



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公告本

(11) 證書號數：TW I733751 B

(45) 公告日：中華民國 110 (2021) 年 07 月 21 日

(21) 申請案號：106103567

(22) 申請日：中華民國 106 (2017) 年 02 月 02 日

(51) Int. Cl. : C07H21/00 (2006.01)

A61K31/7088 (2006.01)

A61K31/713 (2006.01)

A61K47/50 (2017.01)

(30) 優先權：2016/01/29 日本

特願 2016-016707

(71) 申請人：日商協和麒麟股份有限公司 (日本) KYOWA KIRIN CO., LTD. (JP)  
日本

(72) 發明人：上原啓嗣 UEHARA, KEIJI (JP)；鈴木康裕 SUZUKI, YASUHIRO (JP)；岩井宏徒 IWAI, HIROTO (JP)；本間正一 HONMA, MASAKAZU (JP)；福田裕一 FUKUDA, YUICHI (JP)；木內達人 KIUCHI, TATSUTO (JP)

(74) 代理人：陳長文

(56) 參考文獻：

WO 2013/075035A1

WO 2014/179620A1

WO 2014/179627A2

WO 2014/179629A2

WO 2015/105083A1

審查人員：謝敏哲

申請專利範圍項數：9 項 圖式數：0 共 315 頁

(54) 名稱

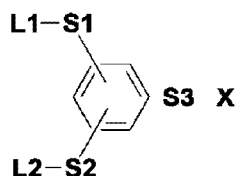
核酸複合體

(57) 摘要

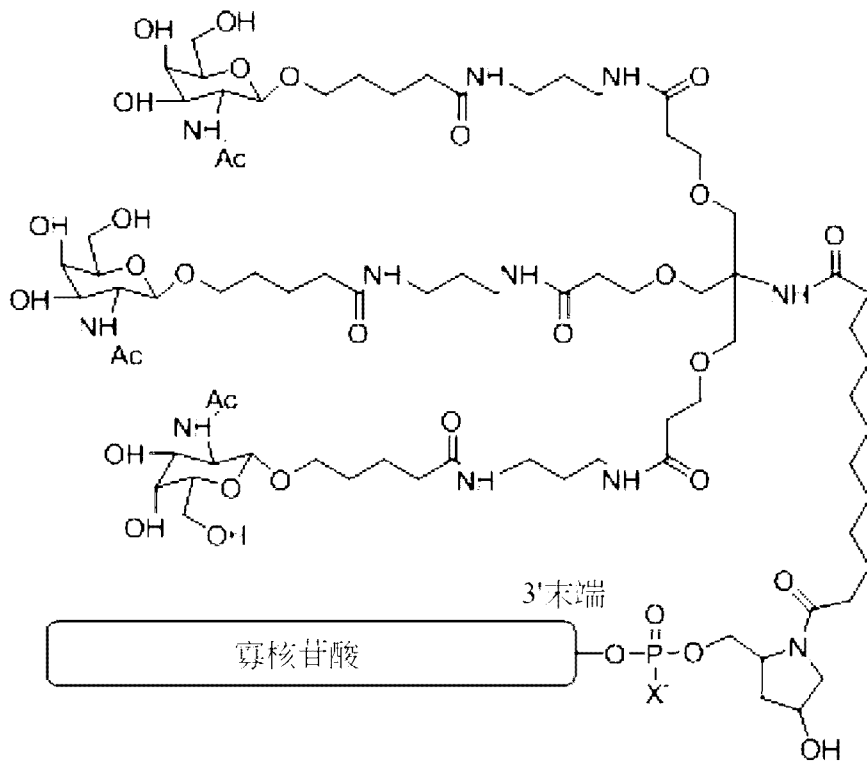
本發明係關於下述式 1 所表示之核酸複合體。

式 1：

[化1]

(式 1 中，X 為寡核苷酸，L1 及 L2 分別獨立為糖配體，S1、S2 及 S3 分別獨立為連結子)  
特徵化學式：

[化1]





# 公告本

申請日：106年2月2日

I733751

## 【發明摘要】

IPC分類：C07H 21/00 (2006.01)  
A61K 31/7088 (2006.01)  
A61K 31/713 (2006.01)  
A61K 47/50 (2017.01)

### 【中文發明名稱】

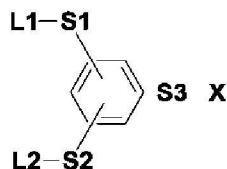
核酸複合體

### 【中文】

本發明係關於下述式1所表示之核酸複合體。

式1：

[化1]



(式1中，X為寡核苷酸，L1及L2分別獨立為糖配體，S1、S2及S3分別獨立為連結子)

### 【指定代表圖】

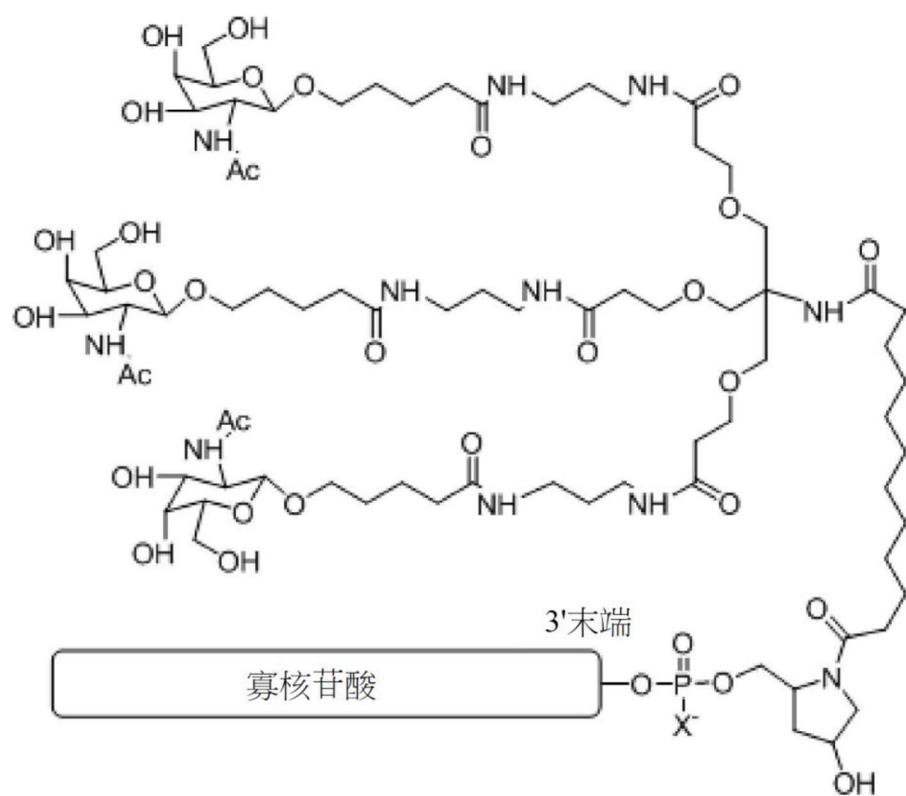
無

### 【代表圖之符號簡單說明】

無

### 【特徵化學式】

[化1]



## 【發明說明書】

### 【中文發明名稱】

核酸複合體

### 【技術領域】

本發明係關於一種核酸複合體及含有該核酸複合體之醫藥組合物等。

### 【先前技術】

作為核酸醫藥，已知有適體、反義核酸、誘餌核酸、核酶、siRNA、miRNA及antimiRNA等。核酸醫藥就可控制細胞內之所有基因之較高之通用性之方面而言，期待其於迄今被視為難以治療之各種疾病中之臨床應用。

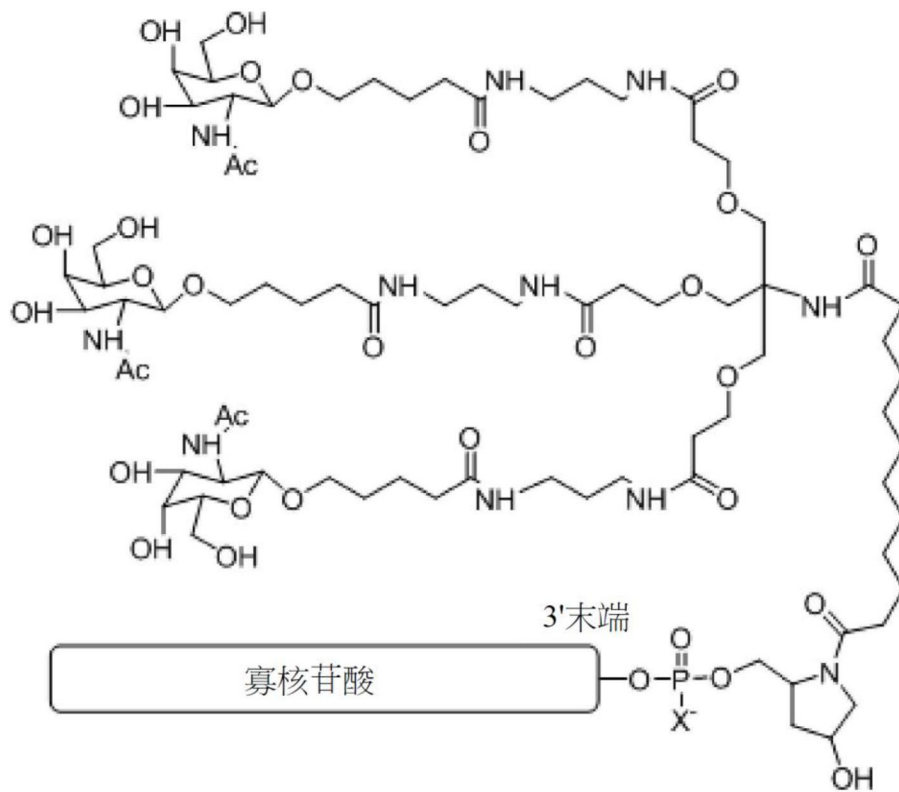
又，核酸醫藥就細胞內之較高之標靶選擇性與活性之方面而言，作為繼抗體、低分子醫藥之後之下一代醫藥而受到期待。

然而，作為核酸醫藥之問題點，可列舉難以傳遞至標靶組織。

作為活體內之有效之核酸醫藥之傳遞法之一，報告有使用標靶化合物與核酸之核酸複合體(conjugate)。作為標靶化合物，可列舉能夠與在細胞外表現之受體鍵結之配體。其中，尤其是作為可與在肝細胞中極高表現之去唾液酸糖蛋白質受體(asialoglycoprotein receptor, ASGPR)鍵結之配體，而報告有複數種利用N-乙醯基-D-半乳糖胺(GalNAc)等之核酸複合體。近年來，報告有將該等配體與siRNA類鍵結而成之核酸複合體可有效率地傳遞至肝細胞(非專利文獻1)。

作為標靶化合物與寡核苷酸之複合體，例如於專利文獻1及2中揭示有以下所示之核酸複合體。

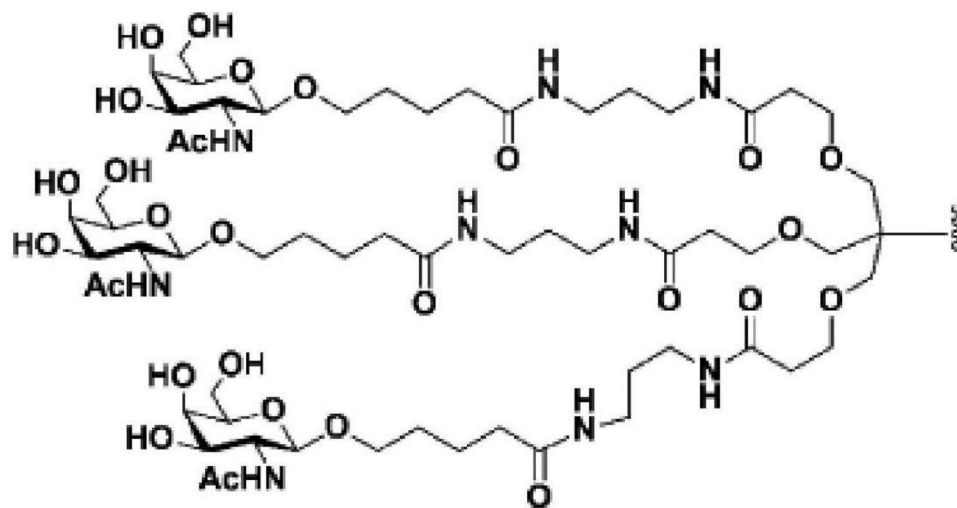
[化1]



(式中，Ac表示乙醯基。以下，於本說明書中相同)

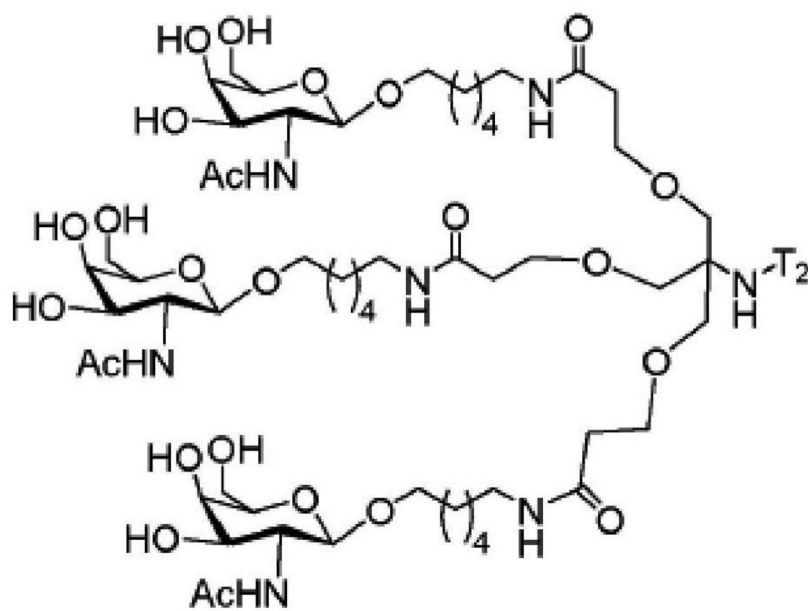
又，於專利文獻3中揭示有一種具有以下結構之核酸複合體，該結構具有與專利文獻1及2同樣之糖配體-連繫單元。

[化2]



又，於專利文獻4中，作為糖配體-連繫單元，揭示有具有以下所示之結構之核酸複合體。

[化3]



先前技術文獻

專利文獻

專利文獻1：國際公開第2009/073809號

專利文獻2：國際公開第2013/075035號

專利文獻3：國際公開第2015/105083號

專利文獻4：國際公開第2014/179620號

非專利文獻

非專利文獻1：Journal of American Chemical Society，2014年，第136卷，p16958-16961

**【發明內容】**

[發明所欲解決之問題]

本發明之目的在於提供一種新穎核酸複合體。

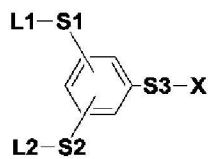
[解決問題之技術手段]

本發明係關於以下之(1)~(22)。

(1)一種核酸複合體，其係以下述式1表示，

式1：

[化4]



(式1中，

X為寡核苷酸，

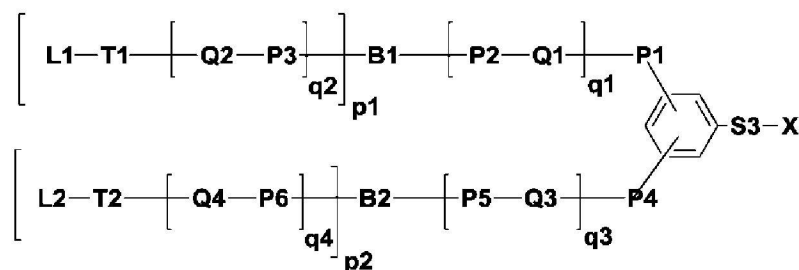
L1及L2分別獨立為糖配體，

S1、S2及S3分別獨立為連結子)。

(2)如(1)所記載之核酸複合體，其具有下述式2所表示之結構，

式2：

[化5]



(式2中，

X、L1、L2及S3分別與上述含義相同，

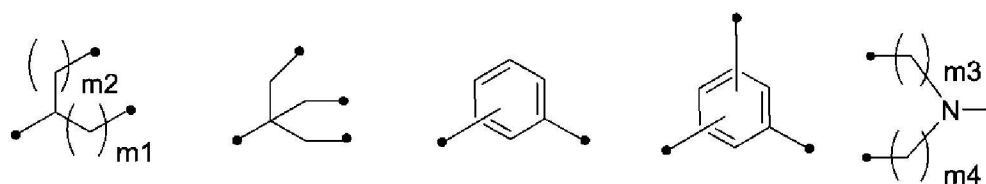
P1、P2、P3、P4、P5及P6、以及T1及T2分別獨立，不存在或者為-CO-、-NH-、-O-、-S-、-O-CO-、-S-CO-、-NH-CO-、-CO-O-、-CO-S-或-CO-NH-，

Q1、Q2、Q3及Q4分別獨立，不存在或者為經取代或未經取代之碳數1~12之伸烷基或 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ，n為0~99之整數，

B1及B2分別獨立為鍵結鍵，或為下述式2-1所表示之任一結構，各結構中之末端之黑圓點分別為與P2或P3或者P5或P6之鍵結點，m1、m2、m3及m4分別獨立為0~10之整數，

式2-1：

[化6]



p1及p2分別獨立為1、2或3之整數，

q1、q2、q3及q4分別獨立為0~10之整數，

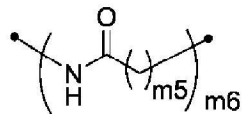
其中，於p1及p2分別為2或3之整數時，各P3及P6、Q2及Q4、T1及T2以及L1及L2可相同或不同)。

(3)如請求項2所記載之核酸複合體，其中P1及P4分別獨立為-CO-NH-、-NH-CO-或-O-。

(4)如(2)及(3)所記載之核酸複合體，其中-(P2-Q1)<sub>q1</sub>-及-(P5-Q3)<sub>q3</sub>-分別獨立，不存在或者為下述式3-1~式3-3所表示之任一結構，

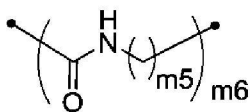
式3-1：

[化7]



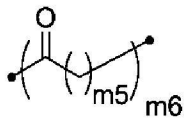
式3-2：

[化8]



式3-3：

[化9]



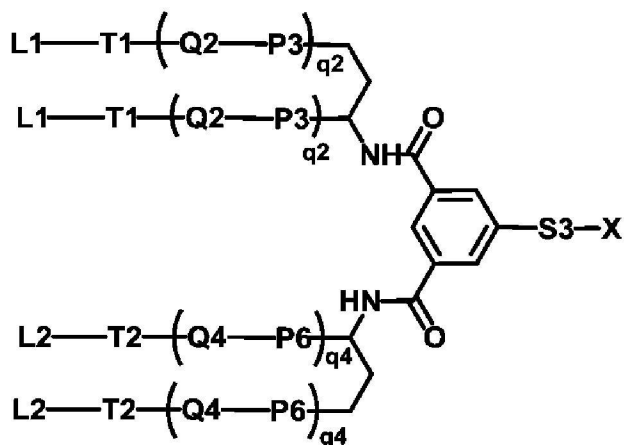
(式3-1～式3-3中，

m5及m6分別獨立為0～10之整數，式3-1～式3-3之結構中之末端之黑圓點分別為與B1或B2或者P1或P4之鍵結點)。

(5)如(2)至(4)中任一項所記載之核酸複合體，其具有下述式4-1～式4-9所表示之任一結構，

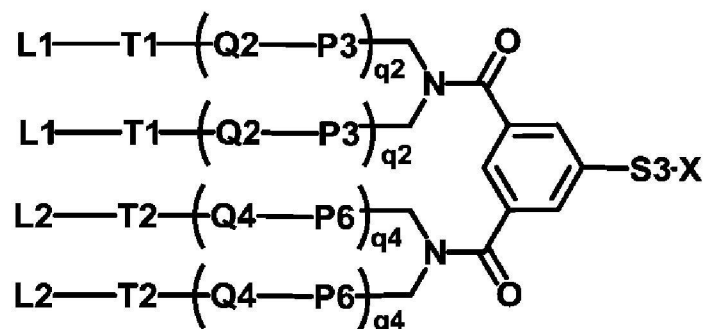
式4-1：

[化10]



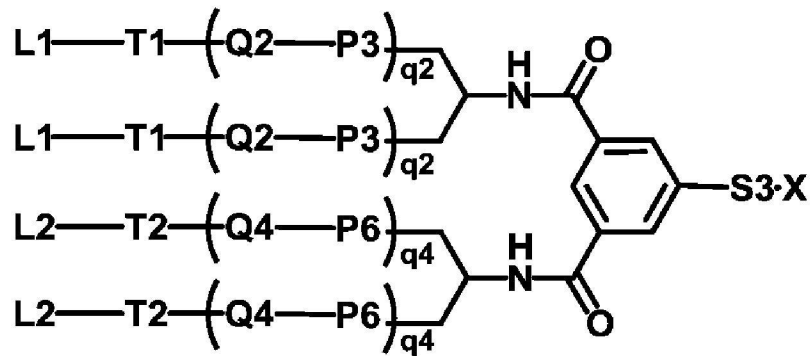
式4-2：

[化11]



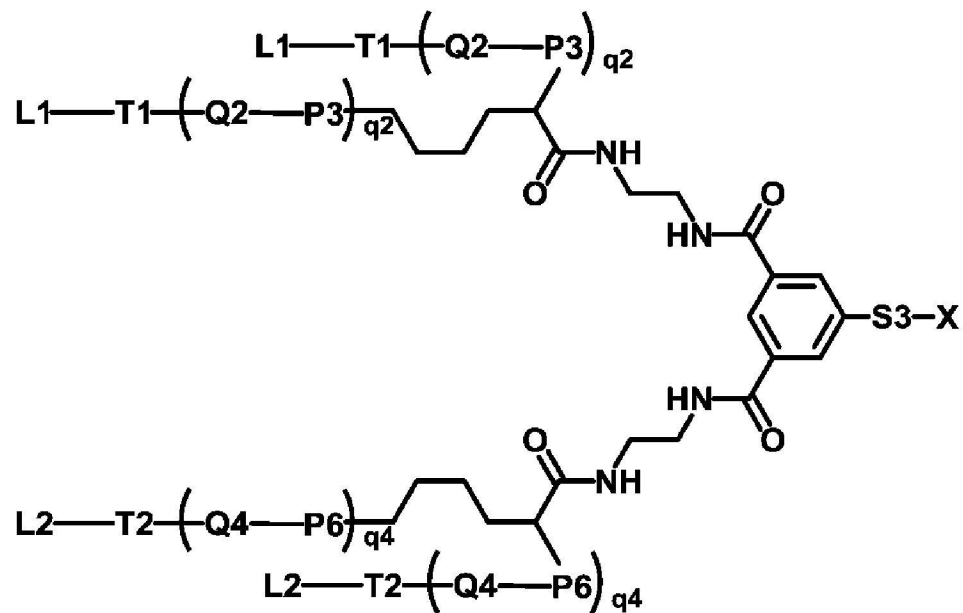
式4-3：

[化12]



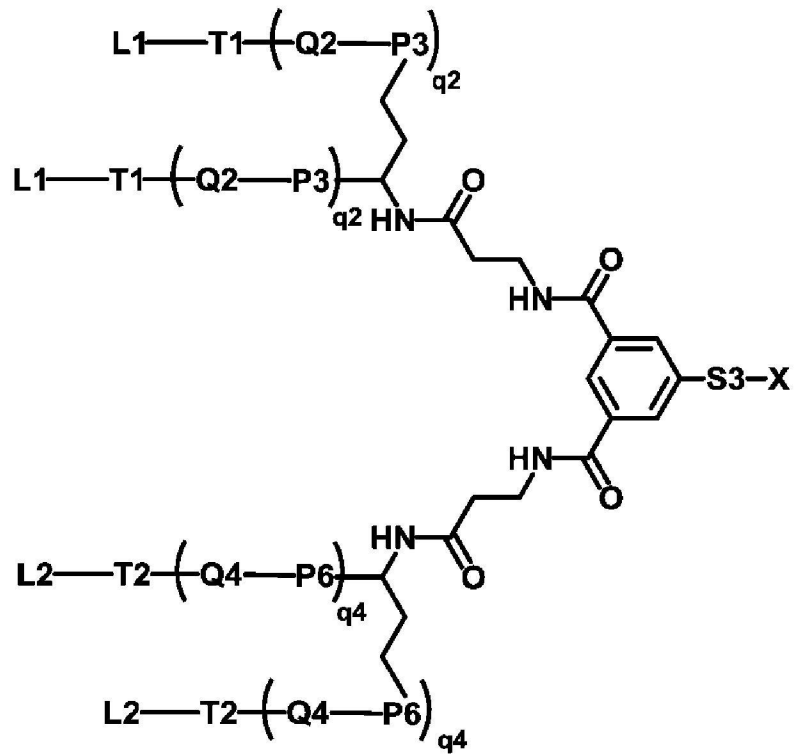
式4-4：

[化13]



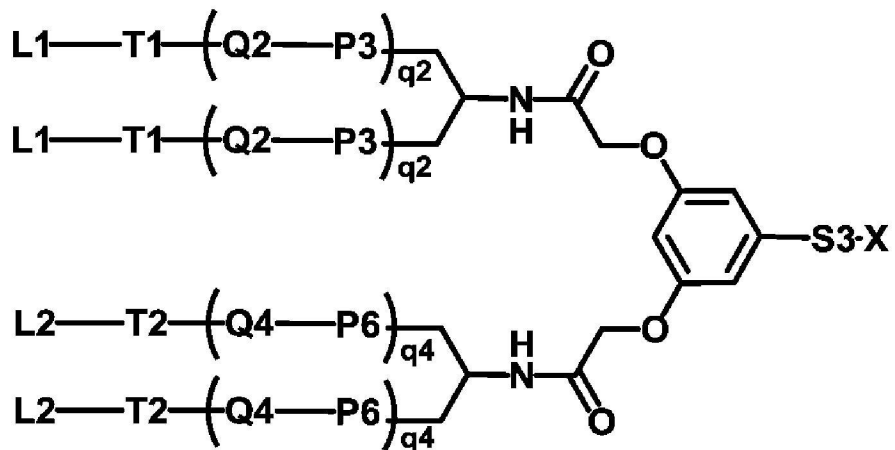
式4-5：

[化14]



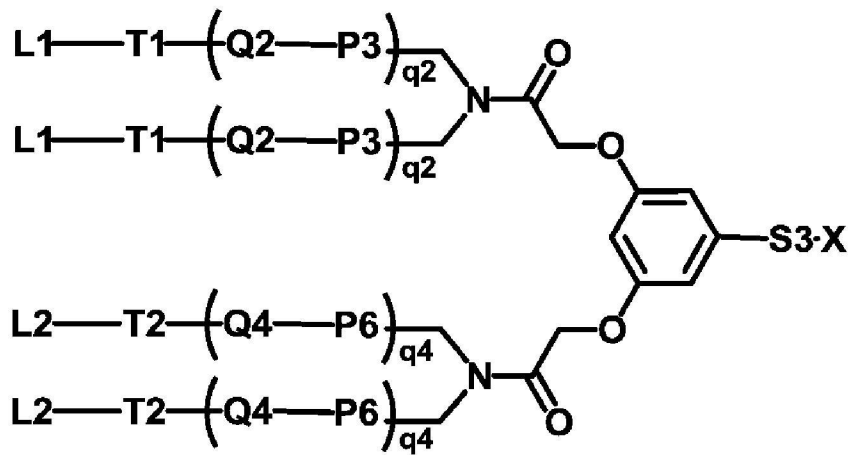
式4-6：

[化15]



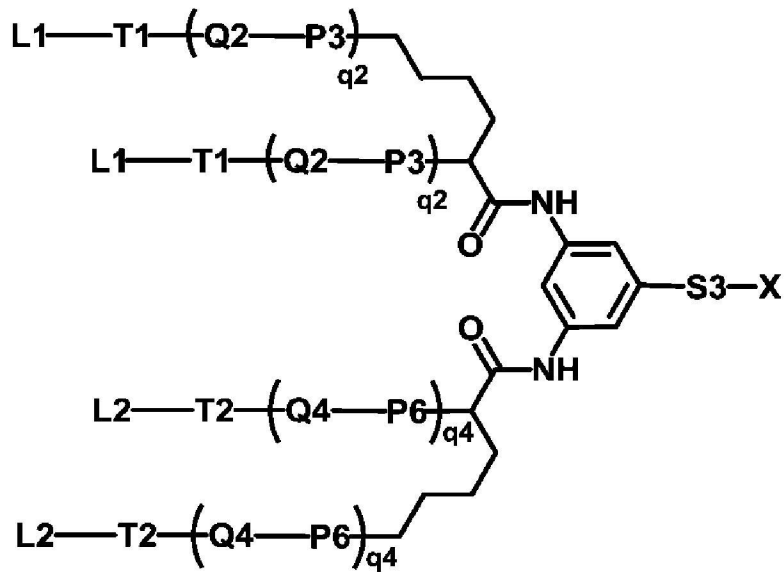
式4-7：

[化16]



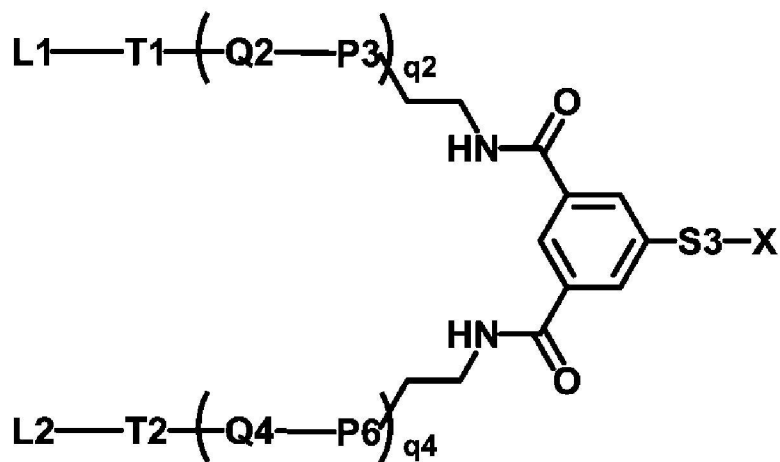
式4-8：

[化17]



式4-9：

[化18]



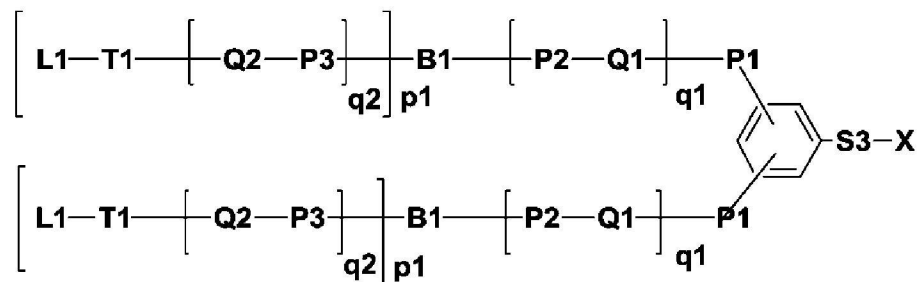
(式4-1~4-9中，

$X$ 、 $L1$ 、 $L2$ 、 $S3$ 、 $P3$ 、 $P6$ 、 $T1$ 、 $T2$ 、 $Q2$ 、 $Q4$ 、 $q2$ 及 $q4$ 分別與上述含義相同)。

(6)如(1)所記載之核酸複合體，其具有下述式5所表示之結構，

式5：

[化19]



(式5中，

$X$ 、 $S3$ 、 $P1$ 、 $P2$ 、 $P3$ 、 $Q1$ 、 $Q2$ 、 $B1$ 、 $T1$ 、 $L1$ 、 $p1$ 、 $q1$ 及 $q2$ 分別與上述含義相同)。

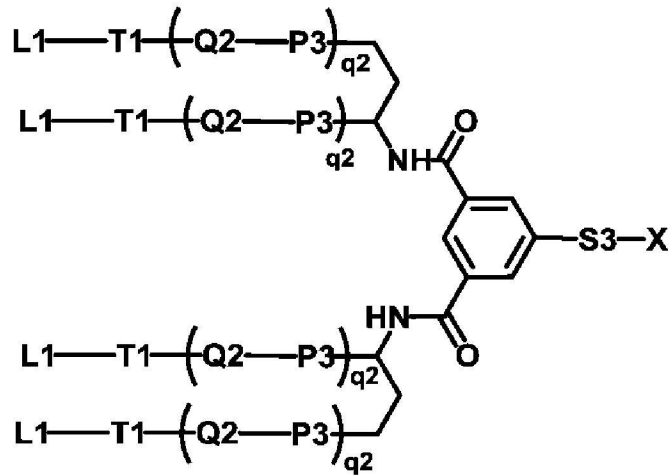
(7)如(6)所記載之核酸複合體，其中 $P1$ 為 $-CO-NH-$ 、 $-NH-CO-$ 或 $-O-$

。

(8)如(6)或(7)所記載之核酸複合體，其具有下述式6-1～式6-9所表示之任一結構，

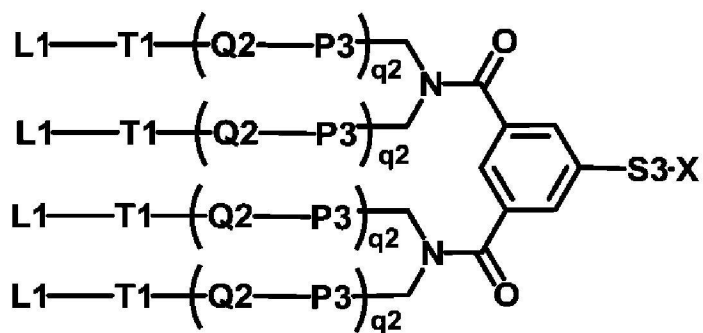
式6-1：

[化20]



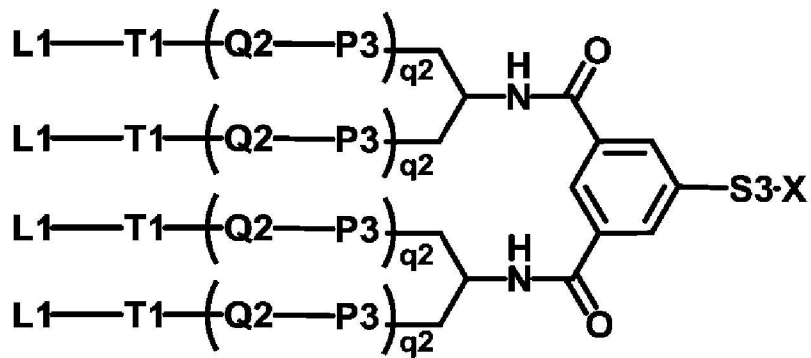
式6-2：

[化21]



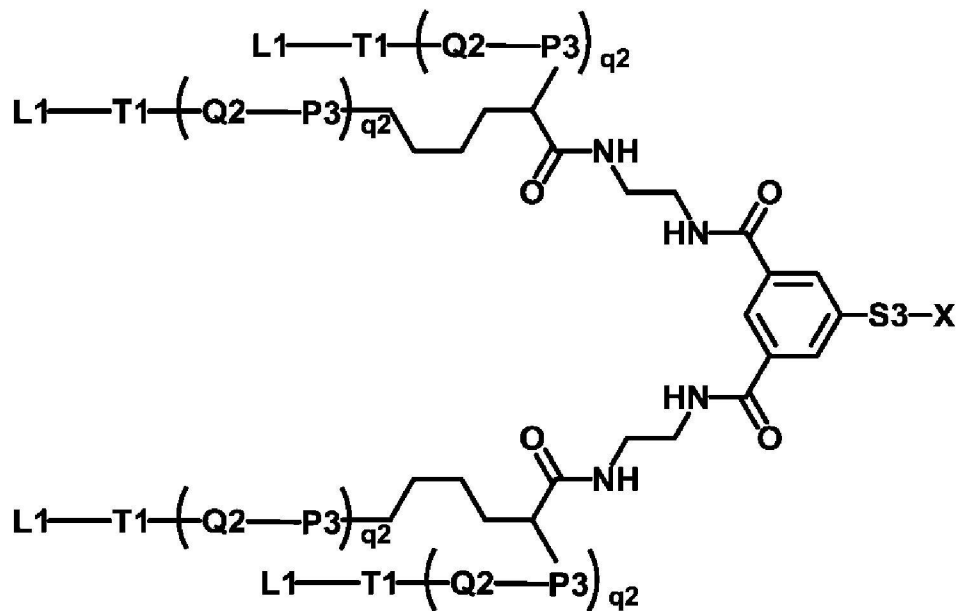
式6-3：

[化22]



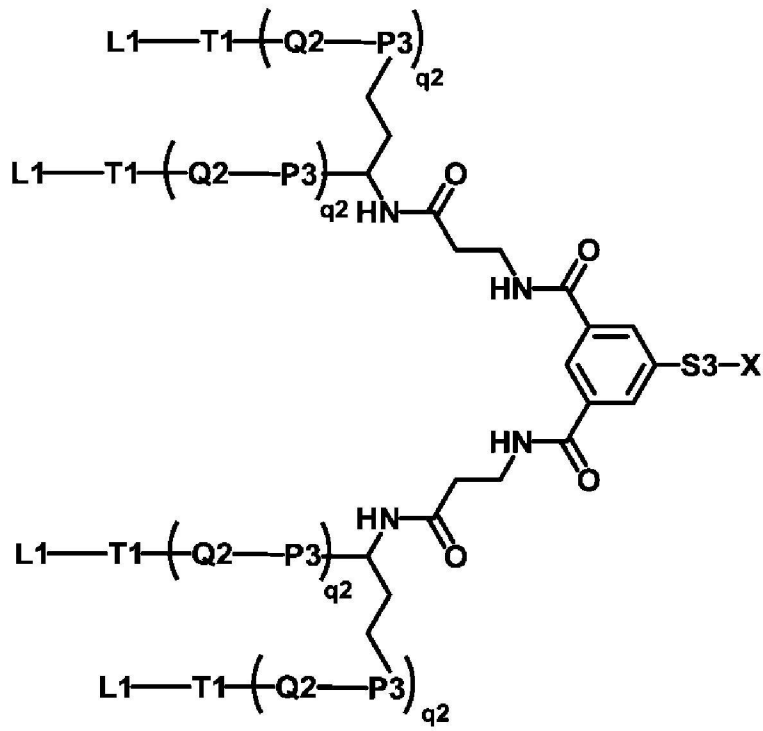
式6-4：

[化23]



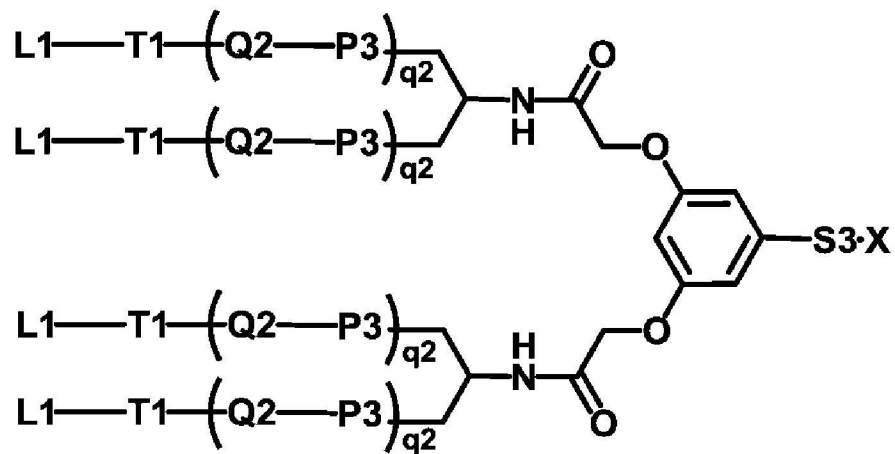
式6-5：

[化24]



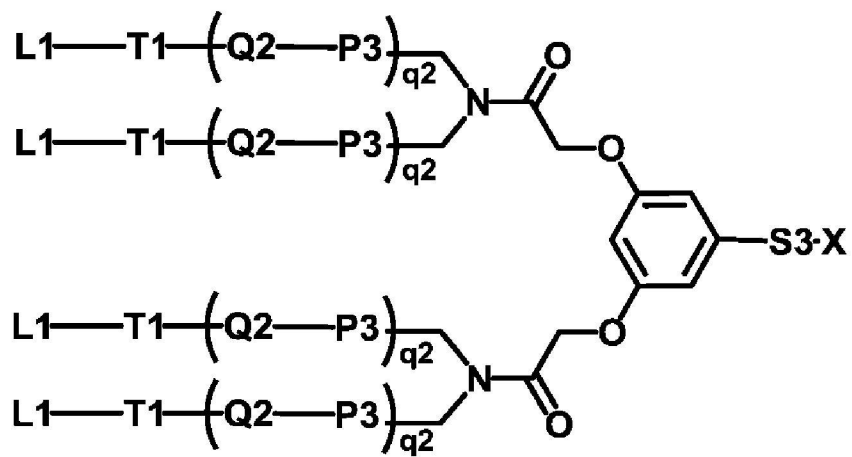
式6-6：

[化25]



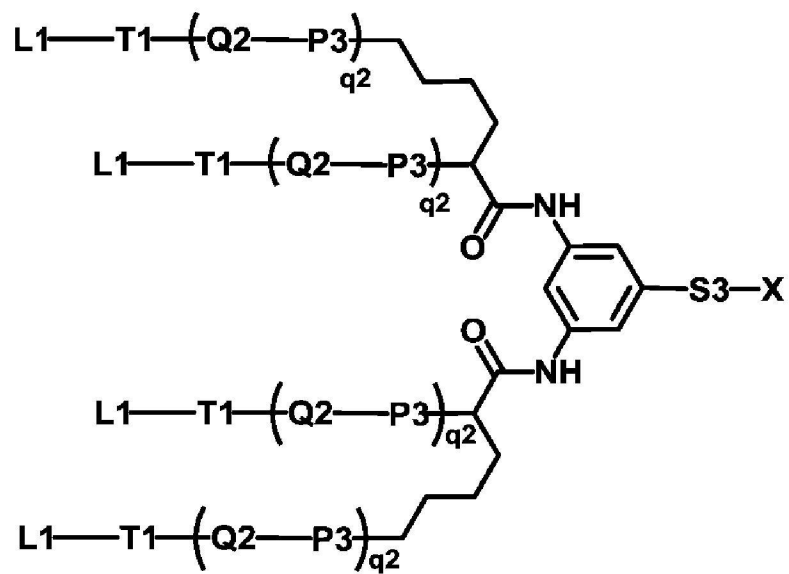
式6-7：

[化26]



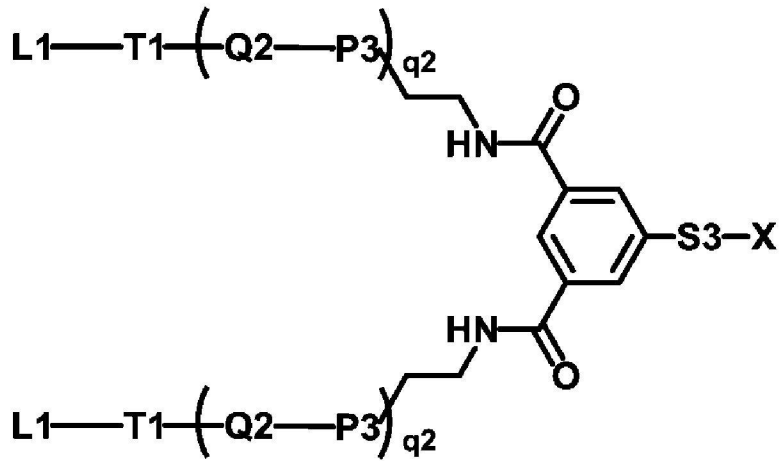
式6-8：

[化27]



式6-9：

[化28]



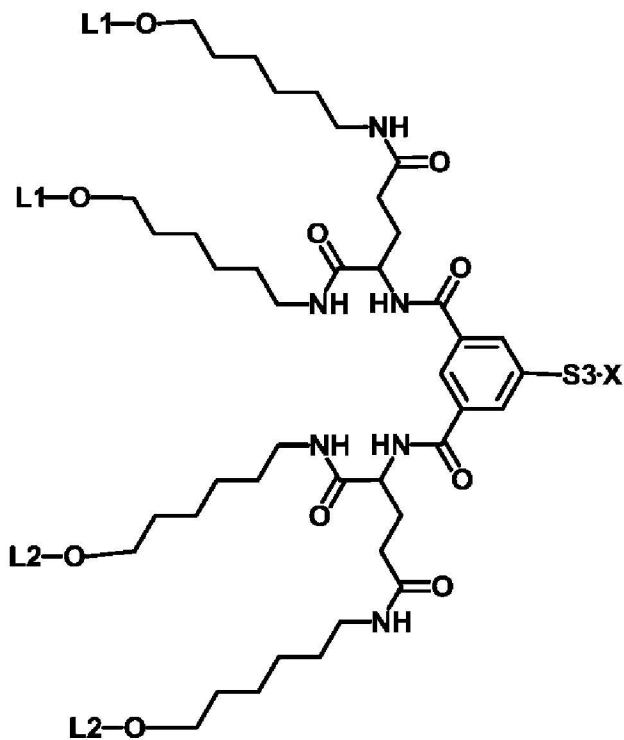
(式6-1~6-9中，

$X$ 、 $S3$ 、 $P3$ 、 $Q2$ 、 $T1$ 、 $L1$ 及 $q2$ 分別與上述含義相同)。

(9)如(2)至(8)所記載之核酸複合體，其具有下述式7-1~式7-9所表示之任一結構，

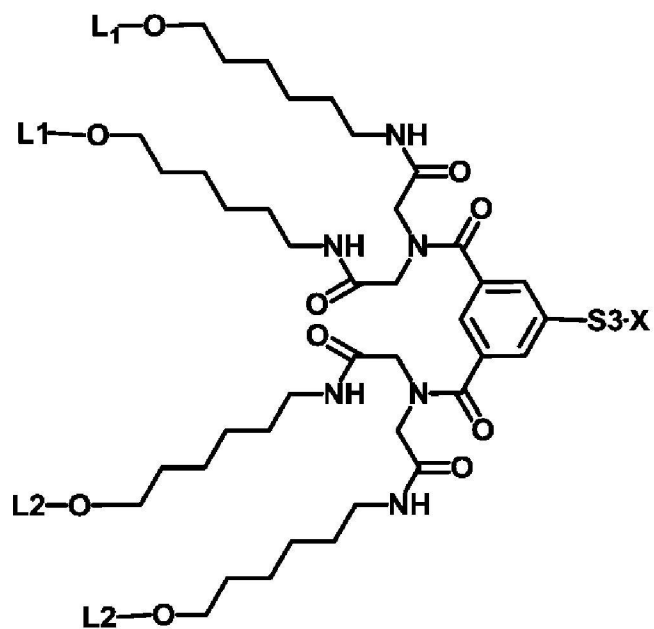
式7-1：

[化29]



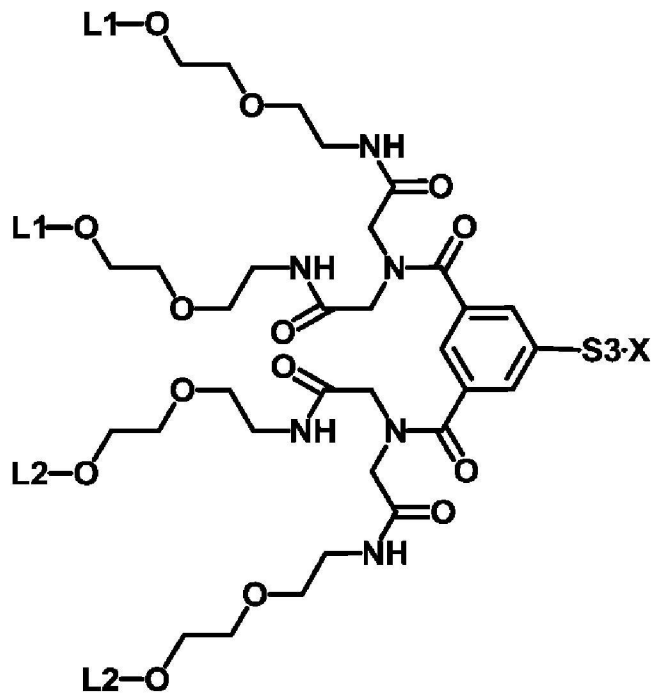
式7-2：

[化30]



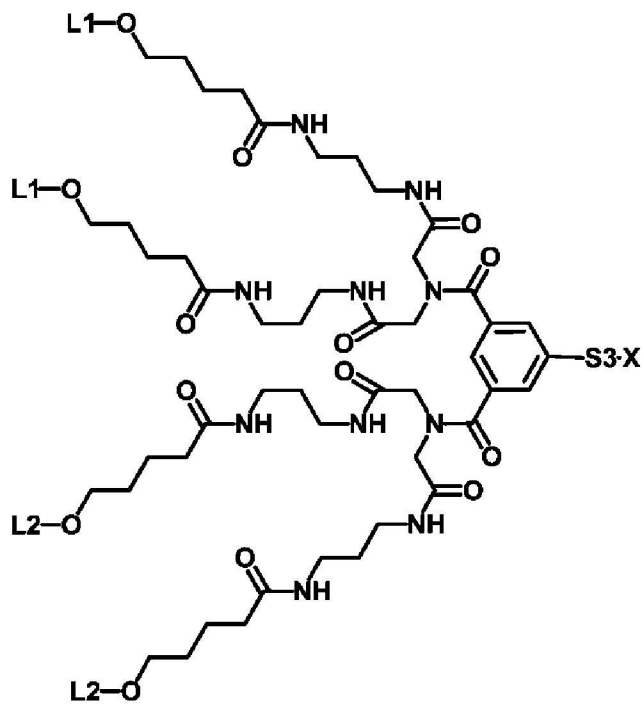
式7-3：

[化31]



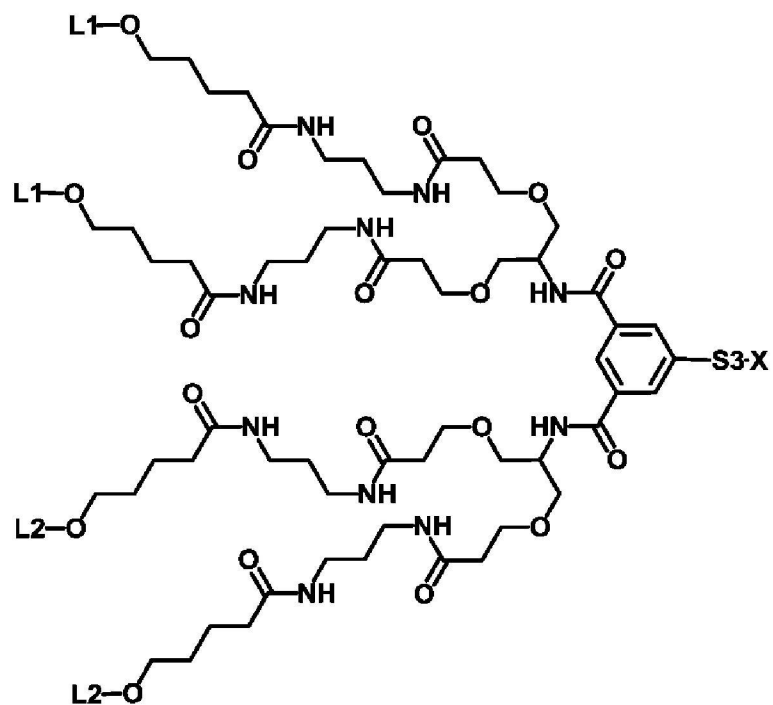
式7-4 :

[化32]



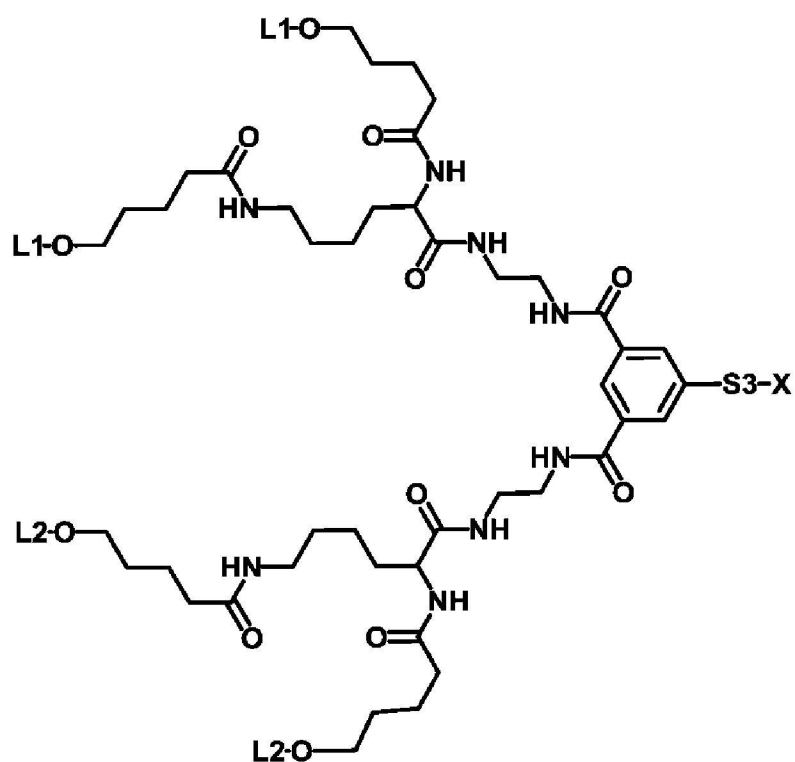
式7-5：

[化33]



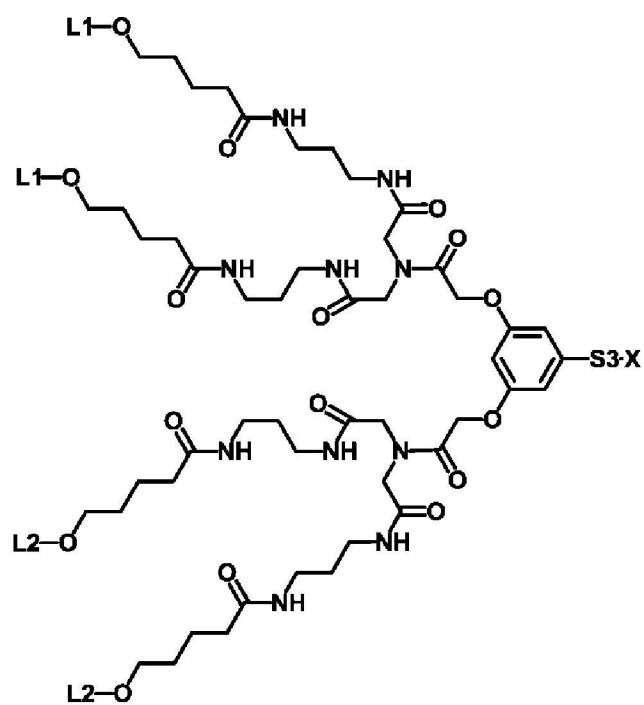
式7-6：

[化34]



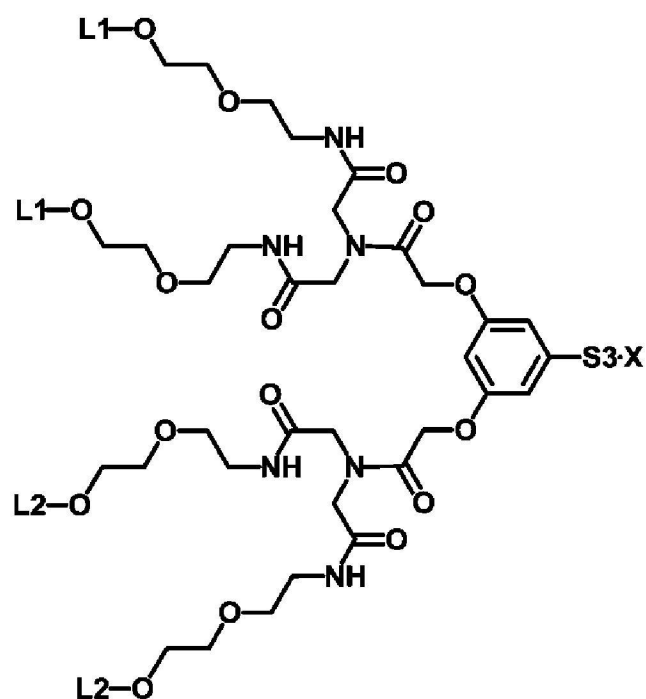
式7-7：

[化35]



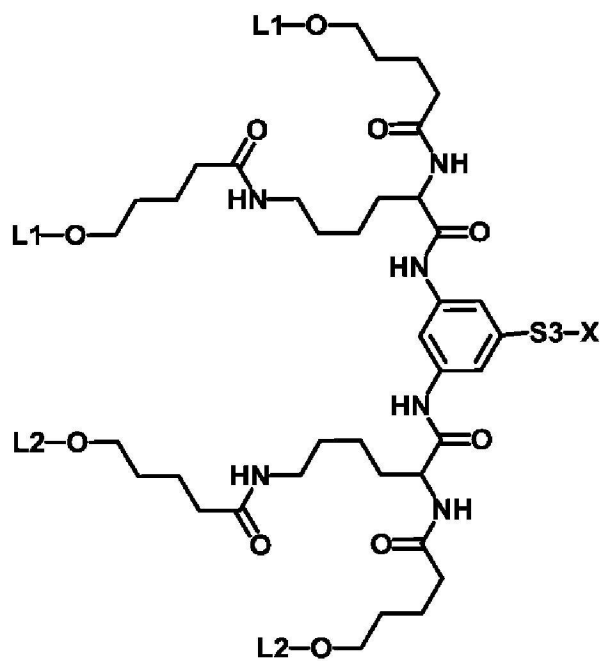
式7-8：

[化36]



式7-9：

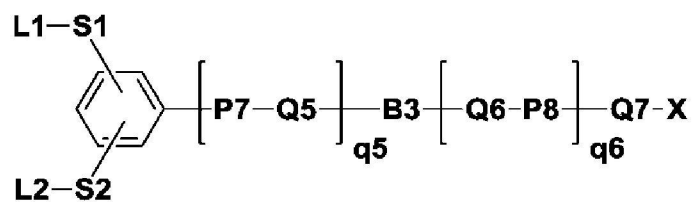
[化37]



(10)如(1)至(9)中任一項所記載之核酸複合體，其具有下述式11所表示之結構，

式11：

[化38]



(式11中，

X、L1、L2、S1及S2分別與上述含義相同，

P7及P8分別獨立，不存在或者為-CO-、-NH-、-O-、-S-、-O-CO-、-S-CO-、-NH-CO-、-CO-O-、-CO-S-或-CO-NH-，

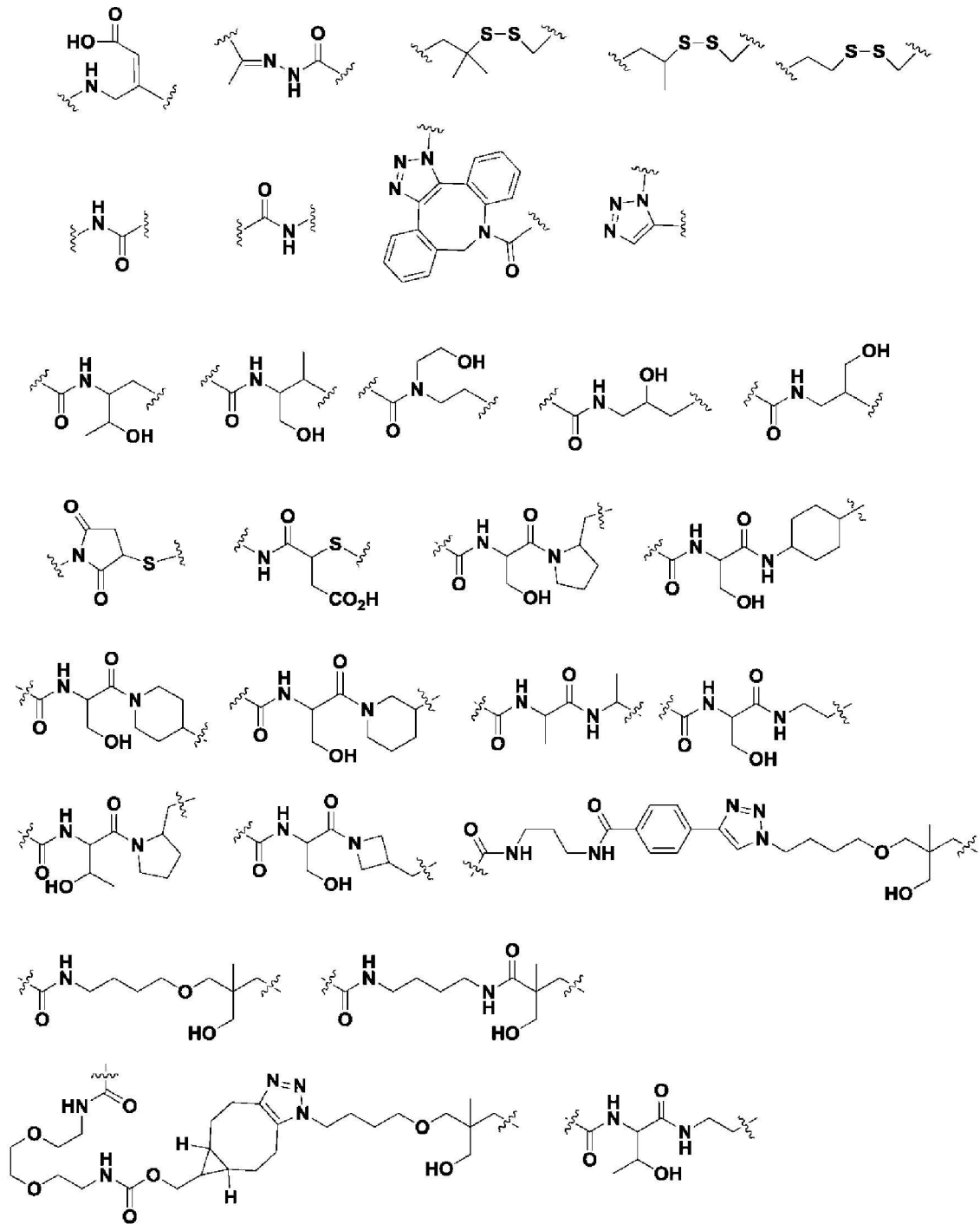
Q5、Q6及Q7分別獨立，不存在或者為經取代或未經取代之碳數1～

12之伸烷基或 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{n8}-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ， $n8$ 為0~99之整數，

B3為下述式11-1所表示之任一結構，虛線分別意指與Q5及Q6之鍵結鍵，

式11-1：

[化39]

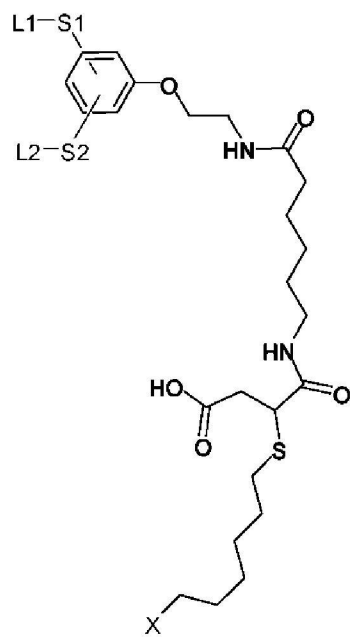


q5及q6分別獨立為0~10之整數)。

(11)如(1)至(10)中任一項所記載之核酸複合體，其具有下述式12-1~式12-12所表示之任一結構，

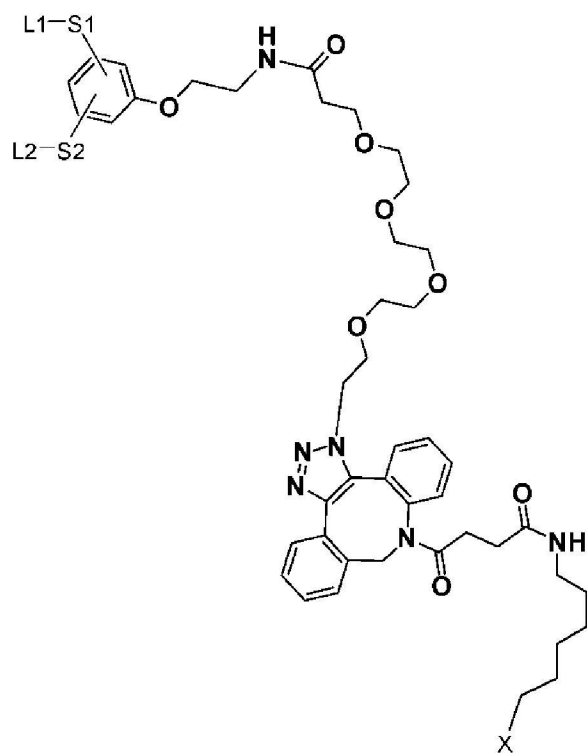
式12-1：

[化40]



式12-2 :

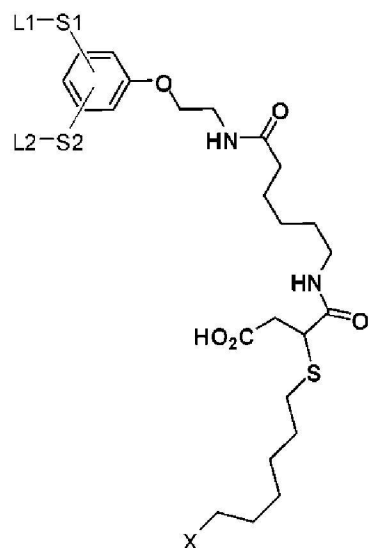
[化41]



第 25 頁(發明說明書)

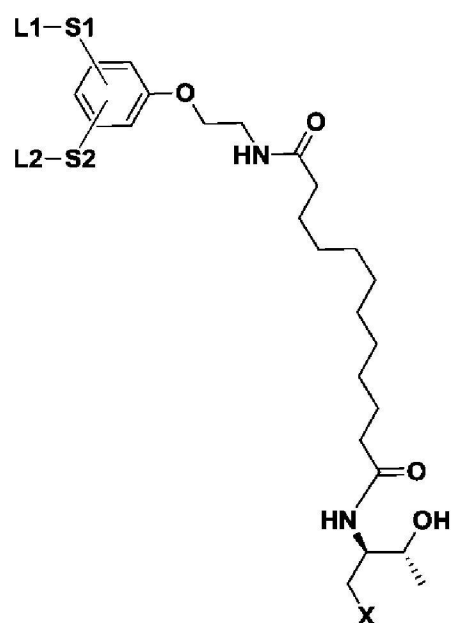
式12-3：

[化42]



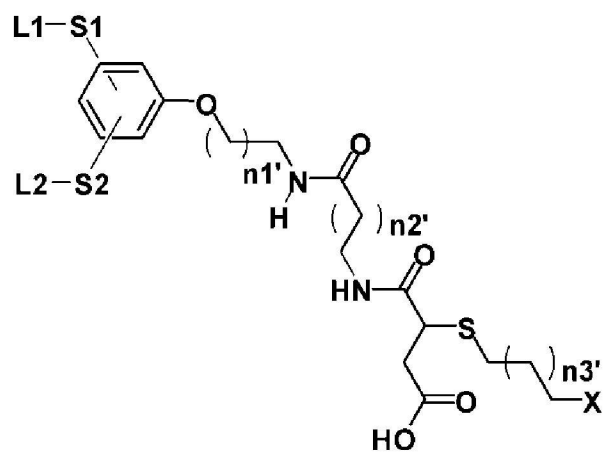
式12-4：

[化43]



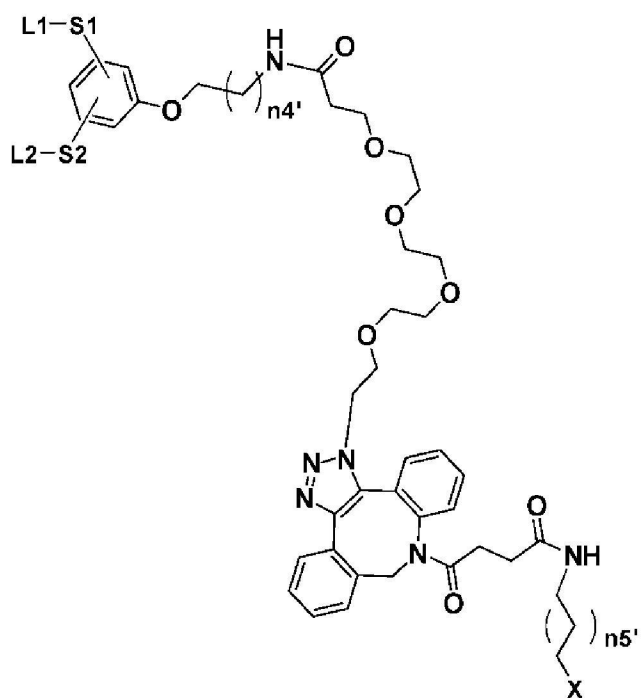
式12-5：

[化44]



式12-6：

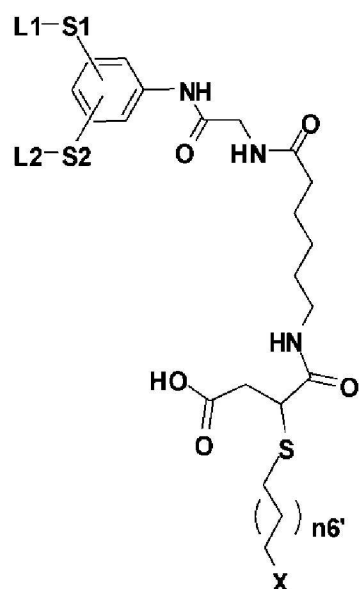
[化45]



式12-7：

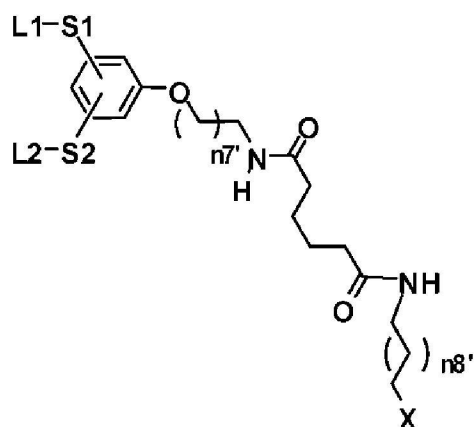
第 27 頁(發明說明書)

[化46]



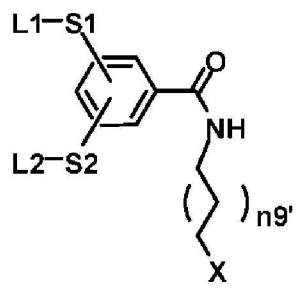
式12-8 :

[化47]



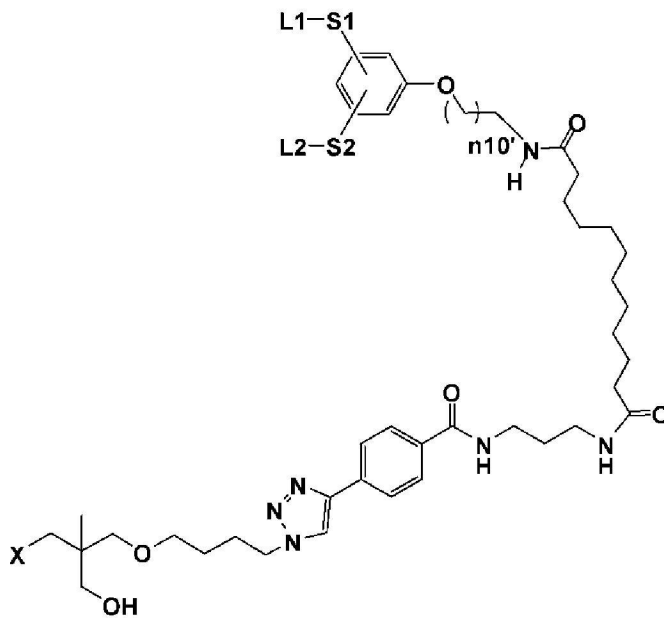
式12-9 :

[化48]



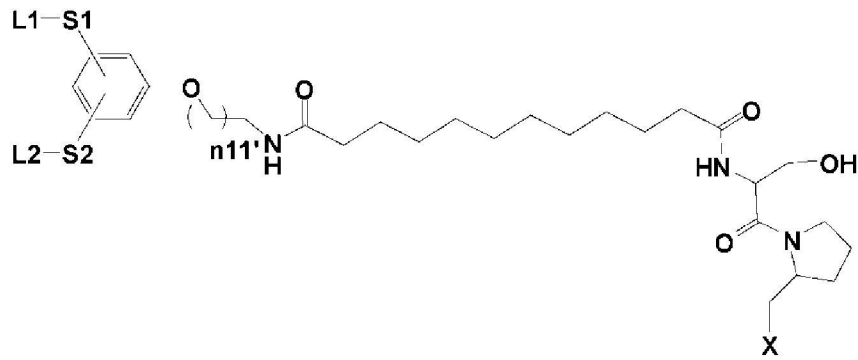
式12-10：

[化49]



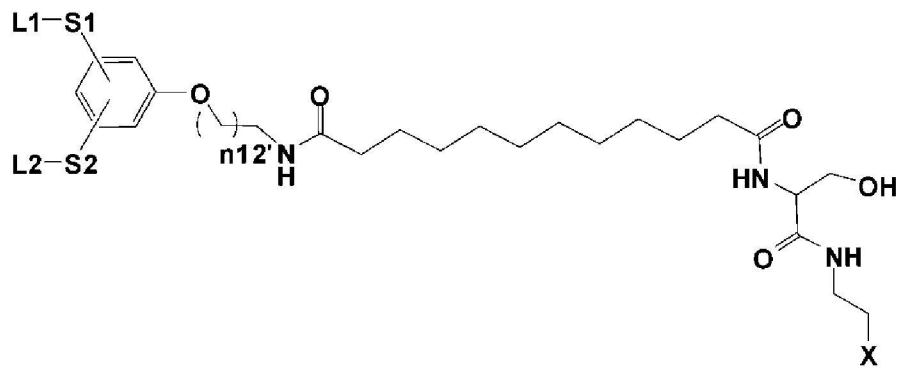
式12-11：

[化50]



式12-12：

[化51]



(式12-1~12-12中，

X、L1、L2、S1及S2分別與上述含義相同， $n1'$ ~ $n12'$ 分別獨立為1~10之整數)。

(12)如(1)至(11)中任一項所記載之核酸複合體，其中上述糖配體為甘露糖或N-乙醯基半乳糖胺。

(13)如(1)至(12)中任一項所記載之核酸複合體，其中上述寡核苷酸含有修飾核苷酸。

(14)一種醫藥組合物，其含有如(1)至(13)中任一項所記載之核酸複合體。

(15)如(14)所記載之醫藥組合物，其係用於導入至細胞內。

(16)如(15)所記載之醫藥組合物，其中上述細胞為肝細胞。

(17)如(14)至(16)中任一項所記載之醫藥組合物，其係被靜脈內投予或皮下投予。

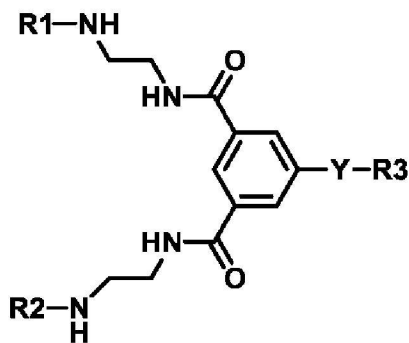
(18)一種疾病之治療或預防方法，其包括將如(1)至(13)中任一項所記載之核酸複合體或如(14)至(17)中任一項所記載之醫藥組合物投予至需要其之患者。

(19)如(18)所記載之治療或預防方法，其中上述患者為哺乳動物。

(20)一種化合物，其係以下述式8表示，

式8：

[化52]



(式8中，

R1及R2分別獨立為氫原子、第三丁氧基羰基、苄氧基羰基、9-芴基甲基氧基羰基、-CO-R4、或-CO-B4-[(P9-Q8)<sub>q7</sub>-T3-L3]<sub>p3</sub>，

P9及T3分別獨立，不存在或者為-CO-、-NH-、-O-、-S-、-O-CO-、-S-CO-、-NH-CO-、-CO-O-、-CO-S-或-CO-NH-，

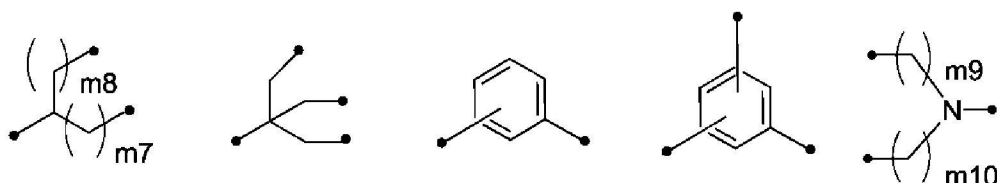
Q8不存在或者為經取代或未經取代之碳數1~12之伸烷基或-

$(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{n1}-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ， $n1$ 為0~99之整數，

B4分別獨立為鍵結鍵或下述式8-1所表示之任一結構，各結構中之末端之黑圓點分別為與羰基或P9之鍵結點， $m7$ 、 $m8$ 、 $m9$ 及 $m10$ 分別獨立為0~10之整數，

式8-1：

[化53]



$p3$ 為1、2或3之整數，

$q7$ 為0~10之整數，

L3為糖配體，

Y為 $-\text{O}-(\text{CH}_2)_{m11}-\text{NH}-$ 及 $-\text{NH}-\text{CO}-(\text{CH}_2)_{m12}-\text{NH}-$ ， $m11$ 及 $m12$ 分別獨立為1~10之整數，

R3為氫原子、第三丁氧基羰基、苄氧基羰基、9-芴基甲基氧基羰基、 $-\text{CO}-\text{R4}$ 、 $-\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{n2}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}_3$ 、或 $-\text{CO}-\text{Q9}-\text{B5}-(\text{Q10}-\text{P10})_{q8}-\text{X1}$ ，

P10不存在或者為 $-\text{CO}-$ 、 $-\text{NH}-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{O}-\text{CO}-$ 、 $-\text{S}-\text{CO}-$ 、 $-\text{NH}-\text{CO}-$ 、 $-\text{CO}-\text{O}-$ 、 $-\text{CO}-\text{S}-$ 或 $-\text{CO}-\text{NH}-$ ， $n2$ 為0~99之整數，

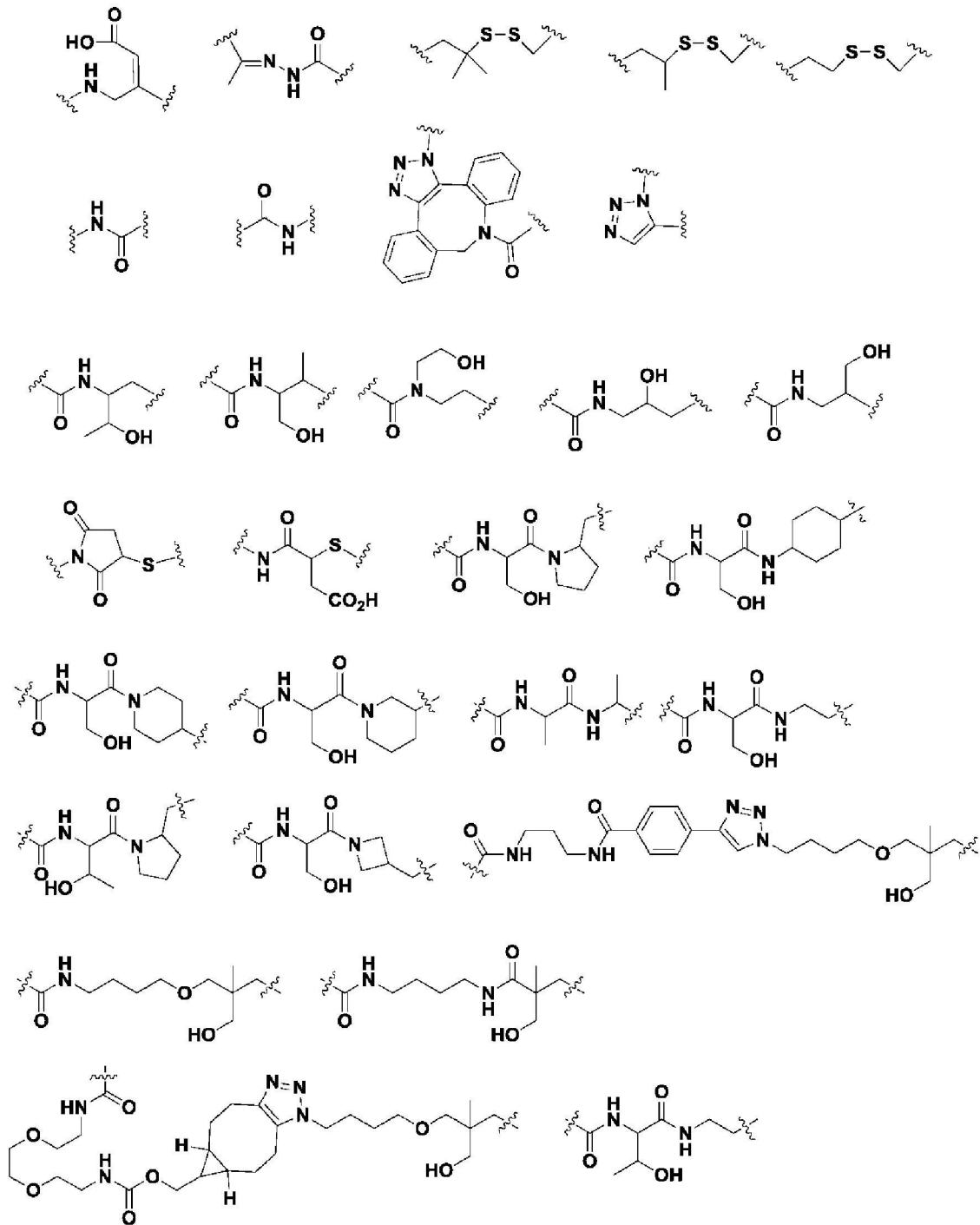
Q9及Q10分別獨立，不存在或者為經取代或未經取代之碳數1~12之伸烷基或 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{n3}-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ， $n3$ 為0~99之整數，

B5為下述式8-2所表示之任一結構，虛線分別意指與Q9及Q10之鍵結

鍵，

式8-2：

[化54]



q8為0~10之整數，

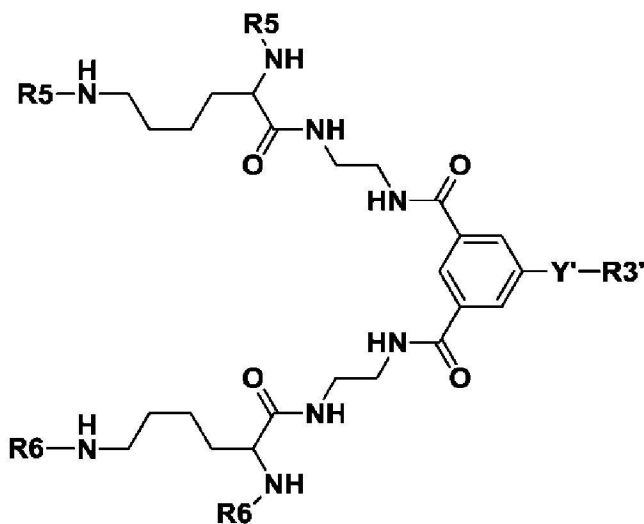
X1為氫原子或固相載體，

R4為經選自由經第三丁氧基羰基、苄氧基羰基、9-芴基甲基氧基羰基取代或未經取代之胺基、羧基、順丁烯二醯亞胺基、及芳烷基氧基羰基所組成之群中之1個或2個取代基所取代之碳數2~10之烷基)。

(21)一種化合物，其係以下述式9表示，

式9：

[化55]



(式9中，

R5及R6分別獨立為氫原子、第三丁氧基羰基、苄氧基羰基、9-芴基甲基氧基羰基、-CO-R4'、或-CO-Q11-(P11-Q11')<sub>q9</sub>-T4-L4，

P11及T4分別獨立，不存在或者為-CO-、-NH-、-O-、-S-、-O-CO-、-S-CO-、-NH-CO-、-CO-O-、-CO-S-或-CO-NH-，

Q11及Q11'不存在或者為經取代或未經取代之碳數1~12之伸烷基或-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n4</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-，n4為0~99之整數，

q9為0~10之整數，

L4 為糖配體，

Y' 為  $-\text{O}-(\text{CH}_2)_{m11'}-\text{NH}-$  及  $-\text{NH}-\text{CO}-(\text{CH}_2)_{m12'}-\text{NH}-$ ， $m11'$  及  $m12'$  分別獨立為 1~10 之整數，

R3' 為氫原子、第三丁氧基羰基、苄氧基羰基、9-芴基甲基氧基羰基、 $-\text{CO}-\text{R}4'$ 、 $-\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{n2'}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}_3$ 、或  $-\text{CO}-\text{Q}9'-\text{B}5'-(\text{Q}10'-\text{P}10')_{q8'}-\text{X}1'$ ， $n2'$  為 0~99 之整數，

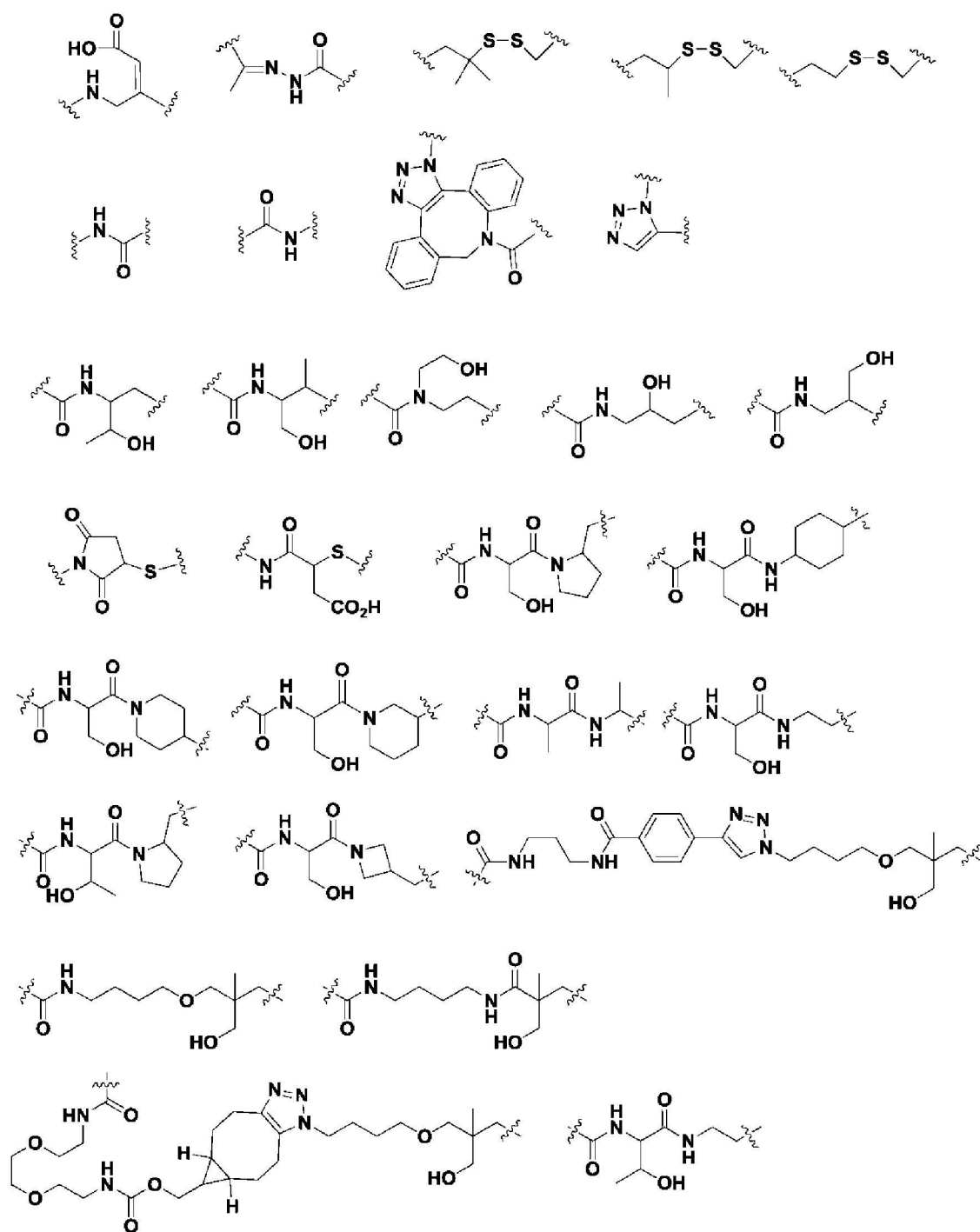
P10' 不存在或者為  $-\text{CO}-$ 、 $-\text{NH}-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{O}-\text{CO}-$ 、 $-\text{S}-\text{CO}-$ 、 $-\text{NH}-\text{CO}-$ 、 $-\text{CO}-\text{O}-$ 、 $-\text{CO}-\text{S}-$  或  $-\text{CO}-\text{NH}-$ ，

Q9' 及 Q10' 分別獨立，不存在或者為經取代或未經取代之碳數 1~12 之伸烷基或  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{n3'}-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ， $n3'$  為 0~99 之整數，

B5' 為下述式 9-1 所表示之任一結構，虛線分別意指與 Q9' 及 Q10' 之鍵結鍵，

式 9-1：

[化 56]



q8' 為 0~10 之 整 數 ，

X1' 為 氫 原 子 或 固 相 載 體 ，

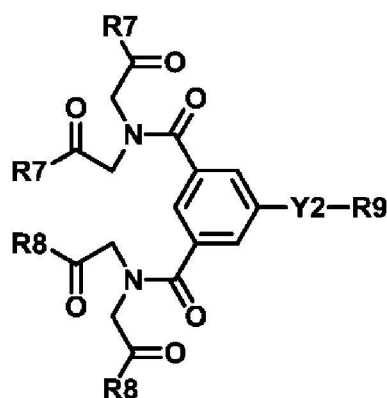
R4' 為 經 選 自 經 第 三 丁 氧 基 羰 基 、 苄 氧 基 羰 基 、 9-苄 基 甲 基 氧 基 羰 基 取 代 或 未 經 取 代 之 胺 基 、 羧 基 、 順 丁 烯 二 醯 亞 胺 基 、 及 芳 烷 基 氧 基 羰 基

所組成之群中之1個或2個取代基所取代之碳數2~10之烷基)。

(22)一種化合物，其係以下述式10表示，

式10：

[化57]



(式10中，

R7及R8分別獨立為羥基、第三丁氧基、苄氧基、-NH-R10、或-NH-Q12-(P12-Q12')<sub>q10</sub>-T5-L5，

P12及T5分別獨立，不存在或者為-CO-、-NH-、-O-、-S-、-O-CO-、-S-CO-、-NH-CO-、-CO-O-、-CO-S-或-CO-NH-，

Q12及Q12'不存在或者為經取代或未經取代之碳數1~12之伸烷基或-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n5</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-，n5為0~99之整數，

