

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

(43) 国際公開日  
2023年8月10日(10.08.2023)



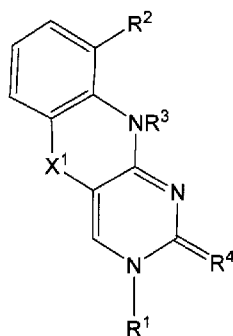
(10) 国際公開番号

WO 2023/149038 A1

- (51) 国際特許分類:  
C07D 498/04 (2006.01) A61P 21/00 (2006.01)  
A61K 31/5383 (2006.01) C07H 19/23 (2006.01)  
A61K 31/7115 (2006.01) C12N 15/113 (2010.01)  
A61K 48/00 (2006.01) C12N 15/115 (2010.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2022/041129
- (22) 国際出願日: 2022年11月4日(04.11.2022)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2022-017564 2022年2月7日(07.02.2022) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人大阪大学 (OSAKA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 Osaka (JP). 国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 (NATIONAL INSTITUTES OF BIOMEDICAL INNOVATION, HEALTH AND NUTRITION) [JP/JP]; 〒5670085 大阪府茨木市彩都あさぎ七丁目6番8号 Osaka (JP).
- (72) 発明者: 小比賀 聡 (OBIKA, Satoshi); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 中川 治 (NAKAGAWA, Osamu); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 山路 凌平 (YAMAJI, Ryohei); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 鎌田 春彦 (KAMADA, Haruhiko); 〒5670085 大阪府茨木市彩都あさぎ七丁目6番8号 国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所内 Osaka (JP). 中山 泰亮 (NAKAYAMA, Taisuke); 〒5670085 大阪府茨木市彩都あさぎ七丁目6番8号 国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所内 Osaka (JP).
- (74) 代理人: 中道 佳博, 外 (NAKAMICHI, Yoshihiro et al.); 〒5300047 大阪府大阪市北区西天満3丁目2番9号 翁ビル5階 創樹国際特許事務所 Osaka (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH,

(54) Title: PHENOXAZINE DERIVATIVE AND DRUG DELIVERY SYSTEM FORMULATION USING SAME

(54) 発明の名称: フェノキサジン誘導体およびそれを用いたドラッグデリバリーシステム製剤



(57) Abstract: A compound or a pharmaceutically acceptable salt thereof of the present invention has a structure represented by formula (I) and can form a ligand in a drug delivery system formulation. The drug delivery system formulation according to the present invention can improve delivering ability thereof to, for example, skeletal muscles.

(57) 要約: 本発明の化合物またはその薬学的に許容し得る塩は、式 (I) で表される構造を有し、ドラッグデリバリーシステム製剤におけるリガンドを構成し得る。本発明のドラッグデリバリーシステム製剤は、例えば骨格筋へのデリバリー能を向上させることができる。

PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG,  
SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ,  
UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

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

添付公開書類 :

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

## 明 細 書

発明の名称：

フェノキサジン誘導体およびそれを用いたドラッグデリバリーシステム製剤

### 技術分野

[0001] 本発明は、フェノキサジン誘導体およびそれを用いたドラッグデリバリーシステム製剤に関する。

### 背景技術

[0002] 核酸医薬の一種であるアンチセンス医薬は、標的mRNAと相補的なアンチセンスオリゴ核酸（ASO）で二重鎖を形成させることにより、疾患原因となるタンパク質の機能・発現を制御する。アンチセンス医薬は、mRNAやmiRNAなどの遺伝子を標的にすることができ、配列が既知であれば迅速に医薬開発が可能である。このことから、難治性疾患治療の新たな可能性を秘めた新規創薬モダリティとして期待されている。

[0003] 一方、核酸医薬は細胞膜透過性に乏しく、容易に腎排泄を受けてしまうといった課題がある。この課題に対して、オリゴ核酸に受容体選択的なりガンドを搭載する戦略がある。例えばリガンドと細胞膜表面上に発現する受容体とを結合させることによってエンドサイトーシスを誘発し、オリゴ核酸を効果的に細胞内へと送達させることができる。

[0004] この戦略を用いた代表例としてはN-アセチルガラクトサミン（GalNAc）をコンジュゲートしたオリゴ核酸が挙げられる（非特許文献1）。非特許文献1によれば、オリゴ核酸の末端にGalNAcを結合させることにより、肝臓中の肝実質細胞膜表面上に発現するアジアロ糖タンパク受容体を介したエンドサイトーシスを誘発し、肝臓に対して効率良くオリゴ核酸を集積させることに成功したことが記載されている。

[0005] 例えば、2019年にギボシラン（givosiran）がリガンド結合型siRNAとして世界初の承認を受けており、2020年には同じくリガ

ンド結合型 siRNA であるルマシラン (lumasiran) およびインクリシラン (inclisiran) が承認されていることから、リガンドをオリゴ核酸に結合させる戦略は非常に有望である。

[0006] 現在、肝臓以外の臓器に核酸医薬を送達させる需要が高まっており、膵臓へ送達させるグルカゴン様ペプチド-1 (eGLP-1) を結合したオリゴ核酸 (非特許文献2)、筋組織への送達に効果を示すパルミチン酸結合型オリゴ核酸 (非特許文献3) 等に関する報告がなされている。しかし、これらはいずれも実用化までは至っておらず、肝臓以外の臓器に核酸医薬を送達させることは未だ困難である。

### 先行技術文献

#### 非特許文献

[0007] 非特許文献1: T. P. Prakashら、Nucleic Acid Res., 42, 8796-8807 (2014)

非特許文献2: C. Ammalaら、Sci. Adv., 4 (2018) DOI: 10.1126/sciadv.aat3386.

非特許文献3: A. E. Chappellら、Nucleic Acids Res., 48, 4382-4395 (2020).

### 発明の概要

#### 発明が解決しようとする課題

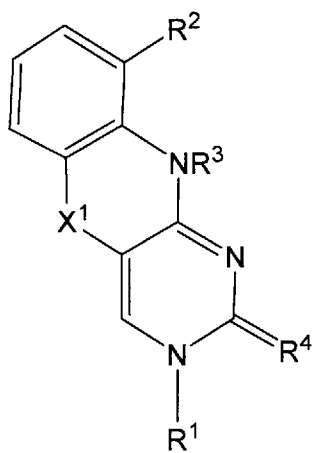
[0008] 本発明は、上記問題の解決を課題とするものであり、その目的とするところは、肝臓以外の臓器、器官または組織に対して核酸医薬を送達させることを可能にする化合物、およびそれを用いたドラッグデリバリーシステム製剤を提供することにある。

#### 課題を解決するための手段

[0009] 本発明は、以下の式(1)で表される化合物、またはその薬学的に許容し得る塩である：

[0010]

[化1]

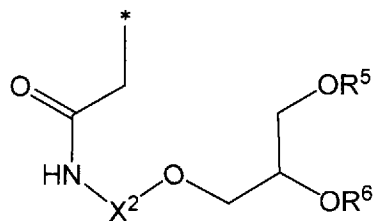


(I)

[0011] (式 (I) 中、

R<sup>1</sup>は、以下の式 (II) :

[0012] [化2]

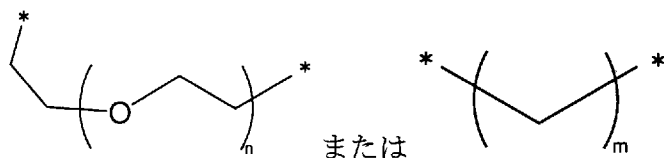


(II)

[0013] (式 (II) 中、

X<sup>2</sup>は以下の式 :

[0014] [化3]



[0015]

(ここで、 $n$ は2～4のいずれかの整数であり、  
 $m$ は2～4のいずれかの整数であり、そして  
 $*$ は結合手である) で表される基であり、

R<sup>5</sup>は水素原子、分岐または環を形成していてもよい炭素数1～7のアルキル基、あるいは核酸合成の水酸基の保護基であり、

R<sup>6</sup>は、水素原子、核酸合成の水酸基の保護基、分岐または環を形成していてもよい炭素数1から7のアルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数2から7のアルケニル基、該α群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよくそしてヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数3から10のアリール基、α群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよくそしてヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数3から12のアリール部分を有するアラルキル基、該α群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいアシル基、該α群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいシリル基、該α群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいリン酸基、核酸合成の保護基で保護されたリン酸基、 $-P(R^{14})R^{15}$  [式中、R<sup>14</sup>およびR<sup>15</sup>は、それぞれ独立して、水酸基、核酸合成の保護基で保護された水酸基、メルカプト基、核酸合成の保護基で保護されたメルカプト基、アミノ基、炭素数1から6のアルコキシ基、炭素数1から6のアルキルチオ基、炭素数1から6のシアノアルコキシ基、または炭素数1から6のアルキル基を有するジアルキルアミノ基を表す]を表し、

ここで、該α群は、水酸基、核酸合成の保護基で保護された水酸基、炭素数1から6の直鎖アルキル基、炭素数1から6の直鎖アルコキシ基、メルカプト基、核酸合成の保護基で保護されたメルカプト基、炭素数1から6の直鎖アルキルチオ基、アミノ基、炭素数1から6の直鎖アルキルアミノ基、核酸合成の保護基で保護されたアミノ基、およびハロゲン原子からなり、

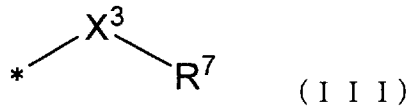
\*は結合手である)

で表される基であり、

R<sup>2</sup>は、水素原子、水酸基、ニトロ基、アミノ基、または以下の式(111) :

[0016]

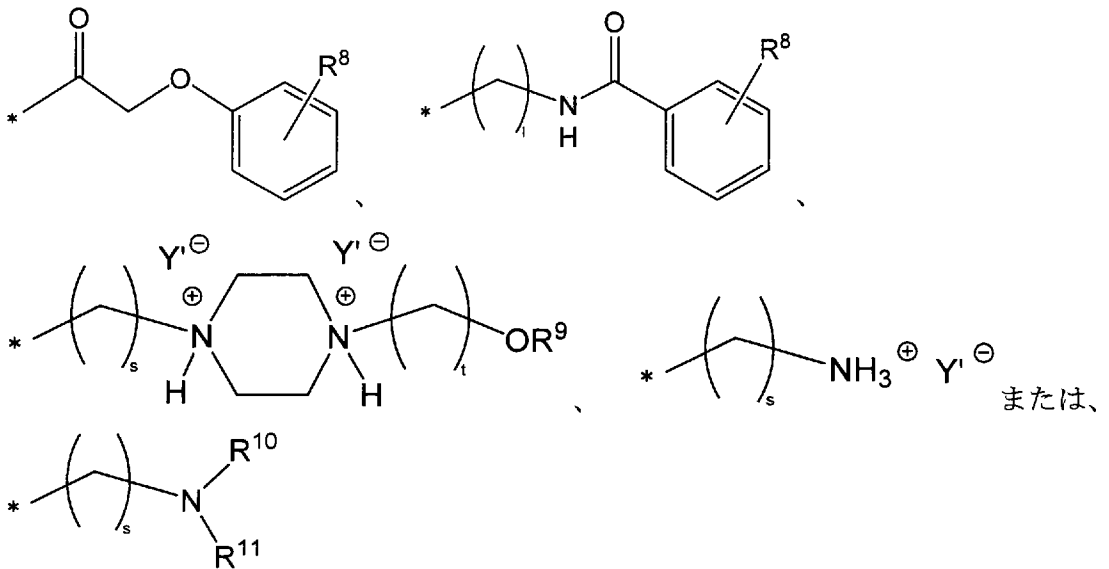
[化4]



[0017] (式 (I I I) 中、

X<sup>3</sup>は酸素原子または硫黄原子であり、R<sup>7</sup>は以下の式：

[0018] [化5]



[0019] (ここで、

R<sup>8</sup>は水素原子、水酸基、分岐または環を形成していてもよい炭素数1～7のアルキル基、あるいは分岐または環を形成していてもよい炭素数1～7のアルコキシ基であり、

R<sup>9</sup>は水素原子、あるいは分岐または環を形成していてもよい炭素数1～7のアルキル基であり、

R<sup>10</sup>およびR<sup>11</sup>はそれぞれ独立して、水素原子、分岐または環を形成していてもよい炭素数1～7のアルキル基、またはアミノ基の保護基であり、

Y'は薬学的に許容し得るアニオンであり、

s は 2 ~ 4 のいずれかの整数であり、

t は 2 ~ 4 のいずれかの整数であり、

l は 1 ~ 5 のいずれかの整数であり、

そして

\*は結合手である) で表される基である)

で表される基であり、

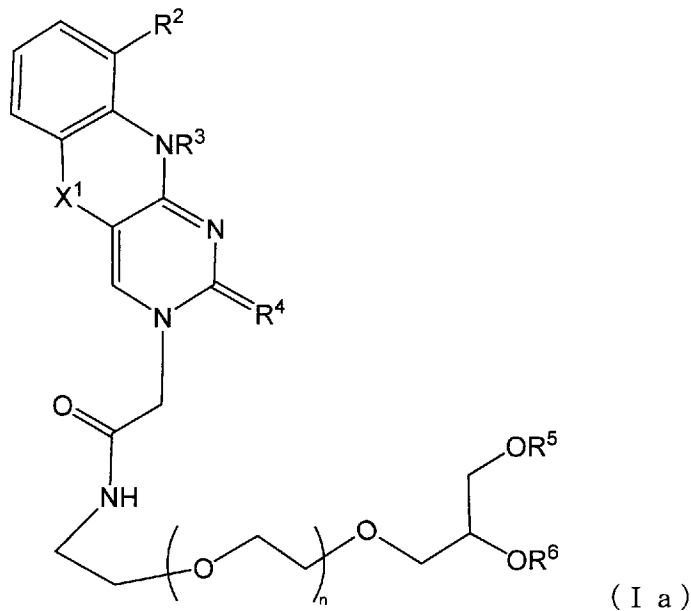
R<sup>3</sup>は水素原子、分岐または環を形成していてもよい炭素数 1 ~ 7 のアルキル基、またはアミノ基の保護基であり、

R<sup>4</sup>は酸素原子または硫黄原子であり、

X<sup>1</sup>は酸素原子または硫黄原子である)。

[0020] 1つの実施形態では、上記式 (I) は以下の式 (I a) で表される：

[0021] [化6]

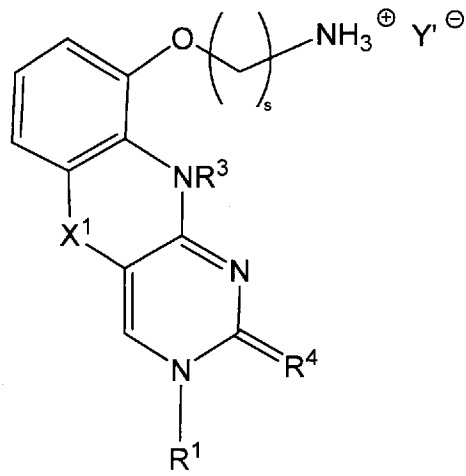


[0022] (式 (I a) 中、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>、X<sup>1</sup>、および n は上記に定義した通りである)。

[0023] 1つの実施形態では、上記式 (I) は以下の式 (I b) で表される：

[0024]

[化7]

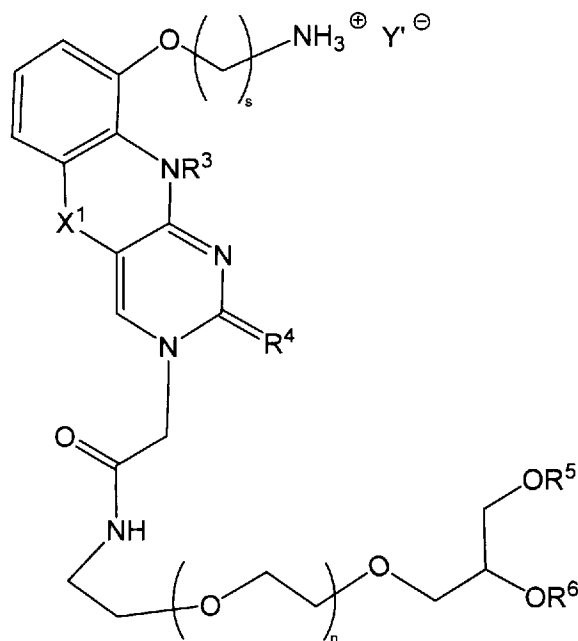


(I b)

[0025] (式 (I b) 中、 $R^1$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $X^1$ 、 $Y'$ 、および  $s$  は上記に定義した通りである)。

