892
KON893
KON905
1000
316
100
31.6
10
3.16
nt

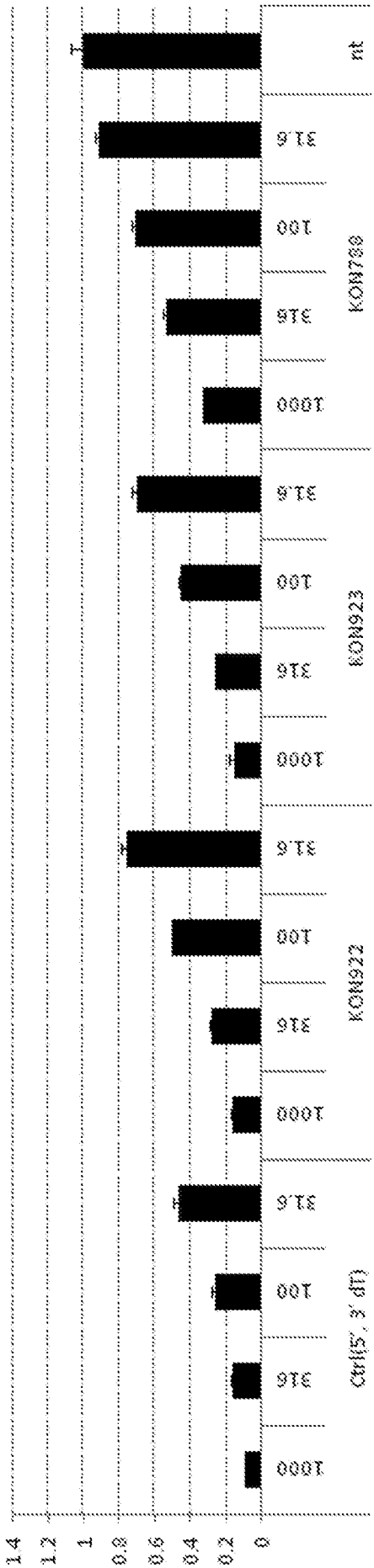
[図20]


1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Ctrl (5', 3' dT)
KOW922
KOW923
KOW788
nt
1000
316
100
31.6

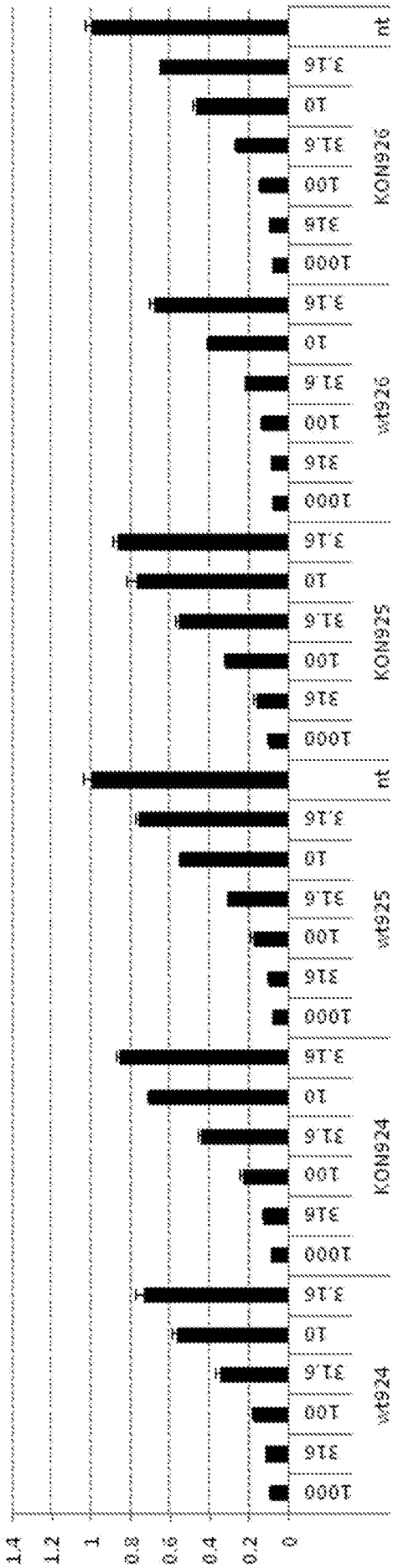
[図21]