L5為糖配體，

Y2為-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>m13</sub>-NH-及-NH-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>m14</sub>-NH-，m13及m14分別獨立為1~10之整數，

q10為0~10之整數，

R9為氫原子、第三丁氧基羰基、苄氧基羰基、9-芴基甲基氧基羰

基、 $-\text{CO-R}_{10}$ 、 $-\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{n_6}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}_3$ 、或 $-\text{CO-Q}_{13}-\text{B}_6-(\text{Q}_{14}-\text{P}_{13})_{q_{11}}-\text{X}_2$ ， $n_6$ 為0~99之整數，

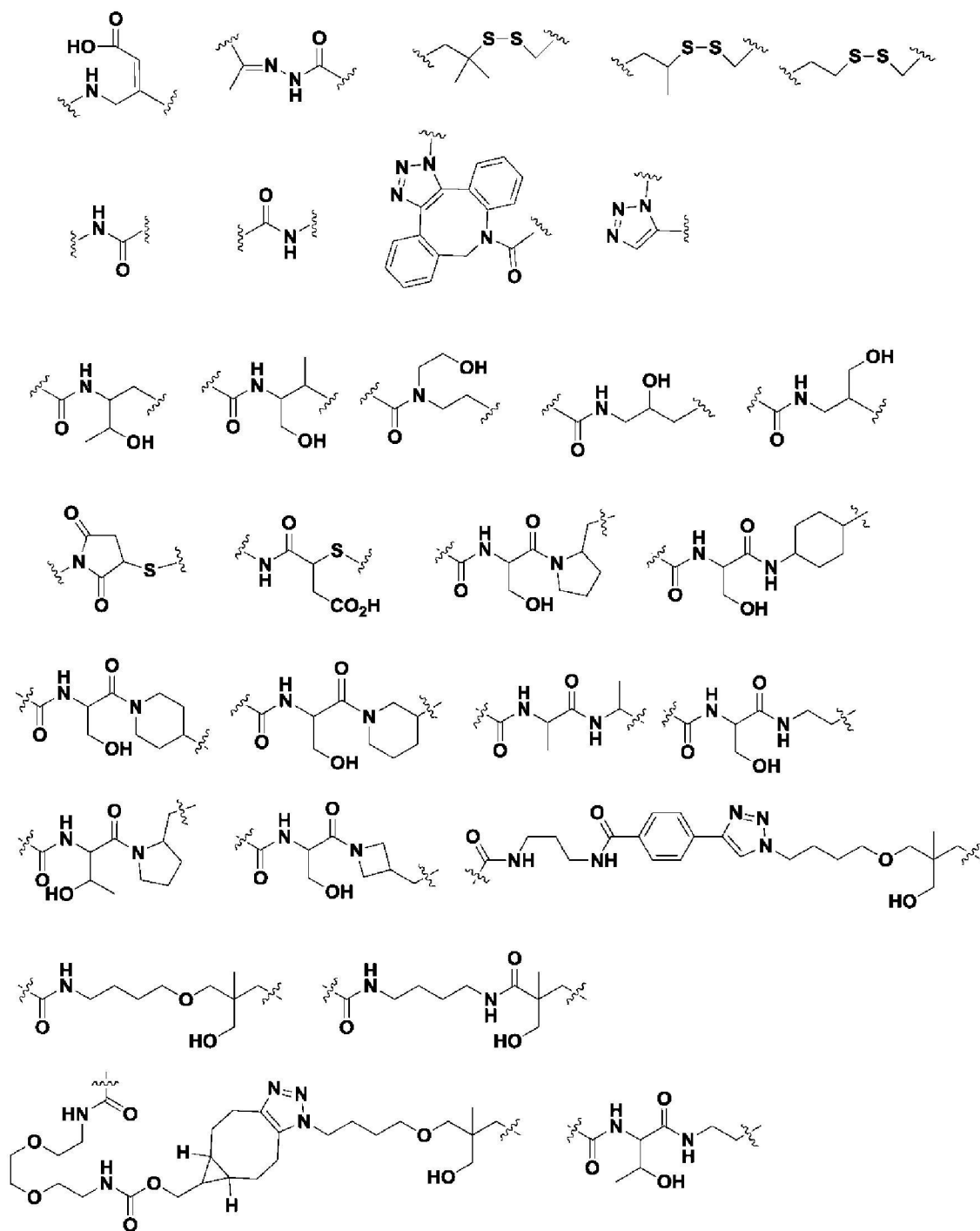
P10不存在或者為 $-\text{CO}-$ 、 $-\text{NH}-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{O-CO}-$ 、 $-\text{S-CO}-$ 、 $-\text{NH-CO}-$ 、 $-\text{CO-O}-$ 、 $-\text{CO-S-}$ 或 $-\text{CO-NH-}$ ，

Q13及Q14分別獨立，不存在或者為經取代或未經取代之碳數1~12之伸烷基或 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{n_7}-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ， $n_7$ 為0~99之整數，

B6為下述式10-1所表示之任一結構，虛線分別意指與Q13及Q14之鍵結鍵，

式10-1：

[化58]



q11為0~10之整數，

X2為氫原子或固相載體，

R10為經選自由經第三丁氧基羰基、苄氧基羰基、9-芴基甲基氧基羰基取代或未經取代之胺基、羧基、順丁烯二醯亞胺基、及芳烷基氧基羰基所組成之群中之1個或2個取代基所取代之碳數2~10之烷基)。

## [發明之效果]

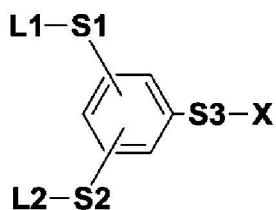
例如將含有本發明之核酸複合體之醫藥組合物投予至哺乳動物，於活體內可治療各種相關疾病。

## 【實施方式】

本發明之核酸複合體係以下述式1表示之核酸複合體。

式1：

[化59]



式1中，

X為寡核苷酸，

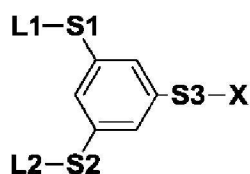
L1及L2分別獨立為糖配體，

S1、S2及S3分別獨立為連結子。

於本發明中，S1及S2可相對於S3於苯環上之取代位置而分別於鄰位、間位、對位與苯環鍵結，適宜為下述式1-1所表示之核酸複合體。式1中之S1及S2於苯環上之鍵結鍵意指可為苯環上之S3之取代位置以外任意之位置。

式1-1：

[化60]



式1-1中，

X、L1、L2、S1、S2及S3分別與上述含義相同。

於本說明書中，所謂與上述含義相同，若例示式1-1中進行說明，則意指式1-1中之X、L1、L2、S1及S2分別可為與式1中上述之X、L1、L2、S1及S2各自之定義相同之基。

於本發明中，X為寡核苷酸，可使用已知用作核酸醫藥之寡核苷酸。於本發明中，所謂核酸醫藥意指可用作適體、反義核酸、誘餌核酸、核酶、siRNA、miRNA及antimiRNA等之核苷酸。

於本發明中，S3與寡核苷酸不僅經由構成核苷酸之糖部分之3'位或5'位而與S3鍵結，而且亦可經由構成核苷酸之鹼基部分而與S3鍵結。於本發明中，可將寡核苷酸理解為具有將S3與寡核苷酸鍵結之結構之基，例如，於寡核苷酸經由-O-P(Z)(Z')O-(式中，Z及Z'分別獨立為氧原子或硫原子)而與S3鍵結之情形時，可將作為X之寡核苷酸以-O-P(Z)(Z')O-寡核苷酸之形式加以理解。

又，寡核苷酸可為單鏈或雙鏈寡核苷酸。

S3之連結子與X之寡核苷酸於寡核苷酸之3'末端或5'末端鍵結。於寡核苷酸為雙鏈之情形時，較佳為S3之連結子與構成雙鏈核酸之正義鏈之3'末端或5'末端鍵結，但並不限定於該種鍵結。

於本發明中，將含有與標靶mRNA為互補性鹼基序列之核酸稱為反義核苷酸，亦將含有與反義核苷酸之鹼基序列為互補性鹼基序列之核酸稱

為正義核苷酸。

本發明所使用之構成核酸複合體之寡核苷酸於導入至哺乳動物細胞中之情形時，只要具有控制標靶基因之表現之能力，則可為任意形狀，適宜使用單鏈寡核苷酸或雙鏈寡核苷酸。

作為寡核苷酸，只要為核苷酸或具有與核苷酸同等功能之分子之聚合物，則可為任意分子，例如可列舉作為脫氧核糖核苷酸之聚合物之DNA、作為核糖核苷酸之聚合物之RNA、作為DNA與RNA之聚合物之嵌合核酸。又，於DNA、RNA及嵌合核酸中，可為至少一脫氧核糖核苷酸或核糖核苷酸等核苷酸被取代為具有與核苷酸同等功能之分子之核苷酸聚合物。再者，RNA中之尿嘧啶(U)於DNA中可被單一地替換為胸腺嘧啶(T)。

作為具有與核苷酸同等功能之分子，例如可列舉對核苷酸進行修飾而成之核苷酸衍生物等，例如與DNA或RNA相比，為了提高耐核酸酶性或使其穩定，為了提高與互補鏈核酸之親和性，為了提高細胞透過性，或為了使其可視化，可適宜地使用對脫氧核糖核苷酸或核糖核苷酸進行修飾而成之分子等。

作為核苷酸衍生物，例如可列舉糖部修飾核苷酸、磷酸二酯鍵修飾核苷酸、鹼基修飾核苷酸等糖部、磷酸二酯鍵及鹼基之至少一者經修飾之核苷酸等。

作為糖部修飾核苷酸，只要為對核苷酸之糖之化學結構之一部分或全部藉由任意取代基進行修飾或取代而成者、或者藉由任意原子進行取代而成者，則可為任意者，可較佳地使用2'-修飾核苷酸。

作為2'-修飾核苷酸，例如可列舉核糖之2'-OH基被取代為選自由

OR、R、R'OR、SH、SR、NH<sub>2</sub>、NHR、NR<sub>2</sub>、N<sub>3</sub>、CN、F、Cl、Br及I所組成之群(R為烷基或芳基，較佳為碳數1~6之烷基，R'為伸烷基，較佳為碳數1~6之伸烷基)中之取代基之2'-修飾核苷酸，作為2'-修飾，可較佳地列舉利用F、甲氧基及乙氧基之取代。又，亦可列舉被取代為選自由2-(甲氧基)乙氧基(2-(methoxy)ethoxy基)、3-胺基丙氧基(3-aminopropoxy基)、2-[(N,N-二甲基胺基)氧基]乙氧基(2-[(N,N-dimethylamino)oxy]ethoxy基)、3-(N,N-二甲基胺基)丙氧基(3-(N,N-dimethylamino)propoxy基)、2-[2-(N,N-二甲基胺基)乙氧基]乙氧基(2-[2-(N,N-Dimethylamino)ethoxy]ethoxy基)、2-(甲基胺基)-2-氧代乙氧基(2-(methylamino)-2-oxoethoxy基)、2-(N-甲基胺甲醯基)乙氧基(2-(N-methylcarbamoyl)ethoxy基)及2-氰基乙氧基(2-cyanoethoxy基)所組成之群中之取代基之2'-修飾核苷酸等。

又，作為糖部修飾核苷酸，亦可適宜地使用藉由對糖部導入交聯結構而具有2個環狀結構之交聯結構型人工核酸(Bridged Nucleic Acid)(BNA)。具體而言，可列舉2'位之氧原子與4'位之碳原子經由亞甲基而交聯之鎖定人工核酸(Locked Nucleic Acid)(LNA)[Tetrahedron Letters, 38, 8735(1997)及Tetrahedron, 54, 3607(1998)]、伸乙基交聯結構型人工核酸(Ethylene bridged nucleic acid)(ENA)[Nucleic Acid Research, 32, e175(2004)]、限制性乙基(Constrained Ethyl)(cEt)[The Journal of Organic Chemistry 75, 1569(2010)]、醯胺交聯結構型人工核酸(Amido-Bridged Nucleic Acid(AmNA))[Chem Bio Chem 13, 2513(2012)]及2'-O,4'-C-螺伸環丙基交聯結構型人工核酸(2'-O,4'-C-Spirocyclopropylene bridged nucleic acid(scPbNA))[Chem. Commun., 51, 9737(2015)]等。

進而亦可列舉肽核酸(peptide nucleic acid, PNA)[Acc. Chem. Res., 32, 624(1999)]、氧基肽核酸(oxy peptide nucleic acid, OPNA)[J. Am. Chem. Soc., 123, 4653(2001)]、肽核糖核酸(peptide ribonucleic acid, PRNA)[J. Am. Chem. Soc., 122, 6900(2000)]等作為糖部修飾核苷酸。

作為磷酸二酯鍵修飾核苷酸，只要為對核苷酸之磷酸二酯鍵之化學結構之一部分或全部藉由任意取代基進行修飾或取代而成者、或者藉由任意原子進行取代而成者，則可為任意者，例如可列舉磷酸二酯鍵被取代為硫代磷酸酯鍵之核苷酸、磷酸二酯鍵被取代為二硫代磷酸酯鍵之核苷酸、磷酸二酯鍵被取代為磷酸烷基酯鍵之核苷酸、磷酸二酯鍵被取代為胺基磷酸酯鍵之核苷酸等，較佳可列舉磷酸二酯鍵被取代為硫代磷酸酯鍵之核苷酸。

作為鹼基修飾核苷酸，只要為對核苷酸之鹼基之化學結構之一部分或全部藉由任意取代基進行修飾或取代而成者、或者藉由任意原子進行取代而成者，則可為任意者，例如可列舉：鹼基內之氧原子被取代為硫原子者；氫原子被取代為碳數1~6之烷基、鹵基者；甲基被取代為氫原子、羥基甲基、碳數2~6之烷基者；胺基被取代為碳數1~6之烷基、碳數1~6之烷醯基、側氧基、羥基等者。再者，使用5-甲基胞嘧啶(5-mC)代替胞嘧啶(C)作為鹼基修飾核苷酸亦為本發明之較佳之形態之一。

作為核苷酸衍生物，亦可列舉直接或經由連結子對核苷酸或者糖部、磷酸二酯鍵或鹼基中之至少一個經修飾之核苷酸衍生物附加肽、蛋白質、糖、脂質、磷脂質、啡啉、葉酸鹽、啡啶、蔥醌、吡啶、螢光素、玫瑰紅、香豆素、色素等其他化學物質而成者，具體而言，可列舉5'-多胺附加核苷酸衍生物、膽固醇附加核苷酸衍生物、類固醇附加核苷酸衍生

物、膽汁酸附加核苷酸衍生物、維生素附加核苷酸衍生物、Cy5附加核苷酸衍生物、Cy3附加核苷酸衍生物、6-FAM附加核苷酸衍生物、及生物素附加核苷酸衍生物等。

核苷酸衍生物亦可與核酸內之其他核苷酸或核苷酸衍生物形成伸烷基結構、肽結構、核苷酸結構、醚結構、酯結構、及組合該等中之至少一種而成之結構等交聯結構。

寡核苷酸亦包含其分子中之一部分或全部原子被取代為質量數不同之原子(同位素)而成者。

於本說明書中，所謂「互補」例如意指如腺嘌呤與胸腺嘧啶或尿嘧啶之關係、及鳥嘌呤與胞嘧啶之關係般，可經由寬鬆之氫鍵而於2個鹼基間進行鹼基配對之關係。

於本說明書中，所謂「互補性」不僅意指2個核苷酸序列完全互補之情形，而且意指可於核苷酸序列間具有0~30%、0~20%或0~10%之失配鹼基，例如與標靶mRNA為互補性之反義寡核苷酸可於與標靶mRNA之部分鹼基序列完全互補之鹼基序列中包含1個或複數個鹼基之取代。具體而言，反義寡核苷酸相對於標靶基因之標靶序列，可具有1~8個、較佳為1~6個、1~4個、1~3個、尤其是2個或1個失配鹼基。

又，所謂「互補性」包含一核苷酸序列為與另一核苷酸序列完全互補之鹼基序列中1個或複數個鹼基附加及/或缺失之序列之情形。例如，標靶mRNA與反義寡核苷酸亦可藉由反義寡核苷酸中之鹼基之附加及/或缺失而於反正義鏈及/或標靶mRNA區域具有1個或2個突起鹼基。

但於以下記載「互補性」之位置係以亦包含「互補」之含義之形式記載。

本發明所使用之所謂反義寡核苷酸係與編碼標靶基因之DNA、由編碼標靶基因之DNA轉錄之mRNA前驅物、mRNA、microRNA前驅物或microRNA為互補性之寡核苷酸，該反義寡核苷酸藉由與標靶DNA、mRNA前驅物或mRNA形成雙鏈而抑制DNA、mRNA前驅物、mRNA、microRNA前驅物或microRNA之活動。

反義寡核苷酸不僅包括與成為標靶之DNA、mRNA前驅物、mRNA、microRNA前驅物或microRNA為完全互補性者，只要於嚴格之條件下可與DNA、mRNA前驅物、mRNA、microRNA前驅物或microRNA雜交，則亦包括存在1個或數個失配者。

所謂反義寡核苷酸只要為與標靶基因雜交之核酸，則可導入至髮夾低聚物、環狀低聚物之形態中，亦可含有內部或末端之突起或環等結構要素。

反義寡核苷酸之長度為8~80個鹼基，較佳為8~30個鹼基。例如可為8~20個鹼基、10~20個鹼基、13~20個鹼基、13~16個鹼基、13個鹼基、14個鹼基、15個鹼基、16個鹼基、17個鹼基、18個鹼基、19個鹼基、20個鹼基。

若將反義寡核苷酸導入至細胞內，則立體性地阻礙與互補性之mRNA前驅物或mRNA鍵結而轉譯成蛋白質之過程，而可抑制標靶基因之表現。

又，反義寡核苷酸於細胞內與互補性之microRNA前驅物或microRNA鍵結，亦可立體性地阻礙microRNA之功能。

又，亦存在反義寡核苷酸於細胞內與互補性之mRNA及mRNA前驅物鍵結而切割mRNA及mRNA前驅物之情況。作為此種例，已知有利用將

RNA與DNA之雙股之RNA鏈進行切割之核酸內切酶即RNaseH發揮之作用。若本發明之細胞內之反義寡核苷酸與mRNA及mRNA前驅物形成雙股，則可被RNaseH所識別，而將互補性之mRNA鏈酶解。

為了誘導利用RNaseH進行之mRNA及mRNA前驅物之切割，較佳為具有4~80個連續之DNA區域之反義寡核苷酸。於該情形時，反義寡核苷酸較佳為具有0~80%之糖部修飾核苷酸，更佳為10~60%，進而較佳為20~50%。又，於具有糖部修飾核苷酸之情形時之連續之DNA區域更佳為4~20個，進而較佳為4~15個，最佳為5~10個。進而，反義寡核苷酸中之糖部修飾核苷酸之位置較佳為配置於5'末端附近及/或3'末端附近，更佳為配置於距5'端為全長長度之25%以內之位置及/或距3'端為全長長度之25%以內之位置。

亦可使反義寡核苷酸與互補性寡核酸形成雙股，藉由以雙股核酸之形式導入至細胞內而誘導標靶基因之表現抑制(參照國際公開第2005/113571號)。藉由配體修飾該情形時之雙股核酸之位置較佳為互補性之寡核酸之5'末端或3'末端。

本發明所使用之反義寡核苷酸藉由使用與標靶基因之啟動子序列等為互補性鹼基序列，亦可促進標靶基因之表現(參照國際公開第2013/173601號及國際公開第2013/173637號)。

作為製造反義寡核苷酸之方法，並無特別限定，可列舉使用公知之化學合成之方法、或酶轉錄法等。作為使用公知之化學合成之方法，可列舉亞磷醯胺法、硫代磷酸酯法、磷酸三酯法、CEM(Ca<sup>2+</sup> enrichment of medium，富集Ca<sup>2+</sup>培養基)法[Nucleic Acid Research, 35, 3287(2007)]等，例如，可藉由ABI3900高產量核酸合成機(Applied Biosystems公司製

造)進行合成。結束合成後，進行自固相之脫離、保護基之去保護及目標物之精製等。較理想為藉由精製而獲得純度90%以上、較佳為95%以上之反義寡核苷酸。作為製造本發明之反義寡核苷酸之酶轉錄法，可列舉藉由以具有目標鹼基序列之質體或DNA作為模板而使用噬菌體RNA聚合酶、例如T7、T3、或SP6RNA聚合酶之轉錄之方法。

本發明所使用之雙鏈寡核苷酸只要為含有與標靶mRNA之一部分鹼基序列為互補性鹼基序列之核酸及/或含有與該核酸之鹼基序列為互補性鹼基序列之核酸，則可含有任意寡核苷酸或其衍生物。

本發明所使用之雙鏈寡核苷酸只要含有與標靶mRNA序列為互補性鹼基序列之核酸及含有與該核酸之鹼基序列為互補性鹼基序列之核酸可形成雙股，則可為任意長度，可形成雙股之序列之長度通常為11~35個鹼基，較佳為15~30個鹼基，更佳為17~25個鹼基，進而較佳為17~23個鹼基，尤佳為19~23個鹼基。

作為本發明所使用之抑制標靶蛋白質之表現之雙鏈寡核苷酸，可適宜地使用：單鏈核酸，其為含有與標靶mRNA序列為互補性鹼基序列之核酸，且抑制標靶蛋白質之表現；或雙鏈核酸，其包含含有與標靶mRNA序列為互補性鹼基序列之核酸及含有與該核酸之鹼基序列為互補性鹼基序列之核酸，且抑制標靶蛋白質之表現。

雙鏈寡核苷酸藉由使用包含含有與標靶基因之啟動子序列等為互補性鹼基序列之核酸及含有與該核酸之鹼基序列為互補性鹼基序列之核酸的分子，亦可促進標靶基因之表現 [Nucleic Acid Research, 41, 10086(2013)、Hepatology, 59, 216(2014)]。

所謂雙鏈寡核苷酸係指兩條寡核苷酸配對而具有雙股區域之核苷

酸。所謂雙股區域係指構成雙鏈之核苷酸或其衍生物構成鹼基對而形成雙股之部分。雙股區域通常為11~27個鹼基對，較佳為15~25個鹼基對，更佳為15~23個鹼基對，進而較佳為17~21個鹼基對。

構成雙鏈寡核苷酸之單鏈寡核苷酸通常含有11~30個鹼基，較佳為含有15~29個鹼基，更佳為含有15~27個鹼基，進而較佳為含有15~25個鹼基，尤佳為含有17~23個鹼基。

於雙鏈寡核苷酸中，於在與雙股區域相接之3'側或5'側具有不形成雙股之追加之核苷酸或核苷酸衍生物之情形時，將其稱為突起部(overhang)。於具有突起部之情形時，構成突起部之核苷酸可為核糖核苷酸、脫氧核糖核苷酸或該等之衍生物。

作為具有突起部之雙鏈寡核苷酸，可使用至少一條鏈之3'末端或5'末端具有包含1~6個鹼基、通常為1~3個鹼基之突起部者，可較佳地使用具有包含2個鹼基之突起部者，例如可列舉具有包含dTdT或UU之突起部者。突起部可僅存在於反義寡核苷酸，僅存在於正義寡核苷酸，及存在於反義寡核苷酸與正義寡核苷酸兩者，可較佳地使用反義寡核苷酸具有突起部之雙鏈寡核苷酸。再者，反義寡核苷酸包含雙股區域及與其相接之突起部。

作為雙鏈寡核苷酸，可使用包含與標靶基因之鹼基序列或其互補鏈之鹼基序列相同之序列之核酸，亦可使用包含將該核酸之至少一條鏈之5'末端或3'末端刪除1~4個鹼基而成之核酸及含有與該核酸之鹼基序列為互補性鹼基序列之核酸之雙鏈核酸。

雙鏈寡核苷酸可為RNA彼此形成雙股之雙鏈RNA(dsRNA)、DNA彼此形成雙股之雙鏈DNA(dsDNA)，或亦可為RNA與DNA形成雙股之雜交

核酸。或者可為雙鏈中之一條或兩條鏈為DNA與RNA之嵌合核酸。較佳為雙鏈RNA(dsRNA)。

較佳為反義寡核苷酸之自5'末端起第2個核苷酸與標靶mRNA序列之自3'末端起第2個脫氧核糖核苷酸互補，更佳為反義寡核苷酸之自5'末端起第2~7個核苷酸與標靶mRNA序列之自3'末端起第2~7個脫氧核糖核苷酸完全互補，進而較佳為反義寡核苷酸之自5'末端起第2~11個核苷酸與標靶mRNA序列之自3'末端起第2~11個脫氧核糖核苷酸完全互補。又，較佳為反義寡核苷酸之自5'末端起第11個核苷酸與標靶mRNA序列之自3'末端起第11個脫氧核糖核苷酸互補，更佳為反義寡核苷酸之自5'末端起第9~13個核苷酸與標靶mRNA序列之自3'末端起第9~13個脫氧核糖核苷酸完全互補，進而較佳為反義寡核苷酸之自5'末端起第7~15個核苷酸與標靶mRNA序列之自3'末端起第7~15個脫氧核糖核苷酸完全互補。

相對於雙鏈核酸區域內之核苷酸，修飾核苷酸較佳為含有50~100%，更佳為含有70~100%，進而較佳為含有90~100%。

雙鏈寡核苷酸可以化學方式合成，通常可藉由使用固相寡核苷酸合成法進行合成(例如參照：Usman et al.，美國專利第5,804,683號說明書；美國專利第5,831,071號說明書；美國專利第5,998,203號說明書；美國專利第6,117,657號說明書；美國專利第6,353,098號說明書；美國專利第6,362,323號說明書；美國專利第6,437,117號說明書；美國專利第6,469,158號說明書；Scaringe et al.，美國專利第6,111,086號說明書；美國專利第6,008,400號說明書；美國專利第6,111,086號說明書)。

RNA可藉由酶合成或部分/全部有機合成而生成，又，經修飾之核糖核苷酸可於活體外藉由酶合成或有機合成而導入。於一態樣中，各鏈係以

化學方式製備。以化學方式合成RNA分子之方法於該技術領域為公知[參照Nucleic Acids Research, 32, 936 (1998)]。

作為本發明所使用之RNA，可列舉含有標靶基因之mRNA之連續之15~30個鹼基、較佳為17~25個鹼基、更佳為19~23個鹼基之序列(以下設為序列X)及與序列X為互補性鹼基之序列(以下設為互補性序列X')的RNA，例如可列舉：包含含有序列X之正義寡核苷酸及含有互補性序列X'之反義寡核苷酸之雙鏈RNA、具有以間隔寡核苷酸將該正義寡核苷酸與該反義寡核苷酸連結而成之髮夾結構之RNA。

作為含有序列X之正義寡核苷酸，可列舉：僅含有序列X作為鹼基之RNA(以下設為序列X鏈)；於序列X鏈之3'端、5'端或兩端附加相同或不同之1~6個、較佳為2~4個核苷酸而成之RNA。

作為含有互補性序列X'之反義寡核苷酸，可列舉：僅含有互補性序列X'作為鹼基之RNA(以下設為互補性序列X'鏈)；於互補性序列X'鏈之3'端、5'端或兩端附加相同或不同之1~6個、較佳為2~4個核苷酸而成之雙鏈RNA等。

作為具有以間隔寡核苷酸將含有序列X之正義寡核苷酸與含有互補性序列X'之反義寡核苷酸連結而成之髮夾結構之RNA之間隔寡核苷酸，較佳為6~12個鹼基之核苷酸，且較佳為其5'端之序列為2個U。作為間隔寡核苷酸之例，可列舉含有UUCAAGAGA之鹼基序列之寡核苷酸。關於以間隔寡核苷酸連結之2個RNA之順序，任一RNA可為5'側，較佳為含有序列X之正義鏈成為5'側。

對序列X鏈及互補性序列X'鏈附加之核苷酸、以及間隔寡核苷酸之鹼基可為鳥嘌呤、腺嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶及尿嘧啶之任一種或複數種，

又，鍵結於各鹼基上之糖可為核糖、脫氧核糖或2'位之羥基被取代為修飾基之核糖中之任一種，作為所附加之核苷酸，更佳為尿苷酸(U)及脫氧胸苷酸(dT)之任一種或兩種。又，亦可將於序列X鏈之3'端附加之核苷酸之鹼基序列設為與在標靶基因之mRNA內與序列X鄰接之核苷酸之鹼基序列相同之鹼基序列。又，亦可將於互補性序列X'鏈之3'端附加之核苷酸之鹼基序列設為與在標靶基因之mRNA內與序列X鄰接之核苷酸之鹼基序列為互補性鹼基序列。

作為本發明所使用之RNA之更佳之例，例如可列舉：(a)雙鏈RNA，其係包含含有序列X之正義寡核苷酸及含有互補性序列X'之反義寡核苷酸者，且序列X為標靶基因之mRNA之連續之19~21個鹼基之序列，且正義寡核苷酸含有序列X鏈及於序列X鏈之3'端附加之相同或不同之2~4個之核苷酸，反義寡核苷酸含有互補性序列X'鏈及於互補性序列X'鏈之3'端附加之相同或不同之2~4個之核苷酸；(b)雙鏈RNA，其係包含含有序列X之正義寡核苷酸及含有互補性序列X'之反義寡核苷酸者，且序列X為標靶基因之mRNA之連續之23~25個鹼基之序列，且正義寡核苷酸為序列X鏈，反義寡核苷酸為互補性序列X'鏈；(c)雙鏈RNA，其係包含含有序列X之正義寡核苷酸及含有互補性序列X'之反義寡核苷酸者，且序列X為標靶基因之mRNA之連續之23~27個鹼基之序列，且正義寡核苷酸含有序列X鏈及於序列X鏈之3'端附加之相同或不同之2~4個之核苷酸，反義寡核苷酸含有互補性序列X'鏈及於互補性序列X'鏈之3'端附加之相同或不同之2~4個之核苷酸，於互補性序列X'鏈之3'端附加之核苷酸之鹼基序列為與在標靶基因之mRNA內與序列X鄰接之核苷酸之鹼基序列為互補性鹼基序列；等。

又，作為本發明所使用之RNA，可較佳地列舉具有利用RNA干擾(RNAi)之該標靶基因之表現抑制作用的RNA。

單鏈寡核苷酸係使用固相亞磷醯胺法[參照Nucleic Acids Research, 30, 2435(1993)]而合成、去保護以及於NAP-5管柱(Amersham Pharmacia Biotech、Piscataway、NJ)上除鹽。低聚物係使用藉由利用15分鐘步驟之線性梯度之Amersham Source 15Q管柱(1.0 cm，高度25 cm)(Amersham Pharmacia Biotech、Piscataway、NJ)之離子交換高性能液相層析法(ion exchange-high performance liquid chromatography，IE-HPLC)進行精製。梯度係自90：10之緩衝液A：B變化為52：48之緩衝液A：B，緩衝液A為pH值8.5之100 mmol/L之Tris，及緩衝液B為pH值8.5之100 mmol/L之Tris(1 mol/L之NaCl)。於260 nm下對試樣進行檢測，針對對應於全長寡核苷酸種類之波峰，進行收集並混合試樣，藉由NAP-5管柱進行除鹽、及冷凍乾燥。

各單鏈寡核苷酸之純度係藉由利用Beckman PACE 5000(Beckman Coulter、Inc., Fullerton, Calif)之毛細管電泳(CE)而確定。CE毛細管具有100  $\mu\text{m}$ 之內徑，含有ssDNA 100R Gel(Beckman-Coulter)。典型而言，將約0.6 nmole之寡核苷酸注射至毛細管內，於444 V/cm之電場中實行，藉由260 nm下之UV吸光度而檢測。改性三羥甲基胺基甲烷-硼酸-7 mol/L-尿素電泳緩衝液係自Beckman-Coulter購入。可獲得用於以下所記述之實驗之藉由CE評價為純度至少90%之單鏈寡核苷酸。化合物同一性係依照製造業者之推薦操作說明，藉由利用Voyager DE. TM. Biospectrometry工作站(Applied Biosystems、Foster City、Calif.)之基質輔助雷射脫附游離-飛行時間型(matrix-assisted laser desorption

ionization-time of flight, MALDI-TOF)質量分光法進行驗證。單鏈寡核苷酸之相對分子質量可於所預想之分子質量之0.2%以內獲得。

將單鏈寡核苷酸以100  $\mu\text{mol/L}$ 濃度再懸浮於包含100  $\text{mmol/L}$ 乙酸鉀、30  $\text{mmol/L}$  HEPES(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, 4-(2-羥乙基)-1-哌啶乙磺酸)之pH值為7.5之緩衝液中。將互補性正義鏈及反正義鏈以相同之莫耳量混合，而獲得50  $\mu\text{mol/L}$ 雙鏈寡核苷酸之最終溶液。將試樣加熱5分鐘至95 $^{\circ}\text{C}$ ，於使用前冷卻至室溫。雙鏈核酸係於-20 $^{\circ}\text{C}$ 下進行保存。將單鏈寡核苷酸冷凍乾燥，或者於-80 $^{\circ}\text{C}$ 下儲藏於無核酸酶之水中。

L1及L2分別獨立為糖配體。

於本發明中，作為糖配體，意指源自可與在標靶細胞中表現之受體結合之糖類(單糖、二糖、三糖及多糖等)之基。於本發明中，於糖配體藉由O-鍵而鍵結於S1及S2之連結子上之情形時，意指將與構成糖配體之糖類之鍵結相關之羥基去除之部分為源自糖類之基之糖配體。

於本發明中，選擇成為寡核苷酸之標靶細胞之糖配體即可。

作為單糖，例如可列舉：阿洛糖、阿卓糖、阿拉伯糖、紅黴糖(cladinose)、赤藻糖、赤藻酮糖、果糖、D-海藻糖醇、L-海藻糖醇、岩藻糖胺(fucosamine)、岩藻糖(fucose)、墨角藻糖(fuculose)、半乳糖胺、D-半乳糖胺醇、N-乙醯基半乳糖胺、半乳糖、葡萄糖胺、N-乙醯基葡萄糖胺、葡萄糖胺醇(glucosaminitol)、葡萄糖、葡萄糖-6-磷酸、古洛糖、甘油醛、L-甘油-D-甘露-庚糖、甘油、甘油酮、古洛糖、艾杜糖、來蘇糖、甘露糖胺、甘露糖、甘露糖-6-磷酸、阿洛酮糖、異鼠李糖、異鼠李糖胺、鼠李糖醇、鼠李糖胺、鼠李糖、核糖、核酮糖、景天庚酮糖、山梨

糖、塔格糖、塔羅糖、酒石酸、蘇糖、木糖、及木酮糖等。

作為二糖、三糖、多糖，例如可列舉：阿比可糖、阿卡波糖、阿米西糖(amicetose)、支鏈澱粉、直鏈澱粉、洋芹糖、碳黴氨糖(arcnose)、蛔糖、抗壞血酸、波伊文糖(boivinose)、纖維雙糖、纖維三糖、纖維素、馬鈴薯三糖(chacotriose)、查爾糖(chalcose)、甲殼素、可立糖(colitose)、環糊精、磁麻糖(cymarose)、糊精、2-脫氧核糖、2-脫氧葡萄糖、脫氧毛地黃糖(diginose)、毛地黃糖(digitalose)、毛地黃毒糖(digitoxose)、evalose、evemitrose、低聚果糖、半乳寡糖(galactooligosaccharide)、龍膽三糖、龍膽二糖、葡聚糖、糖原(glucogen)、肝糖(glycogen)、金縷梅糖(hamamelose)、肝素、菊糖、異左旋葡萄糖酮(iselevoglucosenone)、異麥芽糖、異麥芽三糖、異潘糖、麴二糖(kojibiose)、乳糖、乳糖胺、乳糖二胺、昆布二糖(laminarabiose)、左旋葡聚糖(levoglucosan)、左旋葡萄糖酮、 $\beta$ -麥芽糖、麥芽三糖、低聚甘露糖、甘露三糖、蜜三糖、蜜二糖、胞壁酸、碳黴糖(mycarose)、6-脫氧-D-阿洛糖(mycinose)、神經胺糖酸、含唾液酸之糖鏈、黑麴黴糖、野尻黴素、諾維糖(noviose)、夾竹桃糖、潘糖、泊雷糖(paratose)、車前糖、櫻草糖、棉子糖、阿克拉黴糖(rhodinose)、芸香糖、沙門糖(sarmentose)、景天庚酮糖、景天庚醛聚糖(sedoheptulosan)、茄三糖(solatriose)、槐二糖、水蘇糖、鏈黴糖(streptose)、蔗糖、 $\alpha,\alpha$ -海藻糖、海藻糖胺(trehalosamine)、松二糖、泰威糖(tyvelose)、木二糖(xylobiose)、傘形糖等。

糖類中之各單糖可為D體或L體，亦可為D體與L體以任意比率形成之混合物。

糖類亦可包含脫氧糖(將醇羥基取代為氫原子而成者)、胺基糖(將醇羥基取代為胺基而成者)、硫代糖(將醇羥基取代為硫醇基而成者、或將C=O取代為C=S而成者、或將環氧取代為硫而成者)、硒代糖、碲代糖、氮雜糖(將環氧取代為氮而成者)、亞胺基糖(將環氧取代為氮而成者)、亞磷糖(將環氧取代為磷而成者)、磷雜糖(將環氧取代為磷而成者)、C-取代單糖(以碳原子取代非末端碳原子中之氫原子而成者)、不飽和單糖、醛糖醇(以CHOH基取代羰基而成者)、醛糖酸(將醛基取代為羧基而成者)、酮基醛糖酸、糖醛酸、醛糖二酸等。

關於胺基糖，作為糖類中之胺基單糖，可列舉：半乳糖胺、葡萄糖胺、甘露糖胺、岩藻糖胺、異鼠李糖胺、神經胺糖酸、胞壁酸、乳糖二胺、六碳胺糖(acosamine)、bacillosamine、柔紅糖胺(daunosamine)、脫氧糖胺(desosamine)、福樂糖胺(forosamine)、加洛糖胺(garosamine)、卡糖胺(kanosamine)、kansosamine、碳黴胺糖(mycaminose)、海藻糖胺(mycosamine)、過骨胺糖(perosamine)、6-脫氧-L-塔羅糖胺(pneumosamine)、絳紅糖胺(purpurosamine)、紫紅糖胺(Rhodosamine)等。又，胺基糖之胺基可被取代為乙醯基等。

作為含唾液酸之糖鏈，可列舉於糖鏈非還原末端含有NeuAc之糖鏈，可列舉含有NeuAc-Gal-GlcNAc之糖鏈、或Neu5Ac $\alpha$ (2-6)Gal $\beta$ (1-3)GlcNAc等。

糖類中之各單糖只要可與在標靶細胞中表現之受體鍵結，則可經取代基所取代，例如，羥基可被取代，各單糖中之氫原子可被疊氨基及/或可經取代之芳基進行1~複數個取代。

作為糖配體，較佳為對應於作為標靶之各器官而選擇與在標靶細胞

之表面表現之受體鍵結之糖配體，例如於標靶細胞為肝細胞之情形時，較佳為針對在肝細胞表面表現之受體之糖配體，更佳為針對去唾液酸糖蛋白質受體(ASGPR)之糖配體。

作為針對ASGPR之糖配體，較佳為甘露糖或N-乙醯基半乳糖胺，更佳為N-乙醯基半乳糖胺。

作為對ASGPR親和性更高之糖配體，已知有例如 *Bioorganic Medicinal Chemistry*, 17, 7254(2009)、及 *Journal of American Chemical Society*, 134, 1978(2012)等所記載之糖衍生物，可使用該等。

於本發明中，S1、S2及S3為連結子。

S1與S2只要為將作為糖配體之L1及L2與苯環連結之結構，則無特別限定，可採用核酸複合體中所使用之公知之結構。S1與S2可相同，亦可不同。

作為糖配體之L1與L2較佳為藉由糖苷鍵而與S1及S2連結，S1及S2可分別藉由例如-CO-、-NH-、-O-、-S-、-O-CO-、-S-CO-、-NH-CO-、-CO-O-、-CO-S-或-CO-NH-鍵而與苯環連結。

S3只要為將作為寡核苷酸之X與苯環連結之結構，則無特別限定，可採用核酸複合體中所使用之公知之結構。

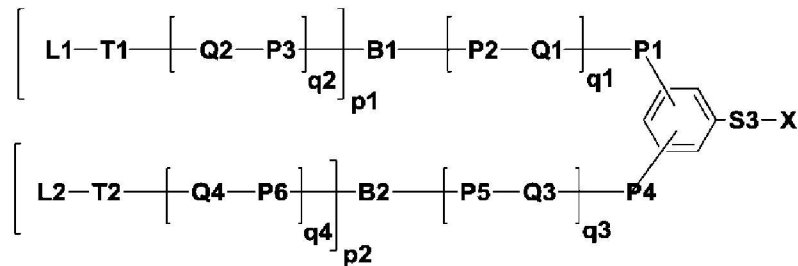
作為寡核苷酸之X較佳為藉由磷酸二酯鍵而與S3連結，S3可藉由例如-CO-、-NH-、-O-、-S-、-O-CO-、-S-CO-、-NH-CO-、-CO-O-、-CO-S-或-CO-NH-鍵而與苯環連結。

作為S1、S2及S3之連結子，例如可採用國際公開第2009/073809號、國際公開第2013/075035號、國際公開第2015/105083號、國際公開第2014/179620號、國際公開第2015/006740號所揭示之結構。

於本發明中，核酸複合體適宜為具有下述式2所表示之結構之核酸複合體。

式2：

[化61]



式2中，

X、L1、L2及S3分別與上述含義相同，

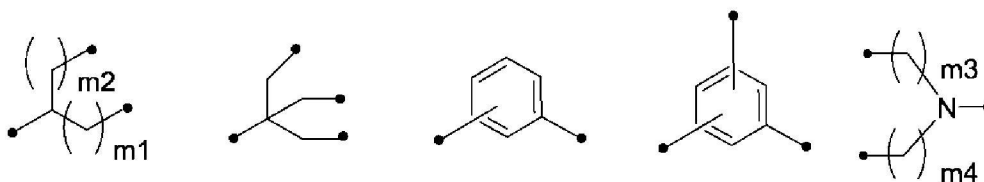
P1、P2、P3、P4、P5及P6、以及T1及T2分別獨立，不存在或者為-CO-、-NH-、-O-、-S-、-O-CO-、-S-CO-、-NH-CO-、-CO-O-、-CO-S-或-CO-NH-，

Q1、Q2、Q3及Q4分別獨立，不存在或者為經取代或未經取代之碳數1~12之伸烷基或 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ，n為0~99之整數，

B1及B2分別獨立為鍵結鍵或下述式2-1所表示之任一結構，各結構中之末端之黑圓點分別為與P2或P3或者P5或P6之鍵結點，m1、m2、m3及m4分別獨立為0~10之整數，

式2-1：

[化62]



$p_1$ 及 $p_2$ 分別獨立為1、2或3之整數，

$q_1$ 、 $q_2$ 、 $q_3$ 及 $q_4$ 分別獨立為0~10之整數，

其中，於 $p_1$ 及 $p_2$ 分別為2或3之整數時，各P3及P6、Q2及Q4、T1及T2以及L1及L2可相同或不同。

P1及P4分別獨立，不存在或者為-CO-、-NH-、-O-、-S-、-O-CO-、-S-CO-、-NH-CO-、-CO-O-、-CO-S-或-CO-NH-，較佳為-O-、-O-CO-、-NH-CO-或-CO-NH-，更佳為-O-、-NH-CO-或-CO-NH-，進而較佳為-NH-CO-。

P1或P4於例如為-NH-CO-之情形時，具有-NH-CO-苯環之部分結構。

Q1、Q2、Q3及Q4分別獨立，不存在或者為經取代或未經取代之碳數1~12之伸烷基或 $-(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2-$ ， $n$ 為0~99之整數，較佳為經取代或未經取代之碳數1~12之伸烷基，更佳為未經取代之碳數1~12之伸烷基，進而較佳為未經取代之碳數1~6之伸烷基，進而更佳為未經取代之碳數1~4之伸烷基。

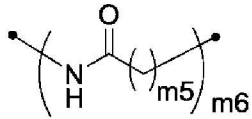
P2及P5分別獨立，不存在或者為-CO-、-NH-、-O-、-S-、-O-CO-、-S-CO-、-NH-CO-、-CO-O-、-CO-S-或-CO-NH-，較佳為不存在或者為CO-O-或-CO-NH-，更佳為不存在或者為-CO-NH-。P2及P5於例如為CO-NH-之情形時，具有B1-CO-NH-Q1及B2-CO-NH-Q3之部分結構。

$-(P_2-Q_1)_{q_1}$ -及 $-(P_5-Q_3)_{q_3}$ -適宜為分別獨立，不存在或者為下述式3-1

～式3-3所表示之任一結構。

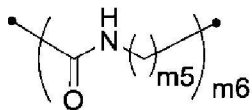
式3-1：

[化63]



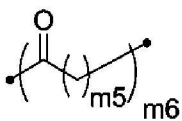
式3-2：

[化64]



式3-3：

[化65]



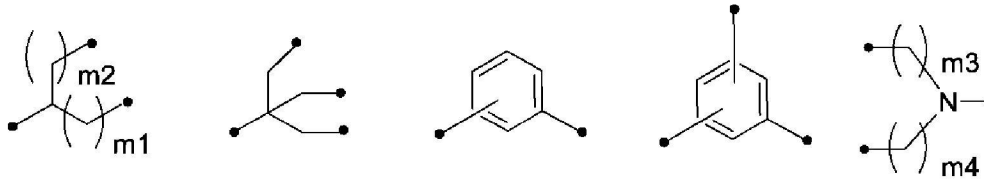
式3-1～3-3中，

m5及m6分別獨立為0～10之整數，式3-1～式3-3之結構中之末端之黑圓點分別為與B1或B2或者P1或P4之鍵結點。

B1及B2分別獨立為鍵結鍵或下述式所表示之任一結構，各結構中之末端之黑圓點分別為與P2或P3或者P5或P6之鍵結點，m1、m2、m3及m4

分別獨立為0~10之整數。

[化66]

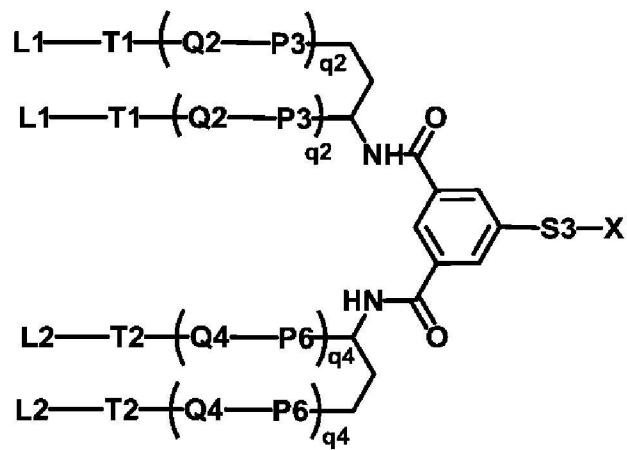


B1及B2較佳為源自麩胺酸、天冬胺酸、離胺酸、亞胺基二乙酸等包括非天然胺基酸之胺基酸或1,3-丙二醇等胺基醇之基，於B1及B2為源自麩胺酸及天冬胺酸之基之情形時，較佳為麩胺酸及天冬胺酸之胺基分別鍵結，且P2及P5為-NH-CO-鍵，於B1及B2為源自離胺酸之基之情形時，較佳為離胺酸之羧基分別鍵結，且P2及P5為-CO-NH-鍵，於B1及B2為源自亞胺基二乙酸之基之情形時，較佳為亞胺基二乙酸之胺基分別鍵結，且P2及P5成為-CO-鍵。

於本發明中，核酸複合體適宜為具有下述式4-1~4-9所表示之結構之核酸複合體。

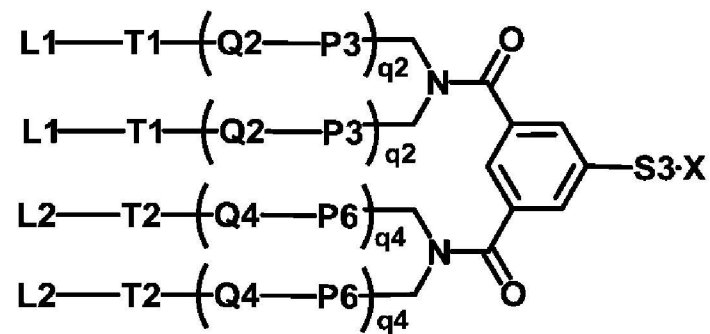
式4-1：

[化67]



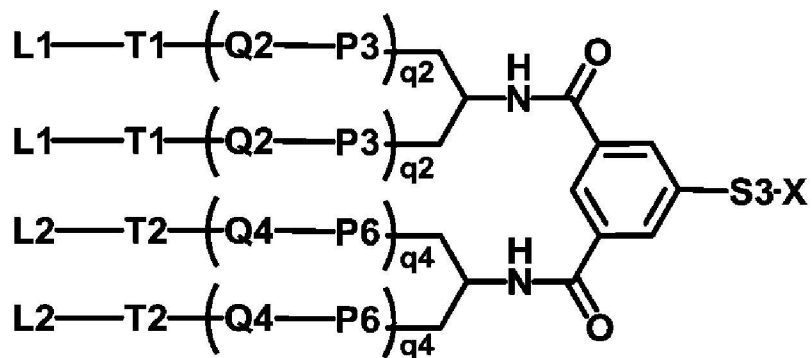
式4-2：

[化68]



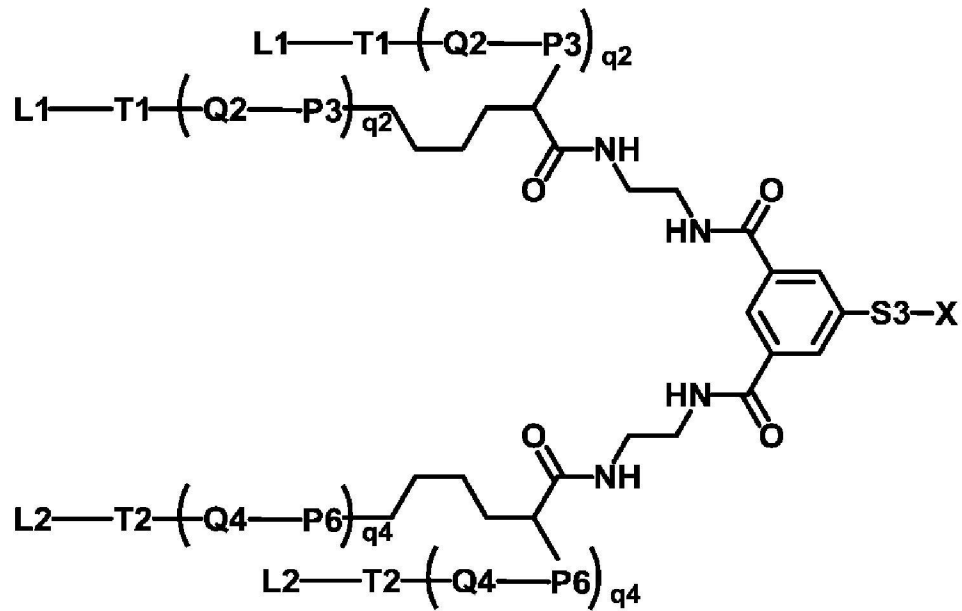
式4-3：

[化69]



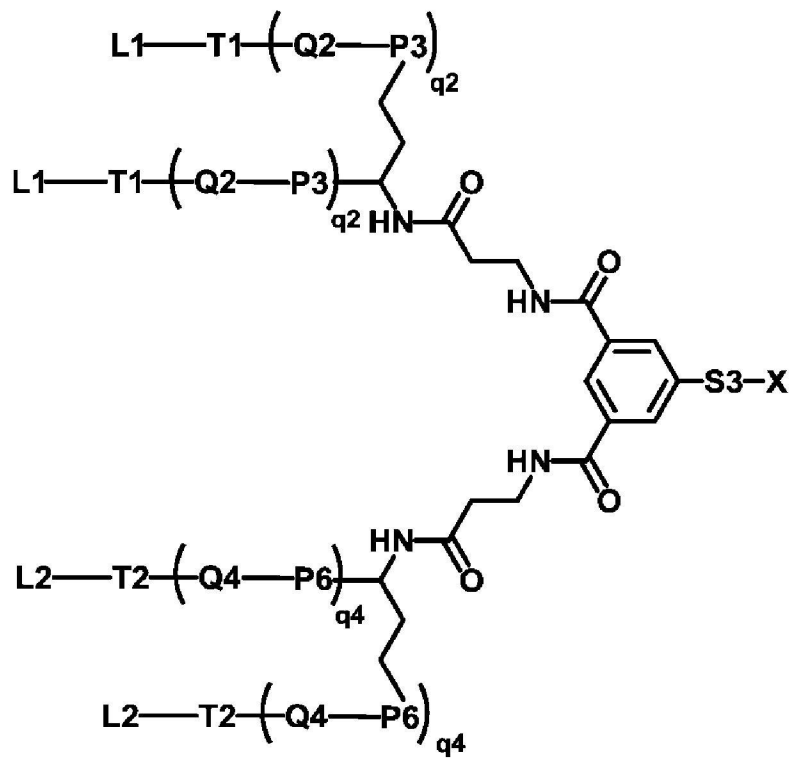
式4-4：

[化70]



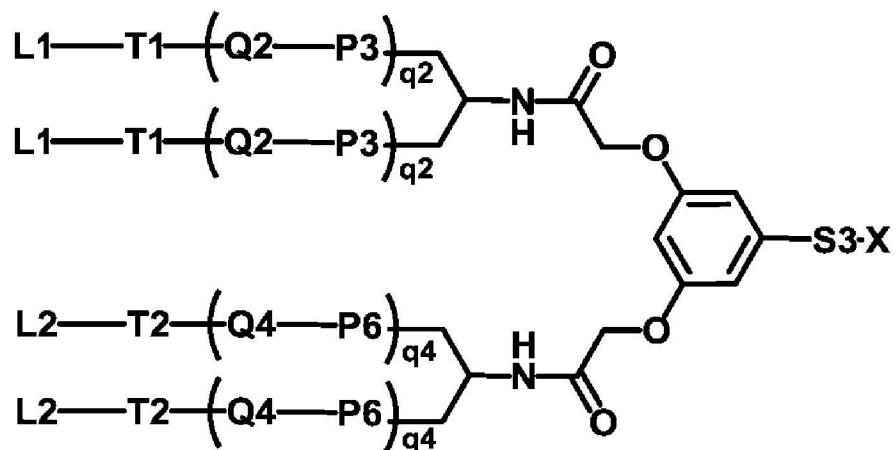
式4-5：

[化71]



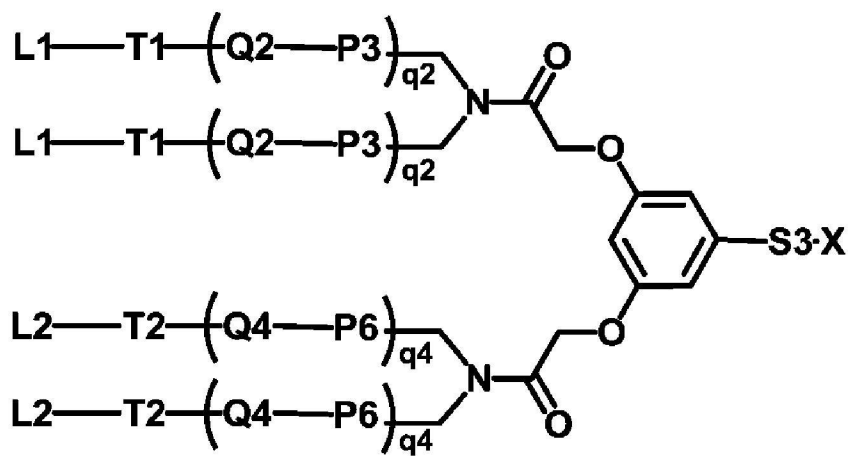
式4-6：

[化72]



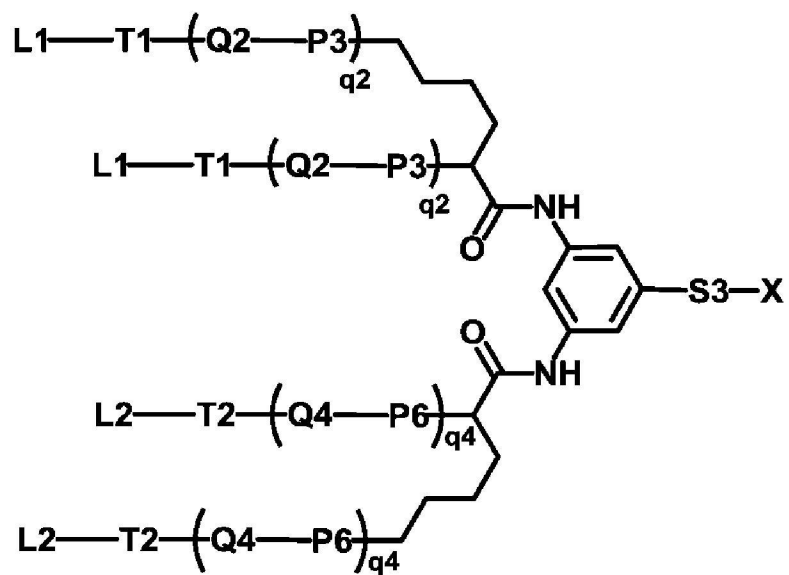
式4-7：

[化73]



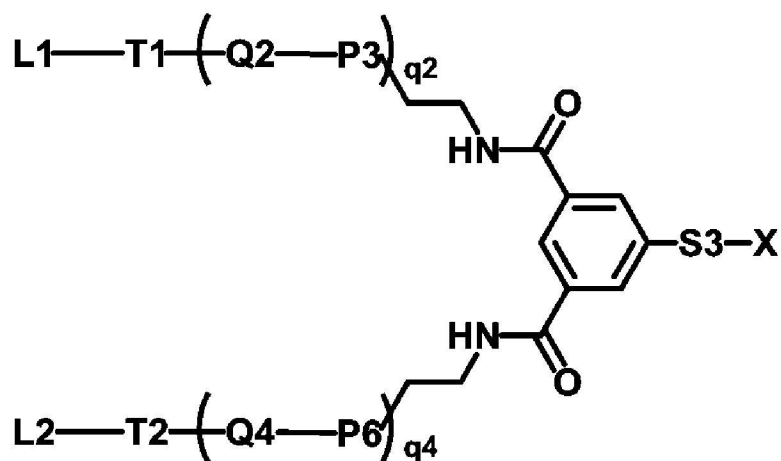
式4-8：

[化74]



式4-9：

[化75]



式4-1~4-9中，

X、L1、L2、S3、P3、P6、T1、T2、Q2、Q4、q2及q4分別與上述含義相同。

P3及P6分別獨立，不存在或者為-CO-、-NH-、-O-、-S-、-O-CO-、-S-CO-、-NH-CO-、-CO-O-、-CO-S-或-CO-NH-，較佳為-O-CO-或-NH-CO-，更佳為-NH-CO-。P3及P6於例如為-NH-CO-之情形時，分別具有B1-NH-CO-Q2及B2-NH-CO-Q4之部分結構。

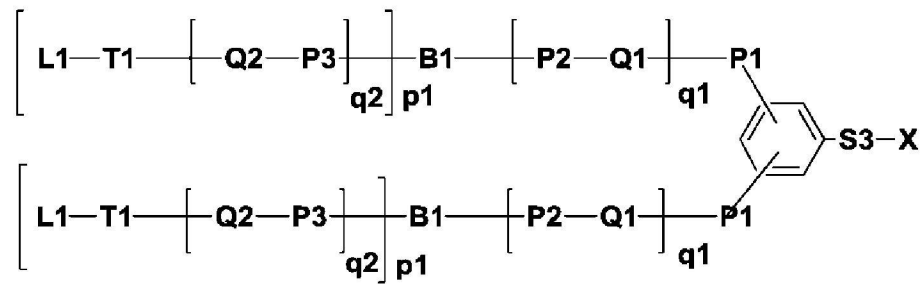
T1及T2分別獨立，不存在或者為-CO-、-NH-、-O-、-S-、-O-CO-、-S-CO-、-NH-CO-、-CO-O-、-CO-S-或-CO-NH-，較佳為-O-或-S-，更佳為-O-。

於本發明中，核酸複合體適宜為具有下述式5所表示之結構之核酸複合體。

於式5中，式2中之P1與P4、P2與P5、P3與P6、Q1與Q3、Q2與Q4、B1與B2、T1與T2、L1與L2、p1與p2、q1與q3以及q2與q4分別相同。

式5：

[化76]



式5中，

X、S3、P1、P2、P3、Q1、Q2、B1、T1、L1、p1、q1及q2分別與上述含義相同。

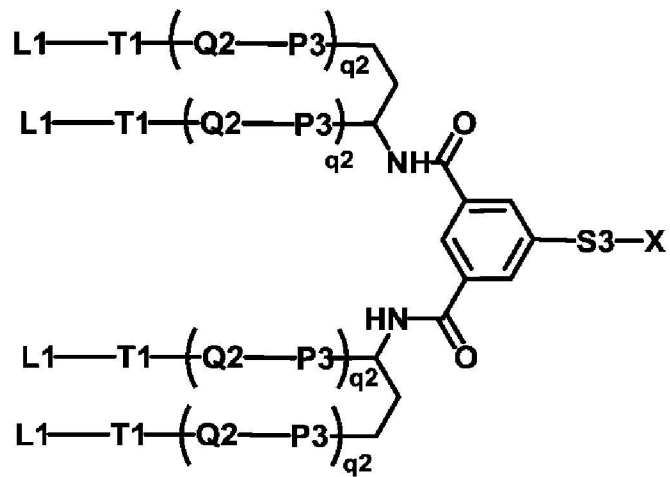
又，式5中之X、S3、P1、P2、P3、Q1、Q2、B1、T1、L1、p1、q1及q2分別可為上述之適宜之基，較佳為P1為-CO-NH-、-NH-CO-或-O-。

式5中之-(P2-Q1)<sub>q1</sub>-適宜為不存在或者為上述式3-1～式3-3所表示之任一結構。

於本發明中，核酸複合體適宜為具有下述式6-1～6-9所表示之結構之核酸複合體。

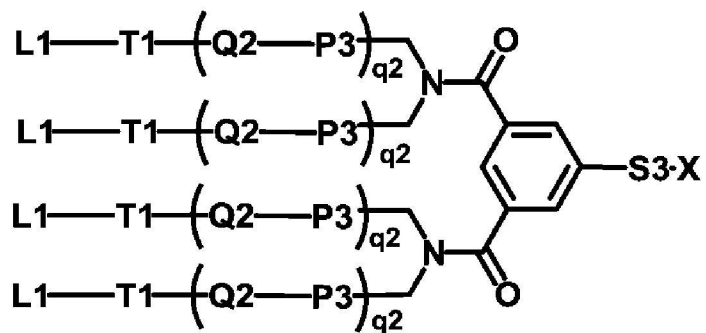
式6-1：

[化77]



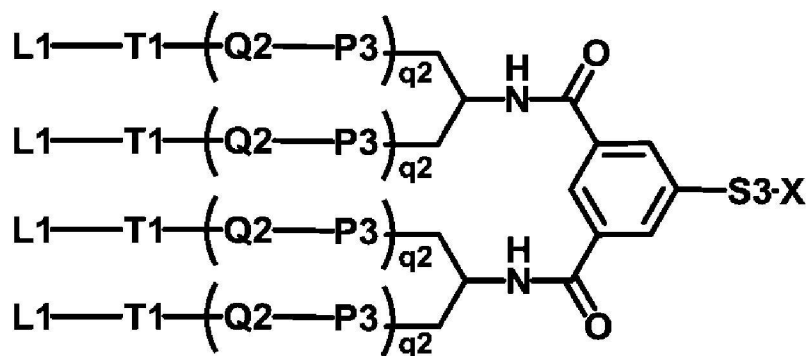
式6-2：

[化78]



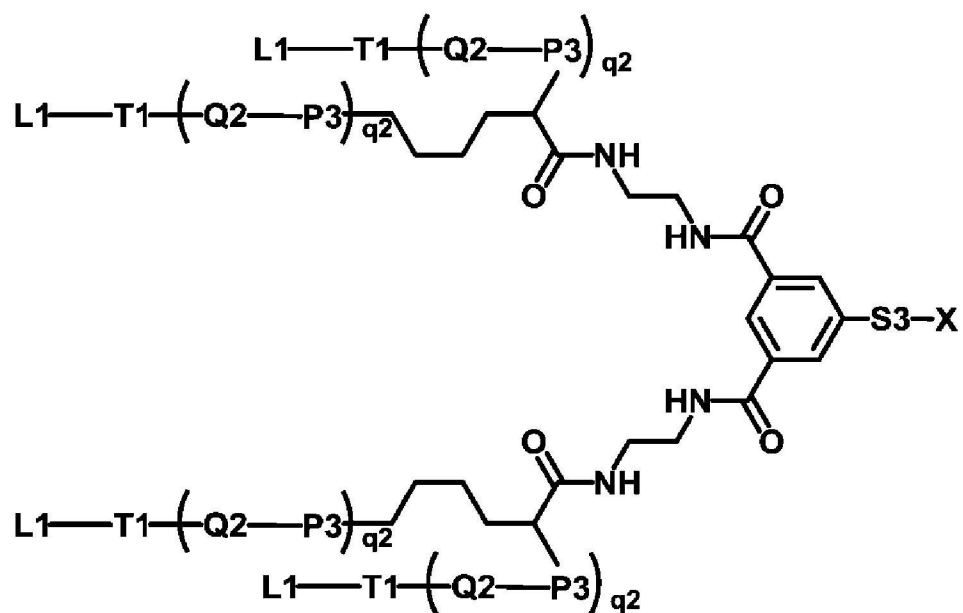
式6-3：

[化79]



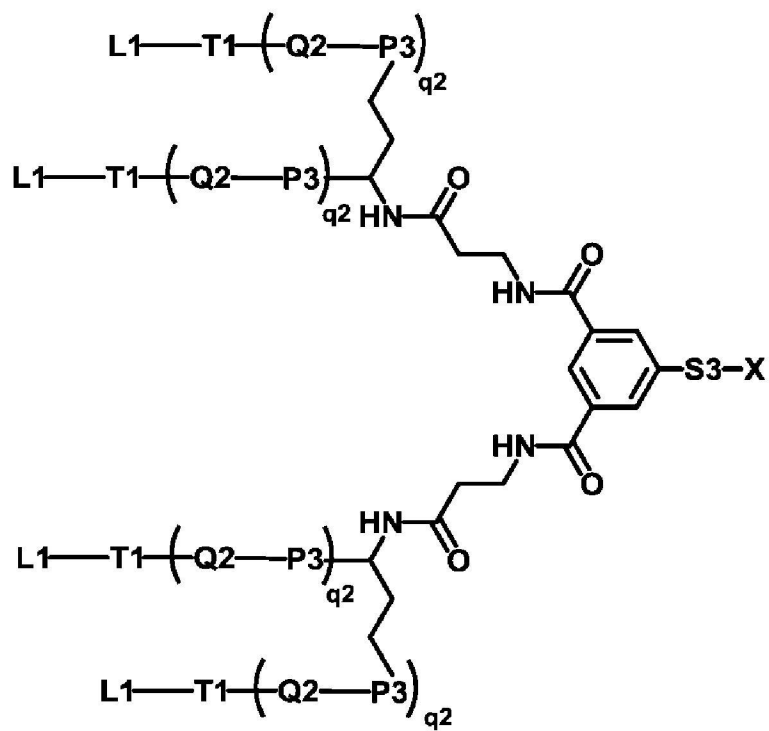
式6-4：

[化80]



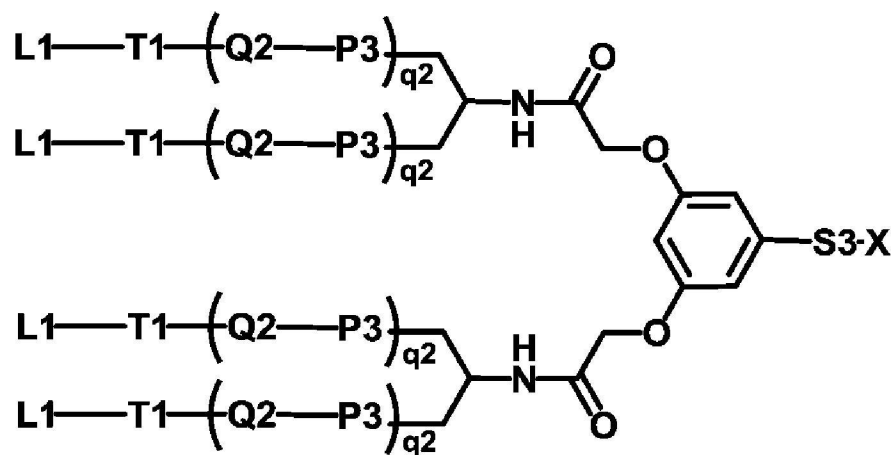
式6-5：

[化81]



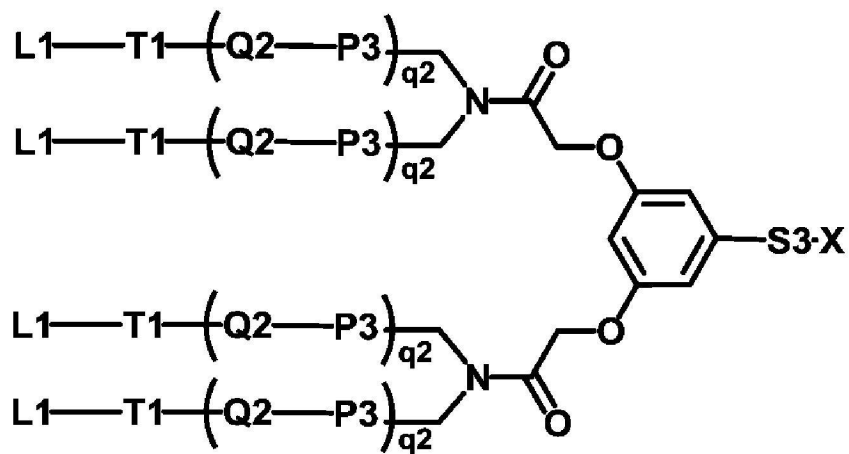
式6-6：

[化82]



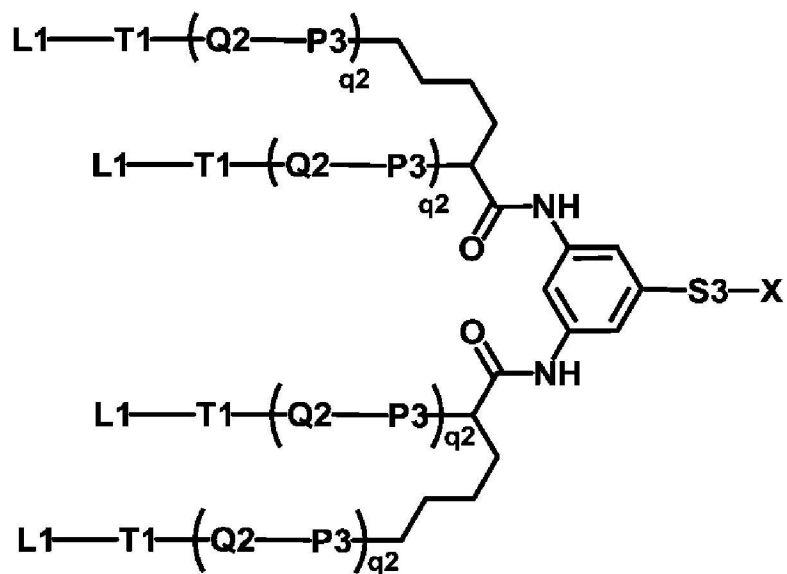
式6-7：

[化83]



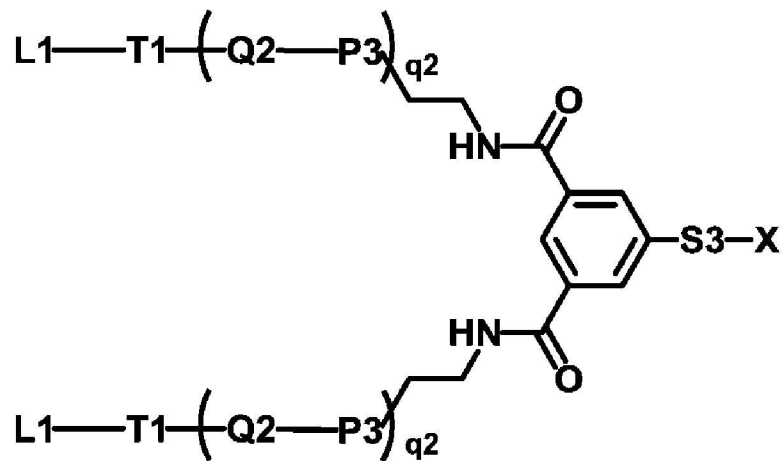
式6-8：

[化84]



式6-9：

[化85]



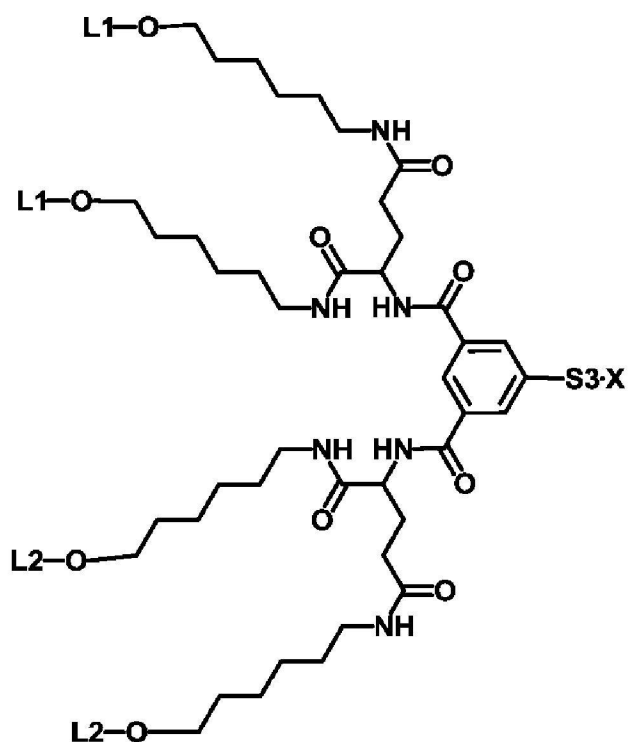
式6-1~式6-9中，

X、S3、P3、Q2、T1、及L1分別與上述含義相同。

於本發明中，核酸複合體適宜為具有下述式7-1~式7-9之任一者所表示之結構之核酸複合體。

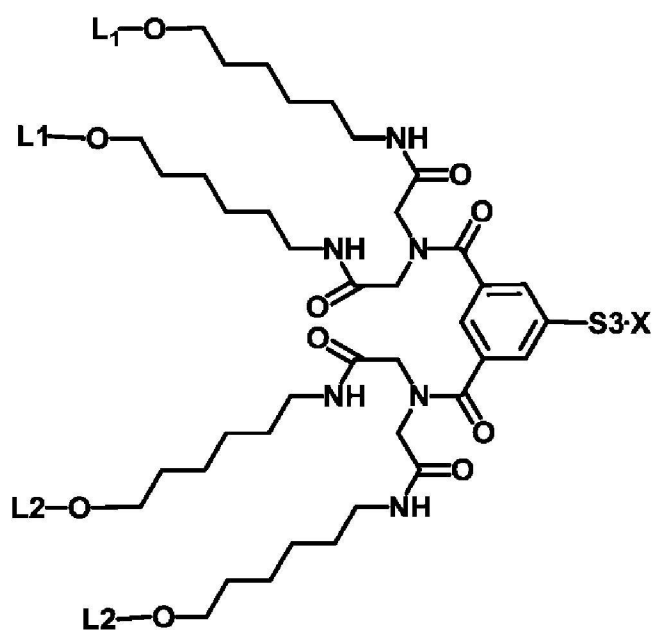
式7-1：

[化86]



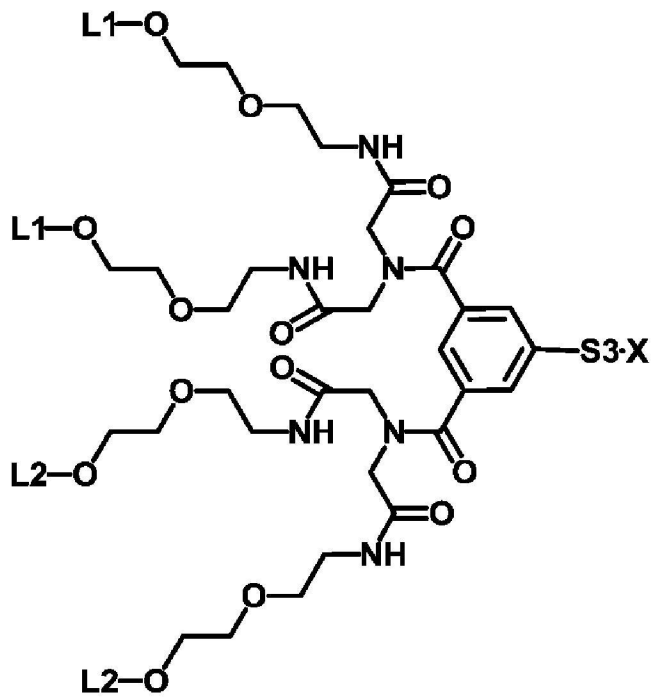
式7-2：

[化87]



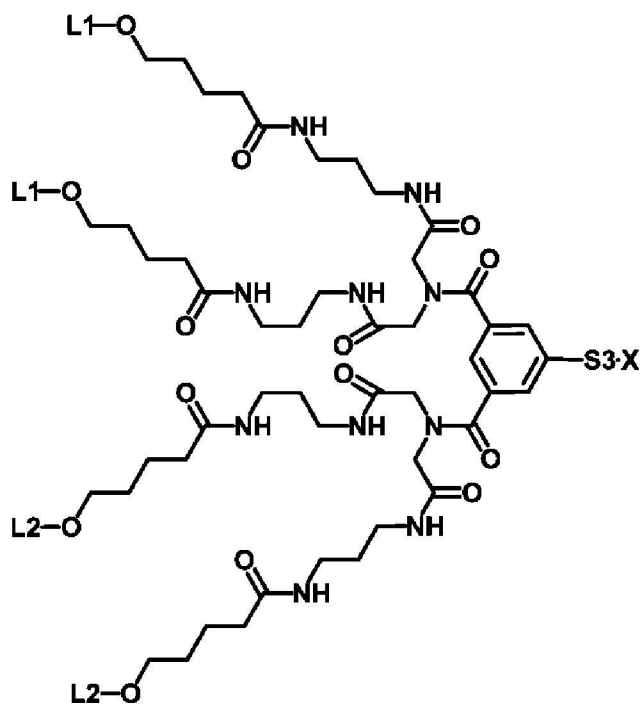
式7-3：

[化88]



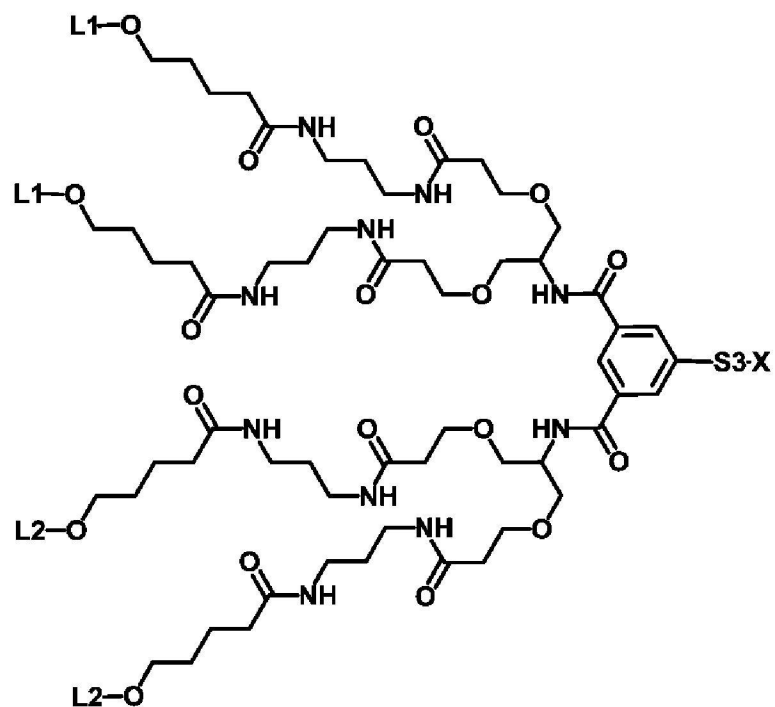
式7-4：

[化89]



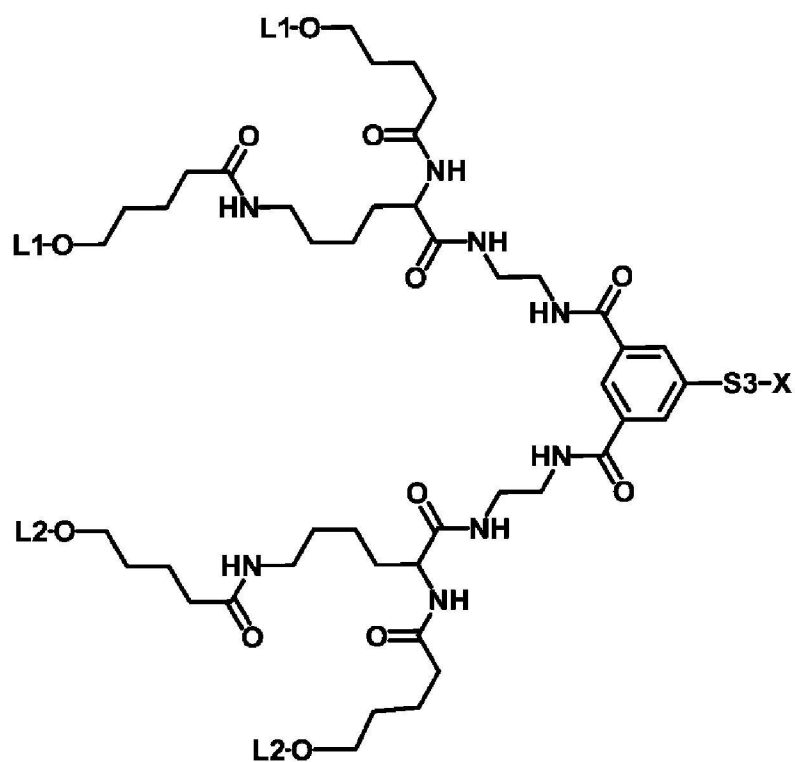
式7-5：

[化90]



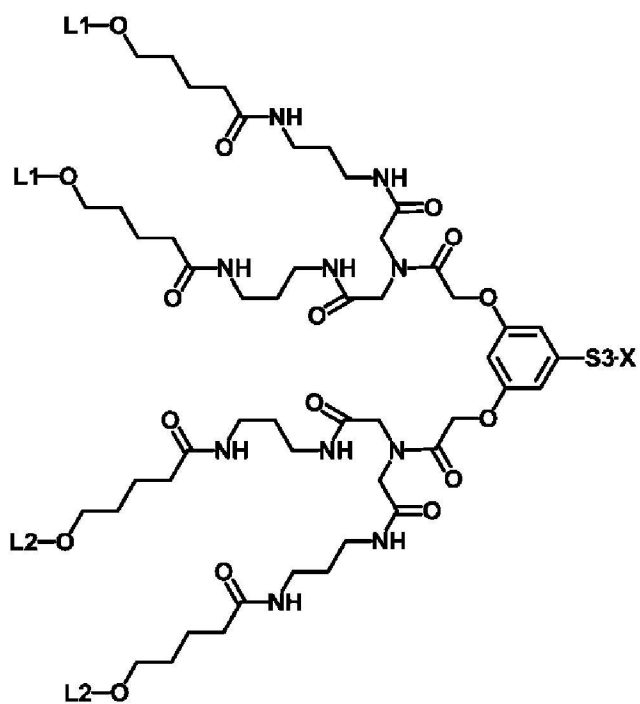
式7-6：

[化91]



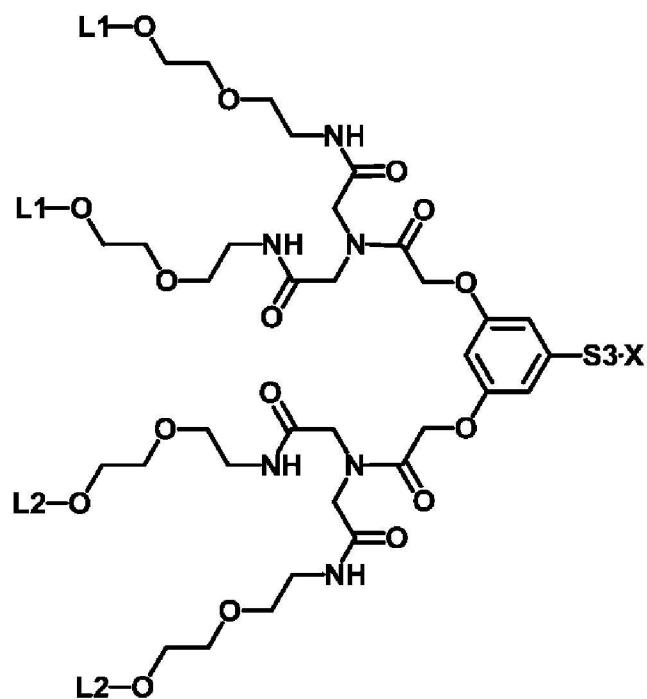
式7-7：

[化92]



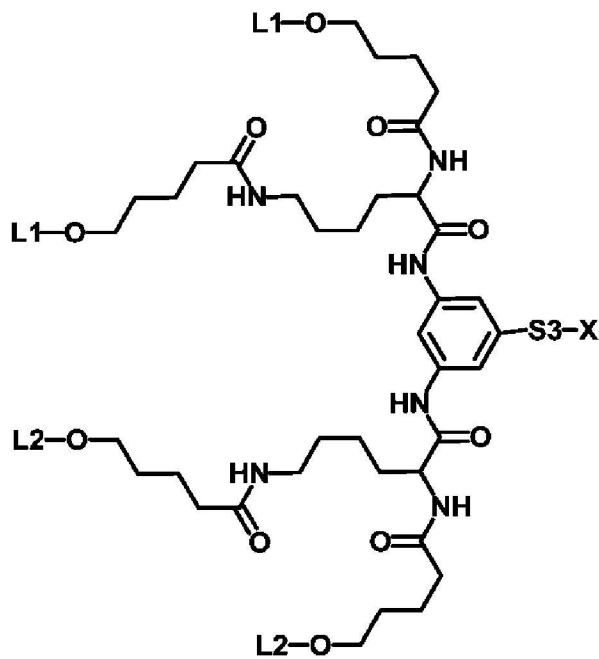
式7-8：

[化93]



式7-9：

[化94]



式7-1～式7-9中，

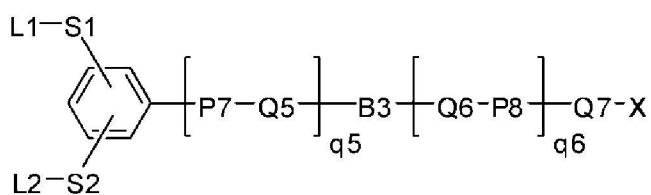
X、L1、L2及S3分別與上述含義相同。L1與L2可相同亦可不同，適宜為相同。

於式7-1～式7-9中，藉由將各伸烷基部分導入至鏈長不同之伸烷基鏈中，或者藉由將醯胺鍵等取代為其他鍵，亦可製造具有式7-1～式7-9所表示之結構之核酸複合體以外之核酸衍生物。

於本發明中，核酸複合體適宜為具有下述式11所表示之結構之核酸複合體。

式11：

[化95]



式11中，

L1、L2、S1及S2分別與上述含義相同，

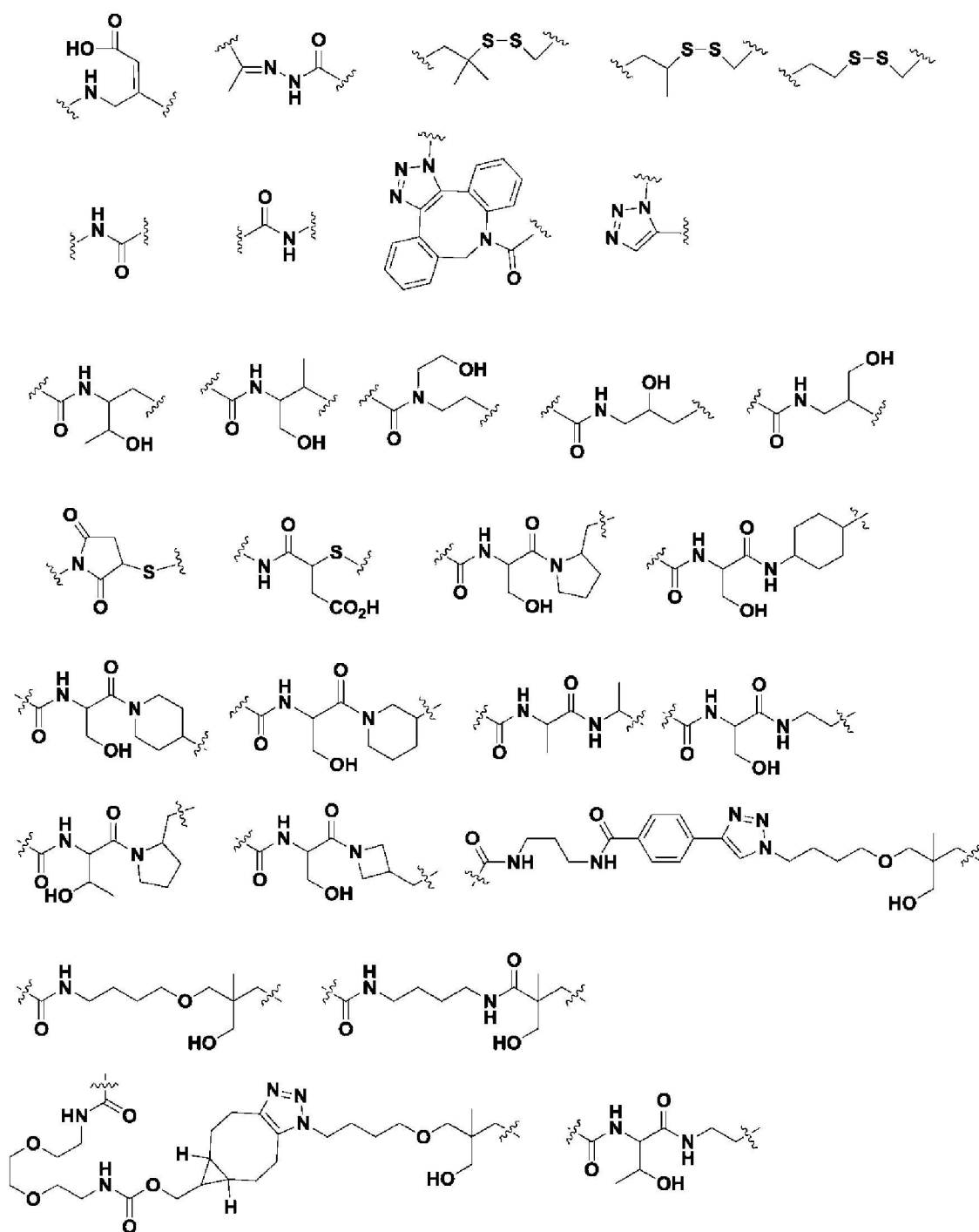
P7及P8分別獨立，不存在或者為-CO-、-NH-、-O-、-S-、-O-CO-、  
-S-CO-、-NH-CO-、-CO-O-、-CO-S-或-CO-NH-，