[0026] 1つの実施形態では、上記式 (I) は以下の式 (I c) で表される：

[0027] [化8]



(I c)

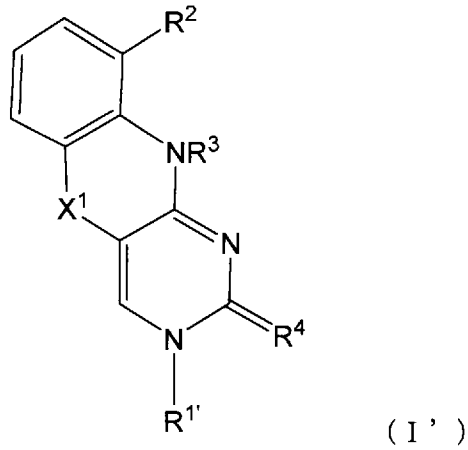
[0028] (式 (I c) 中、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $X^1$ 、 $Y'$ 、 $n$  および  $s$  は上記に定義した通りである)。

[0029] 本発明はまた、上記化合物、またはその薬学的に許容し得る塩由来のリガ

ンドを含む、ドラッグデリバリーシステム製剤である。

[0030] 本発明はまた、ドラッグデリバリーシステム製剤であって、  
以下の式 (I') :

[0031] [化9]



[0032] (式 (I') 中、

R<sup>1'</sup> は、

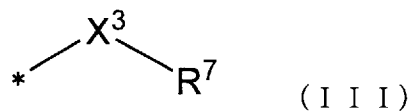
水素原子、分岐または環を形成していてもよい炭素数 1~7 のアルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数 1~7 のアルコキシ基、あるいは分岐していてもよい炭素数 1~6 のアルキルチオ基；もしくは

リボース-1-イル構造および 2-デオキシリボース-1-イル構造からなる群から選択される化学構造を含むペントース部分；

であり、

R<sup>2</sup> は、水素原子、水酸基、ニトロ基、アミノ基、または以下の式 (III) :

[0033] [化10]

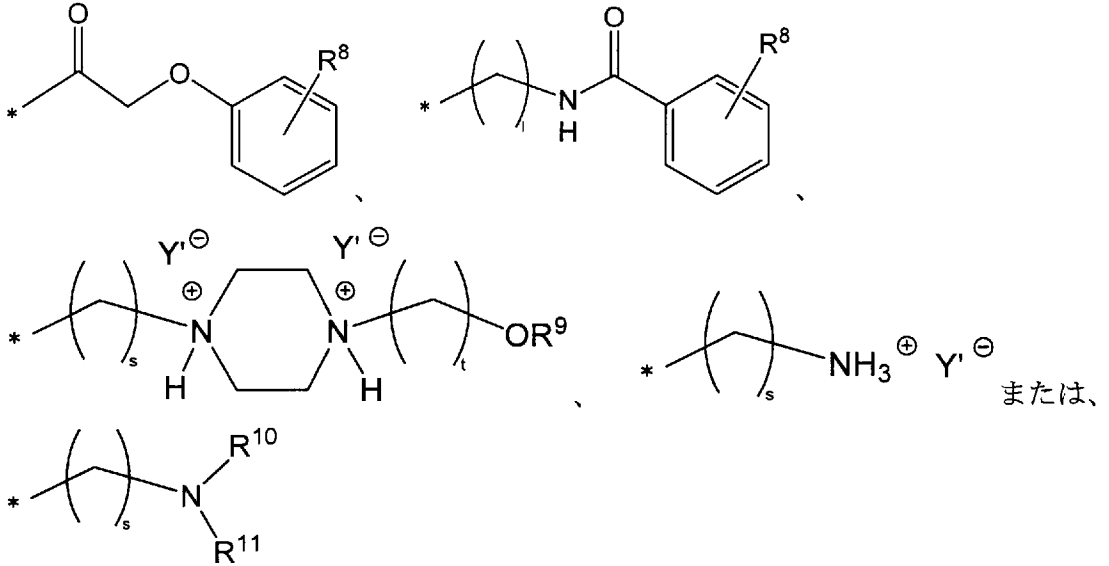


[0034] (式 (III) 中、

X<sup>3</sup>は酸素原子または硫黄原子であり、

R<sup>7</sup>は以下の式：

[0035] [化11]



[0036] (ここで、

R<sup>8</sup>は水素原子、水酸基、分岐または環を形成していてもよい炭素数1～7のアルキル基、あるいは分岐または環を形成していてもよい炭素数1～7のアルコキシ基であり、

R<sup>9</sup>は水素原子、あるいは分岐または環を形成していてもよい炭素数1～7のアルキル基であり、

R<sup>10</sup>およびR<sup>11</sup>はそれぞれ独立して、水素原子、分岐または環を形成していてもよい炭素数1～7のアルキル基、またはアミノ基の保護基であり、

Y' は薬学的に許容し得るアニオンであり、

sは2～4のいずれかの整数であり、

tは2～4のいずれかの整数であり、

lは1～5のいずれかの整数であり、そして

\*は結合手である) で表される基である)

で表される基であり、

R<sup>3</sup>は水素原子、分岐または環を形成していてもよい炭素数1～7のアルキル基、またはアミノ基の保護基であり、

R<sup>4</sup>は酸素原子または硫黄原子であり、

X<sup>1</sup>は酸素原子または硫黄原子である)

で表される化合物、またはその薬学的に許容し得る塩由来のリガンドを含む、ドラッグデリバリーシステム製剤である。

[0037] 1つの実施形態では、上記式(1')におけるR<sup>1'</sup>は上記ペントース部分である。

[0038] さらに実施形態では、上記ペントース部分は人工核酸モノマーから塩基部分が脱離した部分である。

[0039] またさらに実施形態では、上記人工核酸モノマーは2', 4'-BNA/LNAモノマーである。

[0040] 1つの実施形態では、上記リガンドは、ポリ核酸と結合したコンジュゲート体の形態で含有されている。

[0041] さらに実施形態では、上記リガンドは、上記ポリ核酸の5'末端に結合している。

[0042] さらに実施形態では、上記コンジュゲート体は、1つの上記ポリ核酸に対して1～3個の上記リガンドが結合したものである。

[0043] さらに実施形態では、上記ポリ核酸はオリゴヌクレオチドである。

[0044] またさらに実施形態では、上記オリゴヌクレオチドは、アンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA、または核酸アプタマーである。

[0045] 1つの実施形態では、本発明のドラッグデリバリーシステム製剤は、骨格筋への送達のために用いられる。

[0046] 本発明はまた、上記ドラッグデリバリーシステム製剤を含有する、医薬品である。

### 発明の効果

[0047] 本発明によれば、骨格筋などの肝臓以外の臓器、器官または組織に対する核酸医薬の送達を可能にすることができる。また、本発明のドラッグデリバ

リーシステム製剤は生体に対して安全であり、煩雑な製造工程を要することなく効率良く製造することができる。

### 図面の簡単な説明

[0048] [図1]実施例2で作製したG-クランプリンカー部分1個を5'末端に導入したオリゴ核酸(ODN 1X)の一本鎖の蛍光スペクトル、および当該オリゴ核酸と相補鎖DNAとの二本鎖の蛍光スペクトルを示すグラフである。

[図2]実施例2で作製したG-クランプリンカー部分3個を5'末端に導入したオリゴ核酸(ODN 2X)の一本鎖の蛍光スペクトル、および当該オリゴ核酸と相補鎖DNAとの二重鎖の蛍光スペクトルを示すグラフである。

[図3]実施例2で作製したG-クランプリンカー部分1個を5'末端に導入したオリゴ核酸(ODN 1X)の一本鎖の蛍光スペクトル、および当該オリゴ核酸と相補鎖RNAとの二重鎖の蛍光スペクトルを示すグラフである。

[図4]実施例2で作製したG-クランプリンカー部分3個を5'末端に導入したオリゴ核酸(ODN 2X)の一本鎖の蛍光スペクトル、および当該オリゴ核酸と相補鎖RNAとの二本鎖の蛍光スペクトルを示すグラフである。

[図5]実施例4で作製した核酸をマウスに投与した後の当該マウスの骨格筋におけるmMALAT1 RNA発現量を示すグラフである。図中のデータは、平均値±標準偏差で示す(n=5)。図5中、\*P<0.05, \*\*P<0.01であり、対照群(saline)に対する有意差を示す。図5中、P値を伴う水平線は、群間の有意差を示す。図5cは、図5aと図5bの結果を統合した図である。

### 発明を実施するための形態

[0049] (用語の定義)

本明細書において使用される用語は、特に言及する場合を除いて当該分野で通常用いられる意味で用いられる。

[0050] まず、本明細書中で用いられる代表的な用語を定義する。

[0051] 本明細書において、用語「炭素数1からnのアルキル基」は、炭素数1~nの任意の直鎖、分岐鎖または環状のアルキル基をいう。例えば、炭素数n

が9である場合、炭素数1からnのアルキル基としては、メチル基、エチル基、n-プロピル基、イソプロピル基、n-ブチル基、s-ブチル基、t-ブチル基、n-ペンチル基、イソペンチル基、ネオペンチル基、t-ペンチル基、n-ヘキシル基、イソヘキシル基、n-ヘプチル基、n-オクチル基、n-ノニル基などが挙げられる。また、例えば、「分岐していてもよい炭素数1から9のアルキル基」という場合は、炭素数1~9の直鎖または分岐鎖のアルキル基をいう。用語「分岐していてもよい炭素数1から3のアルキル基」という場合は、炭素数1~3の任意の直鎖または分岐鎖のアルキル基をいう。さらに、用語「炭素数1から6の直鎖アルキル基」は、炭素数1~6の任意の直鎖アルキル基をいう。またさらに、用語「分岐または環を形成していてもよい炭素数1から7のアルキル基」という場合は、炭素数1~7の任意の直鎖状、分岐鎖状または環状のアルキル基をいう。

[0052] 本明細書において、用語「炭素数1からnのアルコキシ基」は、炭素数1~nの任意の直鎖、分岐鎖または環状のアルコキシ基をいう。例えば、炭素数nが7である場合、炭素数1~nのアルコキシ基としては、メトキシ基、エトキシ基、n-プロポキシ基、イソプロポキシ基、n-ブトキシ基、s-ブトキシ基、t-ブトキシ基、n-ペントキシ基、イソペントキシ基、ネオペントキシ基、n-ヘキトキシ基、イソヘキトキシ基、t-ヘキトキシ基、ネオヘキトキシ基、シクロヘキトキシ基、n-ヘプトキシ基、イソヘプトキシ基、ネオヘプトキシ基、t-ヘプトキシ基、などが挙げられる。また、例えば、「分岐していてもよい炭素数1から3のアルコキシ基」という場合は、炭素数1~3の直鎖または分岐鎖のアルコキシ基をいう。また、用語「炭素数1から6の直鎖アルコキシ基」は、炭素数1~6の任意の直鎖アルキル基を有するアルコキシ基を包含する。一方、用語「炭素数1から6のアルコキシ基」という場合は、炭素数1~6の任意の直鎖、分岐鎖または環状のアルコキシ基をいう。またさらに、用語「分岐または環を形成していてもよい炭素数1から7のアルコキシ基」という場合は、炭素数1~7の任意の直鎖状、分岐鎖状または環状のアルコキシ基をいう。

- [0053] 用語「炭素数1から6の直鎖アルコキシ基で置換されていてもよい炭素数1から6の直鎖アルコキシ基」という場合は、上記「炭素数1から6の直鎖アルコキシ基」、ならびに「炭素数1から6の直鎖アルコキシ基」を構成する1つまたはそれ以上の水素原子が、同一または異なってもよい他の「炭素数1から6の直鎖アルコキシ基」で置換されたアルコキシ基をいう。このような「炭素数1から6の直鎖アルコキシ基で置換されていてもよい炭素数1から6の直鎖アルコキシ基」としては、例えばメトキシ基、エトキシ基、*n*-プロポキシ基、メトキシメトキシ基、エトキシメトキシ基、*n*-プロポキシメトキシ基、メトキシエトキシ基（例えば2-メトキシエトキシ基）、エトキシエトキシ基（例えば2-エトキシエトキシ基）、および*n*-プロポキシエトキシ基が挙げられる。
- [0054] 本明細書において、用語「炭素数1から6のシアノアルコキシ基」は、炭素数1～6の任意の直鎖、分岐鎖または環状のアルコキシ基における少なくとも1つの水素原子がシアノ基で置換された基をいう。
- [0055] 本明細書において、用語「炭素数1から6の直鎖アルキルチオ基」は、炭素数1～6の任意の直鎖アルキル基を有するアルキルチオ基を包含する。例えば、メチルチオ基、エチルチオ基、*n*-プロピルチオ基などが挙げられる。一方、用語「炭素数1から6のアルキルチオ基」という場合は、炭素数1～6の任意の直鎖、分岐鎖または環状のアルキルチオ基をいう。
- [0056] 本明細書において、用語「炭素数1から6の直鎖アルキルアミノ基」は、炭素数1～6の任意の直鎖アルキル基を1つまたは2つ有するアミノ基を包含する。例えば、メチルアミノ基、ジメチルアミノ基、エチルアミノ基、メチルエチルアミノ基、ジエチルアミノ基などが挙げられる。一方、用語「炭素数1から6のアルキル基を有するジアルキルアミノ基」は、炭素数1～6の任意のアルキル基を2つ有するアミノ基を包含する。
- [0057] 本明細書において、用語「分岐または環を形成していてもよい炭素数2から7のアルケニル基」は、炭素数2～7の任意の直鎖アルケニル基、炭素数3～7の任意の分岐鎖アルケニル基、および炭素数3～7の任意の環状アル

ケニル基を包含する。単に、「低級アルケニル基」という場合もある。例えば、炭素数2～7の任意の直鎖アルケニル基としては、エテニル基、1-プロペニル基、2-プロペニル基、1-ブテニル基、2-ブテニル基、1-ペンテニル基、2-ペンテニル基、3-ペンテニル基、4-ペンテニル基、1-ヘキセニル基などが挙げられ、炭素数3～7の任意の分岐鎖アルケニル基としては、イソプロペニル基、1-メチル-1-プロペニル基、1-メチル-2-プロペニル基、2-メチル-1-プロペニル基、2-メチル-2-プロペニル基、1-メチル-2-ブテニル基などが挙げられ、そして炭素数3～7の任意の環状アルケニル基としては、シクロブテニル基、シクロペンテニル基、シクロヘキセニル基などが挙げられる。

[0058] 本明細書において、用語「炭素数 $n_1$ ～ $n_2$ のアリール基」は、炭素数 $n_1$ ～ $n_2$ の（ここで、 $n_1$ および $n_2$ は整数であり、 $n_1 < n_2$ である）の任意のアリール基を包含する。例えば「炭素数6から20のアリール基」には、フェニル基、ナフチル基などが包含される。

[0059] 本明細書において、用語「炭素数 $n_1$ ～ $n_2$ のヘテロアリール基」は、1個以上のヘテロ原子を含む炭素数 $n_1$ ～ $n_2$ の（ここで、 $n_1$ および $n_2$ は整数であり、 $n_1 < n_2$ である）の任意のヘテロアリール基を包含する。ヘテロアリール基を構成するヘテロ原子の例としては、酸素原子、窒素原子、硫黄原子などが挙げられる。例えば、「炭素数4から20のヘテロアリール基」は、このようなヘテロ原子を1つまたはそれ以上含む炭素数4～20のヘテロアリール基を包含する。

[0060] 本明細書において、用語「ヘテロ原子を含んでもよい炭素数3から10のアリール基」は、炭化水素のみで構成された、炭素数6～10の任意のアリール基と、当アリール基の環構造を構成する少なくとも1つの炭素原子がヘテロ原子（例えば、窒素原子、酸素原子、および硫黄原子、ならびにこれらの組合せ）で置換された、炭素数3～12の任意のヘテロアリール基とを包含する。当該炭素数6～10のアリール基としては、フェニル基、ナフチル基、インデニル基、アズレニル基などが挙げられ、そして当該炭素数3

～12の任意のヘテロアリアル基としては、ピリジル基、ピロリル基、キノリル基、インドリル基、イミダゾリル基、フリル基、チエニル基などが挙げられる。

[0061] 本明細書において、用語「ヘテロ原子を含んでもよい炭素数3から12のアリアル部分を有するアラルキル基」の例としては、ベンジル基、フェネチル基、ナフチルメチル基、3-フェニルプロピル基、2-フェニルプロピル基、4-フェニルブチル基、2-フェニルブチル基、ピリジルメチル基、インドリルメチル基、フリルメチル基、チエニルメチル基、ピロリルメチル基、2-ピリジリエチル基、1-ピリジリエチル基、3-チエニルプロピル基などが挙げられる。