1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Ctrl(5', 3' dT)
KOW22
KOW922
KOW739
1000
316
100
31.6
mt

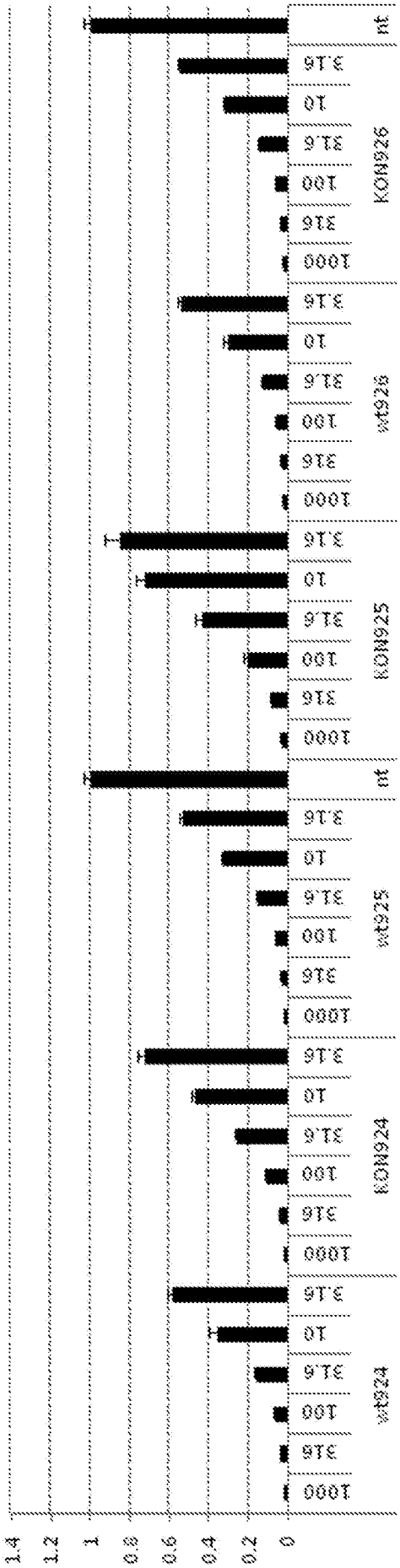
[図22]


1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Cn(5′, 3′ dT)
KOM922
KOM923
KOM760
nt
1000
316
100
31.6

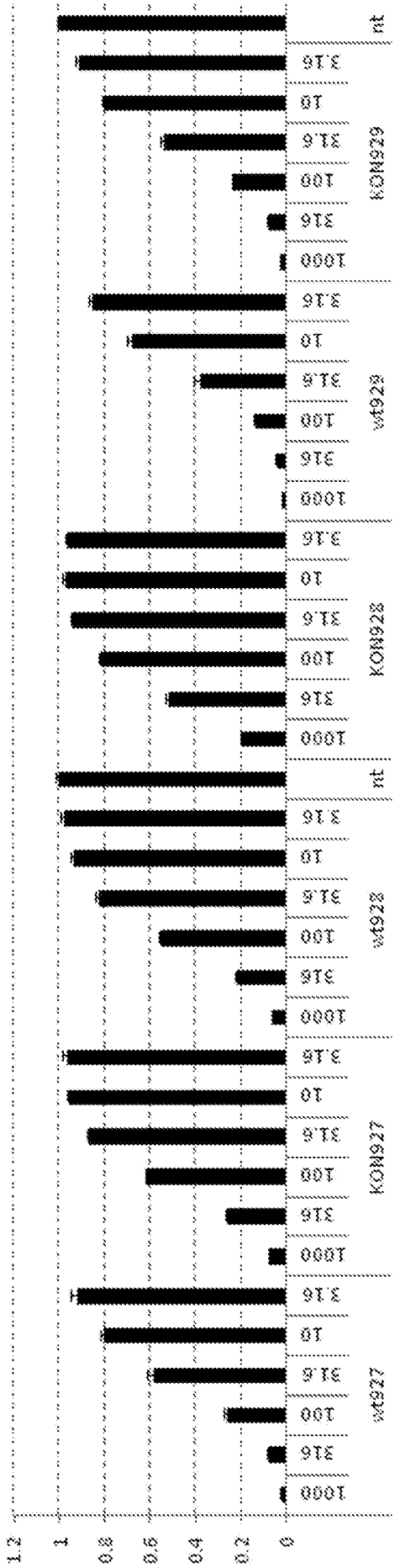
[図23]