Q5、Q6及Q7分別獨立，不存在或者為經取代或未經取代之碳數1～  
12之伸烷基或-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n8</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-，n8為0～99之整數，

B3於本說明書中被稱為分支單元，為下述式11-1所表示之任一結  
構，虛線分別意指與Q5及Q6之鍵結鍵，

式11-1：

[化96]



q5及q6分別獨立為0~10之整數。

P7不存在或者為-CO-、-NH-、-O-、-S-、-O-CO-、-S-CO-、-NH-CO-、-CO-O-、-CO-S-或-CO-NH-，較佳為-O-、-NH-CO-或-CO-NH-，更佳為-O-、或-NH-CO-。P7於例如為-O-之情形時，具有苯環-O-之部分結構。

P8不存在或者為 $-\text{CO}-$ 、 $-\text{NH}-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{O}-\text{CO}-$ 、 $-\text{S}-\text{CO}-$ 、 $-\text{NH}-\text{CO}-$ 、 $-\text{CO}-\text{O}-$ 、 $-\text{CO}-\text{S}-$ 或 $-\text{CO}-\text{NH}-$ ，於存在之情形時，較佳為 $-\text{CO}-\text{O}-$ 或 $-\text{CO}-\text{NH}-$ ，更佳為 $-\text{CO}-\text{NH}-$ 。P8於例如為 $-\text{CO}-\text{NH}-$ 之情形時，具有Q6- $-\text{CO}-\text{NH}-$ 之部分結構。

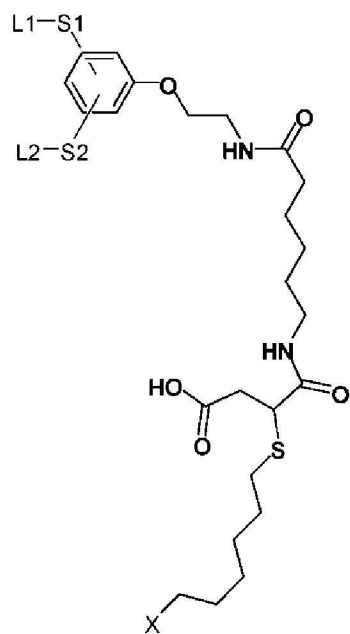
Q5、Q6及Q7分別獨立，不存在或者為經取代或未經取代之碳數1~12之伸烷基或 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{n8}-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ， $n8$ 為0~99之整數，較佳為經取代或未經取代之碳數1~12之伸烷基，更佳為未經取代之碳數1~12之伸烷基，進而較佳為未經取代之碳數1~6之伸烷基，進而更佳為未經取代之碳數1~4之伸烷基。

$-(\text{P7}-\text{Q5})_{q5}-$  為  $-\text{O}-\text{(CH}_2\text{)}_{m15}-\text{NH}-$  及  $-\text{NH}-\text{CO}-\text{(CH}_2\text{)}_{m16}-\text{NH}-$ ， $m15$  及  $m16$  適宜分別獨立為1~10之整數。

於本發明中，核酸複合體適宜為具有下述式12-1~式12-12之任一者所表示之結構之核酸複合體。

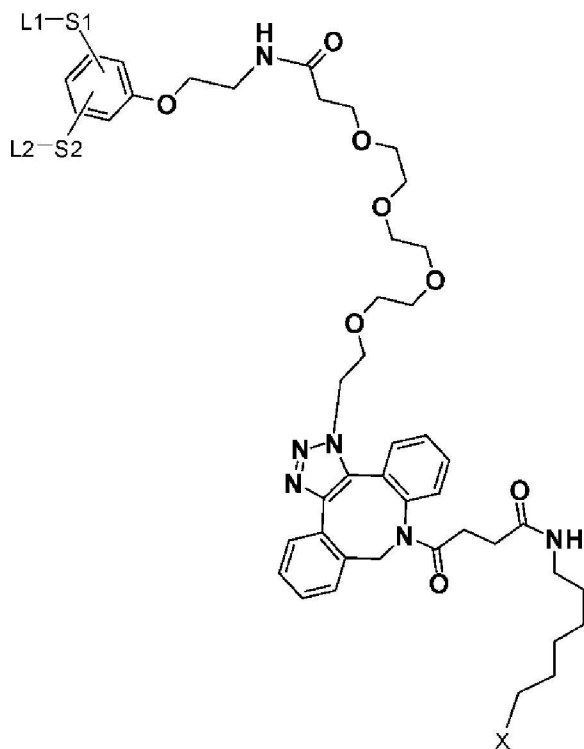
式12-1：

[化97]



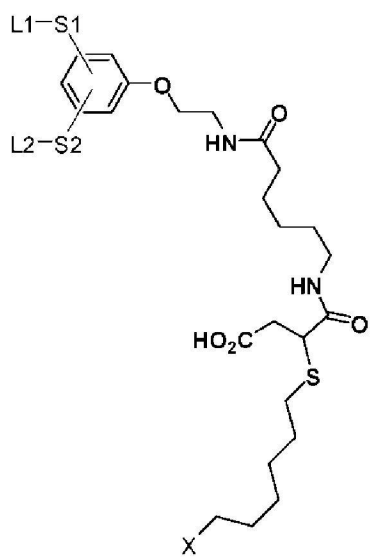
式12-2：

[化98]



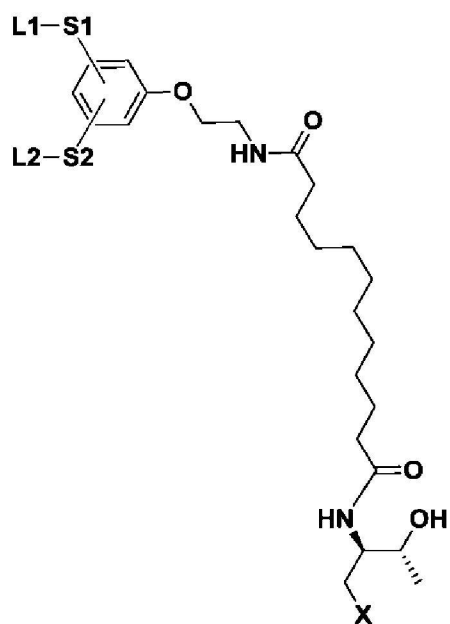
式12-3：

[化99]



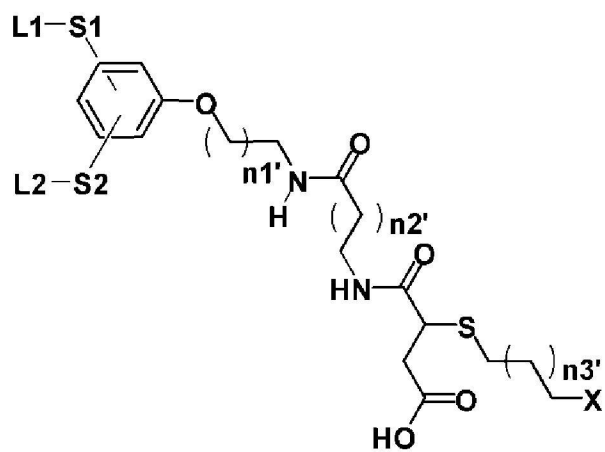
式12-4：

[化100]



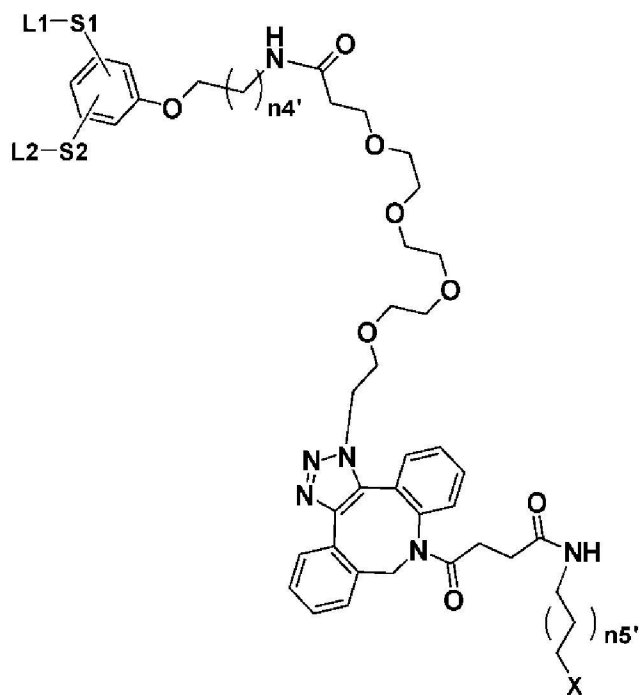
式12-5：

[化101]



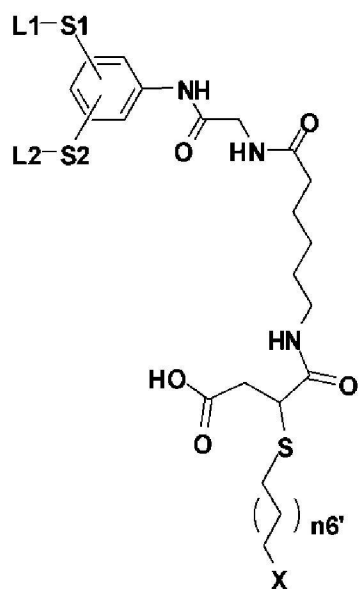
式12-6：

[化102]



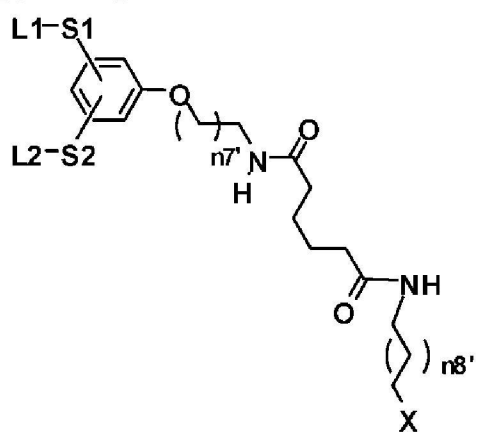
式12-7：

[化103]



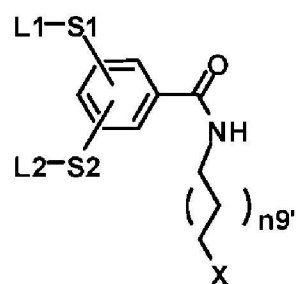
式12-8：

[化104]



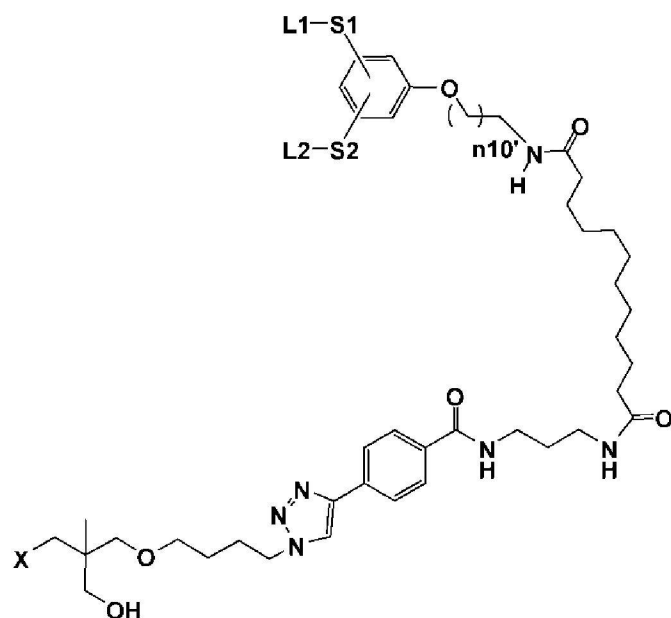
式12-9：

[化105]



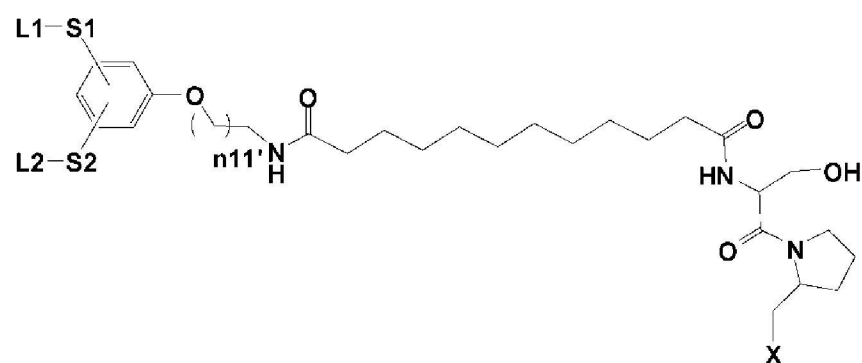
式12-10：

[化106]



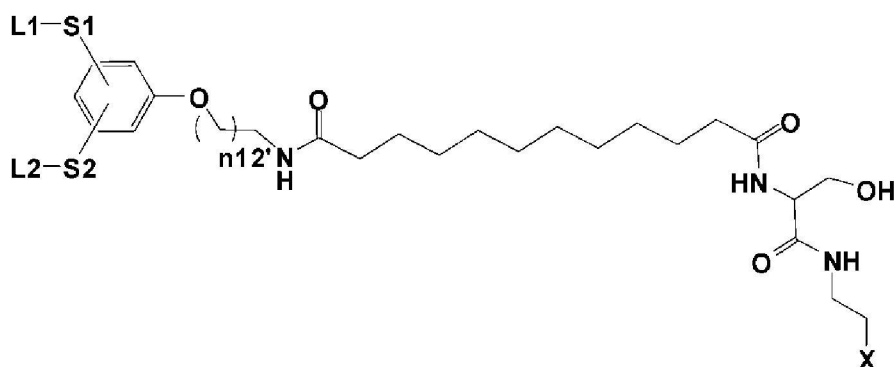
式12-11：

[化107]



式12-12：

[化108]



式12-1~12-12中，

X、L1、L2、S1及S2分別與上述含義相同， $n1' \sim n12'$ 分別獨立為1~10之整數。

本發明之核酸複合體於式1所表示之核酸複合體中，較佳為兼具式2及式11之結構之核酸複合體，該核酸複合體為式11之結構，且式2可為式4-1~式4-9，亦可為式6-1~式6-9，亦可為式7-1~式7-9，於式2為式4-1~式4-9、式6-1~式6-9、或式7-1~式7-9之情形時，式11可為式12-1~式12-12。本發明之核酸複合體於式1所表示之核酸複合體中，更適宜為兼具式4-1~式4-9中之任一結構及式12-1~式12-12中之任一結構之核酸複合體、兼具式6-1~式6-9中之任一結構及式12-1~式12-12中之任一結構之核酸複合體、兼具式7-1~式7-9中之任一結構及式12-1~式12-12中之任一結構之核酸複合體。

本發明之核酸複合體於氫離子配位於任一氮原子上之孤電子對上之情形時，亦可與製藥上可容許之陰離子形成鹽。

於本發明中，作為製藥上可容許之陰離子，例如可列舉：氯化物離子、溴化物離子、硝酸根離子、硫酸根離子、磷酸根離子等無機離子；乙酸根離子、草酸根離子、順丁烯二酸根離子、反丁烯二酸根離子、檸檬酸

根離子、苯甲酸根離子、甲磺酸根離子等有機酸根離子等。

對本發明之核酸複合體之製造法進行說明。再者，於以下所示之製造法中，於所定義之基在該製造法之條件下發生變化或不適於實施該製造法之情形時，可藉由使用有機合成化學所常用之保護基之導入及去除方法 [例如 *Protective Groups in Organic Synthesis, third edition*, T. W. Greene 著, John Wiley & Sons Inc.(1999年)等所記載之方法] 等製造目標化合物。又，亦可視需要改變取代基導入等反應步驟之順序。

式1所表示之核酸聚合物亦可藉由固相合成而合成。

式1所表示之核酸聚合物可參考作為核酸複合體而公知之連結子結構之合成方法而合成。

式1所表示之核酸複合體中以S1作為連結子之L1-苯環單元或以S2作為連結子之L2-苯環單元之合成例如以式2所表示之核酸複合體為例進行說明。

式2所表示之核酸複合體中之L1-苯環單元或L2-苯環單元係藉由P1、P2、P3、P4、P5、及P6以及T1及T2而連結。

P1、P2、P3、P4、P5、及P6以及T1及T2之-CO-、-NH-、-O-、-S-、-O-CO-、-S-CO-、-NH-CO-、-CO-O-、-CO-S-或-CO-NH-鍵例如可參考第4版實驗化學講座19「有機化合物之合成I」、丸善(1992年)、第4版實驗化學講座20「有機化合物之合成II」、丸善(1992年))等所記載之鍵結反應之方法，藉由選擇適於形成式2所表示之結構之原料而適當合成。

又，藉由自苯環起依序鍵結具有Q1作為部分結構之化合物、具有B1作為部分結構之化合物，可製造L1-苯環單元之部分結構。

藉由另行合成具有L1與Q2作為部分結構之化合物，使具有L1與Q2

作為部分結構之化合物與包含具有苯環、Q1及B1作為部分結構之L1-苯環單元之部分結構之化合物鍵結，可製造L1-苯環單元結構。

關於L2-苯環單元亦為同樣，藉由自苯環起依序鍵結具有Q3作為部分結構之化合物、具有B2作為部分結構之化合物，可製造L2-苯環單元之部分結構。

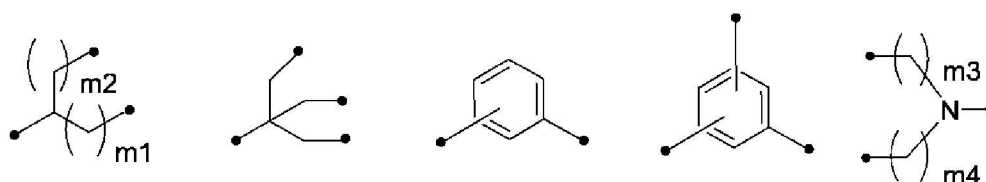
藉由另行合成具有L2與Q4作為部分結構之化合物，使具有L2與Q4作為部分結構之化合物與包含具有苯環、Q3及B2作為部分結構之L2-苯環單元之部分結構之化合物鍵結，可製造L2-苯環單元結構。

作為具有Q1作為部分結構之化合物、具有Q3作為部分結構之化合物，可列舉於碳數1~10之伸烷基或 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 之兩末端具有羥基、羧基、胺基、硫醇基之化合物。

作為具有B1作為部分結構之化合物、具有B2作為部分結構之化合物，可列舉具有下述式2-1所表示之任一結構且於各結構中之末端之黑圓點分別具有羥基、羧基、胺基、或硫醇基之化合物。

式2-1：

[化109]



作為具有B1作為部分結構之化合物、具有B2作為部分結構之化合物之具體例，可列舉：乙二醇、麩胺酸、天冬胺酸、離胺酸、Tris、亞胺基二乙酸、2-胺基-1,3-丙二醇等，較佳為麩胺酸、天冬胺酸、離胺酸、亞胺

基二乙酸。

合成具有L1、Q2及B1作為部分結構之化合物後，使其與具有Q1與苯環之化合物鍵結，藉此亦可製造L1-苯環單元結構。

合成具有L2、Q4及B2作為部分結構之化合物後，使其與具有Q3與苯環之化合物鍵結，藉此亦可製造L2-苯環單元結構。

於本發明中，作為[L1-T1-(Q2-P3)<sub>q2</sub>]<sub>p1</sub>-B1-(P2-Q1)<sub>q1</sub>-P1-之部分結構與作為[L2-T2-(Q3-P6)<sub>q4</sub>]<sub>p2</sub>-B2-(P5-Q3)<sub>q3</sub>-P2-之部分結構可相同或不同，較佳為相同。

作為與糖配體之L1-T1-Q2相當之單元，例如可列舉L3-T1-Q2-COOH、L3-T1-(Q2-P3)<sub>q2-1</sub>-Q2-NH<sub>2</sub>等。具體而言，可列舉L3-O-碳數1~12之伸烷基-COOH、或L3-碳數1~12之伸烷基-CO-NH-碳數2~12之伸烷基-NH<sub>2</sub>等。

L3只要為藉由去保護而成為L1之糖配體衍生物即可，並無特別限定。作為糖配體之取代基，只要為糖質化學之領域所通用之取代基即可，並無特別限定，較佳為Ac基。

具體而言，以S1作為連結子之L1-苯環單元或以S2作為連結子之L2-苯環單元之合成可藉由參考實施例所記載之方法，適當增減伸烷基鏈之碳數，或使用將末端胺基或末端羧基轉換為可形成-CO-、-NH-、-O-、-S-、-O-CO-、-S-CO-、-NH-CO-、-CO-O-、-CO-S-或-CO-NH-鍵之基之化合物而合成。又，關於L1之糖配體，於實施例中例示有甘露糖或N-乙醯基半乳糖胺，但亦可變更為其他糖配體而實施。

式1所表示之核酸複合體中之以S3作為連結子之X-苯環單元之合成例如以式11所表示之核酸複合體為例進行說明。

式11所表示之核酸複合體中之X-苯環單元除了寡核苷酸之鍵以外，亦具有由P7及P8表示之鍵。

P7及P8之-CO-、-NH-、-O-、-S-、-O-CO-、-S-CO-、-NH-CO-、-CO-O-、-CO-S-或-CO-NH-鍵例如可參考第4版實驗化學講座19「有機化合物之合成I」丸善(1992年)、第4版實驗化學講座20「有機化合物之合成II」、丸善(1992年))所記載之鍵結反應之方法，選擇適於形成式11所表示之結構之原料而適當合成。

又，藉由自苯環起依序鍵結具有Q5作為部分結構之化合物、具有B3作為部分結構之化合物，可製造X-苯環單元之部分結構。

藉由另行合成具有X與Q7作為部分結構之化合物、或具有X與Q6作為部分結構之化合物，使具有X與Q7作為部分結構之化合物或具有X與Q6作為部分結構之化合物與包含具有苯環及Q5作為部分結構之X-苯環單元之部分結構之化合物鍵結而形成B3部分，可製造X-苯環單元結構。

具體而言，若以於包含具有苯環及Q5作為部分結構之X-苯環單元之部分結構之化合物之末端具有疊氨基之情形為例，則藉由使如實施例所揭示之經末端鍵結性官能基化之寡核苷酸進行反應，進行環化加成而形成三唑環，從而形成B3部分，藉此可製造X-苯環單元結構。

作為具有Q5作為部分結構之化合物、具有Q6作為部分結構之化合物、具有Q7作為部分結構之化合物，可列舉於碳數1~10之伸烷基或-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-之兩末端具有羥基、羧基、胺基、硫醇基之化合物。

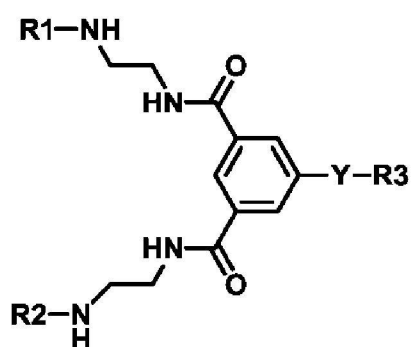
可分別依序製造L1-苯環單元結構、L2-苯環單元結構及X-苯環單元結構，較佳為合成L1-苯環單元結構及L2-苯環單元結構後鍵結X-苯環單

元結構。尤其是關於具有寡核苷酸部分之X，較佳為於接近合成糖配體複合體之最終步驟時導入至化合物內。

於本發明中，可獲得下述式8～式10所表示之化合物作為合成中間物。

式8：

[化110]



(式8中，

R1及R2分別獨立為氫原子、第三丁氧基羰基(Boc基)、苄氧基羰基(Z基)、9-苄基甲基氧基羰基(Fmoc基)、-CO-R4、或-CO-B4-[(P9-Q8)<sub>q7</sub>-T3-L3]<sub>p3</sub>，

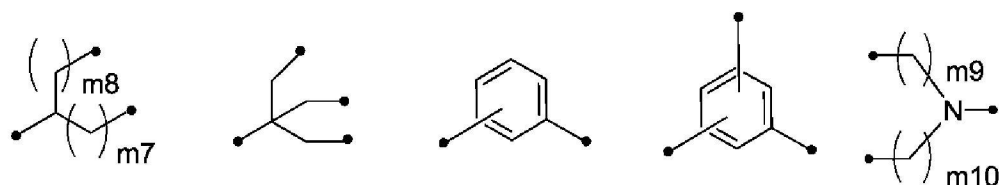
P9及T3分別獨立，不存在或者為-CO-、-NH-、-O-、-S-、-O-CO-、-S-CO-、-NH-CO-、-CO-O-、-CO-S-或-CO-NH-，

Q8不存在或者為經取代或未經取代之碳數1～12之伸烷基或-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n1</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-，n1為0～99之整數，

B4分別獨立為鍵結鍵或下述式8-1所表示之任一結構，各結構中之末端之黑圓點分別為與羰基或P9之鍵結點，m7、m8、m9及m10分別獨立為0～10之整數，

式8-1：

[化111]



$p_3$  為 1、2 或 3 之整數， $q_7$  為 0~10 之整數，

L3 為糖配體，

Y 為  $-\text{O}-(\text{CH}_2)_{m_{11}}-\text{NH}-$  及  $-\text{NH}-\text{CO}-(\text{CH}_2)_{m_{12}}-\text{NH}-$ ， $m_{11}$  及  $m_{12}$  分別獨立為 1~10 之整數，

R3 為氫原子、第三丁氧基羰基、苄氧基羰基、9-芡基甲基氧基羰基、 $-\text{CO}-\text{R}_4$ 、 $-\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{n_2}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}_3$ 、或  $-\text{CO}-\text{Q}_9-\text{B}_5-(\text{Q}_{10}-\text{P}_{10})_{q_8}-\text{X}_1$ ， $n_2$  為 0~99 之整數，

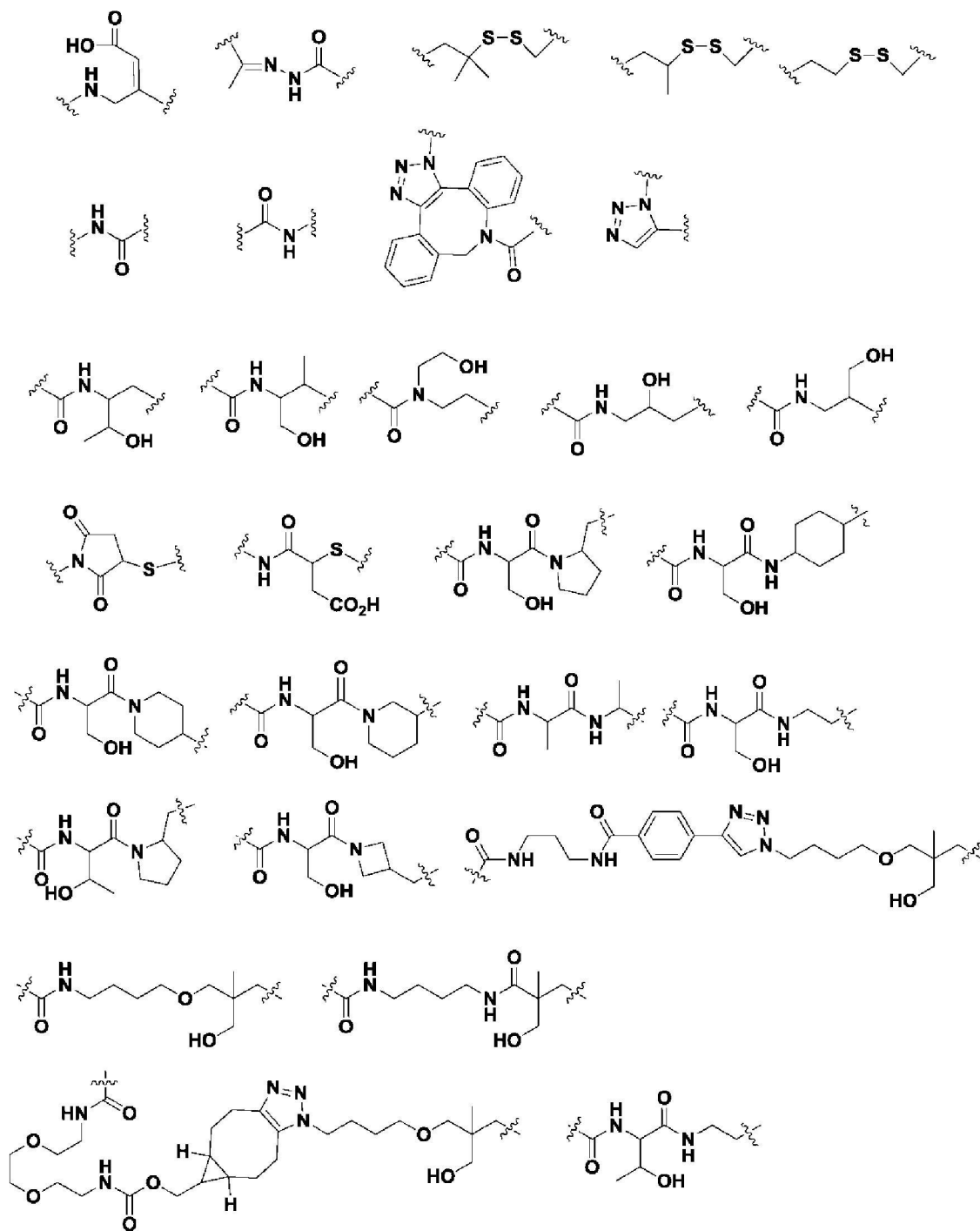
P10 不存在或者為  $-\text{CO}-$ 、 $-\text{NH}-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{O}-\text{CO}-$ 、 $-\text{S}-\text{CO}-$ 、 $-\text{NH}-\text{CO}-$ 、 $-\text{CO}-\text{O}-$ 、 $-\text{CO}-\text{S}-$  或  $-\text{CO}-\text{NH}-$ ，

Q9 及 Q10 分別獨立，不存在或者為經取代或未經取代之碳數 1~12 之伸烷基或  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{n_3}-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ， $n_3$  為 0~99 之整數，

B5 為下述式 8-2 所表示之任一結構，虛線分別意指與 Q9 及 Q10 之鍵結鍵，

式8-2：

[化112]



q8為0~10之整數，

X1為氫原子或固相載體，

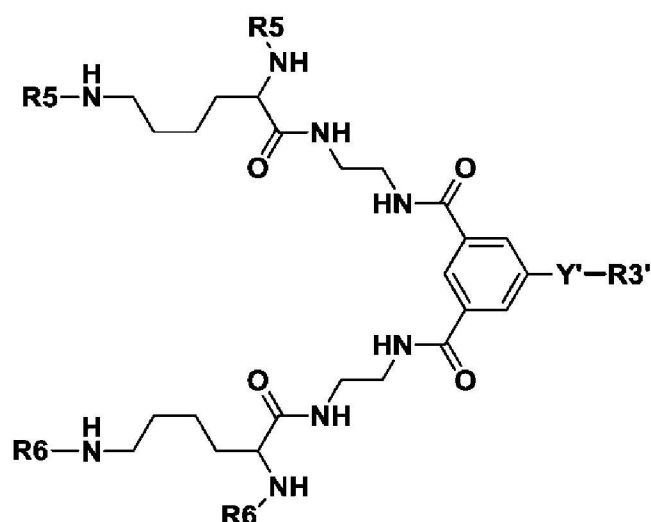
R4為經選自由經第三丁氧基羰基、苄氧基羰基、9-芴基甲基氧基羰基取代或未經取代之胺基、羧基、順丁烯二醯亞胺基、及芳烷基氧基羰基所組成之群中之1個或2個取代基所取代之碳數2~10之烷基)

第 94 頁(發明說明書)

於本發明中，可獲得下述式9所表示之化合物作為合成中間物。

式9：

[化113]



(式9中，

R5及R6分別獨立為氫原子、第三丁氧基羰基、苄氧基羰基、9-苄基甲基氧基羰基、-CO-R4'、或-CO-Q11-(P11-Q11')<sub>q9</sub>-T4-L4，

P11及T4分別獨立，不存在或者為-CO-、-NH-、-O-、-S-、-O-CO-、-S-CO-、-NH-CO-、-CO-O-、-CO-S-或-CO-NH-，

Q11及Q11'不存在或者為經取代或未經取代之碳數1~12之伸烷基或-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n4</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-，n4為0~99之整數，

q9為0~10之整數，

L4為糖配體，

Y'為-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>m11'</sub>-NH-及-NH-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>m12'</sub>-NH-，m11'及m12'分別獨立為1~10之整數，

R3'為氫原子、第三丁氧基羰基、苄氧基羰基、9-苄基甲基氧基羰

第 95 頁(發明說明書)

基、 $-\text{CO-R4}'$ 、 $-\text{CO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{n2}'-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}_3$ 、或 $-\text{CO-Q9}'-\text{B5}'-(\text{Q10}'-\text{P10}')_{q8}'-\text{X1}'$ ， $n2'$ 為0~99之整數，

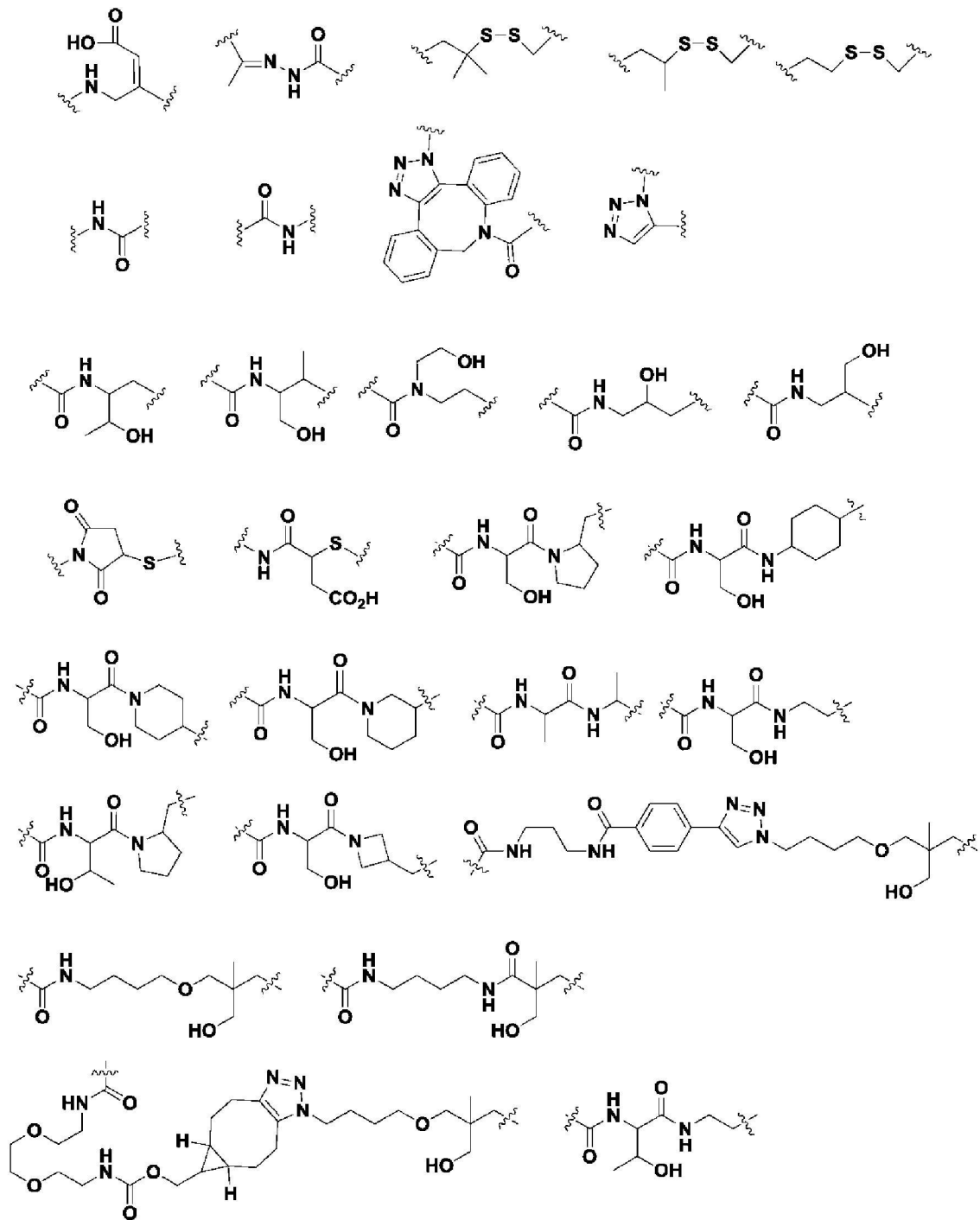
$\text{P10}'$ 不存在或者為 $-\text{CO}-$ 、 $-\text{NH}-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{O-CO}-$ 、 $-\text{S-CO}-$ 、 $-\text{NH-CO}-$ 、 $-\text{CO-O}-$ 、 $-\text{CO-S-}$ 或 $-\text{CO-NH-}$ ，

$\text{Q9}'$ 及 $\text{Q10}'$ 分別獨立，不存在或者為經取代或未經取代之碳數1~12之伸烷基或 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{n3}'-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ， $n3'$ 為0~99之整數，

$\text{B5}'$ 為下述式9-1所表示之任一結構，虛線分別意指與 $\text{Q9}'$ 及 $\text{Q10}'$ 之鍵結鍵，

式9-1：

[化114]



q8'為0~10之整數，

X1'為氫原子或固相載體，

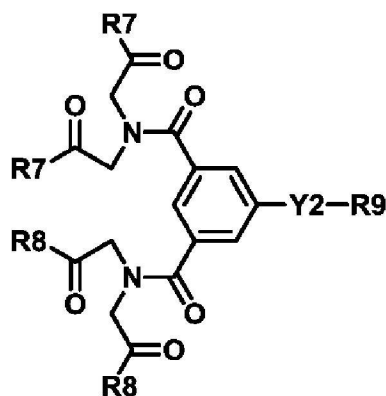
R4'為經選自由經第三丁氧基羰基、苄氧基羰基、9-芴基甲基氧基羰基取代或未經取代之胺基、羧基、順丁烯二醯亞胺基、及芳烷基氧基羰基所組成之群中之1個或2個取代基所取代之碳數2~10之烷基)

第 97 頁(發明說明書)

於本發明中，可獲得下述式10所表示之化合物作為合成中間物。

式10：

[化115]



式10中，

R7及R8分別獨立為羥基、第三丁氧基、苄氧基、-NH-R10、或-NH-Q12-(P12-Q12')<sub>q10</sub>-T4-L4，

P12及T4分別獨立，不存在或者為-CO-、-NH-、-O-、-S-、-O-CO-、-S-CO-、-NH-CO-、-CO-O-、-CO-S-或-CO-NH-，

Q12及Q12'不存在或者為經取代或未經取代之碳數1~12之伸烷基或-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n2</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-，n2為0~99之整數，

L4為糖配體，

Y2為-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>m9</sub>-NH-及-NH-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>m10</sub>-NH-，m9、m10分別獨立為1~10之整數，

q10為0~10之整數，

R9為氫原子、第三丁氧基羰基、苄氧基羰基、9-芴基甲基氧基羰基、-CO-R10、-CO-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n6</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>、或-CO-Q13-B6-(Q14-

P13)<sub>q11</sub>-X2，n6為0~99之整數，

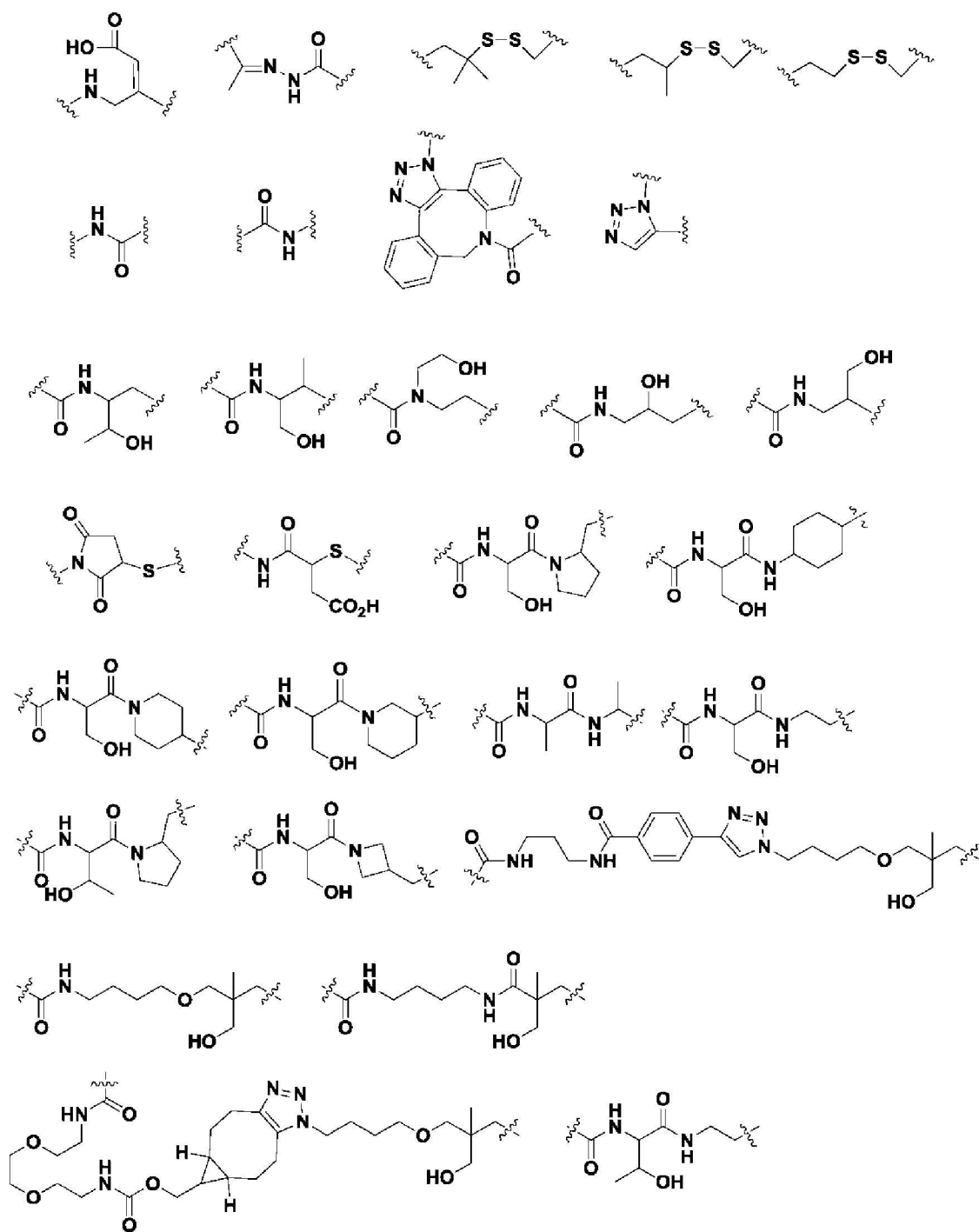
P13不存在或者為-CO-、-NH-、-O-、-S-、-O-CO-、-S-CO-、-NH-CO-、-CO-O-、-CO-S-或-CO-NH-，

Q13及Q14分別獨立，不存在或者為經取代或未經取代之碳數1~12之伸烷基或-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n7</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-，n7為0~99之整數，

B6為下述式10-1所表示之任一結構，虛線分別意指與Q13及Q14之鍵結鍵，

式10-1：

[化116]



q11為0~10之整數，

X2為氫原子或固相載體，

R10為經選自由經第三丁氧基羰基、苄氧基羰基、9-芴基甲基氧基羰基取代或未經取代之胺基、羧基、順丁烯二醯亞胺基、及芳烷基氧基羰基所組成之群中之1個或2個取代基所取代之碳數2~10之烷基)

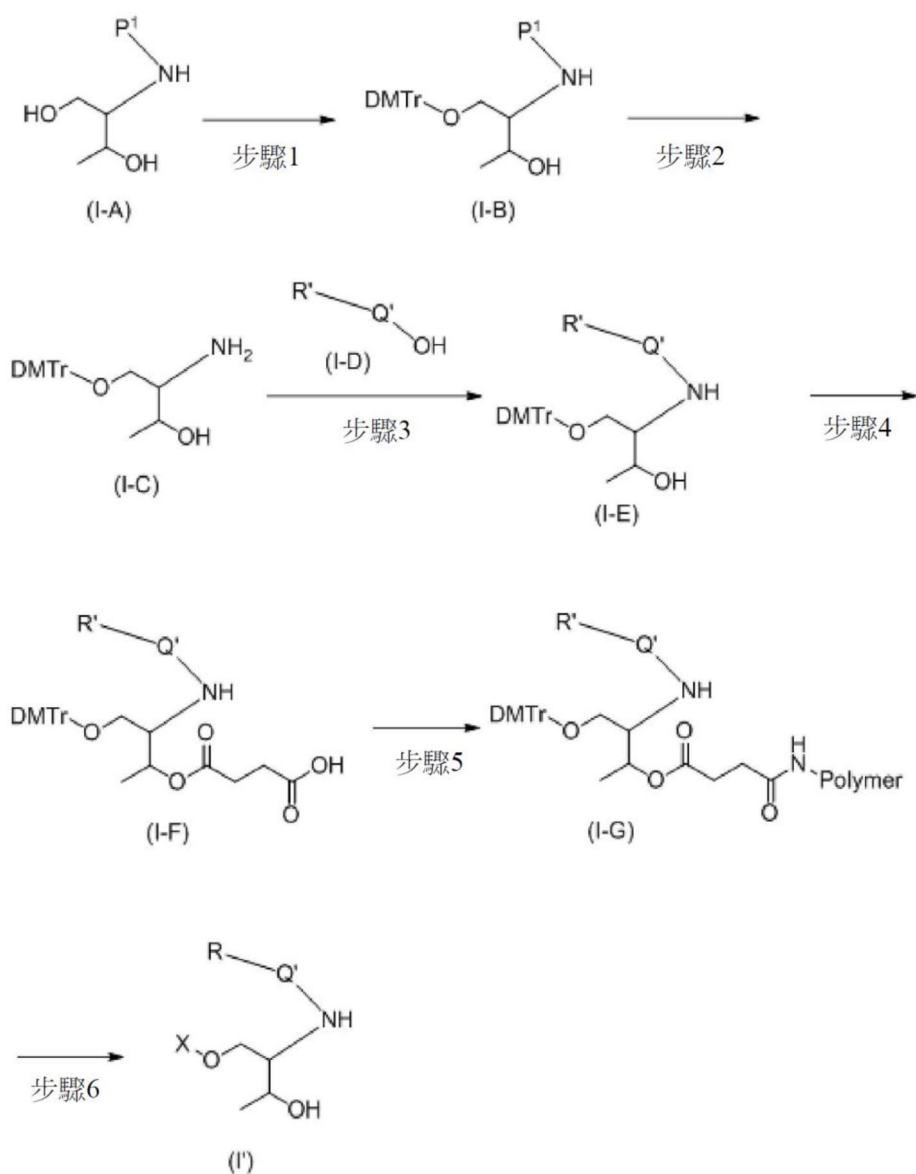
第 100 頁(發明說明書)

以下，關於本發明，將製造方法作為一例進行例示。再者，於以下關於製造方法1～製造方法17之記載中，存在使用與本發明之核酸衍生物等中之式1～式12所表示之化合物中相同之符號作為表示基之符號者，但兩者係分開理解，並非藉由對製造方法1～製造方法12所記載之基之說明限定性地解釋本發明。又，關於本發明中之核酸衍生物，於製造方法1～製造方法17中將表示寡核苷酸之X記載為-O-X。

#### 製造方法1

關於本發明中之核酸衍生物，作為具有式(I')所表示之部分結構之化合物之製造方法，可例示其製造方法。

[化117]



(式中，P1為Fmoc等可藉由鹼基進行去保護之保護基，DMTr表示p,p'-二甲氧基三苯甲基，R表示糖配體-連繫單元，R'表示R中之糖配體之各羥基由乙醯基等可藉由鹼基進行去保護之保護基所保護之基，Polymer表示固相載體，Q'為-CO-)

#### 步驟1

化合物(I-B)可藉由在吡啶等溶劑中，視需要於共溶劑之存在下，在0℃與100℃之間之溫度下，使化合物(I-A)與p,p'-二甲氧基三苯氯甲烷反應5分鐘～100小時而製造。

作為共溶劑，例如可列舉：甲醇、乙醇、二氯甲烷、氯仿、1,2-二氯乙烷、甲苯、乙酸乙酯、乙腈、二乙醚、四氫呋喃、1,2-二甲氧基乙烷、二噁烷、N,N-二甲基甲醯胺(DMF)、N,N-二甲基乙醯胺、N-甲基吡咯啉酮、吡啶、水等，該等可單獨或混合使用。

## 步驟2

化合物(I-C)可藉由在不存在溶劑之情況下或於溶劑中，於1~1000當量之二級胺存在下，在室溫與200°C之間之溫度下使化合物(I-B)反應5分鐘~100小時而製造。

作為溶劑，例如可列舉：甲醇、乙醇、二氯甲烷、氯仿、1,2-二氯乙烷、甲苯、乙酸乙酯、乙腈、二乙醚、四氫呋喃、1,2-二甲氧基乙烷、二噁烷、N,N-二甲基甲醯胺(DMF)、N,N-二甲基乙醯胺、N-甲基吡咯啉酮、吡啶、水等，該等可單獨或混合使用。

作為二級胺，例如可列舉：二乙基胺、哌啶等。

## 步驟3

化合物(1-E)可藉由在不存在溶劑之情況下或於溶劑中，於1~30當量之鹼、縮合劑及視需要0.01~30當量之添加劑之存在下，在室溫與200°C之間之溫度下使化合物(I-C)與化合物(I-D)反應5分鐘~100小時而製造。

作為溶劑，可列舉步驟2所例示者。

作為鹼，例如可列舉：碳酸銫、碳酸鉀、氫氧化鉀、氫氧化鈉、甲醇鈉、第三丁醇鉀、三乙胺、二異丙基乙基胺、N-甲基咪啉、吡啶、1,8-二氮雜雙環[5.4.0]-7-十一烯(DBU)、N,N-二甲基-4-胺基吡啶(DMAP)等。

作為縮合劑，例如可列舉：1,3-二環己碳二醯亞胺(DCC)、1-乙基-3-(3-二甲基胺基丙基)碳二醯亞胺鹽酸鹽(EDC)、羰基二咪唑、苯并三唑-1-基氧基三(二甲基胺基)磷六氟磷酸鹽、(苯并三唑-1-基氧基)三吡咯啉基磷六氟磷酸鹽、O-(7-氮雜苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸鹽(HATU)、O-(苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸(HBTU)、碘化2-氯-1-甲基吡啶鎊等。

作為添加劑，例如可列舉：1-羥基苯并三唑(HOBT)、4-二甲基胺基吡啶(DMAP)等。

化合物(I-D)可藉由公知之方法(例如參照 *Journal of American Chemical Society*, 136, 16958, (2014))或依照其之方法而獲得。

#### 步驟4

化合物(I-F)可藉由在溶劑中，於1~30當量之鹼存在下，在室溫與200°C之間之溫度下使化合物(I-E)與丁二酸酐反應5分鐘~100小時而製造。

作為溶劑，可列舉步驟2所例示者。

作為鹼，可列舉步驟3所例示者。

#### 步驟5

化合物(I-G)可藉由在不存在溶劑之情況下或於溶劑中，於1~30當量之鹼、縮合劑及視需要0.01~30當量之添加劑之存在下，在室溫與200°C之間之溫度下使化合物(I-F)與末端經胺基化之固相載體反應5分鐘~100小時後，於室溫與200°C之間之溫度下與乙酸酐/吡啶溶液反應5分鐘~100小時而製造。

作為溶劑，可列舉步驟2所例示者。

作為鹼基、縮合劑及添加劑，分別可列舉步驟3所例示者。

作為經胺基化之固相載體，例如可列舉長鏈烷基胺細孔性玻璃(LCAA-CPG)等，該等可以市售品之形式獲得。

#### 步驟6

具有式(I')所表示之糖配體-連繫-分支單元之核酸複合體可藉由使用化合物(I-G)，利用公知之寡核苷酸化學合成法將相對應之核苷酸鏈伸長後，進行自固相之脫離、保護基之去保護及精製而製造。

作為公知之寡核苷酸化學合成法，可列舉亞磷醯胺法、硫代磷酸酯法、磷酸三酯法、CEM法(參照Nucleic Acids Research, 35, 3287(2007))等，例如可藉由ABI3900高產量核酸合成機(Applied Biosystems公司製造)進行合成。

自固相之脫離、去保護可藉由在寡核苷酸化學合成後，於溶劑中或於不存在溶劑之情況下，在-80°C至200°C之間之溫度下，以鹼處理10秒至72小時而製造。

作為鹼，例如可列舉：氨、甲基胺、二甲基胺、乙基胺、二乙基胺、異丙基胺、二異丙基胺、哌啶、三乙胺、乙二胺、1,8-二氮雜雙環[5.4.0]-7-十一烯(DBU)、碳酸鉀等。

作為溶劑，可列舉：水、甲醇、乙醇、THF等。

寡核苷酸之精製可藉由C18逆相管柱或陰離子交換管柱、較佳為組合上文所述2種方法而進行。精製後之核酸複合體純度較理想為設為90%以上、較佳為95%以上。

又，於上述步驟3中，視需要亦可藉由將化合物(I-D)分割為兩個單元，分2個階段與化合物(I-C)縮合而進行。具體而言，例如於R-Q'為R-

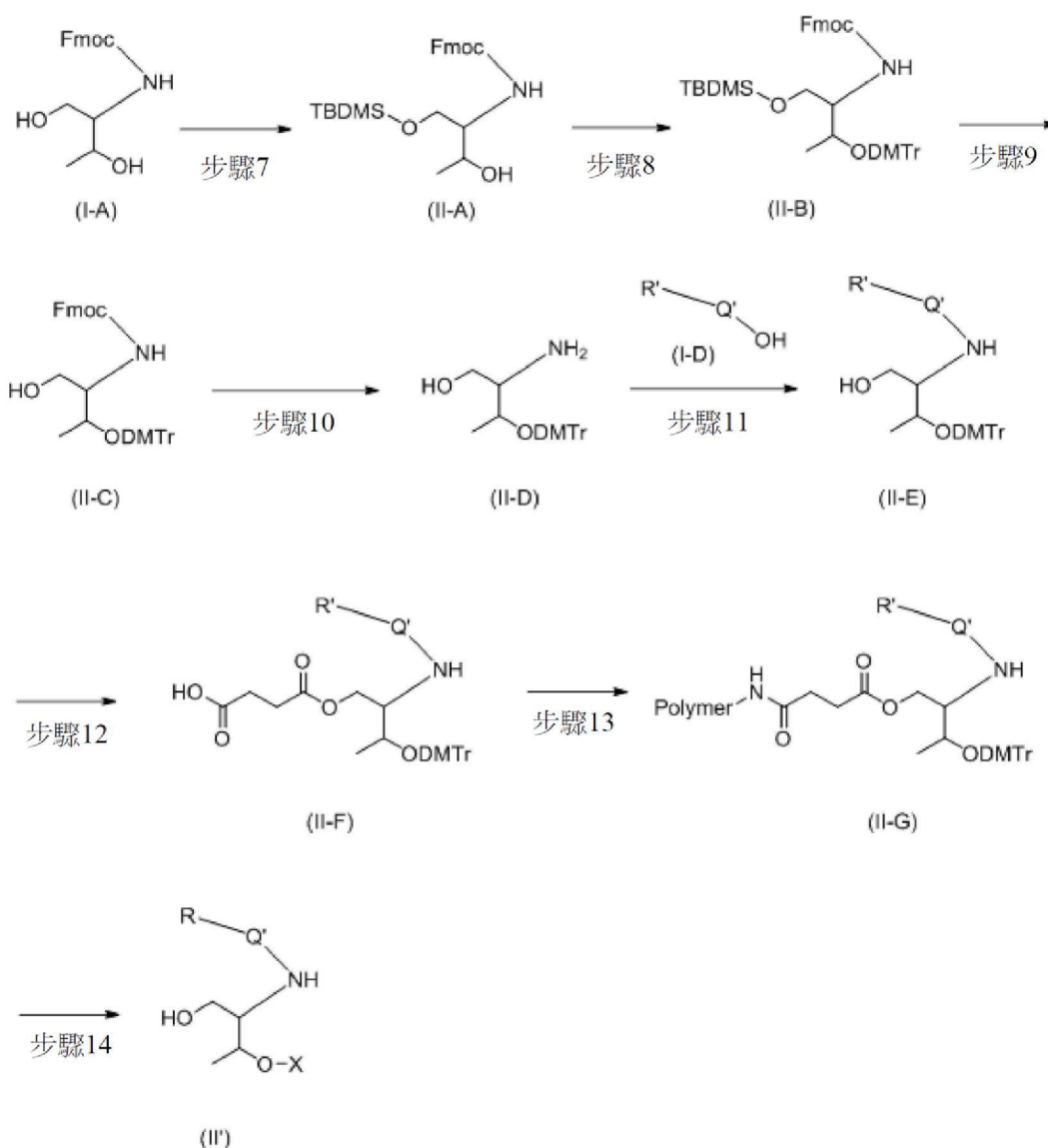
NH-CO-Q4'-CO-之情形時(Q4'為經取代或未經取代之碳數1~12之伸烷基)，於步驟3中，藉由與步驟3同樣之方法使化合物(I-C)與 $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{-O-CO-Q4'-CO-OH}$ (Q4'與上述含義相同)進行縮合，於乙醇或水等溶劑中，藉由氫氧化鋰等鹼將所獲得之化合物之乙酯水解後，進而使其與 $\text{R'-NH}_2$ (R'與上述含義相同)進行縮合，藉此可獲得目標化合物。再者， $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{-O-CO-Q4'-CO-OH}$ (Q4'與上述含義相同)及 $\text{R'-NH}_2$ (R'與上述含義相同)可藉由公知之方法(例如參照Journal of American Chemical Society, 136, 16958(2014))或依照其之方法而獲得。此處，於Q4'中，經取代或未經取代之碳數1~12之伸烷基中之取代基及伸烷基部分與上述相同。

例示Q為-CO-之情形，但關於Q不為-CO-之情形之化合物，亦可藉由適當變更Q之結構，並且藉由與上述同樣之方法、公知之方法或將該等組合，適當變更反應條件而製備。

## 製造方法2

關於本發明中之核酸衍生物，作為具有式(II')所表示之部分結構之化合物之製造方法，可例示其製造方法。

[化118]



(式中，DMTr、R、R'、X、Q'、及Polymer與上述含義相同。

TBDMS表示第三丁基二甲基矽烷基，Fmoc表示9-芴基甲基氧基羰基)

步驟7

化合物(II-A)可藉由在N,N-二甲基甲醯胺(DMF)等溶劑中，較佳為於2當量之鹼之存在下，在0°C ~ 100°C之間之溫度下，使化合物(I-A)、第三丁基二甲基氯矽烷及二甲基胺基吡啶反應5分鐘~100小時而製造。

作為鹼，可列舉製造方法1之步驟3所例示者。

步驟8

化合物(II-B)可使用化合物(II-A)，在與製造方法1之步驟1同樣之條件下製造。

#### 步驟9

化合物(II-C)可藉由在溶劑中，於室溫與200°C之間之溫度下，使化合物(II-B)與氟化正四丁基銨(TBAF)反應5分鐘~100小時而製造。

作為溶劑，可列舉步驟2所例示者。

#### 步驟10

化合物(II-D)可使用化合物(II-C)，在與製造方法1之步驟2同樣之條件下製造。

#### 步驟11

化合物(II-E)可使用化合物(II-D)及化合物(I-D)，在與製造方法1之步驟3同樣之條件下製造。

#### 步驟12~14

化合物(II')可使用化合物(II-E)，在與製造方法1之步驟4~步驟6同樣之條件下製造。

又，於上述步驟11中，視需要亦可藉由將化合物(I-D)分割為兩個單元，分2個階段與化合物(II-C)縮合而進行。具體而言，例如於R-Q'為-NH-CO-Q4'-CO-之情形時(Q4'為經取代或未經取代之碳數1~12之伸烷基)，於步驟11中，藉由與步驟11同樣之方法使化合物(II-C)與CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>-O-CO-Q4'-CO-OH(Q4'與上述含義相同)進行縮合，於乙醇或水等溶劑中，藉由氫氧化鋰等鹼將所獲得之化合物之乙酯水解後，進而使其與R'-NH<sub>2</sub>(R'與上述含義相同)進行縮合，藉此可獲得目標化合物。再者，CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>-O-CO-Q4'-CO-OH(Q4'與上述含義相同)及R'-NH<sub>2</sub>(R'與上述含義

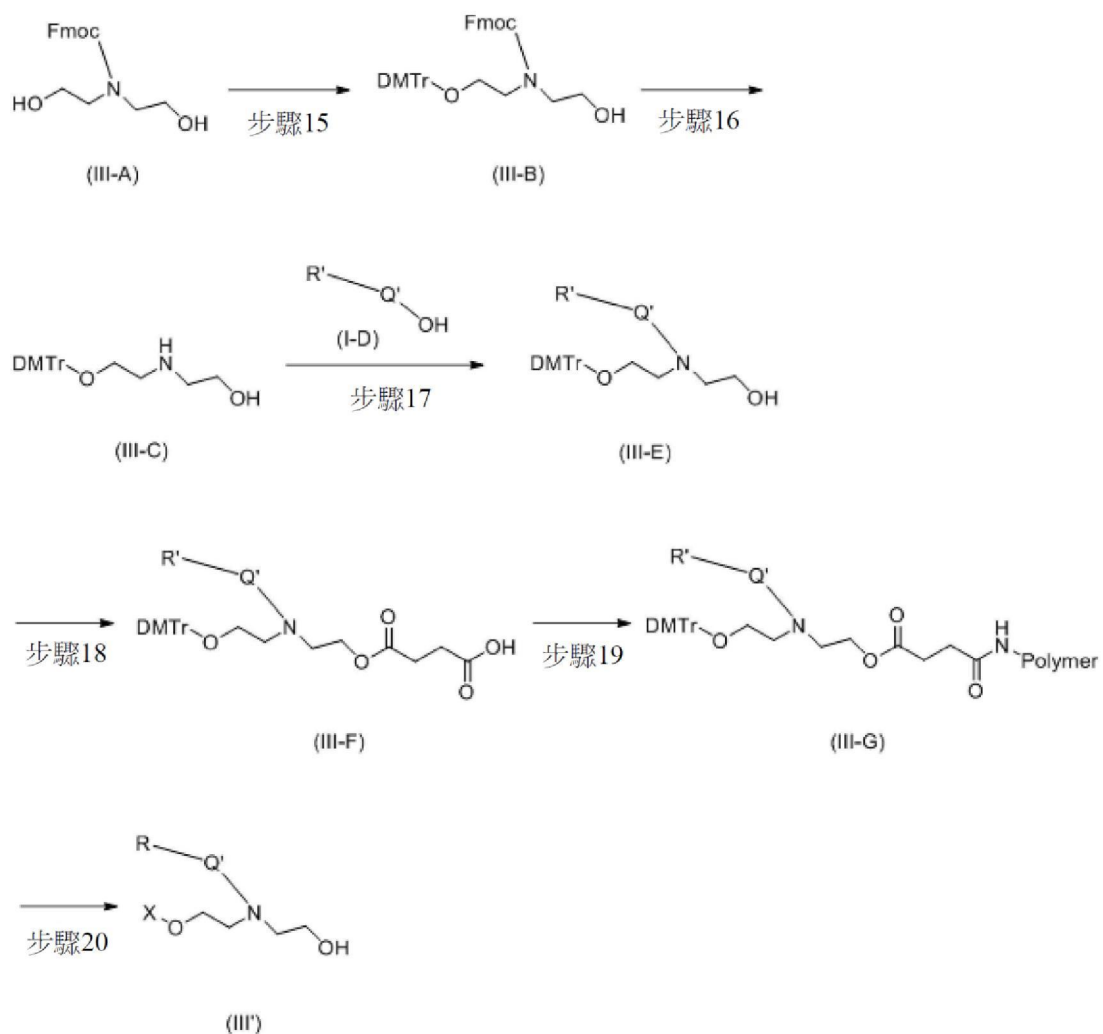
相同)可藉由公知之方法(例如參照Journal of American Chemical Society, 136, 16958(2014))或依照其之方法而獲得。

例示Q為-CO-之情形，但關於Q不為-CO-之情形之化合物，亦可藉由適當變更Q之結構，並且藉由與上述同樣之方法、公知之方法或將該等組合，適當變更反應條件而製備。

### 製造方法3

關於本發明中之核酸衍生物，作為具有式(III')所表示之部分結構之化合物之製造方法，可例示其製造方法。

#### [化119]



(式中，DMTr、Fmoc、R、R'、Q'、X及Polymer與上述含義相同)

化合物(III')可使用化合物(III-A)，在與製造方法1之步驟1至步驟6同樣之條件下製造。再者，化合物(III-A)可以市售品之形式獲得。

#### 步驟15

化合物(III-B)可使用化合物(III-A)，在與製造法1之步驟1同樣之條件下製造。

化合物(III-A)可以市售品之形式購入。

#### 步驟16

化合物(III-C)可使用化合物(III-B)，在與製造法1之步驟2同樣之條件下製造。

#### 步驟17

化合物(III-E)可使用化合物(III-C)，在與製造法1之步驟3同樣之條件下製造。

#### 步驟18～20

化合物(III')可使用化合物(III-E)，在與製造方法1之步驟4～步驟6同樣之條件下製造。

又，於上述步驟17中，視需要亦可藉由將化合物(I-D)分割為兩個單元，分2個階段與化合物(III-C)縮合而進行。具體而言，例如於R-Q'為-NH-CO-Q4'-CO-之情形時(Q4'為經取代或未經取代之碳數1～12之伸烷基)，於步驟17中，藉由與步驟17同樣之方法使化合物(III-C)與CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>-O-CO-Q4'-CO-OH(Q4'與上述含義相同)縮合，於乙醇或水等溶劑中，藉由氫氧化鋰等鹼將所獲得之化合物之乙酯水解後，進而使其與R'-NH<sub>2</sub>(R'與上述含義相同)進行縮合，藉此可獲得目標化合物。再者，CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>-O-

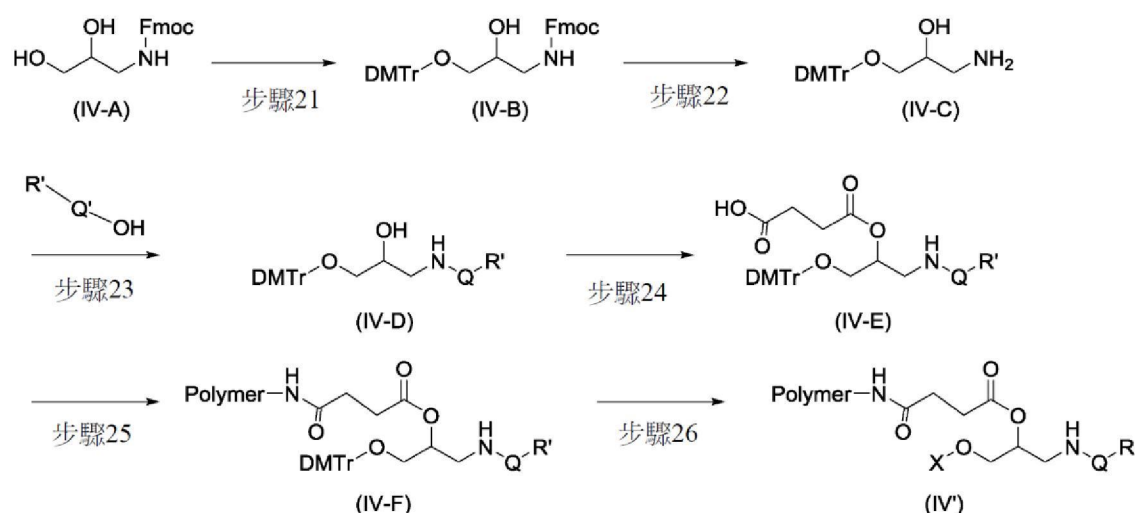
CO-Q4'-CO-OH(Q4'與上述含義相同)及R'-NH<sub>2</sub>(R'與上述含義相同)可藉由公知之方法(例如參照 Journal of American Chemical Society, 136, 16958(2014))或依照其之方法而獲得。

例示Q為-CO-之情形，但關於Q不為-CO-之情形之化合物，亦可藉由適當變更Q之結構，並且藉由與上述同樣之方法、公知之方法或將該等組合，適當變更反應條件而製備。

#### 製造方法4

關於本發明中之核酸衍生物，作為具有式(IV')所表示之部分結構之化合物之製造方法，可例示其製造方法。

#### [化120]



(式中，DMTr、Fmoc、R、R'、Q'、X及Polymer與上述含義相同)

化合物(IV')可使用化合物(IV-A)，在與製造方法1之步驟1至步驟6同樣之條件下製造。再者，化合物(IV-A)可以市售品之形式獲得。

又，於上述步驟23中，視需要亦可藉由將化合物(I-D)分割為兩個單元，分2個階段與化合物(IV-C)縮合而進行。具體而言，例如於R'-Q'為-

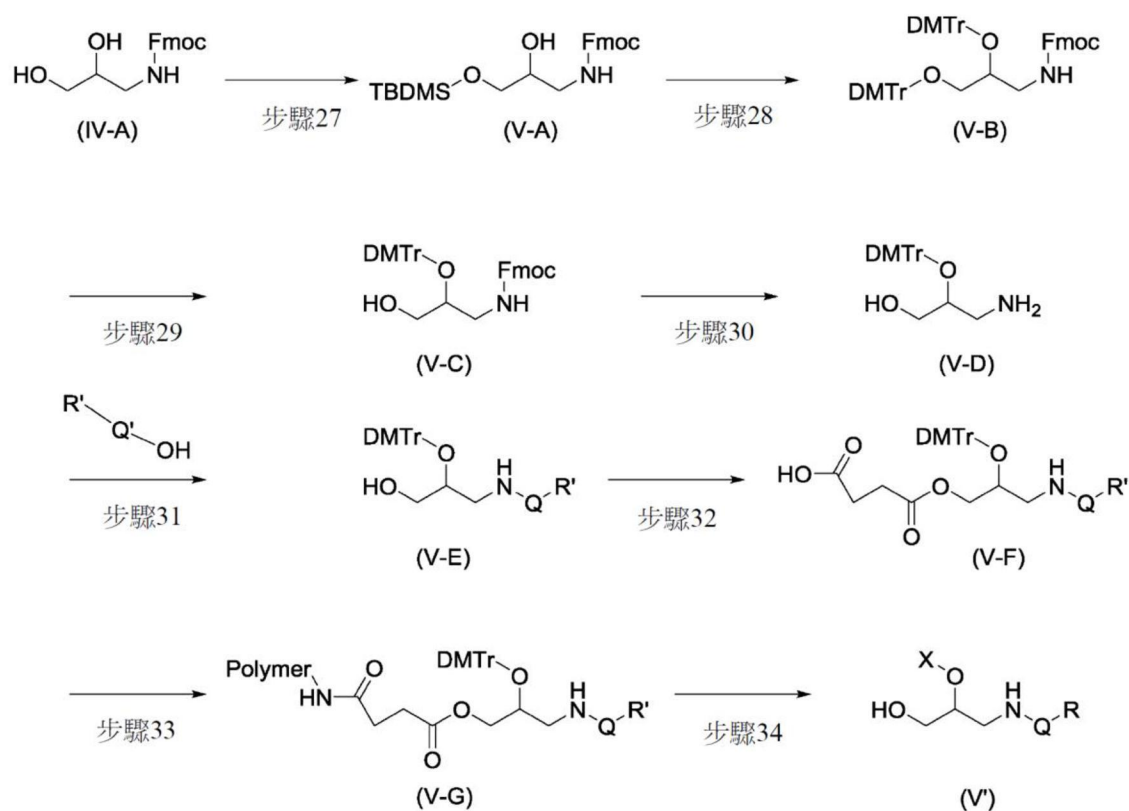
NH-CO-Q4'-CO-之情形時(Q4'為經取代或未經取代之碳數1~12之伸烷基)，於步驟23中，藉由與步驟23同樣之方法使化合物(IV-C)與 $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{-O-CO-Q4'-CO-OH}$ (Q4'與上述含義相同)縮合，於乙醇或水等溶劑中，藉由氫氧化鋰等鹼將所獲得之化合物之乙酯水解後，進而使其與 $\text{R}'\text{-NH}_2$ (R'與上述含義相同)進行縮合，藉此可獲得目標化合物。再者， $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{-O-CO-Q4'-CO-OH}$ (Q4'與上述含義相同)及 $\text{R}'\text{-NH}_2$ (R'與上述含義相同)可藉由公知之方法(例如參照 *Journal of American Chemical Society*, 136, 16958(2014))或依照其之方法而獲得。

例示Q為-CO-之情形，但關於Q不為-CO-之情形之化合物，亦可藉由適當變更Q之結構，並且藉由與上述同樣之方法、公知之方法或將該等組合，適當變更反應條件而製備。

#### 製造方法5

關於本發明中之核酸衍生物，作為具有式(V')所表示之部分結構之化合物之製造方法，可例示其製造方法。

[化121]



(式中，DMTr、R、R'、X、Q'、TBDMS、Fmoc及Polymer與上述含義相同)

化合物(V')可使用化合物(IV-A)，在與製造方法2之步驟1至步驟7同樣之條件下製造。再者，化合物(IV-A)可以市售品之形式獲得。

又，於上述步驟31中，視需要亦可藉由將化合物(I-D)分割為兩個單元，分2個階段與化合物(V-D)縮合而進行。具體而言，例如於R'-Q'為-NH-CO-Q4'-CO-之情形時(Q4'為經取代或未經取代之碳數1~12之伸烷基)，於步驟31中，藉由與步驟31同樣之方法使化合物(V-D)與CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>-O-CO-Q4'-CO-OH(Q4'與上述含義相同)進行縮合，於乙醇或水等溶劑中，藉由氫氧化鋰等鹼將所獲得之化合物之乙酯水解後，進而使其與R'-NH<sub>2</sub>(R'與上述含義相同)進行縮合，藉此可獲得目標化合物。再者，CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>-O-CO-Q4'-CO-OH(Q4'與上述含義相同)及R'-NH<sub>2</sub>(R'與上述含義

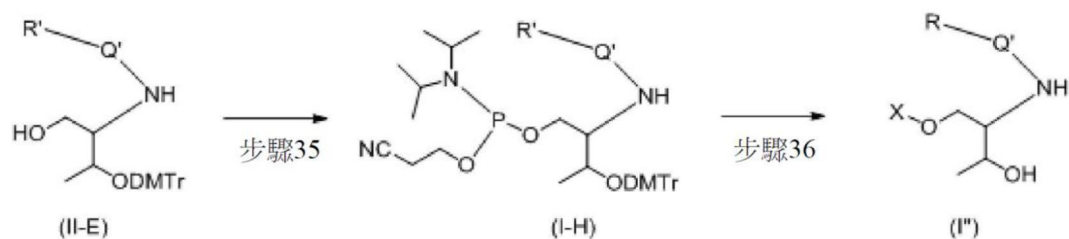
相同)可藉由公知之方法(例如參照Journal of American Chemical Society, 136, 16958(2014))或依照其之方法而獲得。

例示Q為-CO-之情形，但關於Q不為-CO-之情形之化合物，亦可藉由適當變更Q-OH之結構，並且藉由與上述同樣之方法、公知之方法或將該等組合，適當變更反應條件而製備。

### 製造方法6

以下例示於寡核苷酸之5'末端鍵結有糖配體-連繫-分支單元之本發明之核酸複合體之製造方法。

[化122]



(式中，R、R'、Q'、DMTr及X與上述含義相同)

### 步驟35

化合物(I-H)可藉由在不存在溶劑之情況下或於溶劑中，於鹼基及反應促進劑共存下，在室溫與200°C之間之溫度下使化合物(II-E)與2-氰乙基-N,N,N',N'-四異丙基亞磷醯二胺反應5分鐘~100小時而製造。

作為溶劑，可列舉製造方法1之步驟2所例示者。

作為鹼，可列舉製造方法1之步驟3所例示者。

作為反應促進劑，例如可列舉：1H-四唑、4,5-二氰基咪唑、5-乙硫基四唑、5-苄硫基四唑等，可以市售品之形式購入。

## 步驟36

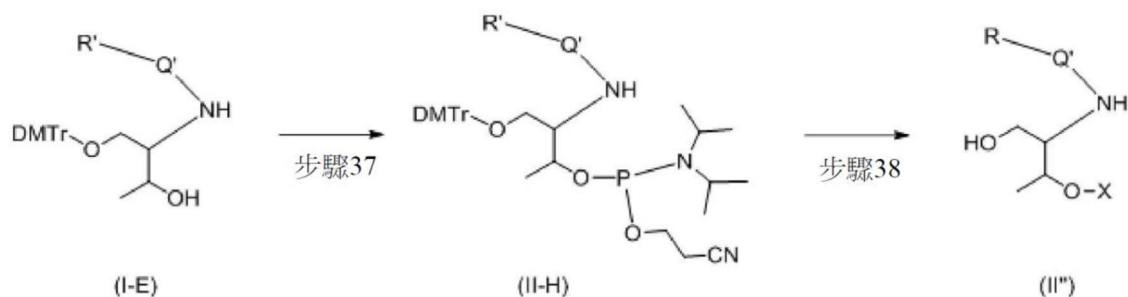
將寡核苷酸鏈伸長，最後使用化合物(I-H)，藉由糖配體-連繫-分支單元修飾寡核苷酸之5'末端後，進行自固相之脫離、保護基之去保護及精製，藉此可製造化合物(I'')。此處，自固相之脫離、保護基之去保護及精製可分別以與製造方法1之步驟7同樣之方式製造。

## 製造方法7

以下例示於寡核苷酸之5'末端鍵結有糖配體-連繫-分支單元之本發明之核酸複合體之製造方法。

可藉由在與製造方法6之步驟35及36同樣之條件下製造。

[化123]



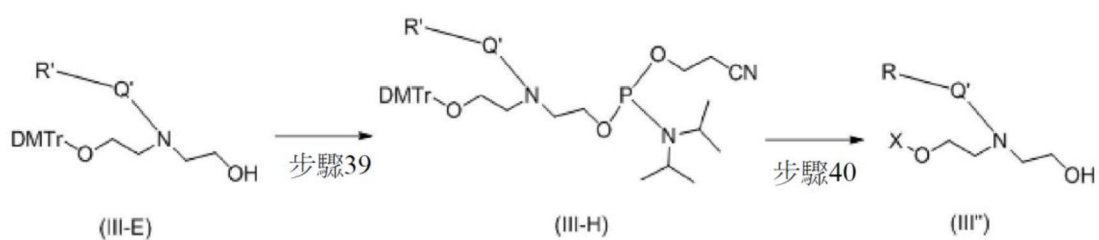
(式中，R、R'、Q'、DMTr及X與上述含義相同)

## 製造方法8

以下例示於寡核苷酸之5'末端鍵結有糖配體-連繫-分支單元之本發明之核酸複合體之製造方法。

可藉由在與製造方法6之步驟35及36同樣之條件下製造。

[化124]



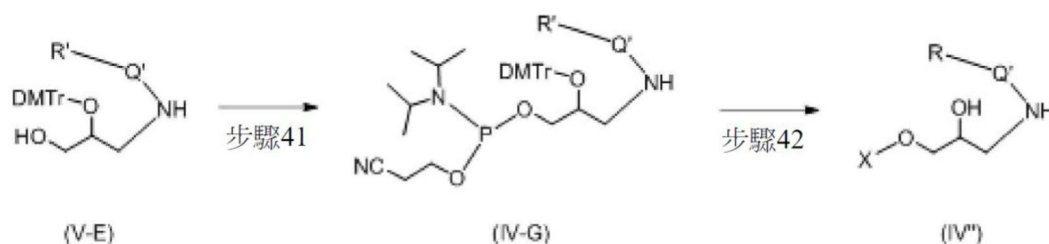
(式中，R、R'、Q'、DMTr及X與上述含義相同)

### 製造方法9

以下例示於寡核苷酸之5'末端鍵結有糖配體-連繫-分支單元之本發明之核酸複合體之製造方法。

可藉由在與製造方法6之步驟35及36同樣之條件下製造。

[化125]



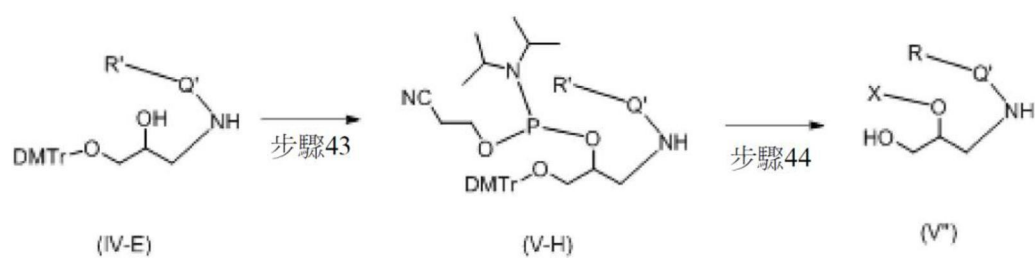
(式中，R、R'、Q'、DMTr及X與上述含義相同)

### 製造方法10

以下例示於寡核苷酸之5'末端鍵結有糖配體-連繫-分支單元之本發明之核酸複合體之製造方法。

可藉由在與製造方法6之步驟35及36同樣之條件下製造。

[化126]



(式中，R、R'、Q'、DMTr及X與上述含義相同)

### 製造方法11

分別將於構成雙鏈核酸之正義鏈之3'末端或5'末端具有糖配體-連繫-分支單元之正義鏈與構成雙鏈核酸之反正義鏈溶解於水或適當之緩衝液中，並加以混合，藉此可獲得具有雙鏈核酸之核酸複合體。

作為緩衝液，例如可列舉：乙酸緩衝液、三羥甲基胺基甲烷緩衝液、檸檬酸緩衝液、磷酸緩衝液、水等，可將該等單獨或混合使用。

作為正義鏈與反正義鏈之混合比，相對於正義鏈1當量，反正義鏈較佳為0.5~2當量，更佳為0.9~1.1當量，進而較佳為0.95當量~1.05當量。

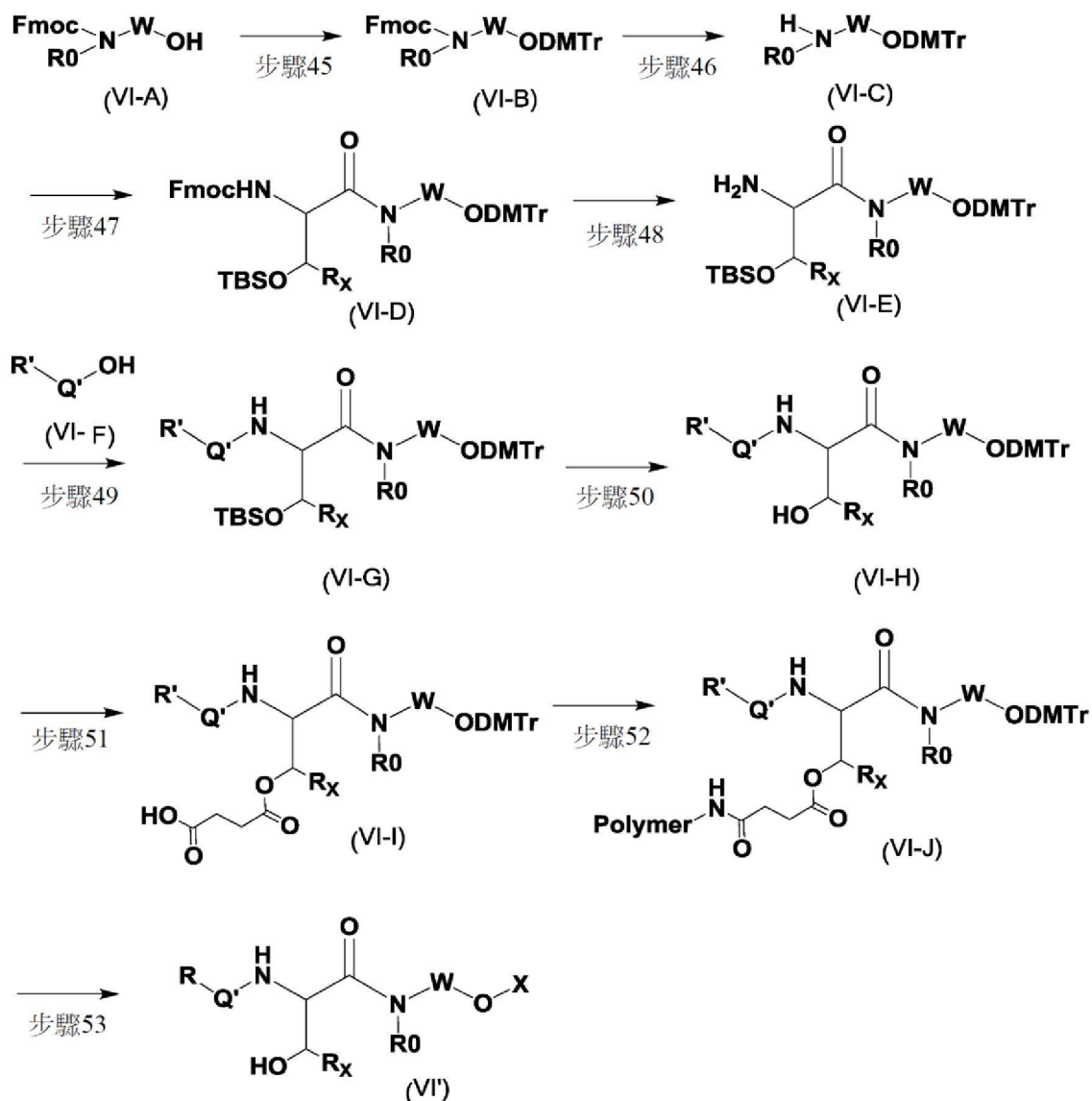
又，將該正義鏈與該反正義鏈加以混合後，亦可適當進行退火處理。退火處理可藉由將正義鏈與反正義鏈之混合物加熱至較佳為50~100℃、更佳為60~100℃、進而較佳為80~100℃後緩冷至室溫而進行。

反正義鏈可依照上述公知之寡核苷酸合成法而獲得。

### 製造方法12

關於本發明中之核酸衍生物，作為具有式(VI')所表示之部分結構之化合物之製造方法，可例示其製造方法。

[化127]



(式中，DMTr、R、R'、X、Q'、Polymer、TBS及Fmoc與上述含義相同，R<sub>0</sub>及R<sub>x</sub>相同或不同，表示氫原子、C<sub>1</sub>~C<sub>10</sub>之伸烷基或C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>之伸環烷基，W為C<sub>1</sub>~C<sub>10</sub>之伸烷基、C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>之伸環烷基，或者可與R<sub>0</sub>一併形成C<sub>4</sub>-C<sub>8</sub>之含氮雜環)

#### 步驟45

化合物(VI-B)可使用化合物(VI-A)，在與製造方法1之步驟1同樣之條件下製造。

化合物(VI-A)可以市售品之形式獲得，或者可藉由公知之方法(例如

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters，第11卷，383-386頁)或依照其之方法而獲得。

#### 步驟46

化合物(VI-C)可使用化合物(VI-B)，在與製造方法1之步驟2同樣之條件下製造。

#### 步驟47

化合物(VI-D)可使用化合物(VI-C)，在與製造方法1之步驟3同樣之條件下製造。

#### 步驟48

化合物(VI-E)可使用化合物(VI-D)，在與製造方法1之步驟2同樣之條件下製造。

#### 步驟49

化合物(VI-G)可使用化合物(VI-E)與化合物(VI-F)，在與製造方法1之步驟3同樣之條件下製造。

#### 步驟50

化合物(VI-H)可使用化合物(VI-G)，在與製造方法2之步驟9同樣之條件下製造。

#### 步驟51～53

化合物(VI')可使用化合物(VI-H)、化合物(VI-I)及化合物(VI-J)，在與製造方法1之步驟4～6同樣之條件下製造。

步驟45～53亦可藉由公知之方法(例如國際公開第2015/105083號所記載之方法)、或依照其之方法實施。

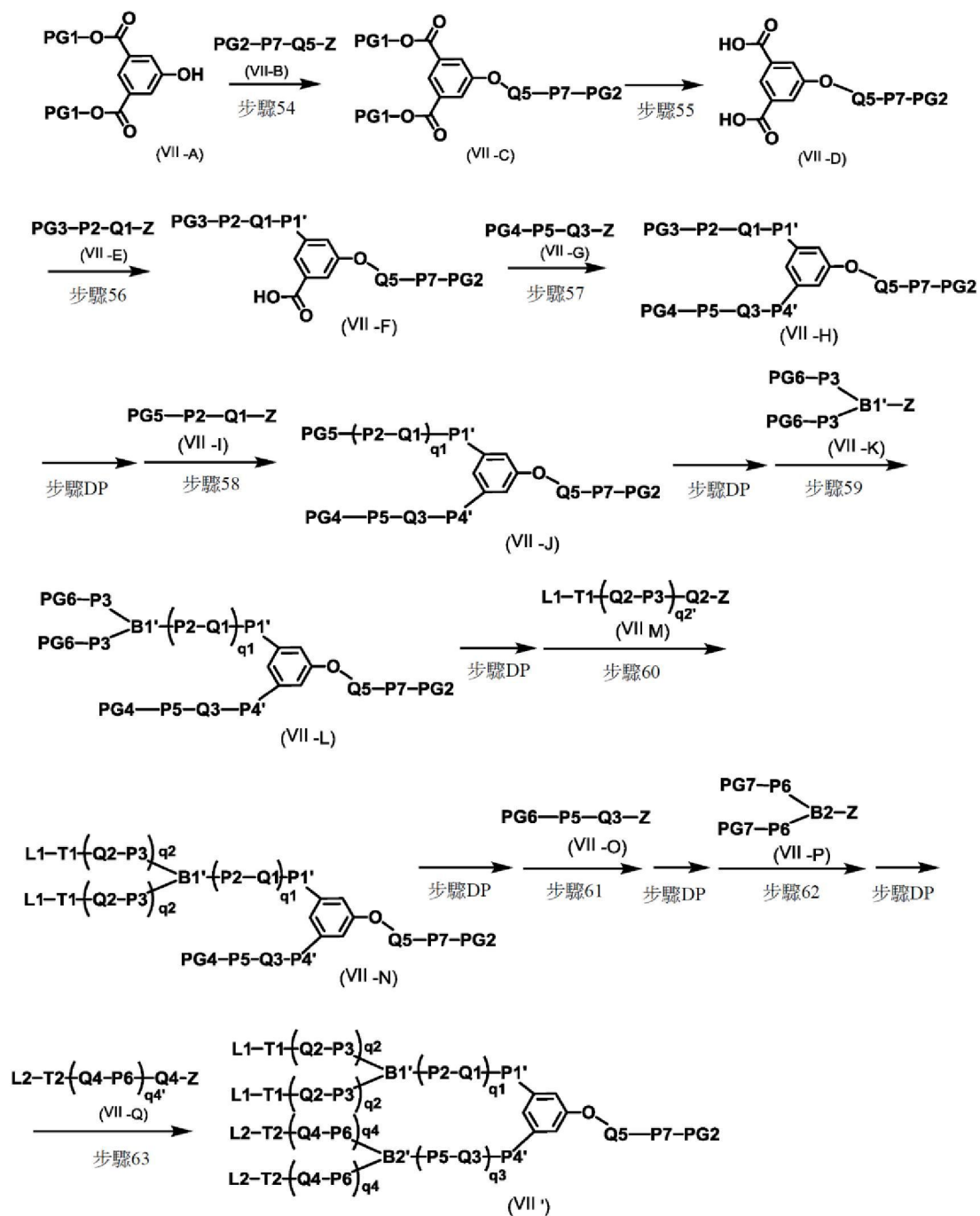
化合物(VI-F)可藉由公知之方法(例如Journal of American Chemical