[0062] 本明細書において、用語「アシル基」の例としては、脂肪族アシル基および芳香族アシル基が挙げられる。具体的には、脂肪族アシル基の例としては、ホルミル基、アセチル基、プロピオニル基、ブチリル基、イソブチリル基、ペンタノイル基、ピバロイル基、バレリル基、イソバレリル基、オクタノイル基、ノナノイル基、デカノイル基、3-メチルノナノイル基、8-メチルノナノイル基、3-エチルオクタノイル基、3,7-ジメチルオクタノイル基、ウンデカノイル基、ドデカノイル基、トリデカノイル基、テトラデカノイル基、ペンタデカノイル基、ヘキサデカノイル基、1-メチルペンタデカノイル基、14-メチルペンタデカノイル基、13,13-ジメチルテトラデカノイル基、ヘプタデカノイル基、15-メチルヘキサデカノイル基、オクタデカノイル基、1-メチルヘプタデカノイル基、ノナデカノイル基、アイコサノイル基およびヘナイコサノイル基のようなアルキルカルボニル基；スクシノイル基、グルタロイル基、アジポイル基のようなカルボキシ化アルキルカルボニル基；クロロアセチル基、ジクロロアセチル基、トリクロロアセチル基、トリフルオロアセチル基のようなハロゲン低級アルキルカルボニル基；メトキシアセチル基のような低級アルコキシ低級アルキルカルボニル基；(E)-2-メチル-2-ブテノイル基のような不飽和アルキルカルボニル基が挙げられる。また、芳香族アシル基の例としては、ベンゾイル基

、 $\alpha$ -ナフトイル基、 $\beta$ -ナフトイル基のようなアリーールカルボニル基；2-ブromoベンゾイル基、4-クロロベンゾイル基のようなハロゲンアリーールカルボニル基；2, 4, 6-トリメチルベンゾイル基、4-トルオイル基のような低級アルキル化アリーールカルボニル基；4-アニソイル基のような低級アルコキシ化アリーールカルボニル基；2-カルボキシベンゾイル基、3-カルボキシベンゾイル基、4-カルボキシベンゾイル基のようなカルボキシ化アリーールカルボニル基；4-ニトロベンゾイル基、2-ニトロベンゾイル基のようなニトロ化アリーールカルボニル基；2-(メトキシカルボニル)ベンゾイル基のような低級アルコキシカルボニル化アリーールカルボニル基；4-フェニルベンゾイル基のようなアリーール化アリーールカルボニル基などが挙げられる。好適には、ホルミル基、アセチル基、プロピオニル基、ブチリル基、イソブチリル基、ペンタノイル基、ピバロイル基、ベンゾイル基である。

[0063] 本明細書において、用語「シリル基」の例としては、トリメチルシリル基、トリエチルシリル基、イソプロピルジメチルシリル基、*t*-ブチルジメチルシリル基、メチルジイソプロピルシリル基、メチルジ-*t*-ブチルシリル基、トリエチルシリル基のようなトリ低級アルキルシリル基；ジフェニルメチルシリル基、ブチルジフェニルシリル基、ジフェニルイソプロピルシリル基、フェニルジイソプロピルシリル基のような1~2個のアリーール基で置換されたトリ低級アルキルシリル基などが挙げられる。好適には、トリメチルシリル基、トリエチルシリル基、トリエチルシリル基、*t*-ブチルジメチルシリル基、*t*-ブチルジフェニルシリル基であり、さらに好適にはトリメチルシリル基である。

[0064] 本明細書において、用語「ハロゲン原子」としては、例えば、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、またはヨウ素原子が挙げられる。好適には、フッ素原子または塩素原子である。

[0065] 本明細書において、用語「核酸合成のアミノ基の保護基」、「核酸合成の水酸基の保護基」、「核酸合成の保護基で保護された水酸基」、「核酸合成

の保護基で保護されたリン酸基」、「核酸合成の保護基で保護されたメルカプト基」の「保護基」とは、核酸合成の際に安定してアミノ基、水酸基、リン酸基またはメルカプト基を保護し得るものであれば、特に制限されない。具体的には、酸性または中性条件で安定であり、加水素分解、加水分解、電気分解、および光分解のような化学的方法により開裂し得る保護基のことをいう。このような保護基としては、例えば、低級アルキル基、低級アルケニル基、アシル基、テトラヒドロピラニルまたはテトラヒドロチオピラニル基、テトラヒドロフラニルまたはテトラヒドロチオフラニル基、シリル基、低級アルコキシメチル基、低級アルコキシ化低級アルコキシメチル基、ハロゲン低級アルコキシメチル基、低級アルコキシ化エチル基、ハロゲン化エチル基、1～3個のアリール基で置換されたメチル基、「低級アルキル基、低級アルコキシ基、ハロゲン原子またはシアノ基でアリール環が置換された1～3個のアリール基で置換されたメチル基」、低級アルコキシカルボニル基、「ハロゲン原子、低級アルコキシ基またはニトロ基で置換されたアリール基」、「ハロゲン原子またはトリ低級アルキルシリル基で置換された低級アルコキシカルボニル基」、アルケニルオキシカルボニル基、「低級アルコキシまたはニトロ基でアリール環が置換されていてもよいアラルキルオキシカルボニル基」などが挙げられる。

[0066] より具体的には、テトラヒドロピラニル基またはテトラヒドロチオピラニル基としては、テトラヒドロピラン-2-イル基、3-ブロモテトラヒドロピラン-2-イル基、4-メトキシテトラヒドロピラン-4-イル基、テトラヒドロチオピラン-4-イル基、4-メトキシテトラヒドロチオピラン-4-イル基などが挙げられる。テトラヒドロフラニル基またはテトラヒドロチオフラニル基としては、テトラヒドロフラン-2-イル基、テトラヒドロチオフラン-2-イル基が挙げられる。低級アルコキシメチル基としては、メトキシメチル基、1,1-ジメチル-1-メトキシメチル基、エトキシメチル基、プロポキシメチル基、イソプロポキシメチル基、ブトキシメチル基、*t*-ブトキシメチル基などが挙げられる。低級アルコキシ化低級アルコキ

シメチル基としては、2-メトキシエトキシメチル基などが挙げられる。ハロゲン低級アルコキシメチル基としては、2, 2, 2-トリクロロエトキシメチル基、ビス(2-クロロエトキシ)メチル基などが挙げられる。低級アルコキシ化エチル基としては、1-エトキシエチル基、1-(イソプロポキシ)エチル基などが挙げられる。ハロゲン化エチル基としては、2, 2, 2-トリクロロエチル基などが挙げられる。1~3個のアリール基で置換されたメチル基としては、ベンジル基、 $\alpha$ -ナフチルメチル基、 $\beta$ -ナフチルメチル基、ジフェニルメチル基、トリフェニルメチル基、 $\alpha$ -ナフチルジフェニルメチル基、9-アンズリルメチル基などが挙げられる。「低級アルキル基、低級アルコキシ基、ハロゲン原子またはシアノ基でアリール環が置換された1~3個のアリール基で置換されたメチル基」としては、4-メチルベンジル基、2, 4, 6-トリメチルベンジル基、3, 4, 5-トリメチルベンジル基、4-メトキシベンジル基、4-メトキシフェニルジフェニルメチル基、4, 4'-ジメトキシトリフェニルメチル基、2-ニトロベンジル基、4-ニトロベンジル基、4-クロロベンジル基、4-ブロモベンジル基、4-シアノベンジル基などが挙げられる。低級アルコキシカルボニル基としては、メトキシカルボニル基、エトキシカルボニル基、*t*-ブトキシカルボニル基、イソブトキシカルボニル基などが挙げられる。「ハロゲン原子、低級アルコキシ基またはニトロ基で置換されたアリール基」としては、4-クロロフェニル基、2-フロロフェニル基、4-メトキシフェニル基、4-ニトロフェニル基、2, 4-ジニトロフェニル基などが挙げられる。「ハロゲン原子またはトリ低級アルキルシリル基で置換された低級アルコキシカルボニル基」としては、2, 2, 2-トリクロロエトキシカルボニル基、2-トリメチルシリルエトキシカルボニル基などが挙げられる。アルケニルオキシカルボニル基としては、ビニルオキシカルボニル基、アリールオキシカルボニル基などが挙げられる。「低級アルコキシまたはニトロ基でアリール環が置換されていてもよいアラルキルオキシカルボニル基」としては、ベンジルオキシカルボニル基、4-メトキシベンジルオキシカルボニル基、3, 4-

ジメトキシベンジルオキシカルボニル基、2-ニトロベンジルオキシカルボニル基、4-ニトロベンジルオキシカルボニル基などが挙げられる。

[0067] 1つの実施形態では、「核酸合成の水酸基の保護基」としては、例えば脂肪族アシル基、芳香族アシル基、1～3個のアリール基で置換されたメチル基、「低級アルキル、低級アルコキシ、ハロゲン、シアノ基でアリール環が置換された1～3個のアリール基で置換されたメチル基」、およびシリル基が挙げられる。あるいは、1つの実施形態では、「核酸合成の水酸基の保護基」としては、例えばアセチル基、ベンゾイル基、ベンジル基、p-メトキシベンゾイル基、ジメトキシトリチル基、モノメトキシトリチル基、tert-ブチルジフェニルシリル基、tert-ブチルジメチルシリル (TBDMMS) 基、[(トリイソプロピルシリル) オキシ] メチル (TOM) 基、[(2-ニトロベンジル) オキシ] メチル (NBOM) 基、ビス(アセトキシエトキシ) メチルエーテル (ACE) 基、テトラヒドロ-4-メトキシ-2H-ピラン-2-イル (Mthp) 基、1-(2-シアノエトキシ) エチル (CEE) 基、2-シアノエトキシメチル (CEM) 基、tert-ブチルジチオメチル (DTM) 基、2-(4-トリルスルホニル) エトキシメチル (TEM) 基、および4-(N-ジクロロアセチル-N-メチルアミノ) ベンジルオキシメチル (4-MABOM) 基が挙げられる。

[0068] 1つの実施形態では、「核酸合成の保護基で保護された水酸基」の保護基としては、例えば脂肪族アシル基、芳香族アシル基、「1～3個のアリール基で置換されたメチル基」、「ハロゲン原子、低級アルコキシ基またはニトロ基で置換されたアリール基」、低級アルキル基、および低級アルケニル基が挙げられる。あるいは、1つの実施形態では、「核酸合成の保護基で保護された水酸基」の保護基としては、例えばベンゾイル基、ベンジル基、2-クロロフェニル基、4-クロロフェニル基、および2-プロペニル基が挙げられる。

[0069] 1つの実施形態では、「核酸合成のアミノ基の保護基」としては、例えばアシル基、好適には、ベンゾイル基が挙げられる。

- [0070] 1つの実施形態では、「核酸合成の保護基で保護されたリン酸基」の「保護基」としては、例えば低級アルキル基、シアノ基で置換された低級アルキル基、アラルキル基、「ニトロ基またはハロゲン原子でアリアル環が置換されたアラルキル基」、および「低級アルキル基、ハロゲン原子、またはニトロ基で置換されたアリアル基」が挙げられる。あるいは、1つの実施形態では、「核酸合成の保護基で保護されたリン酸基」の「保護基」としては、例えば2-シアノエチル基、2, 2, 2-トリクロロエチル基、ベンジル基、2-クロロフェニル基、および4-クロロフェニル基が挙げられる。
- [0071] 1つの実施形態では、「核酸合成の保護基で保護されたメルカプト基」の「保護基」としては、例えば脂肪族アシル基および芳香族アシル基、好適には、ベンゾイル基が挙げられる。
- [0072] 本明細書において、用語「その薬学的に許容し得る塩」とは、特定の化合物に対する塩であって、薬学的用途に使用する際に当該用途の目的を全体的にまたは部分的に阻害するおそれのない塩を意味する。そのような塩としては、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、リチウム塩のようなアルカリ金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩のようなアルカリ土類金属塩、アルミニウム塩、鉄塩、亜鉛塩、銅塩、ニッケル塩、コバルト塩などの金属塩；アンモニウム塩のような無機塩、*t*-オクチルアミン塩、ジベンジルアミン塩、モルホリン塩、グルコサミン塩、フェニルグリシンアルキルエステル塩、エチレンジアミン塩、*N*-メチルグルカミン塩、グアニジン塩、ジエチルアミン塩、トリエチルアミン塩、ジシクロヘキシルアミン塩、*N*, *N*'-ジベンジルエチレンジアミン塩、クロロプロカイン塩、プロカイン塩、ジエタノールアミン塩、*N*-ベンジルーフェネチルアミン塩、ピペラジン塩、テトラメチルアンモニウム塩、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン塩のような有機塩等のアミン塩；フッ化水素酸塩、塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩のようなハロゲン原子化水素酸塩、硝酸塩、過塩素酸塩、硫酸塩、リン酸塩等の無機酸塩；メタンスルホン酸塩、トリフルオロメタンスルホン酸塩、エタンスルホン酸塩のような低級アルカンスルホン酸塩、ベンゼンスルホ

ン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩のようなアリールスルホン酸塩、酢酸塩、リンゴ酸塩、フマル酸塩、コハク酸塩、クエン酸塩、酒石酸塩、シュウ酸塩、マレイン酸塩等の有機酸塩；および、グリシン塩、リジン塩、アルギニン塩、オルニチン塩、グルタミン酸塩、アスパラギン酸塩のようなアミノ酸塩が挙げられる。

[0073] 本明細書において、用語「薬学的に許容し得るカチオン」とは、本発明の化合物を例えば薬学的用途に使用する際に当該用途の目的を全体的にまたは部分的に阻害するおそれのないカチオンを意味し、例えば、水素イオン、ナトリウムイオン、カリウムイオン、アンモニウムイオンなどを包含する。

[0074] 本明細書において、用語「薬学的に許容し得るアニオン」とは、本発明の化合物を例えば薬学的用途に使用する際に当該用途の目的を全体的にまたは部分的に阻害するおそれのないアニオンを意味し、例えば、塩化物イオン、臭化物イオン、水酸化物イオン、酢酸イオン、炭酸イオン、リン酸イオンなどを包含する。

[0075] 本明細書において、用語「核酸」は、リボ核酸（RNA）とデオキシリボ核酸（DNA）の総称であり、塩基、糖およびリン酸からなるヌクレオチドがホスホジエステル結合で連なった生体高分子をいう。糖の部分がリボースであるものがRNA、リボースの2'位の水酸基が水素基に置換された2-デオキシリボースであるものがDNAである。糖の5'位が隣の糖の3'位とホスホジエステル結合し、この結合が繰り返されて鎖状を形成している。

[0076] 「ヌクレオシド」は、プリンまたはピリミジン塩基と糖とが結合した「ヌクレオシド」、ならびにプリンおよびピリミジン以外の芳香族複素環および芳香族炭化水素環でプリンまたはピリミジン塩基との代用が可能なものと糖が結合した「ヌクレオシド」を含む。天然型のヌクレオシドを「天然ヌクレオシド」ともいう。修飾された非天然型のヌクレオシドを「修飾ヌクレオシド」ともいい、特に糖部分が修飾されたヌクレオチドを「糖修飾ヌクレオシド」という。「ヌクレオチド」とは、ヌクレオシドの糖にリン酸基が結合した化合物を意味する。「ヌクレオシド」「ヌクレオチド」には、それぞれD

NAのものおよびRNAのものが挙げられる。

[0077] 本明細書において、用語「オリゴヌクレオチド」とは、同一または異なる「ヌクレオシド」がリン酸ジエステル結合または他の結合で、例えば5個～70個、好ましくは10個～40個、より好ましくは12個～30個結合した「ヌクレオチド」のポリマーであり、天然型のものと非天然型のものを含む。非天然型の「オリゴヌクレオチド」としては、好適には、糖部分が修飾された糖誘導体；リン酸ジエステル部分がチオエート化されたチオエート誘導体；末端のリン酸部分がエステル化されたエステル体；プリン塩基上のアミノ基がアミド化されたアミド体が挙げられ、さらに好適には、糖部分が修飾された糖誘導体が挙げられる。「オリゴヌクレオチド」は、天然ヌクレオシドまたは修飾ヌクレオシドからなるものであってもよく、あるいは天然ヌクレオシドと修飾ヌクレオシドとの混合であってもよい。