1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
wt924
KOM924
wt925
KOM925
wt926
KOM926
1000
316
100
31.6
10
3.16
nt

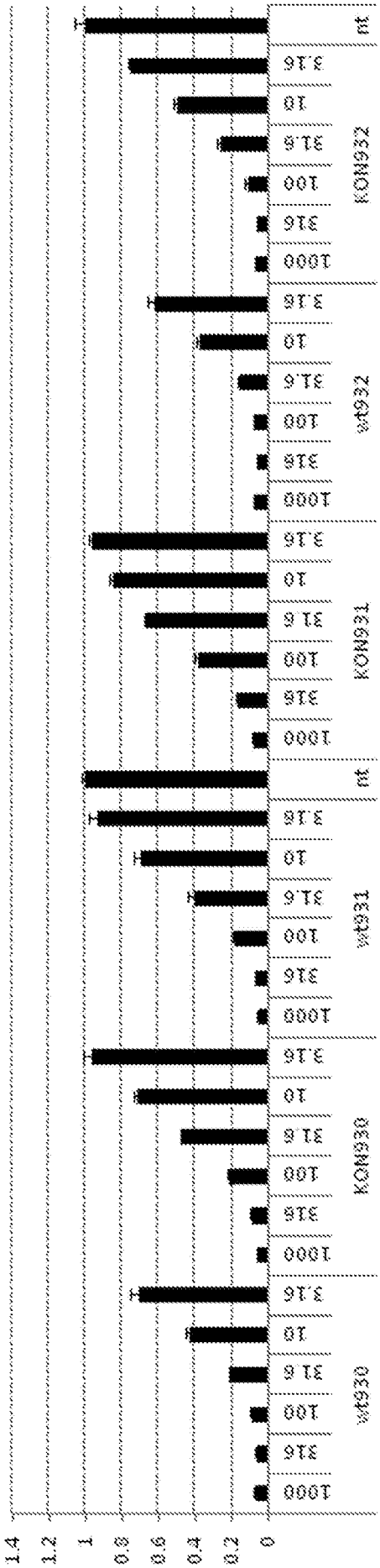
[図24]


1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
wt924
KOM924
wt925
KOM925
wt926
KOM926
1000
316
100
31.6
10
3.16
nt