Society, 136卷, 16958頁, 2014年所記載之方法)、或依照其之方法而獲得。

### 製造方法13

式2中P1及P4為-NH-CO-、-O-CO-或-S-CO-之糖配體-連繫-單元可藉由以下之方法製造。

[化128]

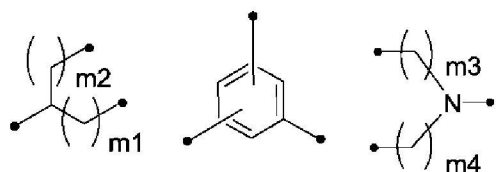


(式中，Q1、Q2、Q3、Q4、Q5、P2、P3、P5、P6、P7、T1、T2、L1、L2、q1、q2、q3及q4分別與上述含義相同，q1'表示較q1小1之整數，q2'表示較q2小1之整數，P1'及P4'分別獨立地表示-CO-O-、-CO-NH-或-CO-S-，Z表示H、OH、NH<sub>2</sub>、SH、氯原子、溴原子、碘原子、甲磺醯氧基、對甲苯磺醯氧基或羧酸，B1'及B2'表示下述式之結構體之任一

者，PG1、PG2、PG3、PG4、PG5、PG6及PG7分別表示適當之保護基)

式：

[化129]



m1、m2、m3或m4分別獨立地表示0~10之整數。

#### 步驟54

化合物(VII-C)可藉由在四氫呋喃等溶劑中，對化合物(VII-A)與化合物(VII-B)添加三苯基膦聚合物載體，於冰浴冷卻下使其與偶氮二羧酸二異丙酯甲苯溶液進行反應而製造。

作為溶劑，可列舉製造步驟1之步驟2所例示者。

化合物(VII-A)可以市售品之形式獲得。

#### 步驟55

化合物(VII-D)可藉由使用化合物(VII-C)，於甲醇等溶劑中，在冰浴冷卻、鹼之存在下使其反應而製造。

作為溶劑，可列舉製造步驟1之步驟2所例示者。

作為鹼，可列舉製造步驟1之步驟3所例示者。

#### 步驟56

化合物(VII-F)可使用化合物(VII-D)及化合物(VII-E)，在與製造步驟1之步驟3同樣之條件下製造。

#### 步驟57

化合物(VII-H)可使用化合物(VII-F)及化合物(VII-G)，在與製造步驟1之步驟3同樣之條件下製造。

#### 步驟58

化合物(VII-J)可使用化合物(VII-H)及化合物(VII-I)，在與製造步驟1之步驟3同樣之條件下製造。

#### 步驟59

化合物(VII-L)可使用化合物(VII-J)及化合物(VII-K)，在與製造步驟1之步驟3同樣之條件下製造。

#### 步驟60

化合物(VII-N)可使用化合物(VII-L)及化合物(VII-M)，在與製造步驟1之步驟3同樣之條件下製造。

#### 步驟61~63

化合物(VII')可使用化合物(VII-O)、化合物(VII-P)及化合物(VII-Q)，在與製造步驟1之步驟3同樣之條件下製造。

#### 步驟DP

可藉由適當地使用有機合成化學所常用之方法[例如 *Protective Groups in Organic Synthesis*, third edition, T. W. Greene 著, John Wiley & Sons Inc.(1999年)等所記載之方法等]而製造。

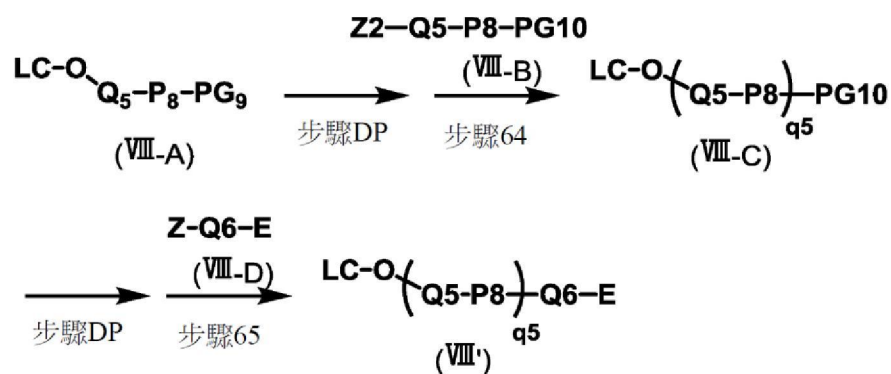
化合物(VII-B)、化合物(VII-E)、化合物(VII-G)、化合物(VII-I)、化合物(VII-K)、化合物(VII-M)、化合物(VII-O)、化合物(VII-P)及化合物(VII-Q)可以市售品之形式獲得，或者可藉由組合「實驗化學講座第4版有機合成，p.258，丸善(1992年)」、「*March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure*, 7<sup>th</sup> Edition」所記載之

方法、或依照其之方法而獲得。

#### 製造方法14

式4中P7為-O-之單元可藉由以下之方法製造。

[化130]



(式中，Q5、Q6、P8、q5分別與上述含義相同，Z2表示H、OH、NH<sub>2</sub>或SH，PG9及PG10分別表示適當之保護基，LC表示糖配體-連繫單元，E表示羧酸或順丁烯二醯亞胺)

#### 步驟64

化合物(VIII-C)可使用化合物(VIII-A)及化合物(VIII-B)，在與製造步驟1之步驟3同樣之條件下製造。

化合物(VIII-B)可以市售品之形式獲得，或者可藉由組合「實驗化學講座第4版 有機合成，p.258，丸善(1992年)」、「March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure, 7<sup>th</sup> Edition」所記載之方法、或依照其之方法而獲得。

#### 步驟65

化合物(VIII')可使用化合物(VIII-C)及化合物(VIII-D)，在與製造步驟1之步驟3同樣之條件下製造。

化合物(VIII-D)可以市售品之形式獲得，或者可藉由組合「實驗化學講座第4版 有機合成，p.258，丸善(1992年)」、「March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure, 7<sup>th</sup> Edition」所記載之方法、或依照其之方法而獲得。

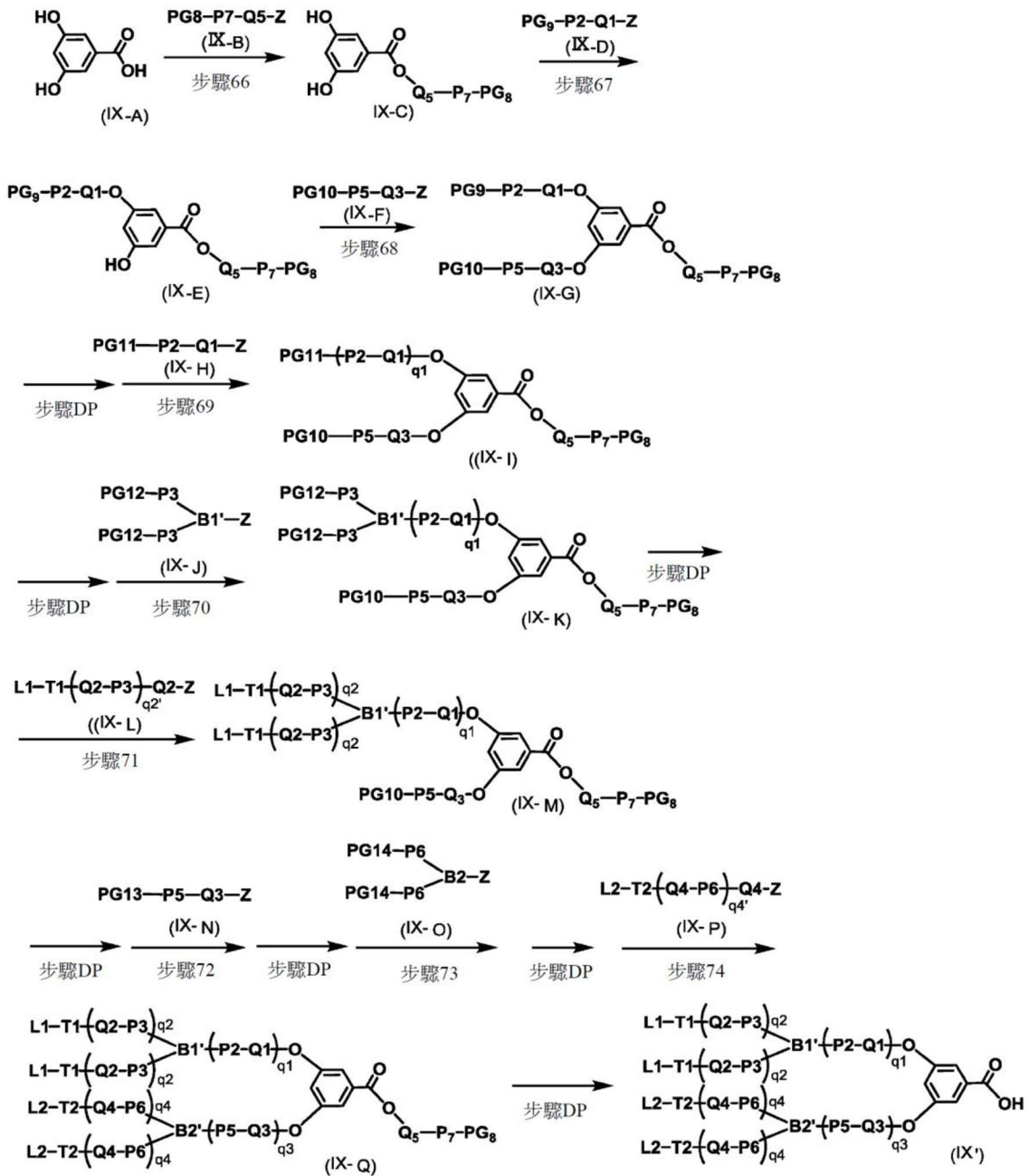
#### 步驟DP

可藉由適當地使用有機合成化學所常用之方法[例如 Protective Groups in Organic Synthesis, third edition，T. W. Greene 著，John Wiley & Sons Inc.(1999年)等所記載之方法等]而製造。

#### 製造方法15

式2中P1及P4為-O-之糖配體-連繫單元可藉由以下之方法製造。

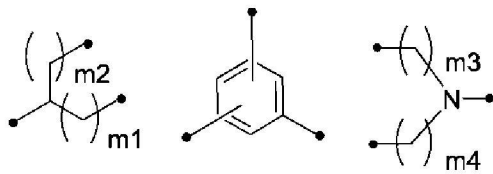
[化131]



(式中，Q1、Q2、Q3、Q4、P2、P3、P5、P6、T1、T2、L1、L2、q1、q2、q3、q4、Z、B1'或B2'分別與上述含義相同，q1'表示較q1小1之整數，q2'表示較q2小1之整數，PG8、PG9、PG10、PG11、PG12、PG13及PG14分別表示適當之保護基)

式：

[化132]



m1、m2、m3及m4與上述含義相同。

#### 步驟66

化合物(IX-C)可藉由將化合物(IX-A)與化合物(IX-B)溶解於N,N'-二甲基甲醯胺等溶劑中，添加碳酸氫鉀等鹼，於室溫 $\sim 200^{\circ}\text{C}$ 下反應5分鐘 $\sim 100$ 小時而製造。

作為溶劑，可列舉製造步驟1之步驟2所例示者。

作為鹼，可列舉製造步驟1之步驟3所例示者。

#### 步驟67

化合物(IX-E)可藉由將化合物(IX-C)與化合物(IX-D)溶解於N,N'-二甲基甲醯胺等溶劑中，添加碳酸氫鉀等鹼，於室溫 $\sim 200^{\circ}\text{C}$ 下反應5分鐘 $\sim 100$ 小時而製造。

作為溶劑，可列舉製造步驟1之步驟2所例示者。

作為鹼，可列舉製造步驟1之步驟3所例示者。

化合物(IX-A)可以市售品之形式獲得。

#### 步驟68

化合物(IX-G)可使用化合物(IX-E)及化合物(IX-F)，在與製造步驟1之步驟3同樣之條件下製造。

#### 步驟69

化合物(IX-I)可使用化合物(IX-G)及化合物(IX-H)，在與製造步驟1之步驟3同樣之條件下製造。

## 步驟70

化合物(IX-K)可使用化合物(IX-I)及化合物(IX-J)，在與製造步驟1之步驟3同樣之條件下製造。

## 步驟71

化合物(IX-M)可使用化合物(IX-K)及化合物(IX-L)，在與製造步驟1之步驟3同樣之條件下製造。

## 步驟72-74

化合物(IX')可使用化合物(IX-M)、化合物(IX-N)、化合物(IX-O)及化合物(IX-P)，在與製造步驟1之步驟3同樣之條件下製造。

## 步驟DP

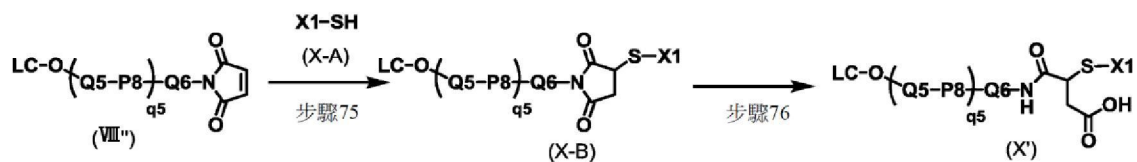
可藉由適當地使用有機合成化學所常用之方法[例如 *Protective Groups in Organic Synthesis*, third edition, T. W. Greene 著, John Wiley & Sons Inc.(1999年)等所記載之方法等]而製造。

化合物(IX'-B)、化合物(IX'-D)、化合物(IX'-F)、化合物(IX'-H)、化合物(IX'-J)、化合物(IX'-L)、化合物(IX'-N)、化合物(IX'-O)及化合物(IX'-P)可以市售品之形式獲得，或者可藉由組合「實驗化學講座第4版 有機合成，p.258，丸善(1992年)」、「*March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure*, 7<sup>th</sup> Edition」所記載之方法、或依照其之方法而獲得。

## 製造方法16

作為式1～式7之核酸複合體之製造方法，亦可使用以下之方法。

[化133]



(式中，LC、Q5、P8、Q6與上述含義相同，X1-SH表示末端具有包含經SH取代之C1～C10烷基之結構之寡核苷酸)

#### 步驟75

化合物(X-B)可藉由使化合物(VIII'')與化合物(X-A)於溶劑中、 $0^{\circ}C \sim 100^{\circ}C$ 下反應10秒～100小時而製造。

作為溶劑，可列舉：水、磷酸緩衝液、乙酸鈉緩衝液、二甲基亞砷等，該等可單獨或混合使用。

化合物(VIII')可藉由使用製造法14而獲得。

化合物(X-B)亦可藉由公知之方法(例如Bioconjugate Chemistry，第21卷，187-202頁，2010年、或Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry，2010年，9月；CHAPTER：Unit 4.41)或依照其之方法而獲得。

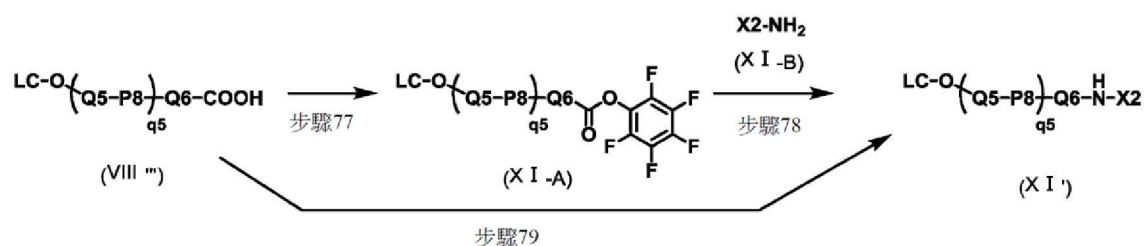
#### 步驟76

化合物(X')可藉由使用化合物(X-B)，於碳酸鈉水溶液或氨水中等pH值為8以上之條件下，在室溫與 $200^{\circ}C$ 之間之溫度下反應5分鐘～100小時而製造。

#### 製造方法17

作為式1～式7之核酸複合體之製造方法，亦可使用以下之方法。

[化134]



(式中，LC、Q5、P8、Q6與上述含義相同，X2-NH<sub>2</sub>表示末端具有包含經NH<sub>2</sub>取代之C1-C10烷基之結構之寡核苷酸)

#### 步驟77

化合物(XI-A)可使用化合物(VIII''')，藉由公知之方法(例如Bioconjugate Chemistry，第26卷，1451-1455頁，2015年所記載之方法)或依照其之方法而獲得。

化合物(VIII''')可藉由使用製造法14而獲得。

#### 步驟78

化合物(XI')可使用化合物(XI-B)，藉由公知之方法(例如Bioconjugate Chemistry，第26卷，1451-1455頁，2015年所記載之方法)或依照其之方法而獲得。

#### 步驟79

又，作為其他方法，化合物(XI')可藉由公知之方法(例如參照Bioconjugate Chemistry，第22卷，1723-1728頁，2011年)或依照其之方法，由化合物(XI-A)直接獲得。

本說明書中之核酸複合體例如亦可作為酸加成鹽、金屬鹽、銨鹽、有機胺加成鹽、胺基酸加成鹽等鹽而獲得。

作為酸加成鹽，例如可列舉：鹽酸鹽、硫酸鹽、磷酸鹽等無機酸鹽；乙酸鹽、順丁烯二酸鹽、反丁烯二酸鹽、檸檬酸鹽、甲磺酸鹽等有機

酸鹽，作為金屬鹽，例如可列舉：鈉鹽、鉀鹽等鹼金屬鹽；鎂鹽、鈣鹽等鹼土金屬鹽；鋁鹽、鋅鹽等，作為銨鹽，例如可列舉：銨、四甲基銨等之鹽，作為有機胺加成鹽，例如可列舉：味啉、嘔啉等之加成鹽，作為胺基酸加成鹽，例如可列舉：離胺酸、甘胺酸、苯丙胺酸等之加成鹽。

於欲製備本說明書之核酸複合體之鹽之情形時，在該複合體以所需之鹽之形式獲得時直接進行精製即可，又，在以游離之形式獲得時，將該複合體溶解或懸浮於適當之溶劑中，添加相對應之酸或鹼，進行單離、精製即可。又，於將形成該複合體鹽之抗衡離子轉換為不同之抗衡離子時，將該複合體鹽溶解或懸浮於適當之溶劑中後，添加數當量～大幅過量之酸、鹼及/或鹽(氯化鈉、氯化銨等無機鹽等)，進行單離、精製即可。

於本說明書之核酸複合體中亦有可存在幾何異構物、光學異構物等立體異構物、互變異構物等者，全部可能之異構物及該等之混合物亦包含於本發明中。

又，本說明書之核酸複合體亦存在以與水或各種溶劑之加成物之形式存在之情況，該等加成物亦包含於本發明中。

進而，本發明之核酸複合體亦包含分子中之一部分或全部原子被取代之為質量數不同之原子(同位素)(例如氘原子等)者。

本發明之醫藥組合物含有式1所表示之核酸複合體。本發明之核酸複合體藉由具有L1及L2之糖配體，而被標靶細胞識別，從而被導入至細胞內。

本發明之核酸複合體係對哺乳動物投予，於活體內藉由使標靶基因之表現降低或停止而對其進行抑制，可用於治療與標靶基因相關之疾病。

於使用本發明之核酸複合體作為治療劑或預防劑之情形時，作為投

予路徑，較理想為使用治療時最有效之投予路徑，並無特別限定，例如可列舉靜脈內投予、皮下投予及肌內投予等，較佳為靜脈內投予。

投予量因投予對象之症狀或年齡、投予路徑等而異，例如以換算為雙鏈寡核苷酸之1日投予量成為0.1  $\mu\text{g}$ ~1000 mg之方式投予即可，更佳為以1日投予量成為1~100 mg之方式投予。

作為適於靜脈內投予或肌內投予之製劑，例如可列舉注射劑，亦可將所製備之液劑直接作為例如注射劑等形態而使用，亦可藉由例如過濾、離心分離等將溶劑自該液劑去除而使用，亦可將該液劑冷凍乾燥而使用，及/或將加入有例如甘露醇、乳糖、海藻糖、麥芽糖或甘胺酸等賦形劑之液劑冷凍乾燥而使用。

於注射劑之情形時，較佳為於液劑或者去除溶劑或經冷凍乾燥之組合物中混合例如水、酸、鹼、各種緩衝液、生理食鹽水或胺基酸輸液等而製備注射劑。又，亦可添加例如檸檬酸、抗壞血酸、半胱胺酸或EDTA等抗氧化劑或甘油、葡萄糖或氯化鈉等等張劑等而製備注射劑。又，亦可加入例如甘油等冷凍保存劑而進行冷凍保存。

#### 實施例

其次，藉由參考例、實施例及試驗例對本發明加以具體說明。但本發明並不限定於該等實施例及試驗例。再者，實施例及參考例所示之質子核磁共振光譜( $^1\text{H}$  NMR)係於270 MHz、300 MHz或400 MHz下測得者，存在因化合物及測定條件而未能明確地觀測到交換性質子之情況。又，作為訊號之多重度之表述，使用通常所使用者，所謂br意指broad，表示表觀上為寬廣之訊號。

UPLC(ultra-high performance liquid chromatography，超高效液相

層析)分析係使用以下條件。

流動相A：含0.1%甲酸之水溶液、B：乙腈溶液

梯度：流動相B為10%-90%之線性梯度(3分鐘)

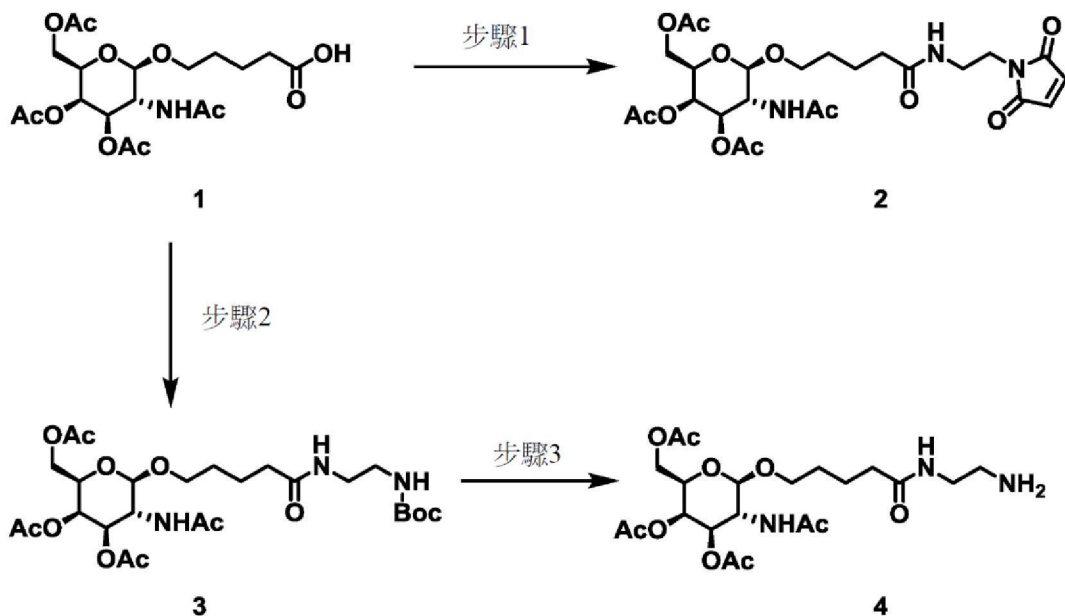
管柱：Waters公司製造之ACQUITY UPLC BEH C18(1.7  $\mu\text{m}$ ，內徑2.1 $\times$ 50 mm)

流速：0.8 mL/min

PDA(photodiode array，光電二極體陣列)檢測波長：254 nm(檢測範圍190-800 nm)

參考例1 糖配體單元之合成

[化135]



化合物2之合成

步驟1

藉由 Journal of American Chemical Society，第136卷，16958-

16961頁，2014年所記載之方法合成之化合物1(0.8755 g，1.9567 mmol)溶解於四氫呋喃(10 mL)中，於室溫下將1,3-二環己碳二醯亞胺(DCC，0.4247 g，2.0584 mmol)與N-羥基丁二醯亞胺(0.2412 g，2.0958 mmol)攪拌一晚。去除自反應混合物析出之固體，於減壓下將溶劑蒸餾去除。將所獲得之混合物溶解於N,N'-二甲基甲醯胺(DMF)中，添加2-胺基乙基順丁烯二醯亞胺臭酸鹽(0.6479 g，2.5491 mmol)與二異丙基乙基胺(1.7 mL，9.7835 mmol)後，於室溫下攪拌一晚。於減壓下將反應液之溶劑蒸餾去除，藉由逆相管柱層析法(水/甲醇 = 80/20)使其溶出，藉此獲得化合物2(0.8502 g，產率76%)。

ESI-MS m/z: 570(M+H)<sup>+</sup>;

<sup>1</sup>H-NMR(DMSO-D<sub>6</sub>) δ: 1.45-1.56 (4H, m), 1.78 (3H, s), 1.90 (3H, s), 1.97 (2H, t, J = 7.0 Hz), 2.00 (3H, s), 2.11 (3H, s), 3.18-3.19 (2H, m), 3.38-3.45 (3H, m), 3.64-3.71 (1H, m), 3.85-3.89 (1H, m), 4.01-4.04 (3H, m), 4.48 (1H, d, J = 8.6 Hz), 4.95-4.98 (1H, m), 5.21 (1H, d, J = 3.5 Hz), 6.99 (2H, s), 7.81-7.87 (2H, m).

化合物4之合成

步驟2

將步驟1所記載之化合物1(0.9602 g，2.1460 mmol)溶解於N,N'-二甲基甲醯胺(10 mL)中，添加N-Boc-乙二胺(Sigma-Aldrich公司製造，0.6877 g，4.292 mmol)、二異丙基乙基胺(1.90 mL，10.87 mmol)、及2-(1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲六氟磷酸鹽(和光純藥工業公司製造，1.6437 g，4.3229 mmol)，於室溫下徹夜攪拌。於反應液中添加水，藉由氯仿萃取2次後，利用飽和食鹽水清洗有機層，利用無水硫酸鎂加以

乾燥。於減壓下將溶劑蒸餾去除，而獲得化合物3之粗精製物。

ESI-MS  $m/z$ : 590(M+H)<sup>+</sup>

### 步驟3

將步驟2中合成之化合物3(1.2654 g, 2.1460 mmol)溶解於二氯甲烷(15 mL)中，添加三氟乙酸(4 mL)，於室溫下攪拌一晚。於反應液中添加水，藉由乙酸乙酯進行萃取後，利用飽和食鹽水清洗有機層，利用無水硫酸鎂加以乾燥。於減壓下將溶劑蒸餾去除，藉由逆相管柱層析法(水/甲醇 = 80/20)使其溶出，藉此獲得化合物4(0.3879 g, 產率37%)。

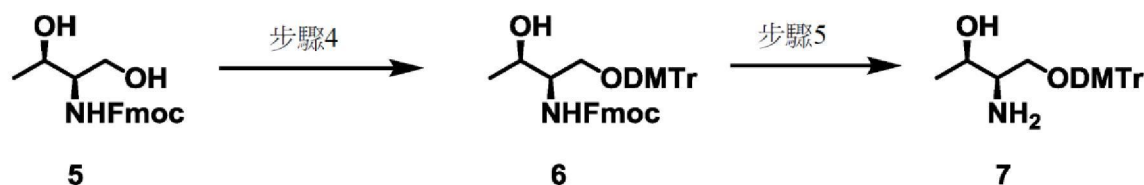
ESI-MS  $m/z$ : 490(M+H)<sup>+</sup>;

<sup>1</sup>H-NMR(DMSO-D<sub>6</sub>)  $\delta$ : 1.46-1.52 (4H, m), 1.78 (3H, s), 1.90 (3H, s), 2.00 (3H, s), 2.08 (2H, t,  $J = 7.4$  Hz), 2.11 (3H, s), 2.85 (2H, t,  $J = 6.3$  Hz), 3.27 (2H, dd,  $J = 12.3, 6.2$  Hz), 3.67-3.69 (1H, m), 3.68-3.73 (1H, m), 3.86-3.90 (1H, m), 4.01-4.04 (3H, m), 4.49 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz), 4.97 (1H, dd,  $J = 11.3, 3.4$  Hz), 5.22 (1H, d,  $J = 3.5$  Hz), 7.86 (1H, d,  $J = 9.1$  Hz), 7.95-8.02 (1H, m).

參考例2 分支單元之合成

化合物7之合成

[化136]



### 步驟4

將((2R,3R)-1,3-二羥基丁烷-2-基)胺基甲酸(9H-蒾-9-基)甲酯(化合物5, Chem-Impex International, Inc公司製造, 1.50 g, 4.58 mmol)溶解於吡啶(20 mL)中, 於冰浴冷卻下添加4,4'-二甲氧基三苯氯甲烷(東京化成工業公司製造, 1.71 g, 5.04 mmol)後, 於室溫下攪拌2小時。將反應液冰浴冷卻, 添加10%檸檬酸水溶液, 藉由乙酸乙酯進行萃取後, 利用飽和食鹽水清洗有機層, 利用無水硫酸鎂加以乾燥。於減壓下將溶劑蒸餾去除, 利用矽膠管柱層析法(己烷/乙酸乙酯 = 90/10)對殘渣進行精製, 藉此獲得化合物6(1.07 g, 產率37%)。

ESI-MS m/z: 630(M+H)<sup>+</sup>

#### 步驟5

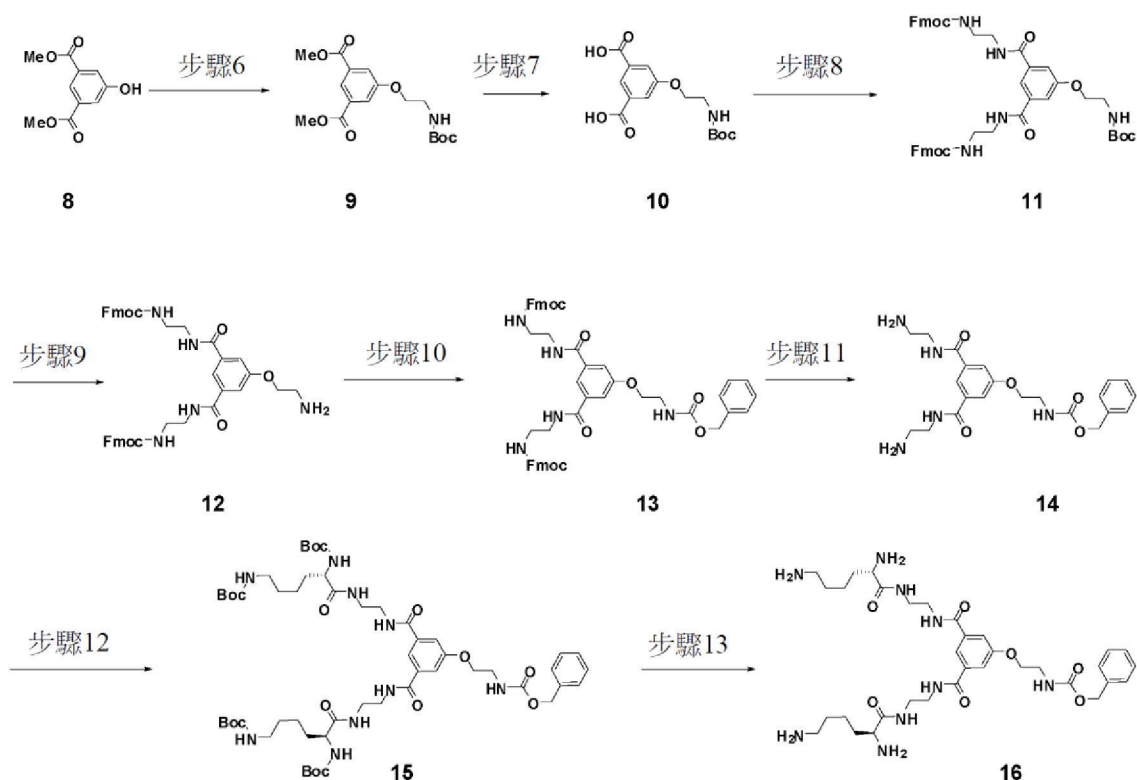
將步驟4中合成之化合物6(1.07 g, 1.699 mmol)溶解於N,N-二甲基甲醯胺(10 mL)中, 於室溫下添加哌啶(0.336 mL, 3.40 mmol)並攪拌3小時。於反應液中添加水, 藉由乙酸乙酯進行萃取後, 利用飽和食鹽水清洗有機層, 利用無水硫酸鎂加以乾燥。於減壓下將溶劑蒸餾去除, 利用胺基矽膠管柱層析法(氯仿/甲醇 = 90/10)對殘渣進行精製, 藉此獲得化合物7(0.59 g, 產率85%)。

ESI-MS m/z: 408(M+H)<sup>+</sup>

#### 實施例1 連繫單元之合成1

#### 化合物16之合成

[化137]



### 步驟6

將5-羥基間苯二甲酸二甲酯(化合物8，和光純藥工業公司製造，5.0443 g，24 mmol)溶解於四氫呋喃(和光純藥工業公司製造25 mL)中，添加2-(第三丁氧基羰基胺基)-1-乙醇(東京化成工業公司製造，4.0343 g，25.03 mmol)、及三苯基膦聚合物載體(Sigma-Aldrich公司製造，6.61 g，25.2 mmol)後，於冰浴冷卻下添加40%偶氮二羧酸二異丙酯(DIAD)甲苯溶液(東京化成工業公司製造，13.26 mL，25.2 mmol)，於室溫下攪拌一晚。過濾反應液，於減壓下將濾液蒸餾去除後，利用胺基矽膠管柱層析法(己烷/乙酸乙酯 = 95/5 ~ 80/20)對殘渣進行精製，藉此獲得化合物9(5.3071 g，產率63%)。

ESI-MS  $m/z$ : 254( $M+H$ )<sup>+</sup>，以脫Boc體之形式檢測出

### 步驟7

將步驟6中合成之化合物9(5.3071 g, 15.02 mmol)溶解於甲醇(25 mL)中，於冰浴冷卻下添加2 mol/L氫氧化鈉水溶液(和光純藥工業公司製造，13 mL)，於室溫下攪拌4小時。將反應液冰浴冷卻，添加10%檸檬酸水溶液，藉由乙酸乙酯進行萃取後，利用飽和食鹽水清洗有機層，利用無水硫酸鎂加以乾燥。於減壓下將溶劑蒸餾去除，藉此定量獲得化合物10。

ESI-MS m/z: 324(M-H)<sup>-</sup>

#### 步驟8

將步驟7中合成之化合物10(1.9296 g, 5.93 mmol)溶解於N,N'-二甲基甲醯胺(70 mL)中，添加N-1-(9H-芴-9-基甲氧基羰基)-乙二胺鹽酸鹽(3.3493 g, 11.86 mmol)、二異丙基乙基胺(5.18 mL, 29.7 mmol)、及2-(1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲六氟磷酸鹽(4.5168 g, 11.88 mmol)，於室溫下攪拌4小時。將反應液冰浴冷卻，添加10%檸檬酸水溶液，藉由氯仿進行萃取後，利用飽和碳酸氫鈉水溶液及飽和食鹽水清洗有機層，利用無水硫酸鎂加以乾燥。於減壓下將溶劑蒸餾去除，利用矽膠管柱層析法(氯仿/甲醇)對殘渣進行精製，藉此獲得化合物11(3.4407 g, 產率68%)。

ESI-MS m/z: 898(M+HCOO)<sup>-</sup>

#### 步驟9

將步驟8中合成之化合物11(1.6087 g, 1.884 mmol)溶解於二氯甲烷(20 mL)中，於冰浴冷卻下添加三氟乙酸(5 mL, 64.9 mmol)，於室溫下攪拌4小時。於減壓下將反應液之溶劑蒸餾去除，藉此定量獲得化合物12(2.4079 g)。

ESI-MS m/z: 798(M+HCOO)<sup>-</sup>

## 步驟10

將步驟9中合成之化合物12(386 mg, 0.512 mmol)溶解於四氫呋喃(10 mL)中，於冰浴冷卻下添加苯甲醯氯(175 mg, 1.024 mmol)，於室溫下攪拌1小時。於減壓下將反應液之溶劑蒸餾去除，利用矽膠管柱層析法(氯仿/甲醇)對殘渣進行精製，藉此獲得化合物13(373 mg, 產率82%)。

ESI-MS  $m/z$ : 888(M+H)<sup>+</sup>

## 步驟11

將步驟10中合成之化合物13(108 mg, 0.122 mmol)溶解於二氯甲烷(5 mL)中，於室溫下添加二乙基胺(0.5 mL, 4.8 mmol)並攪拌1小時。於減壓下將溶劑蒸餾去除，藉此定量獲得化合物14(54.9 mg)。

ESI-MS  $m/z$ : 444(M+H)<sup>+</sup>

## 步驟12

添加步驟11中合成之化合物14(180 mg, 0.406 mmol)、N $\alpha$ ,N $\epsilon$ -雙(第三丁氧基羰基)-L-離胺酸(Novabiochem公司製造, 295 mg, 0.852 mmol)、二異丙基乙基胺(0.354 mL, 2.029 mmol)、及2-(1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲六氟磷酸鹽(324 mg, 0.852 mmol)，於室溫下徹夜攪拌。將反應液冰浴冷卻，添加10%檸檬酸水溶液，藉由氯仿進行萃取後，利用飽和食鹽水清洗有機層，利用無水硫酸鎂加以乾燥。於減壓下將溶劑蒸餾去除，利用胺基矽膠管柱層析法(氯仿/甲醇)對殘渣進行精製，藉此定量獲得化合物15(450 mg)。

ESI-MS  $m/z$ : 1101(M+H)<sup>+</sup>

## 步驟13

將步驟12中合成之化合物15(2.1558 g, 1.9593 mmol)溶解於二氯甲

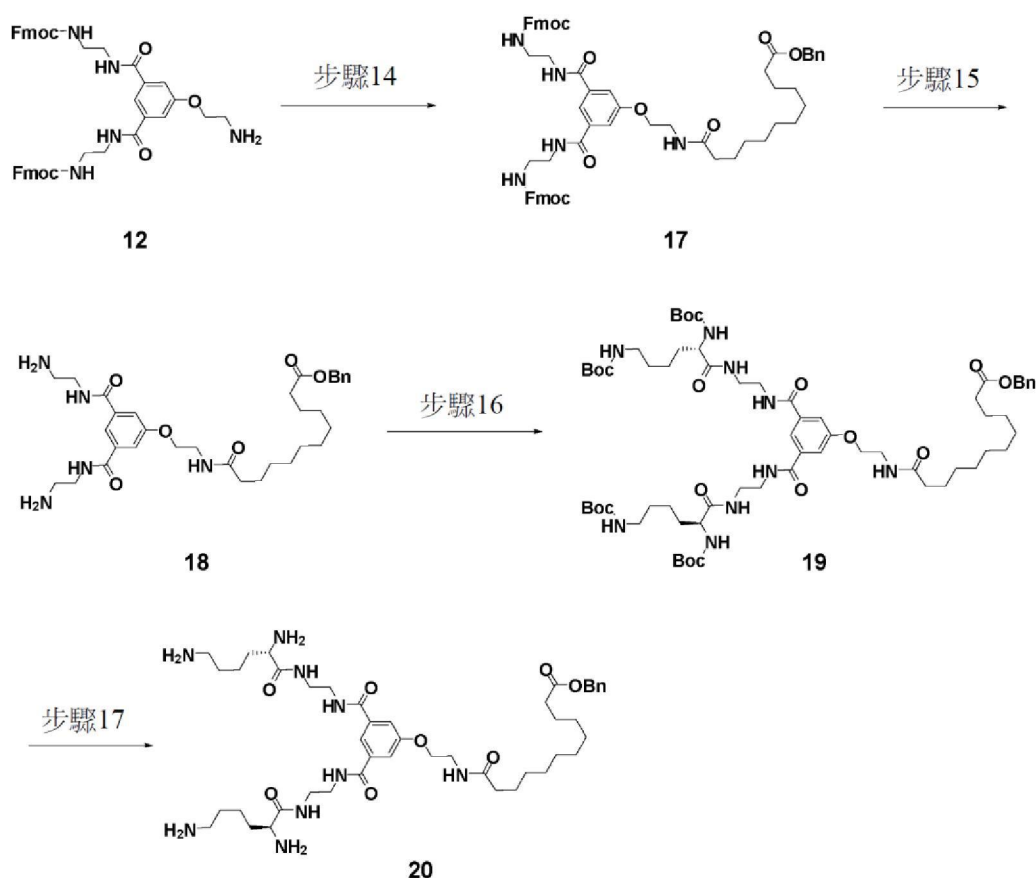
烷(20 mL)中，於冰浴冷卻下添加三氟乙酸(5 mL)，於室溫下攪拌4小時。  
於減壓下將反應液之溶劑蒸餾去除，藉此定量獲得化合物16。

ESI-MS  $m/z$ : 700(M+H)<sup>+</sup>

實施例2 連繫單元之合成2

化合物20之合成

[化138]



步驟14

將步驟9中合成之化合物12(0.5716 g, 0.7582 mmol)、藉由Bioconjugate Chemistry, 第22卷, 690-699頁, 2011年所記載之方法合成之十二酸單苄基酯(0.4859 mg, 1.5164 mmol)、二異丙基乙基胺(0.662

mL, 3.79 mmol)、及2-(1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲六氟磷酸鹽(0.5766 g, 1.516 mmol)溶解於N,N-二甲基甲醯胺(12 mL)中，於室溫下攪拌1小時。將反應液冰浴冷卻，添加飽和檸檬酸水溶液，藉由氯仿進行萃取後，利用飽和食鹽水清洗有機層，利用無水硫酸鎂加以乾燥。於減壓下將溶劑蒸餾去除，利用矽膠管柱層析法(氯仿/甲醇)對殘渣進行精製，藉此獲得化合物17(0.88 g, 產率84%)。

ESI-MS m/z: 1057(M+H)<sup>+</sup>

#### 步驟15

將步驟14中合成之化合物17(0.7545 g, 0.714 mmol)溶解於二氯甲烷四氫呋喃(20 mL)中，於室溫下添加二乙基胺(5 mL, 47.9 mmol)並進行徹夜攪拌。於減壓下將溶劑蒸餾去除，藉此定量獲得化合物18。

ESI-MS m/z: 612(M+H)<sup>+</sup>

#### 步驟16

添加步驟15中合成之化合物18(0.437 g, 0.7143 mmol)、N $\alpha$ ,N $\epsilon$ -雙(第三丁氧基羰基)-L-離胺酸(Novabiochem公司製造, 0.5483 g, 1.583 mmol)、二異丙基乙基胺(0.624 mL, 3.57 mmol)、2-(1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲六氟磷酸鹽(0.5703 g, 1.5 mmol)，於室溫下攪拌2小時。於反應液中添加10%檸檬酸水溶液，藉由乙酸乙酯進行萃取後，利用飽和食鹽水清洗有機層，利用無水硫酸鎂加以乾燥。於減壓下將溶劑蒸餾去除，藉此獲得化合物19之粗產物。

ESI-MS m/z: 1269(M+H)<sup>+</sup>

#### 步驟17

將步驟16中合成之化合物19(0.906 g, 0.7143 mmol)溶解於二氯甲

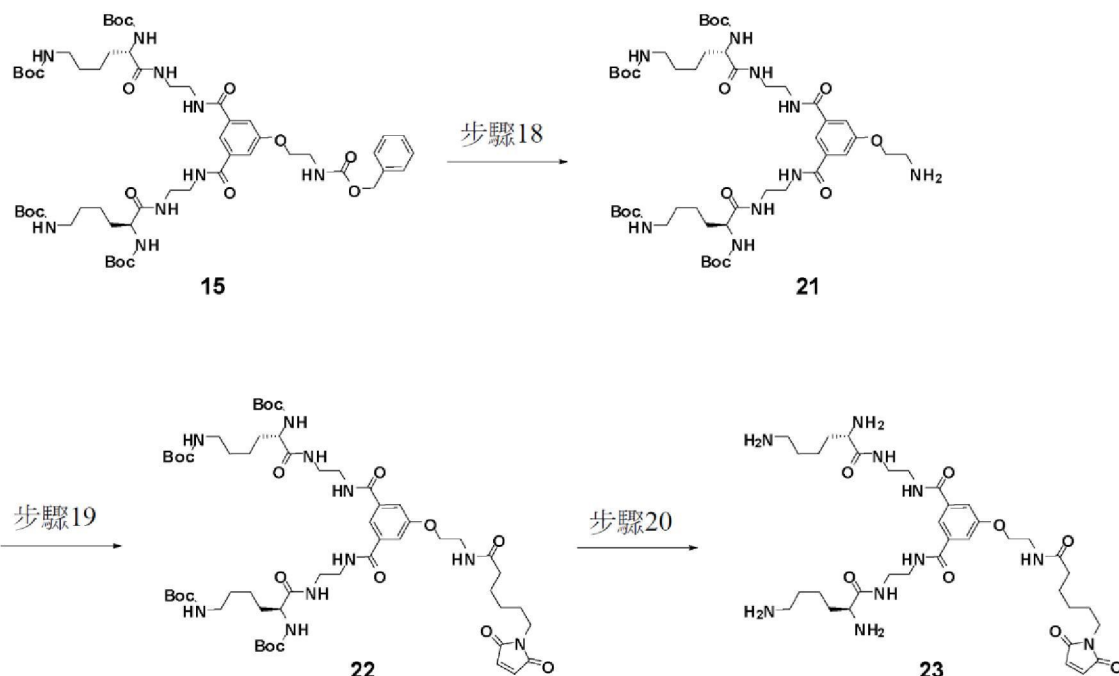
烷(12 mL)中，於冰浴冷卻下添加三氟乙酸(3 mL, 38.9 mmol)，於室溫下攪拌4小時。於減壓下將反應液之溶劑蒸餾去除，藉此獲得化合物20之粗產物。

ESI-MS  $m/z$ : 869(M+H)<sup>+</sup>

實施例3 連繫單元之合成3

化合物23之合成

[化139]



步驟18

將步驟12中合成之化合物15(100 mg, 0.091 mmol)溶解於甲醇(3 mL)中，添加乙酸(2  $\mu$ L)後，進行利用鈀/碳之催化氫還原。於減壓下將所獲得之溶液餾分之溶劑蒸餾去除，藉此定量獲得化合物21。

ESI-MS  $m/z$ : 967(M+H)<sup>+</sup>

步驟19

將步驟18中合成之化合物21(50 mg, 0.052 mmol)及N-(6-順丁烯二醯亞胺己醯氧基)丁二醯亞胺(48 mg, 0.155 mmol)溶解於四氫呋喃(2 mL)中，添加二異丙基乙基胺(0.045 mL, 0.259 mmol)，於室溫下徹夜攪拌。於減壓下將溶劑蒸餾去除，利用矽膠管柱層析法(氯仿/甲醇)對殘渣進行精製，藉此獲得化合物22(18 mg, 產率30%)。

ESI-MS m/z: 1160(M+H)<sup>+</sup>

#### 步驟20

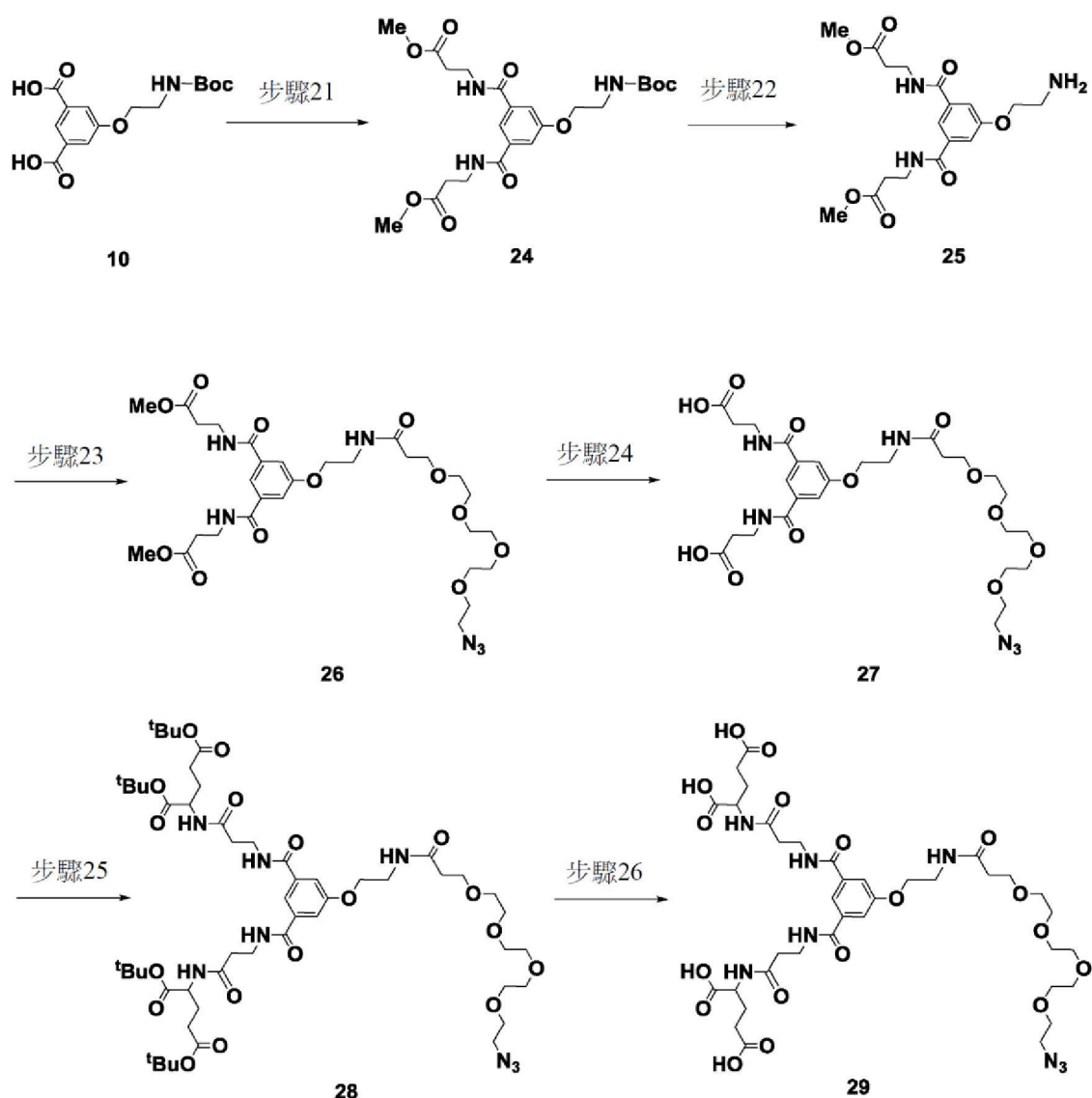
將步驟19中合成之化合物22(18 mg, 0.016 mmol)溶解於二氯甲烷(2 mL)中，於冰浴冷卻下添加三氟乙酸(0.2 mL, 2.6 mmol)，於室溫下徹夜攪拌。於減壓下將反應液之溶劑蒸餾去除，藉由二乙醚進行晶析後，以白色固體之形式獲得化合物23(7.5 mg, 產率64%)。

ESI-MS m/z: 759(M+H)<sup>+</sup>

#### 實施例4 連繫單元之合成4

##### 化合物29之合成

[化140]



### 步驟21

使用步驟7中合成之化合物10(0.9372 g, 2.8809 mmol)、 $\beta$ -丙胺酸甲酯鹽酸鹽(東京化成工業股份有限公司製造, 0.8082 g, 5.7902 mmol), 藉由與實施例1之步驟8同樣之方法定量獲得化合物24。

ESI-MS  $m/z$ : 495(M+H)<sup>+</sup>

### 步驟22

使用步驟21中合成之化合物24(0.9622 g, 1.952 mmol), 藉由與實施例1之步驟9同樣之方法定量獲得化合物25。

ESI-MS m/z: 396(M+H)<sup>+</sup>

### 步驟23

使用步驟22中合成之化合物25(0.1146 g, 0.290 mmol)及N-丁二醯亞胺基15-疊氮基-4,7,10,13-四氧雜十五酸(N3-PEG4-NHS, 東京化成工業股份有限公司製造, 0.0750 g, 0.1931 mmol), 藉由與實施例3之步驟19同樣之方法定量獲得化合物26。

ESI-MS m/z: 669(M+H)<sup>+</sup>

### 步驟24

使用步驟23中合成之化合物26(0.1291 g, 0.193 mmol), 藉由與實施例1之步驟7同樣之方法定量獲得化合物27。

ESI-MS m/z: 641(M+H)<sup>+</sup>

### 步驟25

使用步驟24中合成之化合物27(0.1252 g, 0.193 mmol)及L-麩胺酸二第三丁酯(渡邊化學股份有限公司製造, 0.1180 g, 0.399 mmol), 藉由與實施例1之步驟8同樣之方法獲得化合物28(0.0521 g, 產率24%)。

ESI-MS m/z: 1124(M+H)<sup>+</sup>

### 步驟26

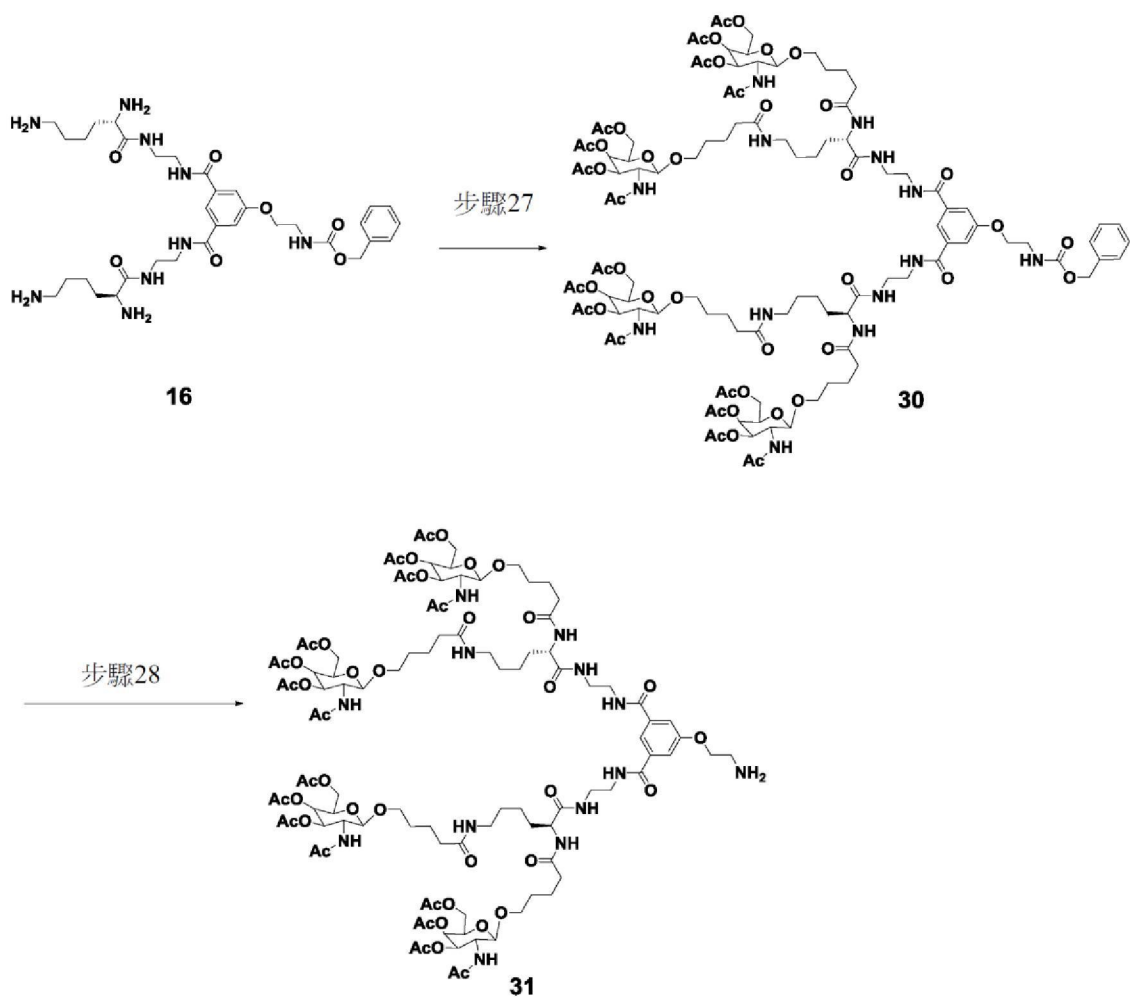
使用步驟25中合成之化合物28(0.0521 g, 0.0464 mmol), 藉由與實施例1之步驟9同樣之方法獲得化合物29(36 mg, 產率86%)。

ESI-MS m/z: 899(M+H)<sup>+</sup>

## 實施例5 糖配體-苯環單元之合成1

### 化合物31之合成

[化141]



### 步驟27

使用步驟13中合成之化合物16(0.2586 g, 0.3695 mmol)與藉由Journal of American Chemical Society, 第136卷, 16958-16961頁, 2014年所記載之方法合成之化合物1(0.8559 g, 1.7927 mmol), 藉由與實施例1之步驟8同樣之方法獲得化合物30(0.5272 g, 產率61%)。

ESI-MS m/z: 2418(M+H)<sup>+</sup>

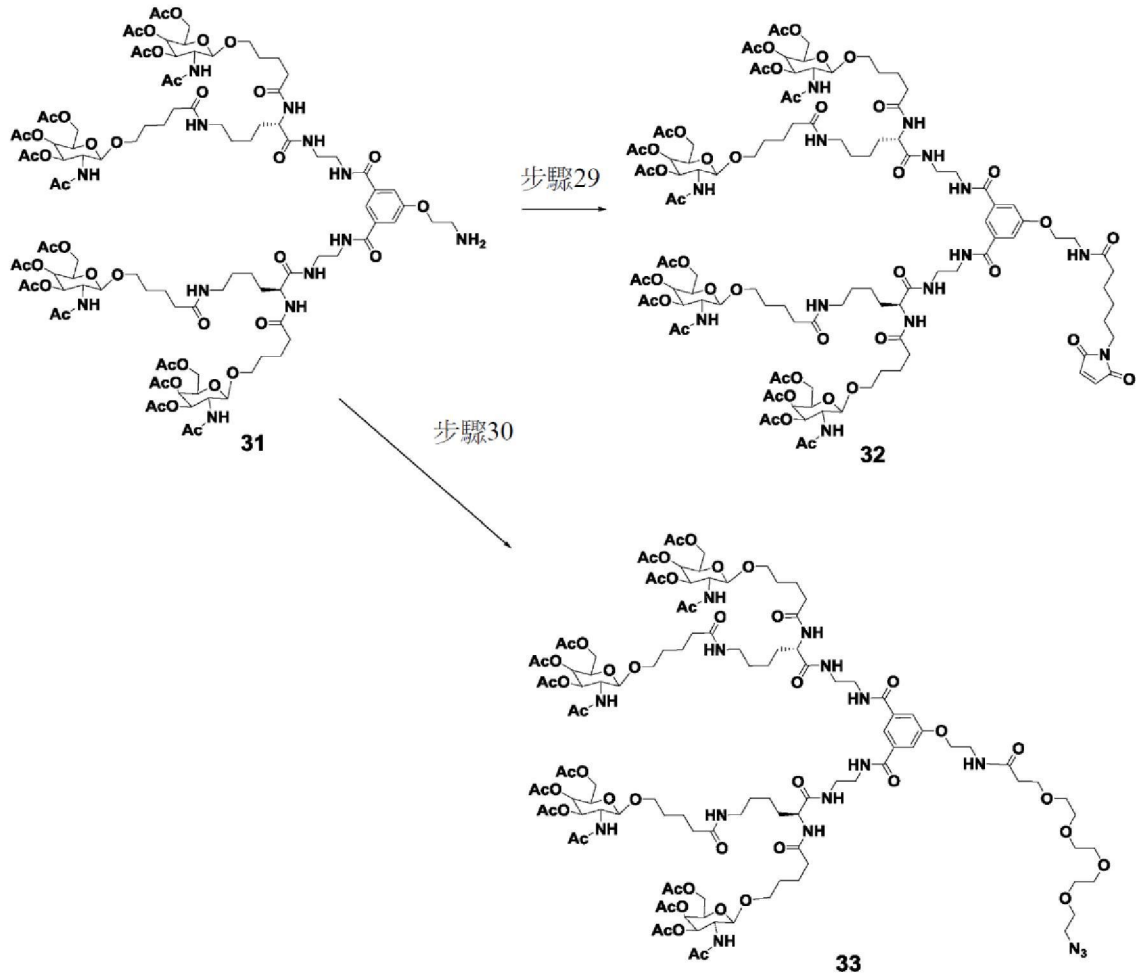
### 步驟28

使用步驟27中合成之化合物30(0.2653 g, 0.1097 mmol), 藉由與實施例3之步驟21同樣之方法獲得化合物31(0.1524 g, 產率61%)。

ESI-MS m/z: 2284(M+H)<sup>+</sup>

## 實施例6 糖配體-連繫單元之合成2

[化142]



## 化合物32之合成

## 步驟29

使用步驟28中合成之化合物31(0.0152 g, 0.006657 mmol), 藉由與實施例3之步驟19同樣之方法獲得化合物32(0.0077 g, 產率47%)。

ESI-MS  $m/z$ : 1239(M+2H)<sup>2+</sup>

<sup>1</sup>H-NMR(DMSO-D<sub>6</sub>)  $\delta$ : 1.11-1.66 (34H, m), 1.77 (12H, d, J = 1.5 Hz), 1.89 (12H, s), 2.01-2.14 (10H, m), 2.01 (12H, s), 2.10 (12H, s),

2.92-2.99 (4H, m), 3.16-3.54 (14H, m), 3.65-3.74 (4H, m), 3.81-3.91 (4H, m), 3.98-4.08 (14H, m), 4.11-4.24 (4H, m), 4.48 (4H, dd,  $J = 8.4, 1.8$  Hz), 4.93-5.00 (4H, m), 5.21 (4H, d,  $J = 3.5$  Hz), 6.99 (2H, s), 7.52 (2H, s), 7.66-7.75 (2H, m), 7.78-7.87 (6H, m), 7.91 (1H, brs), 8.01-8.08 (3H, brm), 8.54-8.60 (2H, brm).

化合物33之合成

步驟30

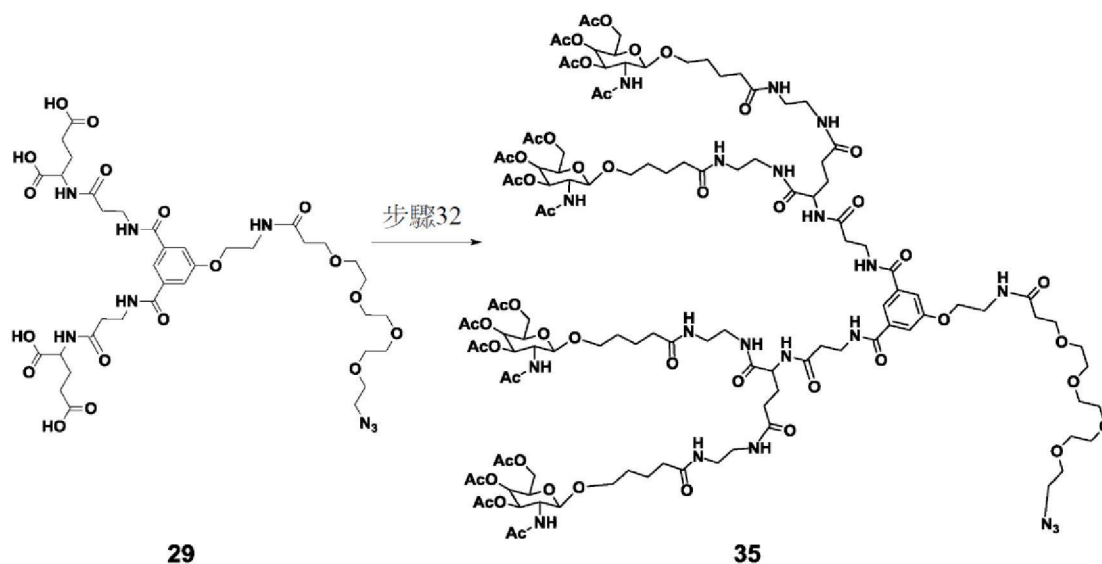
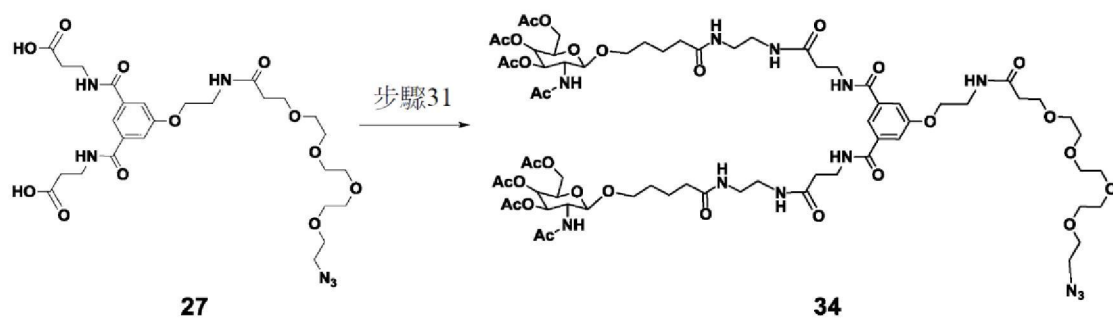
使用步驟28中合成之化合物31(0.0150 g, 0.00657 mmol), 藉由與實施例4之步驟23同樣之方法獲得化合物33(0.0062 g, 產率37%)。

ESI-MS  $m/z$ : 1279( $M+2H$ )<sup>2+</sup>

<sup>1</sup>H-NMR(DMSO-D<sub>6</sub>)  $\delta$ : 1.11-1.66 (30H, m), 1.77 (12H, s), 1.89 (12H, s), 2.01-2.14 (8H, m), 2.01 (12H, s), 2.10 (12H, s), 2.33-2.38 (2H, m), 2.92-2.99 (4H, m), 3.16-3.54 (14H, m), 3.58-3.63 (16H, m), 3.65-3.74 (4H, m), 3.81-3.91 (4H, m), 3.98-4.08 (12H, m), 4.11-4.24 (4H, m), 4.48 (4H, dd,  $J = 8.4, 1.8$  Hz), 4.93-5.00 (4H, m), 5.21 (4H, d,  $J = 3.5$  Hz), 7.52 (2H, s), 7.66-7.75 (2H, m), 7.78-7.87 (6H, m), 7.91 (1H, brs), 8.01-8.08 (3H, brm), 8.54-8.60 (2H, brm).

實施例7 糖配體-連繫單元之合成3

[化143]



## 化合物34之合成

### 步驟31

使用步驟24中合成之化合物27(0.00436 g, 0.00681 mmol)及參考例1之步驟3中合成之化合物4(0.010 g, 0.020 mmol)，藉由與實施例1之步驟8同樣之方法獲得化合物34之粗產物。

ESI-MS  $m/z$ : 1584(M+H)<sup>+</sup>

## 化合物35之合成

### 步驟32

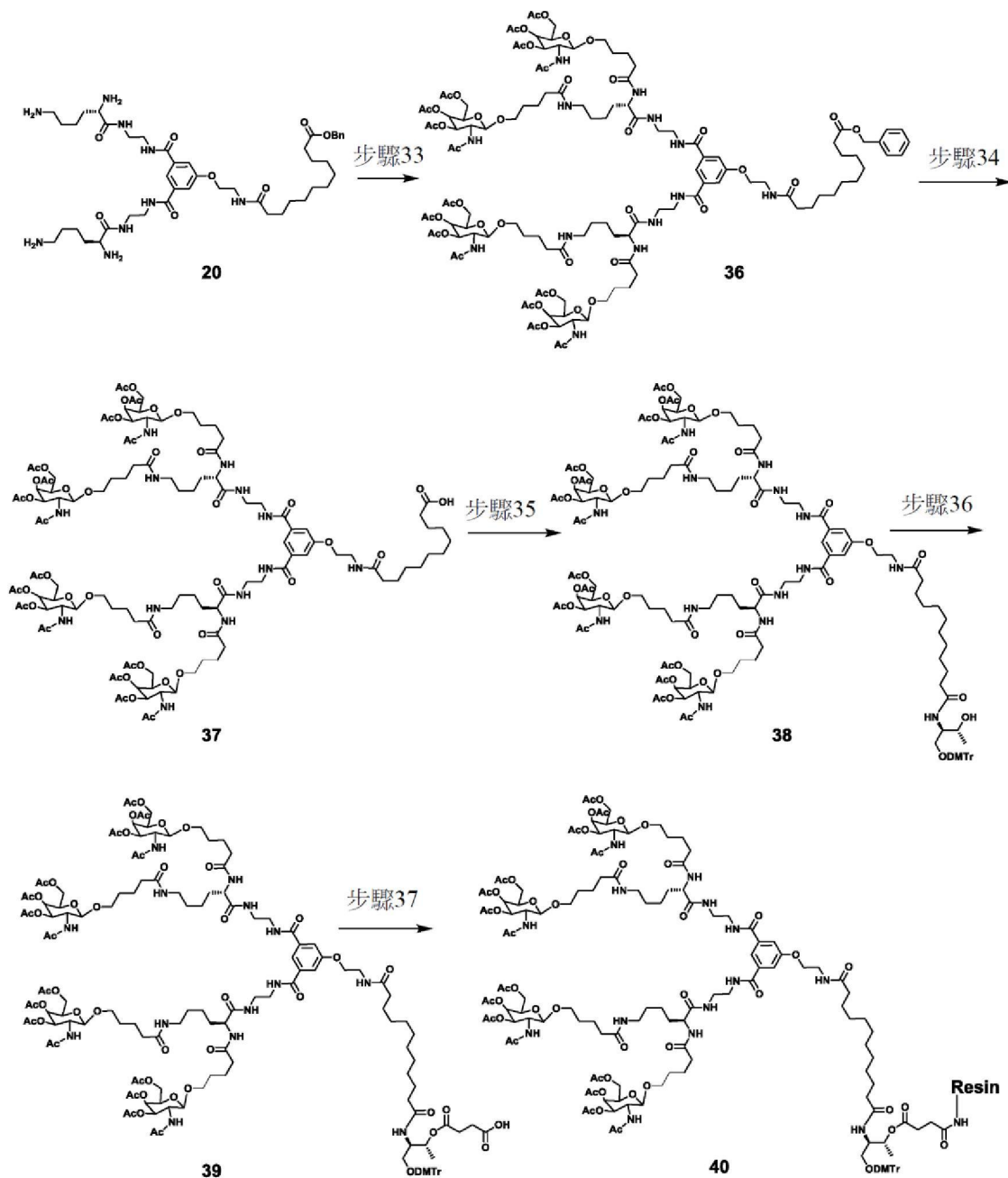
使用步驟26中合成之化合物29(0.0100 g, 0.01112 mmol)，藉由與實施例1之步驟8同樣之方法獲得化合物35(0.0223 g, 產率72%)。

ESI-MS  $m/z$ : 1393(M+2H)<sup>2+</sup>

實施例8 糖配體-連繫-分支單元之合成

化合物40之合成

[化144]



步驟33

第 150 頁(發明說明書)

使用步驟17中合成之化合物20(0.1952 g, 0.225 mmol)與藉由Journal of American Chemical Society, 第136卷, 16958-16961頁、2014年所記載之方法合成之化合物1(0.4162 g, 0.93 mmol), 藉由與實施例1之步驟8同樣之方法獲得化合物36(334.8 mg, 產率58%)。

ESI-MS m/z: 1294(M+2H)<sup>2+</sup>

#### 步驟34

使用步驟33中合成之化合物36(0.1459 g, 0.056 mmol), 藉由與實施例3之步驟18同樣之方法獲得化合物37(112 mg, 產率80%)。

ESI-MS m/z: 1249(M+2H)<sup>2+</sup>

<sup>1</sup>H-NMR(DMSO-D<sub>6</sub>) δ: 1.11-1.66 (44H, m), 1.77 (12H, d, J = 1.5 Hz), 1.89 (12H, s), 2.01-2.20 (12H, m), 2.01 (12H, s), 2.10 (12H, s), 2.92-2.99 (4H, m), 3.16-3.54 (10H, m), 3.58-3.64 (4H, m), 3.65-3.74 (4H, m), 3.81-3.91 (4H, m), 3.98-4.08 (12H, m), 4.11-4.24 (4H, m), 4.48 (4H, dd, J = 8.4, 1.8 Hz), 4.93-5.00 (4H, m), 5.21 (4H, d, J = 3.5 Hz), 6.99 (2H, s), 7.52 (2H, s), 7.66-7.75 (2H, m), 7.78-7.87 (6H, m), 7.91 (1H, brs), 8.01-8.08 (3H, brm), 8.54-8.60 (2H, brm).

#### 步驟35

使用步驟34中合成之化合物37(0.1091 g, 0.044 mmol)及參考例2之步驟5中所製造之化合物7(0.0748 g, 0.184 mmol), 藉由與實施例1之步驟8同樣之方法以粗產物之形式獲得化合物38。

ESI-MS m/z: 1292(M+2H)<sup>2+</sup>, 作為脫DMTr體而檢測出

#### 步驟36

將步驟35中合成之化合物38(0.161 g, 0.05586 mmol)溶解於二氯甲

烷(5 mL)中，添加丁二酸酐(東京化成工業公司製造，0.1182 g，1.181 mmol)、N,N-二甲基胺基吡啶(0.0224 g，0.183 mmol)、及三乙胺(0.55 mL，3.95 mmol)，於室溫下攪拌一晚。將反應液冰浴冷卻，添加水，藉由乙酸乙酯萃取2次後，利用飽和食鹽水清洗有機層，利用無水硫酸鎂加以乾燥。於減壓下將溶劑蒸餾去除，藉此獲得化合物39之粗產物。

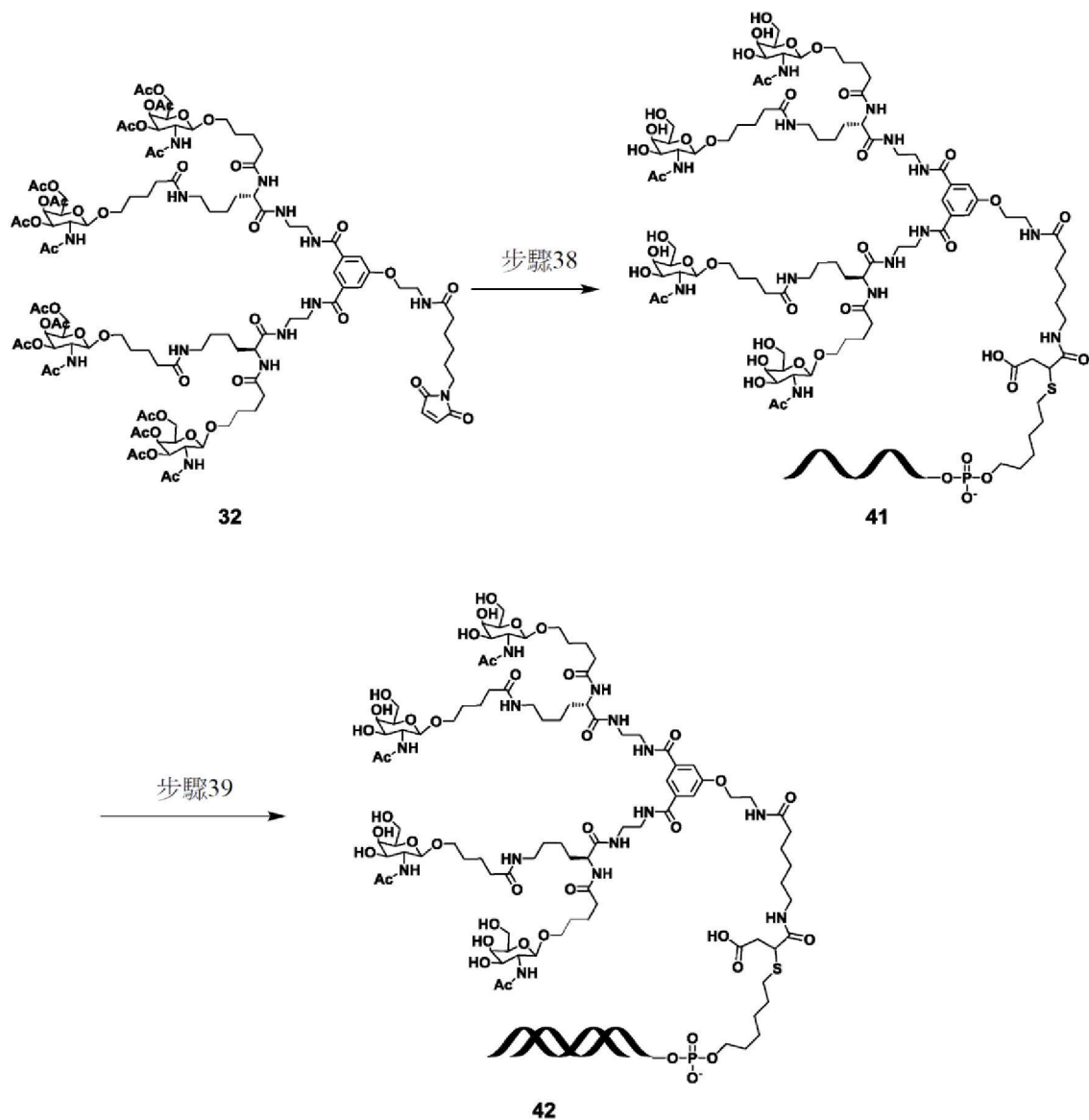
ESI-MS m/z: 1342(M+2H)<sup>2+</sup>，作為脫DMTr體而檢測出

### 步驟37

將步驟36中合成之化合物39(0.0816 g，0.02734 mmol)、O-(苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸鹽(0.0221 g，0.05827 mmol)、及二異丙基乙基胺(0.02 mL，0.1094 mmol)溶解於N,N-二甲基甲醯胺(4 mL)中，添加LCAA-CPG(Chem Gene公司製造，0.4882 g)，於室溫下徹夜攪拌。將混合物過濾分離，藉由二氯甲烷、10%甲醇二氯甲烷溶液、及二乙醚依序清洗後，使其與乙酸酐/吡啶溶液作用，藉此獲得化合物40(49.5 μmol/g，產率89%)。再者，產率係將1%三氟乙酸/二氯甲烷溶液添加於固相載體中，根據可由來自DMTr基之吸收計算之於固相載體中之導入率而算出。

### 實施例9 核酸複合體之合成1

[化145]



## 核酸複合體41之合成

### 步驟38

添加步驟29中合成之化合物32與藉由Molecules，第17卷，13825-13843頁，2012年所記載之方法合成之末端經巰基修飾之寡核苷酸，於室溫下靜置4小時。於反應混合物中添加碳酸鈉，於4°C下靜置一晚。利用陰離子交換層析法(GE Healthcare，MonoQ 5/50GL，10 μm，5.0 mm×50 mm，利用A液：10 mmol/L Tris緩衝液/30%乙腈、B液：10 mmol/L Tris緩衝液/30%乙腈/1 mol/L NaBr進行梯度法)或逆相液體層析法(Waters，X

BridgeC18，5 μm，4.6 mm×250 mm，利用0.1 mol/L乙酸三乙酯銨緩衝液、B液：乙腈進行梯度法)之任一方法進行精製，藉此獲得寡核苷酸不同之3種單鏈之核酸複合體41。

將藉由本實施例合成之核酸複合體之序列及質量分析結果示於第1表。

第1表

[表1]

化合物	序列(5'→3')	理論分子量	實測值
ApoBASO	G(L) <sup>5</sup> (L) <sup>a</sup> t <sup>t</sup> g <sup>g</sup> t <sup>a</sup> t(L) <sup>5</sup> (L) <sup>A</sup> (L)	-	-
41_3'-ApoBASO	G(L) <sup>5</sup> (L) <sup>a</sup> t <sup>t</sup> g <sup>g</sup> t <sup>a</sup> t(L) <sup>5</sup> (L) <sup>A</sup> (L) <u>41</u>	6514	6512
41_5'-ApoBASO	<u>41</u> G(L) <sup>5</sup> (L) <sup>a</sup> t <sup>t</sup> g <sup>g</sup> t <sup>a</sup> t(L) <sup>5</sup> (L) <sup>A</sup> (L)	6514	6511
41_3'-AT3-ssRNA	G(F) <sup>G</sup> (M) <sup>U</sup> (F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <u>41</u>	8971	8971

表中，n表示DNA，N(M)表示2'-O-甲基修飾RNA，N(F)表示2'-氟修飾RNA，N(L)表示LNA，5(L)表示LNAmC，^表示硫代磷酸酯修飾，ss表示正義鏈，as表示反正義鏈，附下劃線之編號表示相當於實施例中之化合物編號之修飾基。以下各表中相同。

核酸複合體42之合成

步驟39

步驟38中合成之單鏈之核酸複合體41\_3'-AT3-ssRNA係藉由混合緩衝液(100 mmol/L乙酸鉀、30 mmol/L 2-[4-(2-羥基乙基)哌啶-1-基]乙磺酸、HEPES)-KOH(pH值7.4)、2 mmol/L 乙酸鎂)進行濃度調整(50 μmol/L)。將上文所述之正義鏈與反正義鏈(50 μmol/L)分別等量混合，於80°C下靜置10分鐘。反正義鏈序列如第2表所記載般。緩緩降低溫度，於

37°C 下靜置1小時，而獲得雙鏈之核酸複合體42。

將藉由本實施例合成之核酸複合體之序列示於第2表。

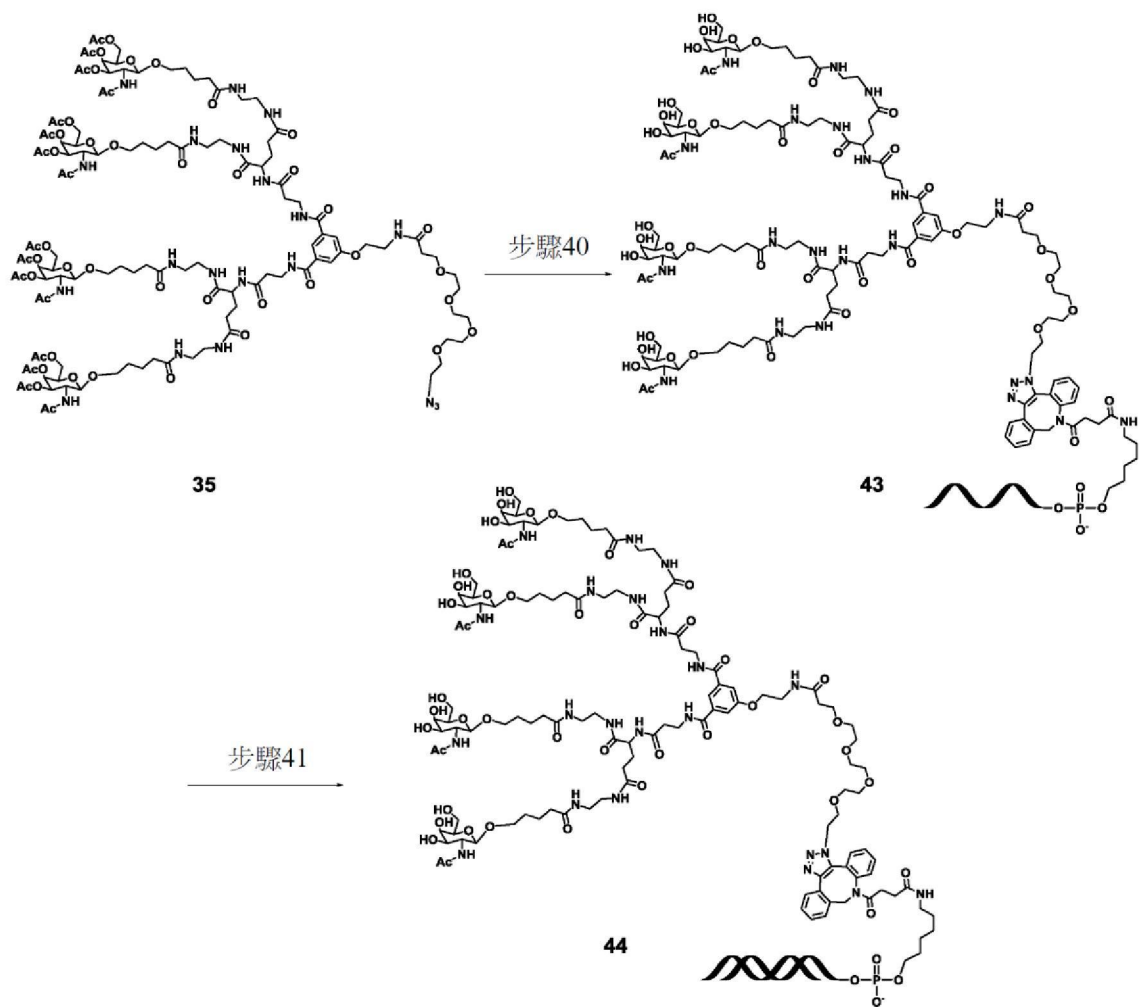
第2表

[表2]

化合物	單鏈名稱	序列(5'→3')
42_3'-AT3-siRNA	41_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <b>41</b>
	AT3-asRNA	U(M)^U(F)^G(M)A(F)A(M)G(F)U(M)A(F)A(M)A(F) U(M)G(M)G(M)U(F)G(M)U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)C(M)^A(M)^G(M)

實施例10 核酸複合體之合成2

[化146]



### 核酸複合體43之合成

#### 步驟40

使用步驟32中合成之化合物35與藉由ACS Nano，第9卷，9652-9664頁，2015年所記載之方法合成之寡核苷酸，藉由與實施例9之步驟38同樣之反應條件、程序獲得單鏈之核酸複合體43。

將藉由本實施例合成之核酸複合體之序列及質量分析結果示於第3表。

#### 第3表

[表3]

化合物	序列(5'→3')	理論分子量	實測值
43_5'-B2M-ssRNA	<b>43</b> A(F)G(M)G(F)A(M)C(F)U(M)G(F)G(M)U(F)C(M) U(F)U(F)U(M)C(F)U(M)A(F)U(M)C(F)U(M)^C(F)^U(M)	9529	9528

## 核酸複合體44之合成

### 步驟41

藉由與實施例9之步驟39同樣之方法獲得雙鏈之核酸複合體44。

將藉由本實施例合成之核酸複合體之序列示於第4表。

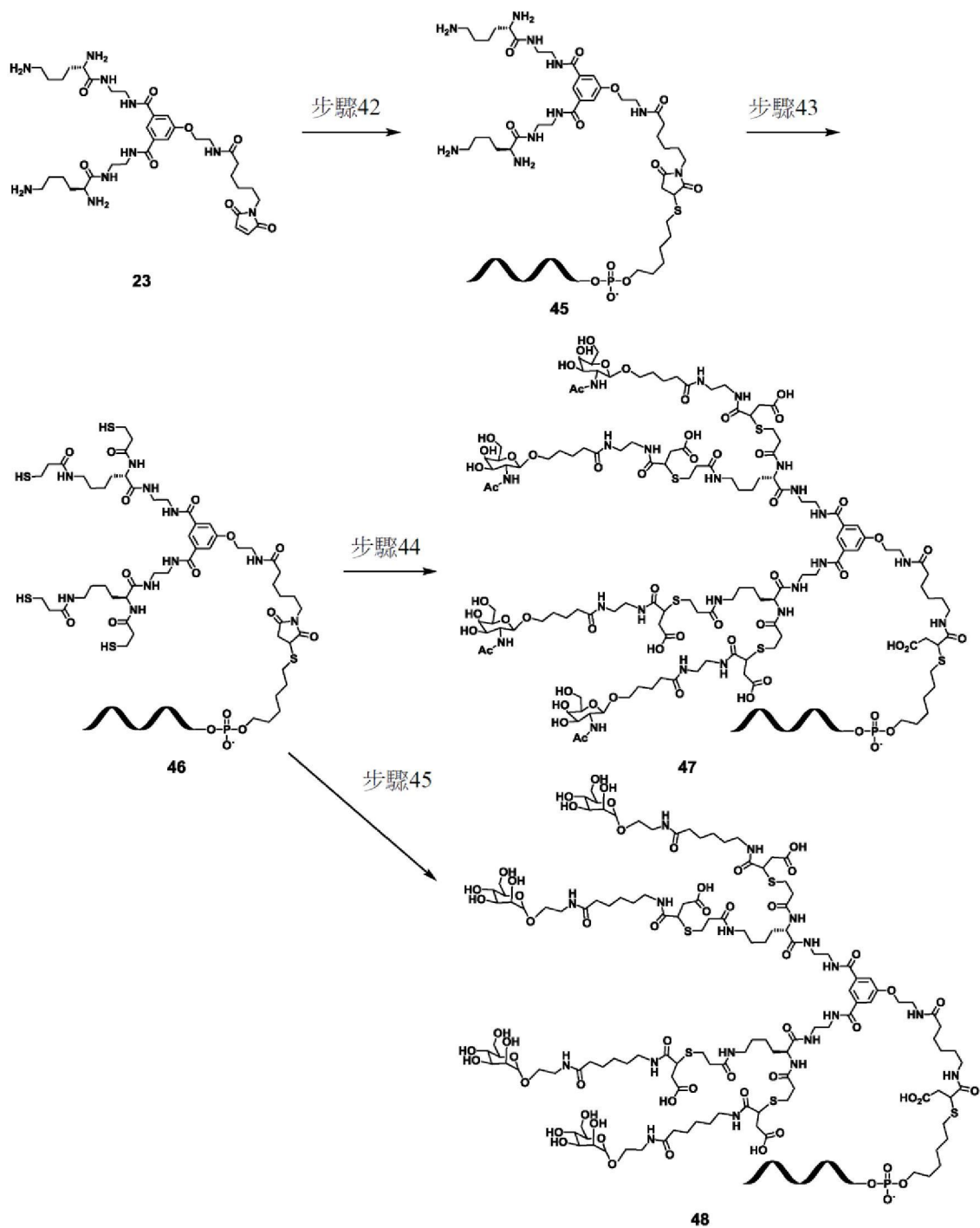
### 第4表

[表4]

化合物	單鏈名稱	序列(5'→3')
44_3'-B2M-siRNA	43_5'-B2M-ssRNA	<b>43</b> A(F)G(M)G(F)A(M)C(F)U(M)G(F)G(M)U(F)C(M) U(F)U(F)U(M)C(F)U(M)A(F)U(M)C(F)U(M)^C(F)^U(M)
	B2M-as-RNA	A(F)^G(M)^A(F)G(M)A(F)U(M)A(F)G(M)A(F)A(M)A(M) G(F)A(M)C(F)C(M)A(F)G(M)U(F)C(M)C(F)U(M)^U(F)^G(M)

## 實施例11 核酸複合體之合成3

[化147]