[0078] オリゴヌクレオチドにおける糖と糖の間の結合（ヌクレオシド間結合）は、天然の核酸が有する結合であるホスホジエステル（D-オリゴ）でもよく、人工的に修飾がなされた結合（例えば、ホスホロチオエート（S-オリゴ）、メチルホスホネート（M-オリゴ）、ボラノホスホネート等）であってもよい。当該分野で公知の結合であれば、いずれも利用可能である。S-オリゴ（ホスホロチオエート）は、ヌクレオシド間のホスホジエステル結合のリン酸基部の酸素原子が硫黄原子で置換されたPS骨格を有する。この修飾は公知の方法にしたがって、オリゴヌクレオチドに取り込まれる。この修飾をオリゴヌクレオチド中に1もしくは複数もつアンチセンスオリゴヌクレオチド（ASO）をS-オリゴ型（ホスホロチオエート型）ともいう。オリゴヌクレオチド中、全て同じ結合でもよいし、異なる結合を含んでいてもよい。好ましくは、本発明におけるオリゴヌクレオチドは、D-オリゴおよび／またはS-オリゴを含む。

[0079] 当該分野で公知のヌクレオチドの修飾もまた利用可能である。ヌクレオチドの修飾としては、糖修飾、核酸塩基修飾が知られている。このような核酸修飾は、当該分野で公知の方法に基づいて行うことができる。

[0080] 核酸塩基修飾としては、例えば、5-メチルシトシン、5-ヒドロキシメチルシトシン、5-プロピニルシトシン等が挙げられる。

[0081] 糖修飾としては、例えば、糖の2' 部位の置換および糖の4' 位と2' 位との間の架橋構造が挙げられる。糖の2' 部位の置換としては、例えば、2'-F、2'-OCH<sub>3</sub> (2'-OMe)、2'-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub> (2'-MOE) 等が挙げられる。

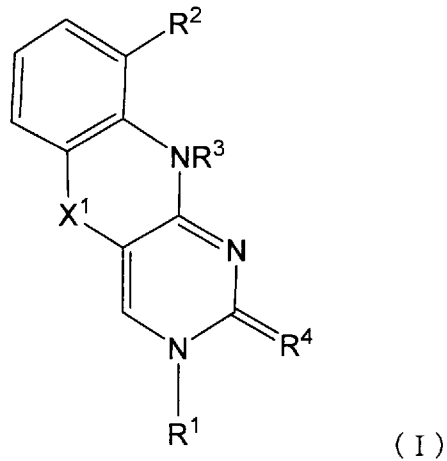
[0082] 核酸の「改変」とは、塩基の置換、欠失または挿入、あるいは塩基以外の化学構造の変更（例えば、上述したような修飾）などの核酸の任意の変更を指す。本明細書では、このような改変を少なくとも1つ含む物質を「改変体」と呼ぶことがある。

[0083] (化合物およびその薬学的に許容し得る塩)

本発明の化合物およびその薬学的に許容し得る塩は、例えば、フェノチアジン構造またはフェノチアジンに類似する構造を有する。

[0084] 本発明の化合物は、以下の式(1)で表される：

[0085] [化12]

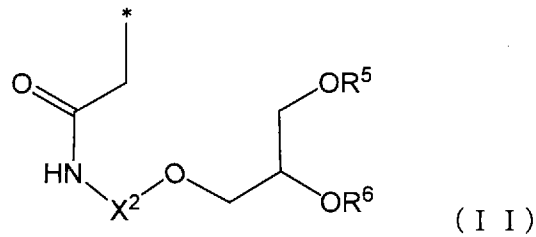


[0086] (式(1)中、

R<sup>1</sup>は、以下の式(11)：

[0087]

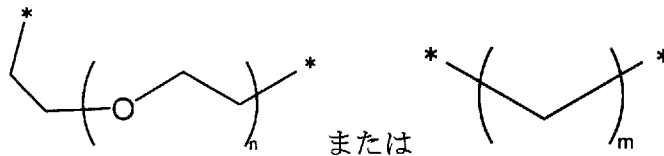
[化13]



[0088] (式 ( I I ) 中、

X<sup>2</sup>は以下の式：

[0089] [化14]



[0090] (ここで、nは2～4 (具体的には2、3または4) のいずれかの整数であり、

mは2～4 (具体的には2、3または4) のいずれかの整数であり、そして

\*は結合手である) で表される基であり、

R<sup>5</sup>は水素原子、分岐または環を形成していてもよい炭素数1～7のアルキル基、あるいは核酸合成の水酸基の保護基であり、R<sup>6</sup>は、水素原子、核酸合成の水酸基の保護基、分岐または環を形成していてもよい炭素数1から7のアルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数2から7のアルケニル基、該α群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよくそしてヘテロ原子を含んでもよい炭素数3から10のアリール基、α群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよくそしてヘテロ原子を含んでもよい炭素数3から12のアリール部分を有するアラルキル基、該α群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいアシル基、該α群から選択される任意の置換基を1以上有していて

もよいシリル基、該 $\alpha$ 群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいリン酸基、核酸合成の保護基で保護されたリン酸基、 $-P(R^{14})R^{15}$  [式中、 $R^{14}$ および $R^{15}$ は、それぞれ独立して、水酸基、核酸合成の保護基で保護された水酸基、メルカプト基、核酸合成の保護基で保護されたメルカプト基、アミノ基、炭素数1から6のアルコキシ基、炭素数1から6のアルキルチオ基、炭素数1から6のシアノアルコキシ基、または炭素数1から6のアルキル基を有するジアルキルアミノ基を表す]を表し、

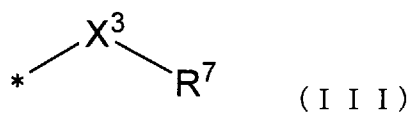
ここで、該 $\alpha$ 群は、水酸基、核酸合成の保護基で保護された水酸基、炭素数1から6の直鎖アルキル基、炭素数1から6の直鎖アルコキシ基、メルカプト基、核酸合成の保護基で保護されたメルカプト基、炭素数1から6の直鎖アルキルチオ基、アミノ基、炭素数1から6の直鎖アルキルアミノ基、核酸合成の保護基で保護されたアミノ基、およびハロゲン原子からなり、

\*は結合手である)

で表される基であり、

$R^2$ は、水素原子、水酸基、ニトロ基、アミノ基、または以下の式(III) :

[0091] [化15]



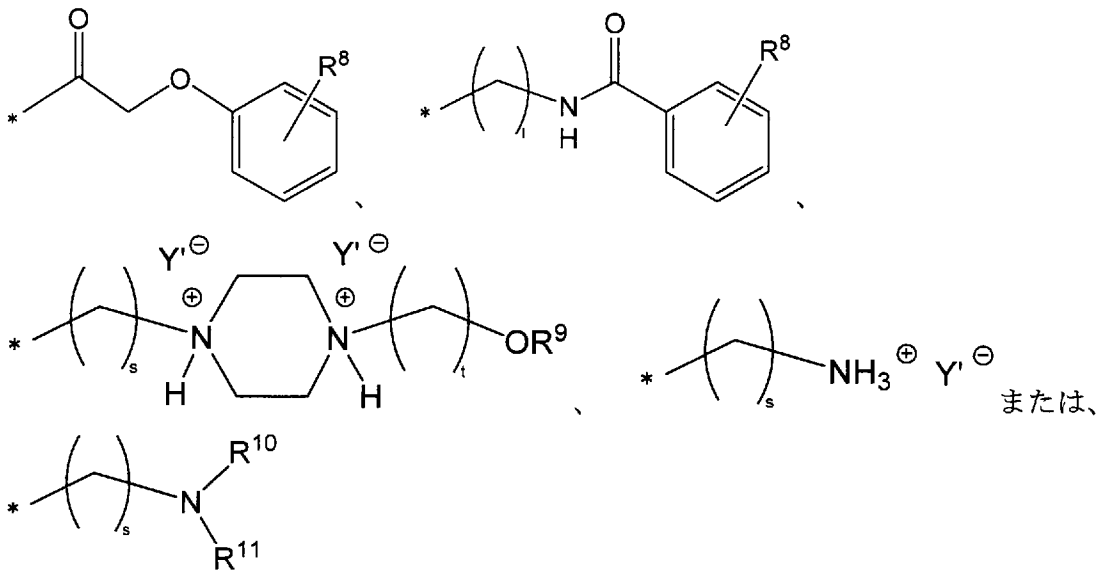
[0092] (式(III)中、

$X^3$ は酸素原子または硫黄原子であり、

$R^7$ は以下の式 :

[0093]

[化16]



[0094] (ここで、

$R^8$ は水素原子、水酸基、分岐または環を形成していてもよい炭素数1～7のアルキル基、あるいは分岐または環を形成していてもよい炭素数1～7のアルコキシ基であり、

$R^9$ は水素原子、あるいは分岐または環を形成していてもよい炭素数1～7のアルキル基であり、

$R^{10}$ および $R^{11}$ はそれぞれ独立して、水素原子、分岐または環を形成していてもよい炭素数1～7のアルキル基、またはアミノ基の保護基であり、

$Y'$ は薬学的に許容し得るアニオンであり、

$s$ は2～4（具体的には2、3または4）のいずれかの整数であり、

$t$ は2～4（具体的には2、3または4）のいずれかの整数であり、

$l$ は1～5（具体的には1、2、3、4または5）のいずれかの整数であり、

そして

\*は結合手である)で表される基である)

で表される基であり、

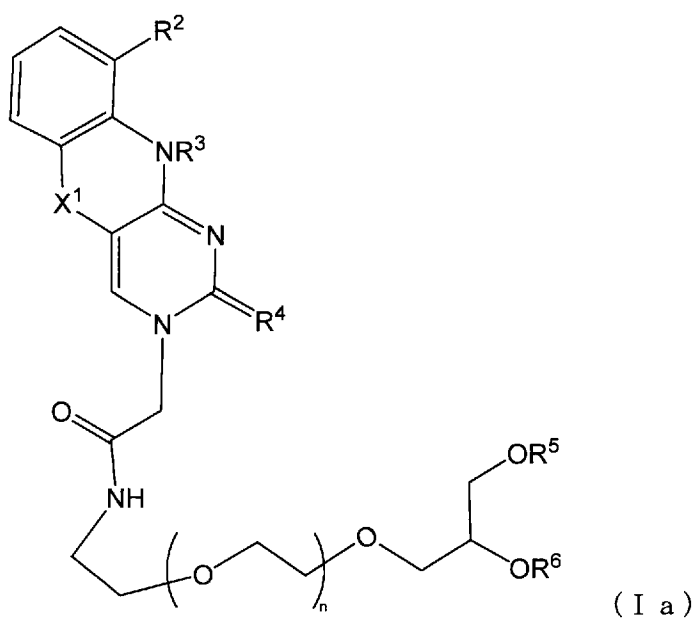
R<sup>3</sup>は水素原子、分岐または環を形成していてもよい炭素数1～7のアルキル基、またはアミノ基の保護基であり、

R<sup>4</sup>は酸素原子または硫黄原子であり、

X<sup>1</sup>は酸素原子または硫黄原子である)。

[0095] 1つの実施形態では、本発明は以下の式(1a)で表される化合物およびその薬学的に許容し得る塩である：

[0096] [化17]

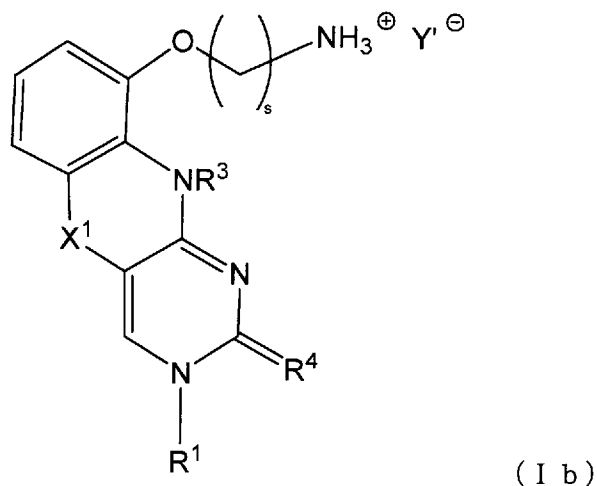


[0097] (式(1a)中、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>、X<sup>1</sup>、およびnは上記に定義した通りである)。

[0098] あるいは、1つの実施形態では、本発明は以下の式(1b)で表される化合物およびその薬学的に許容し得る塩である：

[0099]

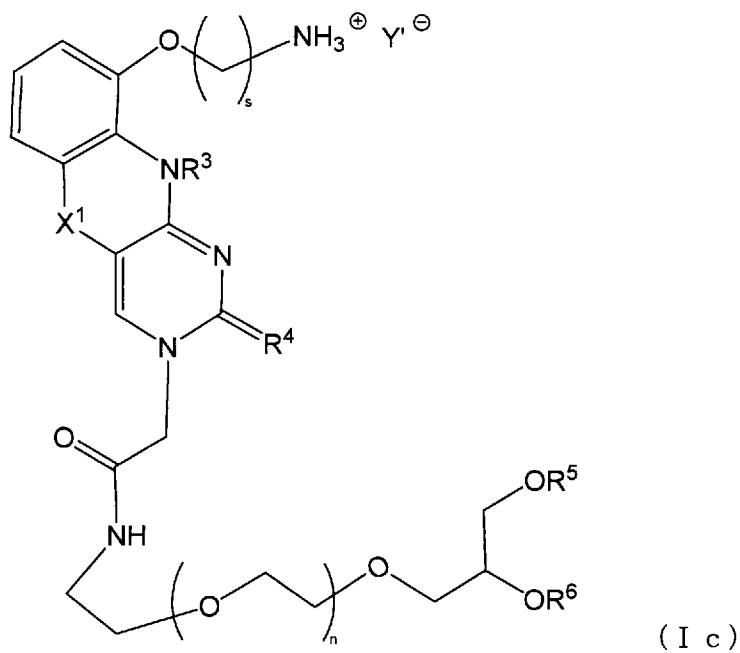
[化18]



[0100] (式 ( I b ) 中、 $R^1$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $X^1$ 、 $Y'$ 、および  $s$  は上記に定義した通りである)。

[0101] あるいは、1つの実施形態では、本発明は以下の式 ( I c ) で表される化合物およびその薬学的に許容し得る塩である：

[0102] [化19]



[0103] (式 ( I c ) 中、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $X^1$ 、 $Y'$ 、 $n$  および  $s$  は上記に定義した通りである)。

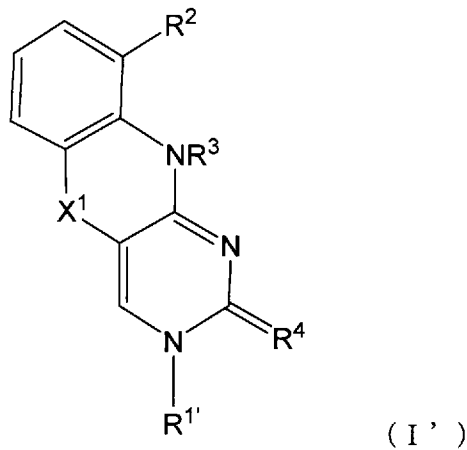
[0104] 本発明の式(1)の化合物は、例えば5-ブロモウラシルから、E. Pedrosaら、Org. Lett., 9, 4503-4506(2007)などの公知文献に記載されている公知化合物を作製し、これを出発物質として複数の反応工程を経て合成することができる。

[0105] (ドラッグデリバリーシステム製剤)

本発明のドラッグデリバリーシステム(以下、DDSということがある)製剤は、例えば、上記式(1)で表される化合物、またはその薬学的に許容し得る塩由来のリガンドを含む。

[0106] あるいは、本発明のDDS製剤は、例えば以下の式(1')で表される化合物、またはその薬学的に許容し得る塩由来のリガンドを含む：

[0107] [化20]



[0108] (式(1')中、

R<sup>1'</sup>は、

水素原子、分岐または環を形成していてもよい炭素数1~7のアルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数1~7のアルコキシ基、あるいは分岐していてもよい炭素数1~6のアルキルチオ基；もしくは

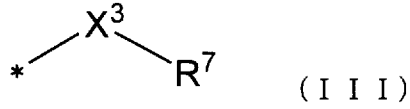
リボース-1-イル構造および2-デオキシリボース-1-イル構造からなる群から選択される化学構造を含むペントース部分；

であり、

R<sup>2</sup>は、水素原子、水酸基、ニトロ基、アミノ基、または以下の式(111)

) :

[0109] [化21]