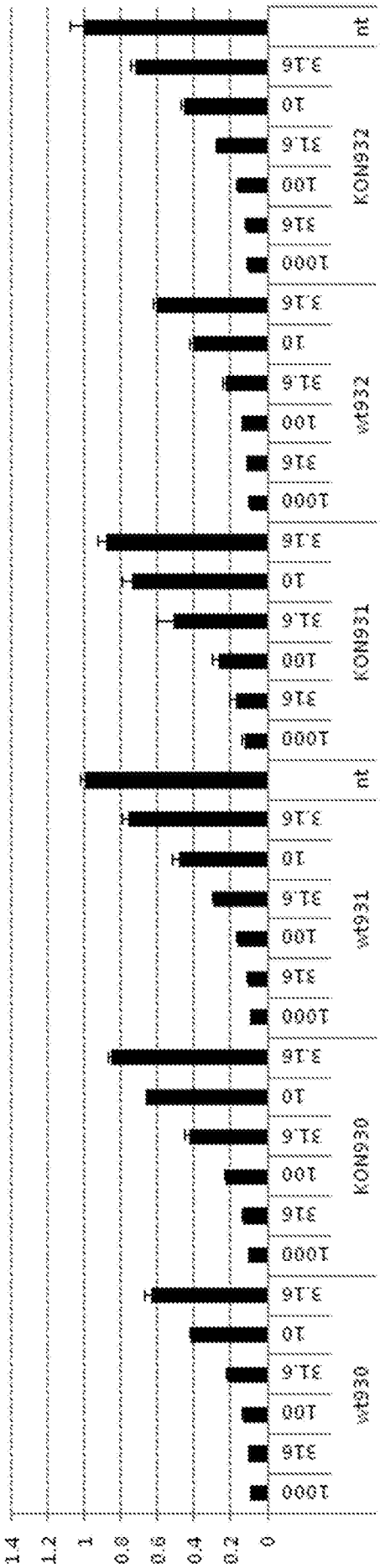
[図25]


1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
wt927
KOW927
wt928
KOW928
wt929
KOW929
nt
1000
316
100
31.6
10
3.16

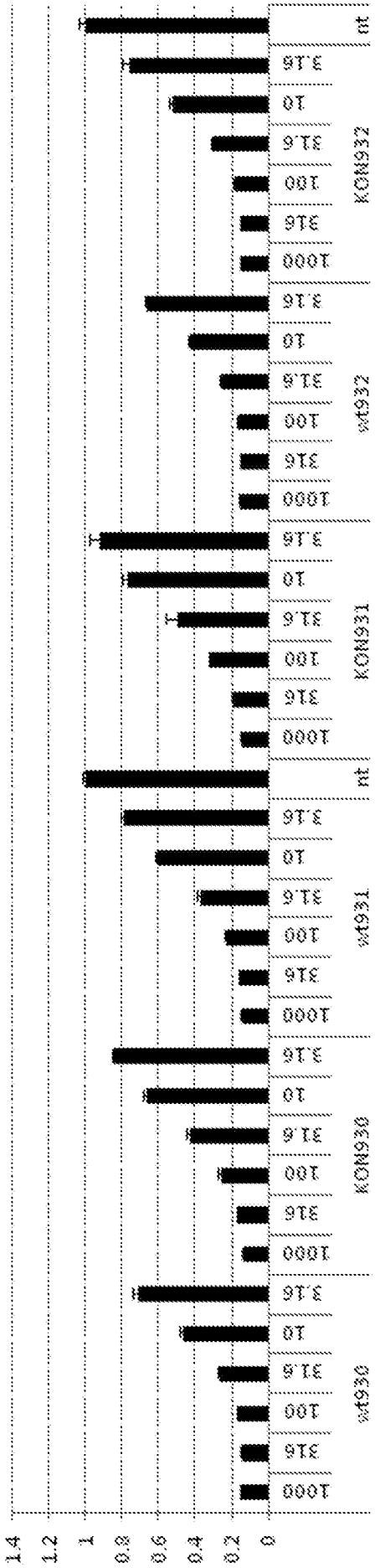
[図26]


1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
wt930
KOM930
wt931
KOM931
wt932
KOM932
1000
316
100
31.6
10
3.16
nt

[図27]


1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
wt
KOM932
KOM931
wt
KOM930
KOM930
wt
KOM931
KOM932
1000
316
100
31.6
10
3.16

[図28]


1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
wt930
KON930
wt931
KON931
wt932
KON932
1000
316
100
31.6
10
3.16
nt

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2016/069057

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C07H21/00(2006.01)i, *C12N15/113*(2010.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07H21/00, C12N15/113

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2016	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2016