## 核酸複合體45之合成

### 步驟42

使用步驟20中合成之化合物23(648 nmol)與藉由Molecules，第17卷，13825-13843頁，2012年所記載之方法合成之末端經巰基修飾之寡核苷酸(216 nmol)，藉由與實施例9之步驟38同樣之方法獲得核酸複合體  
第158頁(發明說明書)

45。

核酸複合體46之合成

步驟43

於步驟42中合成之化合物45(100 nmol)中添加N-丁二醯亞胺基3-(2-吡啶基二硫基)丙酸酯(6.3 mg, 20  $\mu$ mol)之二甲基亞砷溶液，於磷酸緩衝液中在室溫下靜置4小時。於反應溶液中添加二硫代蘇糖醇(15.4 mg, 100  $\mu$ mol)，於室溫下靜置一晚。對混合物進行凝膠過濾處理(Nap管柱，GE Healthcare公司製造，溶出溶劑：20 mmol/L乙酸/乙酸鈉緩衝液(pH值5.0))及超過濾，藉此獲得核酸複合體46。

核酸複合體47之合成

步驟44

使用步驟43中合成之化合物46與參考例1之步驟1中合成之化合物2，藉由與實施例9之步驟38同樣之方法獲得單鏈之核酸複合體47。

核酸複合體48之合成

步驟45

使用步驟43中合成之化合物46與藉由Bioconjugate Chemistry，第14卷，232-238頁，2003年所記載之方法合成之甘露糖順丁烯二醯亞胺加成物，藉由與實施例9之步驟38同樣之方法獲得單鏈之核酸複合體48。

將藉由本實施例合成之核酸複合體之序列及質量分析結果示於第5表。

第5表

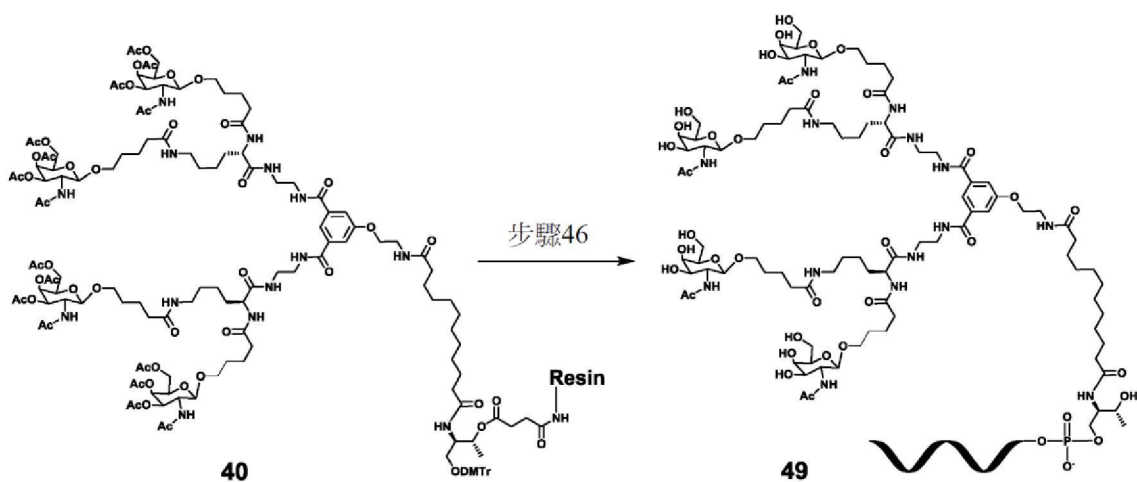
[表5]

化合物	序列(5'→3')	理論分子量	實測值
45 5'-CD45-ASO	<b>45</b> C(L)^C(L)^A(L)^A(L)^a^t^g^c^a^a^g^A(L)^G(L)^T(L)^T(L)	6479	6479
46 5'-CD45-ASO	<b>46</b> C(L)^C(L)^A(L)^A(L)^a^t^g^c^a^a^g^A(L)^G(L)^T(L)^T(L)	6832	6832
47 5'-CD45-ASO	<b>47</b> C(L)^C(L)^A(L)^A(L)^a^t^g^c^a^a^g^A(L)^G(L)^T(L)^T(L)	8695	8696
48 5'-CD45-ASO	<b>48</b> C(L)^C(L)^A(L)^A(L)^a^t^g^c^a^a^g^A(L)^G(L)^T(L)^T(L)	8587	8585

## 實施例12 核酸複合體之合成4

### 核酸複合體49之合成

[化148]



### 步驟46

使用核酸合成裝置(Ultra Fast Parallel Syntheizer, Sigma公司製造, 以下稱為UFPS), 以0.2  $\mu\text{mol}$ 尺度進行反正義鏈之3'末端具有GalNAc基之寡核苷酸複合體之合成(分別稱為G-CH1179-s、G-CH0099-s、及G-CH1180-s)。固相載體使用步驟37中合成之化合物40。二甲氧基三苯甲基dT亞磷醯胺(SAFC-PROLIGO公司)係藉由乙腈調整為0.06 mol/L。使用5-苄硫基-1H-四唑(SAFC-PROLIGO公司)、及0.06 mol/L dT亞磷醯胺之乙腈溶液作為亞磷醯胺之活化物, 時間各設為10分鐘而進行縮合反應。反應後, 浸漬於28%氨溶液中, 於55°C下放置4小時。於減壓下進行濃縮,

添加1-丁醇而停止反應。使用逆相液體層析法(資生堂，CAPSELL PAK C18，SG300，6.0 mm×75 mm，利用5%乙腈/0.1%乙酸三乙酯銨緩衝液、B液：50%乙腈/水進行梯度法)進行精製，藉此獲得單鏈之核酸複合體49。

將藉由本實施例合成之核酸複合體之序列及質量分析結果示於第6表。

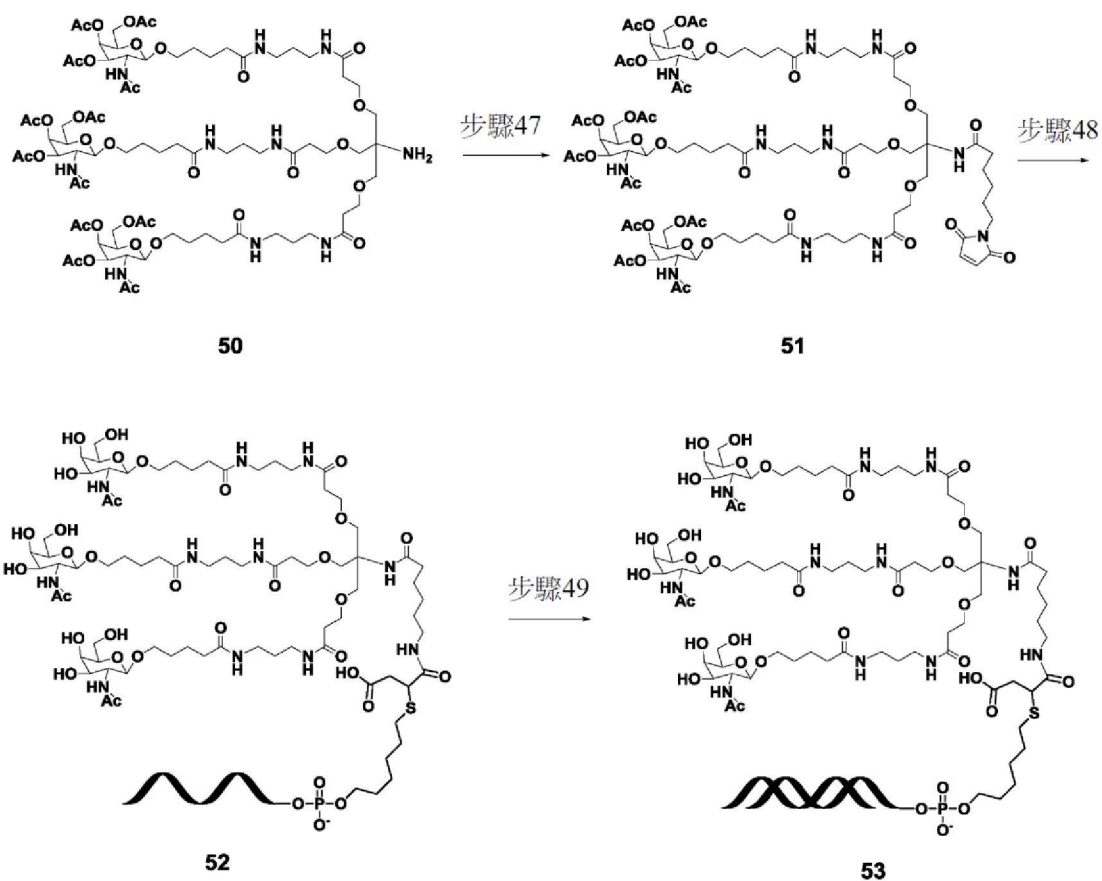
第6表

[表6]

化合物	序列(5'→3')	理論分子量	實測值
49_3'-dT10	Ttttttttt <b>49</b>	5120	5120

比較例1 核酸複合體之合成

[化149]



## 核酸複合體52之合成

### 步驟47

使用藉由Journal of American Chemical Society，第136卷，16958-16961頁，2014年所記載之方法合成之化合物50(0.0796 g，0.044 mmol)，藉由與實施例6之步驟29同樣之方法獲得化合物51(0.014 g，產率19%)。

ESI-MS  $m/z$ : 994(M+2H)<sup>2+</sup>

### 步驟48

使用步驟47中合成之化合物51，藉由與實施例9之步驟38同樣之方法獲得寡核苷酸不同之3種單鏈之核酸複合體52。

將藉由本實施例合成之核酸複合體之序列及質量分析結果示於第7

表。

第7表

[表7]

化合物	序列 (5'→3')	理論分子量	實測值
52_3'-ApoBASO	G(L) <sup>5</sup> (L) <sup>a</sup> t <sup>t</sup> g <sup>g</sup> t <sup>a</sup> t <sup>t</sup> (L) <sup>5</sup> (L) <sup>A</sup> (L) <b>52</b>	6148	6147
52_5'-ApoBASO	<b>52</b> G(L) <sup>5</sup> (L) <sup>a</sup> t <sup>t</sup> g <sup>g</sup> t <sup>a</sup> t <sup>t</sup> (L) <sup>5</sup> (L) <sup>A</sup> (L)	6148	6148
52_3'-AT3-ssRNA	G(F) <sup>5</sup> G(M) <sup>5</sup> U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <b>52</b>	8564	8564

核酸複合體53之合成

步驟49

使用步驟48中合成之化合物52\_3'-AT3-ssRNA，藉由與實施例9之步驟39同樣之方法獲得雙鏈之核酸複合體53。

將藉由本實施例合成之核酸複合體之序列示於第8表。

第8表

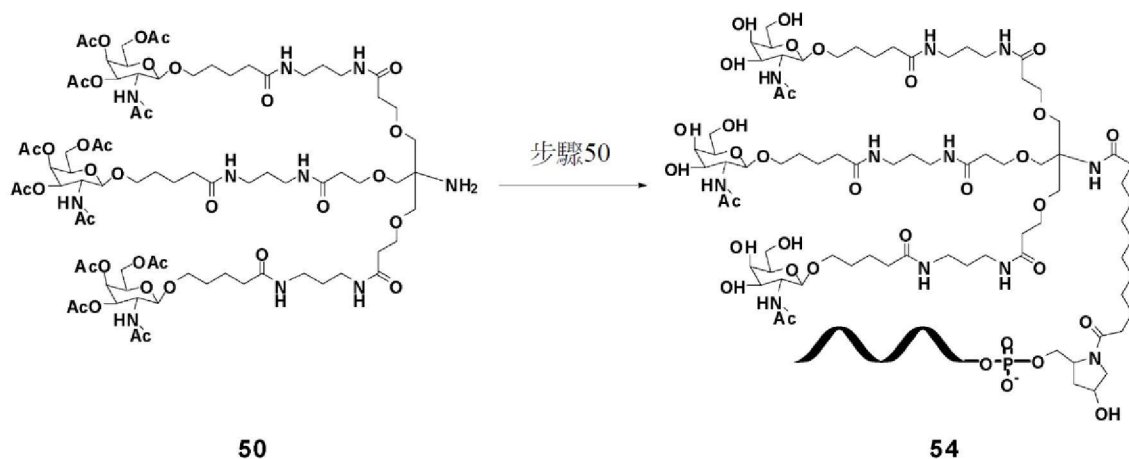
[表8]

化合物	單鏈名稱	序列 (5'→3')
53_3'-AT3-siRNA	52_3'-AT3-ssRNA	G(F) <sup>5</sup> G(M) <sup>5</sup> U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <b>52</b>
	AT3-asRNA	U(M) <sup>5</sup> U(F) <sup>5</sup> G(M)A(F)A(M)G(F)U(M)A(F)A(M)A(F) U(M)G(M)G(M)U(F)G(M)U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)C(M) <sup>5</sup> A(M) <sup>5</sup> G(M)

比較例2 核酸複合體之合成

核酸複合體54之合成

[化150]



藉由 *Journal of American Chemical Society*，第 136 卷，16958-16961 頁，2014 年所記載之方法獲得具有 ApoBASO (參照第 1 表) 之單鏈之核酸複合體 54。

#### 試驗例 1 核酸複合體對小鼠初代肝細胞之活體外 (in vitro) 活性

對於實施例 9、比較例 1 及比較例 2 中合成之各核酸複合體中之 ApoBASO (受檢物 1)、核酸複合體 54 (受檢物 2)、52\_3'-ApoBASO (受檢物 3)、52\_5'-ApoBASO (受檢物 4)、41\_3'-ApoBASO (受檢物 5)、41\_5'-ApoBASO (受檢物 6)，分別藉由以下之方法，導入至源自 CD-1 之小鼠初代肝細胞 (Life Technologies 公司製造，目錄編號 MSCP10) 中。

將以最終濃度成為 30、10 或 3 nmol/L 之方式藉由 Opti-MEM (GIBCO 公司，31985) 稀釋而獲得之各核酸複合體以每孔 20  $\mu$ L 之方式分注於 96 孔之培養盤中後，以細胞數成為 12500/80  $\mu$ L/孔之方式播種懸浮於含有初代幹細胞之解凍及培養補充品 (Primary Hepatocyte Thawing and Plating Supplements) (Life Technologies 公司製造，目錄編號 CM3000) 之 William 培養基 (William's E Medium) (Life Technologies 公司製造，目錄編號 A12176-01) 中之小鼠初代肝細胞，於 37°C、5% CO<sub>2</sub> 條件下培養 6 小時後，

小心去除培養上清液，添加含有初代幹細胞維持補充品(Primary Hepatocyte Maintenance Supplements)(Life Technologies公司製造，目錄編號CM4000)之William培養基。又，播種不做任何處理之細胞作為陰性對照群。

將導入有各製劑之細胞於37°C之5%CO<sub>2</sub>培養箱內培養18小時，藉由經冰浴冷卻之磷酸緩衝化生理食鹽水進行清洗，使用SuperPrep Cell Lysis & RT Kit for qPCR(東洋紡公司製造，目錄編號SCQ-201)，依照製品隨附之說明書所記載之方法，進行全部RNA之回收、及藉由以所獲得之全部RNA作為模板之逆轉錄反應進行之cDNA之製作。

以所獲得之cDNA作為模板，以TaqMan(註冊商標)基因表現分析探針(TaqMan gene expression assay's probe)(Applied Biosystems公司製造)作為探針，使用QuantStudio 12K Flex即時PCR(polymerase chain reaction，聚合酶鏈反應)系統(ABI公司製造)，依照隨附之使用說明書所記載之方法進行PCR反應，藉此使Apolipoprotein(載脂蛋白)B(別名Apolipoprotein-B100/Apolipoprotein-B48，以下表示為apob)基因及作為構成性表現基因之甘油醛3-磷酸脫氫酶(D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，以下表示為gapdh)基因進行PCR反應，分別測定mRNA擴增量，以gapdh之mRNA擴增量作為內部對照，算出apob之mRNA之準定量值。將以同樣方式測得之陰性對照中之apob之mRNA之準定量值設為1，根據apob之mRNA之準定量值求出apob之mRNA之表現率。將所獲得之apob之mRNA之表現率之結果以相對於陰性對照之apob mRNA表現率之抑制率之形式示於第9表及第10表。再者，各表分別表示獨立之試驗之結果。

## 第9表

[表9]

受檢物	受檢物1			受檢物2		
用量[nmol/L]	30	10	3	30	10	3
apob mRNA量 [抑制率%]	20.89	1.46	7.22	98.65	85.96	47.78
受檢物	受檢物3			受檢物4		
用量[nmol/L]	30	10	3	30	10	3
apob mRNA量 [抑制率%]	98.46	71.13	37.32	99.99	97.23	73.02

## 第10表

[表10]

受檢物	受檢物1			受檢物2		
用量[nmol/L]	30	10	3	30	10	3
apob mRNA量 [抑制率%]	34.28	12.17	4.67	96.85	89.07	65.24
受檢物	受檢物5			受檢物6		
用量[nmol/L]	30	10	3	30	10	
apob mRNA量 [抑制率%]	98.55	94.13	74.47	99.16	98.22	

根據第9表及第10表可知，本發明之核酸複合體會抑制導入至小鼠初代肝細胞中後之apob基因之mRNA之表現。

#### 試驗例2 核酸複合體於小鼠中之活體內(in vivo)活性

對於實施例9、比較例1及比較例2中合成之各核酸複合體中之ApoBASO(受檢物1)、核酸複合體54(受檢物2)、52\_3'-ApoBASO(受檢物3)、52\_5'-ApoBASO(受檢物4)、41\_3'-ApoBASO(受檢物5)、41\_5'-ApoBASO(受檢物6)，分別藉由以下之方法實施活體內(in vivo)評價試

驗。再者，各核酸複合體根據試驗而藉由磷酸緩衝化生理食鹽水 (DPBS)(Nacalai Tesque公司製造)加以稀釋使用。將小鼠(BALB/cA，自CLEA Japan獲得)馴化飼養後，對各小鼠以0.75 mg/kg或0.25 mg/kg之方式皮下注射投予各核酸複合體。又，作為對照群，僅對小鼠皮下注射投予DPBS。投予起3天後自淺側頭靜脈採集血清。其後將動物安樂死，取肝臟以液態氮冷凍保存。對於肝臟冷凍樣品，使用Trizol(註冊商標)RNA分離試劑(Life Technologies公司製造，目錄編號15596026)及RNAeasy mini kit(QIAGEN公司製造，目錄編號74106)，依照製品隨附之說明書所記載之方法，進行全部RNA之回收。進而使用Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit(轉錄第一鏈cDNA合成試劑盒)(Roche公司製造，目錄編號04897030001)，依照製品隨附之說明書所記載之方法，進行藉由以所獲得之全部RNA作為模板之逆轉錄反應進行之cDNA之製作。

以所獲得之cDNA作為模板，以TaqMan(註冊商標)基因表現分析探針(TaqMan gene expression assay's probe)(Applied Biosystems公司製造)作為探針，使用QuantStudio 12K Flex即時PCR系統(ABI公司製造)，依照隨附之使用說明書所記載之方法進行PCR反應，藉此使apob基因及gapdh基因進行PCR反應，分別測定mRNA擴增量，以gapdh之mRNA擴增量作為內部對照，算出apob之mRNA之準定量值。將以同樣之方式測得之對照群中之apob之mRNA之準定量值設為1，根據apob之mRNA之準定量值求出apob之mRNA之表現率。又，使用LabAssay膽固醇(和光純藥工業公司製造，目錄編號294-65801)，依照隨附之使用說明書所記載之方法測定血清中之總膽固醇濃度。將所獲得之apob之mRNA之表現抑制率及血清中總膽固醇濃度示於第11表及第12表。

第11表

[表11]

受檢物	受檢物1	受檢物2	受檢物3	受檢物4	對照群
用量[mg/kg]	0.75	0.75	0.75	0.75	-
肝臟中apob mRNA量 [抑制率%]	56.46	94.07	90.21	97.74	-
血清中總膽固醇濃度 [mg/dL]	83.36	45.37	48.98	41.70	116.06

第12表

[表12]

受檢物	受檢物1		受檢物2		對照群
用量[mg/kg]	0.75	0.25	0.75	0.25	-
肝臟中apob mRNA量 [抑制率%]	75.28	24.23	95.78	74.39	-
血清中總膽固醇濃度 [mg/dL]	95.68	100.35	46.45	102.85	98.53
受檢物	受檢物5		受檢物6		
用量[mg/kg]	0.75	0.25	0.75	0.25	
肝臟中apob mRNA量 [抑制率%]	98.12	82.10	99.27	96.05	
血清中總膽固醇濃度 [mg/dL]	34.61	61.55	25.24	39.65	

根據第11表及第12表可知，本發明之核酸複合體(受檢物5及6)於活體內會降低apob基因之表現，減少血中之總膽固醇濃度。

### 試驗例3 核酸複合體對小鼠初代肝細胞之活體外(in vitro)活性

對於實施例9及比較例1中獲得之各核酸複合體中之53\_3'-AT3-siRNA(受檢物7)、42\_3'-AT3-siRNA(受檢物8)，分別藉由以下之方法導入至源自CD-1之小鼠初代肝細胞(Life Technologies公司製造，目錄編號

MSCP10)中。

將以最終濃度成為 300、100 或 30 nmol/L 之方式藉由 Opti-MEM(GIBCO公司, 31985)稀釋而獲得之各核酸複合體以每孔20  $\mu$ L之方式分注於96孔之培養盤中後, 以細胞數成為12500/80  $\mu$ L/孔之方式播種懸浮於含有初代幹細胞之解凍及培養補充品(Primary Hepatocyte Thawing and Plating Supplements)(Life Technologies 公司製造, 目錄編號CM3000)之William培養基(William's E Medium)(Life Technologies公司製造, 目錄編號A12176-01)中之小鼠初代肝細胞, 於37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>條件下培養6小時後, 小心去除培養上清液, 添加含有初代幹細胞維持補充品(Primary Hepatocyte Maintenance Supplements)(Life Technologies公司製造, 目錄編號CM4000)之William培養基。又, 播種不做任何處理之細胞作為陰性對照群。

將導入有各製劑之細胞於37 $^{\circ}$ C之5%CO<sub>2</sub>培養箱內培養18小時, 藉由經冰浴冷卻之磷酸緩衝化生理食鹽水進行清洗, 使用SuperPrep Cell Lysis & RT Kit for qPCR(東洋紡公司製造, 目錄編號SCQ-201), 依照製品隨附之說明書所記載之方法, 進行全部RNA之回收及利用以所獲得之全部RNA為模板之逆轉錄反應進行之cDNA之製作。

以所獲得之cDNA作為模板, 以TaqMan(註冊商標)基因表現分析探針(TaqMan gene expression assay's probe)(Applied Biosystems公司製造)作為探針, 使用QuantStudio 12K Flex即時PCR系統(ABI公司製造), 依照隨附之使用說明書所記載之方法進行PCR反應, 藉此使Serpine peptidase inhibitor(絲胺酸蛋白酶抑制物肽酶抑制劑), clade(分支)C(antithrombin(抗凝血酶)), member 1(別名antithrombin(抗凝血

酶)III，以下表示為AT3)基因及作為構成性表現基因之甘油醛3-磷酸脫氫酶(D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，以下表示為gapdh)基因進行PCR反應，分別測定mRNA擴增量，以gapdh之mRNA擴增量作為內部對照，算出AT3之mRNA之準定量值。將以同樣方式測得之陰性對照中之AT3之mRNA之準定量值設為1，根據AT3之mRNA之準定量值求出AT3之mRNA之表現率。將所獲得之AT3之mRNA之表現率之結果以相對於陰性對照之AT3 mRNA表現率之抑制率之形式示於第13表中。

第13表

[表13]

受檢物	受檢物7			受檢物8		
用量[nmol/L]	300	100	30	300	100	30
AT3 mRNA量 [抑制率%]	11.906	3.0612	-6.657	94.428	92.451	88.378

根據第13表可知，本發明之核酸複合體(受檢物8)會抑制導入至小鼠初代肝細胞中後之AT3基因之mRNA之表現。

#### 試驗例4 核酸複合體於小鼠中之活體內(in vivo)活性

對於實施例9及比較例1中獲得之各核酸複合體中之53\_3'-AT3-siRNA(受檢物7)、42\_3'-AT3-siRNA(受檢物8)，分別藉由以下之方法實施活體內(in vivo)評價試驗。再者，各核酸複合體根據試驗而藉由磷酸緩衝化生理食鹽水(DPBS)(Nacalai Tesque公司製造)加以稀釋使用。將小鼠(BALB/cA，自CLEA Japan獲得)馴化飼養後，對小鼠分別以1.5 mg/kg或0.5 mg/kg之方式皮下注射投予各核酸複合體。又，作為對照群，僅對小鼠皮下注射投予PBS。自投予起3天後在異氟醚麻醉下自後大靜脈後部靜

脈採血。將採得之血液與含有3.2 M檸檬酸鈉及5 mmol/L之D-葡萄糖之抗凝固液以體積比9：1加以混合，將離心後之上清液回收，藉此獲得血漿。採血後將動物安樂死，取肝臟以液態氮冷凍保存。對於肝臟冷凍樣品，使用Trizol(註冊商標)RNA分離試劑(Life Technologies公司製造，目錄編號15596026)及RNAeasy mini kit(QIAGEN公司製造，目錄編號74106)，依照製品隨附之說明書所記載之方法，進行全部RNA之回收。進而使用Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit(轉錄第一鏈cDNA合成試劑盒)(Roche公司製造，目錄編號04897030001)，依照製品隨附之說明書所記載之方法，進行藉由以所獲得之全部RNA作為模板之逆轉錄反應進行之cDNA之製作。

以所獲得之cDNA作為模板，以TaqMan(註冊商標)基因表現分析探針(TaqMan gene expression assay's probe)(Applied Biosystems公司製造)作為探針，使用QuantStudio 12K Flex即時PCR系統(ABI公司製造)，依照隨附之使用說明書所記載之方法進行PCR反應，藉此使AT3基因及gapdh基因進行PCR反應，分別測定mRNA擴增量，以AT3之mRNA擴增量作為內部對照，算出AT3之mRNA之準定量值。將以同樣方式測得之對照群中之AT3之mRNA之準定量值設為1，根據AT3之mRNA之準定量值求出AT3之mRNA之表現率。又，使用小鼠抗凝血酶III ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay，酶聯免疫吸附分析法)試劑盒(Mouse Antithrombin III ELISA Kit)(Abcam公司製造，目錄編號ab108800)，依照隨附之使用說明書所記載之方法測定血漿中之AT3蛋白質濃度。將所獲得之AT3之mRNA之表現抑制率及血漿中AT3蛋白質濃度示於第14表。

第14表

[表14]

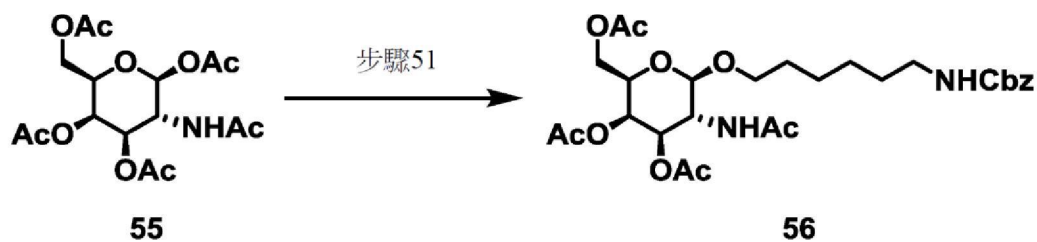
受檢物	對照群	受檢物7		受檢物8	
用量[mg/kg]	-	1.5	0.5	1.5	0.5
肝臟中AT3 mRNA量 [抑制率%]	-	-13.90	2.63	47.76	31.37
血漿中AT3蛋白質濃度 [μg/mL]	287.32	263.03	287.42	147.54	235.68

根據第14表可知，本發明之核酸複合體(受檢物8)於活體內會降低AT3基因之表現，減少血中之AT3蛋白質濃度。

### 參考例3 糖配體單元之合成

#### 化合物56之合成

[化151]



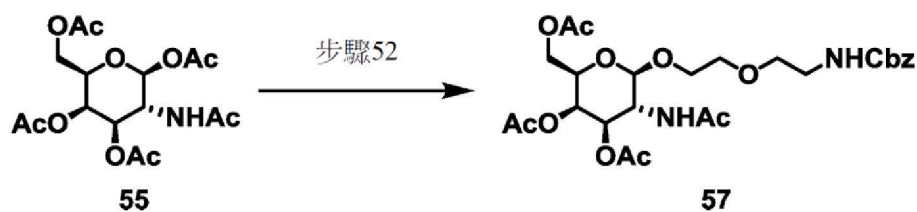
#### 步驟51

藉由Journal of Medicinal Chemistry，第59卷，2718-2733頁，2016年所記載之方法，由化合物55(1.200 g，3.640 mmol)合成化合物56(1.050 g，產率50%)。

ESI-MS m/z: 582(M+H)<sup>+</sup>

#### 化合物57之合成

[化152]



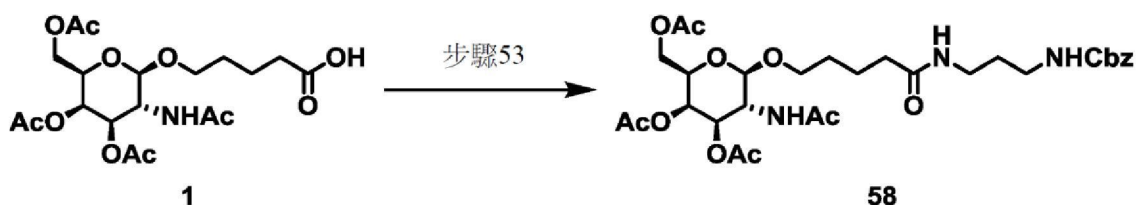
### 步驟52

將化合物55(4.000 g, 10.27 mmol)溶解於二氯甲烷(60 mL)中，添加2-(2-羥基乙氧基)乙基胺基甲酸苄酯(2.700 g, 11.30 mmol)、及三氟甲磺酸(0.1360 mL, 1.541 mmol)，於回流條件下徹夜攪拌。於反應液中添加10 wt%碳酸鉀水溶液，與二氯甲烷分液後，以水清洗有機相，藉由無水硫酸鈉加以乾燥。於減壓下將溶劑蒸餾去除，置換為2-甲基四氫呋喃並進行濃縮。將殘渣滴加至庚烷中，將所獲得之結晶進行過濾，藉此獲得化合物57(5.130 g, 產率88%)。

ESI-MS  $m/z$ : 570(M+H)<sup>+</sup>

### 化合物58之合成

[化153]



### 步驟53

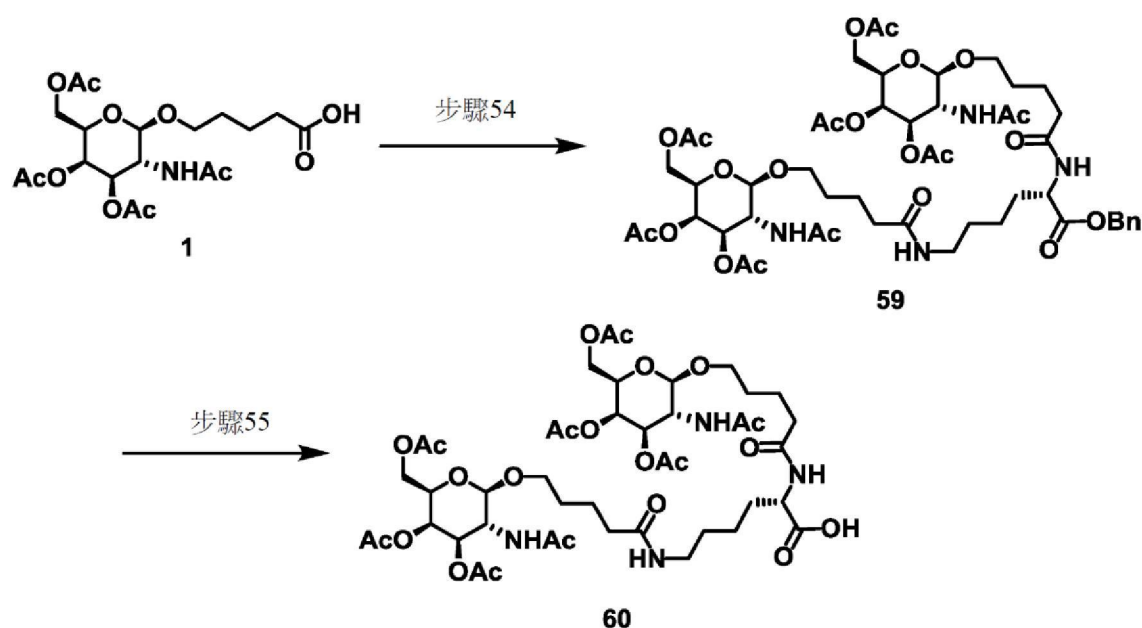
將步驟1所記載之化合物1(898.0 mg, 2.007 mmol)溶解於二氯甲烷(15 mL)中，添加1-羥基苯并三唑一水合物(338.0 mg, 2.208 mmol)、1-

(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二醯亞胺鹽酸鹽(343 mg, 2.208 mmol)、及 N-1-Z-1,3-二胺基丙烷鹽酸鹽(0.4910 mL, 2.208 mmol)，於室溫下攪拌3小時。於反應液中添加水，藉由二氯甲烷進行分液後，藉由飽和碳酸氫鈉水溶液清洗有機層，藉由無水硫酸鈉加以乾燥。於減壓下將溶劑蒸餾去除，利用矽膠管柱層析法(氯仿/甲醇=90/10)對殘渣進行精製，藉此獲得化合物58(873.0 mg, 產率68%)。

ESI-MS m/z: 639(M+H)<sup>+</sup>

化合物60之合成

[化154]



#### 步驟54

將步驟1所記載之化合物1(3.00 g, 6.70 mmol)溶解於二氯甲烷(60 mL)中，於室溫下添加L-離胺酸苄酯二對甲苯磺酸鹽(1.75 g, 3.02 mmol)、三乙胺(0.935 mL, 6.70 mmol)、1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基

碳二醯亞胺鹽酸鹽(1.29 g, 6.70 mmol)、1-羥基苯并三唑一水合物(103 mg, 0.670 mmol)並攪拌2.5小時。以水與飽和碳酸氫鈉水溶液清洗反應液，藉由無水硫酸鈉加以乾燥。於減壓下將溶劑蒸餾去除，利用矽膠管柱層析法(氯仿/甲醇=90/10)對殘渣進行精製，藉此定量獲得化合物59。

ESI-MS  $m/z$ : 1096(M+H)<sup>+</sup>

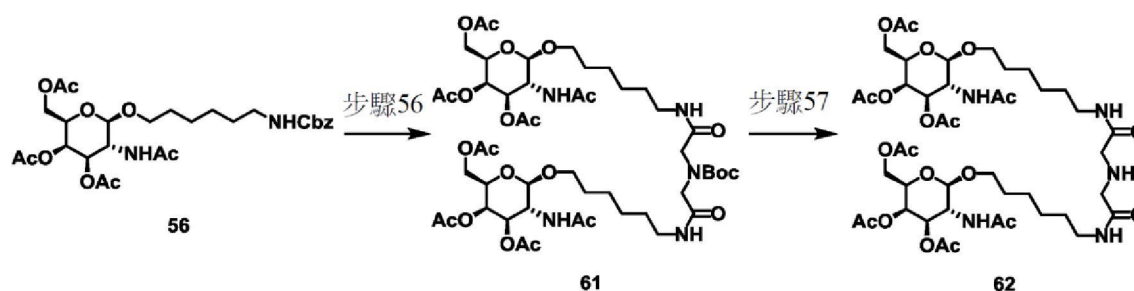
#### 步驟55

將步驟54中合成之化合物59(2.30 g, 2.10 mmol)溶解於四氫呋喃(46 mL)中，於室溫下添加10%鈀碳粉末(含水晶，54.29%，424 mg)，於氫氣環境下徹夜攪拌。過濾反應液，於減壓下將溶劑蒸餾去除，藉此定量獲得化合物60。

ESI-MS  $m/z$ : 1006(M+H)<sup>+</sup>

#### 化合物62之合成

[化155]



#### 步驟56

將亞胺基二乙酸(東京化成工業公司製造，1.5 g, 6.43 mmol)溶解於二氯甲烷(30 mL)中，添加五氟三氟乙酸(東京化成工業公司製造，2.75 mL, 16.08 mmol)、三乙胺(4.48 mL, 32.2 mmol)並攪拌4小時。於反應液中添加10%檸檬酸水溶液，藉由氯仿進行萃取後，利用飽和食鹽水清洗

第 175 頁(發明說明書)

有機層，利用無水硫酸鎂加以乾燥。然後，將步驟51中合成之化合物56(2 g, 3.45 mmol)溶解於乙酸乙酯(10 mL)與乙腈(10 mL)之混合液中，藉由鈀/碳進行催化氫還原。於減壓下將所獲得之溶液部分之溶劑蒸餾去除，藉此獲得化合物61之粗產物。

ESI-MS  $m/z$ : 1091(M+H)<sup>+</sup>

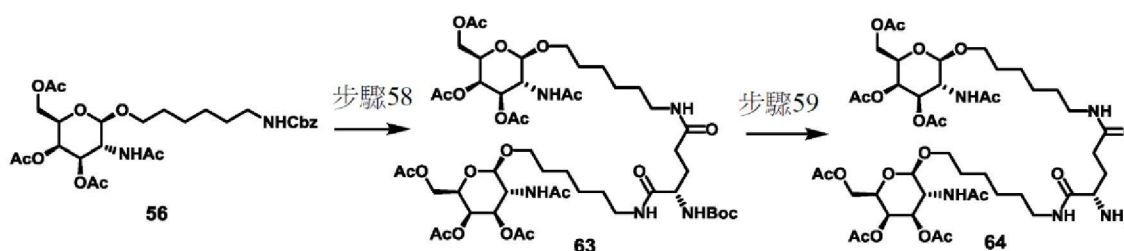
### 步驟57

使用步驟56中合成之化合物61(1.5 g, 1.37 mmol)，藉由與參考例1之步驟3同樣之方法定量獲得化合物62。

ESI-MS  $m/z$ : 990(M+H)<sup>+</sup>

化合物64之合成

[化156]



### 步驟58

使用N-(第三丁氧基羰基)-L-麩胺酸(東京化成工業公司製造)，並且使用步驟51中合成之化合物56(1.855 g, 3.19 mmol)，藉由與參考例3之步驟56同樣之方法獲得化合物63之粗精製物。

ESI-MS  $m/z$ : 1105(M+H)<sup>+</sup>

### 步驟59

使用步驟58中合成之化合物63(1.421 g, 1.2866 mmol)，藉由與參





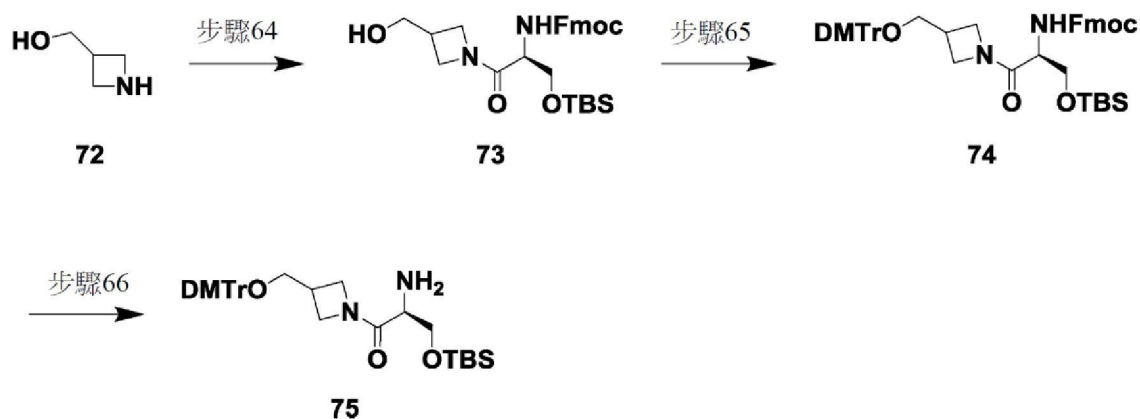
將藉由Journal of Organic Chemistry，第74卷，6837-6842頁，2009年所記載之方法合成之化合物65(110 mg，0.212 mmol)溶解於四氫呋喃(2 mL)中，添加N-(1R,8S,9s)-雙環[6.1.0]壬-4-炔-9-基甲氧基羰基-1,8-二胺基-3,6-二氧雜辛烷 N-(1R,8S,9s)-Bicyclo[6.1.0]non-4-yn-9-ylmethyloxycarbonyl-1,8-diamino-3,6-dioxaoctane(東京化成工業公司製造，72 mg，0.222 mmol)，於室溫下攪拌1小時。於反應液中添加水，藉由氯仿進行萃取後，利用飽和食鹽水清洗有機層，利用無水硫酸鎂加以乾燥。於減壓下將溶劑蒸餾去除，利用胺基矽膠管柱層析法(氯仿/甲醇=90/10)對殘渣進行精製，藉此獲得化合物71(160 mg，產率90%)。

ESI-MS  $m/z$ : 845(M+H)<sup>+</sup>

<sup>1</sup>H-NMR(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 0.88 (3H, s), 0.91-1.09 (3H, m), 1.20-1.25 (1H, m), 1.52-1.59 (4H, m), 1.80-1.85 (2H, m), 2.19-2.25 (4H, m), 2.59-2.68 (1H, m), 2.84-2.90 (4H, m), 3.02-3.11 (3H, m), 3.35-3.44 (5H, m), 3.49-3.53 (5H, m), 3.54-3.58 (2H, m), 3.62 (5H, s), 3.78 (6H, s), 4.13 (2H, d, J = 6.4 Hz), 4.21 (2H, t, J = 7.2 Hz), 6.79-6.84 (4H, m), 7.18-7.21 (1H, m), 7.24-7.27 (2H, m), 7.28-7.32 (4H, m), 7.39-7.44 (2H, m).

化合物75之合成

[化160]



### 步驟64

使用化合物72(AstaTech公司製造，100 mg，1.148 mmol)及Fmoc-Ser(tBuMe<sub>2</sub>Si)-OH(渡邊化學工業公司製造，532 mg，1.205 mmol)，藉由與實施例1之步驟8同樣之方法獲得化合物73(410 mg，產率70%)。

ESI-MS m/z: 511(M+H)<sup>+</sup>

<sup>1</sup>H-NMR(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 0.06 (6H, s), 0.90 (9H, s), 2.76-2.85 (1H, m), 3.65-3.86 (5H, m), 4.02-4.23 (3H, m), 4.32-4.40 (4H, m), 5.55 (1H, d, J = 8.0 Hz), 7.31 (2H, t, J = 7.6 Hz), 7.40 (2H, t, J = 7.6 Hz), 7.59 (2H, d, J = 7.6 Hz), 7.76 (2H, d, J = 7.6 Hz).

### 步驟65

使用步驟64中合成之化合物73(410 mg，0.803 mmol)，藉由與參考例2之步驟4同樣之方法獲得化合物74之粗產物(680 mg)。

ESI-MS m/z: 814(M+H)<sup>+</sup>

### 步驟66

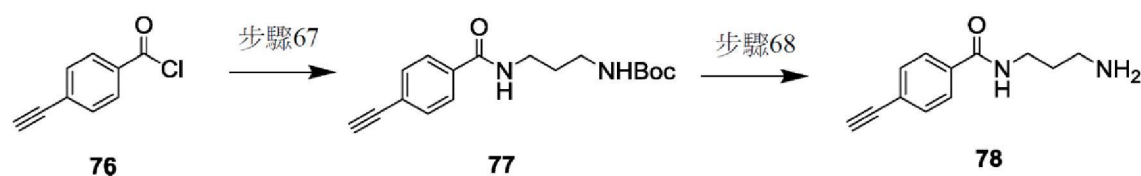
使用步驟65中合成之化合物74之粗產物(680 mg)，藉由與參考例2之步驟5同樣之方法獲得化合物75(330 mg，2階段產率70%)。

ESI-MS m/z: 519 (M+H)<sup>+</sup>

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 0.02-0.09 (6H, m), 0.89 (9H, d,  $J = 28.8$  Hz), 2.84-2.94 (1H, m), 3.24-3.30 (2H, m), 3.46 (1H, t,  $J = 7.2$  Hz), 3.52-3.68 (2H, m), 3.75-3.80 (1H, m), 3.82 (6H, d,  $J = 2.4$  Hz), 3.89-3.96 (1H, m), 4.05-4.17 (1H, m), 4.27-4.37 (1H, m), 6.82-6.89 (4H, m), 7.22-7.27 (1H, m), 7.29-7.34 (6H, m), 7.41-7.45 (2H, m).

化合物78之合成

[化161]



步驟67

將N-(第三丁氧基羰基)-1,3-二胺基丙烷(東京化成工業公司製造, 1.788 g, 10.26 mmol)溶解於二氯甲烷(22.8 mL)中, 添加三乙胺(1.907 mL, 13.68 mmol), 於室溫下攪拌15分鐘。於反應液中滴加藉由Organic Letter, 第16卷, 6318-6321頁, 2014年所記載之方法合成之化合物76(1.126 g, 6.84 mmol)之二氯甲烷溶液(5 mL), 於室溫下攪拌2小時。於反應液中添加水, 藉由氯仿進行萃取後, 利用飽和食鹽水清洗有機層, 利用無水硫酸鎂加以乾燥。於減壓下將溶劑蒸餾去除, 藉由矽膠管柱層析法(庚烷/乙酸乙酯 = 35/65)對殘渣進行精製, 藉此獲得化合物77(1.65 g, 產率80%)。

ESI-MS  $m/z$ : 303(M+H) $^+$

步驟68

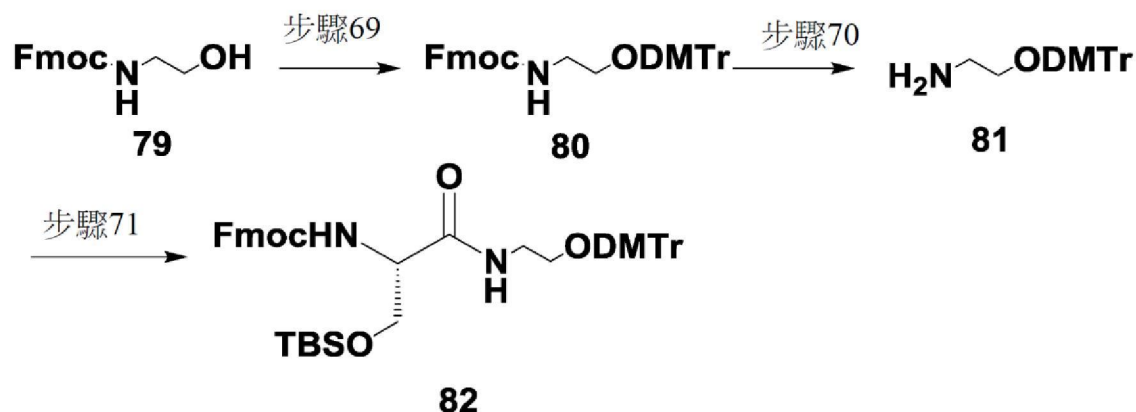
使用步驟67中合成之化合物77(1.65 g, 5.46 mmol), 藉由與參考例1之步驟3同樣之方法獲得化合物78(1.10 g, 產率100%)。

ESI-MS  $m/z$ : 203 ( $M+H$ )<sup>+</sup>

<sup>1</sup>H-NMR(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 1.74 (2H, dt,  $J = 12.0, 6.0$  Hz), 2.95 (2H, t,  $J = 6.0$  Hz), 3.18 (1H, s), 3.60 (2H, td,  $J = 6.0, 5.2$  Hz), 7.54 (2H, dt,  $J = 8.4, 1.8$  Hz), 7.76 (2H, dt,  $J = 8.4, 1.8$  Hz), 7.97 (1H, brs).

化合物82之合成

[化162]



步驟69

使用化合物79(東京化成公司製造, 1.2 g, 4.24 mmol), 藉由與參考例2之步驟4同樣之方法獲得化合物79之粗產物。

ESI-MS  $m/z$ : 608( $M+Na$ )<sup>+</sup>

步驟70

使用步驟69中合成之化合物80之粗產物, 藉由參考例2之步驟5或實施例1之步驟11所記載之方法獲得化合物81(1.34 g, 2階段產率52%)。

ESI-MS  $m/z$ : 386( $M+Na$ )<sup>+</sup>

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 3.34 (2H, t,  $J = 6.4$  Hz), 3.47 (2H, t,  $J = 6.4$  Hz), 3.79 (6H, s), 6.78-6.84 (4H, m), 7.17-7.21 (1H, m), 7.27-7.35 (6H, m), 7.42-7.46 (2H, m).

#### 步驟71

使用步驟70中合成之化合物81(1.15 g, 3.16 mmol)及Fmoc-Ser(tBuMe<sub>2</sub>Si)-OH(渡邊化學工業公司製造, 1.677 g, 3.8 mmol), 藉由與實施例1之步驟8同樣之方法獲得化合物82(560 mg, 產率31%)。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 0.00-0.07 (6H, m), 0.83-0.89 (9H, m), 3.18-3.26 (2H, m), 3.39-3.46 (2H, m), 3.61-3.68 (1H, m), 3.76 (6H, s), 3.89 (1H, dd,  $J = 10.0, 4.0$  Hz), 4.03 (1H, dd,  $J = 10.0, 4.0$  Hz), 4.15-4.20 (1H, m), 4.22-4.28 (1H, m), 4.32-4.40 (2H, m), 5.65-5.88 (1H, m), 6.76-6.85 (4H, m), 7.16-7.23 (1H, m), 7.25-7.34 (8H, m), 7.36-7.44 (4H, m), 7.50-7.64 (2H, m), 7.72-7.79 (2H, m).

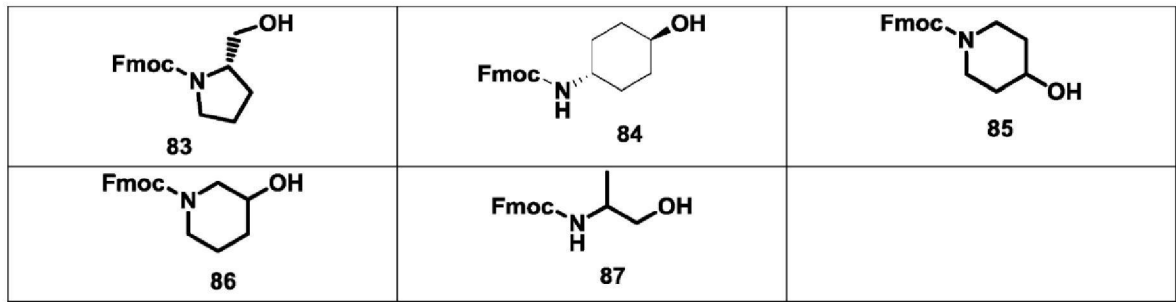
#### 化合物88-94之合成

使用第15表所記載之化合物及Fmoc-Ser(tBuMe<sub>2</sub>Si)-OH、Fmoc-Thr(tBuMe<sub>2</sub>Si)-OH, 藉由與步驟69~71同樣之方法獲得第16表所記載之化合物。

將藉由本實施例合成之化合物之NMR分析資料示於第17表。

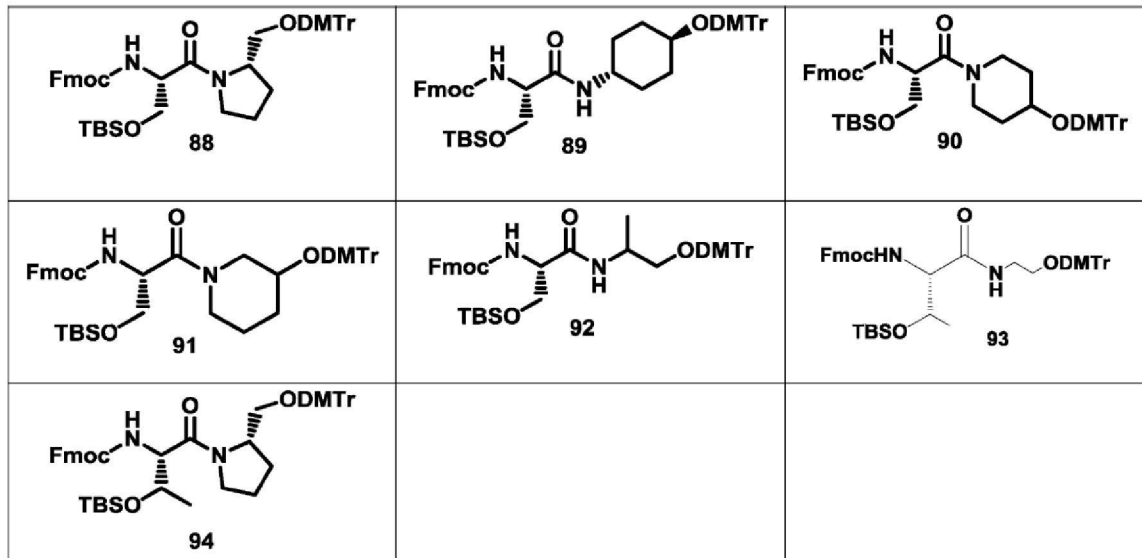
#### 第15表

[表15]



第16表

[表16]



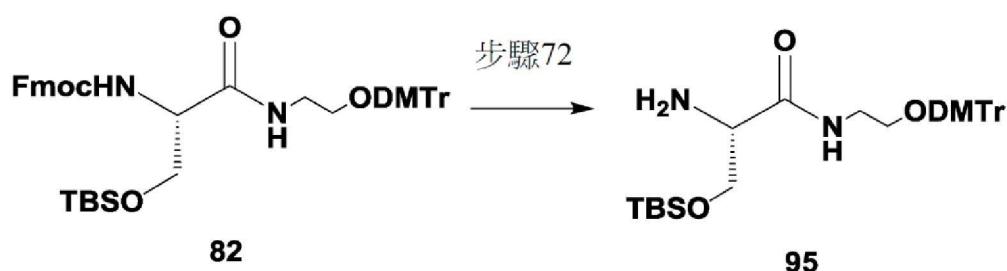
第17表

[表17]

化合物	NMR
88	<sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ): δ0.07-0.03 (6H, m), 0.89-0.87 (9H, m), 2.04-1.65 (4H, m), 3.86-3.58 (11H, m), 4.37-4.18 (4H, m), 4.69-4.68 (1H, m), 5.67-5.65 (1H, m), 6.84-6.80 (4H, m), 7.18-7.16 (3H, m), 7.33-7.25 (7H, m), 7.42-7.38 (3H, m), 7.60-7.58 (2H, m), 7.78-7.75 (2H, m).
89	<sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ): δ0.11-0.05 (6H, m), 0.91-0.87 (9H, m), 1.43-1.19 (4H, m), 2.00-1.80 (3H, m), 3.74-3.36 (2H, m), 3.81-3.75 (6H, m), 4.41-3.96 (5H, m), 5.71-5.64 (1H, m), 6.37-6.36 (1H, m), 6.84-6.80 (4H, m), 7.20-7.16 (2H, m), 7.42-7.25 (10H, m), 7.59-7.48 (3H, m), 7.78-7.75 (2H, m).
90	<sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ): δ0.08-0.03 (6H, m), 0.98-0.81 (9H, m), 1.20-1.07 (2H, m), 1.39-1.30 (2H, m), 1.42-1.40 (1H, m), 1.71-1.50 (2H, m), 3.36-3.14 (1H, m), 3.73-3.60 (3H, m), 3.80-3.77 (6H, m), 4.33-4.18 (1H, m), 4.35-4.34 (2H, m), 4.78-4.77 (1H, m), 5.75-5.74 (1H, m), 6.83-6.81 (4H, m), 7.35-7.26 (5H, m), 7.39-7.37 (6H, m), 7.50-7.48 (2H, m), 7.61-7.57 (2H, m), 7.77-7.74 (2H, m).
91	<sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ): δ0.04-0.00 (6H, m), 0.87-0.80 (9H, m), 1.47-1.11 (3H, m), 1.92-1.61 (1H, m), 4.83-2.99 (16H, m), 5.88-5.72 (1H, m), 6.89-6.82 (4H, m), 7.21-7.14 (1H, m), 7.49-7.28 (12H, m), 7.62-7.59 (2H, m), 7.77-7.75 (2H, m).
92	<sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ): δ0.01-0.05 (6H, m), 0.66-0.92 (9H, m), 1.11-1.12 (3H, m), 3.02-3.06 (1H, m), 3.55-3.62 (1H, m), 3.69-3.75 (6H, m), 3.91-4.35 (6H, m), 5.62 (1H, s), 6.74-6.78 (4H, m), 7.10-7.12 (2H, m), 7.14-7.27 (7H, m), 7.30-7.36 (4H, m), 7.43-7.53 (2H, m), 7.68-7.71 (2H, m).
93	<sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ): δ0.14-0.08 (6H, m), 1.10-0.87 (9H, m), 1.56-1.55 (3H, m), 3.48-3.41 (2H, m), 3.81-3.73 (7H, m), 4.25-4.14 (2H, m), 4.45-4.39 (3H, m), 5.77-5.76 (1H, m), 6.84-6.79 (4H, m), 7.18-7.16 (3H, m), 7.42-7.26 (10H, m), 7.61-7.56 (2H, m), 7.78-7.74 (2H, m).
94	<sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ): δ-0.10-0.00 (6H, m), 0.81-0.72 (9H, m), 1.12-1.11 (3H, m), 1.47-1.54 (1H, m), 1.83-1.77 (3H, m), 3.71-3.47 (9H, m), 4.39-4.00 (6H, m), 5.55-5.53 (1H, m), 6.74-6.71 (4H, m), 7.08-7.06 (3H, m), 7.32-7.16 (10H, m), 7.52-7.48 (2H, m), 7.67-7.65 (2H, m).

## 化合物95之合成

[化163]



## 步驟72

使用步驟71中合成之化合物82(2.487 g, 3.16 mmol), 藉由與參考例

2之步驟5同樣之方法獲得化合物95(1.2 g, 產率67%)。

ESI-MS  $m/z$ : 587( $M+Na$ )<sup>+</sup>

<sup>1</sup>H-NMR(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : -0.01-0.07 (6H, m), 0.86-0.90 (9H, m), 3.15-3.21 (2H, m), 3.41-3.48 (3H, m), 3.72 (1H, dd,  $J = 10.0, 6.4$  Hz), 3.79 (6H, s), 3.84 (1H, dd,  $J = 10.0, 4.8$  Hz), 6.79-6.84 (4H, m), 7.18-7.23 (1H, m), 7.27-7.33 (6H, m), 7.40-7.44 (2H, m), 7.72-7.75 (1H, brm).

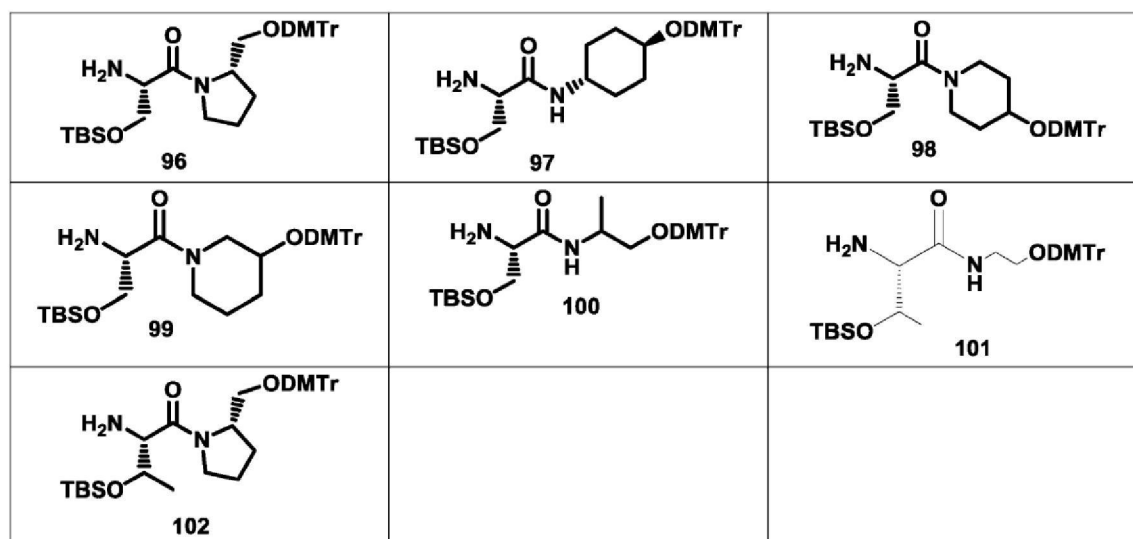
化合物96~102之合成

使用第16表所記載之化合物，藉由與步驟72同樣之方法獲得第18表所記載之化合物。

將藉由本實施例合成之化合物之質量分析結果示於第19表。

第18表

[表18]



第19表

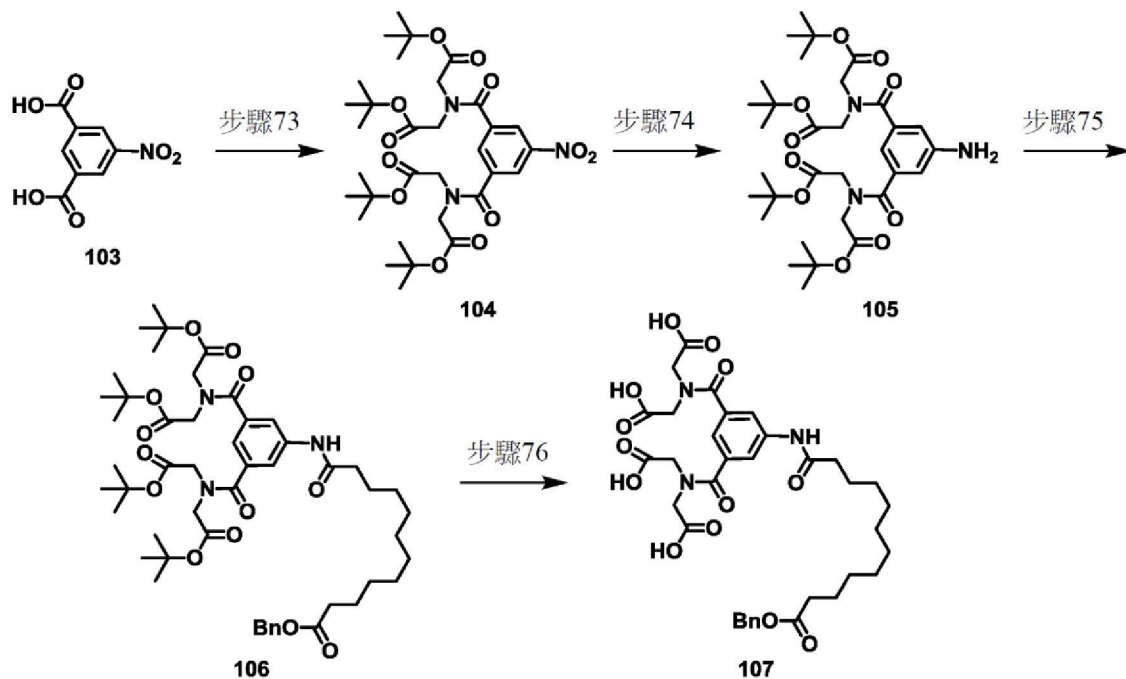
[表19]

化合物	ESI-MS m/z
96	605(M+H) <sup>+</sup>
97	619(M+H) <sup>+</sup>
98	303(M+H) <sup>+</sup> ，作為脫DMTr體而檢測出
99	649(M+HCOOH) <sup>-</sup>
100	577(M-H) <sup>-</sup>
101	623(M+HCOOH) <sup>-</sup>
102	317(M+H) <sup>+</sup> ，作為脫DMTr體而檢測出

## 實施例13 連繫單元之合成

## 化合物107之合成

[化164]



## 步驟73

將化合物103(2.00 g, 9.47 mmol)溶解於N,N'-二甲基甲醯胺(40 mL)中，於室溫下添加亞胺基二乙酸二第三丁酯(5.11 g, 20.84 mmol)、1-(3-

二甲基胺基丙基)-3-乙基碳二醯亞胺鹽酸鹽(4.00 g, 20.84 mmol)、1-羥基苯并三唑一水合物(145 mg, 0.947 mmol)並攪拌2小時。於反應液中添加水，藉由乙酸乙酯進行萃取後，藉由飽和碳酸氫鈉水溶液與飽和食鹽水清洗有機層，藉由無水硫酸鈉加以乾燥。於減壓下將溶劑蒸餾去除，藉由矽膠管柱層析法(庚烷/乙酸乙酯 = 50/50)對殘渣進行精製。進而利用甲醇進行漿料精製，藉此獲得化合物104(4.07 g, 產率65%)。

ESI-MS  $m/z$ : 664(M-H)<sup>-</sup>

#### 步驟74

將步驟73中合成之化合物104(2.66 g, 4.00 mmol)溶解於四氫呋喃(53 mL)中，於室溫下添加10%鈀碳粉末(含水晶，54.29%，490 mg)，於氫氣環境下攪拌3小時。過濾反應液，於減壓下將溶劑蒸餾去除，藉此獲得化合物105(2.86 g, 產率113%)。

ESI-MS  $m/z$ : 634(M-H)<sup>-</sup>

#### 步驟75

將步驟74中合成之化合物105(871.0 mg, 1.370 mmol)溶解於N,N'-二甲基甲醯胺(17 mL)中，添加O-(7-氮雜苯并三唑-1-炔)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸鹽(625.0 mg, 1.644 mmol)、二異丙基乙基胺(0.5730 mL, 3.290 mmol)、及十二烷二酸單苄基酯(527.0 mg, 1.644 mmol)，於室溫下徹夜攪拌。於反應液中添加水，藉由乙酸乙酯進行萃取後，利用飽和碳酸氫鈉水溶液及飽和食鹽水清洗有機層，藉由無水硫酸鈉加以乾燥。於減壓下將溶劑蒸餾去除，利用矽膠管柱層析法(庚烷/乙酸乙酯 = 60/40)對殘渣進行精製，藉此獲得化合物106(1.030 g, 產率80%)。

ESI-MS  $m/z$ : 939(M+H)<sup>+</sup>

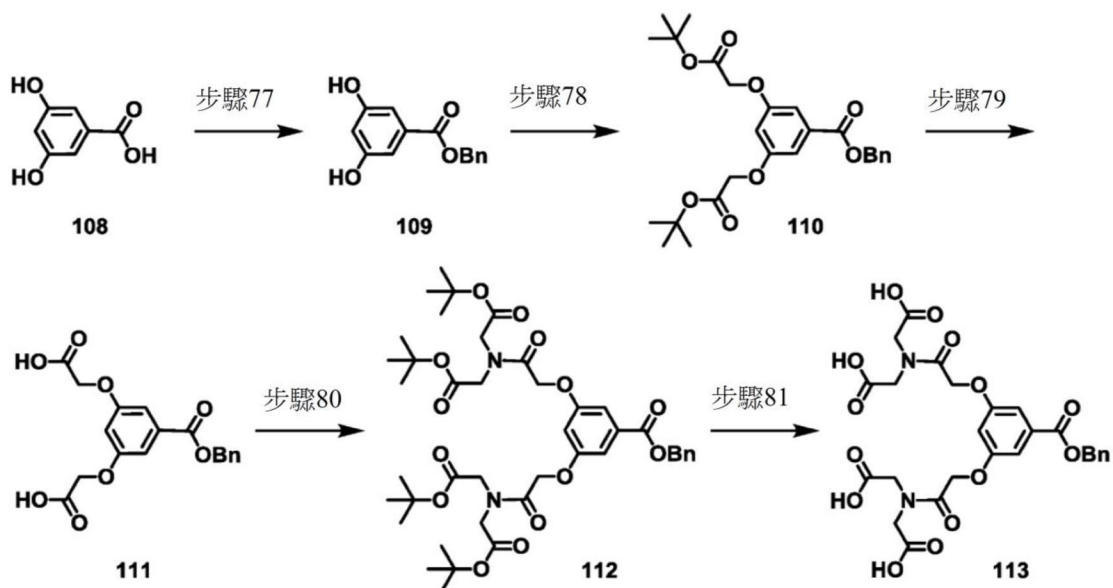
## 步驟76

將步驟75中合成之化合物106(1.030 g, 1.098 mmol)溶解於二氯甲烷(10 mL)中，添加三氟乙酸(10.00 mL, 130.0 mmol)，於室溫下攪拌1小時。於減壓下將溶劑蒸餾去除，而獲得化合物107之粗產物。

ESI-MS  $m/z$ : 713(M-H)<sup>-</sup>

化合物113之合成

[化165]



## 步驟77

將化合物108(2.000 g, 12.98 mmol)溶解於N,N'-二甲基甲醯胺(30 mL)中，添加碳酸氫鉀(1.559 g, 15.57 mmol)及苄基氯(2.328 mL, 19.47 mmol)，於室溫下攪拌4小時。於反應液中添加飽和氯化銨，藉由二氯甲烷進行萃取後，藉由水清洗有機層，並藉由無水硫酸鈉加以乾燥。於減壓下將溶劑蒸餾去除，利用矽膠管柱層析法(庚烷/乙酸乙酯 = 50/50)對殘渣進行精製，藉此獲得化合物109(2.850 g, 產率90%)。

ESI-MS m/z: 243(M-H)<sup>-</sup>

#### 步驟78

將步驟77中合成之化合物109(2.500 g, 10.24 mmol)溶解於N,N'-二甲基甲醯胺(30 mL)中，添加碳酸鉀(5.660 g, 40.90 mmol)及第三丁基溴乙酸(3.300 mL, 22.52 mmol)，於90°C下攪拌4小時。於反應液中添加飽和氯化銨，藉由二氯甲烷進行萃取後，利用飽和食鹽水清洗有機層，藉由無水硫酸鈉加以乾燥。於減壓下將溶劑蒸餾去除，利用矽膠管柱層析法(庚烷/乙酸乙酯=75/25)對殘渣進行精製，藉此獲得化合物110(4.300 g, 產率89%)。

ESI-MS m/z: 472(M-H)<sup>-</sup>

#### 步驟79

將步驟78中合成之化合物110(1.000 g, 2.116 mmol)溶解於二氯甲烷(10 mL)中，添加三氟乙酸(10.00 mL, 130.0 mmol)，並於室溫下攪拌6小時。於減壓下將溶劑蒸餾去除，而獲得化合物111之粗產物。

ESI-MS m/z: 359(M-H)<sup>-</sup>

#### 步驟80

將步驟79中合成之化合物111(350.0 mg, 0.9710 mmol)溶解於N,N'-二甲基甲醯胺(7 mL)中，添加1-羥基苯并三唑一水合物(327.0 mg, 2.137 mmol)、1-(3-二甲基胺基丙基)-3-乙基碳二醯亞胺鹽酸鹽(410.0 mg, 2.137 mmol)、及亞胺基二乙酸二第三丁酯(524.0 mg, 2.137 mmol)，並於室溫下攪拌5小時。於反應液中添加水，藉由乙酸乙酯進行萃取後，利用飽和碳酸氫鈉水溶液及飽和食鹽水清洗有機層，藉由無水硫酸鈉加以乾燥。於減壓下將溶劑蒸餾去除，利用矽膠管柱層析法(庚烷/乙酸乙酯=

60/40)對殘渣進行精製，藉此獲得化合物112(617.0 mg，產率78%)。

ESI-MS  $m/z$ : 814(M-H)<sup>-</sup>

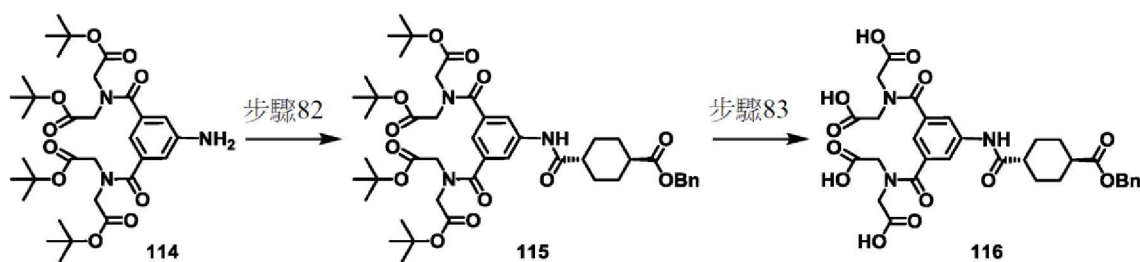
### 步驟81

將步驟80中合成之化合物112(610.0 mg，0.7490 mmol)溶解於二氯甲烷(6 mL)中，添加三氟乙酸(6 mL，78.00 mmol)，於室溫下攪拌1小時。於減壓下將溶劑蒸餾去除，而獲得化合物113之粗產物。

ESI-MS  $m/z$ : 590(M+H)<sup>+</sup>

化合物116之合成

[化166]



### 步驟82

將步驟74中合成之化合物114(474 mg，0.744 mmol)溶解於N,N'-二甲基甲醯胺(10 mL)中，於室溫下添加藉由Journal of Medicinal Chemistry，第54卷，2433-2446頁，2011年所記載之方法合成之反式-環己烷-1,4-二羧酸單苄基酯(0.234 mg，0.893 mmol)、二異丙基乙基胺(0.312 mL，1.79 mmol)、O-(7-氮雜苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸鹽(339 mg，0.893 mmol)並攪拌6小時。於反應液中添加水，藉由乙酸乙酯進行萃取後，藉由飽和碳酸氫鈉水溶液與飽和食鹽水清洗有機層，藉由無水硫酸鈉加以乾燥。於減壓下將溶劑蒸餾去除，利用矽膠管柱

層析法(庚烷/乙酸乙酯 = 50/50)對殘渣進行精製，藉此獲得化合物115(448 mg，產率68%)。

ESI-MS  $m/z$ : 879(M-H)<sup>-</sup>

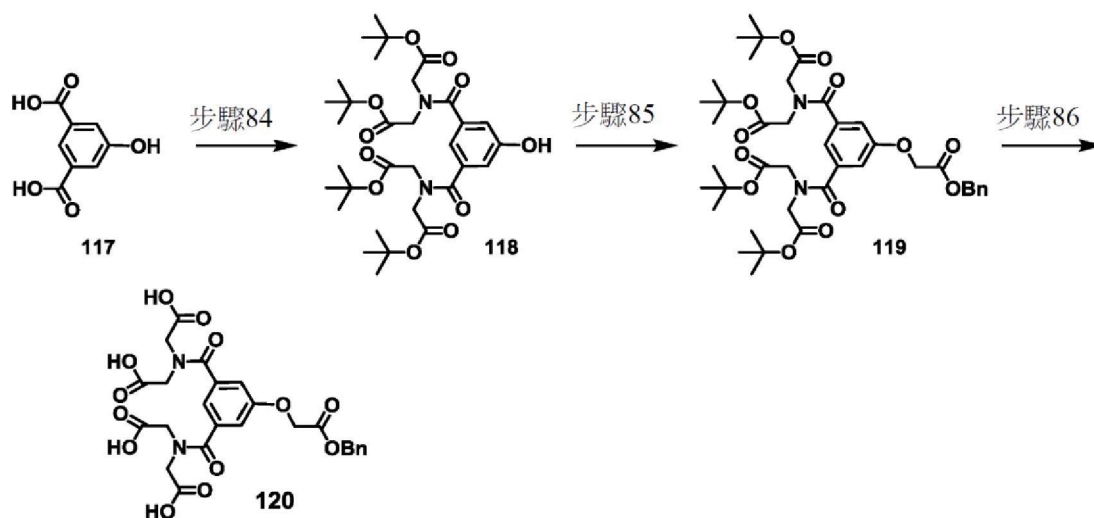
### 步驟83

將步驟82中合成之化合物115(341 mg，0.387 mmol)溶解於二氯甲烷(3.4 mL)中，於室溫下添加三氟乙酸(3.4 mL)並徹夜攪拌。將反應液減壓濃縮，藉由乙酸乙酯進行共沸，並藉由庚烷進行漿料精製，藉此獲得化合物116(254 mg，產率100%)。

ESI-MS  $m/z$ : 656(M+H)<sup>+</sup>

化合物120之合成

[化167]



### 步驟84

將化合物117(500 mg，2.75 mmol)溶解於N,N'-二甲基甲醯胺(10 mL)中，於室溫下添加亞胺基二乙酸二第三丁酯(1.48 g，6.04 mmol)、1-(3-二甲基胺基丙基)-3-乙基碳二醯亞胺鹽酸鹽(1.16 g，6.04 mmol)、1-羥

基苯并三唑一水合物(42.0 mg, 0.275 mmol)並攪拌4小時。於反應液中添加水，藉由乙酸乙酯進行萃取後，利用飽和食鹽水清洗有機層，藉由無水硫酸鈉加以乾燥。於減壓下將溶劑蒸餾去除，利用矽膠管柱層析法(庚烷/乙酸乙酯 = 50/50)對殘渣進行精製，藉此獲得化合物118(329 mg, 產率19%)。

ESI-MS  $m/z$ : 635(M-H)<sup>-</sup>

#### 步驟85

將步驟84中合成之化合物118(323 mg, 0.507 mmol)溶解於N,N'-二甲基甲醯胺(6.5 mL)中，於室溫下添加碳酸鉀(84.0 mg, 0.609 mmol)、溴乙酸苄酯(139 mg, 0.609 mmol)並攪拌3小時。於反應液中添加水，藉由乙酸乙酯進行萃取後，利用飽和食鹽水清洗有機層，藉由無水硫酸鈉加以乾燥。於減壓下將溶劑蒸餾去除，利用矽膠管柱層析法(庚烷/乙酸乙酯 = 50/50)對殘渣進行精製，藉此獲得化合物119(313 mg, 產率79%)。

ESI-MS  $m/z$ : 783(M-H)<sup>-</sup>

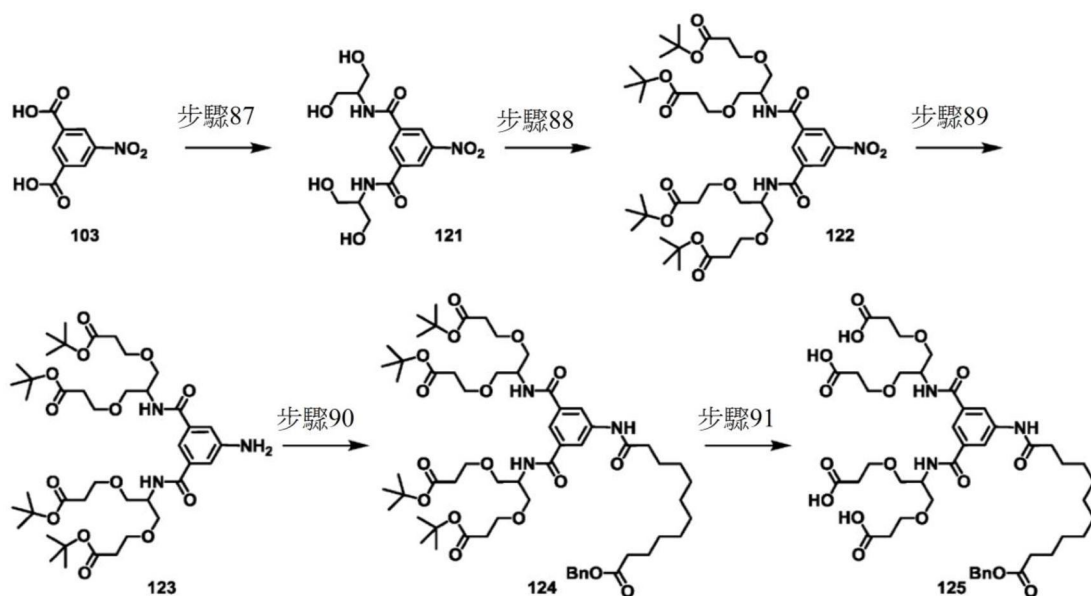
#### 步驟86

將步驟85中合成之化合物119(312 mg, 0.398 mmol)溶解於二氯甲烷(3.1 mL)中，於室溫下添加三氟乙酸(3.1 mL)並徹夜攪拌。將反應液減壓濃縮，藉由乙酸乙酯進行共沸，藉此獲得化合物120(252 mg, 產率113%)。

ESI-MS  $m/z$ : 561(M+H)<sup>+</sup>

化合物125之合成

[化168]



### 步驟87

將化合物103(2.00 g, 9.47 mmol)溶解於N,N'-二甲基甲醯胺(40 mL)中，於室溫下添加2-氨基-1,3-丙二醇(1.90 g, 20.84 mmol)、1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二醯亞胺鹽酸鹽(4.00 g, 20.84 mmol)、1-羥基苯并三唑一水合物(145 mg, 0.947 mmol)並攪拌2小時。於減壓下將溶劑蒸餾去除，藉由矽膠管柱層析法(乙酸乙酯/甲醇=70/30)對殘渣進行精製。進而藉由乙酸乙酯進行漿料精製，藉此獲得化合物121(2.68 g, 產率79%)。

ESI-MS  $m/z$ : 356(M-H)<sup>-</sup>

### 步驟88

將步驟87中合成之化合物121(500 mg, 1.40 mmol)懸浮於乙腈(10 mL)中，於室溫下添加丙烯酸第三丁酯(3.59 g, 28.0 mmol)、氫氧化苄基三甲基銨(40%水溶液, 1.76 mL, 702 mmol)並徹夜攪拌。於減壓下將溶劑蒸餾去除，添加水，藉由乙酸乙酯進行萃取後，利用飽和食鹽水清洗有機層，藉由無水硫酸鈉加以乾燥。於減壓下將溶劑蒸餾去除，利用矽膠管柱層析法(庚烷/乙酸乙酯=50/50)對殘渣進行精製，藉此獲得化合物

122(300 mg, 產率24%)。

ESI-MS  $m/z$ : 871(M+H)<sup>+</sup>

#### 步驟89

將步驟88中合成之化合物122(340 mg, 0.391 mmol)溶解於四氫呋喃(6.8 mL)中, 於室溫下添加10%鈰碳粉末(含水晶, 54.29%, 31.3 mg), 於氫氣環境下攪拌6小時。過濾反應液, 於減壓下將溶劑蒸餾去除, 利用矽膠管柱層析法(庚烷/乙酸乙酯 = 30/70)對殘渣進行精製, 藉此獲得化合物123(235 mg, 產率72%)。

ESI-MS  $m/z$ : 841(M+H)<sup>+</sup>

#### 步驟90

將步驟89中合成之化合物123(232 mg, 0.276 mmol)溶解於N,N'-二甲基甲醯胺(4.6 mL)中, 於室溫下添加十二酸單苄基酯(0.133 mg, 0.414 mmol)、二異丙基乙基胺(0.145 mL, 0.829 mmol)、O-(7-氮雜苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸鹽(158 mg, 0.414 mmol)並徹夜攪拌。於反應液中添加水, 藉由乙酸乙酯進行萃取後, 藉由飽和碳酸氫鈉水溶液與飽和食鹽水清洗有機層, 藉由無水硫酸鈉加以乾燥。於減壓下將溶劑蒸餾去除, 利用矽膠管柱層析法(庚烷/乙酸乙酯 = 30/70)對殘渣進行精製, 藉此獲得化合物124(274 mg, 產率87%)。

ESI-MS  $m/z$ : 1141(M-H)<sup>-</sup>

#### 步驟91

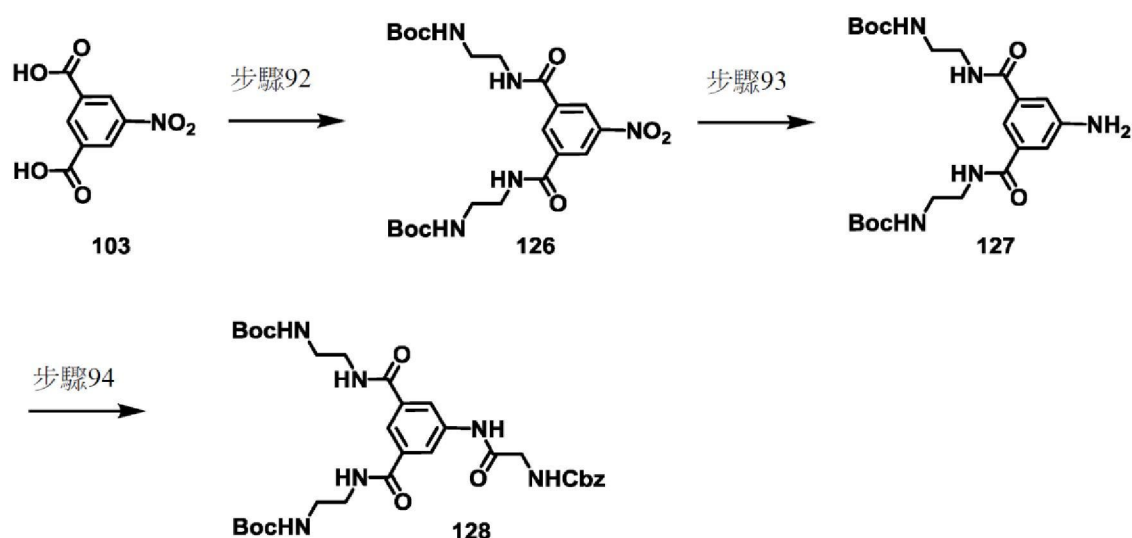
將步驟90中合成之化合物124(273 mg, 0.239 mmol)溶解於二氯甲烷(2.7 mL)中, 於室溫下添加三氟乙酸(2.7 mL)並徹夜攪拌。將反應液減壓濃縮, 藉由乙酸乙酯進行共沸, 藉此獲得化合物125(231 mg, 產率

105%)。

ESI-MS  $m/z$ : 919(M+H)<sup>+</sup>

化合物128之合成

[化169]



### 步驟92

將4-硝基間苯二甲酸103(500 mg, 2.37 mmol)及N-Boc-乙二胺(808 mg, 5.21 mmol)溶解於N,N'-二甲基甲醯胺(10 mL)中，於室溫下添加三乙胺(0.90 mL, 7.11 mmol)、1-羥基苯并三唑一水合物(703 mg, 5.21 mmol)及1-(3-二甲基胺基丙基)-3-乙基碳二醯亞胺鹽酸鹽(1.36 g, 7.11 mmol)並攪拌16小時。對反應液進行後處理，利用矽膠管柱層析法對粗產物進行精製，藉此獲得化合物126(650 mg, 產率55%)。

### 步驟93

將步驟92中合成之化合物126(500 mg, 1.01 mmol)及鋅末(330 mg, 5.5 mmol)懸浮於甲醇(3.5 mL)及四氫呋喃(3.5 mL)中，於0°C下滴加氯化銨(378 mg, 7.07 mmol)之水溶液，於室溫下攪拌24小時。對反應

第 196 頁(發明說明書)

液進行後處理，利用矽膠管柱層析法對粗產物進行精製，藉此獲得化合物127(160 mg，產率34%)。

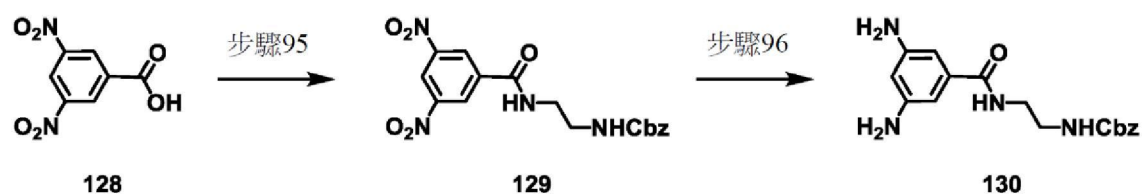
#### 步驟94

將步驟93中合成之化合物127(200 mg，0.430 mmol)及N-Cbz-甘胺酸(90.0 mg，0.430 mmol)溶解於N,N'-二甲基甲醯胺(2.0 mL)中，於室溫下添加二異丙基乙基胺(0.220 mL，1.29 mmol)、O-(7-氮雜苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸鹽(245 mg，0.645 mmol)並攪拌16小時。對反應液進行後處理，利用矽膠管柱層析法對粗產物進行精製，藉此獲得化合物128(180 mg，產率64%)。

ESI-MS m/z: 657(M+H)<sup>+</sup>

化合物130之合成

[化170]



#### 步驟95

將3,5-二硝基苯甲酸128(500 mg，2.36 mmol)及N-Cbz-乙二胺(588 mg，2.83 mmol)溶解於N,N'-二甲基甲醯胺(5.0 mL)中，於室溫下添加三乙胺(0.65 mL，4.72 mmol)、1-羥基苯并三唑一水合物(380 mg，2.83 mmol)及1-(3-二甲基胺基丙基)-3-乙基碳二醯亞胺鹽酸鹽(675 mg，3.54 mmol)並攪拌16小時。對反應液進行後處理，利用矽膠管柱層析法對粗產物進行精製，藉此獲得化合物129(445 mg，產率48%)。

第 197 頁(發明說明書)

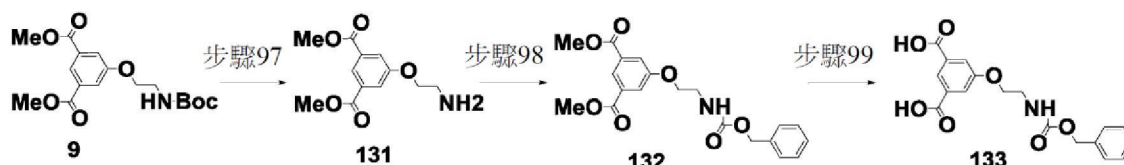
## 步驟96

將步驟95中合成之化合物129(200 mg, 0.515 mmol)溶解於乙醇(5.0 mL)中，於室溫下添加氯化錫(II)(584 mg, 3.09 mmol)及濃鹽酸(0.2 mL)，於80 °C下攪拌16小時。對反應液進行後處理，而獲得化合物130(180 mg, 產率106%)。

ESI-MS  $m/z$ : 329(M+H)<sup>+</sup>

## 化合物133之合成

[化171]



## 步驟97

使用實施例1之步驟6中合成之化合物9(8.17 g, 23.12 mmol)，藉由與實施例1之步驟9同樣之方法獲得化合物131(3.7 g, 產率63%)。

ESI-MS  $m/z$ : 254(M+H)<sup>+</sup>

## 步驟98

使用步驟97中獲得之化合物131(3.7 g, 14.63 mmol)，藉由與實施例1之步驟10同樣之方法獲得化合物132(3.82 g, 產率67%)。

ESI-MS  $m/z$ : 432(M+HCOO)<sup>-</sup>

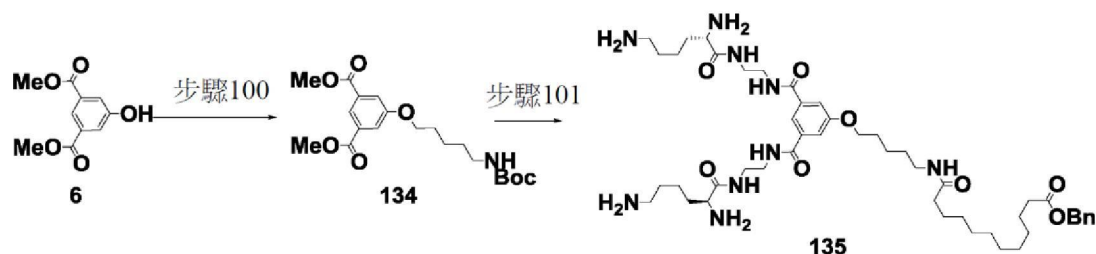
## 步驟99

使用步驟98中獲得之化合物132(3.82 g, 9.86 mmol)，藉由與實施例1之步驟7同樣之方法獲得化合物133(3.08 g, 產率87%)。

ESI-MS  $m/z$ : 360(M+H)<sup>+</sup>

化合物135之合成

[化172]



步驟100

使用化合物8(2 g, 9.53 mmol)與(第三丁氧基羰基胺基)-1-戊醇(東京化成公司製造, 2 g, 10 mmol), 藉由與實施例1之步驟6同樣之方法獲得化合物134(2.40 g, 產率63%)。

ESI-MS  $m/z$ : 296(M+H)<sup>+</sup>, 作為脫Boc體而檢測出

步驟101

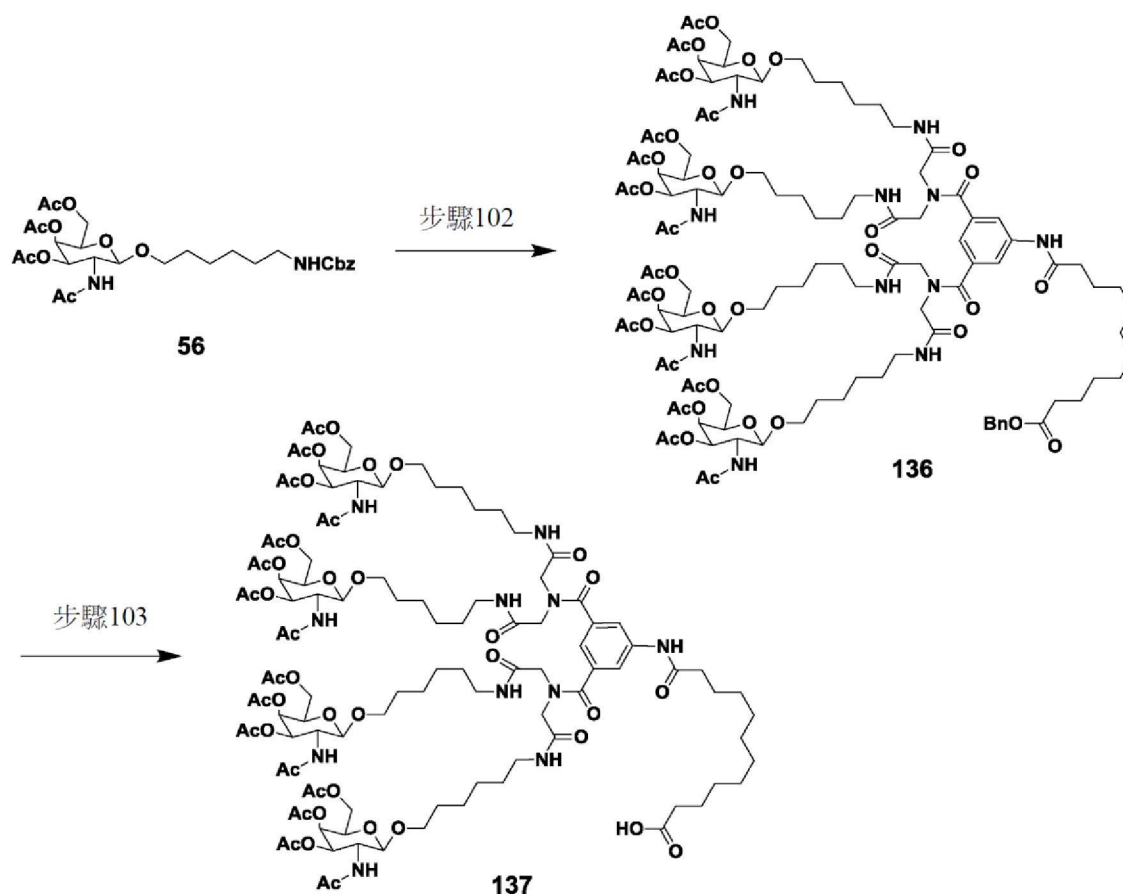
使用步驟100中合成之化合物134, 藉由與實施例1之步驟7-9、14-17同樣之方法獲得化合物135(1.579 g, 產率21%)。

ESI-MS  $m/z$ : 910(M+H)<sup>+</sup>

實施例14 糖配體-連繫單元之合成

化合物137之合成

[化173]



### 步驟102

將步驟51中合成之化合物56(1.015 g, 1.748 mmol)溶解於N,N'-二甲基甲醯胺(12 mL)中，於室溫下添加10%鈦碳粉末(含水晶，54.29%，187 mg)，於氫氣環境下攪拌6小時。將反應液過濾。於濾液中添加步驟76中合成之化合物107(250.0 mg, 0.350 mmol)、1-羥基苯并三唑一水合物(26.80 mg, 0.1750 mmol)、及1-(3-二甲基胺基丙基)-3-乙基碳二醯亞胺鹽酸鹽(402.0 mg, 2.099 mmol)，於室溫下徹夜攪拌。於反應液中添加水，藉由乙酸乙酯進行萃取後，利用飽和碳酸氫鈉水溶液及飽和食鹽水清洗有機層，藉由無水硫酸鈉加以乾燥。於減壓下將溶劑蒸餾去除，利用矽膠管柱層析法(氯仿/甲醇 = 87/13)對殘渣進行精製，藉此獲得化合物136(617.0 mg, 產率88%)。

ESI-MS m/z: 1215(M+2H)<sup>2+</sup>

### 步驟103

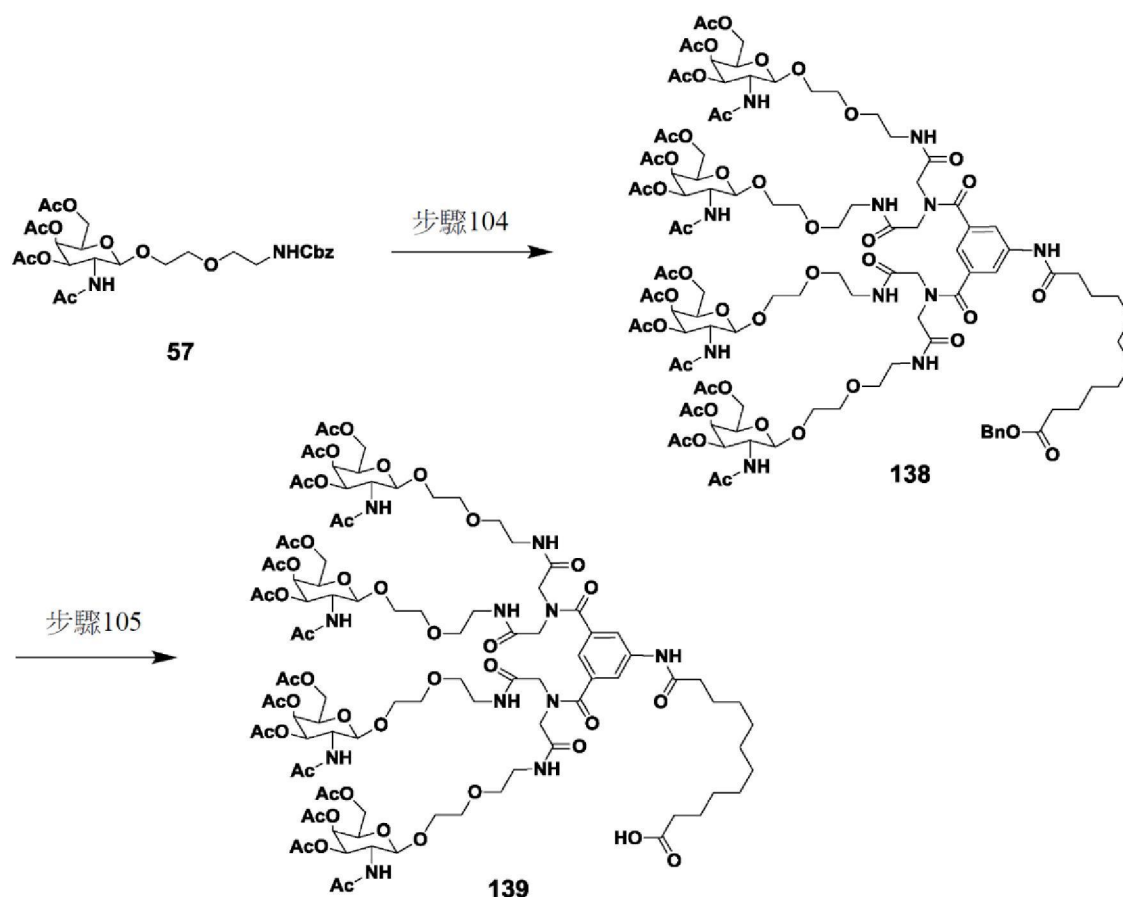
將步驟102中合成之化合物136(0.7380 g, 0.3040 mmol)溶解於四氫呋喃(7 mL)中，於室溫下添加10%鈣碳粉末(含水晶，54.29%，135.90 mg)，於氫氣環境下徹夜攪拌。過濾反應液，於減壓下將溶劑蒸餾去除，利用矽膠管柱層析法(氯仿/甲醇=87/13)對殘渣進行精製，藉此獲得化合物137(581 mg，產率82%)。

ESI-MS m/z: 1170(M+2H)<sup>2+</sup>

<sup>1</sup>H-NMR(400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ): 1.12-2.36 (106H, m), 2.91-3.19 (8H, m), 3.23-3.55 (14H, m), 3.60-3.76 (4H, m), 3.78-3.94 (8H, m), 3.95-4.10 (16H, m), 4.47 (4H, d, J = 8.8 Hz), 4.92-5.01 (4H, m), 5.17-5.24 (4H, m), 6.98 (1H, s), 7.64 (2H, s), 7.81-7.95 (4H, m), 8.28-8.38 (2H, m), 8.44-8.56 (2H, m), 10.13 (1H, s).