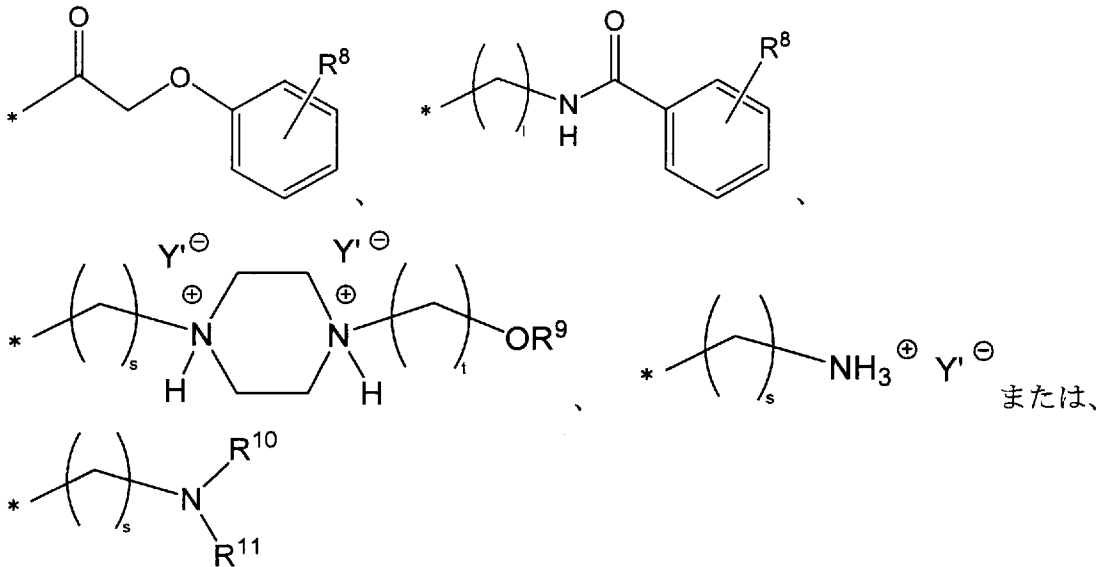


[0110] (式 ( I I I ) 中、

$X^3$ は酸素原子または硫黄原子であり、

$R^7$ は以下の式 :

[0111] [化22]



[0112] (ここで、

$R^8$ は水素原子、水酸基、分岐または環を形成していてもよい炭素数 1 ~ 7 のアルキル基、あるいは分岐または環を形成していてもよい炭素数 1 ~ 7 のアルコキシ基であり、

$R^9$ は水素原子、あるいは分岐または環を形成していてもよい炭素数 1 ~ 7 のアルキル基であり、

$R^{10}$ および  $R^{11}$ はそれぞれ独立して、水素原子、分岐または環を形成していてもよい炭素数 1 ~ 7 のアルキル基、またはアミノ基の保護基であり、

Y' は薬学的に許容し得るアニオンであり、  
 s は 2 ~ 4 のいずれかの整数であり、  
 t は 2 ~ 4 のいずれかの整数であり、  
 l は 1 ~ 5 のいずれかの整数であり、そして  
 \* は結合手である) で表される基である)

で表される基であり、

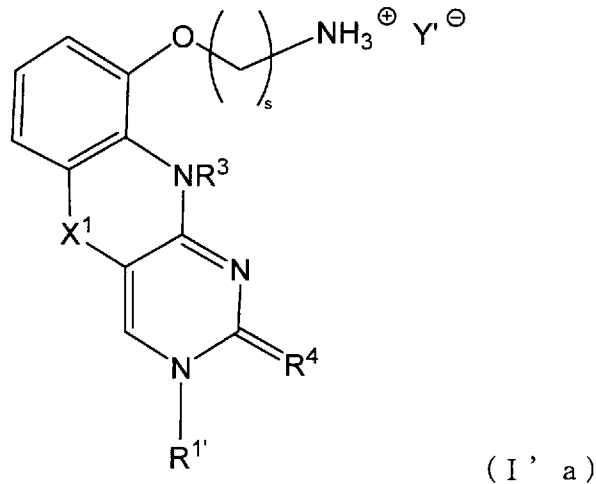
R<sup>3</sup> は水素原子、分岐または環を形成していてもよい炭素数 1 ~ 7 のアルキル基、またはアミノ基の保護基であり、

R<sup>4</sup> は酸素原子または硫黄原子であり、

X<sup>1</sup> は酸素原子または硫黄原子である)。

[0113] 1 つの実施形態では、本発明の DDS 製剤は、以下の式 (I' a) で表される化合物、またはその薬学的に許容し得る塩由来のリガンドを含む：

[0114] [化23]



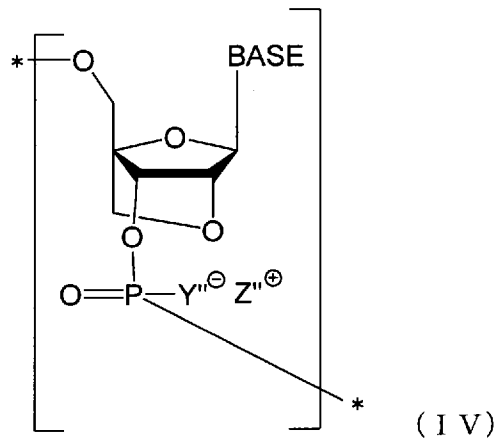
[0115] (式 (I' a) 中、R<sup>1'</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、X<sup>1</sup>、Y'、および s は上記に定義した通りである)。

[0116] あるいは、1 つの実施形態では、本発明の DDS 製剤は、上記式 (I') における R<sup>1'</sup> が、リボース-1-イル構造および 2-デオキシリボース-1-イル構造からなる群から選択される化学構造を含むペントース部分である。このようなペントース部分は、例えば、DNA モノマー、RNA モノマー、

および人工核酸モノマーからなる群から選択される少なくとも1つのモノマーから塩基部分を脱離した部分である。好ましくは、上記ペントース部分は、人工核酸モノマーから塩基部分を脱離した部分である。

[0117] このような人工核酸モノマーは、例えば以下の式 (I V) で表される構造を有する 2', 4' -BNA/LNAモノマーである：

[0118] [化24]



[0119] (式 (I V) 中、

B A S E は、 $\alpha$ 群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいプリン-9-イル基、または $\alpha$ 群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよい2-オキソ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル基を表し、

該 $\alpha$ 群は、水酸基、核酸合成の保護基で保護された水酸基、炭素数1から6の直鎖アルキル基、炭素数1から6の直鎖アルコキシ基、メルカプト基、核酸合成の保護基で保護されたメルカプト基、炭素数1から6の直鎖アルキルチオ基、アミノ基、炭素数1から6の直鎖アルキルアミノ基、核酸合成の保護基で保護されたアミノ基、およびハロゲン原子からなり、

Y'' は酸素原子または硫黄原子であり、

Z'' は薬学的に許容し得るカチオンであり、

\*は結合手である)。

[0120] 上記式 (I V) において、「B A S E」は、例えばプリン塩基 (すなわち

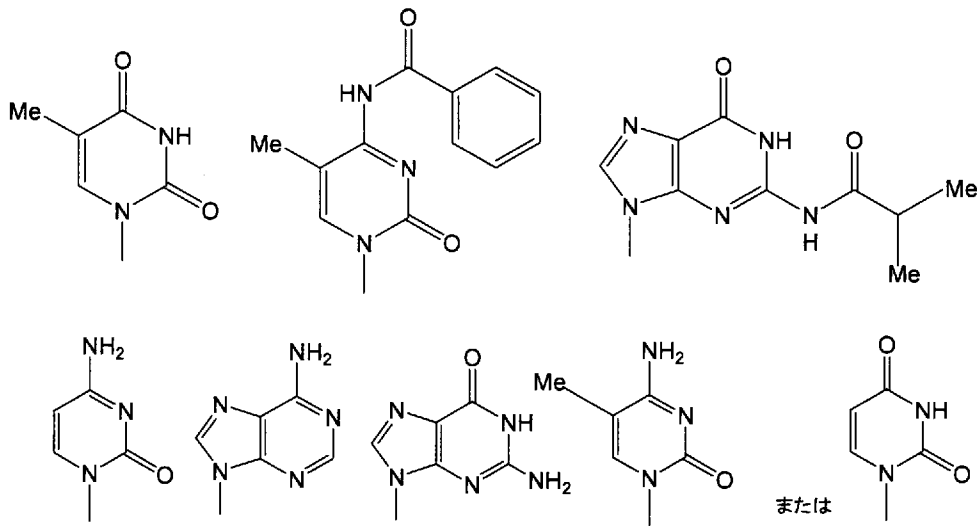
、プリン-9-イル基) またはピリミジン塩基 (すなわち、2-オキソ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル基) である。これらの塩基は、水酸基、炭素数1から6の直鎖アルキル基、炭素数1から6の直鎖アルコキシ基、メルカプト基、炭素数1から6の直鎖アルキルチオ基、アミノ基、炭素数1から6の直鎖アルキルアミノ基、およびハロゲン原子からなる $\alpha$ 群より選択される任意の置換基を1以上有していてもよい。

[0121] 上記「BASE」の具体例としては、アデニル基、グアニル基、シトシニル基、ウラシニル基、およびチミニル基、ならびに6-アミノプリン-9-イル基、2, 6-ジアミノプリン-9-イル基、2-アミノ-6-クロロプリン-9-イル基、2-アミノ-6-フルオロプリン-9-イル基、2-アミノ-6-ブロモプリン-9-イル基、2-アミノ-6-ヒドロキシプリン-9-イル基、6-アミノ-2-メトキシプリン-9-イル基、6-アミノ-2-クロロプリン-9-イル基、6-アミノ-2-フルオロプリン-9-イル基、2, 6-ジメトキシプリン-9-イル基、2, 6-ジクロロプリン-9-イル基、6-メルカプトプリン-9-イル基、2-オキソ-4-アミノ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル基、4-アミノ-2-オキソ-5-フルオロ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル基、4-アミノ-2-オキソ-5-クロロ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル基、2-オキソ-4-メトキシ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル基、2-オキソ-4-メルカプト-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル基、2-オキソ-4-ヒドロキシ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル基、2-オキソ-4-ヒドロキシ-5-メチル-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル基、および4-アミノ-5-メチル-2-オキソ-1, 2-ジヒドロピリミジン-1-イル基が挙げられる。

[0122] あるいは、「BASE」は、核酸医薬への導入において有利であるという観点から、以下の構造式：

[0123]

[化25]



[0124] でそれぞれ表される基、ならびに2-オキソ-4-ヒドロキシ-5-メチル-1,2-ジヒドロピリミジン-1-イル基、2-オキソ-4-アミノ-1,2-ジヒドロピリミジン-1-イル基、6-アミノプリン-9-イル基、2-アミノ-6-ヒドロキシプリン-9-イル基、4-アミノ-5-メチル-2-オキソ-1,2-ジヒドロピリミジン-1-イル基、および2-オキソ-4-ヒドロキシ-1,2-ジヒドロピリミジン-1-イル基であることが好ましい。「BASE」はまた、後述するポリ核酸との反応の際には、上記基を構成する水酸基およびアミノ基が保護基により保護されているものであることが好ましい。

[0125] 1つの実施形態では、本発明のDDS製剤は、上記リガンド（すなわち、上記式（1）で表される化合物、またはその薬学的に許容し得る塩由来のリガンド、または上記式（1'）で表される化合物、またはその薬学的に許容し得る塩由来のリガンド）がポリ核酸と結合したコンジュゲート体の形態で含有されている

[0126] コンジュゲート体を構成し得るポリ核酸は、例えばオリゴヌクレオチドであり、好ましくは生体内の標的の臓器にデリバリーされて、所望の機能を発揮することが期待されるオリゴヌクレオチドである。所望の機能を発揮する

ことが期待されるオリゴヌクレオチドとしては、例えば、標的遺伝子の発現を抑制するもの、および標的遺伝子の発現を調節するものが挙げられる。

[0127] このようなオリゴヌクレオチドには、核酸医薬を構成するオリゴヌクレオチドが包含される。オリゴヌクレオチドは1本鎖または2本鎖のいずれであってもよく、具体的な例としては、アンチセンスオリゴヌクレオチド（ASO）、siRNA、および核酸アプタマーが挙げられる。ASOは、標的配列に結合可能な配列とともに2本鎖オリゴヌクレオチドを形成していてもよい。

[0128] オリゴヌクレオチドは、標的遺伝子中の標的配列に結合可能な配列からなる例えば5～70塩基のオリゴヌクレオチドである。オリゴヌクレオチドの長さは、好ましくは5塩基以上、6塩基以上、7塩基以上、8塩基以上、9塩基以上、10塩基以上、11塩基以上、12塩基以上、13塩基以上、14塩基以上または15塩基以上であり、かつ70塩基以下、50塩基以下、40塩基以下、30塩基以下、25塩基以下または20塩基以下である。

[0129] ポリ核酸を構成するオリゴヌクレオチドが二本鎖オリゴヌクレオチドである場合、第2の鎖は、標的遺伝子中の標的配列に結合可能な配列からなる第1の鎖であるオリゴヌクレオチドに結合可能な配列からなるオリゴヌクレオチドである。この第2の鎖は、例えば、8～60塩基であり、好ましくは8塩基以上、9塩基以上、10塩基以上、11塩基以上、12塩基以上、13塩基以上、14塩基以上または15塩基以上であり、かつ60塩基以下、50塩基以下、40塩基以下、30塩基以下、25塩基以下または20塩基以下である。第2の鎖の長さは、第1の鎖の長さと同じであってもよいし、第1の鎖と結合する限りにおいて、第1の鎖よりも1または数個の塩基に相当する分が短い、あるいは第1の鎖と結合する部位の片側または両側に1または数個の塩基が付加することにより、第2の鎖は第1の鎖よりも長くてもよい。なお、本明細書において、「1または数個の塩基」とは、例えば1～10個、好ましくは1～5個、より好ましくは1～3個、さらにより好ましくは1個または2個の塩基を意味する。第2の鎖の好ましい長さは第1の鎖の

長さに依存する。例えば、第1の鎖の長さに対して50%以上の長さ、60%以上の長さ、70%以上の長さ、50~100%の長さ、60~100%の長さ、70~100%の長さである。

[0130] オリゴヌクレオチドが標的配列に「結合する」とは、異なる複数の1本鎖のオリゴヌクレオチドまたは核酸が、核酸塩基の相補性により2本鎖以上の鎖の核酸を形成し得ることをいう。好ましくは2本鎖の核酸を形成し得ることをいう。結合の熱安定性の指標である2本鎖以上の鎖の核酸の融解温度 ( $T_m$ ) は特に限定されない。

[0131] 2本鎖核酸の融解温度 ( $T_m$ ) は、例えば、下記のように決定され得る：  
塩化ナトリウム（終濃度100mM）とリン酸緩衝液（10mM, pH 7.0）中で、オリゴヌクレオチドと標的RNAやDNAとを等モル混合し、100℃にて加熱した後、室温まで徐冷してアニーリングさせ、2本鎖核酸を形成させる。2本鎖核酸の温度を5℃から90℃まで0.5℃/分の昇温速度で加温する際の260nmにおける吸光度 (A) の温度 (T) による変化を測定し、この測定結果より A vs T のグラフを作成し、このグラフにおいて前遷移領域および後遷移領域における接線の中線と A vs T のグラフとの交点での温度を、2本鎖核酸の  $T_m$  とする。

[0132] 2本鎖核酸の融解温度 ( $T_m$ ) は、例えば40℃以上であり、好ましくは50℃以上である。

[0133] 本明細書において「相補的」とは、異なる2つの1本鎖のオリゴヌクレオチドまたは核酸が2本鎖核酸を形成することができる対合関係にあることをいう。好ましくは、2本鎖を形成する領域の塩基配列が完全に相補性を有するが、当該2本鎖核酸を形成し得、所望の機能（例えば、発現抑制または調節）を発揮し得る限り、1個または数個のミスマッチを有し得る。1個または数個のミスマッチとは、オリゴヌクレオチドの長さに依存し得るが、1個~4個、好ましくは1個~3個、さらに好ましくは1個または2個のミスマッチを意味する。核酸部分を構成するオリゴヌクレオチドは、好ましくは、2本鎖を形成する領域の塩基配列に対して80%以上、90%以上、95%

以上、96%以上、97%以上、98%以上または99%以上の相補性を有するか、あるいは完全に(100%)相補性を有するものであってもよい。

[0134] オリゴヌクレオチドはまた、天然DNAを含有するオリゴヌクレオチド(非修飾オリゴヌクレオチド)および化学的に修飾されたDNAを含有するオリゴヌクレオチドのいずれをも包含する。このような修飾は、オリゴヌクレオチドの活性を変更することができ、例えば、標的核酸に対する親和性を高めるか、または核酸分解酵素(ヌクレアーゼ)に対する耐性を高めることができる。本発明においては、標的に対するオリゴヌクレオチドの親和性を高めることにより、より短いオリゴヌクレオチドの使用を可能にする。