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAplus/REGISTRY(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2015/069932 A1 (SOLSTICE BIOLOGICS, LTD.), 14 May 2015 (14.05.2015), claims; examples (Family: none)	1-40
A	JP 2014-522862 A (Wave Life Sciences Pte. Ltd.), 08 September 2014 (08.09.2014), claims; schemes; examples & US 2014/0194610 A1 & WO 2013/012758 A1 & EP 2734208 A1 & CN 103796657 A & KR 10-2014-0068884 A	1-40

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
04 August 2016 (04.08.16)

Date of mailing of the international search report
16 August 2016 (16.08.16)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3,Kasumigaseki,Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915,Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2016/069057

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2012-532199 A (Ontorii, Inc.), 13 December 2012 (13.12.2012), claims; examples & US 2012/0316224 A1 & WO 2011/005761 A1 & EP 2451461 A1 & KR 10-2012-0046238 A & CN 102596204 A	1-40
A	POIJAERVI,P. et al, Towards nucleotide prodrugs derived from 2,2-bis(hydroxymethyl)malonate and its congeners: hydrolytic cleavage of 2-cyano-2-(hydroxymethyl)-3-methoxy-3-oxopropyl and 3-(alkylamino)-2-cyano-2-(hydroxymethyl)-3-oxopropyl protections from the internucleosidic phosphodiester and phosphorothioate linkages, Helvetica Chimica Acta, 2002, Vol.85, No.7, pp.1869-1876	1-40
A	POIJAERVI,P. et al, 2,2-Bis(ethoxycarbonyl)- and 2-(Alkylaminocarbonyl)-2-cyano-Substituted 3-(Pivaloyl-oxy)propyl Groups as Biodegradable Phosphate Protections of Oligonucleotides, Bioconjugate Chemistry, 2005, Vol.16, No.6, pp.1564-1571	1-40

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１６／０６９０５７

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C07H21/00(2006.01)i, C12N15/113(2010.01)i

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C07H21/00, C12N15/113

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０１６年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１６年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１６年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CAplus/REGISTRY (STN)

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
A	WO 2015/069932 A1 (SOLSTICE BIOLOGICS, LTD.) 2015.05.14, Claims、Examples (ファミリーなし)	1-40
A	JP 2014-522862 A (ウェイブ　ライフ　サイエンス　プライベート　リミテッド) 2014.09.08, 特許請求の範囲、スキーム、実施例 & US 2014/0194610 A1 & WO 2013/012758 A1 & EP 2734208 A1 & CN 103796657 A & KR 10-2014-0068884 A	1-40

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。　☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 ０４．０８．２０１６	国際調査報告の発送日 １６．０８．２０１６
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ） 郵便番号１００－８９１５ 東京都千代田区霞が関三丁目４番３号	特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｐ　４０４２ 三上　晶子 電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４９２

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
A	JP 2012-532199 A (オントリー、インコーポレイテッド) 2012.12.13, 特許請求の範囲、実施例 & US 2012/0316224 A1 & WO 2011/005761 A1 & EP 2451461 A1 & KR 10-2012-0046238 A & CN 102596204 A	1-40
A	POIJAERVI,P. et al, Towards nucleotide prodrugs derived from 2,2-bis(hydroxymethyl)malonate and its congeners: hydrolytic cleavage of 2-cyano-2-(hydroxymethyl)-3-methoxy-3-oxopropyl and 3-(alkylamino)-2-cyano-2-(hydroxymethyl)-3-oxopropyl protections from the internucleosidic phosphodiester and phosphorothioate linkages, Helvetica Chimica Acta, 2002, Vol.85, No.7, pp.1869-1876	1-40
A	POIJAERVI,P. et al, 2,2-Bis(ethoxycarbonyl)- and 2-(Alkylaminocarbonyl)-2-cyano-Substituted 3-(Pivaloyl-oxy)propyl Groups as Biodegradable Phosphate Protections of Oligonucleotides, Bioconjugate Chemistry, 2005, Vol.16, No.6, pp.1564-1571	1-40