化合物139之合成

[化174]



### 步驟104

將步驟52中合成之化合物57(500 mg, 0.879 mmol)溶解於N,N'-二甲基甲醯胺(6.5 mL)中，於室溫下添加10%鈣碳粉末(含水晶，54.29%，94 mg)，並於氫氣環境下攪拌4小時。將反應液過濾。於濾液中添加步驟76中合成之化合物107(126.0 mg, 0.176 mmol)、1-羥基苯并三唑一水合物(13.47 mg, 0.088 mmol)、及1-(3-二甲基胺基丙基)-3-乙基碳二醯亞胺鹽酸鹽(202.0 mg, 1.055 mmol)，於室溫下徹夜攪拌。於減壓下將反應液之溶劑蒸餾去除，利用逆相管柱層析法(水/乙腈)對殘渣進行精製，藉此獲得化合物138(249.7 mg, 產率60%)。

ESI-MS m/z: 1191(M+2H)<sup>2+</sup>

### 步驟105

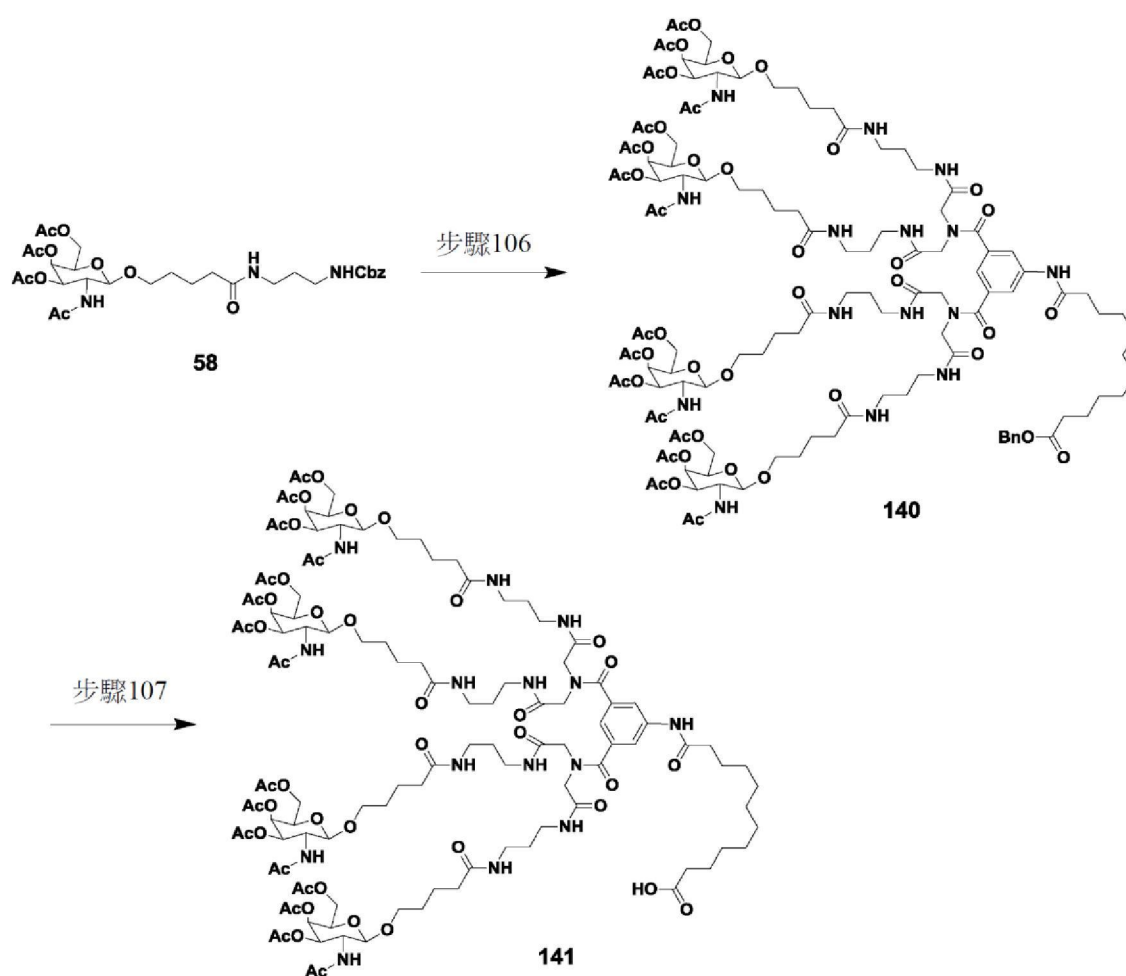
將步驟104中合成之化合物138(0.242 g, 0.102 mmol)溶解於四氫呋喃(3.6 mL)及水(1.2 mL)中，於室溫下添加10%鈰碳粉末(含水晶，54.29%，45 mg)，並於氫氣環境下攪拌4小時。過濾反應液，於減壓下將溶劑蒸餾去除，而獲得化合物139(216 mg，產率93%)。

ESI-MS  $m/z$ : 1146( $M+2H$ )<sup>2+</sup>

<sup>1</sup>H-NMR(400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>,  $\delta$ ): 1.15-1.65 (20H, m), 1.68-2.15 (52H, m), 3.13-3.29 (6H, m), 3.40-3.67 (16H, m), 3.71-3.96 (11H, m), 3.98-4.14 (16H, m), 4.55 (4H, t,  $J = 8.8$  Hz), 4.93-5.06 (4H, m), 5.12-5.28 (4H, m), 6.56 (1H, s), 6.98 (1H, s), 7.64 (2H, s), 7.77-7.93 (4H, m), 8.26-8.49 (3H, m), 10.10 (1H, s).

化合物141之合成

[化175]



### 步驟106

將步驟53中合成之化合物58(430 mg, 0.674 mmol)溶解於N,N'-二甲基甲醯胺(6 mL)中，於室溫下添加10%鈦碳粉末(含水晶，54.29%，79 mg)，於氫氣環境下攪拌4小時。將反應液過濾。於濾液中添加化合物107(105.0 mg, 0.148 mmol)、1-羥基苯并三唑一水合物(11.31 mg, 0.074 mmol)、及1-(3-二甲基胺基丙基)-3-乙基碳二醯亞胺鹽酸鹽(170.0.0 mg, 0.887 mmol)，於室溫下徹夜攪拌。於減壓下將反應液之溶劑蒸餾去除，利用逆相管柱層析法(水/乙腈)對殘渣進行精製，藉此獲得化合物140(218.1 mg, 產率56%)。

ESI-MS  $m/z$ : 1329(M+2H)<sup>2+</sup>

## 步驟107

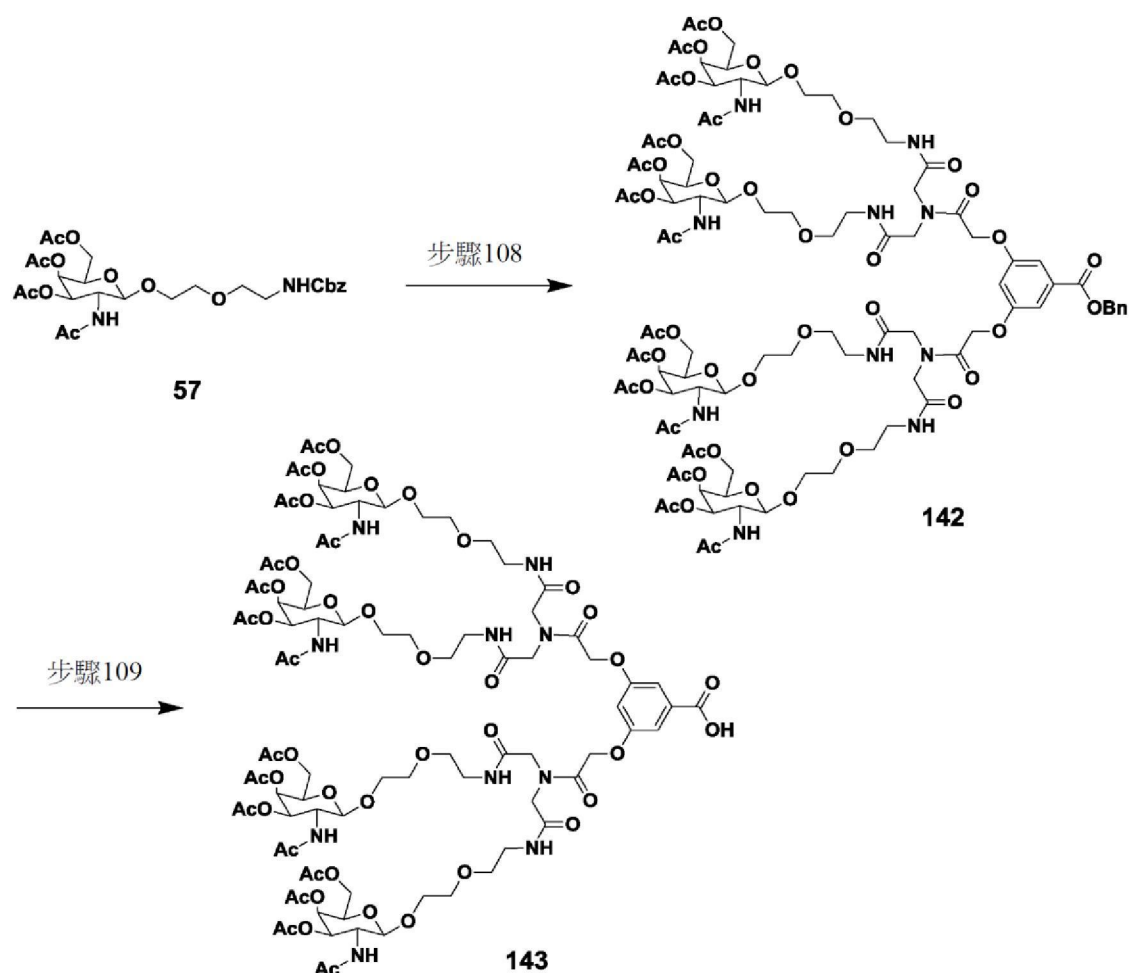
將步驟106中合成之化合物140(0.210 g, 0.079 mmol)溶解於四氫呋喃(3.1 mL)及水(1.0 mL)中，於室溫下添加10%鈰碳粉末(含水晶，54.29%，39 mg)，並於氫氣環境下攪拌4小時。過濾反應液，於減壓下將溶劑蒸餾去除，而獲得化合物141(192.7 mg，產率95%)。

ESI-MS  $m/z$ : 1284( $M+2H$ )<sup>2+</sup>

<sup>1</sup>H-NMR(400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>,  $\delta$ ): 1.17-1.65 (42H, m), 1.69-2.13 (61H, m), 2.95-3.17 (16H, m), 3.65-3.77 (3H, m), 3.79-3.94 (6H, m), 3.96-4.10 (16H, m), 4.48 (4H, d,  $J = 8.4$  Hz), 4.96 (4H, dd,  $J = 2.4, 11.2$  Hz), 5.21 (4H, d,  $J = 3.2$  Hz), 7.01 (1H, s), 7.64-7.92 (11H, m), 8.26-8.48 (4H, m), 10.14 (1H, s).

化合物143之合成

[化176]



### 步驟108

將步驟52中合成之化合物57(450 mg, 0.791 mmol)溶解於N,N'-二甲基甲醯胺(6 mL)中，於室溫下添加10%鈹碳粉末(含水晶，54.29%，85 mg)，並於氫氣環境下攪拌5小時。將反應液過濾。於濾液中添加步驟81中合成之化合物113(94 mg, 0.158 mmol)、1-羥基苯并三唑一水合物(133.0 mg, 0.871 mmol)、及1-(3-二甲基胺基丙基)-3-乙基碳二醯亞胺鹽酸鹽(182.0 mg, 0.950 mmol)，於室溫下徹夜攪拌。於減壓下將反應液之溶劑蒸餾去除，利用逆相管柱層析法(水/乙腈)對殘渣進行精製，藉此獲得化合物142(99 mg, 產率28%)。

ESI-MS  $m/z$ : 1129( $M+2H$ )<sup>2+</sup>

## 步驟109

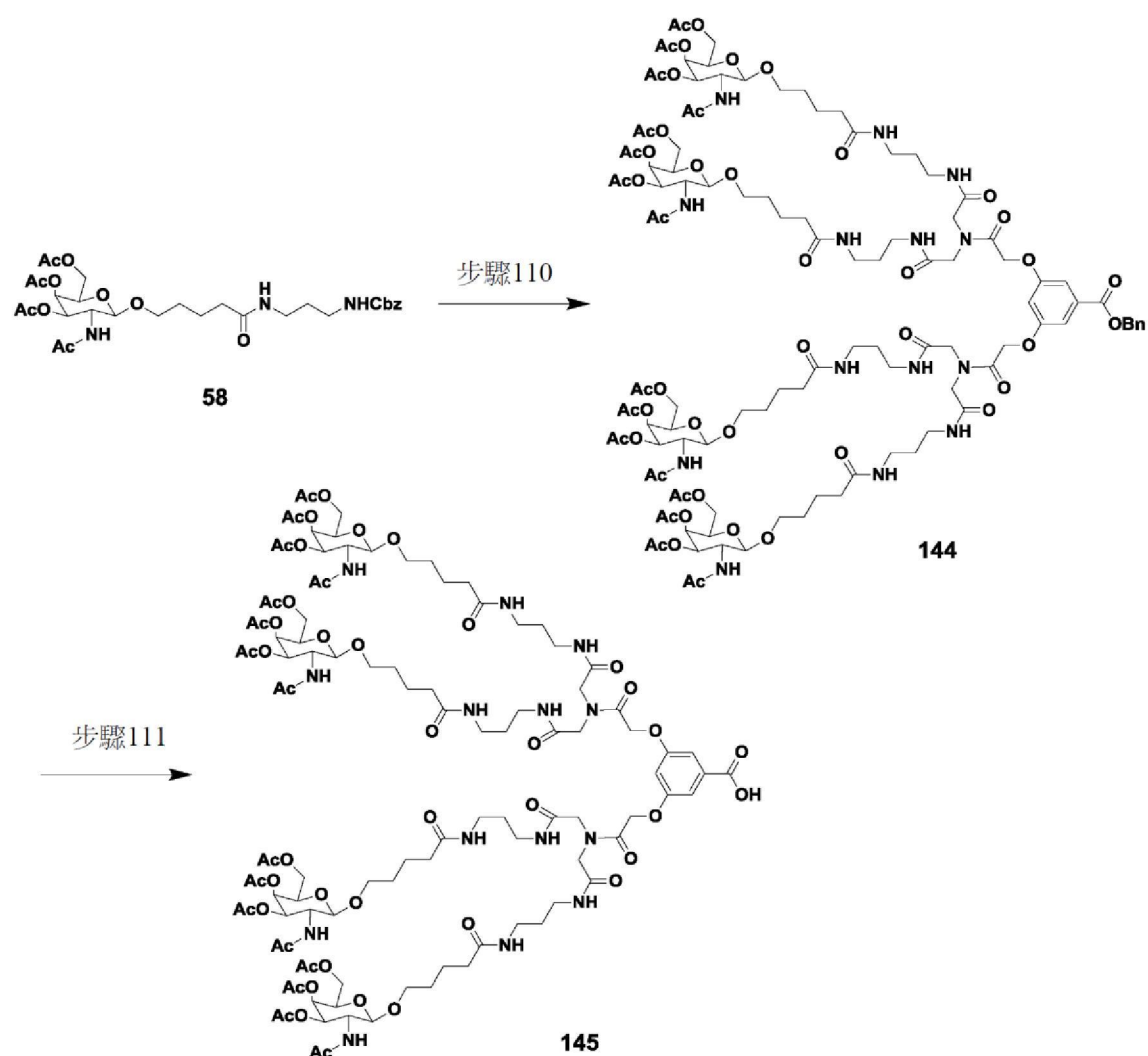
將步驟108中合成之化合物142(80 mg, 0.035 mmol)溶解於四氫呋喃(1.7 mL)及水(0.85 mL)中, 於室溫下添加10% 鈣碳粉末(含水晶, 54.29%, 26 mg), 並於氫氣環境下攪拌2小時。過濾反應液, 於減壓下將溶劑蒸餾去除, 而獲得化合物143(57.5 mg, 產率75%)。

ESI-MS  $m/z$ : 1084( $M+2H$ )<sup>2+</sup>

<sup>1</sup>H-NMR(400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>,  $\delta$ ): 1.69-2.21 (46H, m), 3.14-3.65 (28H, m), 3.67-4.22 (27H, m), 4.43-4.66 (4H, m), 4.69-4.88 (4H, m), 4.89-5.08 (4H, m), 5.12-5.32 (4H, m), 6.54-6.68 (1H, br), 7.01 (2H, s), 7.78-8.09 (3H, m), 8.13-8.31 (2H, m), 8.58-8.75 (2H, m).

化合物145之合成

[化177]



### 步驟110

將步驟53中合成之化合物58(418 mg, 0.655 mmol)溶解於N,N'-二甲基甲醯胺(6 mL)中，於室溫下添加10%鈀碳粉末(含水晶，54.29%，77 mg)，於氫氣環境下攪拌5小時。將反應液過濾。於濾液中添加步驟81中合成之化合物113(85 mg, 0.144 mmol)、1-羥基苯并三唑一水合物(121.0 mg, 0.791 mmol)、及1-(3-二甲基胺基丙基)-3-乙基碳二醯亞胺鹽酸鹽(165.0 mg, 0.863 mmol)，於室溫下徹夜攪拌。於減壓下將反應液之溶劑蒸餾去除，利用逆相管柱層析法(水/乙腈)對殘渣進行精製，藉此獲得化合物144(99 mg, 產率28%)。

ESI-MS m/z: 1268(M+2H)<sup>2+</sup>

### 步驟111

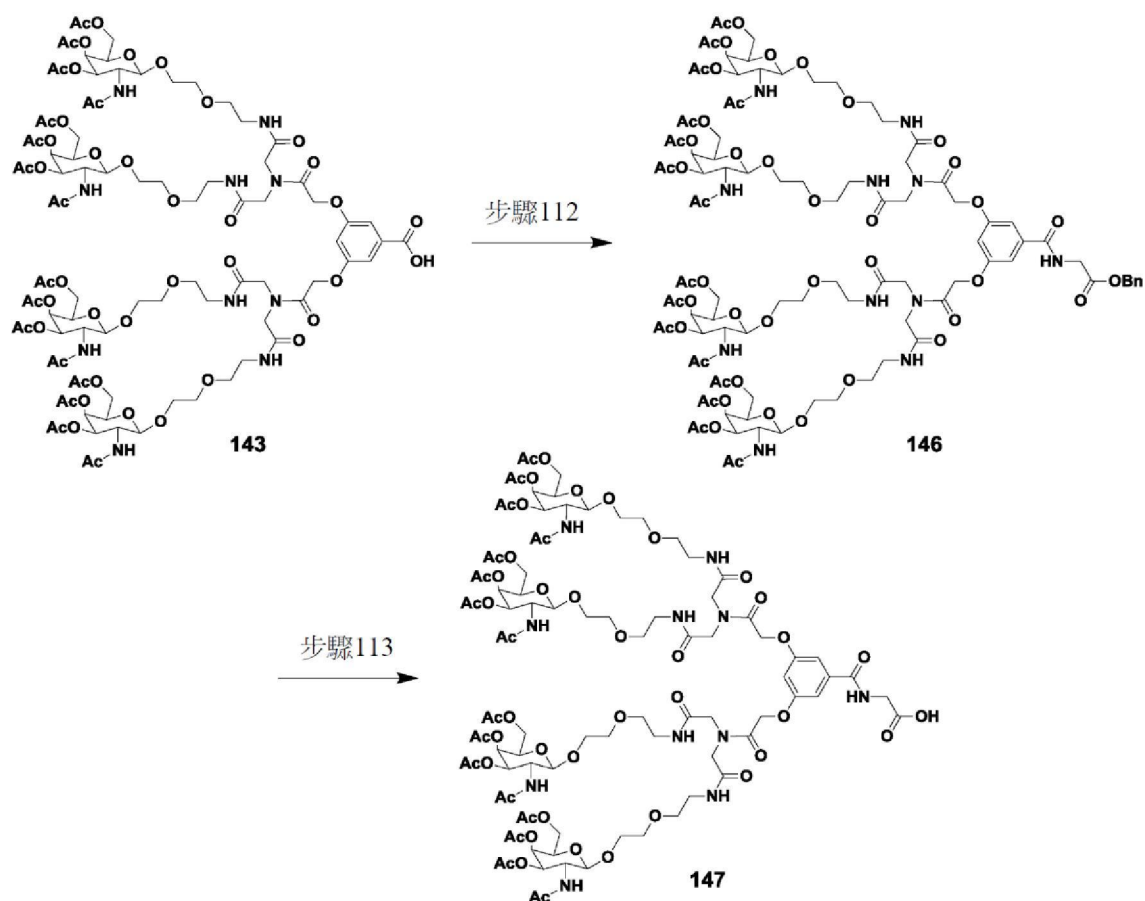
將步驟110中合成之化合物144(186 mg, 0.073 mmol)溶解於四氫呋喃(2.8 mL)及水(0.93 mL)中，於室溫下添加10%鈣碳粉末(含水晶，54.29%，40 mg)，於氫氣環境下攪拌2小時。過濾反應液，於減壓下將溶劑蒸餾去除，而獲得化合物145(156.7 mg，產率87%)。

ESI-MS m/z: 1222(M+2H)<sup>2+</sup>

<sup>1</sup>H-NMR(400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ): 1.36-1.62 (27H, m), 1.67-2.17 (64H, m), 2.92-3.21 (15H, m), 3.58-3.77 (2H, m), 3.80-3.95 (7H, m), 3.97-4.13 (15H, m), 4.47 (4H, d, J = 8.8 Hz), 4.88-5.02 (7H, m), 5.10-5.24 (3H, m), 6.95-7.00 (1H, m), 7.26-7.31 (2H, m), 7.72-7.88 (8H, m), 8.10-8.20 (2H, m), 8.51-8.60 (2H, m).

化合物147之合成

[化178]



### 步驟112

將步驟109中合成之化合物143(171 mg, 0.079 mmol)溶解於N,N'-二甲基甲醯胺(3.4 mL)中，添加甘胺酸苄酯基對甲苯磺酸鹽(32.0 mg, 0.095 mmol)、1-羥基苯并三唑一水合物(12.09 mg, 0.079 mmol)、及1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二醯亞胺鹽酸鹽(18.16 mg, 0.095 mmol)，並於室溫下徹夜攪拌。於減壓下將反應液之溶劑蒸餾去除，利用逆相管柱層析法(水/乙腈)對殘渣進行精製，藉此獲得化合物146(55.7 mg, 產率31%)。

ESI-MS  $m/z$ : 1158(M+2H)<sup>2+</sup>

### 步驟113

將步驟112中合成之化合物146(54 mg, 0.023 mmol)溶解於四氫呋喃

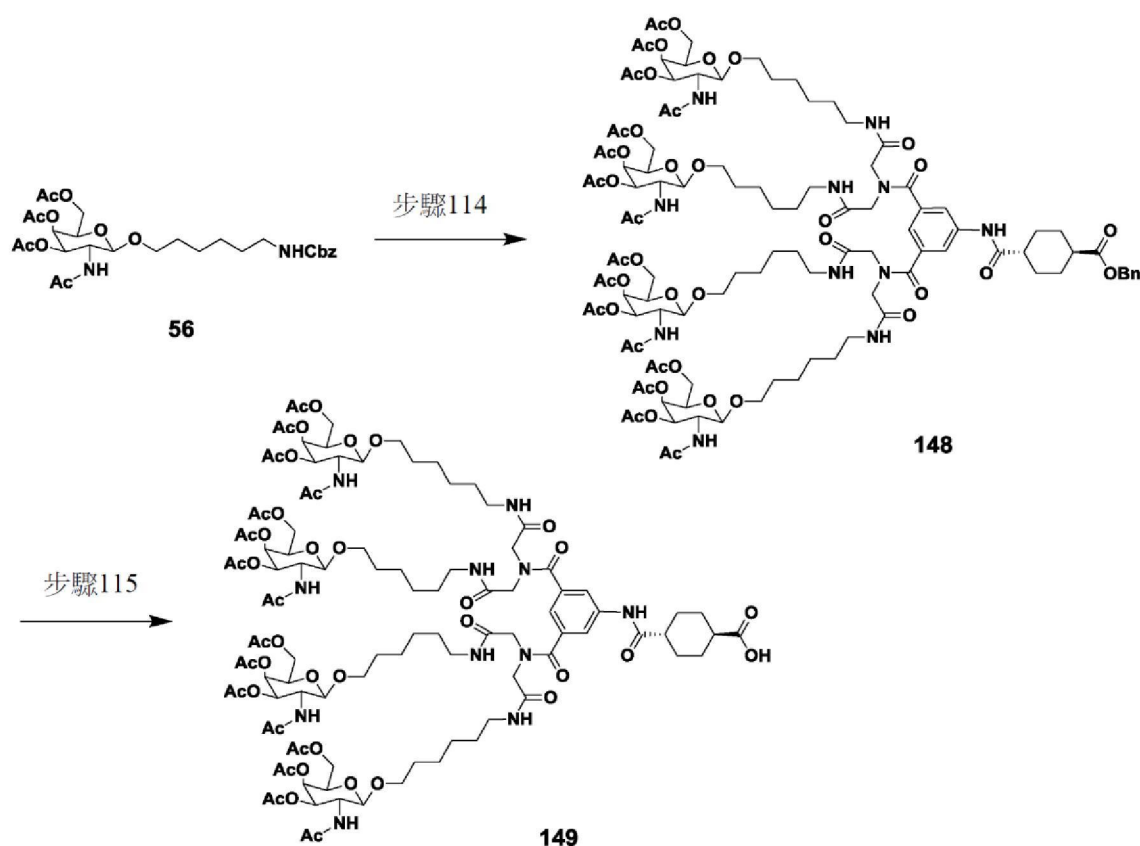
(0.83 mL) 及水(0.28 mL)中，於室溫下添加10%鈀碳粉末(含水晶，54.29%，18 mg)，並於氫氣環境下攪拌2小時。過濾反應液，於減壓下將溶劑蒸餾去除，而獲得化合物147(50.1 mg，產率97%)。

ESI-MS  $m/z$ : 1112( $M+2H$ )<sup>2+</sup>

<sup>1</sup>H-NMR(400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>,  $\delta$ ): 0.96-1.06 (3H, m), 1.71-2.20 (54H, m), 3.41-3.64 (15H, m), 3.68-4.20 (32H), 4.55 (4H, d,  $J = 8.4$  Hz), 4.81 (4H, s), 4.94-5.02 (4H, m), 5.17-5.25 (4H, m), 6.63-6.76 (2H, m), 6.93-7.02 (2H, m), 7.84-8.00 (3H, m), 8.17-8.30 (2H, m), 8.58-8.70 (2H, m).

化合物149之合成

[化179]



## 步驟114

將化合物56(500 mg, 0.861 mmol)溶解於N,N'-二甲基甲醯胺(10 mL)中，於室溫下添加10%鈀碳粉末(含水晶，54.29%，92.1 mg)，並於氫氣環境下攪拌2小時。於氫氣環境下在室溫下添加化合物116(113 mg, 0.172 mmol)、1-(3-二甲基胺基丙基)-3-乙基碳二醯亞胺鹽酸鹽(198 mg, 1.03 mmol)、1-羥基苯并三唑一水合物(13.2 mg, 0.086 mmol)並徹夜攪拌。藉由矽藻土過濾反應液，於減壓下將溶劑蒸餾去除，利用矽膠管柱層析法(氯仿/甲醇=90/10)對殘渣進行精製，進而利用逆相分取HPLC(乙腈/水)進行精製，藉此獲得化合物148(195 mg, 產率48%)。

ESI-MS m/z: 1186(M+2H)<sup>2+</sup>

## 步驟115

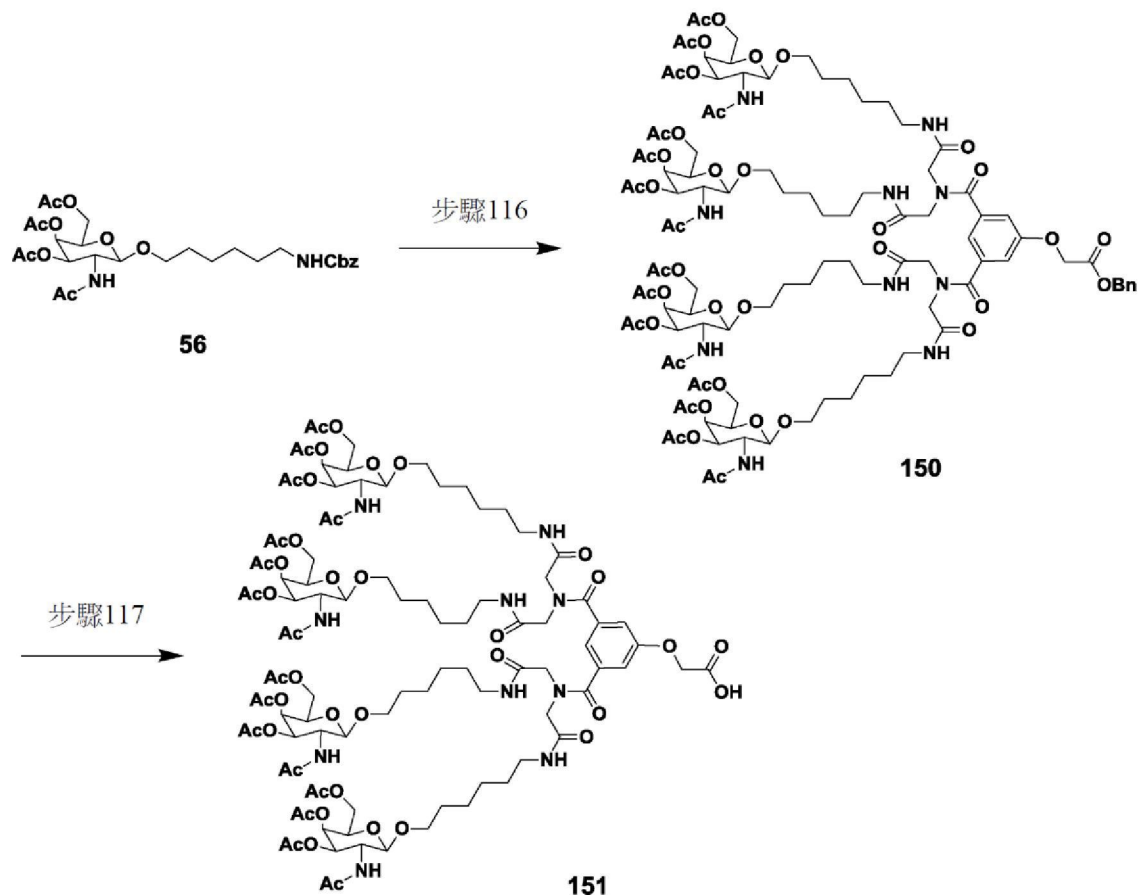
將步驟114中合成之化合物148(194 mg, 0.082 mmol)溶解於四氫呋喃(2.9 mg)及水(1.0 mL)中，於室溫下添加10%鈀碳粉末(含水晶，54.29%，35.7 mg)，並於氫氣環境下攪拌8小時。過濾反應液，於減壓下將溶劑蒸餾去除，而獲得化合物149(183 mg, 產率98%)。

ESI-MS m/z: 1141(M+2H)<sup>2+</sup>

<sup>1</sup>H-NMR(400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ): 1.21-1.45 (m, 40H), 1.76-2.18 (m, 50H), 3.00-3.09 (m, 8H), 3.40-4.20 (m, 32H), 4.47 (d, J = 8.5 Hz, 4H), 4.96 (dd, J = 3.1, 11.2 Hz, 4H), 5.21 (d, J = 3.1 Hz, 4H), 6.98 (s, 1H), 7.65 (s, 2H), 7.84 (d, J = 9.0 Hz, 4H), 8.31 (brs, 1H), 8.44 (brs, 1H), 10.11 (s, 1H).

化合物151之合成

[化180]



### 步驟116

將化合物56(500 mg, 0.861 mmol)溶解於N,N'-二甲基甲醯胺(10 mL)中，於室溫下添加10%鈀碳粉末(含水晶，54.29%，92.1 mg)，並於氫氣環境下攪拌2小時。於氫氣環境下在室溫下添加化合物120(97.0 mg, 0.172 mmol)、1-(3-二甲基胺基丙基)-3-乙基碳二醯亞胺鹽酸鹽(198 mg, 1.03 mmol)、1-羥基苯并三唑一水合物(13.2 mg, 0.086 mmol)並徹夜攪拌。藉由矽藻土過濾反應液，於減壓下將溶劑蒸餾去除，利用矽膠管柱層析法(氯仿/甲醇=85/15)精製殘渣，進而利用逆相分取HPLC(乙腈/水)進行精製，藉此獲得化合物150(179 mg, 產率46%)。

ESI-MS m/z: 1138(M+2H)<sup>2+</sup>

## 步驟117

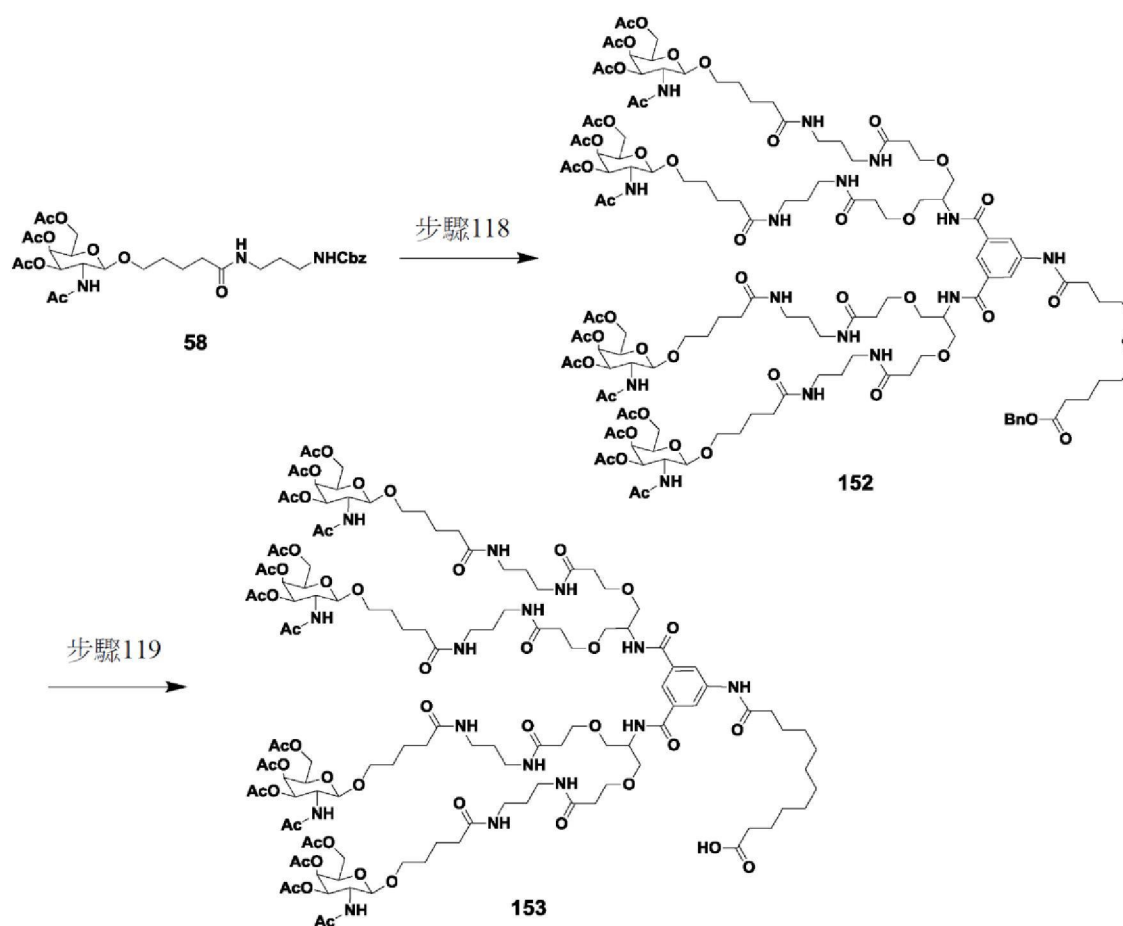
將步驟116中合成之化合物150(175 mg, 0.077 mmol)溶解於四氫呋喃(2.6 mg)及水(0.9 mL)中，於室溫下添加10%鈀碳粉末(含水晶，54.29%，32.4 mg)，並於氫氣環境下攪拌1小時。過濾反應液，於減壓下將溶劑蒸餾去除，而獲得化合物151(160 mg，產率95%)。

ESI-MS  $m/z$ : 1093( $M+2H$ )<sup>2+</sup>

<sup>1</sup>H-NMR(400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>,  $\delta$ ): 1.23-1.45 (m, 32H), 1.77 (s, 12H), 1.89 (s, 12H), 1.99 (s, 12H), 2.10 (s, 12H), 3.01-3.11 (m, 8H), 3.69-4.02 (m, 34H), 4.47-4.50 (m, 4H), 4.94-4.98 (m, 4H), 5.21 (d,  $J = 3.1$  Hz, 4H), 6.92 (s, 1H), 6.94 (s, 2H), 7.87 (d,  $J = 9.4$  Hz, 2H), 7.92 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H), 8.33 (brs, 2H), 8.50 (brs, 2H).

化合物153之合成

[化181]



### 步驟118

將化合物58(500 mg, 0.784 mmol)溶解於N,N'-二甲基甲醯胺(10 mL)中，於室溫下添加10%鈹碳粉末(含水晶，54.29%，92.1 mg)，並於氫氣環境下攪拌2小時。於氫氣環境下在室溫下添加化合物125(144 mg, 0.157 mmol)、1-(3-二甲基胺基丙基)-3-乙基碳二醯亞胺鹽酸鹽(180 mg, 0.941 mmol)、1-羥基苯并三唑一水合物(12.0 mg, 0.078 mmol)並徹夜攪拌。藉由矽藻土過濾反應液，於減壓下將溶劑蒸餾去除，利用矽膠管柱層析法(氯仿/甲醇=80/20)對殘渣進行精製，進而利用逆相分取HPLC(乙腈/水)進行精製，藉此獲得化合物152(191 mg, 產率43%)。

ESI-MS  $m/z$ : 1431( $M+2H$ )<sup>2+</sup>

### 步驟119

第 215 頁(發明說明書)

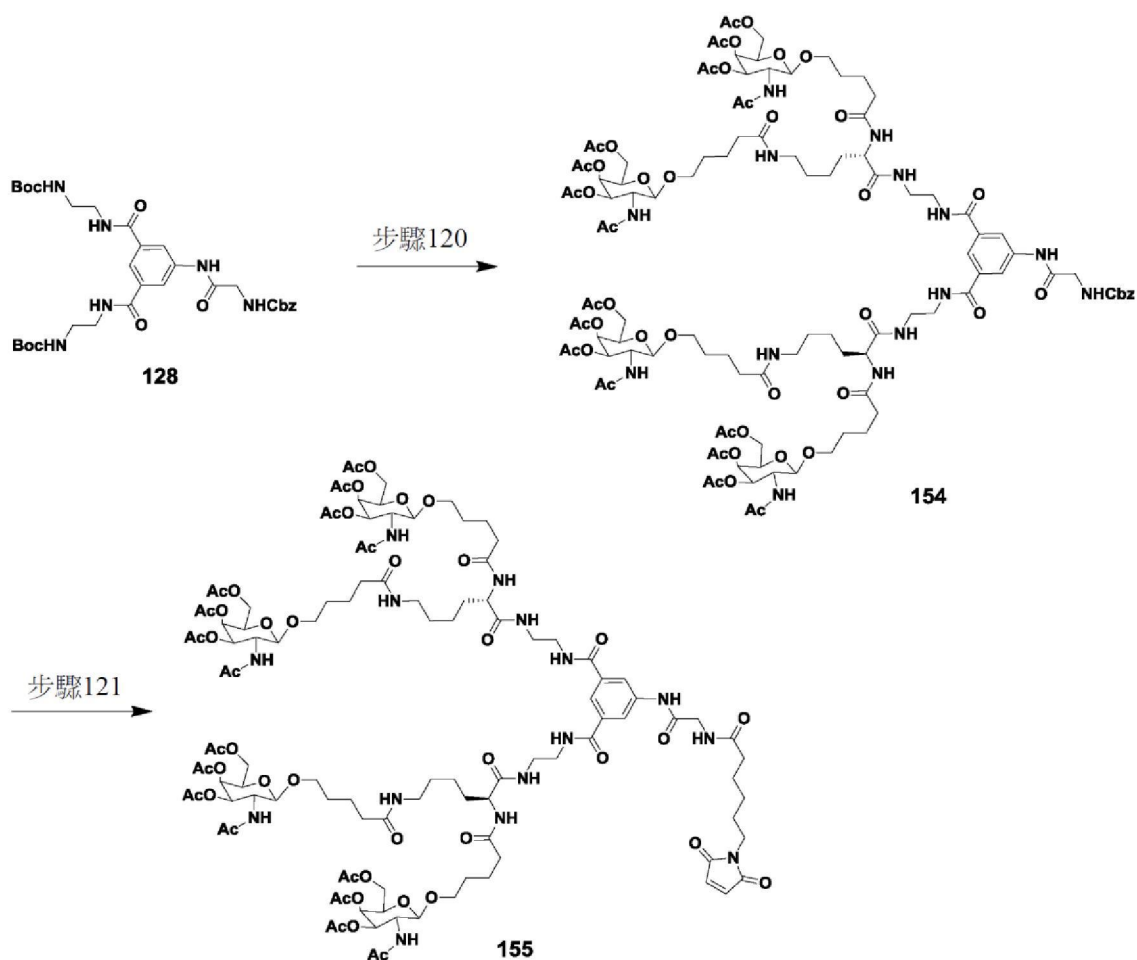
將步驟118中合成之化合物152(186 mg, 0.065 mmol)溶解於四氫呋喃(2.8 mg)及水(0.9 mL)中，於室溫下添加10%鈀碳粉末(含水晶，54.29%，34.3 mg)，並於氫氣環境下攪拌1小時。過濾反應液，於減壓下將溶劑蒸餾去除，而獲得化合物153(174 mg，產率97%)。

ESI-MS  $m/z$ : 1386( $M+2H$ )<sup>2+</sup>

<sup>1</sup>H-NMR(400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>,  $\delta$ ): 1.25-4.02 (m, 164H), 4.18-4.26 (m, 2H), 4.47 (d,  $J = 8.1$  Hz, 4H), 4.96 (dd,  $J = 3.1, 11.2$  Hz, 4H), 5.21 (d,  $J = 3.6$  Hz, 4H), 7.74-7.91 (m, 13H), 8.18 (s, 2H), 8.36 (d,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 10.27 (brs, 1H).

化合物155之合成

[化182]



### 步驟120

將化合物128(150 mg, 0.228 mmol)溶解於二氯甲烷(1.5 mL)中，於室溫下添加三氟乙酸(1.5 mL)並攪拌4小時。將反應液減壓濃縮，藉由乙酸乙酯進行共沸。將殘渣溶解於N,N'-二甲基甲醯胺(3 mL)中，於室溫下添加化合物7(574 mg, 0.571 mmol)、1-(3-二甲基胺基丙基)-3-乙基碳二醯亞胺鹽酸鹽(109 mg, 0.571 mmol)、三乙胺(0.159 mL, 1.14 mmol)、1-羥基苯并三唑一水合物(3.50 mg, 0.023 mmol)並徹夜攪拌。將反應液減壓濃縮，利用矽膠管柱層析法(氯仿/甲醇=90/10)對殘渣進行精製，進而利用逆相分取HPLC(乙腈/水)進行精製，藉此獲得化合物154(242 mg, 產率44%)。

ESI-MS m/z: 1216(M+2H)<sup>2+</sup>

### 步驟121

將化合物154(242 mg, 0.100 mmol)溶解於四氫呋喃/水(4/1, 12 mL)中, 於室溫下添加10%鈦碳粉末(含水晶, 54.29%, 44.6 mg), 並於氫氣環境下攪拌2小時。於氫氣環境下在室溫下添加6-順丁烯二醯亞胺己酸(23.2 mg, 0.110 mmol)、4-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三吡啶-2-基)-4-甲基咪啉鹽酸鹽(55.2 mg, 0.199 mmol)並徹夜攪拌。藉由矽藻土過濾反應液, 於減壓下將溶劑蒸餾去除, 利用HP20樹脂(丙酮/水)對殘渣進行精製, 藉此獲得化合物155(97.4 mg, 產率39%)。

ESI-MS m/z: 1245(M+2H)<sup>2+</sup>

<sup>1</sup>H-NMR(400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ): 1.14-2.16 (100H, m), 2.96-2.98 (4H, m), 3.24-3.41 (18H, m), 3.69-3.73 (4H, m), 3.83-3.91 (6H, m), 4.14-4.16 (2H, m), 4.47 (4H, d, J = 8.6 Hz), 4.96 (4H, dd, J = 3.6, 11.3 Hz), 5.21 (4H, d, J = 3.2 Hz), 7.01 (2H, s), 7.73-7.75 (2H, m), 7.83-7.94 (7H, m), 8.05-8.08 (2H, m), 8.14-8.20 (3H, m), 8.55-8.56 (2H, m), 10.24 (1H, brs).

化合物157之合成

[化183]

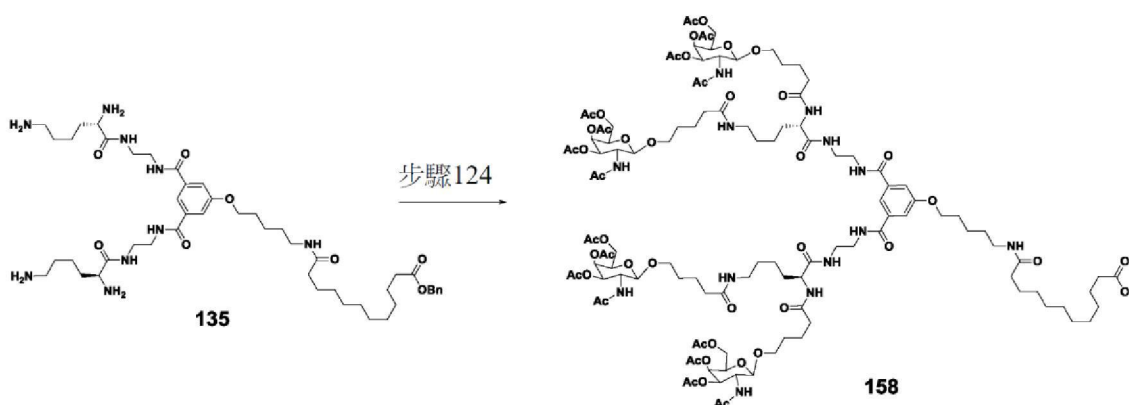


將步驟122中合成之化合物156(196 mg, 0.085 mmol)溶解於四氫呋喃/水(4/1, 10 mL)中, 於室溫下添加10%鈣碳粉末(含水晶, 54.29%, 36.1 mg), 並於氫氣環境下攪拌2小時。於氫氣環境下在室溫下添加6-順丁烯二醯亞胺己酸(19.8 mg, 0.094 mmol)、4-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三吡啶-2-基)-4-甲基咪啉鹽酸鹽(47.0 mg, 0.170 mmol)並徹夜攪拌。藉由矽藻土過濾反應液, 於減壓下將溶劑蒸餾去除, 利用HP20樹脂(丙酮/水)對殘渣進行精製, 藉此獲得化合物157(42.4 mg, 產率21%)。

ESI-MS  $m/z$ : 1182(M+2H)<sup>2+</sup>

化合物158之合成

[化184]



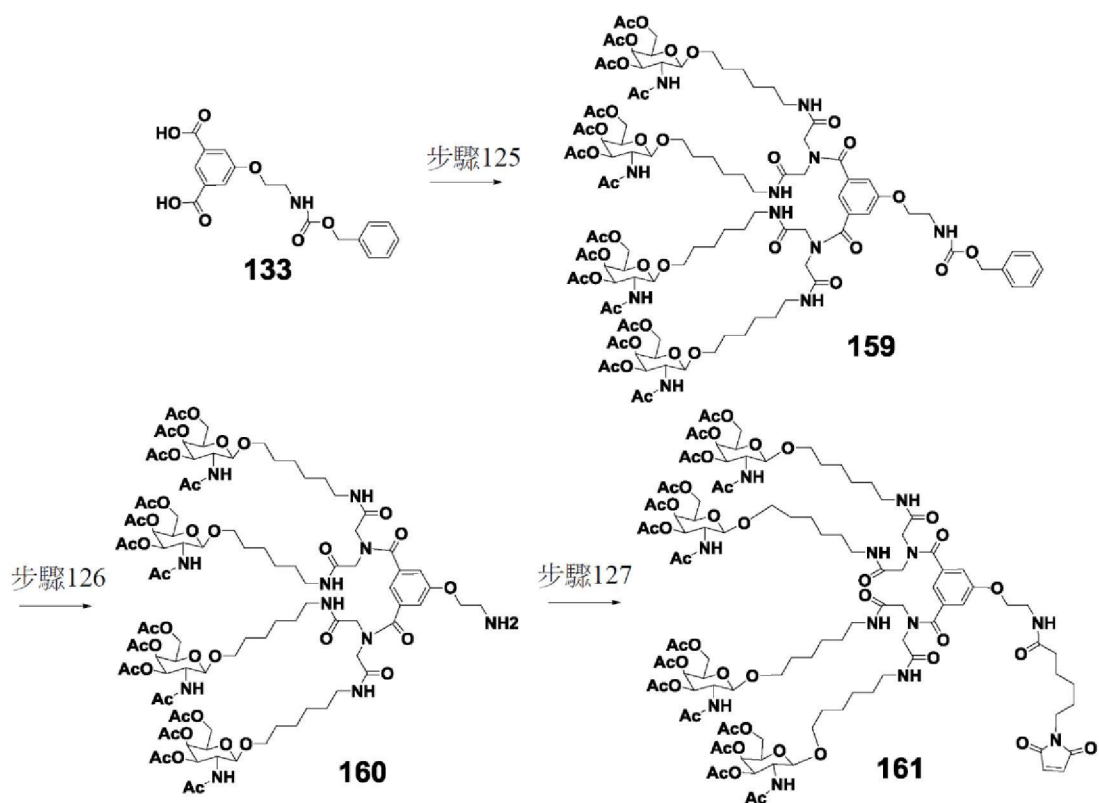
步驟124

使用步驟101中合成之化合物135, 藉由與實施例8之步驟33及34同樣之方法獲得化合物158(2.2 g, 產率58%)。

ESI-MS  $m/z$ : 2437(M+H)<sup>+</sup>

化合物161之合成

[化185]



### 步驟125

使用實施例 13 之步驟 99 中合成之化合物 133(0.101 g, 0.282 mmol)，並且使用參考例 3 之步驟 57 中合成之化合物 62(0.607 g, 0.613 mmol)，藉由與實施例 1 之步驟 8 同樣之方法獲得化合物 159(0.25 g, 產率 39%)。

ESI-MS  $m/z$ : 2304(M+H)<sup>+</sup>

### 步驟126

使用步驟 125 中合成之化合物 159(0.255 g, 0.111 mmol)，藉由與實施例 3 之步驟 18 同樣之方法獲得化合物 160(0.15 g, 產率 63%)。

ESI-MS  $m/z$ : 2170(M+H)<sup>+</sup>

### 步驟127

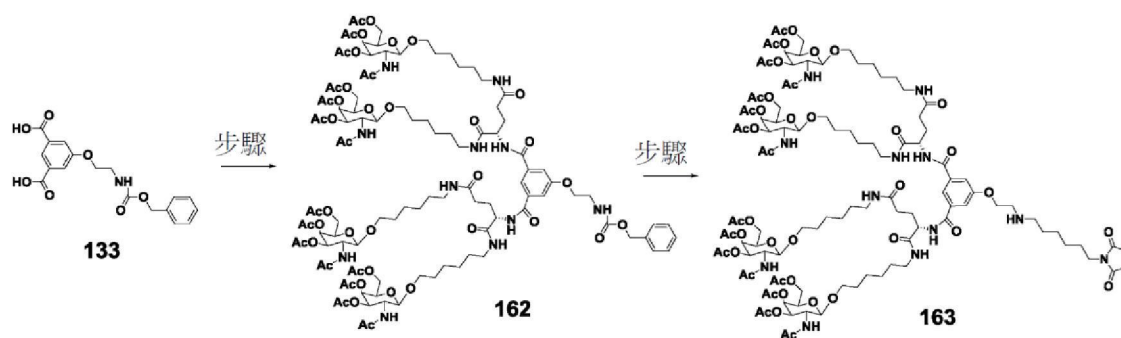
使用步驟 126 中合成之化合物 160(20.8 mg, 9.59  $\mu$ mol)，藉由與實

施例3之步驟19同樣之方法獲得化合物161(5.5 mg，產率24%)。

ESI-MS  $m/z$ : 1182(M+2H)<sup>2+</sup>

化合物163之合成

[化186]



步驟128

使用實施例13之步驟99中合成之化合物133(0.099 g，0.277 mmol)，並且使用參考例3之步驟59中合成之化合物64(0.618 g，0.615 mmol)，藉由與實施例1之步驟8同樣之方法獲得化合物162(0.343 g，產率53%)。

ESI-MS  $m/z$ : 2333(M+H)<sup>+</sup>

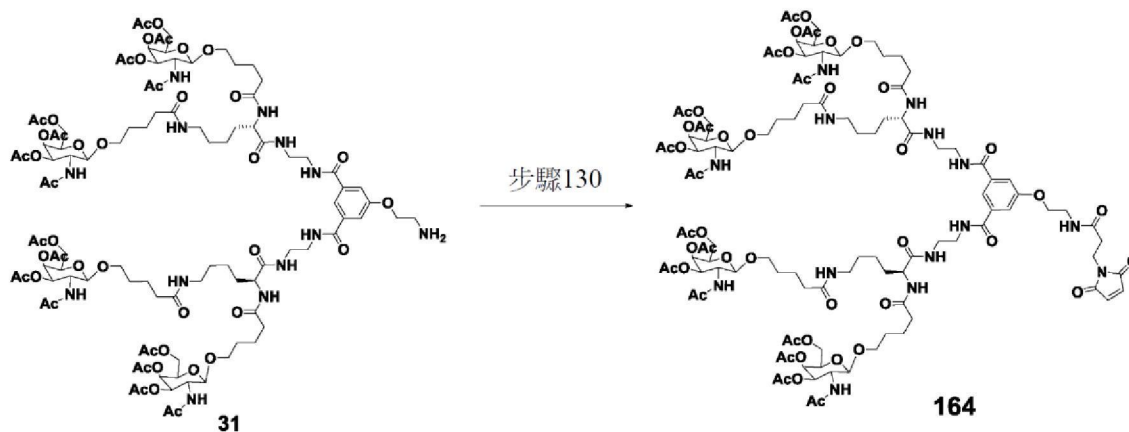
步驟129

使用步驟128中合成之化合物162，藉由與實施例3之步驟18及19同樣之方法獲得化合物163(6.9 mg，產率28%)。

ESI-MS  $m/z$ : 2392(M+H)<sup>+</sup>

化合物164之合成

[化187]



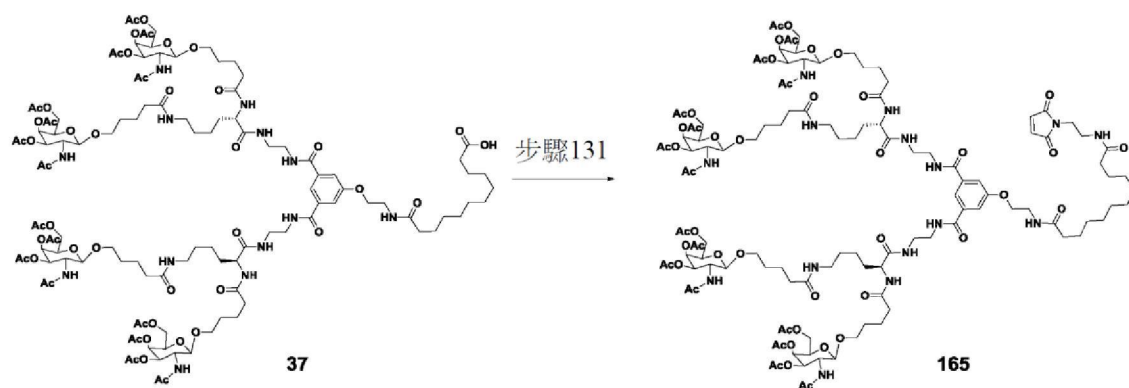
### 步驟130

使用實施例5之步驟28中合成之化合物31(0.048 g, 0.021 mmol)與3-順丁烯二醯亞胺丙酸N-丁二醯亞胺酯(東京化成公司製造, 0.017 g, 0.064 mmol), 藉由與實施例5之步驟29同樣之方法獲得化合物164(0.040 g, 產率78%)。

ESI-MS  $m/z$ : 2480( $M+HCOO$ )<sup>-</sup>

化合物165之合成

[化188]



### 步驟131

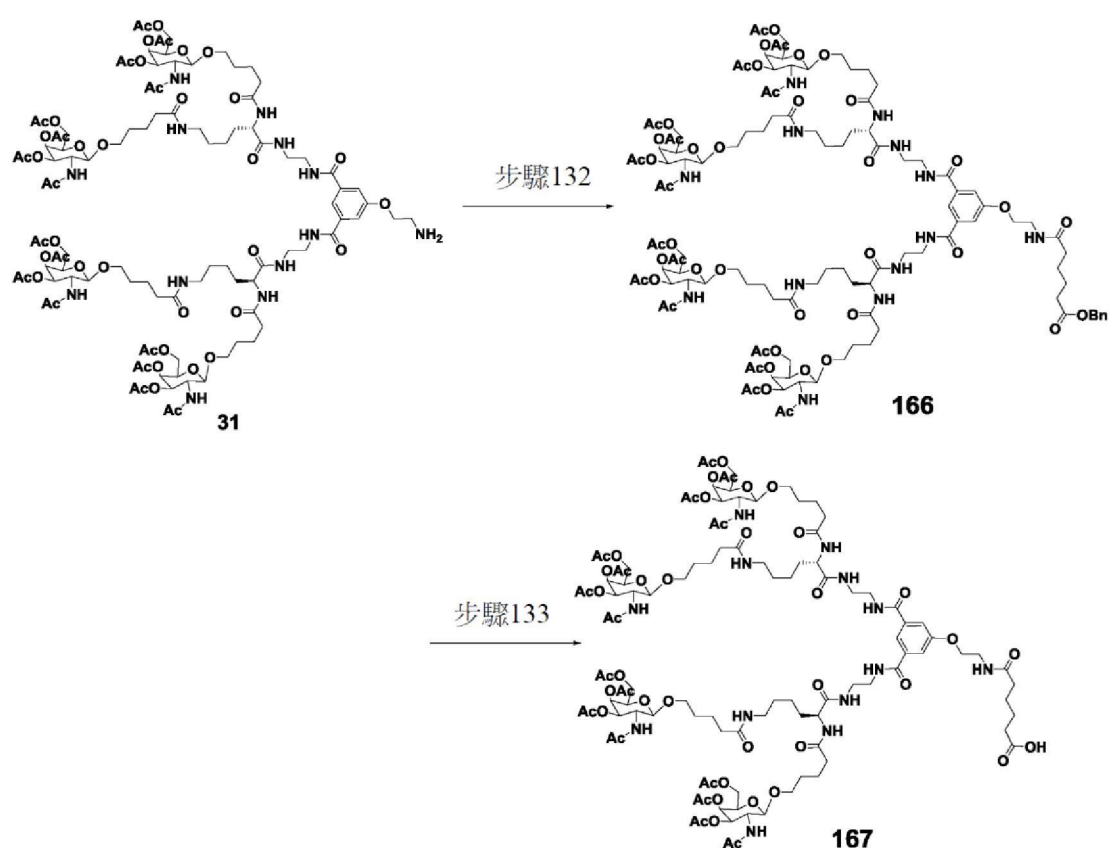
使用實施例8之步驟34中合成之化合物37(23.6 mg, 9.46  $\mu$ mol)與N-

(2-胺基乙基)順丁烯二醯亞胺三氟乙酸鹽(Sigma-Aldrich公司製造，7.21 mg，0.028  $\mu\text{mol}$ )，藉由與實施例1之步驟8同樣之方法獲得化合物165(9.1 mg，產率36%)。

ESI-MS  $m/z$ : 1310( $M+2H$ )<sup>2+</sup>

化合物167之合成

[化189]



步驟132

使用實施例5之步驟28中合成之化合物31(0.122 g，0.054 mmol)，並且使用藉由與實施例2之步驟14同樣之方法合成之己酸單苄基酯，藉由同一步驟所記載之方法獲得化合物166(0.076 g，產率56%)。

ESI-MS  $m/z$ : 2503( $M+H$ )<sup>+</sup>

第 224 頁(發明說明書)

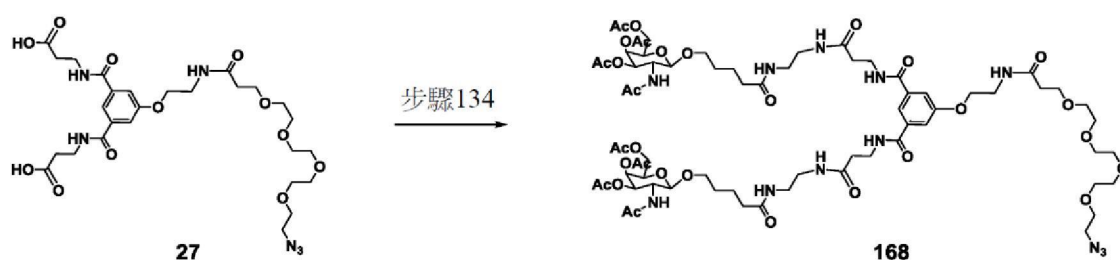
## 步驟133

使用步驟132中合成之化合物166(0.076 g, 0.03 mmol)，藉由與實施例3之步驟18同樣之方法獲得化合物167(0.030 g, 產率40%)。

ESI-MS  $m/z$ : 2412(M+H)<sup>+</sup>

化合物168之合成

[化190]



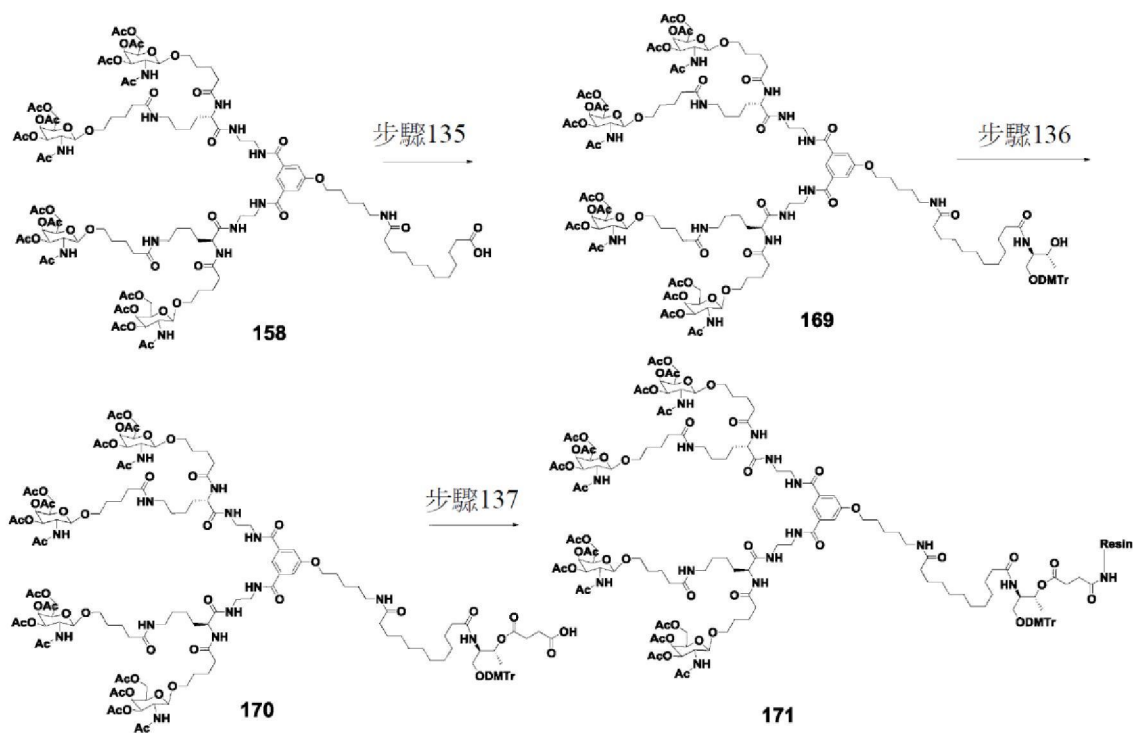
## 步驟134

使用實施例4之步驟24中合成之化合物27(4.36 mg, 0.006 mmol)、參考例1之步驟3中合成之化合物4(10 mg, 0.02 mmol)，藉由與實施例1之步驟12同樣之方法獲得化合物168(7 mg, 產率65%)。

ESI-MS  $m/z$ : 1581(M-H)<sup>-</sup>

化合物171之合成

[化191]



### 步驟135

使用步驟124中合成之化合物158(0.2011 g, 0.079 mmol)，並且使用實施例8之步驟35而獲得化合物169(0.129 g, 產率55%)。

ESI-MS  $m/z$ : 2972(M+HCOO)<sup>-</sup>

### 步驟136

使用步驟135中合成之化合物169(0.129 g, 0.044 mmol)，並且使用實施例8之步驟36而獲得化合物170之粗產物。

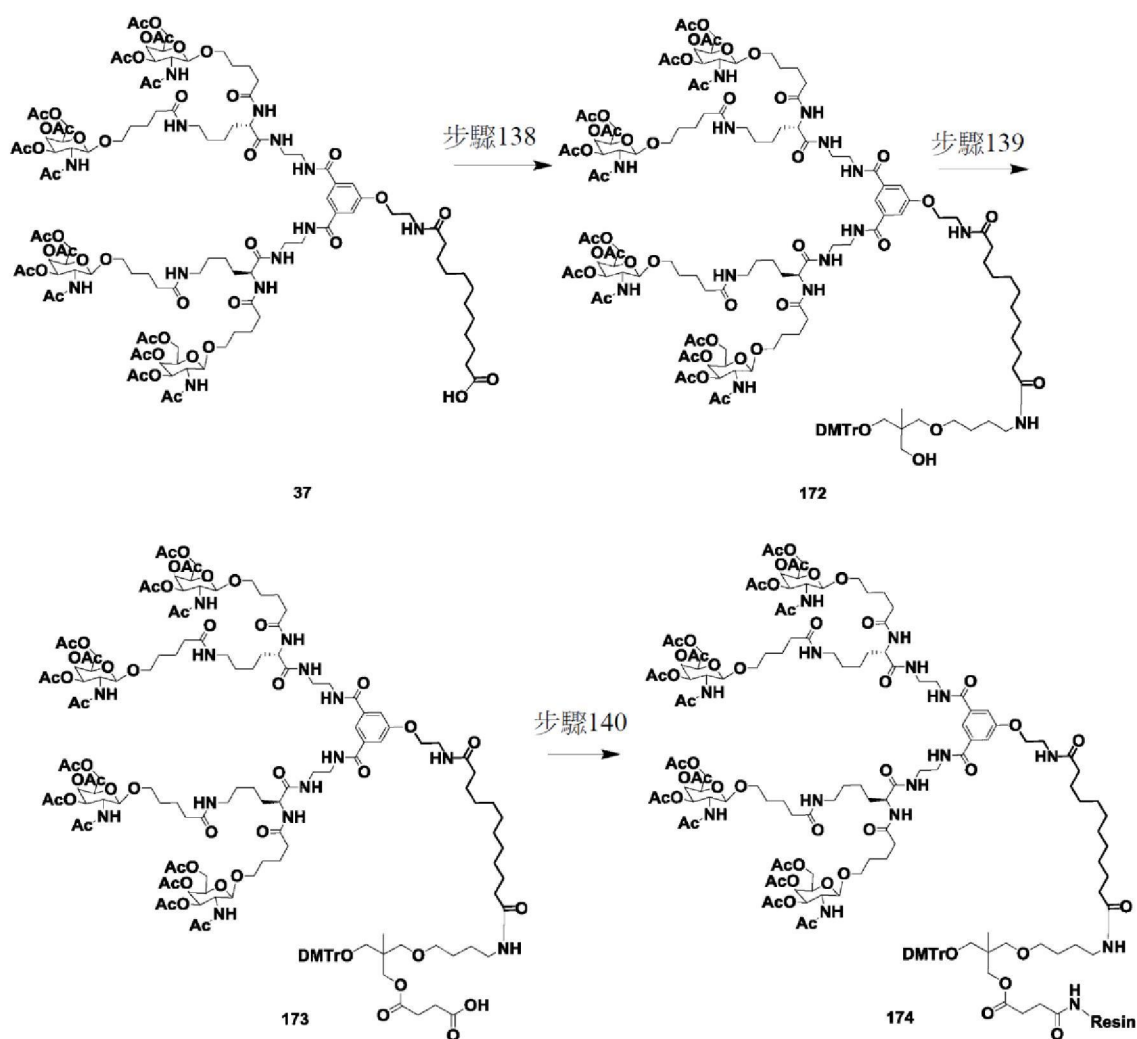
ESI-MS  $m/z$ : 1535(M+HCOOH-2H)<sup>2-</sup>

### 步驟137

使用步驟136中合成之化合物170(0.0467 g, 0.013 mmol)，並且使用實施例8之步驟37而獲得化合物171(19.4  $\mu\text{mol/g}$ , 產率35%)。

化合物174之合成

[化192]



### 步驟138

使用實施例8之步驟35中合成之化合物37(100 mg, 0.040 mmol)及參考例4之步驟60中合成之化合物66, 藉由與實施例8之步驟35同樣之方法獲得化合物172(90 mg, 產率76%)。

ESI-MS  $m/z$ : 1335(M-DMTr+2H)<sup>2+</sup>

### 步驟139

使用步驟138中合成之化合物172(90 mg, 0.030 mmol), 藉由與實施例8之步驟36同樣之方法獲得化合物173之粗產物。

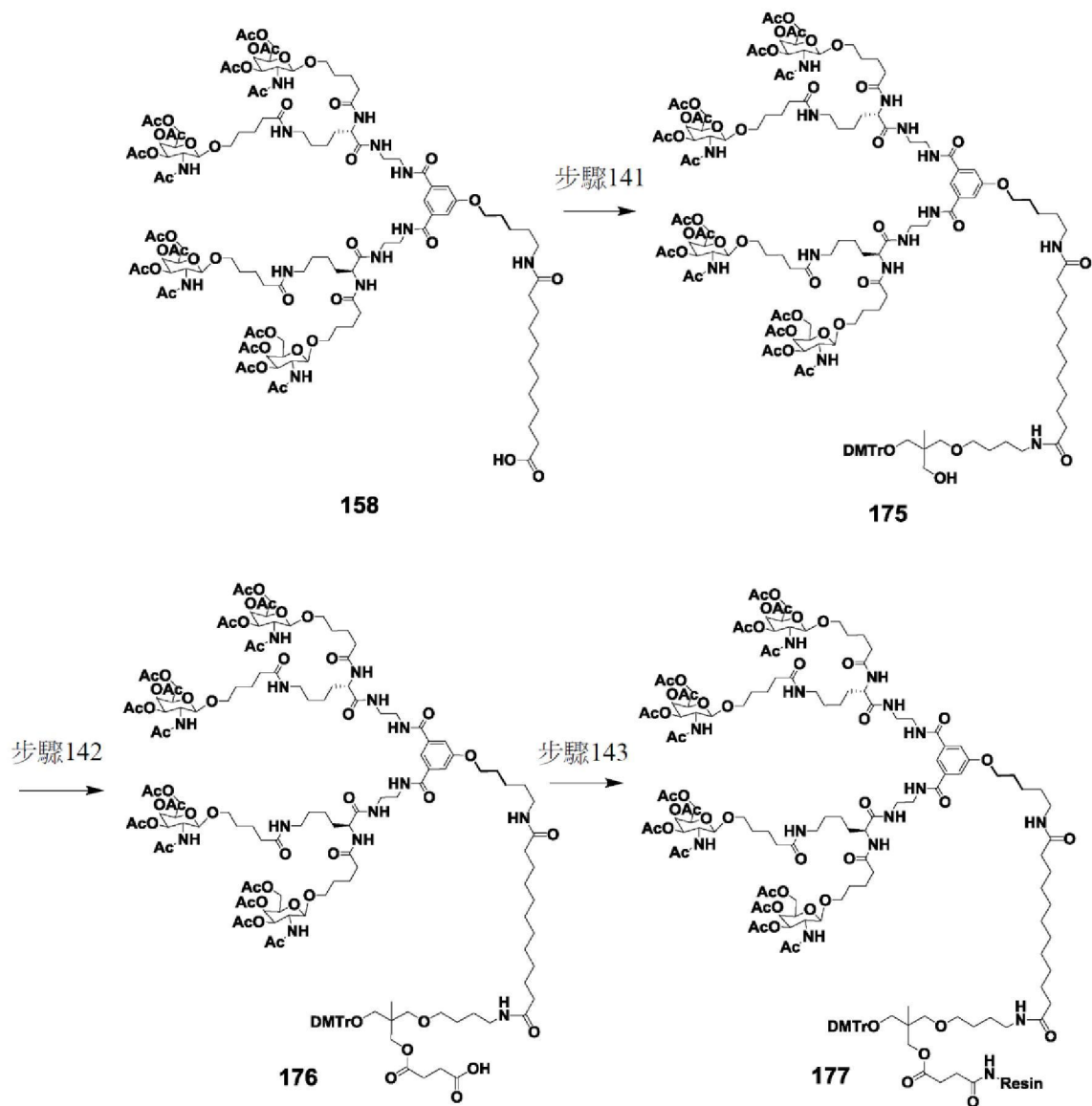
ESI-MS  $m/z$ : 1558(M+HCOOH-2H)<sup>2-</sup>

## 步驟140

使用步驟139中合成之化合物173之粗產物，藉由與實施例8之步驟37同樣之方法獲得化合物174(21.5  $\mu\text{mol/g}$ ，2階段產率32%)。

化合物177之合成

[化193]



## 步驟141

使用實施例14之步驟124中合成之化合物158(100 mg，0.039 mmol)

及參考例4之步驟60中合成之化合物66，藉由與實施例8之步驟35同樣之方法獲得化合物175(90 mg，產率76%)。

ESI-MS m/z: 1356(M+2H)<sup>2+</sup>，作為脫DMTr體而檢測出

#### 步驟142

使用步驟141中合成之化合物175(90 mg，0.030 mmol)，藉由與實施例8之步驟36同樣之方法獲得化合物176之粗產物。

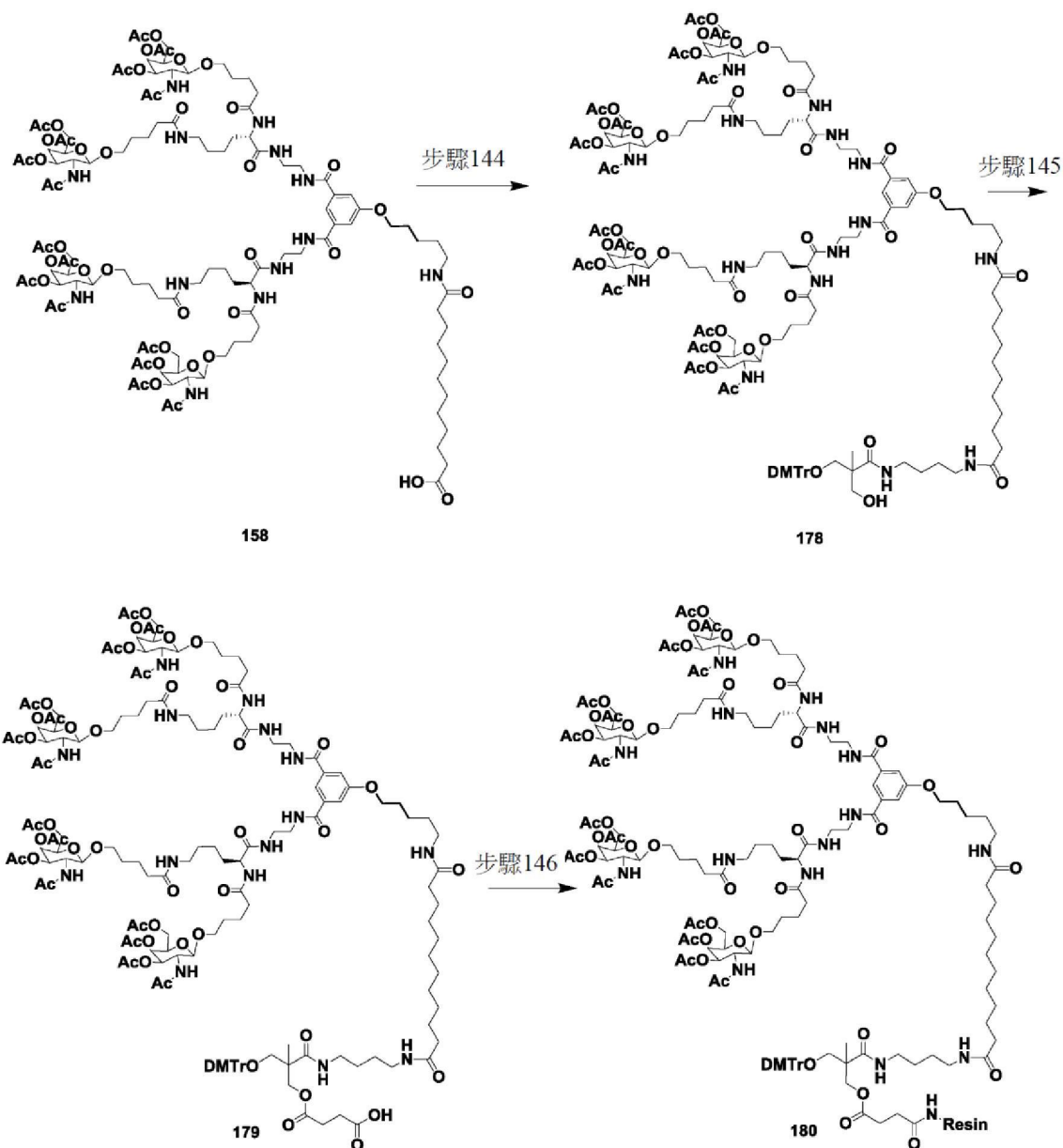
ESI-MS m/z: 1579(M+HCOOH-2H)<sup>2-</sup>

#### 步驟143

使用步驟142中合成之化合物176之粗產物，藉由與實施例8之步驟37同樣之方法獲得化合物177(17.0 μmol/g，2階段產率26%)。

化合物180之合成

[化194]



### 步驟144

使用實施例14之步驟124中合成之化合物158(100 mg, 0.039 mmol)及參考例4之步驟62中合成之化合物69, 藉由與實施例8之步驟35同樣之方法獲得化合物178(50 mg, 產率42%)。

ESI-MS  $m/z$ : 1363( $M+2H$ )<sup>2+</sup>, 作為脫DMTr體而檢測出

### 步驟145

使用步驟144中合成之化合物178(50 mg, 0.017 mmol), 藉由與實施

例8之步驟36同樣之方法獲得化合物179之粗產物。

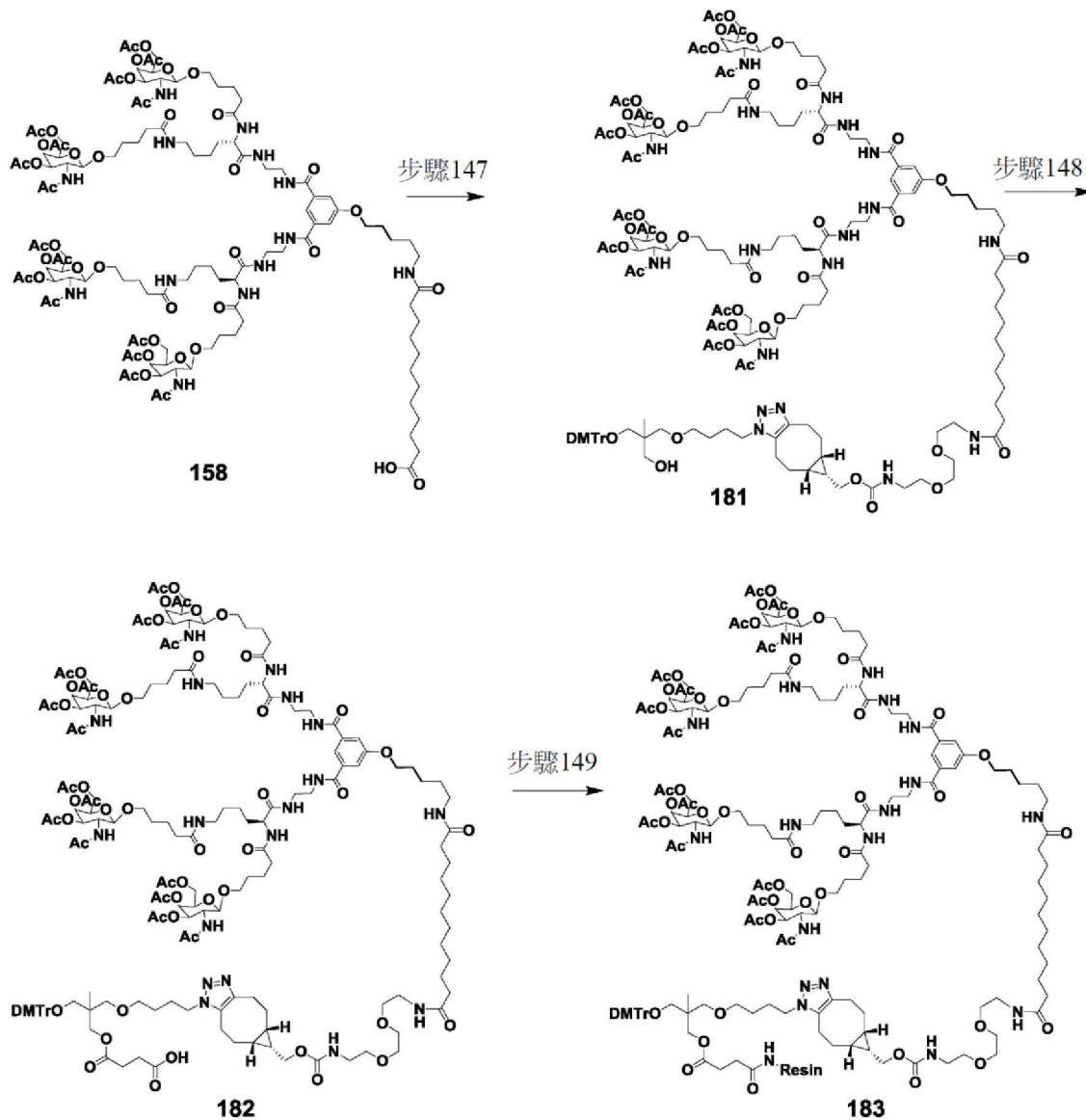
ESI-MS  $m/z$ : 1587(M+HCOOH-2H)<sup>2-</sup>