[0135] ポリ核酸を構成するオリゴヌクレオチドは、常法によって合成することができ、例えば、市販の核酸自動合成装置(例えば、Applied Biosystems社製、株式会社ジーンデザイン製など)によって容易に合成することができる。合成法はホスホロアミダイトを用いた固相合成法、ヒドロジェンホスホネートを用いた固相合成法等がある。

[0136] 本発明のDDS製剤において、コンジュゲート体を構成するポリ核酸がオリゴヌクレオチドで構成される場合、上記リガンドの結合手はオリゴヌクレオチドの3'末端または5'末端の少なくともいずれか一方と結合していてもよいが、好ましくは5'末端に結合している。

[0137] さらに上記コンジュゲート体において、上記リガンドは1つのポリ乳酸に対して好ましくは1~3個、より好ましくは1個のリガンドが結合している。このようなコンジュゲート体は、肝臓に加え、肝臓以外の臓器、器官または組織への当該ポリ核酸送達も可能となる。肝臓以外の臓器、器官または組織としては、必ずしも限定されないが、例えば、骨格筋、脾臓、膵臓、心臓、肺、胃、腸、脳、乳腺、および皮膚が挙げられる。本発明では、特に骨格筋への送達が効果的に行われる。

[0138] (医薬品)

本発明の医薬品は、上記ドラッグデリバリーシステム製剤を含有する。

[0139] 本発明の医薬品の投与方法および剤形は、特に限定されず、当該分野で公

知の投与方法および剤形が利用可能である。

[0140] 本発明の医薬品は、局所的あるいは全身的な治療、または治療すべき領域に応じて様々な方法により投与することができる。投与方法としては、例えば、局所的（例えば、点眼、腔内、直腸内、鼻腔内および経皮を含む）、経口的、または非経口的であってもよい。非経口的投与としては、静脈内注射もしくは点滴、皮下、腹腔内もしくは筋肉内注入、吸引もしくは吸入による気道を介した肺投与等が挙げられる。

[0141] 本発明の医薬品を局所投与する場合、経皮パッチ、軟膏、ローション、クリーム、ゲル、滴下剤、坐剤、噴霧剤、液剤、散剤等の剤形が採用され得る。

[0142] 経口投与用組成物の例としては、散剤、顆粒剤、水もしくは非水性媒体に溶解させた懸濁液または溶液、カプセル、粉末剤、錠剤等が挙げられる。非経口投与用組成物としては、バッファー、希釈剤およびその他の適当な添加剤を含む無菌水溶液等が挙げられる。

[0143] 本発明の医薬品は、上記ドラッグデリバリーシステム製剤におけるコンジュゲート体を構成する「ポリ核酸」の有効量にその剤型に適した賦形剤、結合剤、湿潤剤、崩壊剤、滑沢剤、希釈剤等の各種医薬用添加剤を必要に応じて混合して得ることができる。注射剤の場合には適切な担体と共に滅菌処理を行なって製剤化することができる。

[0144] 投与対象の個体（生体）としては、好ましくは哺乳動物であり、より好ましくは、ヒト、サル、イヌ、ネコなどの愛玩動物、ウシ、ブタなどの家畜動物であり、さらに好ましくはヒトである。投与有効量は、投与される個体に依存するが、個体の種類、性別、年齢、体重、症状等、ならびに投与の方法、経路、頻度などに応じて任意に定めることができる。

## 実施例

[0145] 以下、実施例を用いて本発明を説明するが、本発明はこれらに限定されない。

[0146] なお、以下の実施例において使用した機器等は以下の通りであった。

- [0147]  $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、 $^{19}\text{F-NMR}$ 、および $^{31}\text{P-NMR}$ については、日本電子株式会社製JNM-ECS400、およびJNM-ECA500分光計で記録した。ケミカルシフト値は、 $^1\text{H-NMR}$ については、メタノール- $d_4$  (3.31 ppm)、またはアセトニトリル- $d_3$  (1.93 ppm)と比較して百万分率 (ppm) で報告する。 $^{13}\text{C-NMR}$ については、メタノール- $d_4$  (49.0 ppm)、またはアセトニトリル- $d_3$  (1.32 ppm、118.3 ppm) に対するppmで報告する。さらに、 $^{31}\text{P-NMR}$ および $^{19}\text{F-NMR}$ については、それぞれ外部標準として、5%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (0.00 ppm) およびトリフルオロ酢酸エチル (-78.7 ppm) に対するppmで報告する。
- [0148] Gene Design社製nS-8オリゴヌクレオチド合成機をDNA自動合成機として使用した(1.0  $\mu\text{mol}$ スケール用)。UV融解試験を、光路長1cmの $T_m$ 分析アクセサリ石英キュベットを備えた株式会社島津製作所製UV-1650PCおよびUV-1800分光計を用いて行った。IRスペクトルは、NaClプレートを使用して株式会社島津製作所製IR Affinity-1Sで記録した。UV吸光度測定には、株式会社島津製作所製UV-1800分光計を使用した。蛍光スペクトル測定には、日本分光株式会社製FP-8500蛍光光度計を使用した。すべての新規化合物のMALDI-TOF-Massを、日本電子株式会社製SpiralTOF JMS-S3000で記録した。すべてのオリゴヌクレオチドのMALDI-TOF-Massを、Bruker Daltonics社製Autoflex max TOF/TOF質量分析計で記録した。
- [0149] カラムクロマトグラフィーには、富士シリシア化学株式会社製PSQ-100BまたはPSQ-60Bシリカゲルを使用した。高速液体クロマトグラフィー(HPLC)には、株式会社島津製作所製CBM-20A、DGU-20A3、LC-20AT、CTO-20A、SPD-20A、およびFRC-10Aを使用した。さらに、Waters X-Bridges™ O-STC18 2.5  $\mu\text{m}$  (4.6  $\times$  50mm) をHPLC分析に使用し、W

aters X Bridges™ OST C18 2.5 μm (10×50 mm) を分取カラムに使用した。

[0150] また、以下の実施例に記載する化合物、溶媒および保護基の略号はそれぞれ表1に示す通りである。

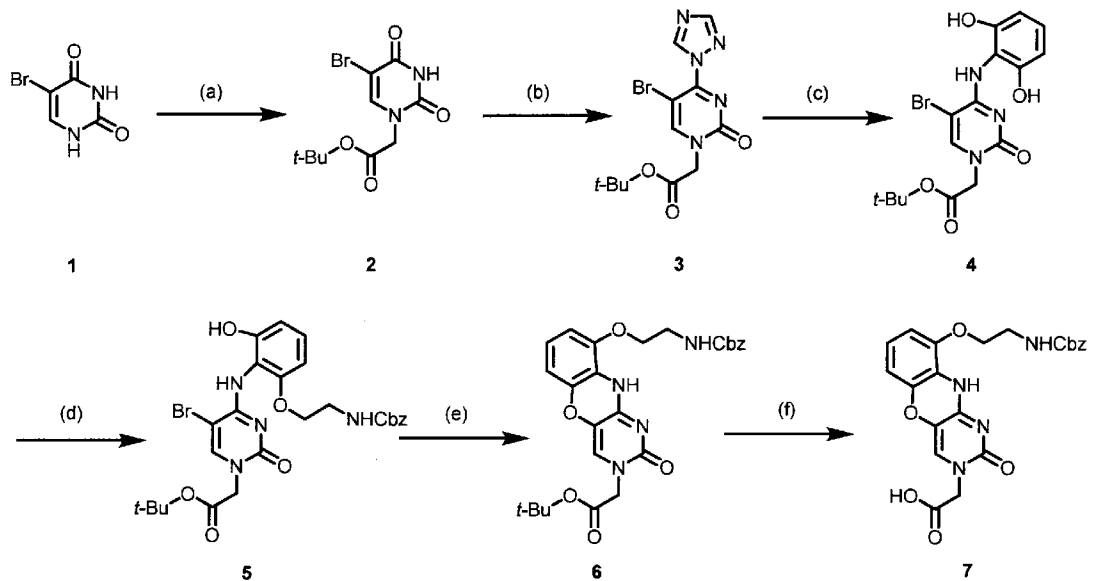
[0151] [表1]

略称	名称	略称	名称
ACN	アセトリル	ETFA	トリフルオロ酢酸エチル
AcOEt	酢酸エチル	GalNac	N-アセチル-D-ガラクトースアミン
Cbz	ベンジルオキシカルボニル(基)	TEA	エチルアミン
DBU	1,8-ジアザビシクロ[5.4.0]ウンデセ-7-エン	TFA	トリフルオロ酢酸
DCM	ジクロロメタン	TFAA	無水トリフルオロ酢酸
DIAD	ジイソプロピル アゾジカルボキシレート	TFAc	トリフルオロアセチル(基)
DIPEA	N,N-ジイソプロピルエチルアミン	THF	テトラヒドロフラン
DMF	N,N-ジメチルホルムアミド	TMS	トリメチルシリル(基)
DMSO	ジメチルスルホキシド	Tris	トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン
DMTr	4,4'-ジメキソトリチル(基)	Ts	p-トルエンシルボニル(基)
DMTrCl	4,4'-ジメキソトリチルクロライド	TsCl	p-トルエンシルボニルクロライド
		TSTU	N,N,N',N'-テトラメチル-O-(N-スクシンイミジル)ウラニウム テトラフルオロボレート

[0152] (実施例1: G-クランプリンカー (化合物18) の合成)

(1-1: 化合物7の合成)

[0153] [化26]



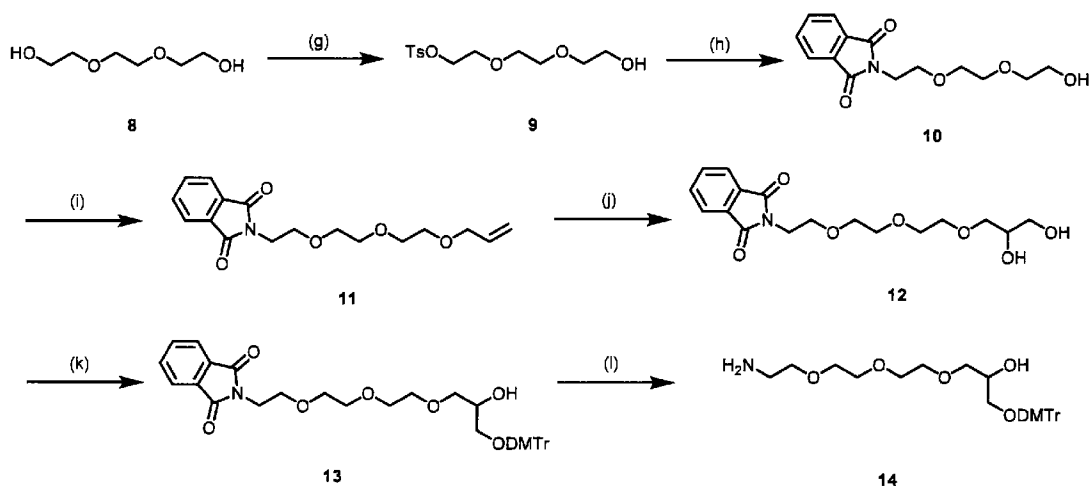
各工程の試薬および条件 (a) *t*-ブチルプロモアセテート, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, DMF, 室温, 9時間, 76%. (b) 1,2,4-トリアゾール, POCl<sub>3</sub>, TEA, ACN, 室温, 20時間, 84%. (c) 2-アミノフェノール, DBU, ACN, 室温, 6時間, 83%. (d) *N*-Cbz-エタノールアミン, PPh<sub>3</sub>, アゾジカルボン酸ジイソプロピル (DIAD), THF, 室温, 19時間, 66%. (e) KF, EtOH, 還流, 66時間, 65%. (f) TFA, DCM, 室温, 20.5時間, 91%.

[0154] 5-ブロモウラシル 1 から、E. Pedrosa ら、Org. Lett., 9, 4503-4506 (2007) に記載の方法を用いて化合物 2 ~ 6 を経由することにより化合物 7 を得た。

。

[0155] (1 - 2 : 化合物 14 の合成)

[0156] [化27]



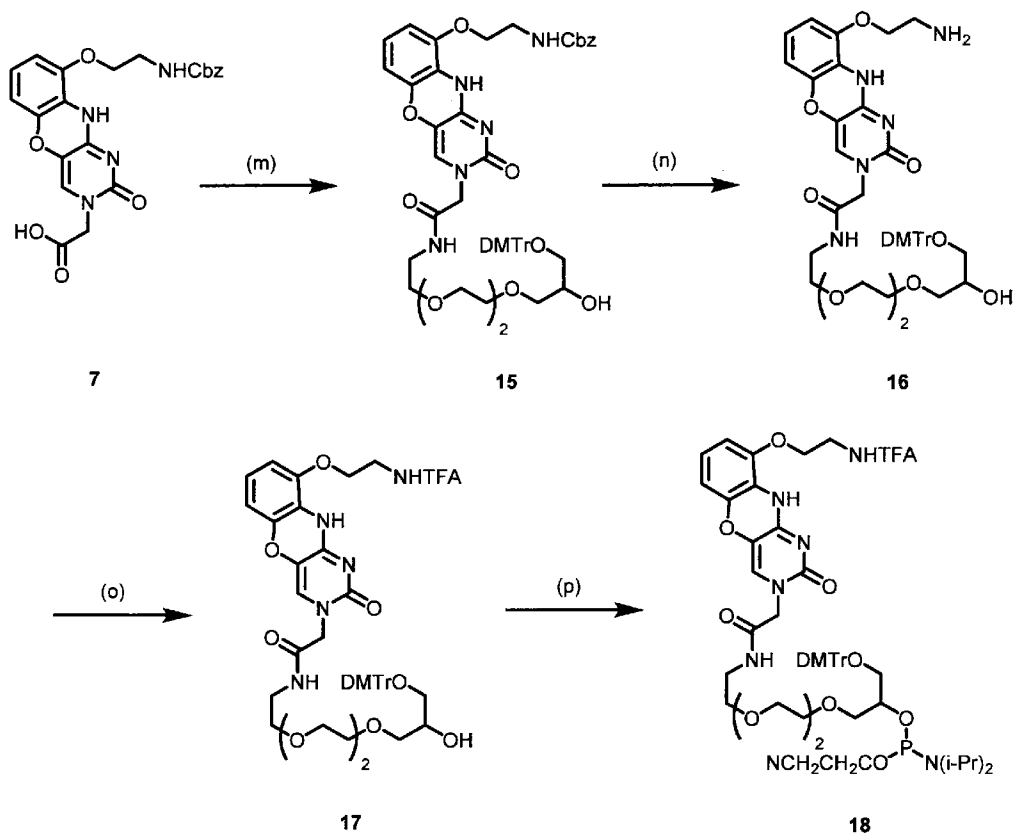
各工程の試薬および条件 (g) TsCl, ピリジン/DCM (1:1), 室温, 18時間, 40%. (h) フタルイミド, DBU, DMF, 80°C, 17時間, 89%. (i) アリルブロミド, NaH, THF/DMF (4:1), 室温, 24時間, 80%. (j) オスミウム酸カリウム(VI)二水和物, *N*-メチルモルホリン-*N*-オキシド, H<sub>2</sub>O/アセトン (5:2), 室温, 26時間, 83%. (k) DMTrCl, ピリジン, 室温, 4.5時間, 88%. (l) 40% MeNH<sub>2</sub>水溶液, MeOH, 55°C, 8時間, 99%.

[0157] 化合物 8 から、J. Chattopadhyaya ら、Helv. Chimica Acta, 82, 2186-2200 (1999) を用いて化合物 9 ~ 13 を経由することにより化合物 14 を得た。

[0158] (1 - 3 : 化合物 18 の合成)

[0159]

[化28]

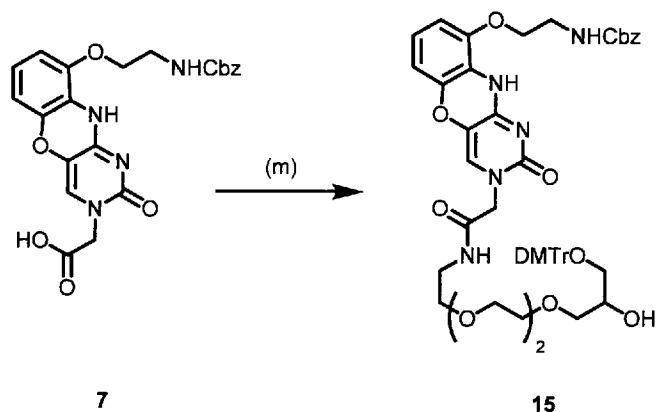


各工程の試薬および条件 (m) TSTU, DIPEA, DMF, 室温, 3.5時間, 次いで化合物14, DMF, 室温, 30分間, 84%. (n) Pd/C (10%), THF/MeOH (7:1), 室温, 2.5時間 (o) ETFA, TEA, MeOH, 室温, 24時間, 60% (2工程). (p) 2-シアノエチル-N,N-ジイソプロピルクロロホスホアミダイト, DIPEA, DCM, 室温, 3時間, 78%.