### 步驟146

使用步驟145中合成之化合物179之粗產物，藉由與實施例8之步驟37同樣之方法獲得化合物180(0.5  $\mu\text{mol/g}$ ，2階段產率1%)。

化合物183之合成

[化195]



## 步驟147

使用實施例14之步驟124中合成之化合物158(100 mg, 0.039 mmol)及參考例4之步驟63中合成之化合物71, 藉由與實施例8之步驟35同樣之方法獲得化合物181(40 mg, 產率30%)。

ESI-MS m/z: 1532(M+2H)<sup>2+</sup>, 作為脫DMTr體而檢測出

## 步驟148

使用步驟147中合成之化合物181(40 mg, 0.012 mmol), 藉由與實施例8之步驟36同樣之方法獲得化合物182之粗產物。

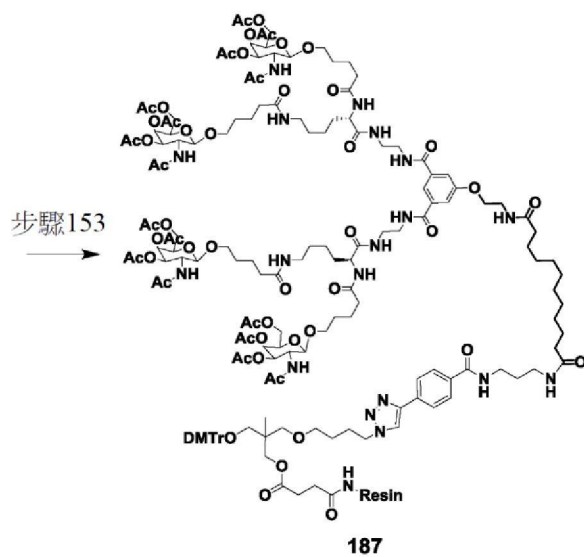
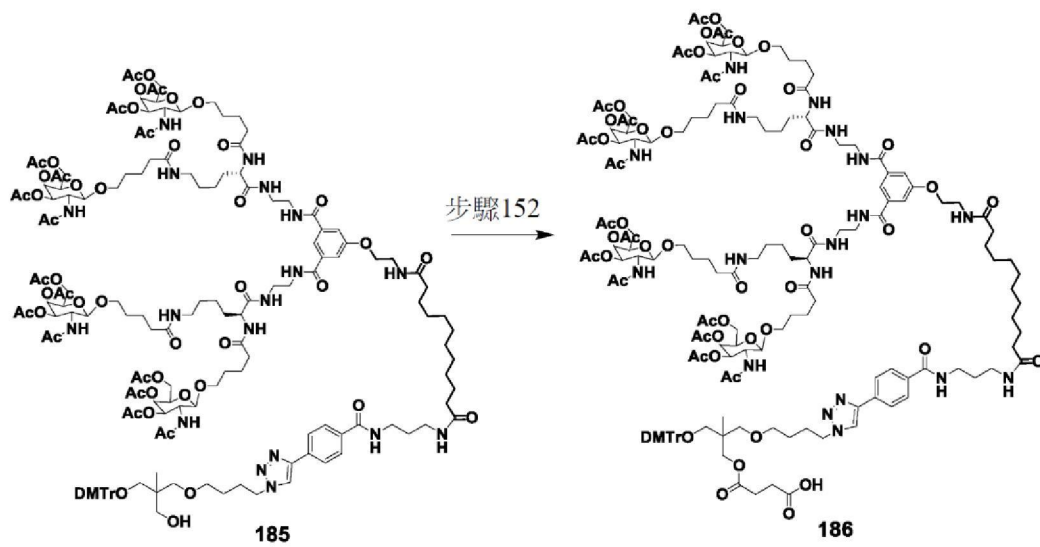
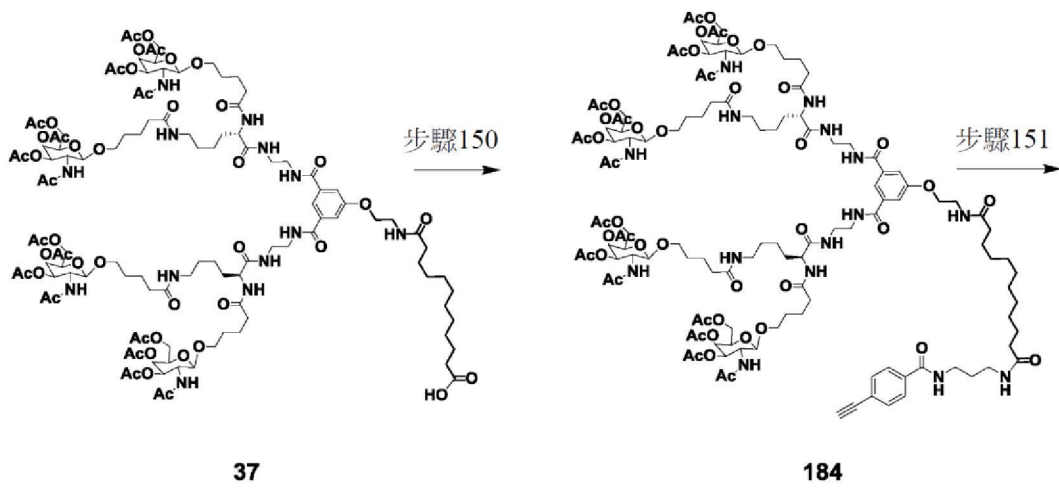
ESI-MS m/z: 1582(M+2H)<sup>2+</sup>, 作為脫DMTr體而檢測出

## 步驟149

使用步驟148中合成之化合物182之粗產物, 藉由與實施例8之步驟37同樣之方法獲得化合物183(0.2 μmol/g, 2階段產率1%)。

化合物187之合成

[化196]



步驟150

使用實施例8之步驟34中合成之化合物158(70 mg, 0.028 mmol)及參考例4之步驟68中合成之化合物78, 藉由與實施例8之步驟35同樣之方法獲得化合物184(58 mg, 產率77%)。

ESI-MS m/z: 1341(M+2H)<sup>2+</sup>

#### 步驟151

將步驟150中合成之化合物184(58 mg, 0.022 mmol)溶解於甲醇(0.15 mL)中, 添加藉由Journal of Organic Chemistry, 第74卷, 6837-6842頁, 2009年所記載之方法中合成之化合物65(16.9 mg, 0.032 mmol)、1 mol/L之L-抗壞血酸鈉(SODIUM L-ASCORBATE)水溶液(0.022 mL, 0.022 mmol)、20 mmol/L硫酸銅(II)水溶液(0.011 mL, 0.22 μmol)、及10 mmol/L之三(2-苯并咪唑基甲基)胺(Tris(2-benzimidazolylmethyl)amine)/DMSO溶液(0.022 mL, 0.22 μmol), 於室溫下攪拌3小時。藉由矽膠管柱層析法(氯仿/甲醇=80/20)對反應液進行精製, 而獲得化合物185(7 mg, 產率10%)。

ESI-MS m/z: 1450(M+2H)<sup>2+</sup>, 作為脫DMTr體而檢測出

#### 步驟152

使用步驟151中合成之化合物185(10 mg, 3.13 μmol), 藉由與實施例8之步驟36同樣之方法獲得化合物186之粗產物。

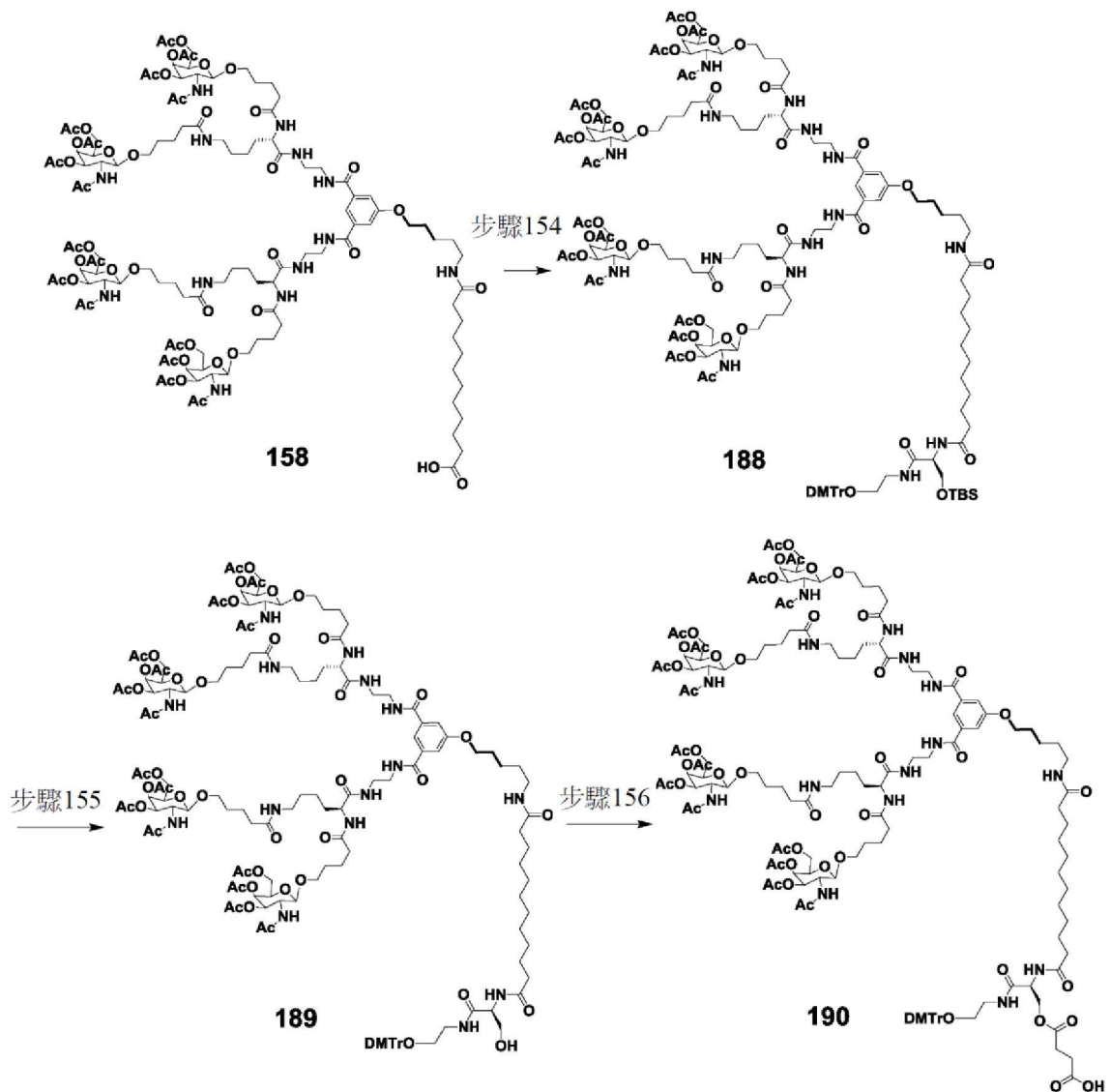
ESI-MS m/z: 1500(M+2H)<sup>2+</sup>, 作為脫DMTr體而檢測出

#### 步驟153

使用步驟152中合成之化合物186之粗產物, 藉由與實施例8之步驟37同樣之方法獲得化合物187(8.4 μmol/g, 產率27%)。

化合物190之合成

[化197]



## 步驟154

使用實施例14之步驟124中合成之化合物158(74.1 mg, 0.029 mmol)與實施例4之步驟72中合成之化合物95(15 mg, 0.027 mmol), 藉由與實施例1之步驟8同樣之方法、或Bioconjugate Chemistry, 第26卷, 1451-1455頁, 2015年所記載之方法獲得化合物188之粗產物。

ESI-MS  $m/z$ : 1392(M+H)<sup>+</sup>, 作為脫DMTr體而檢測出

## 步驟155

使用步驟154中合成之化合物188(0.083 g, 0.027 mmol), 藉由專利文獻WO2015105083所記載之方法獲得化合物189之粗產物。

ESI-MS  $m/z$ : 2669(M+H)<sup>+</sup>, 作為脫DMTr體而檢測出

#### 步驟156

使用步驟155中合成之化合物189(0.08 g, 0.027 mmol), 藉由與實施例8之步驟36同樣之方法獲得化合物190之粗產物。

ESI-MS  $m/z$ : 1556(M+HOOH-2H)<sup>2-</sup>

<sup>1</sup>H-NMR(400 MHz, MeOD)  $\delta$ : 1.45-1.86 (48H, m), 1.93 (12H, s), 1.94 (12H, s), 2.02 (12H, s), 2.13 (12H, s), 2.16-2.28 (17H, m), 2.48 (4H, s), 3.10-3.16 (6H, m), 3.36-3.56 (19H, m), 3.77 (6H, s), 3.80-3.89 (6H, m), 3.98-4.35 (30H, m), 4.53-4.59 (4H, m), 4.66-4.72 (1H, m), 5.04-5.10 (4H, m), 5.31-5.36 (4H, m), 6.81-6.88 (4H, m), 7.17-7.23 (1H, m), 7.26-7.32 (6H, m), 7.38-7.44 (2H, m), 7.54 (2H, brs), 7.90 (1H, brs).

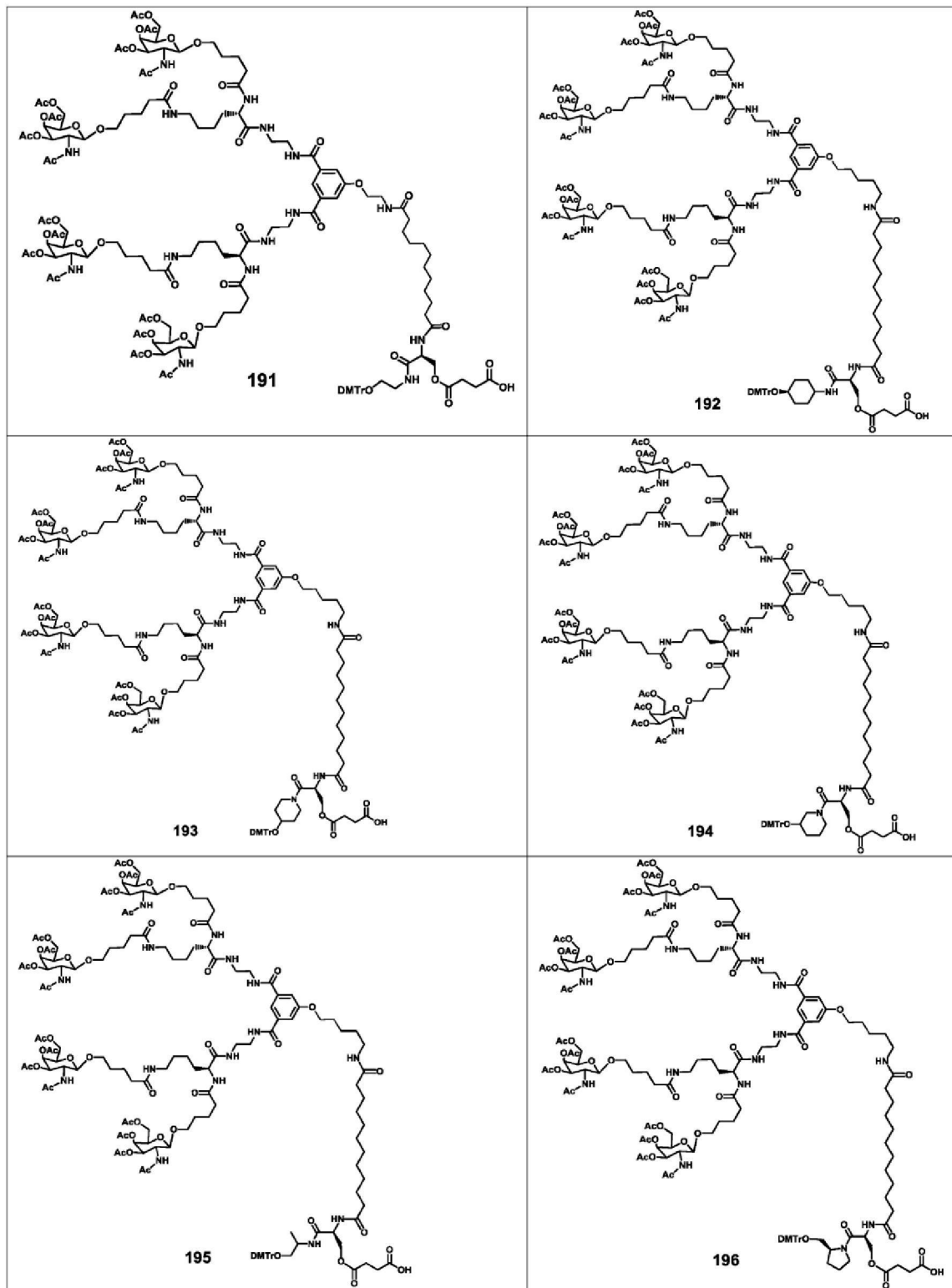
#### 化合物191~199之合成

使用實施例8之步驟34中合成之化合物37或實施例14之步驟124中合成之化合物158及第18表所記載之結構、或參考例4之步驟66中合成之化合物75, 藉由與步驟154、155同樣之方法獲得第20表及第21表所記載之化合物。

將藉由本實施例合成之化合物之質量分析結果示於第22表。

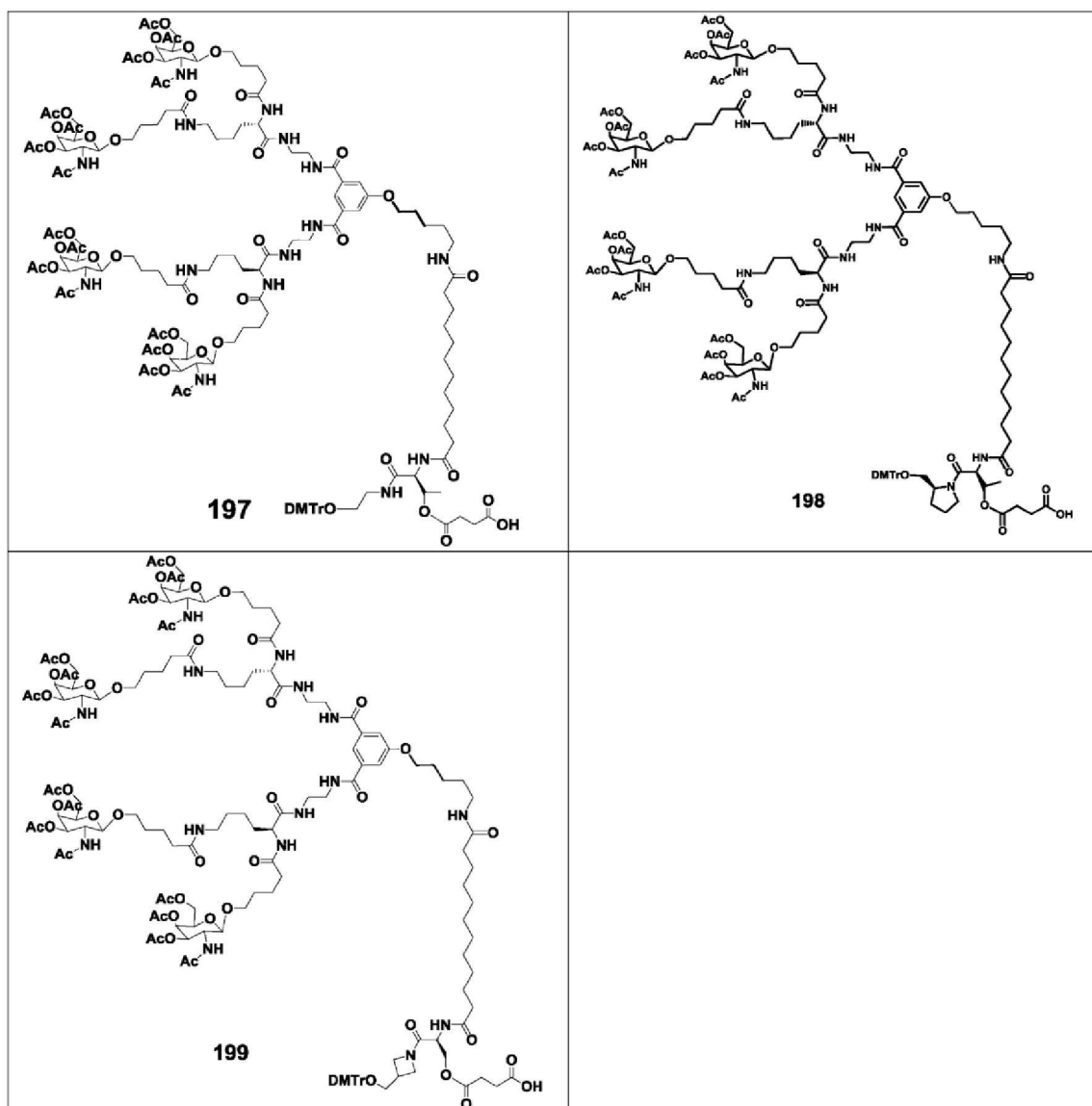
#### 第20表

[表20]



第21表

[表21]



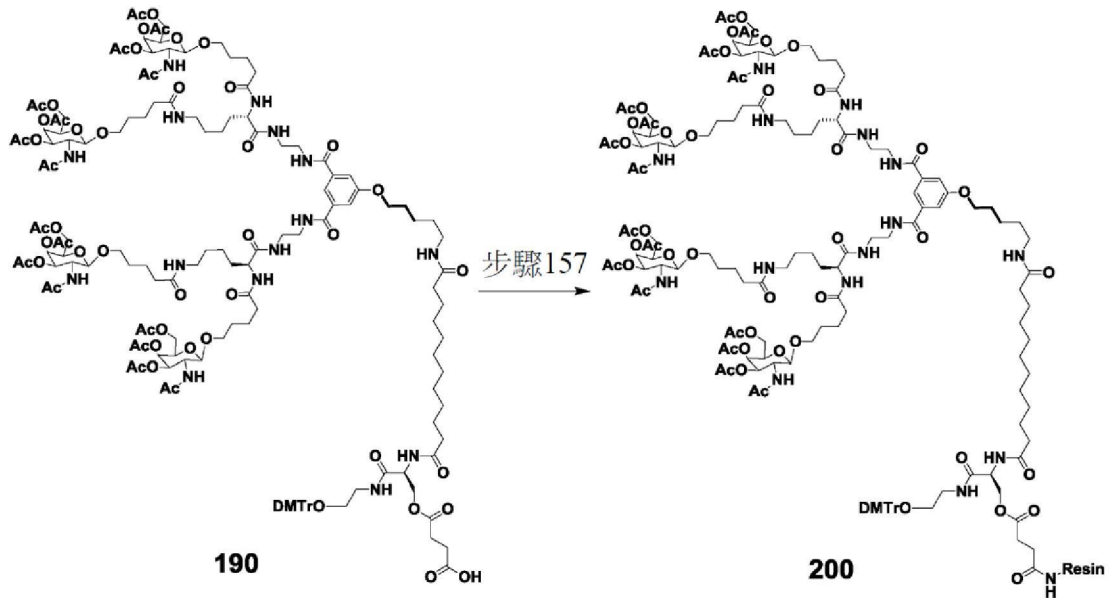
## 第22表

[表22]

化合物	ESI-MS m/z
191	1537(M+HCOOH) <sup>2-</sup>
192	1584(M+HCOOH) <sup>2-</sup>
193	1577(M+HCOOH) <sup>2-</sup>
194	1577(M+HCOOH) <sup>2-</sup>
195	1564(M+HCOOH) <sup>2-</sup>
196	1578(M+HCOOH) <sup>2-</sup>
197	1564(M+HCOOH) <sup>2-</sup>
198	1584(M+HCOOH) <sup>2-</sup>
199	1570(M+2HCOOH) <sup>2-</sup>

## 化合物200之合成

[化198]



## 步驟157

使用步驟156中合成之化合物190(g, mmol)，藉由與實施例8之步驟37同樣之方法獲得化合物200(10.0  $\mu\text{mol/g}$ )。

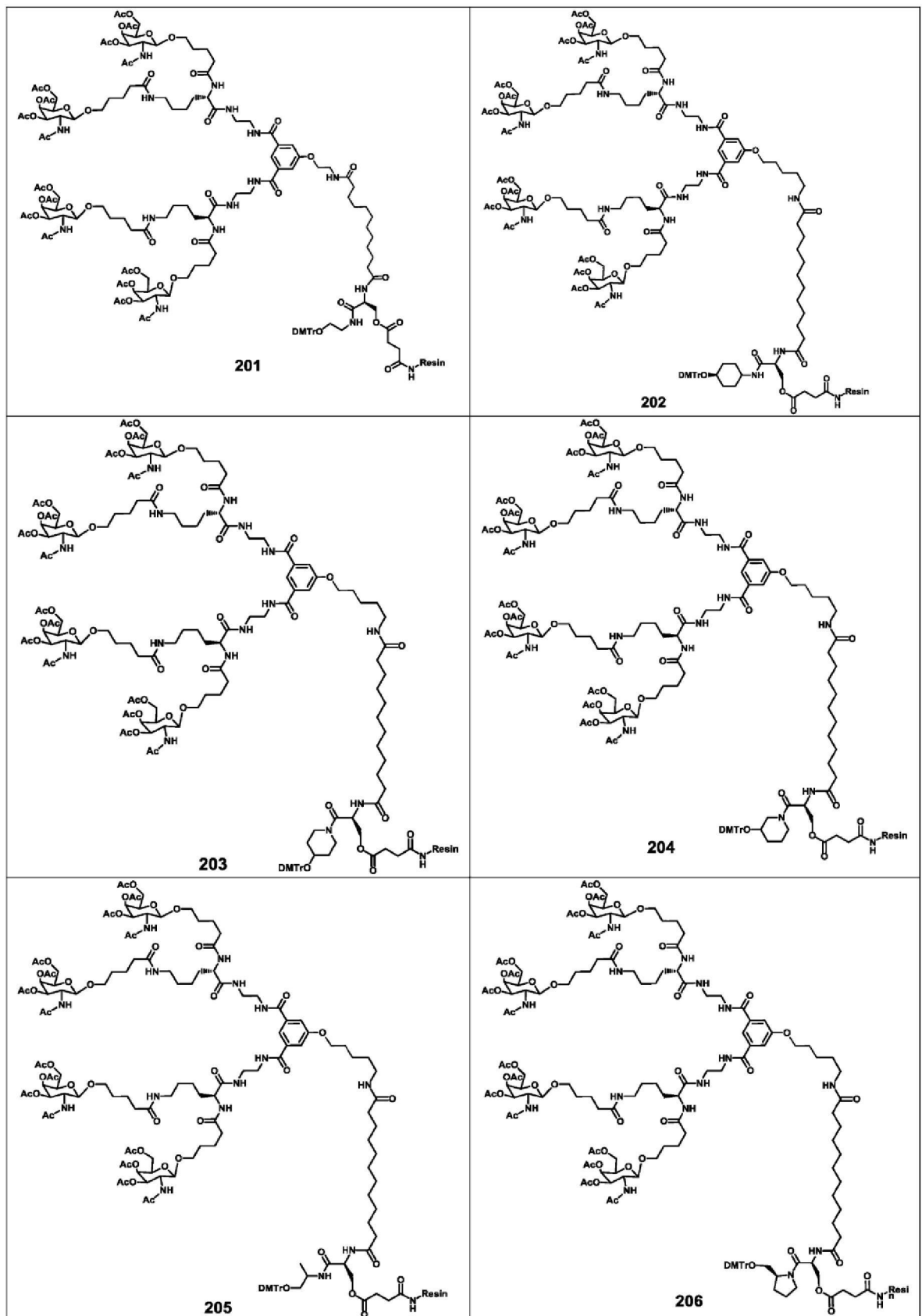
## 化合物201~209之合成

使用第20表及第21表所記載之化合物，藉由與步驟157同樣之方法獲得第23表及第24表所記載之化合物。

將藉由本實施例合成之化合物之擔載量示於第25表。

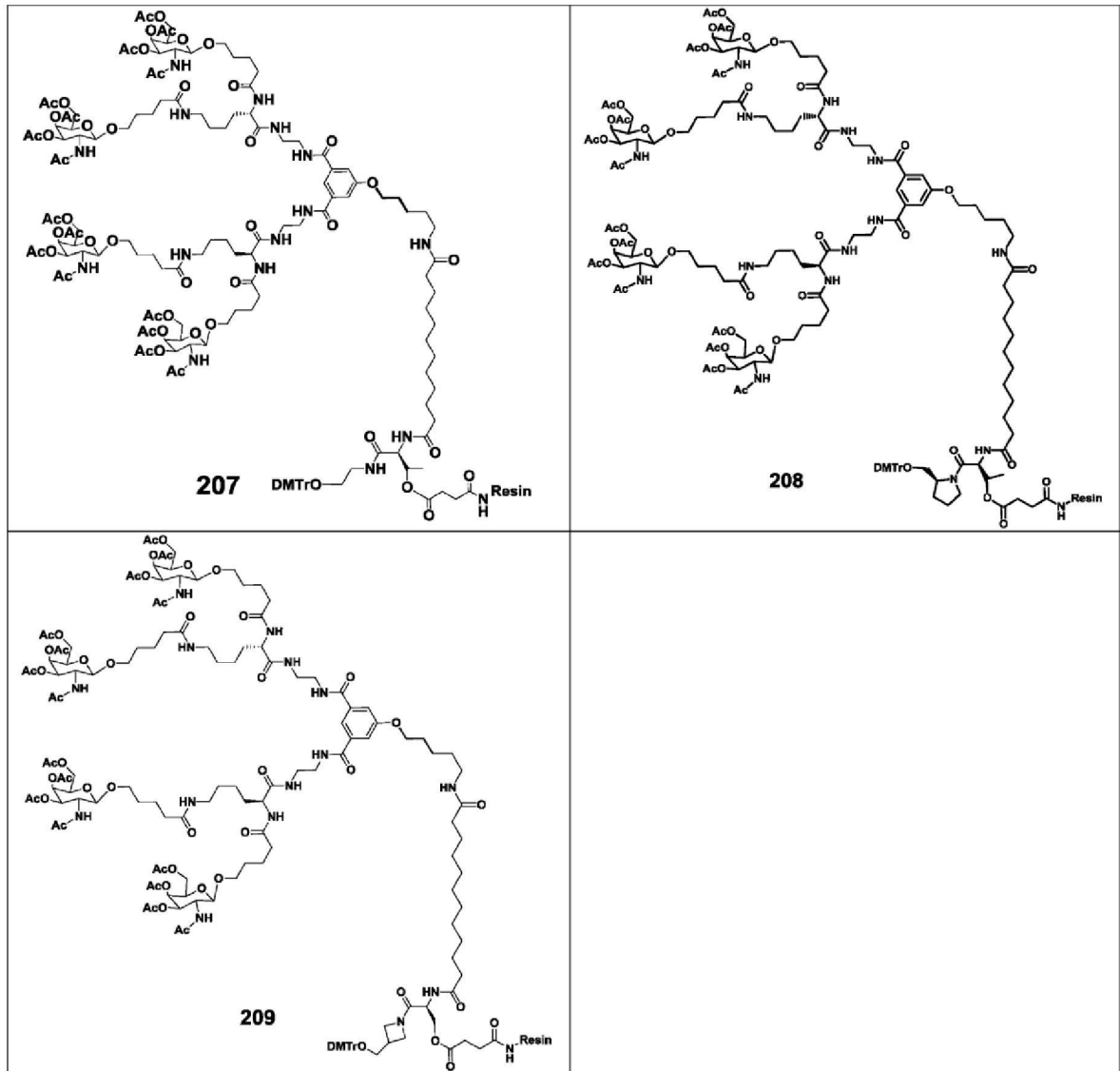
## 第23表

[表23]



第24表

[表24]



## 第25表

[表25]

化合物	擔載量( $\mu\text{mol/g}$ )
201	2.6
202	23.1
203	22.2
204	32.7
205	30.5
206	18.1
207	20.4
208	12.7
209	2.2

## 實施例15 核酸複合體之合成

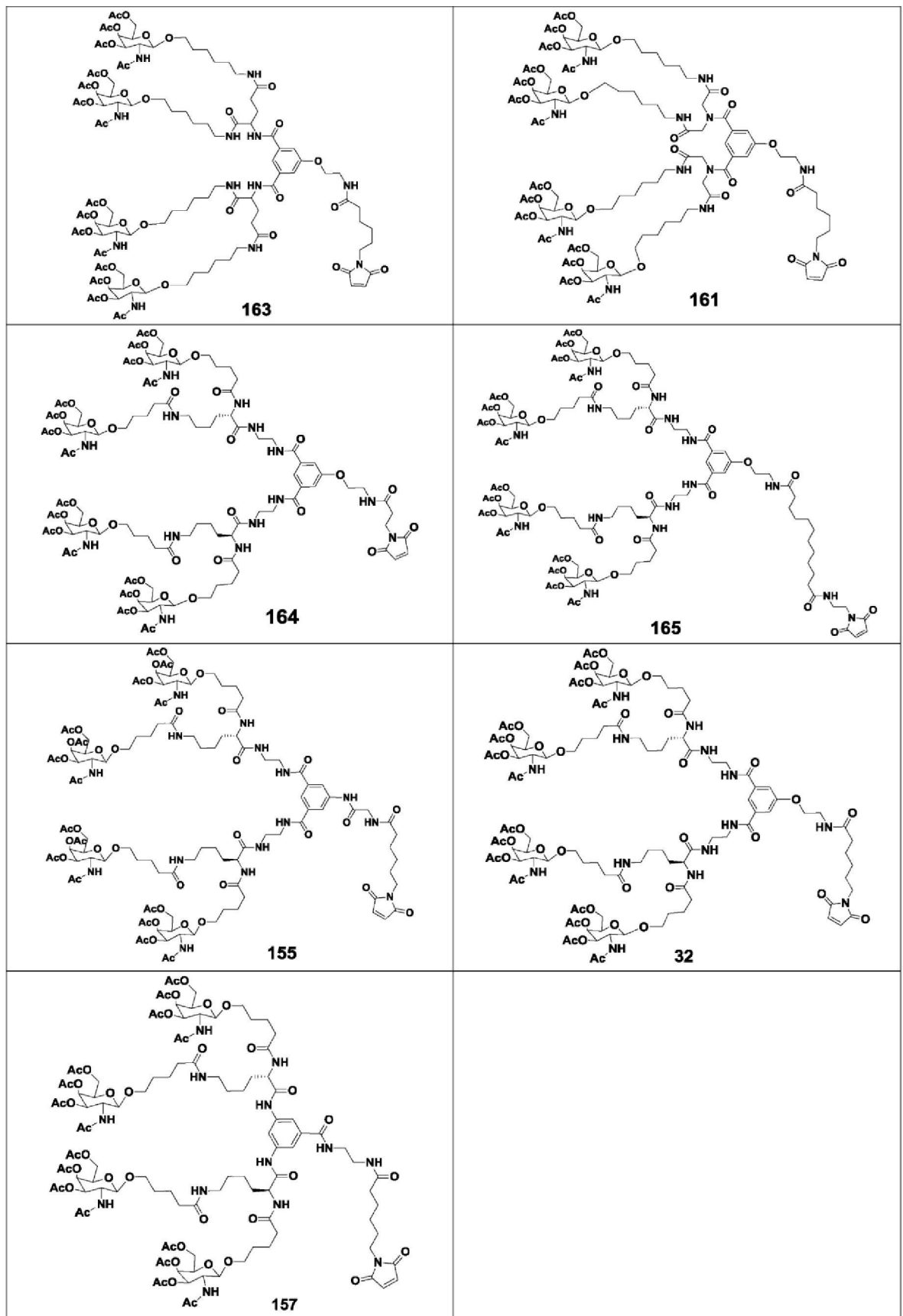
## 核酸複合體210~218之合成

藉由與實施例9之步驟38同樣之方法，使用第26表所記載之化合物而獲得第27表及第28表所記載之單鏈之核酸複合體。

將藉由本實施例合成之核酸複合體之序列及質量分析結果示於第29表。

## 第26表

[表26]

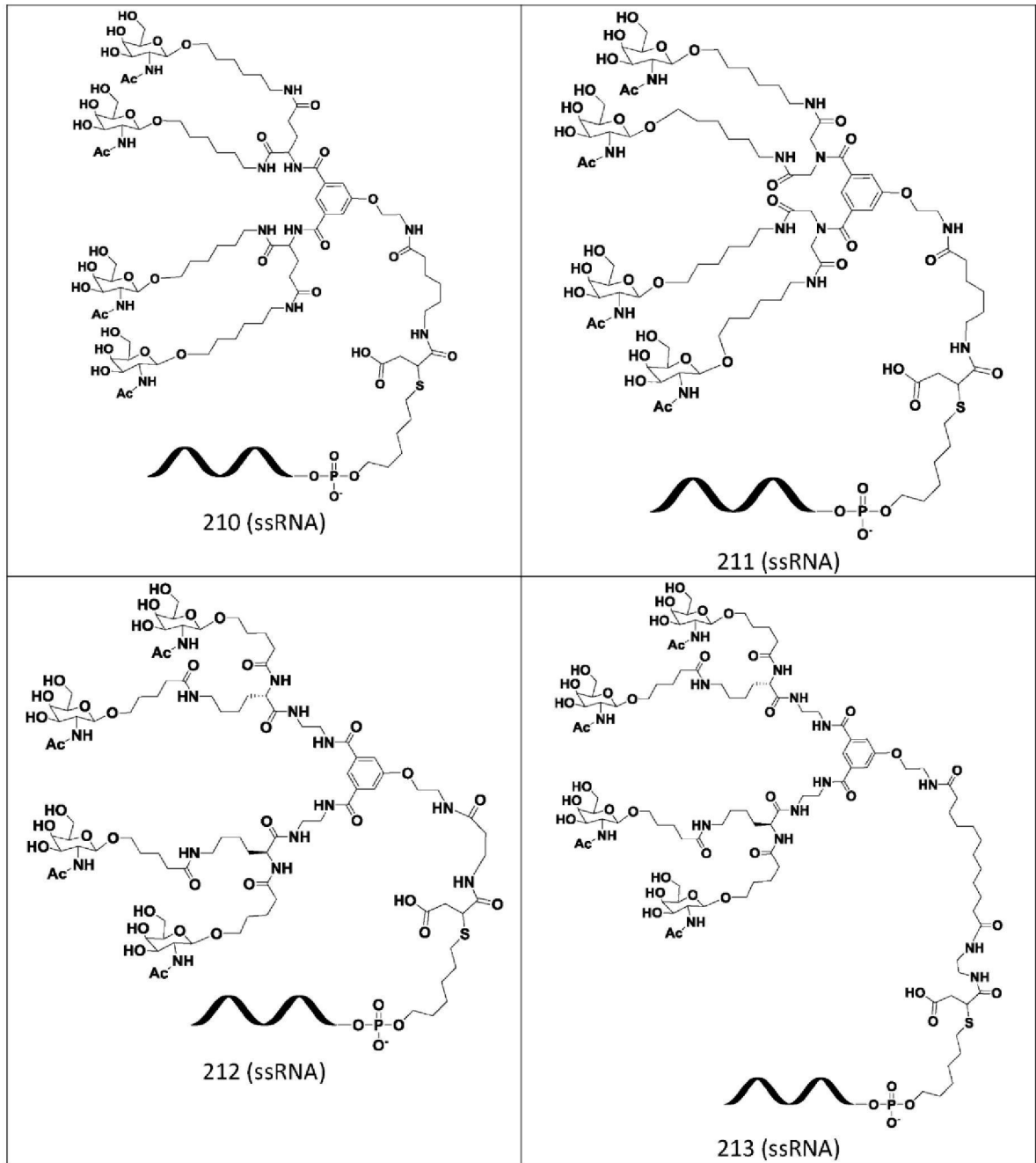


第27表

第 243 頁(發明說明書)

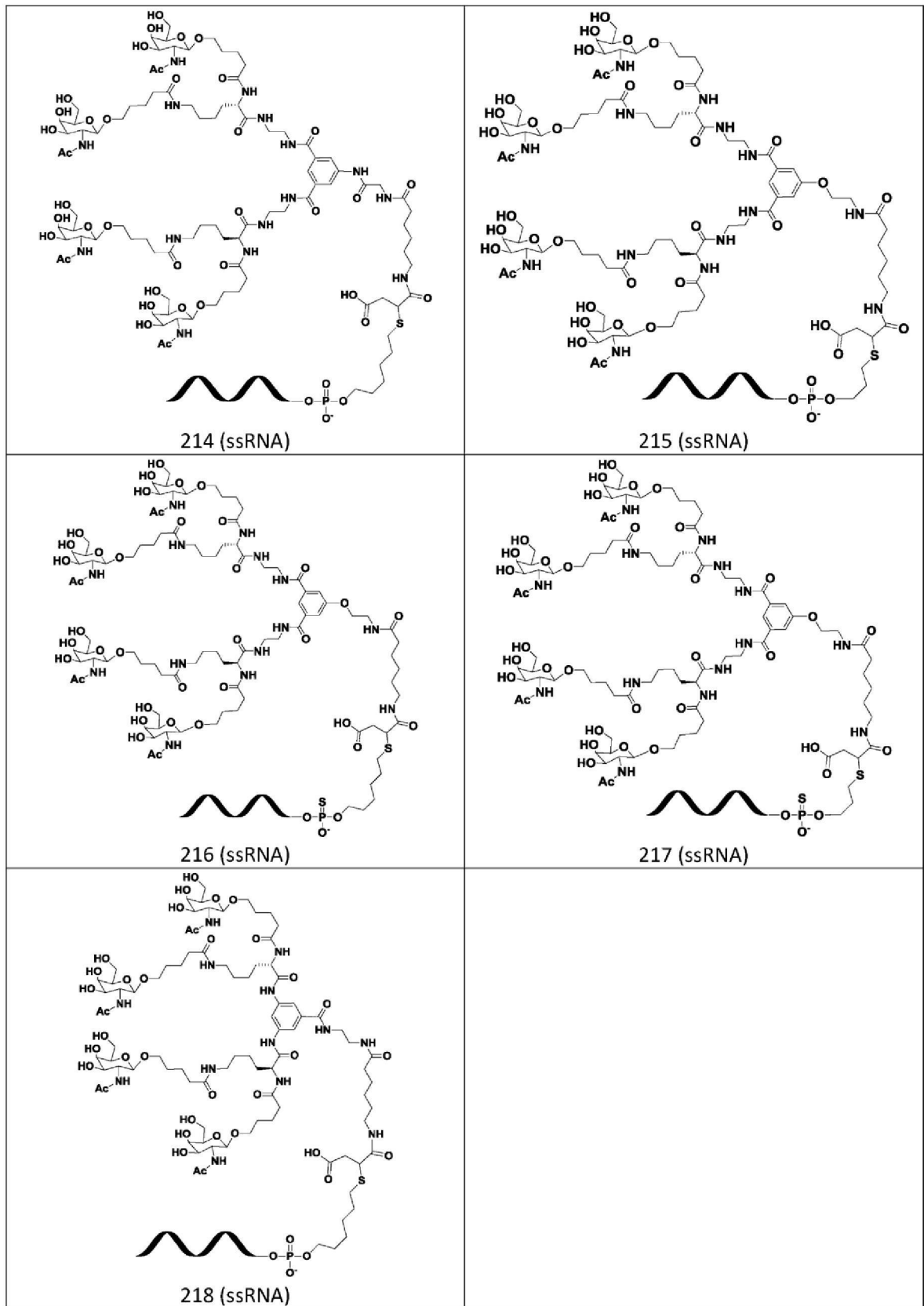
C203329PA.docx

[表27]



第28表

[表28]



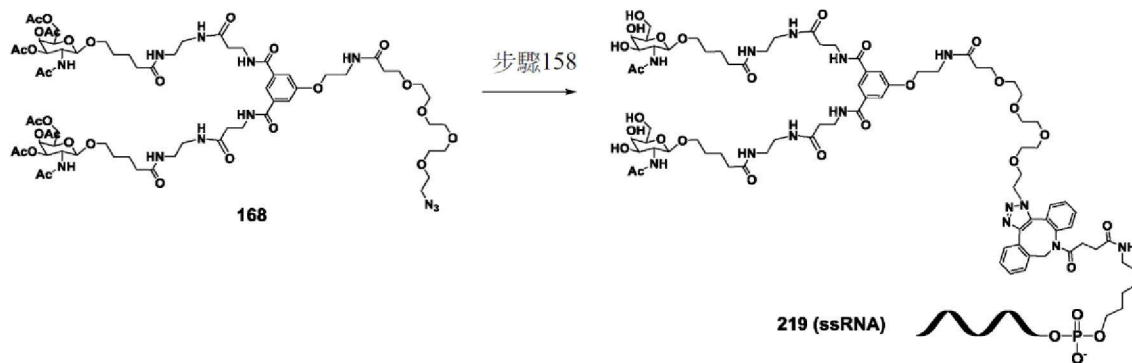
第29表

[表29]

化合物	序列 (5'→3')	理論分子量	實測值
210_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <b>210</b>	8885	8886
211_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <b>211</b>	8857	8857
212_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <b>212</b>	8929	8928
213_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <b>213</b>	9112	9110
214_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <b>214</b>	8983	8982
215_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <b>215</b>	8929	8929
216_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <b>216</b>	8988	8985
217_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <b>217</b>	8946	8943
218_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <b>218</b>	8854	8854

## 核酸複合體219之合成

[化199]



## 步驟158

使用步驟134中合成之化合物168，藉由與實施例10之步驟40同樣之方法獲得第30表所記載之單鏈之核酸複合體219。

將藉由本實施例合成之核酸複合體之序列及質量分析結果示於第30

表。

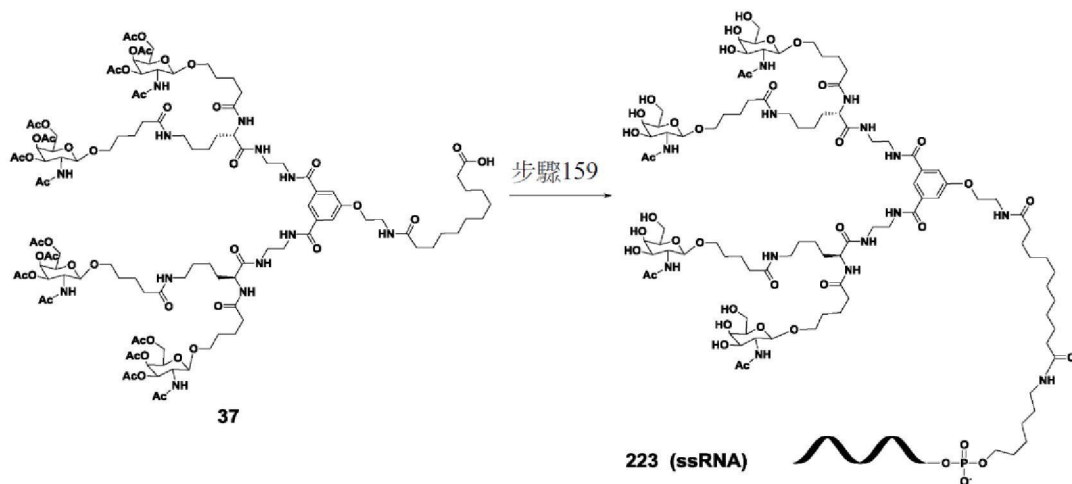
第30表

[表30]

化合物	序列 (5'→3')	理論分子量	實測值
219_5'-B2M-ssRNA	<b>219</b> A(F)G(M)G(F)A(M)C(F)U(M)G(F)G(M)U(F)C(M) U(F)U(F)U(M)C(F)U(M)A(F)U(M)C(F)U(M)^C(F)^U(M)	9529	9528

核酸複合體223之合成

[化200]



步驟159

添加實施例8之步驟34中合成之化合物37與藉由Molecules、第17卷、13825-13843頁、2012年所記載之方法而合成之末端經胺基修飾之寡核苷酸，藉由Bioconjugate Chemistry，第22卷，1723-1728頁，2011年或Bioconjugate Chemistry，第26卷，1451-1455頁，2015年所記載之方法使其等進行反應。利用實施例9之步驟38中所記載之方法進行精製，藉此獲得單鏈之核酸複合體223。

第 247 頁(發明說明書)

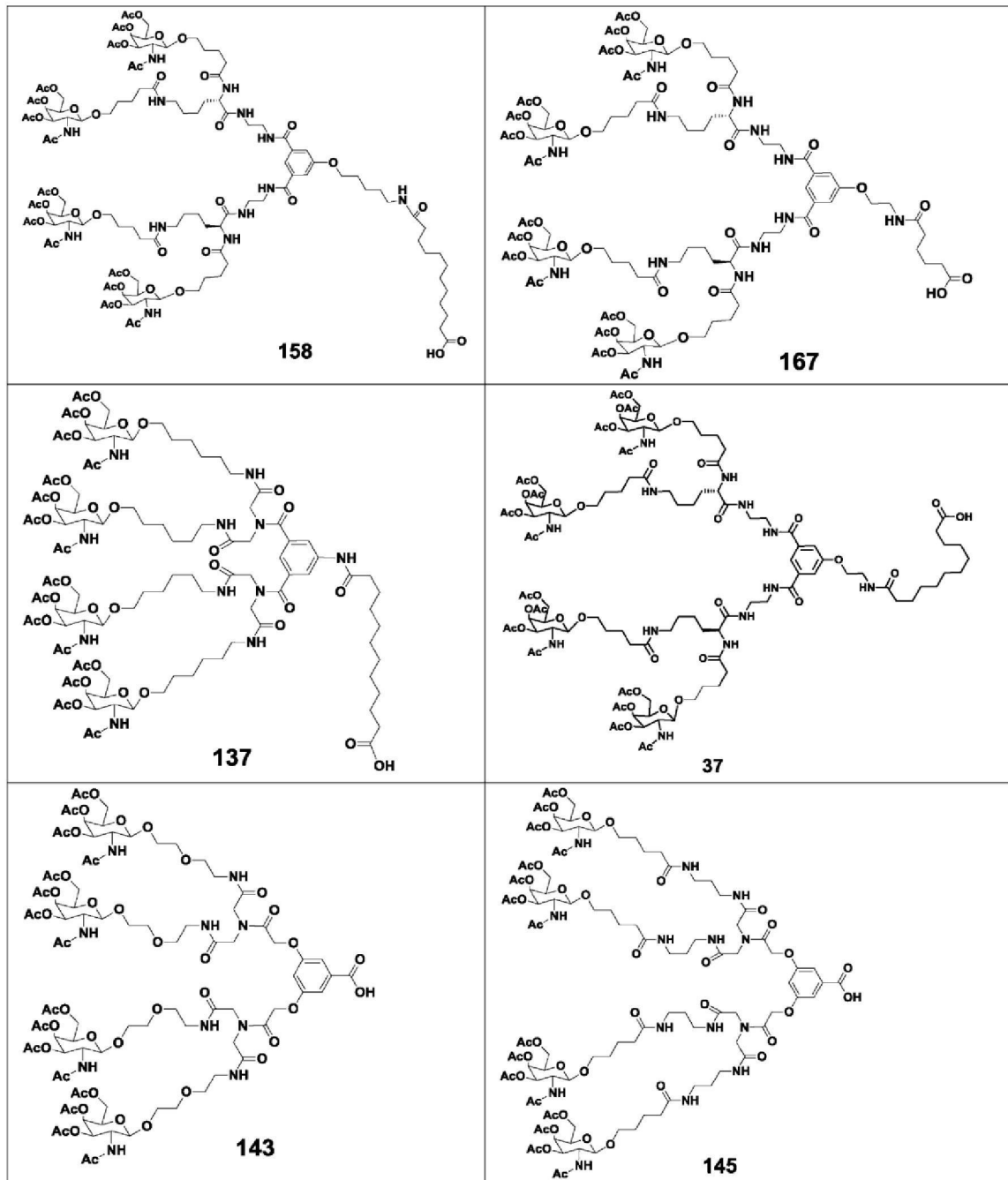
## 核酸複合體220～233之合成

藉由與實施例15之步驟159同樣之方法，使用第31表及第32表所記載之化合物而獲得第33表～第35表所記載之單鏈之核酸複合體。

將藉由本實施例合成之核酸複合體之序列及質量分析結果示於第36表。

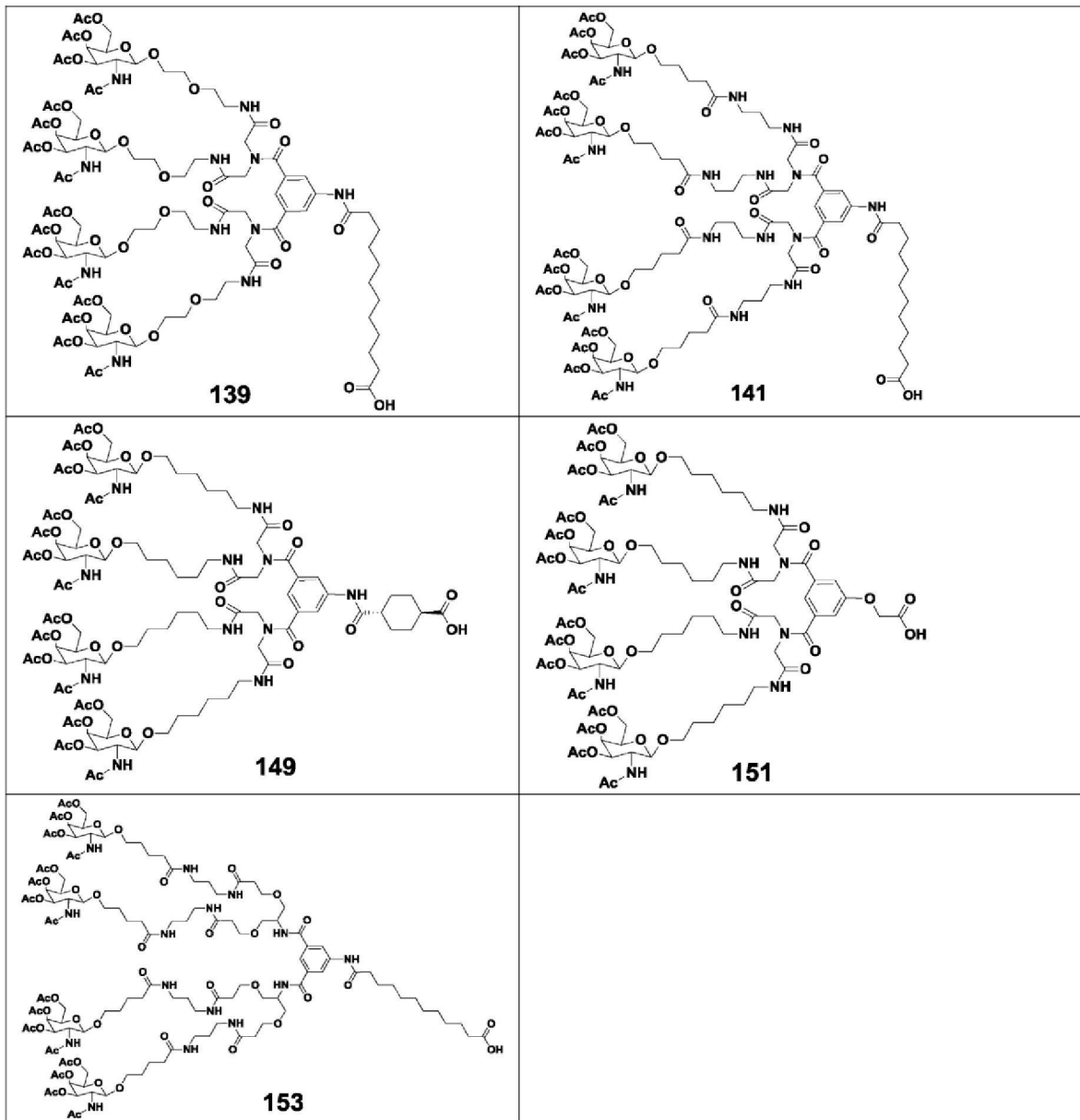
## 第31表

[表31]



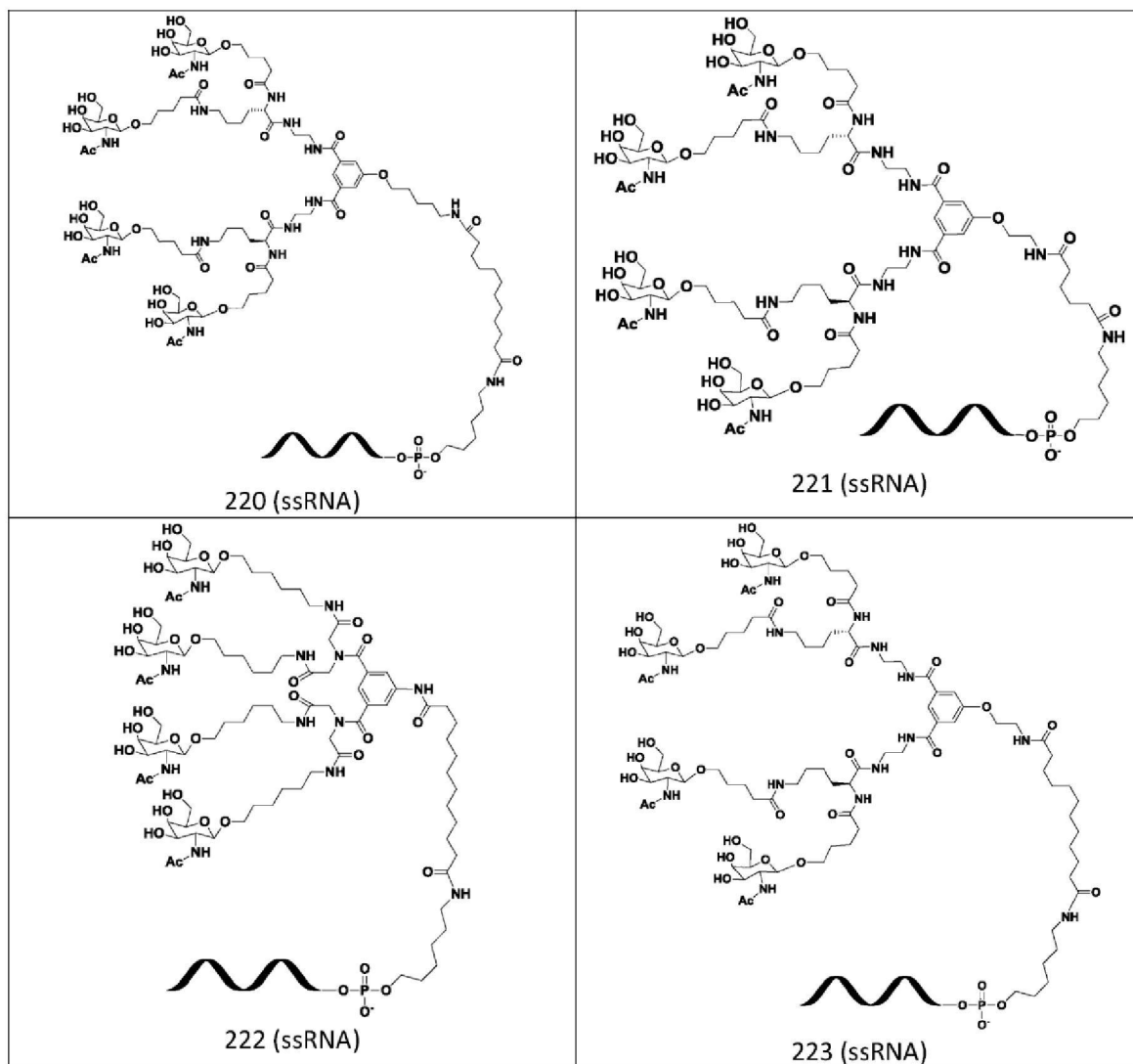
第32表

[表32]



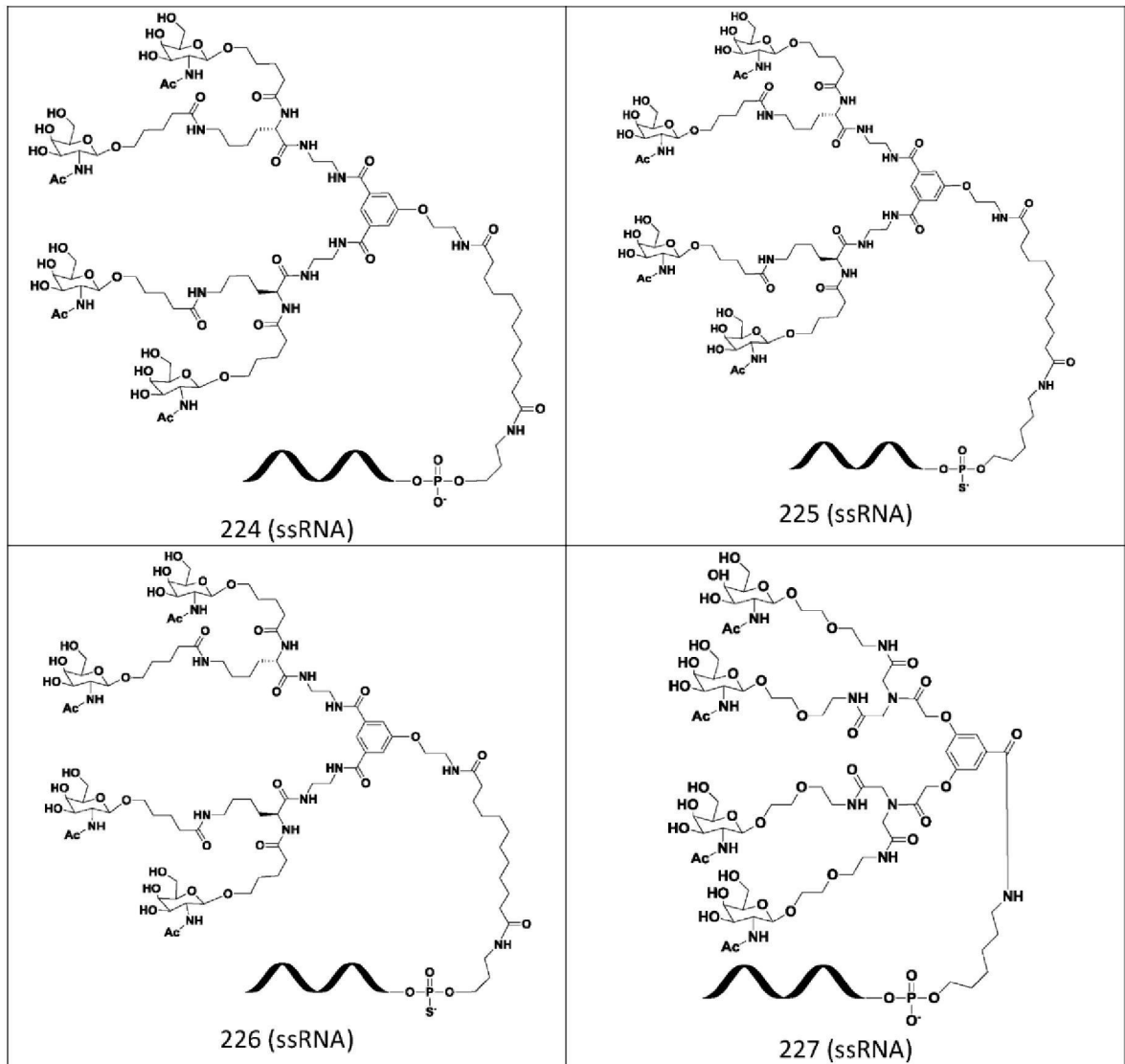
第33表

[表33]



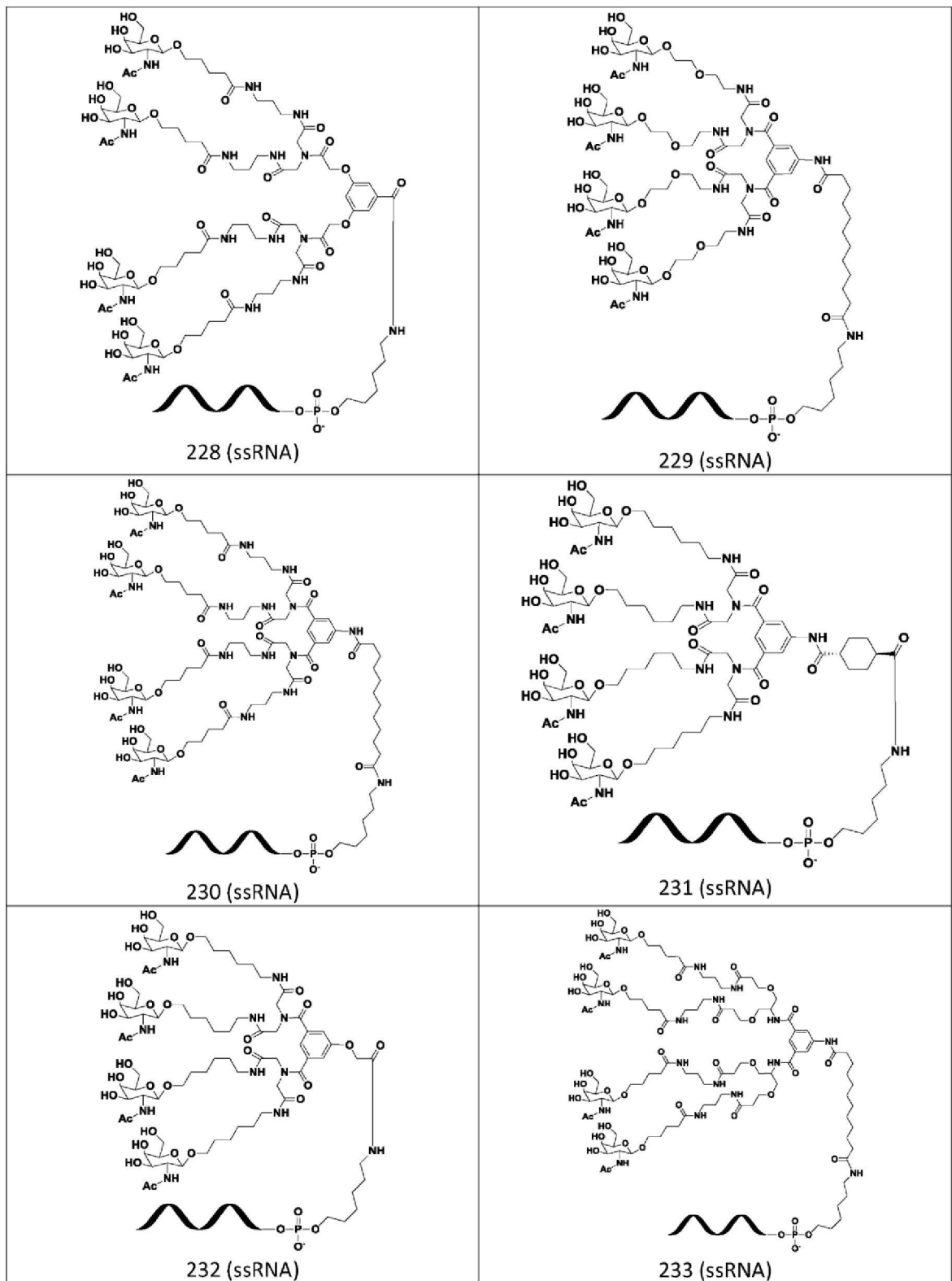
第34表

[表34]



第35表

[表35]



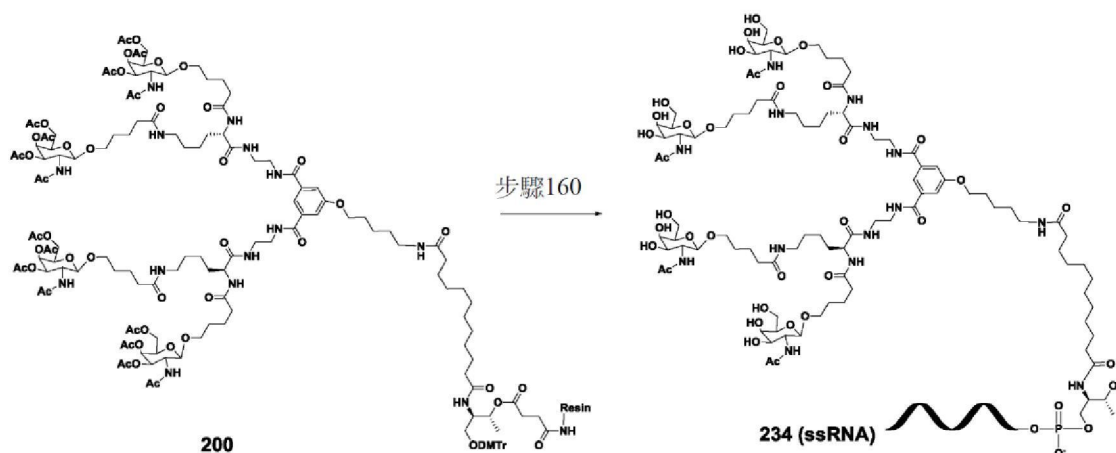
第36表

[表36]

化合物	序列 (5'→3')	理論分子量	實測值
220_3'-AT3-ssRNA	G(F) <sup>^</sup> G(M) <sup>^</sup> U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <b>220</b>	8977	8977
221_3'-AT3-ssRNA	G(F) <sup>^</sup> G(M) <sup>^</sup> U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <b>221</b>	8851	8851
222_3'-AT3-ssRNA	G(F) <sup>^</sup> G(M) <sup>^</sup> U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <b>222</b>	8778	8778
223_3'-AT3-ssRNA	G(F) <sup>^</sup> G(M) <sup>^</sup> U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <b>223</b>	8935	8935
224_3'-AT3-ssRNA	G(F) <sup>^</sup> G(M) <sup>^</sup> U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <b>224</b>	8896	8893
225_3'-AT3-ssRNA	G(F) <sup>^</sup> G(M) <sup>^</sup> U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <b>225</b>	8954	8951
226_3'-AT3-ssRNA	G(F) <sup>^</sup> G(M) <sup>^</sup> U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <b>226</b>	8912	8909
227_3'-AT3-ssRNA	G(F) <sup>^</sup> G(M) <sup>^</sup> U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <b>227</b>	8607	8606
228_3'-AT3-ssRNA	G(F) <sup>^</sup> G(M) <sup>^</sup> U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <b>228</b>	8883	8882
229_3'-AT3-ssRNA	G(F) <sup>^</sup> G(M) <sup>^</sup> U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <b>229</b>	8730	8729
230_3'-AT3-ssRNA	G(F) <sup>^</sup> G(M) <sup>^</sup> U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <b>230</b>	9006	9005
231_3'-AT3-ssRNA	G(F) <sup>^</sup> G(M) <sup>^</sup> U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <b>231</b>	8719	8719
232_3'-AT3-ssRNA	G(F) <sup>^</sup> G(M) <sup>^</sup> U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <b>232</b>	8624	8624
233_3'-AT3-ssRNA	G(F) <sup>^</sup> G(M) <sup>^</sup> U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <b>233</b>	9209	9209

## 核酸複合體234之合成

[化201]



步驟160

使用實施例14之步驟157中合成之化合物200，藉由與實施例12之步驟46同樣之方法獲得單鏈之核酸複合體234。

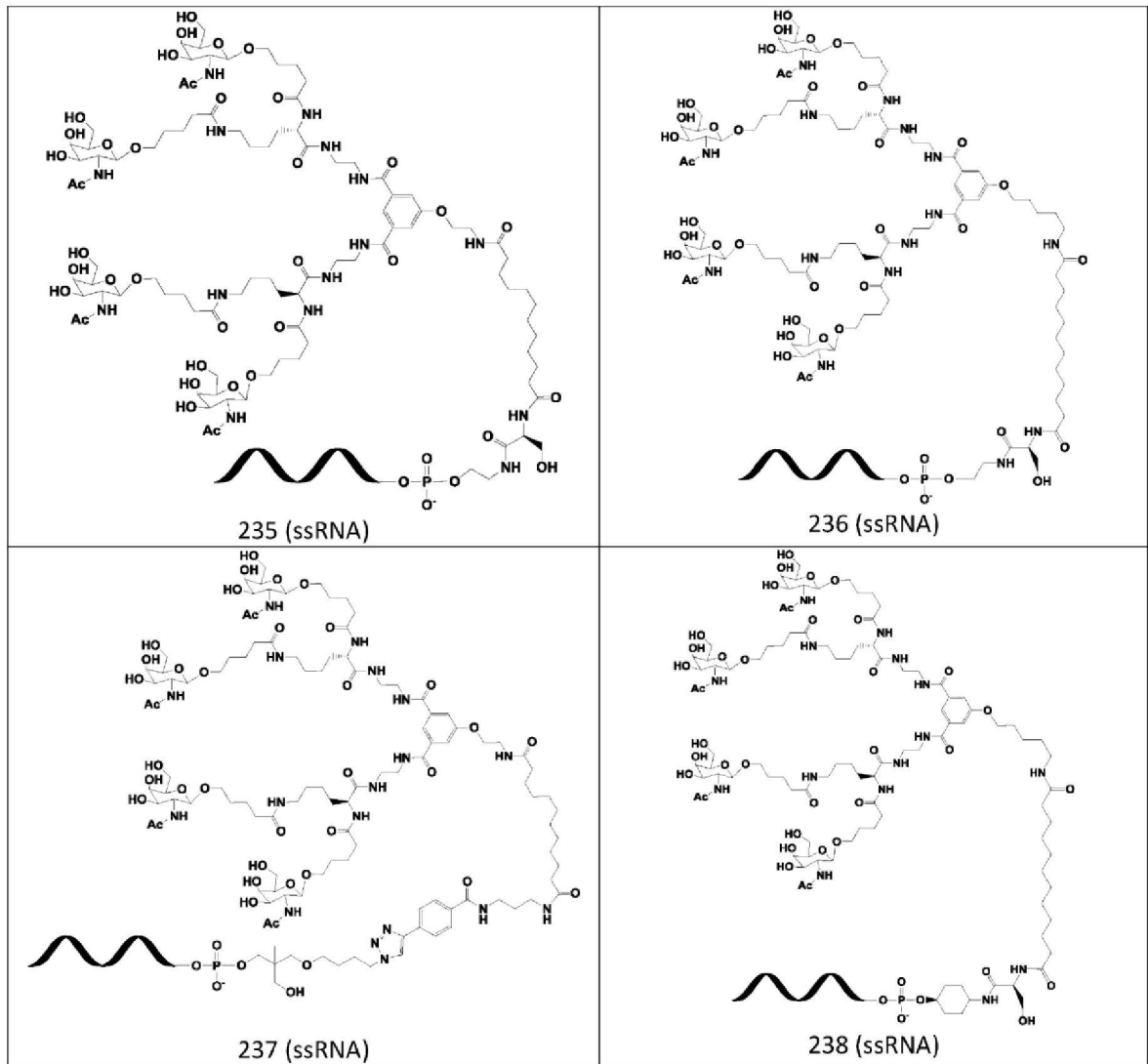
核酸複合體235～250之合成

藉由與步驟160同樣之方法，使用化合物171、174、177、180、183、187、200及第23表及第24表所記載之化合物而分別獲得相對應之第37表～第40表所記載之單鏈之核酸複合體。

將藉由本實施例合成之核酸複合體之序列及質量分析結果示於第41表。

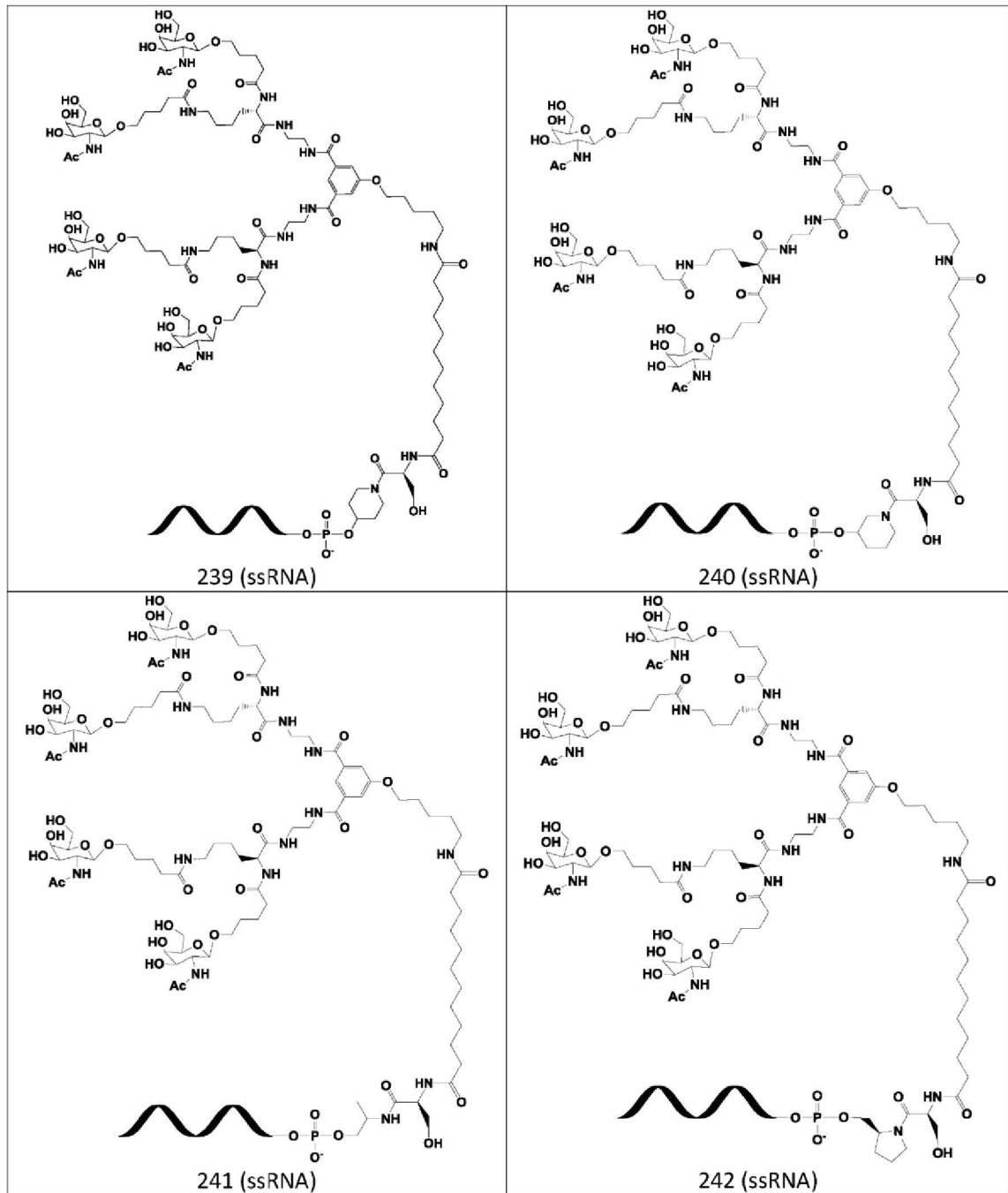
第37表

[表37]



第38表

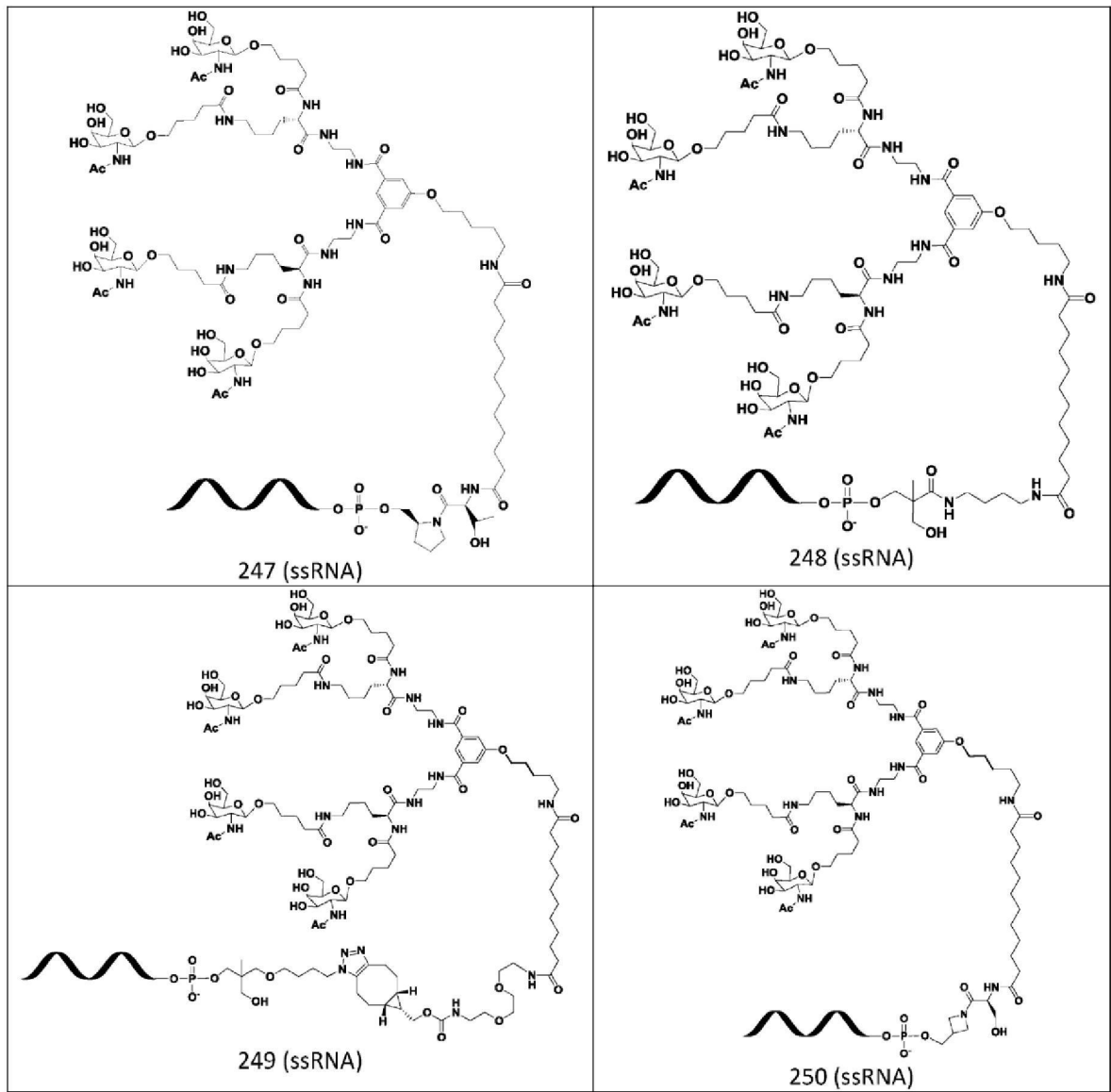
[表38]



第39表

[表39]





第41表

[表41]

化合物	序列(5'→3')	理論分子量	實測值
235_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <b>235</b>	8967	8966
236_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <b>236</b>	9009	9008
237_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <b>237</b>	9238	9238
238_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <b>238</b>	9063	9063
239_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <b>239</b>	9049	9049
240_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <b>240</b>	9049	9048
241_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <b>241</b>	9023	9022
242_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <b>242</b>	9049	9049
243_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <b>243</b>	9052	9051
244_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <b>244</b>	9010	9009
245_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <b>245</b>	8966	8966
245_3'-dT10	Ttttttttt <b>245</b>	5162	5161
246_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <b>246</b>	9024	9023
247_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <b>247</b>	9064	9063
248_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <b>248</b>	9066	9064
249_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <b>249</b>	9403	9403
250_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <b>250</b>	9036	9037

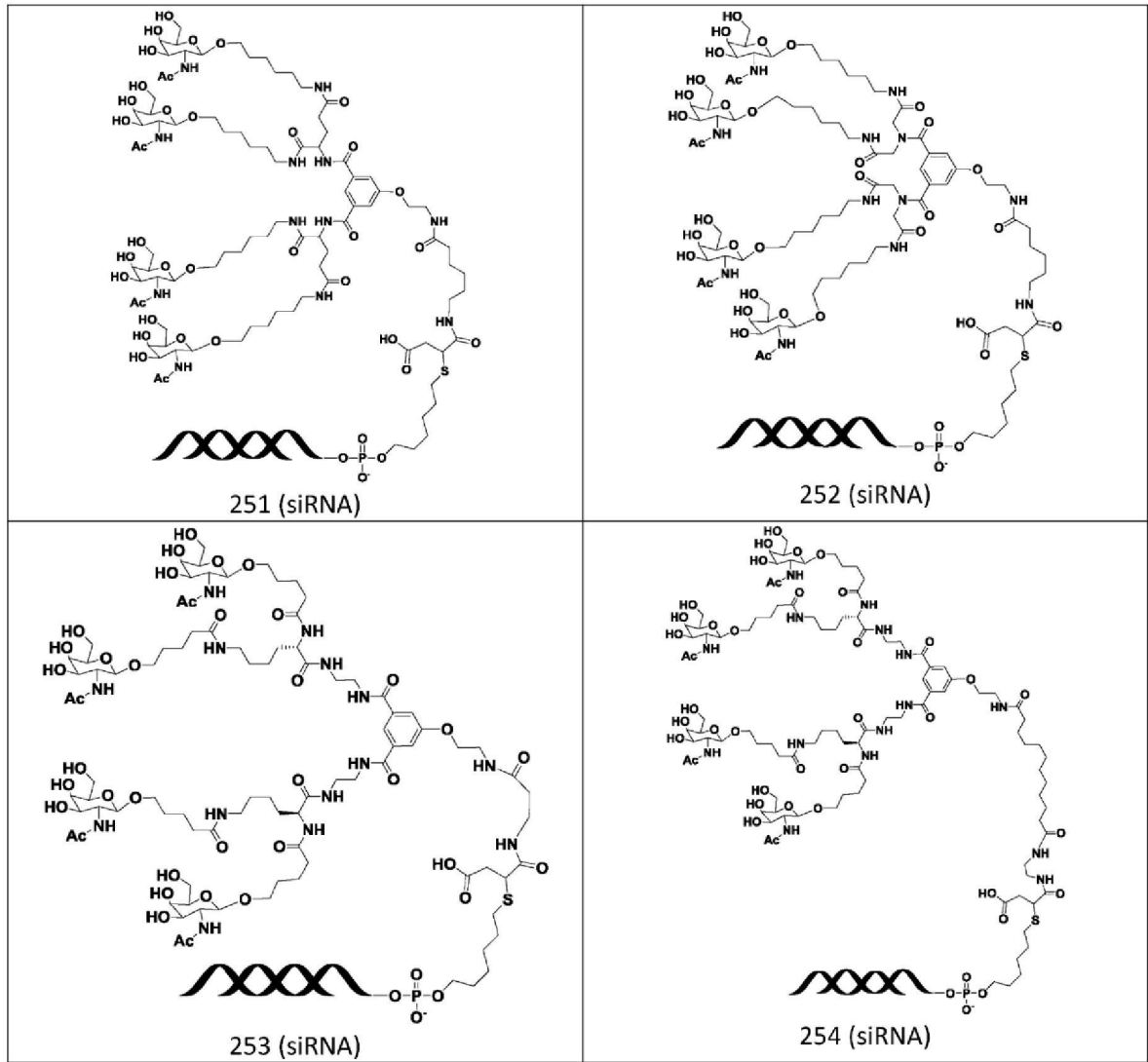
### 核酸複合體251~287之合成

藉由與實施例9之步驟39同樣之方法，使用單鏈之核酸複合體(ssRNA)210~233、235~247而獲得雙鏈之核酸複合體251~287。

將藉由本實施例合成之核酸複合體之序列示於第42、43、45、47~54表。

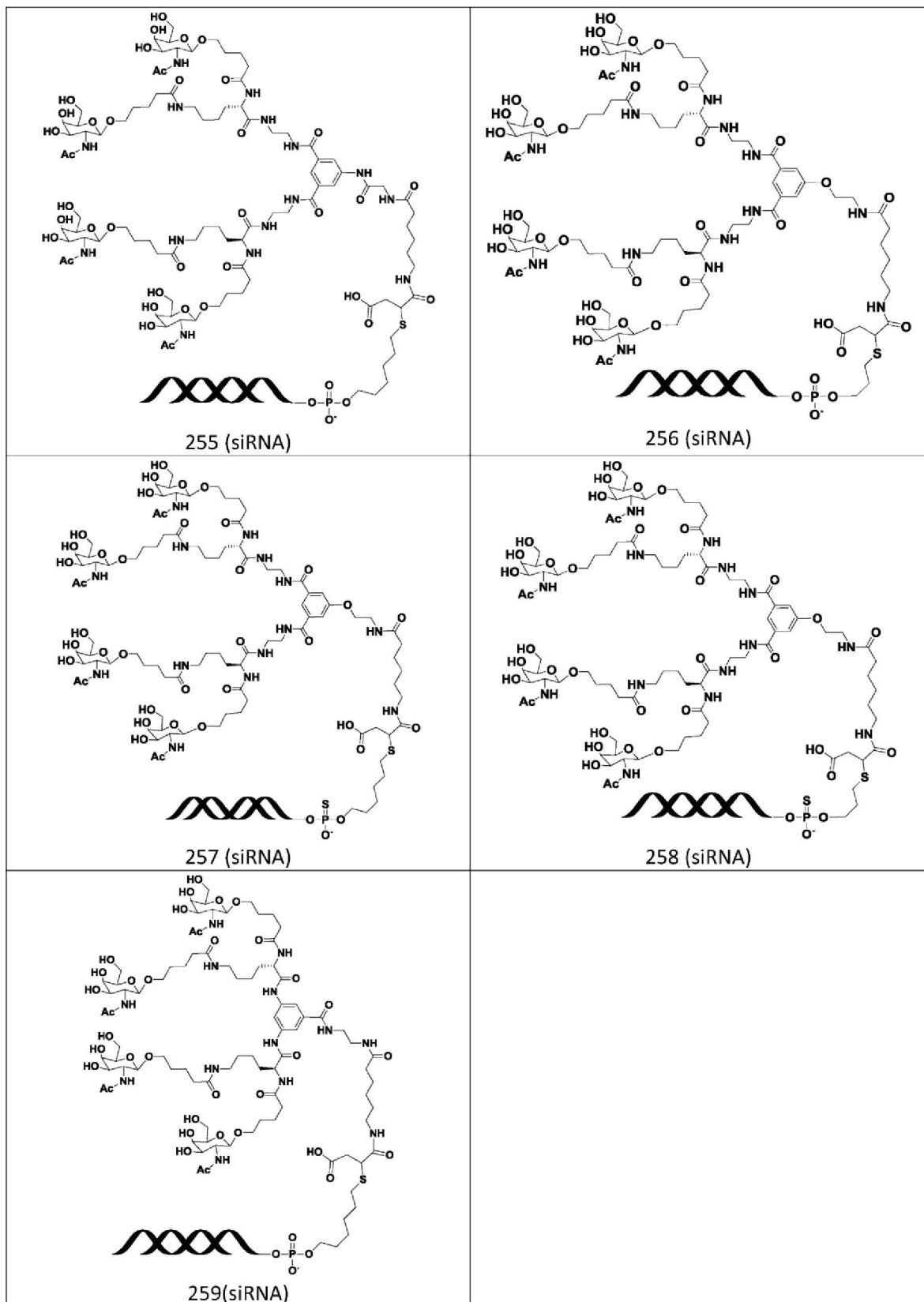
#### 第42表

[表42]