[0160] (1-3-1 : 化合物15 (N-(2-(2-(2-(3-(4,4'-ジメトキシトリチル)オキシ-2-ヒドロプロポキシ)エトキシ)エトキシ)エチル)-2-(9-(N-Cbz-2-アミノエトキシ)-1,3-ジアザ-2-オキサフェノキサジン-3-イル)アセトアミド)の合成)

[0161]

[化29]



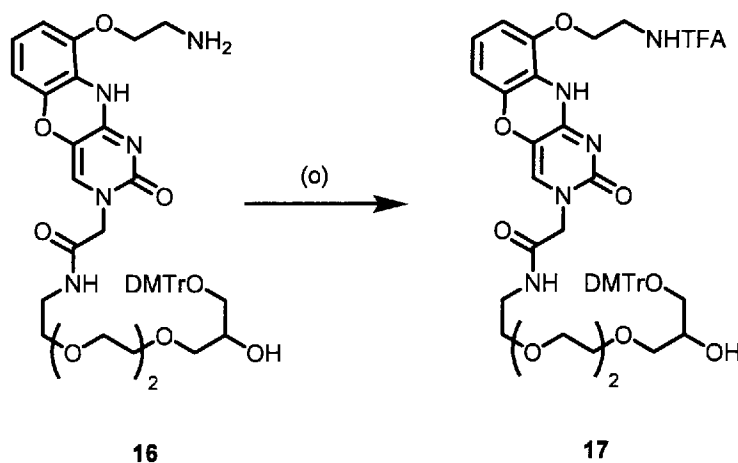
[0162] 乾燥DMF（2 mL）中の化合物7（457 mg、1.01 mmol）の懸濁液に、N，N-ジイソプロピルエチルアミン（DIPEA）（0.35 mL、2.0 mmol）およびN，N，N'，N'-テトラメチル-N-スクシニジル）ウラニウム テトラフルオロボレート（TSTU）（305 mg、1.01 mmol）を添加し、窒素雰囲気下で室温にて3.5時間攪拌した。この混合物に、乾燥DMF（2.5 mL）中の化合物14（613 mg、1.17 mmol）の溶液を添加し、窒素雰囲気下で、室温にて30分間攪拌した。溶媒を減圧下で部分的に除去し、CHCl<sub>3</sub>で抽出した。有機層を飽和NaHCO<sub>3</sub>水溶液で洗浄し、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で乾燥させ、減圧下で濃縮した。粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（MeOH/CHCl<sub>3</sub>=0~3%（トリエチルアミン（TEA）1%））によって精製して、化合物15（815 mg、84%）を白色の固体として得た。化合物15の物性データを表2に示す。

[0163]



[0167] (1-3-3: 化合物17 (N-(2-(2-(2-(3-(4,4'-ジメトキシトリチル)オキシ-2-ヒドロキシプロポキシ)エトキシ)エトキシ)エチル)-2-(9-(N-トリフルオロアセチル-2-アミノエトキシ)-1,3-ジアザ-2-オキソフェノキサジン-3-イル)アセトアミド)の合成)

[0168] [化31]



[0169] 乾燥MeOH (5.2 mL) 中の上記で得られた粗化合物16の溶液に、乾燥TEA (0.74 mL、5.2 mmol) およびエチルトリフルオロアセテート (ETFA) (0.62 mL、5.2 mmol) を添加し、窒素雰囲気下で室温にて24時間攪拌した。この混合物にTEA (0.58 mL) を添加し、減圧下で濃縮した。粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (MeOH/AcOEt = 0~5% (TEA 0.5%)) によって精製して、化合物17 (289 mg、60% (2工程)) を白色の固体として得た。化合物17の物性データを表3に示す。

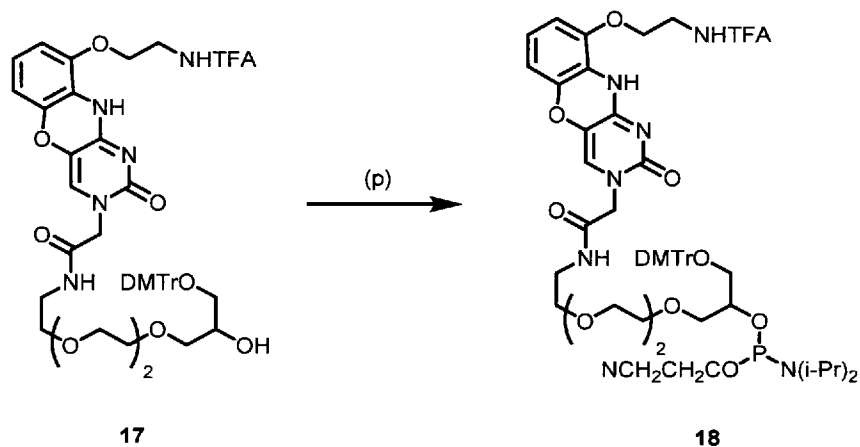
[0170]

[表3]

得られた化合物 17 の物性データ
融点: 92 °C; IR $\nu_{\max}$ (NaCl プレート): 1034, 1093, 1155, 1179, 1209, 1251, 1282, 1369, 1421, 1469, 1478, 1494, 1503, 1510, 1556, 1561, 1611, 1630, 1640, 1677, 1712, 1720, 2881, 2932, 3076, 3301, 3432 $\text{cm}^{-1}$ ; $^1\text{H}$ NMR (400 MHz, $\text{CD}_3\text{CN}$ ): $\delta$ 3.02 (2H, d, $J = 5.4$ Hz), 3.24-3.34 (2H, m), 3.43-3.56 (12H, m), 3.63-3.72 (2H, m), 3.74 (6H, s), 3.84 (1H, s), 4.07 (2H, t, $J = 4.9$ Hz), 4.21 (2H, s), 6.41 (1H, d, $J = 8.3$ Hz), 6.53 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 6.81 (5H, td, $J = 9.0, 8.4$ Hz), 6.98 (1H, s), 7.01 (1H, t, $J = 5.6$ Hz), 7.20 (1H, t, $J = 6.7$ Hz), 7.24-7.34 (6H, m), 7.43 (2H, d, $J = 7.2$ Hz), 7.92 (1H, s), 8.10 ppm (1H, s); $^{13}\text{C}$ NMR (126 MHz, $\text{CD}_3\text{CN}$ ): $\delta$ 39.9, 40.2, 52.5, 55.9, 65.9, 68.0, 70.1, 70.5, 70.9, 71.1, 71.1, 71.3, 73.7, 86.7, 107.7, 109.1, 113.9, 116.0, 116.5, 120.6, 124.3, 127.7, 128.0, 128.7, 129.0, 129.5, 131.0, 137.1, 143.5, 146.3, 146.9, 155.0, 156.2, 157.8, 158.1, 158.4, 158.6, 159.5, 168.7 ppm; $^{19}\text{F}$ NMR (376 MHz, $\text{CD}_3\text{CN}$ ): $\delta$ -77.5 ppm; HR-MS (MALDI-TOF-Mass) $\text{C}_{46}\text{H}_{50}\text{N}_5\text{O}_{12}\text{F}_3\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ としての計算値: 944.3306, 実測値: 944.3309.

[0171] (1-3-3 : 化合物 18 (N-(2-(2-(2-(2-(2-シアノエトキシ(ジイソプロピルアミノ)ホスフィノキシ)-3-(4,4'-ジメトキシトリチル)オキシプロポキシ)エトキシ)エトキシ)エチル)-2-(9-(N-トリフルオロアセチル-2-アミノエトキシ)-1,3-ジアザ-2-オキソフェノキサジン-3-イル)アセトアミド)の合成)

[0172] [化32]



[0173] 乾燥ジクロロメタン (DCM) (1.5 mL) 中の上記で得られた化合物 17 (105 mg、0.114 mmol) の氷冷溶液に、DIPEA (40  $\mu\text{l}$ 、0.23 mmol) および 2-シアノエチル-N,N-ジイソプロピルクロロホスホアミダイト (33  $\mu\text{L}$ 、0.15 mmol) を添加し、そ

してアルゴン雰囲気下、室温で3時間攪拌した。溶媒を減圧下で除去し、 $\text{CHCl}_3$ で抽出した。有機層を飽和 $\text{NaHCO}_3$ 水溶液で洗浄し、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ で乾燥させ、次いで減圧下で濃縮した。粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（アセトニトリル（ACN）/ $\text{CHCl}_3$  = 1 / 1（TEA 1%））で精製して、化合物18（100 mg、78%を白色の固体として得た。化合物18の物性データを表4に示す。

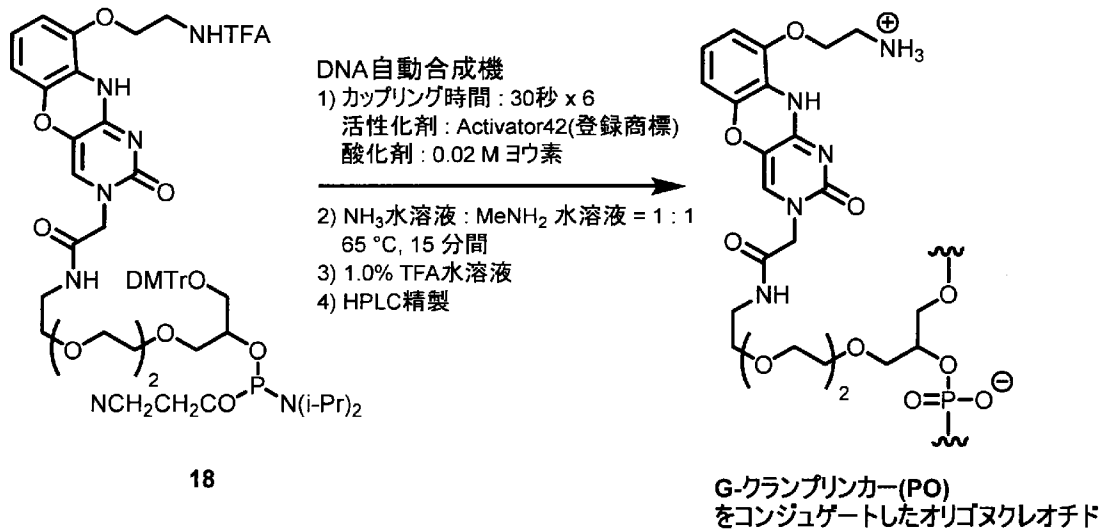
[0174] [表4]

得られた化合物18の物性データ
融点: 64 °C ; IR $\nu_{\text{max}}$ (NaCl プレート): 1034, 1095, 1156, 1180, 1205, 1252, 1285, 1365, 1424, 1466, 1478, 1505, 1510, 1556, 1562, 1611, 1633 1639, 1681, 1716, 2250, 2838, 2876, 2934, 2966, 3064, 3258, 3553 $\text{cm}^{-1}$ ; $^1\text{H}$ NMR (400 MHz, $\text{CD}_3\text{CN}$ ): $\delta$ 1.02 (3H, d, $J$ = 6.8 Hz), 1.06-1.24 (9H, m), 2.50 (1H, t, $J$ = 6.0 Hz), 2.55-2.73 (1H, m), 3.00-3.06 (0.5H, m), 3.09-3.21 (1.5H, m), 3.24-3.35 (2H, m), 3.40-3.71 (17H, m), 3.73 (6H, s), 3.74-3.90 (1H, m), 4.04 (3H, t, $J$ = 5.0 Hz), 4.31 (2H, s), 6.35 (1H, d, $J$ = 7.4 Hz), 6.48 (1H, d, $J$ = 8.4 Hz), 6.74 (1H, t, $J$ = 8.3 Hz), 6.80-6.87 (4H, m) 7.01 (1H, s), 7.12-7.23 (2H, m), 7.24-7.36 (6H, m), 7.40-7.49 (2H, m), 8.03 (1H, s), 8.38 ppm (1H, s); $^{13}\text{C}$ NMR (126 MHz, $\text{CD}_3\text{CN}$ ): $\delta$ 20.9, 21.0, 21.0, 21.1, 24.9, 24.9, 24.9, 25.0, 25.0, 39.9, 40.1, 43.8, 43.8, 43.9, 43.9, 52.5, 55.9, 59.3, 59.3, 59.4, 59.5, 65.0, 65.0, 68.1, 70.0, 70.9, 70.9, 71.1, 71.1, 71.1, 71.5, 71.6, 72.6, 72.6, 72.7, 72.7, 73.3, 73.4, 86.7, 86.8, 107.8, 109.2, 114.0, 116.0, 116.6, 119.5, 119.8, 124.3, 127.7, 128.0, 128.8, 129.0, 129.0, 129.4, 131.0, 131.0, 131.0, 137.0, 137.1, 137.1, 143.5, 146.2, 146.3, 146.9, 155.1, 156.0, 157.8, 158.1, 158.4, 158.7 159.6, 168.5 ppm; $^{19}\text{F}$ NMR (376 MHz, $\text{CD}_3\text{CN}$ ): $\delta$ -77.5 ppm; $^{31}\text{P}$ NMR (162 MHz, $\text{CD}_3\text{CN}$ ): $\delta$ 149.3, 149.8 ppm; HR-MS (MALDI-TOF-Mass) $\text{C}_{55}\text{H}_{67}\text{N}_7\text{O}_{13}\text{F}_3\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ としての計算値: 1144.4379, 実測値: 1144.4401.

[0175] （実施例2：Gクランプリンカーをコンジュゲートしたオリゴ核酸（ODN）の合成と同定）

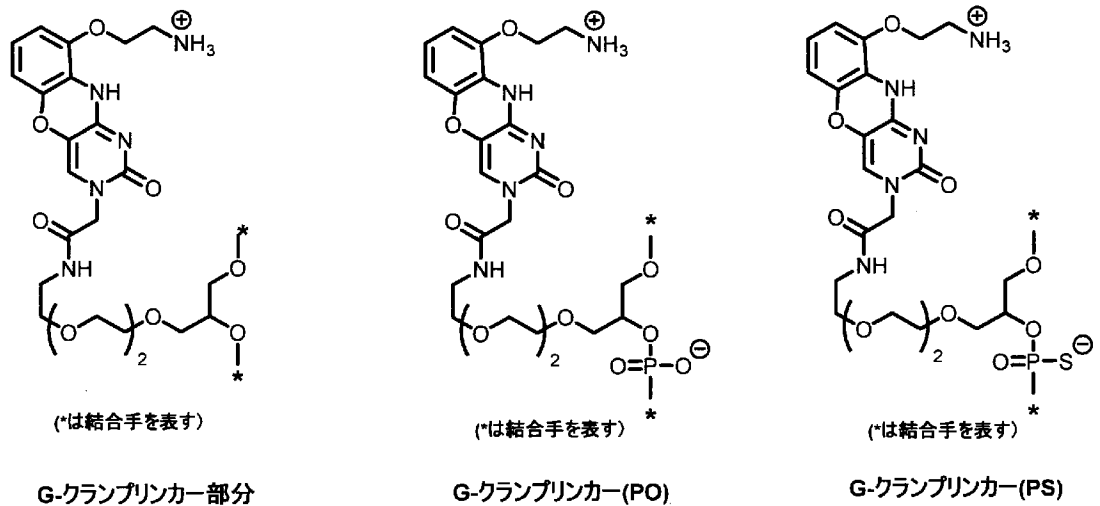
[0176]

[化33]



[0177] なお、本明細書中に用いられる用語「G-クランプリンカー部分」、「G-クランプリンカー (PO)」、「および「G-クランプリンカー (PS)」はそれぞれ以下の構造を指して言う。

[0178] [化34]



[0179] 上記で得られた化合物 18 を用い、G-クランプリンカー (PO) をコンジュゲートしたオリゴヌクレオチドの合成を、DNA自動合成機 (GeneDesign社製nS-8 Oligonucleotides Synthesizer) を用い、1.0 μmolスケールで行った。次いで、5-[3,5-ビス(トリフルオロメチル)フェニル