第43表

[表43]



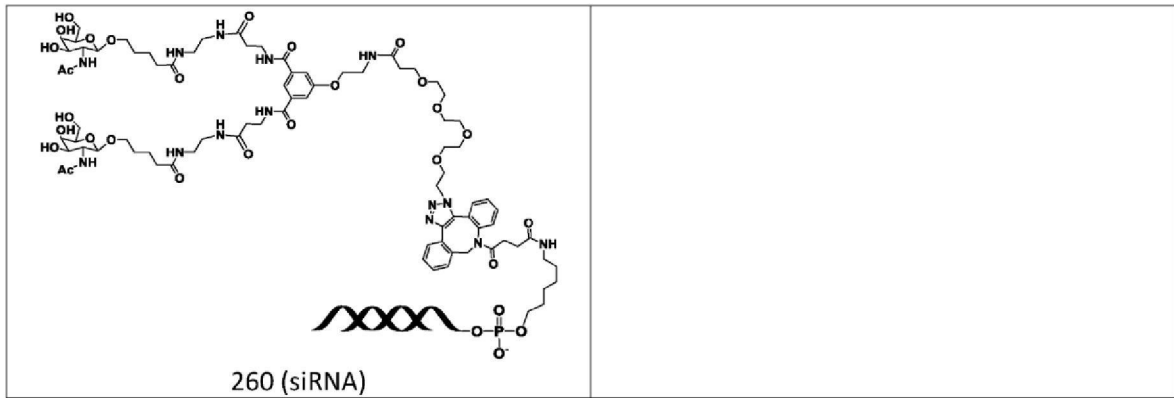
第44表

[表44]

化合物	單鏈名稱	序列 (5'→3')
251_3'-AT3-siRNA	210_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <b>210</b>
252_3'-AT3-siRNA	211_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <b>211</b>
253_3'-AT3-siRNA	212_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <b>212</b>
254_3'-AT3-siRNA	213_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <b>213</b>
255_3'-AT3-siRNA	214_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <b>214</b>
256_3'-AT3-siRNA	215_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <b>215</b>
257_3'-AT3-siRNA	216_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <b>216</b>
258_3'-AT3-siRNA	217_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <b>217</b>
259_3'-AT3-siRNA	218_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <b>218</b>
-	AT3-asRNA	U(M)^U(F)^G(M)A(F)A(M)G(F)U(M)A(F)A(M)A(F) U(M)G(M)G(M)U(F)G(M)U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)C(M)^A(M)^G(M)

第45表

[表45]



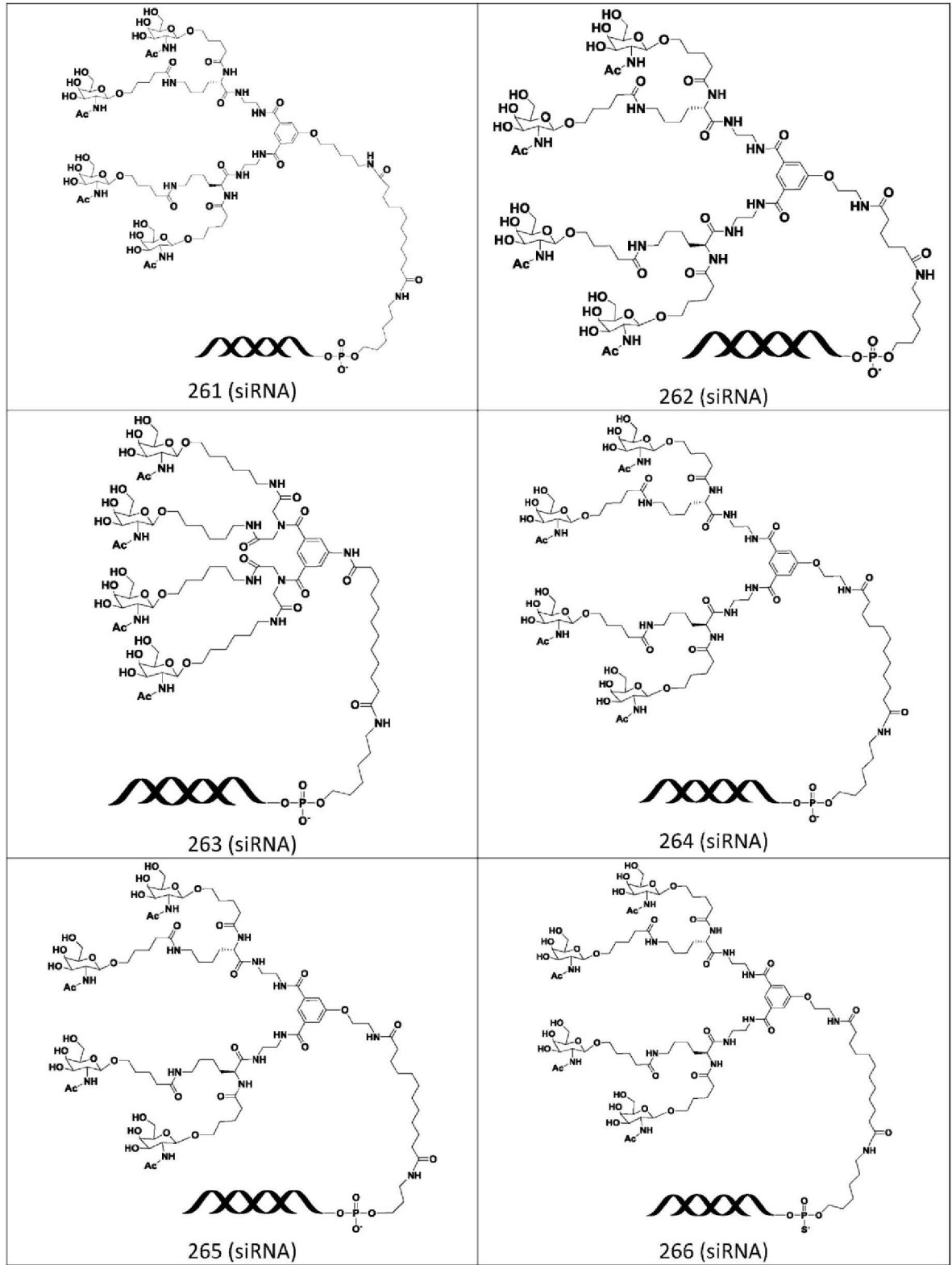
第46表

[表46]

化合物	單鏈名稱	序列 (5'→3')
260_5'-B2M-siRNA	218_5'-B2M-ssRNA	<b>219</b> A(F)G(M)G(F)A(M)C(F)U(M)G(F)G(M)U(F)C(M) U(F)U(F)U(M)C(F)U(M)A(F)U(M)C(F)U(M)^C(F)^U(M)
	B2M-asRNA	A(F)^G(M)^A(F)G(M)A(F)U(M)A(F)G(M)A(F)A(M)A(M) G(F)A(M)C(F)C(M)A(F)G(M)U(F)C(M)C(F)U(M)^U(F)^G(M)

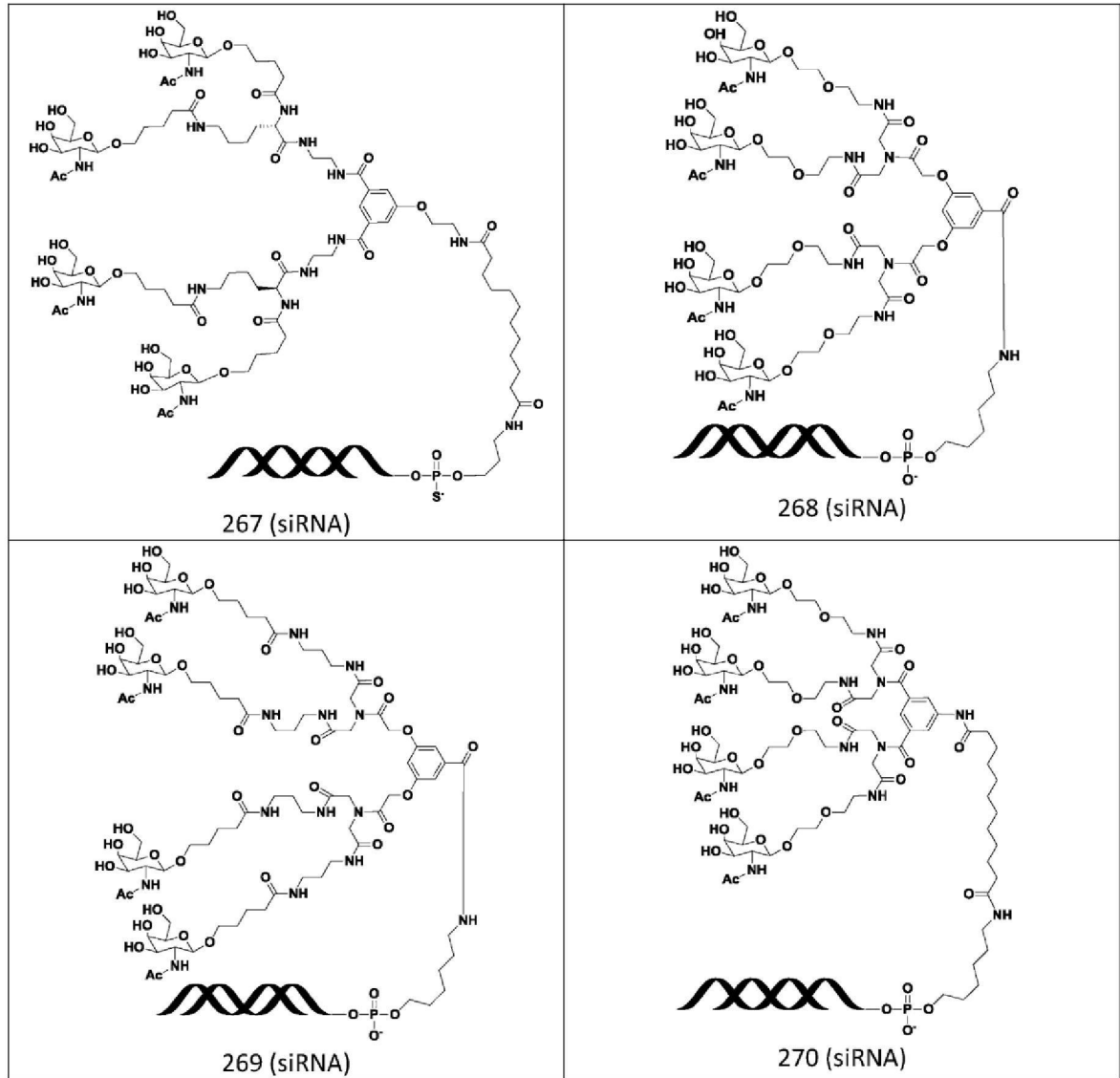
第47表

[表47]



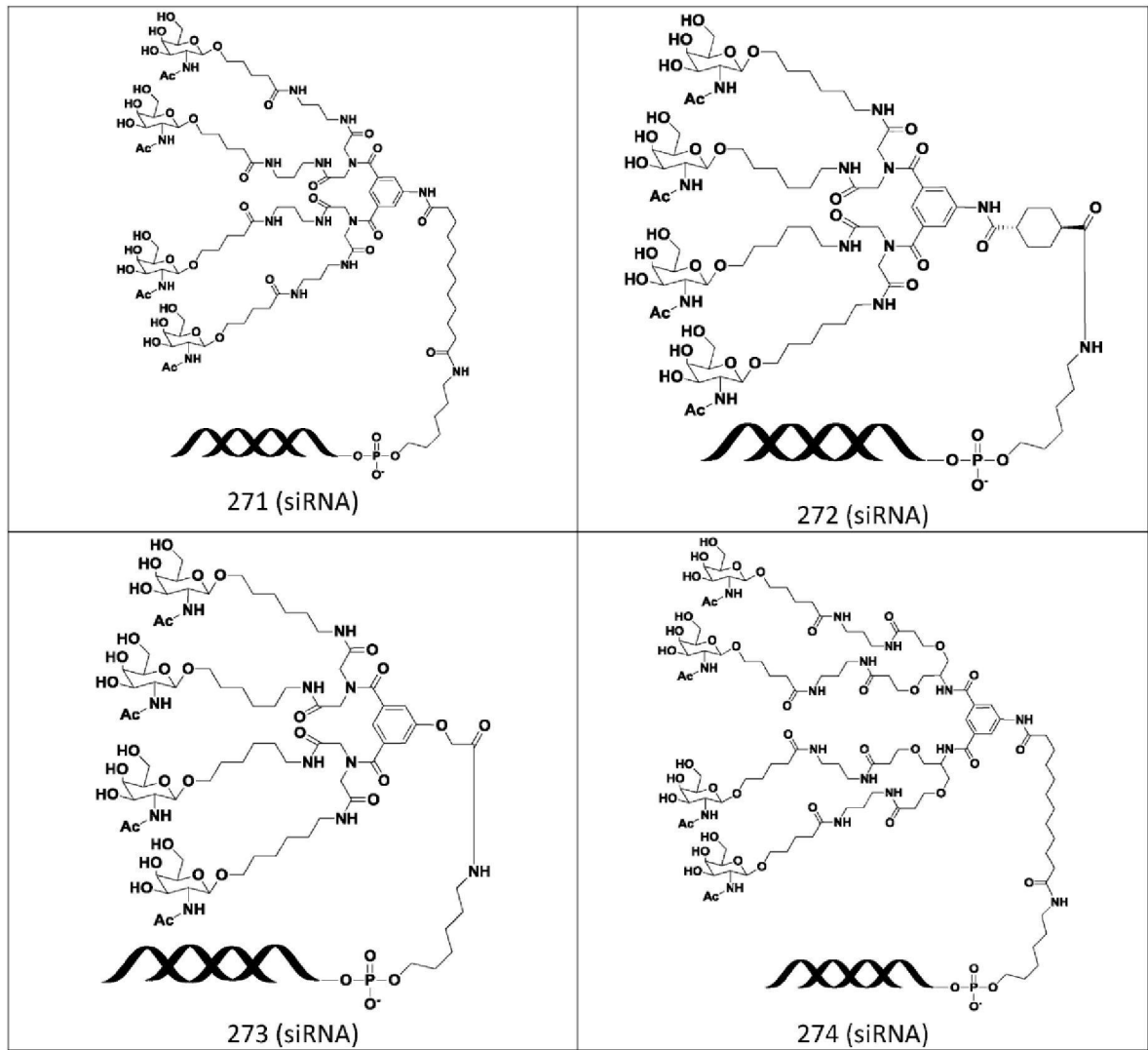
第48表

[表48]



第49表

[表49]



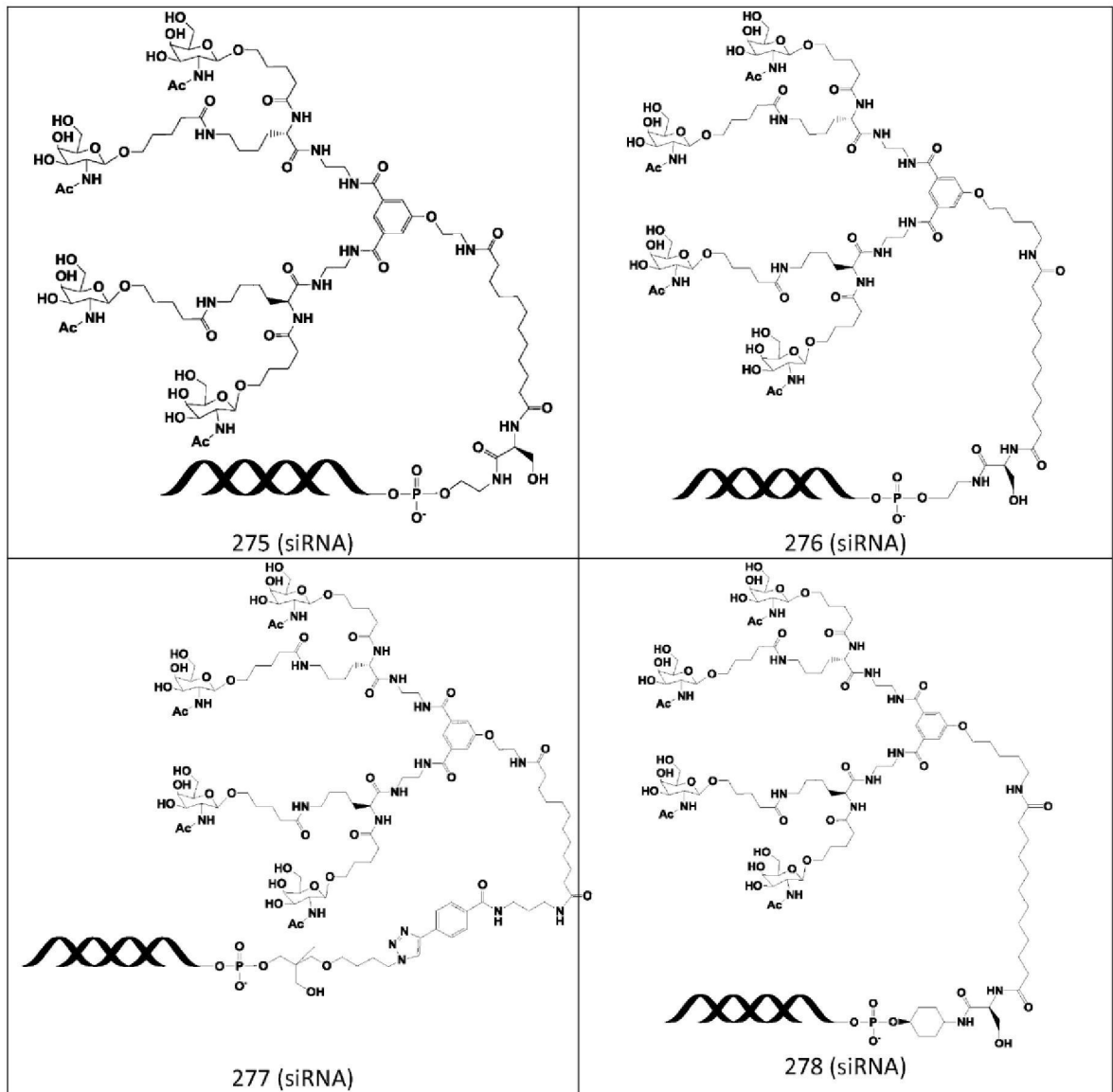
第50表

[表50]

化合物	單鏈名稱	序列 (5'→3')
261_3'-AT3-siRNA	220_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <b>220</b>
262_3'-AT3-siRNA	221_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <b>221</b>
263_3'-AT3-siRNA	222_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <b>222</b>
264_3'-AT3-siRNA	223_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <b>223</b>
265_3'-AT3-siRNA	224_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <b>224</b>
266_3'-AT3-siRNA	225_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <b>225</b>
267_3'-AT3-siRNA	226_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <b>226</b>
268_3'-AT3-siRNA	227_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <b>227</b>
269_3'-AT3-siRNA	228_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <b>228</b>
270_3'-AT3-siRNA	229_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <b>229</b>
271_3'-AT3-siRNA	230_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <b>230</b>
272_3'-AT3-siRNA	231_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <b>231</b>
273_3'-AT3-siRNA	232_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <b>232</b>
274_3'-AT3-siRNA	233_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <b>233</b>
-	AT3-asRNA	U(M)^U(F)^G(M)A(F)A(M)G(F)U(M)A(F)A(M)A(F) U(M)G(M)G(M)U(F)G(M)U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)C(M)^A(M)^G(M)

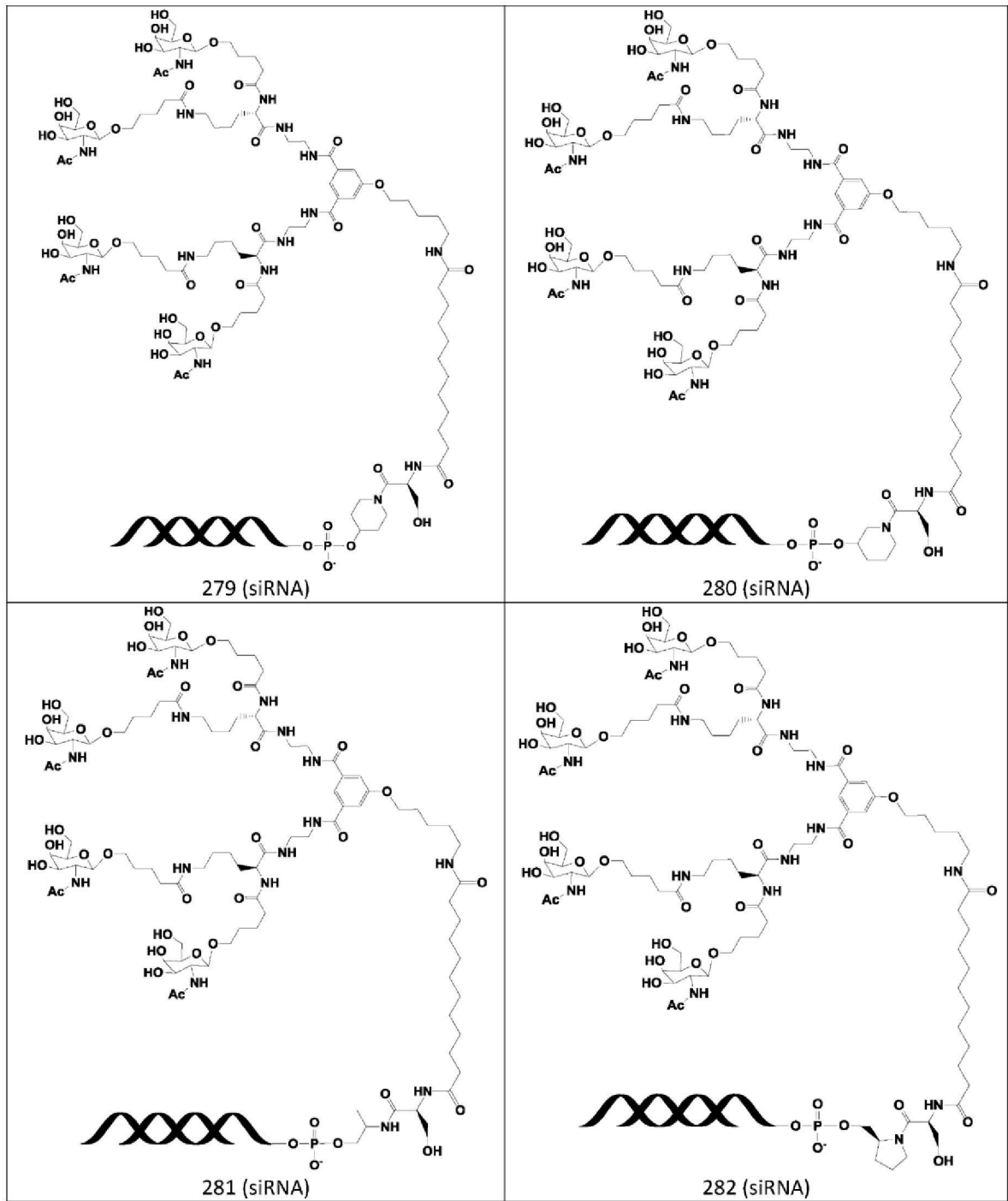
第51表

[表51]



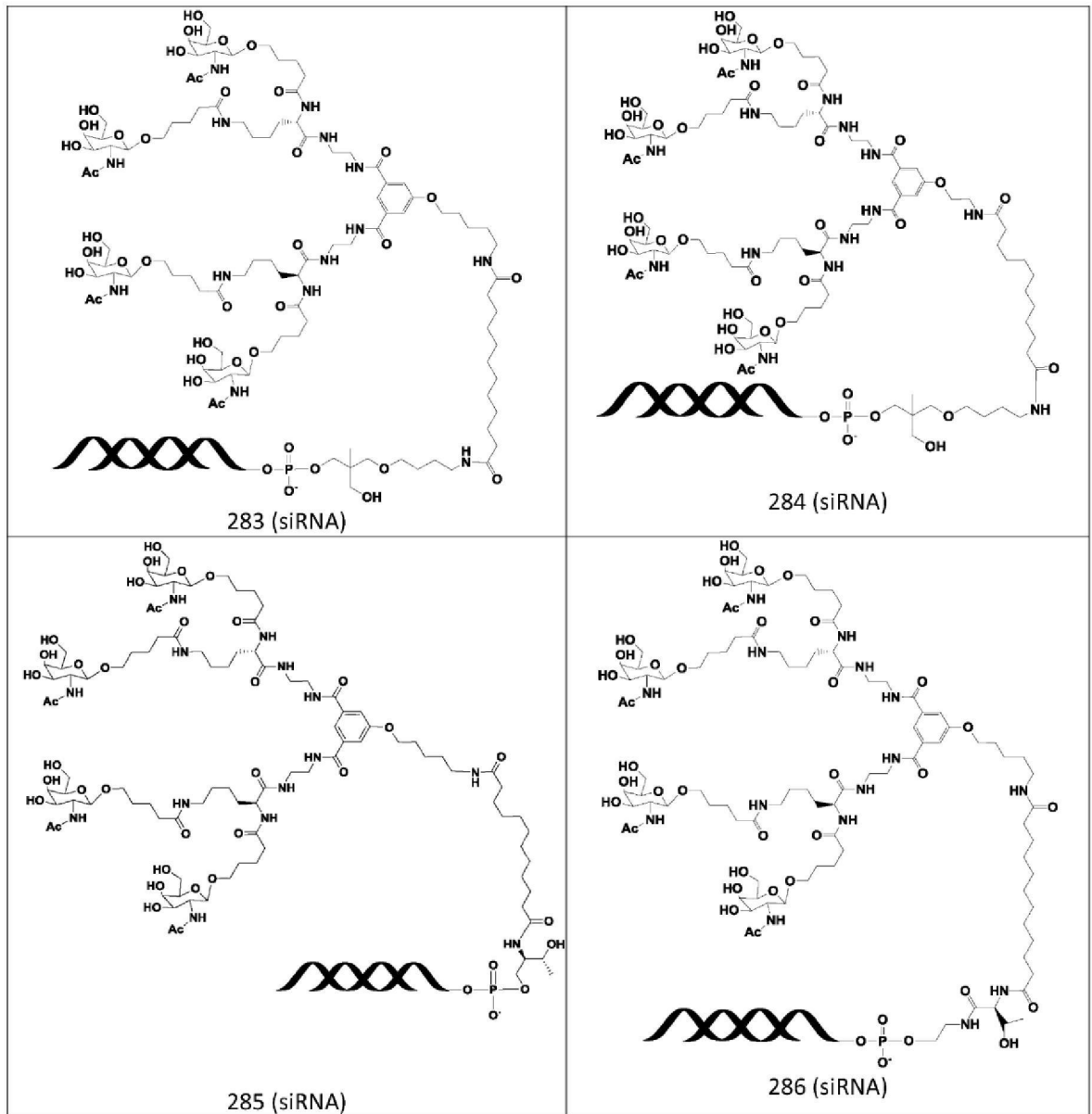
第52表

[表52]



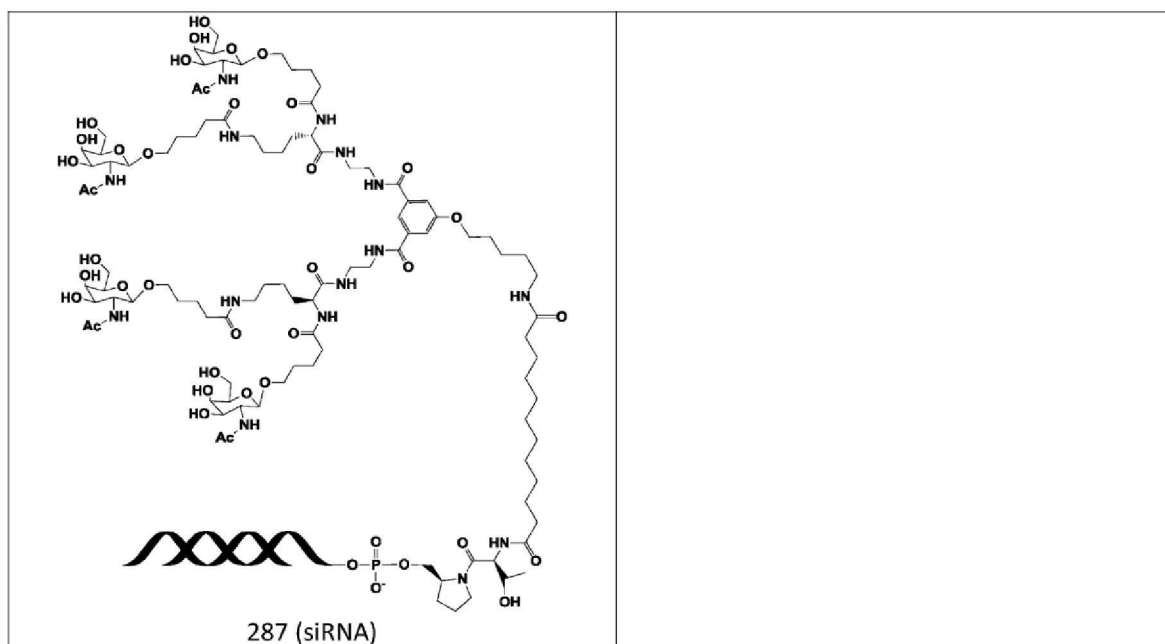
第53表

[表53]



第54表

[表54]



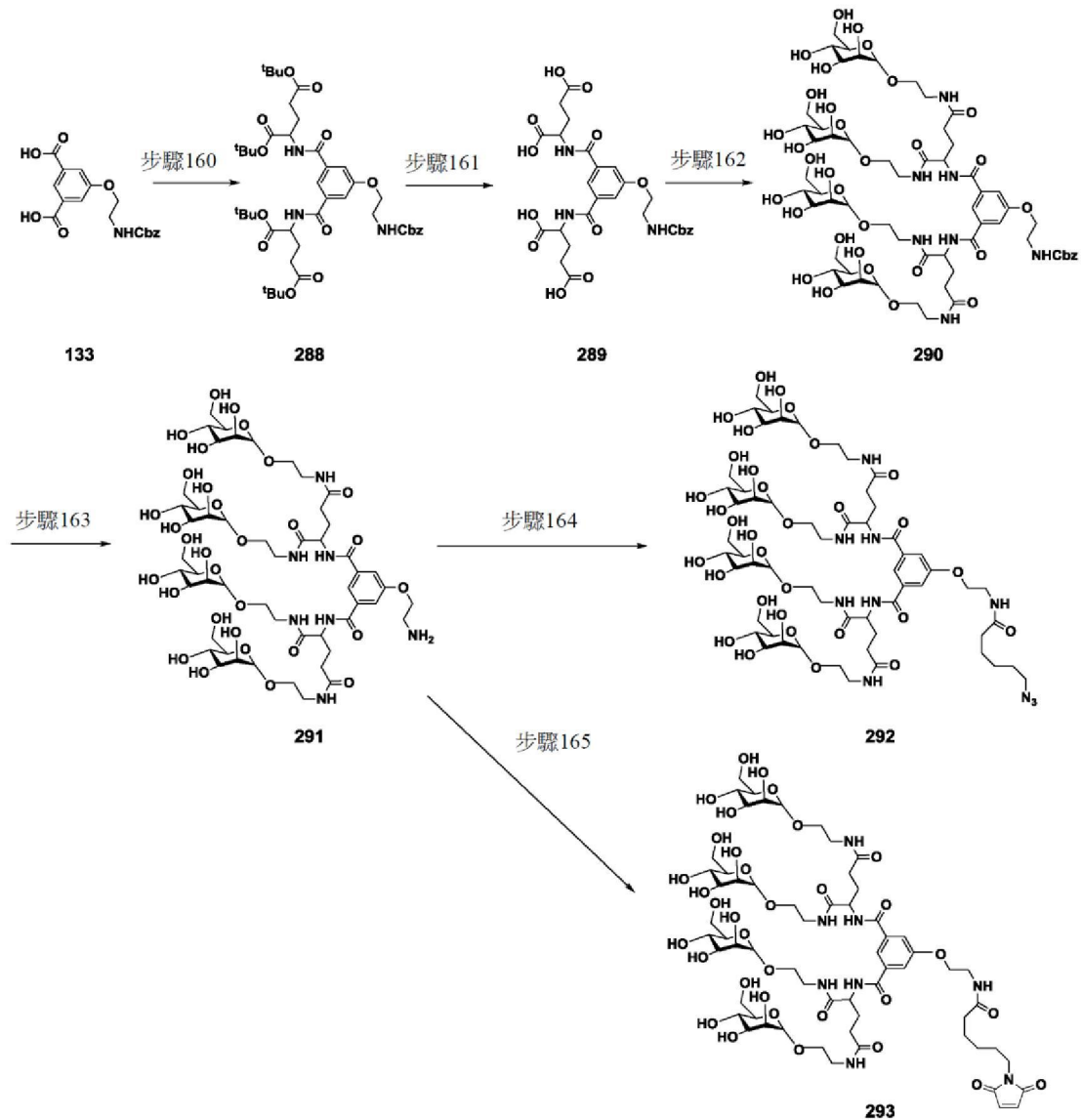
## 第55表

[表55]

化合物	單鏈名稱	序列 (5'→3')
275_3'-AT3-siRNA	235_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <b>235</b>
276_3'-AT3-siRNA	236_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <b>236</b>
277_3'-AT3-siRNA	237_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <b>237</b>
278_3'-AT3-siRNA	238_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <b>238</b>
279_3'-AT3-siRNA	239_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <b>239</b>
280_3'-AT3-siRNA	240_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <b>240</b>
281_3'-AT3-siRNA	241_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <b>241</b>
282_3'-AT3-siRNA	242_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <b>242</b>
283_3'-AT3-siRNA	243_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <b>243</b>
284_3'-AT3-siRNA	244_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <b>244</b>
285_3'-AT3-siRNA	245_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <b>245</b>
286_3'-AT3-siRNA	246_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <b>246</b>
287_3'-AT3-siRNA	247_3'-AT3-ssRNA	G(F)^G(M)^U(F)U(M)A(F)A(M)C(F)A(M)C(F)C(F) A(F)U(M)U(F)U(M)A(F)C(M)U(F)U(M)C(F)A(M)A(F) <b>247</b>

## 實施例16 糖配體-連繫單元之合成

[化202]



## 步驟160

使用實施例13之步驟99中合成之化合物133(0.5 g, 1.365 mmol), 藉由與實施例4之步驟25同樣之方法, 以粗產物之形式獲得化合物288。

## 步驟161

使用實施例16之步驟160中合成之化合物288(0.296 g, 0.247

mmol)，藉由與實施例4之步驟26同樣之方法，以粗產物之形式獲得化合物289。

#### 步驟162

使用實施例16之步驟161中合成之化合物289(0.153 g，0.247 mmol)及藉由Inorganic Chemistry，第83卷，1000-1007頁，2011年所記載之方法合成之1-(2-疊氮基乙基)- $\gamma$ -D-甘露糖苷(0.221 g，0.989 mmol)，藉由與實施例1之步驟8同樣之方法獲得化合物290(0.110 g，產率31%)。

ESI-MS m/z: 720(M+H)<sup>+</sup>

#### 步驟163

使用實施例16之步驟162中合成之化合物290(0.110 g，0.077 mmol)，藉由與實施例5之步驟28同樣之方法獲得化合物291(0.077 g，產率77%)。

ESI-MS m/z: 1305(M+H)<sup>+</sup>

#### 步驟164

將實施例16之步驟163中合成之化合物291(20 mg，0.016 mmol)、2,5-二側氧基吡咯啉-1-基6-疊氮基己酸(10 mg，0.032 mmol)溶解於四氫呋喃(2 mL)中，添加二異丙基乙基胺(0.027 mL，0.078 mmol)，於室溫下徹夜攪拌。藉由逆相高速液相層析法(Waters，X BridgeC18，5  $\mu$ m，4.6 mm $\times$ 250 mm，利用0.01%三氟乙酸水溶液、B液：乙腈進行梯度法)對混合物進行精製，而獲得化合物292(1.7 mg，產率8%)。

ESI-MS m/z: 1444(M+H)<sup>+</sup>

#### 步驟165

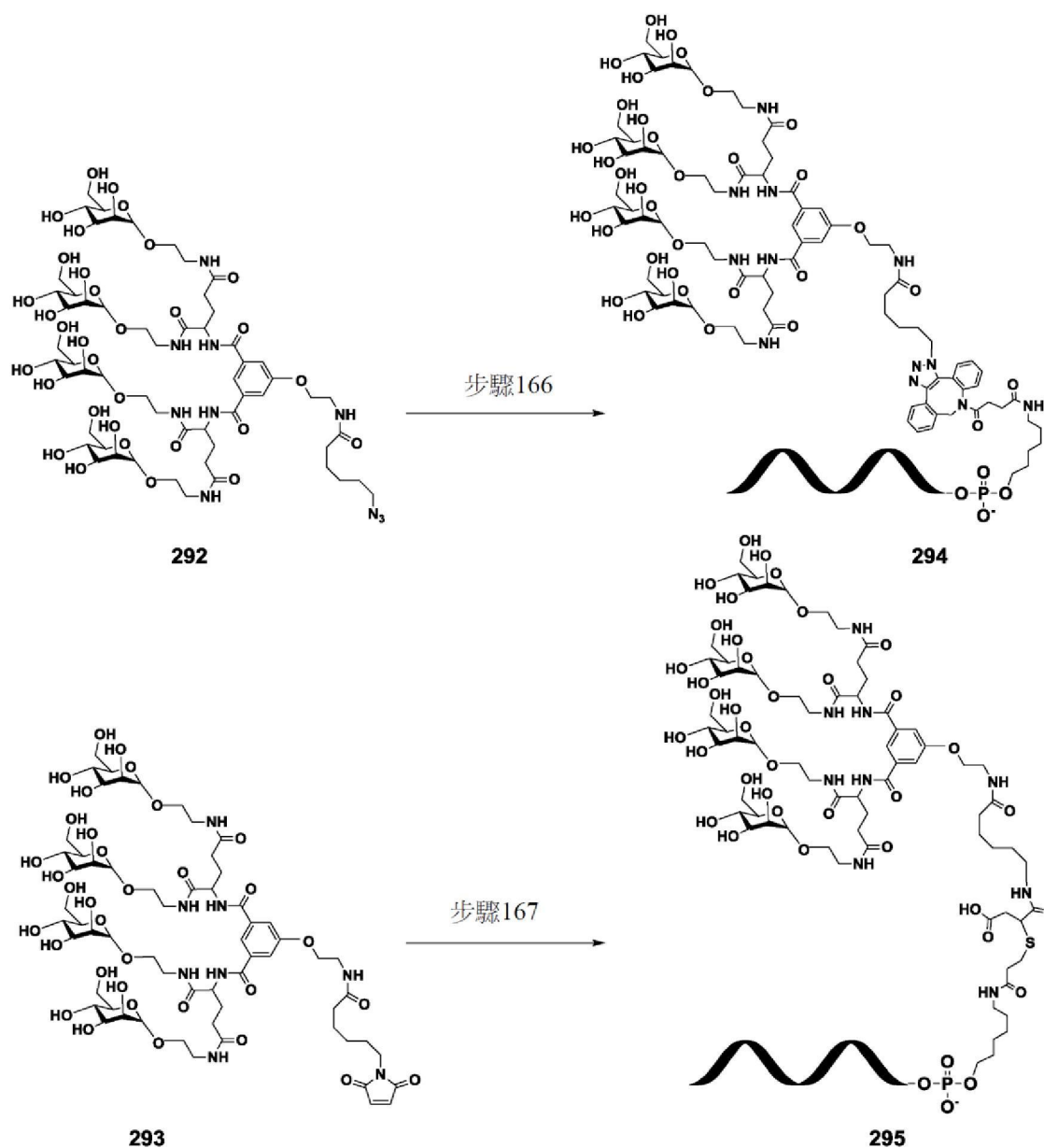
將實施例16之步驟163中合成之化合物291(20 mg，0.016 mmol)、

N-(6-順丁烯二醯亞胺己醯氧基)丁二醯亞胺(9.6 mg, 0.031 mmol)溶解於四氫呋喃(2 mL)中，添加二異丙基乙基胺(0.027 mL, 0.078 mmol)，於室溫下徹夜攪拌。藉由逆相高速液相層析法(Waters, X BridgeC18, 5  $\mu\text{m}$ , 4.6 mm $\times$ 250 mm, 利用0.01%三氟乙酸水溶液、B液：乙腈進行梯度法)對混合物進行精製，而獲得化合物293(1.8 mg, 產率8%)。

ESI-MS  $m/z$ : 1498(M+H)<sup>+</sup>

實施例17 核酸複合體之合成

[化203]



### 步驟166

使用實施例16之步驟164中合成之化合物292，藉由與實施例10之步驟40同樣之方法獲得單鏈之核酸複合體294。

### 步驟167

使用實施例16之步驟165中合成之化合物293，藉由與實施例9之步驟38同樣之方法獲得單鏈之核酸複合體295。

將藉由本實施例合成之核酸複合體之序列及質量分析結果示於第56

表。

第56表

[表56]

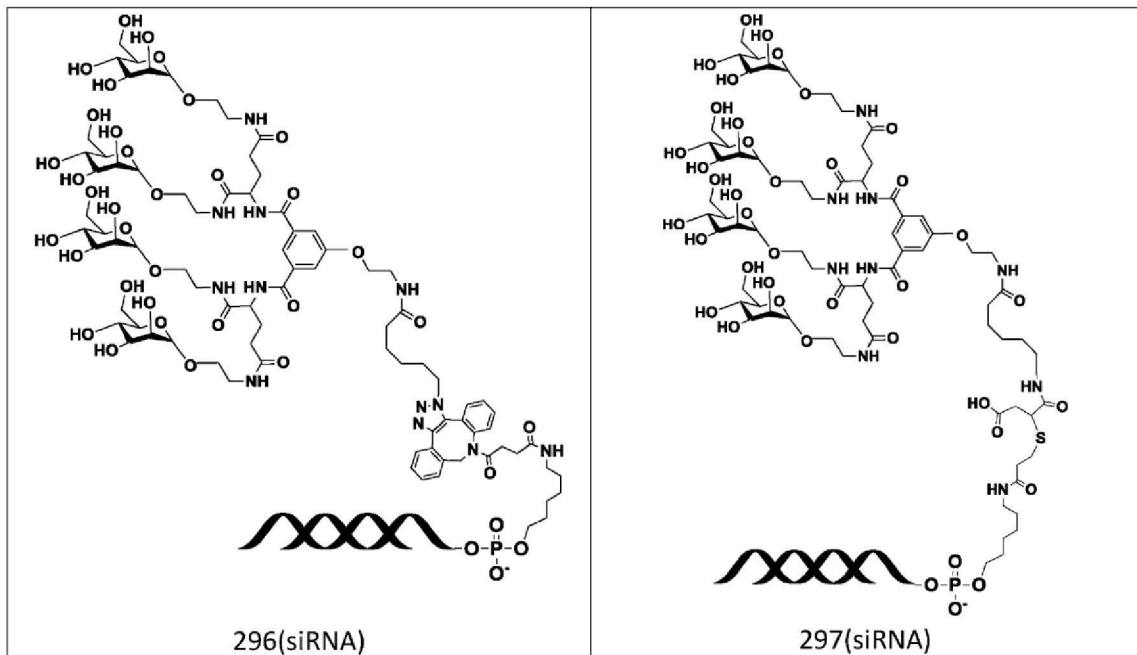
化合物	序列 (5'→3')	理論分子量	實測值
294_3'-B2M-ssRNA	A(F)G(M)G(F)A(M)C(F)U(M)G(F)G(M)U(F)C(M) U(F)U(F)U(M)C(F)U(M)A(F)U(M)C(F)U(M) <sup>^</sup> C(F) <sup>^</sup> U(M) <b>294</b>	8692	8691
295_3'-Hprt1-ssRNA	U(F)C(M)C(F)U(M)A(F)U(M)G(F)A(M)C(F)U(M)G(F)U(M) A(F)G(M)A(F)U(M)U(F)U(M)U(F)A(M)U(F) <b>295</b>	8524	8524

藉由與實施例9之步驟39同樣之方法，使用第56表所記載之單鏈之核酸複合體而獲得第57表所記載之雙鏈之核酸複合體。

將藉由本實施例合成之核酸複合體之序列示於第58表。

第57表

[表57]



第58表

[表58]

化合物	單鏈名稱	序列(5'→3')
296_B2M-siRNA	294_3' -B2M-ssRNA	A(F)G(M)G(F)A(M)C(F)U(M)G(F)G(M)U(F)C(M) U(F)U(F)U(M)C(F)U(M)A(F)U(M)C(F)U(M)^C(F)^U(M) 294
	B2M-as-RNA	A(F)^G(M)^A(F)G(M)A(F)U(M)A(F)G(M)A(F)A(M)A(M) G(F)A(M)C(F)C(M)A(F)G(M)U(F)C(M)C(F)U(M)^U(F)^G(M)
297_Hprt1-siRNA	295_3' -Hprt1-ssRNA	U(F)C(M)C(F)U(M)A(F)U(M)G(F)A(M)C(F)U(M)G(F)U(M) A(F)G(M)A(F)U(M)U(F)U(M)U(F)A(M)U(F) 295
	Hprt1-as-RNA	p-A(M)U(F)A(M)A(F)A(M)A(F)U(M)C(F)U(M)A(F)C(M)A(F) G(M)U(F)C(M)A(F)U(M)A(F)G(M)G(F)A(M)^A(F)^U(M)

### 試驗例5 核酸複合體對小鼠初代肝細胞之活體外(in vitro)活性

對於實施例及比較例中獲得之各核酸複合體中之第59表，分別藉由以下之方法導入至源自CD-1之小鼠初代肝細胞(Life Technologies公司製造，目錄編號MSCP10)中。

將以最終濃度成為30、10或3 nmol/L之方式藉由Opti-MEM(GIBCO公司，31985)稀釋而獲得之各核酸複合體以每孔20 μL之方式分注於96孔之培養盤中後，以細胞數成為12500/80 μL/孔之方式播種懸浮於含有初代幹細胞之解凍及培養補充品(Primary Hepatocyte Thawing and Plating Supplements)(Life Technologies公司製造，目錄編號CM3000)之William培養基(William's E Medium)(Life Technologies公司製造，目錄編號A12176-01)中之小鼠初代肝細胞，於37°C、5%CO<sub>2</sub>條件下培養6小時後，小心去除培養上清液，添加含有初代幹細胞維持補充品(Primary Hepatocyte Maintenance Supplements)(Life Technologies公司製造，目錄編號CM4000)之William培養基。又，播種不做任何處理之細胞作為陰性對照群。

將導入有各製劑之細胞於37°C之5%CO<sub>2</sub>培養箱內培養18小時，藉由

經冰浴冷卻之磷酸緩衝化生理食鹽水進行清洗，使用SuperPrep Cell Lysis & RT Kit for qPCR(東洋紡公司製造，目錄編號SCQ-201)，依照製品隨附之說明書所記載之方法，進行全部RNA之回收及利用以所獲得之全部RNA為模板之逆轉錄反應進行之cDNA之製作。

以所獲得之cDNA作為模板，以TaqMan(註冊商標)基因表現分析探針(TaqMan gene expression assay's probe)(Applied Biosystems公司製造)作為探針，使用QuantStudio 12K Flex即時PCR系統(ABI公司製造)，依照隨附之使用說明書所記載之方法進行PCR反應，藉此使Serpineptidase inhibitor(絲胺酸蛋白酶抑制物肽酶抑制劑)，clade(分支)C(antithrombin(抗凝血酶)), member 1(別名antithrombin(抗凝血酶)III，以下表示為AT3)基因及作為構成性表現基因之甘油醛3-磷酸脫氫酶(D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，以下表示為gapdh)基因進行PCR反應，分別測定mRNA擴增量，以gapdh之mRNA擴增量作為內部對照，算出AT3之mRNA之準定量值。將以同樣方式測得之陰性對照中之AT3之mRNA之準定量值設為1，根據AT3之mRNA之準定量值求出AT3之mRNA之表現率。將所獲得之AT3之mRNA之表現率之結果以相對於陰性對照之AT3 mRNA表現率之抑制率之形式示於第60-66表。

#### 第59表

[表59]

受檢物編號	化合物編號
1	AT3-siRNA
2	53(3'-AT3-siRNA)
3	42(3'-AT3-siRNA)
4	264(3'-AT3-siRNA)
5	261(3'-AT3-siRNA)
6	285(3'-AT3-siRNA)
7	251(3'-AT3-siRNA)
8	252(3'-AT3-siRNA)

第 278 頁(發明說明書)

9	275(3'-AT3-siRNA)
10	276(3'-AT3-siRNA)
11	277(3'-AT3-siRNA)
12	278(3'-AT3-siRNA)
13	279(3'-AT3-siRNA)
14	280(3'-AT3-siRNA)
15	281(3'-AT3-siRNA)
16	282(3'-AT3-siRNA)
17	283(3'-AT3-siRNA)
18	284(3'-AT3-siRNA)
19	262(3'-AT3-siRNA)
20	263(3'-AT3-siRNA)
21	255(3'-AT3-siRNA)
22	253(3'-AT3-siRNA)
23	254(3'-AT3-siRNA)
24	257(3'-AT3-siRNA)
25	256(3'-AT3-siRNA)
26	258(3'-AT3-siRNA)
27	266(3'-AT3-siRNA)
28	265(3'-AT3-siRNA)
29	267(3'-AT3-siRNA)
30	268(3'-AT3-siRNA)
31	269(3'-AT3-siRNA)
32	270(3'-AT3-siRNA)
33	271(3'-AT3-siRNA)
34	272(3'-AT3-siRNA)
35	273(3'-AT3-siRNA)
36	274(3'-AT3-siRNA)
37	286(3'-AT3-siRNA)
38	287(3'-AT3-siRNA)

## 第60表

[表60]

AT3 mRNA量[抑制率%]			
受検物編號	用量[nmol/L]		
	30	10	3
1	16.24	-7.51	19.07
2	-1.77	-0.39	11.50
3	78.72	64.66	35.07
4	79.29	65.43	36.90
5	73.61	62.53	40.42

## 第61表

[表61]

AT3 mRNA量[抑制率%]			
	用量[nmol/L]		
受檢物編號	30	10	3
1	18.78	12.29	3.78
6	89.90	79.76	56.89
7	83.00	76.72	56.30
8	81.80	76.27	55.76

第62表

[表62]

AT3 mRNA量[抑制率%]			
	用量[nmol/L]		
受檢物編號	30	10	3
1	-4.22	-9.92	-6.34
9	96.88	91.91	73.54
10	96.70	93.00	80.95
11	97.58	95.21	86.62
12	97.13	94.73	82.98
13	97.97	94.97	83.79
14	97.41	93.87	82.14
15	97.38	93.23	79.17

第63表

[表63]

AT3 mRNA量[抑制率%]			
	用量[nmol/L]		
受檢物編號	30	10	3
1	-4.23	6.14	9.84
16	98.66	97.09	90.01
17	97.26	96.22	83.87
18	97.90	95.52	84.55

第64表

[表64]

AT3 mRNA量[抑制率%]			
受檢物編號	用量[nmol/L]		
	30	10	3
1	23.69	20.34	14.53
19	86.37	79.19	62.23
20	87.08	74.57	50.87
21	89.22	81.76	56.49
22	92.86	84.12	51.84
23	84.52	76.64	48.04

第65表

[表65]

AT3 mRNA量[抑制率%]			
受檢物編號	用量[nmol/L]		
	30	10	3
1	-0.23	8.53	2.86
24	96.58	92.42	78.16
25	94.48	89.26	72.88
26	94.47	92.33	71.75
27	96.76	93.45	76.89
28	95.70	92.72	68.85
29	96.84	93.35	78.31
30	94.26	89.68	71.60
31	95.63	91.91	71.05
32	95.65	91.54	72.53
33	94.91	91.84	79.27

第66表

[表66]

AT3 mRNA量[抑制率%]			
受檢物編號	用量[nmol/L]		
	30	10	3
1	-3.22	10.06	-12.88
34	97.67	96.70	88.26
35	97.18	96.13	89.84
36	96.80	95.47	87.56
37	98.10	96.09	88.26
38	97.55	96.19	88.25

根據第60～第66表可知，本發明之核酸複合體(受檢物編號3～38)會抑制導入至小鼠初代肝細胞中後之AT3基因之mRNA之表現。

#### 試驗例6 核酸複合體於小鼠中之活體內(in vivo)活性

對於實施例及比較例中獲得之各核酸複合體中之第59表，分別藉由以下之方法實施活體內(in vivo)評價試驗。再者，各核酸複合體根據試驗而藉由磷酸緩衝化生理食鹽水(DPBS)(Nacalai Tesque公司製造)加以稀釋使用。將小鼠(BALB/cA，自CLEA Japan獲得)馴化飼養後，對各小鼠以1.5 mg/kg或0.5 mg/kg之方式皮下注射投予各核酸複合體。又，作為對照群，僅對小鼠皮下注射投予PBS。自投予起3天後在異氟醚麻醉下自後大靜脈後部靜脈採血。將採得之血液與含有3.2 M檸檬酸鈉及5 mmol/L之D-葡萄糖之抗凝固液以體積比9：1加以混合，將離心後之上清液回收，藉此獲得血漿。採血後將動物安樂死，取肝臟以液態氮冷凍保存。對於肝臟冷凍樣品，使用Trizol(註冊商標)RNA分離試劑(Life Technologies公司製造，目錄編號15596026)及RNAeasy mini kit(QIAGEN公司製造，目錄編號74106)，依照製品隨附之說明書所記載之方法，進行全部RNA之回收。進而使用Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit(轉錄第一鏈cDNA合成試劑盒)(Roche公司製造，目錄編號04897030001)，依照製品隨附之說明書所記載之方法，進行藉由以所獲得之全部RNA作為模板之逆轉錄反應進行之cDNA之製作。以所獲得之cDNA作為模板，以TaqMan(註冊商標)基因表現分析探針(TaqMan gene expression assay's probe)(Applied Biosystems公司製造)作為探針，使用QuantStudio 12K Flex即時PCR系統(ABI公司製造)，依照隨附之使用說明書所記載之方法進行PCR反應，藉此使AT3基因及gapdh基因進行PCR反應，分別測定

mRNA擴增量，以AT3之mRNA擴增量作為內部對照，算出AT3之mRNA之準定量值。將以同樣方式測得之對照群中之AT3之mRNA之準定量值設為1，根據AT3之mRNA之準定量值求出AT3之mRNA之表現率。又，使用小鼠抗凝血酶III ELISA試劑盒(Mouse Antithrombin III ELISA Kit)(Abcam公司製造，目錄編號ab108800)，依照隨附之使用說明書所記載之方法測定血漿中之AT3蛋白質濃度。將所獲得之AT3之mRNA之表現抑制率及血漿中AT3蛋白質濃度示於表67-69。

第67表

[表67]

	肝臟中AT3 mRNA量 [抑制率%]		血漿中AT3蛋白質濃度 [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]	
	用量[mg/kg]		用量[mg/kg]	
受檢物編號	1.5	0.5	1.5	0.5
對照群	-		323.05	
2	-13.30	-15.10	303.47	375.88
3	42.85	14.50	212.26	258.78
4	26.74	19.04	243.16	336.67
5	10.76	1.56	281.52	377.74
6	69.39	33.88	160.10	278.20
7	46.36	23.11	189.61	306.61
8	44.26	27.25	205.49	232.32

第68表

[表68]

	肝臟中AT3 mRNA量 [抑制率%]		血漿中AT3蛋白質濃度 [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]	
	用量[mg/kg]		用量[mg/kg]	
受檢物編號	1.5	0.5	1.5	0.5
對照群	-		406.25	
9	52.36	33.71	207.82	271.94
10	46.36	19.93	189.70	283.51
11	61.22	30.09	161.69	263.98
12	66.19	35.34	153.92	256.08

13	63.52	28.98	175.91	277.52
14	66.26	30.95	147.01	248.54
15	61.97	26.39	153.46	258.51
16	54.95	45.75	175.40	234.00
17	50.93	29.41	149.33	266.16
18	57.82	32.22	180.48	314.41

第69表

[表69]

受檢物編號	肝臟中AT3 mRNA量 [抑制率%]		血漿中AT3蛋白質濃度 [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]	
	用量[ $\text{mg}/\text{kg}$ ]		用量[ $\text{mg}/\text{kg}$ ]	
受檢物編號	1.5	0.5	1.5	0.5
對照群	-		430.38	
19	50.65	26.74	235.75	294.03
20	33.17	16.66	228.00	334.38
21	42.26	25.95	230.60	298.86
22	44.79	12.90	233.16	297.65
24	76.00	39.22	125.91	258.13
25	65.05	39.20	154.28	242.88
27	77.76	37.94	143.83	255.37
28	46.70	21.10	233.87	312.41
29	73.38	30.03	161.78	237.47
30	68.94	25.92	169.58	222.12
31	55.87	17.95	172.05	273.52
32	55.38	7.30	200.17	286.96
33	53.60	-8.73	207.01	290.95

根據表67~69可知，本發明之核酸複合體(受檢物編號3~22、24、25、27~33)與活體內會降低AT3基因之表現，減少血中之AT蛋白質濃度。

試驗例7 核酸複合體對人類初代肝細胞之活體外(in vitro)活性

對於實施例15中獲得之B2M-siRNA(受檢物39)、260\_3'-B2M-siRNA(受檢物40)，分別藉由以下之方法導入至人類初代肝細胞(Biopredic international公司製造，目錄編號HEP187)中。

將以最終濃度成為300、100、30、10、3、1 nmol/L之方式藉由

第 284 頁(發明說明書)

Opti-MEM(GIBCO公司，目錄編號31985)稀釋而獲得之各核酸複合體以每孔20  $\mu\text{L}$ 之方式分注於96孔之培養盤中後，以細胞數成為80  $\mu\text{L}$ /孔之方式播種以成為 $1.25 \times 10^5$  cells/mL之方式懸浮於接種培養基(Plating medium)(Biopredic international公司製造，目錄編號LV0304-2)中之人類初代肝細胞，於 $37^\circ\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$ 條件下培養6小時後，小心去除培養上清液，添加保溫培養基(Incubation medium)(Biopredic international公司製造，目錄編號LV0304-2)。又，播種不做任何處理之細胞作為陰性對照群。

將導入有各製劑之細胞於 $37^\circ\text{C}$ 之5% $\text{CO}_2$ 培養箱內培養18小時，藉由經冰浴冷卻之磷酸緩衝化生理食鹽水進行清洗，使用SuperPrep Cell Lysis & RT Kit for qPCR(東洋紡公司製造，目錄編號SCQ-201)，依照製品隨附之說明書所記載之方法，進行全部RNA之回收及利用以所獲得之全部RNA為模板之逆轉錄反應進行之cDNA之製作。

以所獲得之cDNA作為模板，以TaqMan(註冊商標)基因表現分析探針(TaqMan gene expression assay's probe)(Applied Biosystems公司製造)作為探針，使用QuantStudio 12K Flex即時PCR系統(ABI公司製造)，依照隨附之使用說明書所記載之方法進行PCR反應，藉此使 $\beta$ -2微球蛋白(Beta-2 microglobulin)(以下表示為B2M)基因及作為構成性表現基因之甘油醛3-磷酸脫氫酶(D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，以下表示為gapdh)基因進行PCR反應，分別測定mRNA擴增量，以gapdh之mRNA擴增量作為內部對照，算出B2M之mRNA之準定量值。將以同樣之方式測得之陰性對照中之B2M之mRNA之準定量值設為1，根據B2M之mRNA之準定量值求出B2M之mRNA之表現率。將所獲得之B2M之

mRNA之表現率之結果以相對於陰性對照之B2M mRNA表現率之抑制率之形式示於表70。

第70表

[表70]

受檢物	受檢物39(B2M-siRNA)					
用量[nmol/L]	300	100	30	10	3	1
B2M mRNA量 [抑制率%]	37.1	34.1	23.2	20.7	9.9	-6.4
受檢物	受檢物40(260_3'-B2M-siRNA)					
用量[nmol/L]	300	100	30	10	3	1
B2M mRNA量 [抑制率%]	89.3	84.0	77.2	61.9	40.0	15.8

試驗例8 核酸複合體對源自人類單核球之巨噬菌體細胞之mRNA減弱活性之評價

使用含有10%胎牛血清之RPMI1640培養基(Nacalai Tesque公司製造，30264-56)(以下記載為10%FBS RPMI1640培養基)及DNase I溶液(DNase I Solution，StemCell Technology公司製造，07900)，依照隨附之操作說明將人類CD14陽性單核球細胞(Untouched Frozen NPB-CD14+Monocytes，Allcells公司製造，PB011F)溶解。

其後，以最終濃度成為100 ng/mL之方式添加重組人類顆粒性單核球菌落刺激因子(Recombinant Human GM-CSF Protein CF，R&D System公司製造，215-GM-050/CF)(以下記載為GM-CSF)，以 $10^6$  cells/mL之密度播種於多孔盤(multiplate)(SUMILON公司製造，MS-8196F5)中，於37°C、5%CO<sub>2</sub>條件下進行培養。

自開始培養起6天後去除培養上清液，以每孔80 μL之方式將含有

GM-CSF 100 ng/mL之10%FBS RPMI1640培養基添加至各孔中。

使用以Beta-2 Microglobulin( $\beta$ -2微球蛋白，以下記載為B2M)及HPRT-1為標靶之核酸複合體296\_3'-B2M-siRNA(受檢物41)作為受驗樣品，並且使用B2M-siRNA(受檢物42)作為分別與該等核酸複合體相對應之對照群。受驗樣品之最終濃度設為1  $\mu$ mol/L、0.3  $\mu$ mol/L、0.1  $\mu$ mol/L之3點，以N=3實施。

核酸複合體溶液之稀釋係按照以下程序進行。使用Opti-MEM(R) I Reduced Serum Medium(低血清培養基)(Life technologies公司製造，31985-070)稀釋以檸檬酸緩衝液(20 mM Citrate(檸檬酸鹽)(pH值為7)，150 mM NaCl)製備之核酸溶液。以每份20  $\mu$ L之方式將經稀釋之核酸溶液添加至細胞溶液中，於陰性對照群中添加20  $\mu$ L之不含核酸之檸檬酸緩衝液/Opti-MEM混合溶液，於37°C、5%CO<sub>2</sub>條件下培養4天。

含有RNA之細胞溶解液之製備係使用SuperPrep Cell Lysis & RT Kit for qPCR(TOYOBO公司製造，SCQ-101)，並且使用附屬同一試劑盒之RT Kit for qPCR，依照試劑盒隨附之說明書進行逆轉錄反應，而製作cDNA。

以該cDNA作為PCR反應之模板，使用QuantStudio 12K Flex即時PCR系統(Applied Biosystems公司製造)，藉由Taqman探針(Taqman probe)法以下述方式實施。於對B2M基因之減弱效果進行定量之情形時，使B2M及作為對照之HPRT-1之基因進行PCR反應，分別測定mRNA擴增量，以HPRT-1之mRNA擴增量作為內部對照，算出B2M之mRNA之準定量值。

B2M基因之測定係使用TaqMan探針Hs00187842\_m1(Applied

Biosystems公司製造)，反應試劑使用TaqMan基因表現預混液(TaqMan Gene Expression Master Mix)(Applied Biosystems公司製造，4369542)，依照隨附之操作說明而實施。核酸之標靶mRNA量係以將陰性對照群(未導入核酸群)中之B2M之mRNA量設為1時之相對比率之形式算出。將以平均值±標準偏差表示該mRNA量之相對比率而獲得之結果示於表71。

第71表

[表71]

受檢物	受檢物42(B2M-siRNA)			受檢物41(296_3'-B2M-siRNA)		
用量[nmol/L]	1	0.3	0.1	1	0.3	0.1
B2M mRNA量 [抑制率%]	-1.5	-16.5	-0.08	40.9	34.7	29.0

根據該等結果，確認到本發明之核酸複合體(受檢物41)與作為對照群之B2M-siRNA(受檢物42)相比，於源自人類單核球之巨噬菌體中表現出明顯之減弱效果。

## [產業上之可利用性]

本發明之核酸複合體係對哺乳動物投予，於活體內可用於治療各種相關疾病。

序列表非關鍵文字

序列編號1表示ApoBASO之鹼基序列。

序列編號2表示AT3-ssRNA之鹼基序列。

序列編號3表示AT3-asRNA之鹼基序列。

序列編號4表示B2M-ssRNA之鹼基序列。

序列編號5表示B2M-asRNA之鹼基序列。

序列編號6表示CD45AS0之鹼基序列。

序列編號7表示3'-dT10之鹼基序列。

序列編號8表示Hprt1-ssRNA之鹼基序列。

序列編號9表示Hprt1-asRNA之鹼基序列。

## 【序列表】

<110> 日商協和醱酵麒麟有限公司

<120> 寡核苷酸複合體

<130> K1635AHP0001

<150> JP 2016-016707

<151> 2016-01-29

<160> 9

<170> PatentIn第3.5版

<210> 1

<211> 13

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> ApoBASO

<220>

<221> 未分類之特徵

<222> (1).. (1)

<223> LNA

<220>

<221> 未分類之特徵

<222> (2).. (2)

<223> LNAmC

<220>

<221> 未分類之特徵

<222> (2).. (13)

<223> 5'-硫代磷酸酯

<220>

<221> 未分類之特徵

<222> (11).. (11)

<223> LNA

<220>

<221> 未分類之特徵

<222> (12).. (12)

<223> LNAmC

<220>

<221> 未分類之特徵  
 <222> (13).. (13)  
 <223> LNA

<400> 1  
 gnattggtat tna

13

<210> 2  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> AT3-ssRNA

<220>  
 <221> 修飾鹼基  
 <222> (1).. (1)  
 <223> 2'-脫氧-2'-氟鳥苷

<220>  
 <221> 修飾鹼基  
 <222> (2).. (2)  
 <223> gm

<220>  
 <221> 未分類之特徵  
 <222> (2).. (3)  
 <223> 5'-硫代磷酸酯

<220>  
 <221> 修飾鹼基  
 <222> (3).. (3)  
 <223> 2'-脫氧-2'-氟尿苷

<220>  
 <221> 修飾鹼基  
 <222> (4).. (4)  
 <223> um

<220>  
 <221> 修飾鹼基  
 <222> (5).. (5)  
 <223> 2'-脫氧-2'-氟腺苷

<220>  
 <221> 修飾鹼基  
 <222> (6).. (6)

- <223> 2'-O-甲基腺苷
- <220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (7).. (7)  
<223> 2'-脫氧-2'-氟胞嘧啶核苷
- <220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (8).. (8)  
<223> 2'-O-甲基腺苷
- <220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (9).. (10)  
<223> 2'-脫氧-2'-氟胞嘧啶核苷
- <220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (11).. (11)  
<223> 2'-脫氧-2'-氟腺苷
- <220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (12).. (12)  
<223> um
- <220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (13).. (13)  
<223> 2'-脫氧-2'-氟尿苷
- <220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (14).. (14)  
<223> um
- <220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (15).. (15)  
<223> 2'-脫氧-2'-氟腺苷
- <220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (16).. (16)  
<223> cm
- <220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (17).. (17)

- <223> 2'-脫氧-2'-氟尿苷
- <220>  
 <221> 修飾鹼基  
 <222> (18).. (18)  
 <223> um
- <220>  
 <221> 修飾鹼基  
 <222> (19).. (19)  
 <223> 2'-脫氧-2'-氟胞嘧啶核苷
- <220>  
 <221> 修飾鹼基  
 <222> (20).. (20)  
 <223> 2'-O-甲基腺苷
- <220>  
 <221> 修飾鹼基  
 <222> (21).. (21)  
 <223> 2'-脫氧-2'-氟腺苷
- <400> 2  
 gguaacacc auuuacuca a
- <210> 3  
 <211> 23  
 <212> RNA  
 <213> 人工序列
- <220>  
 <223> AT3-asRNA
- <220>  
 <221> 修飾鹼基  
 <222> (1).. (1)  
 <223> um
- <220>  
 <221> 修飾鹼基  
 <222> (2).. (2)  
 <223> 2'-脫氧-2'-氟尿苷
- <220>  
 <221> 未分類之特徵  
 <222> (2).. (3)  
 <223> 5'-硫代磷酸酯

21

- <220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (3).. (3)  
<223> gm
- <220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (4).. (4)  
<223> 2'-脫氧-2'-氟腺苷
- <220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (5).. (5)  
<223> 2'-O-甲基腺苷
- <220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (6).. (6)  
<223> 2'-脫氧-2'-氟烏苷
- <220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (7).. (7)  
<223> um
- <220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (8).. (8)  
<223> 2'-脫氧-2'-氟腺苷
- <220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (9).. (9)  
<223> 2'-O-甲基腺苷
- <220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (10).. (10)  
<223> 2'-脫氧-2'-氟腺苷
- <220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (11).. (11)  
<223> um
- <220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (12).. (13)  
<223> gm

- <220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (14).. (14)  
<223> 2'-脫氧-2'-氟尿苷
- <220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (15).. (15)  
<223> gm
- <220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (16).. (16)  
<223> 2'-脫氧-2'-氟尿苷
- <220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (17).. (17)  
<223> um
- <220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (18).. (18)  
<223> 2'-脫氧-2'-氟腺苷
- <220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (19).. (19)  
<223> 2'-O-甲基腺苷
- <220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (20).. (20)  
<223> 2'-脫氧-2'-氟胞嘧啶核苷
- <220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (21).. (21)  
<223> cm
- <220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (22).. (22)  
<223> 2'-O-甲基腺苷
- <220>  
<221> 未分類之特徵  
<222> (22).. (23)  
<223> 5'-硫代磷酸酯

<220>  
 <221> 修飾鹼基  
 <222> (23).. (23)  
 <223> gm  
  
 <400> 3  
 uugaaguaaa ugguguuaac cag

23

<210> 4  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> B2M-ssRNA

<220>  
 <221> 修飾鹼基  
 <222> (1).. (1)  
 <223> 2'-脫氧-2'-氟腺苷

<220>  
 <221> 修飾鹼基  
 <222> (2).. (2)  
 <223> gm

<220>  
 <221> 修飾鹼基  
 <222> (3).. (3)  
 <223> 2'-脫氧-2'-氟鳥苷

<220>  
 <221> 修飾鹼基  
 <222> (4).. (4)  
 <223> 2'-O-甲基腺苷

<220>  
 <221> 修飾鹼基  
 <222> (5).. (5)  
 <223> 2'-脫氧-2'-氟胞嘧啶核苷

<220>  
 <221> 修飾鹼基  
 <222> (6).. (6)  
 <223> um

<220>  
 <221> 修飾鹼基

- <222> (7).. (7)  
<223> 2'-脫氧-2'-氟鳥苷
- <220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (8).. (8)  
<223> gm
- <220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (9).. (9)  
<223> 2'-脫氧-2'-氟尿苷
- <220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (10).. (10)  
<223> cm
- <220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (11).. (12)  
<223> 2'-脫氧-2'-氟尿苷
- <220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (13).. (13)  
<223> um
- <220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (14).. (14)  
<223> 2'-脫氧-2'-氟胞嘧啶核苷
- <220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (15).. (15)  
<223> um
- <220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (16).. (16)  
<223> 2'-脫氧-2'-氟腺苷
- <220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (17).. (17)  
<223> um
- <220>  
<221> 修飾鹼基

<222> (18).. (18)  
 <223> 2'-脫氧-2'-氟胞嘧啶核苷

<220>  
 <221> 修飾鹼基  
 <222> (19).. (19)  
 <223> um

<220>  
 <221> 修飾鹼基  
 <222> (20).. (20)  
 <223> 2'-脫氧-2'-氟胞嘧啶核苷

<220>  
 <221> 未分類之特徵  
 <222> (20).. (21)  
 <223> 5'-硫代磷酸酯

<220>  
 <221> 修飾鹼基  
 <222> (21).. (21)  
 <223> um

<400> 4  
 aggacugguc uuucuaucuc u

21

<210> 5  
 <211> 23  
 <212> RNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> B2M-asRNA

<220>  
 <221> 修飾鹼基  
 <222> (1).. (1)  
 <223> 2'-脫氧-2'-氟腺苷

<220>  
 <221> 修飾鹼基  
 <222> (2).. (2)  
 <223> gm

<220>  
 <221> 未分類之特徵  
 <222> (2).. (3)  
 <223> 5'-硫代磷酸酯

<220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (3).. (3)  
<223> 2'-脫氧-2'-氟腺苷

<220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (4).. (4)  
<223> gm

<220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (5).. (5)  
<223> 2'-脫氧-2'-氟腺苷

<220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (6).. (6)  
<223> um

<220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (7).. (7)  
<223> 2'-脫氧-2'-氟腺苷

<220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (8).. (8)  
<223> gm

<220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (9).. (9)  
<223> 2'-脫氧-2'-氟腺苷

<220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (10).. (11)  
<223> 2'-O-甲基腺苷

<220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (12).. (12)  
<223> 2'-脫氧-2'-氟鳥苷

<220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (13).. (13)  
<223> 2'-O-甲基腺苷

<220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (14)..(14)  
<223> 2'-脫氧-2'-氟胞嘧啶核苷

<220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (15)..(15)  
<223> cm

<220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (16)..(16)  
<223> 2'-脫氧-2'-氟腺苷

<220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (17)..(17)  
<223> gm

<220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (18)..(18)  
<223> 2'-脫氧-2'-氟尿苷

<220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (19)..(19)  
<223> cm

<220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (20)..(20)  
<223> 2'-脫氧-2'-氟胞嘧啶核苷

<220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (21)..(21)  
<223> um

<220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (22)..(22)  
<223> 2'-脫氧-2'-氟尿苷

<220>  
<221> 未分類之特徵  
<222> (22)..(23)  
<223> 5'-硫代磷酸酯

<220>		
<221>	修飾鹼基	
<222>	(23).. (23)	
<223>	gm	
<400>	5	
	agagauagaa agaccagucc uug	23
<210>	6	
<211>	16	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	CD45A50	
<220>		
<221>	未分類之特徵	
<222>	(1).. (4)	
<223>	LNA	
<220>		
<221>	未分類之特徵	
<222>	(2).. (16)	
<223>	5'-硫代磷酸酯	
<220>		
<221>	未分類之特徵	
<222>	(13).. (16)	
<223>	LNA	
<400>	6	
	ccaaatgccca agagtt	16
<210>	7	
<211>	10	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	3'-dT10	
<220>		
<221>	未分類之特徵	
<222>	(1).. (1)	

<223> RNA

<400> 7

tttttttttt

10

<210> 8

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> Hprt1-ssRNA

<220>

<221> 修飾鹼基

<222> (1).. (1)

<223> 2'-脫氧-2'-氟尿苷

<220>

<221> 修飾鹼基

<222> (2).. (2)

<223> cm

<220>

<221> 修飾鹼基

<222> (3).. (3)

<223> 2'-脫氧-2'-氟胞嘧啶核苷

<220>

<221> 修飾鹼基

<222> (4).. (4)

<223> um

<220>

<221> 修飾鹼基

<222> (5).. (5)

<223> 2'-脫氧-2'-氟腺苷

<220>

<221> 修飾鹼基

<222> (6).. (6)

<223> um

<220>

<221> 修飾鹼基

<222> (7).. (7)

<223> 2'-脫氧-2'-氟鳥苷

- <220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (8).. (8)  
<223> 2'-O-甲基腺苷
- <220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (9).. (9)  
<223> 2'-脫氧-2'-氟胞嘧啶核苷
- <220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (10).. (10)  
<223> um
- <220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (11).. (11)  
<223> 2'-脫氧-2'-氟鳥苷
- <220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (12).. (12)  
<223> um
- <220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (13).. (13)  
<223> 2'-脫氧-2'-氟腺苷
- <220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (14).. (14)  
<223> gm
- <220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (15).. (15)  
<223> 2'-脫氧-2'-氟腺苷
- <220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (16).. (16)  
<223> um
- <220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (17).. (17)  
<223> 2'-脫氧-2'-氟尿苷

<220>  
 <221> 修飾鹼基  
 <222> (18).. (18)  
 <223> um  
  
 <220>  
 <221> 修飾鹼基  
 <222> (19).. (19)  
 <223> 2'-脫氧-2'-氟尿苷  
  
 <220>  
 <221> 修飾鹼基  
 <222> (20).. (20)  
 <223> 2'-O-甲基腺苷  
  
 <220>  
 <221> 修飾鹼基  
 <222> (21).. (21)  
 <223> 2'-脫氧-2'-氟尿苷  
  
 <400> 8  
 uccuaugacu guagauuuua u

21

<210> 9  
 <211> 23  
 <212> RNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> Hprt1-asRNA

<220>  
 <221> 修飾鹼基  
 <222> (1).. (1)  
 <223> 2'-O-甲基腺苷

<220>  
 <221> 修飾鹼基  
 <222> (1).. (1)  
 <223> 5'-磷酸基

<220>  
 <221> 修飾鹼基  
 <222> (2).. (2)  
 <223> 2'-脫氧-2'-氟尿苷

<220>  
 <221> 修飾鹼基

<222> (3).. (3)  
<223> 2'-O-甲基腺苷

<220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (4).. (4)  
<223> 2'-脫氧-2'-氟腺苷

<220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (5).. (5)  
<223> 2'-O-甲基腺苷

<220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (6).. (6)  
<223> 2'-脫氧-2'-氟腺苷

<220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (7).. (7)  
<223> um

<220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (8).. (8)  
<223> 2'-脫氧-2'-氟胞嘧啶核苷

<220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (9).. (9)  
<223> um

<220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (10).. (10)  
<223> 2'-脫氧-2'-氟腺苷

<220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (11).. (11)  
<223> cm

<220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (12).. (12)  
<223> 2'-脫氧-2'-氟腺苷

<220>  
<221> 修飾鹼基

- <222> (13).. (13)  
<223> gm
- <220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (14).. (14)  
<223> 2'-脫氧-2'-氟尿苷
- <220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (15).. (15)  
<223> cm
- <220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (16).. (16)  
<223> 2'-脫氧-2'-氟腺苷
- <220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (17).. (17)  
<223> um
- <220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (18).. (18)  
<223> 2'-脫氧-2'-氟腺苷
- <220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (19).. (19)  
<223> gm
- <220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (20).. (20)  
<223> 2'-脫氧-2'-氟鳥苷
- <220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (21).. (21)  
<223> 2'-O-甲基腺苷
- <220>  
<221> 修飾鹼基  
<222> (22).. (22)  
<223> 2'-脫氧-2'-氟腺苷
- <220>  
<221> 未分類之特徵

<222> (22)..(23)

<223> 5'-硫代磷酸酯

<220>

<221> 修飾鹼基

<222> (23)..(23)

<223> um

<400> 9

auaaaaucua cagucauagg aau

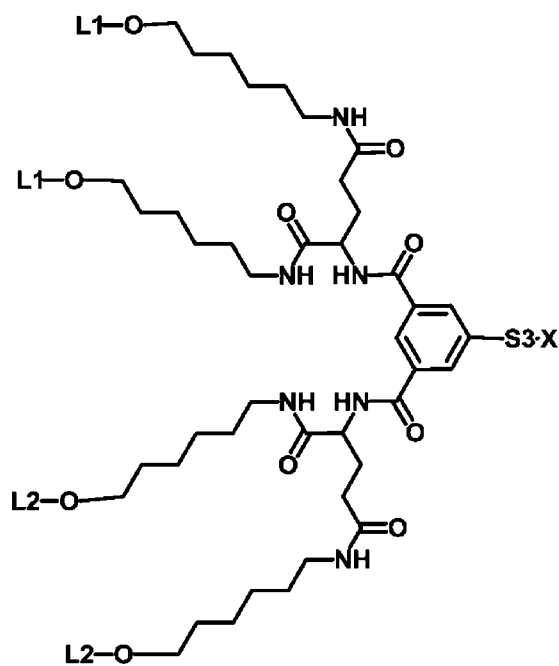
23

**【發明申請專利範圍】****【第1項】**

一種核酸複合體，其具有下述式7-1～式7-9所表示之任一結構，

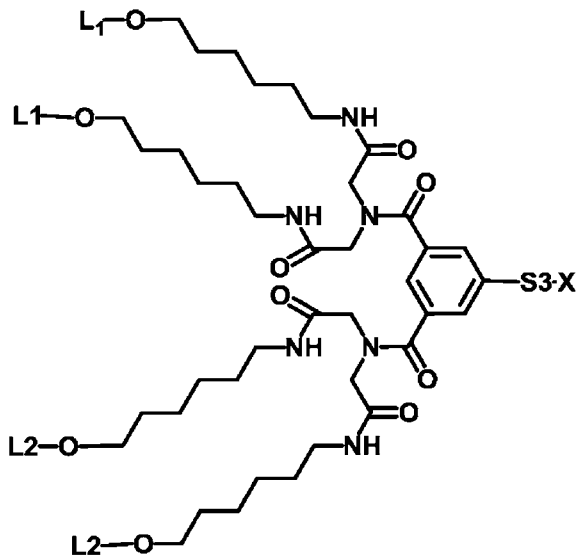
式7-1：

[化26]



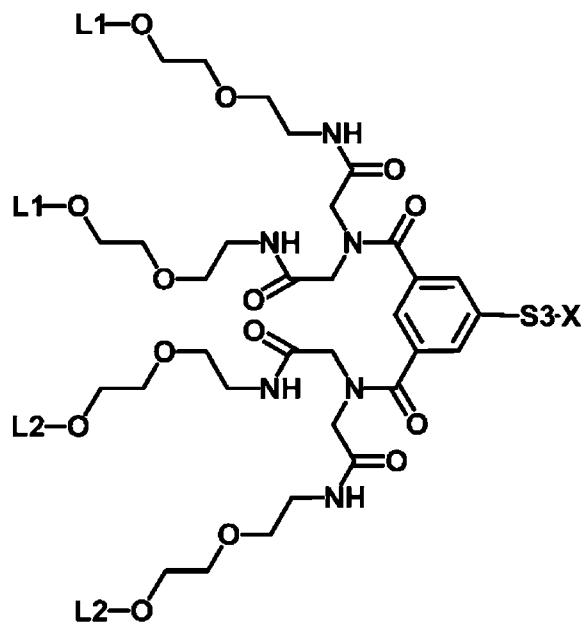
式7-2：

[化27]



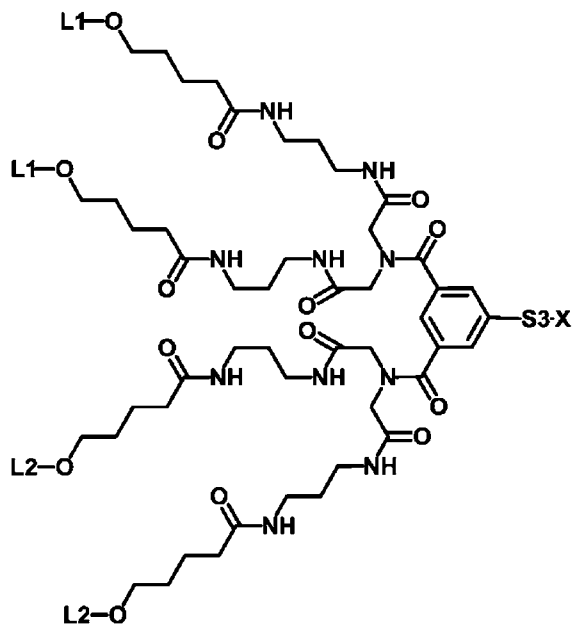
式7-3：

[化28]



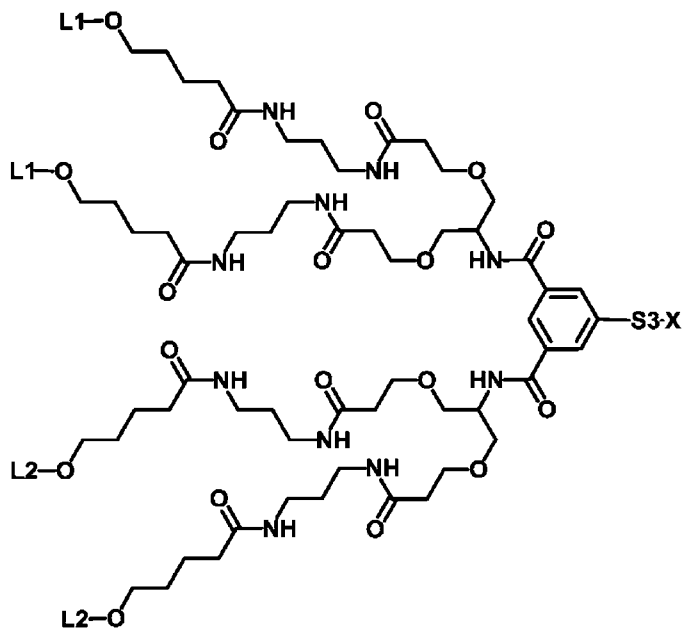
式7-4：

[化29]



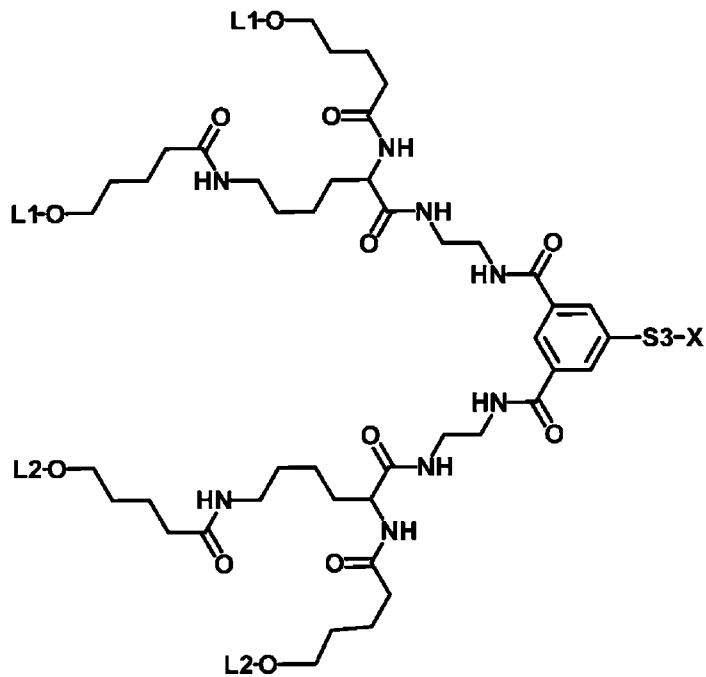
式7-5：

[化30]



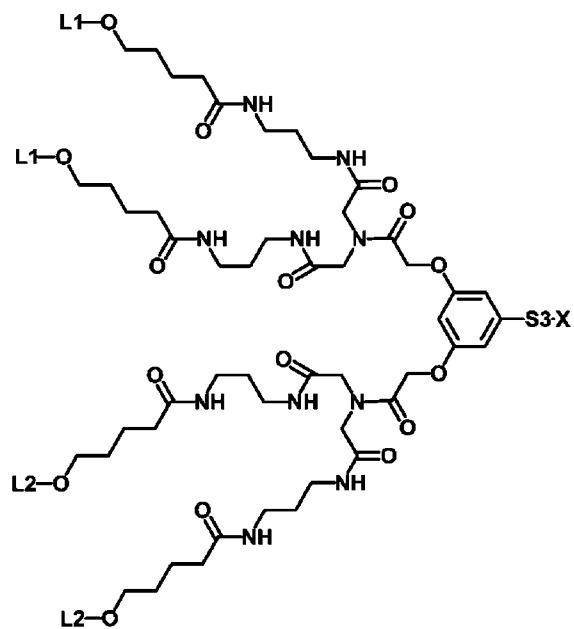
式7-6：

[化31]



式7-7：

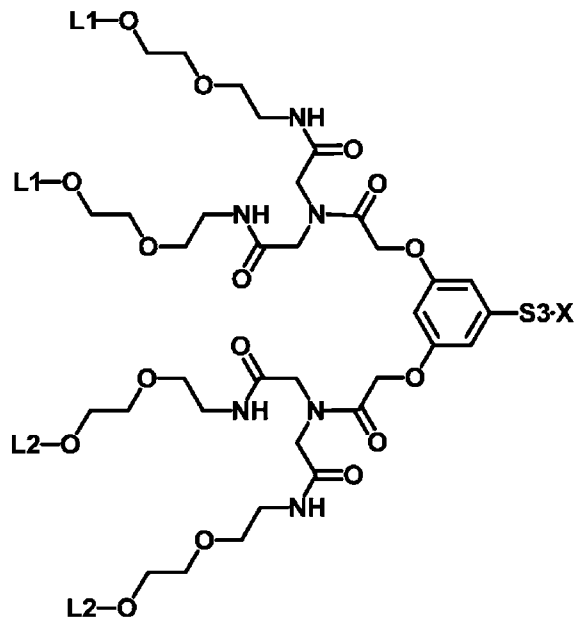
[化32]



式7-8：

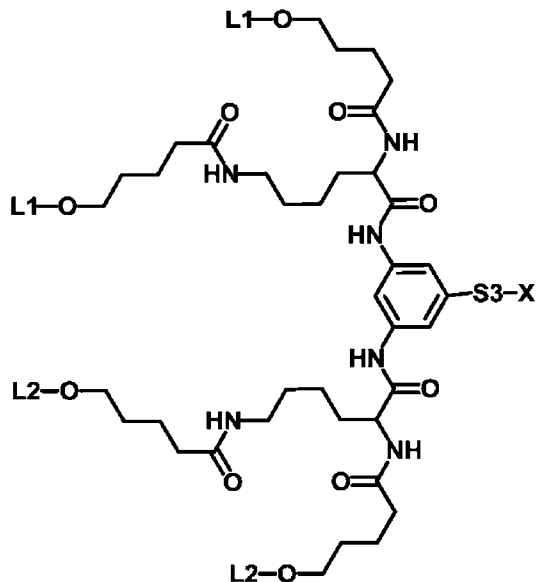
第 4 頁(發明申請專利範圍)

[化33]



式7-9：

[化34]



(式7-1~7-9中，

X為寡核苷酸，

L1及L2分別獨立為糖配體，  
S3為連結子)。

**【第2項】**

如請求項1之核酸複合體，其中上述糖配體為甘露糖或N-乙醯基半乳糖胺。

**【第3項】**

如請求項1或2之核酸複合體，其中上述寡核苷酸含有修飾核苷酸。

**【第4項】**

一種醫藥組合物，其含有如請求項1至3中任一項之核酸複合體。

**【第5項】**

如請求項4之醫藥組合物，其係用於導入至細胞內。

**【第6項】**

如請求項5之醫藥組合物，其中上述細胞為肝細胞。

**【第7項】**

如請求項4之醫藥組合物，其係靜脈內投予或皮下投予。

**【第8項】**

如請求項5之醫藥組合物，其係靜脈內投予或皮下投予。

**【第9項】**

如請求項6之醫藥組合物，其係靜脈內投予或皮下投予。