] - 1 H-テトラゾール (Activator42 (登録商標)) をすべてのカップリング工程で活性剤として使用した。なお、酸化剤にはヨウ素水を用いた。化合物 18 および天然体は、ACN 溶液中で 100 mM にて調製した。化合物 18 および天然体のカップリング時間は、それぞれ 180 秒間および 30 秒間であった。オリゴヌクレオチドの合成を、DMT r-on モードで行った。固体 (CPG) で支持されたオリゴヌクレオチドを切断し、各核酸塩基およびホスホロジエステル結合の保護基を、混合溶液 (メチルアミン水溶液 (40%) およびアンモニア水溶液 (28%) (容量比 1 : 1)) で 65°C にて 15 分間除去した。

[0180] DMT r 基を有する粗オリゴヌクレオチドを脱 DMT r 化し、簡易逆相カラム (Waters Sep-Pak (登録商標) Plus C18 Environmental Cartridges) で簡易精製した。具体的な手順として、Sep-Pak に粗オリゴヌクレオチドを添加した後、10% ACN 水溶液で洗浄した。続いて、1% トリフルオロ酢酸水溶液で脱 DMT r 化し、40% MeOH 水溶液でオリゴヌクレオチドを溶出させた。次に、Waters 社製 XBridge™ OST C18 2.5 μm (10 × 50 mm) 逆相 HPLC 用カラムを用いて、溶離液 A に 100 mM 酢酸トリエチルアンモニウム (TEAA) 緩衝液 (pH = 7.0)、溶離液 B に MeOH を用いるグラジエント溶離法により、HPLC でオリゴヌクレオチドを精製した。

[0181] 精製オリゴヌクレオチドの成分確認を、Waters 社製 XBridge™ OST C18 2.5 μm (4.6 × 50 mm) での逆相 HPLC および MALDI-TOF 質量分析計で行った。全体の収率を 260 nm での UV 吸光度から計算した。なお、逆相 HPLC の測定方法と条件は以下の表 5 の通りであった。

[0182]

[表5]

一般条件
分取クロマトグラフィー: Waters社製XBridge™ OST C18 2.5 μm (10×50mm)
分析クロマトグラフィー: Waters社製XBridge™ OST C18 2.5 μm (4.6×50 mm)
分取条件の流速: 4.0mL/分
分析条件の流速: 1.0mL/分
オリゴヌクレオチド検出用のUVの波長: 260nm
カラムオープンの温度: 50°C
溶離液A: 100 mM TEAA (pH 7.0) 緩衝液
溶離液B: MeOH
分取条件と分析条件の両方でのMeOHのグラジエント(20分)
リテンションタイム (Rt) (分)(分析カラム条件):
5-70%; ODN 1_X(Rt: 9.0分)、ODN 2_X(Rt: 10.1分)、ODN 3_X(Rt: 8.6分)、ODN 4_X(Rt: 7.8分)

[0183] 結果を表 6 に示す。

[0184] [表6]

ODN	配列(5'—3')	MALDI-TOF-Mass	
		計算値 [M-H] <sup>-</sup>	測定値 [M-H] <sup>-</sup>
1X	5'-d(XGCGTTTTTTTGCT)-3' (配列番号1)	4217.9	4218.9
2X	5'-d(XXXGCGTTTTTTTGCT)-3' (配列番号2)	5388.9	5390.7
3X	5'-d(GCGTXXTTTGCT)-3'	3913.7	3914.6
4X	5'-d(GCGTCXCTTGCT)-3'	3883.7	3884.9

X: G-クランプリンカー (PO)

[0185] (実施例 3 : G クランプリンカーがコンジュゲートしたオリゴ核酸 (ODN) の物性評価)

(1) 二重鎖形成能についての評価

実施例 2 で作製されたオリゴヌクレオチドのうち、表 6 に示す G-クランプリンカー (PO) を末端に導入したオリゴヌクレオチド (ODN 1X および ODN 2X) を含む対象鎖と、標的鎖 (一本鎖オリゴ DNA および一本鎖オリゴ RNA) との間の結合親和性を融解温度測定により評価した。

[0186] 具体的には、以下の配列のオリゴヌクレオチドを合成および精製した :

5' - N - d ( G C G T T T T T T G C T ) - 3' (配列番号 1、2 および 5)

- (1) N = なし (配列番号 3)
- (2) N = X (X = G-クランプリンカー (PO)) (配列番号 1)
- (3) N = XXX (X = G-クランプリンカー (PO)) (配列番号 2)

[0187] なお本実施例では実際のデリバリー化の応用を想定し、相補鎖には 3' 側に 4 塩基突き出た一本鎖状態のオーバーハング体を用い、グアニンの数および位置によって二重鎖形成能がどのように変化するかを評価した。具体的には、標的鎖として、一本鎖オリゴDNA 3' - d (YYYYCGCAAAA AACGA) - 5' (配列番号 4 ~ 9)

- (1) YYYY = なし (配列番号 4)
- (2) YYYY = CATA (配列番号 5)
- (3) YYYY = CATG (配列番号 6)
- (4) YYYY = CAGT (配列番号 7)
- (5) YYYY = CTGG (配列番号 8)
- (6) YYYY = CGGT (配列番号 9)

および一本鎖オリゴRNA 3' - r (YYYYCGCAAAA AACGA) - 5' (配列番号 10 ~ 15)

- (1) YYYY = なし (配列番号 10)
- (2) YYYY = CAUA (配列番号 11)
- (3) YYYY = CAUG (配列番号 12)
- (4) YYYY = CAGU (配列番号 13)
- (5) YYYY = CUGG (配列番号 14)
- (6) YYYY = CGGU (配列番号 15)

を用いて、各オリゴヌクレオチドの二重鎖形成能 (結合親和性) を調べた。

[0188] オリゴヌクレオチドの二重鎖形成能を、各種オリゴヌクレオチドと標的鎖とをアニーリング処理して二重鎖を形成させた後、 $T_m$  値を測定することにより調べた。より詳細には、各オリゴヌクレオチド (終濃度  $2 \mu\text{M}$ ) と塩化ナトリウム (終濃度  $100 \text{mM}$ ) のリン酸緩衝液 ( $10 \text{mM}$ ,  $\text{pH} 7.0$ ) のサンプル溶液を  $100^\circ\text{C}$  で加熱し、室温までゆっくり冷却した。その後、窒

素気流下で5℃まで冷却し、測定を開始した。0.5℃/分で90℃まで昇温し、0.5℃間隔で260nmにおける吸光度をプロットした。T<sub>m</sub>値を中線法により算出し、独立した3回の測定における平均値とした。結果を表7に示す。

[0189] [表7]

3'-YYYY-5'	T <sub>m</sub> (ΔT <sub>m</sub> = T <sub>m</sub> (X:1 または X:3) - T <sub>m</sub> (X:0)) (°C)					
	DNA			RNA		
	ODN 5 N=なし	ODN 1X N=X	ODN 2X N=XXX	ODN 5 N=なし	ODN 1X N=X	ODN 2X N=XXX
YYYY なし	38	40 (+2)	31 (-7)	34	35 (+1)	29 (-5)
CAT(U)A	40	42 (+2)	31 (-9)	37	34 (-3)	27 (-10)
CAT(U)G	42	41 (-1)	39 (-3)	38	37 (-1)	33 (-5)
CAGT(U)	38	40 (+2)	34 (-4)	32	31 (-1)	31 (-1)
CT(U)GG	39	44 (+5)	46 (+7)	38	39 (+1)	39 (+1)
CGGT(U)	37	41 (+4)	40 (+3)	34	34 (±0)	35 (+1)

ODN 5: 5'-d(GCGTTTTTTTGCT)-3'  
X = G-クランプリンカー (PO)

[0190] 表7に示すように、1個のG-クランプリンカー (PO) を5'末端に導入したオリゴ核酸 (ODN 1X) は、当該G-クランプリンカーを導入していないもの (N=なし) (ODN 5) と比較して、オーバーハングの有無や配列に関わらず、いずれの標的オリゴRNAに対しても、T<sub>m</sub>値にあまり変化を及ぼさなかった (ΔT<sub>m</sub>: -3~1℃)。これに対し、ODN 1Xは、ODN 5と比較して、オーバーハング部位にCTGGとCGGTを有する標的一本鎖オリゴDNAに対して、T<sub>m</sub>値を大きく上昇させた (ΔT<sub>m</sub>: +4~+5℃)。

[0191] 3個のG-クランプリンカー (PO) を5'末端に導入したオリゴ核酸 (ODN 2X) は、ODN 5と比較して、オーバーハング部位にCAGU、CUGG、CGGUを有する標的オリゴRNAに対して、T<sub>m</sub>値をほとんど変化させなかった (ΔT<sub>m</sub>: -1~+1℃)。一方で、ODN 2Xは、ODN 5と比較して、それ以外の標的オリゴRNAに対しては、大きくT<sub>m</sub>値を低下

させた ( $\Delta T_m$ :  $-10 \sim -5^\circ\text{C}$ )。続いて、ODN 2Xは、ODN5と比較して、オーバーハングにCGGTとCTGGを有する標的オリゴDNAに対して、高い $T_m$ 値を示した ( $\Delta T_m$ :  $+3 \sim +7^\circ\text{C}$ )。逆に、ODN 2Xは、それ以外の標的オリゴDNAに対しては大きく $T_m$ 値を低下させた ( $\Delta T_m$ :  $-9 \sim -3^\circ\text{C}$ )。これらの結果より、ODNの5'末端に導入されたG-クランプリンカー (PO) は、標的オリゴRNAとの二重鎖形成時、いずれのオーバーハング配列に対しても顕著な相互作用は見られないものの、標的オリゴDNAとの場合にはオーバーハング領域にグアニンを有する特定の配列に対して相互作用し二重鎖形成能を向上させることが示された。

[0192] (2) 蛍光特性についての評価

フェノキサジン人工塩基核酸は360nmの励起で430nmに蛍光を持つことが知られている。オリゴ核酸の5'末端に導入したG-クランプリンカーが、標的オリゴDNA及びRNAとの二本鎖形成時に、オーバーハング配列に対して、どのような蛍光変化を及ぼすのかを評価した。そこで、5'末端に1個のG-クランプリンカー (PO) を導入したオリゴ核酸 (ODN 1X) および3個のG-クランプリンカー (PO) を導入したオリゴ核酸 (ODN 2X) について、それぞれ一本鎖状態と、これらオリゴ核酸を表7に示すオーバーハング配列を有する標的オリゴDNAまたはオリゴRNAとの二本鎖状態での蛍光スペクトルを測定した。結果を図1~4に示す。

[0193] 図1に示すように、1個のG-クランプリンカー (PO) を5'末端に導入したオリゴ核酸 (ODN 1X) において、オーバーハングを含まない標的オリゴDNA (図1のYYYYなし) との二本鎖は、一本鎖状態のODN 1Xとほぼ同様の蛍光スペクトルを示した。次いで、ODN 1Xとグアニンを含まないオーバーハングを有する標的オリゴDNAとの二本鎖 (図1のCAT A)、ODN 1Xとグアニンを有するオーバーハングを含む標的オリゴDNAとの二本鎖 (図1のCGGT、CTGG、CAGT、およびCATG) の順で蛍光強度が低下した。

[0194] 図2に示すように、3個のG-クランプリンカー (PO) を5'末端に導

入したオリゴ核酸（ODN 2X）においては、オーバーハングを含まない標的オリゴDNAとの二本鎖（図2のYYYYなし）とグアニンを含まないオーバーハングを有する標的オリゴDNAとの二本鎖（図2のCAT A）が、一本鎖状態のODN 2Xとほぼ同様の蛍光スペクトルを示した。ODN 2Xとグアニン1個を含んだオーバーハングを有するオリゴDNAとの二本鎖（図2のCAGTおよびCATG）の群、そして、ODN 2Xとグアニン2個を含んだオーバーハングを含むオリゴDNAとの二本鎖（図2のCGGTおよびCTGG）の群の順で蛍光強度が低下した。

[0195] 図3に示すように、1個のG-クランプリンカー（PO）を5'末端に導入したオリゴ核酸（ODN 1X）において、オーバーハングを含まない標的オリゴRNAとの二本鎖（図3のYYYYなし）は、一本鎖状態のODN 1Xとほぼ同様の蛍光スペクトルを示した。ODN 1Xとグアニンを含まないオーバーハングを有する相補鎖RNAとの二本鎖（図3のCAUA）は、ODN 1Xと比較して、蛍光強度が半分程度低下した。それ以外の、ODN 1Xとオーバーハングを有するオリゴRNAとの二本鎖は、ほぼ同様の蛍光強度であり最も低かった。

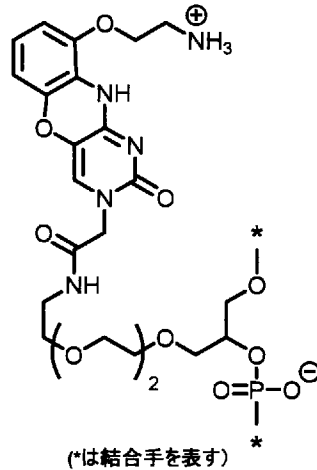
[0196] 図4に示すように、3個のG-クランプリンカー（PO）を5'末端に導入したオリゴ核酸（ODN 2X）においては、オーバーハングを含まないオリゴRNAとの二本鎖（図4のYYYYなし）とグアニンを含まないオーバーハングを有するオリゴRNAとの二本鎖（図4のCAUA）が、一本鎖状態のODN 2Xとほぼ同様の蛍光スペクトルを示した。また、ODN 2Xとグアニン2個を中心に含んだオーバーハングを有するオリゴRNAとの二重鎖（図4のCGGU）の蛍光強度が最も低かった。

[0197] (3) 二重鎖形成能および塩基識別能についての評価

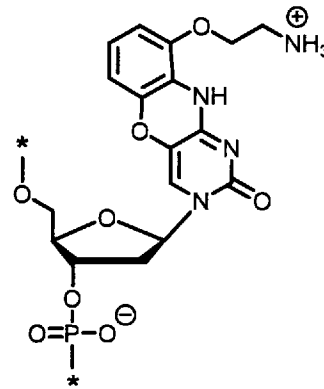
上記で得られたG-クランプリンカー（PO）と、以下で表されるdG-クランプ（公知化合物由来）（Obikaら、Chem. Eur. J., 2021, 27, 2427-2438）と対比すると、これらの間には糖部骨格の有無に相違があるものの、これらは共通する含窒素複素環構造（G-クランプともいう）で構成される人

工塩基を有しており、当該G-クランプリンカー（PO）もまた、dG-クランプと同様に、シトシンに対する選択的な塩基識別能があるとも考えられる。このことから、これらの融解温度を測定し対比した。

[0198] [化35]



G-クランプリンカー(PO)



dG-クランプ(PO)  
(公知化合物由来)

[0199] 具体的には、以下の配列のオリゴヌクレオチドを合成および精製した：



- (1) X = G-クランプリンカー (PO) (ODN 3X)、
- (2) X = dG-クランプ (PO)
- (3) X = 2'-デオキシシチジン (dC) (配列番号16)

[0200] 標的鎖として一本鎖オリゴDNA 3' - d (CGCAAYAAACGA) - 5' (配列番号17および18) について、Yがグアニン (G) である場合 (配列番号17)、および一本鎖オリゴRNA 3' - r (CGCAAYAAACGA) - 5' について、Yがグアニン (G) である場合 (配列番号18) の各オリゴヌクレオチドの二重鎖形成能 (結合親和性) を調べた。

[0201] オリゴヌクレオチドの二重鎖形成能を、上記と同様にして、各種オリゴヌクレオチドと標的鎖とをアニーリング処理して二重鎖を形成させた後、 $T_m$ 値を測定した。より詳細には、各オリゴヌクレオチド (終濃度  $2 \mu\text{M}$ ) と塩化ナトリウム (終濃度  $100 \text{mM}$ ) のリン酸緩衝液 ( $10 \text{mM}$ ,  $\text{pH} 7.0$ )

のサンプル溶液を100℃で加熱し、室温までゆっくり冷却した。その後、窒素気流下で5℃まで冷却し、測定を開始した。0.5℃/分で90℃まで昇温し、0.5℃間隔で260nmにおける吸光度をプロットした。T<sub>m</sub>値を中線法により算出し、独立した3回の測定における平均値とした。結果を表8に示す。

[0202] [表8]

X	T <sub>m</sub> (°C) (ΔT <sub>m</sub> : (G-クランプリンカー(PO)部分または dG-クランプ部分)-dC)	
	Y= G	
	DNA	RNA
G-クランプリンカー(PO)	30 (-15)	34 (-20)
dG-クランプ(PO)	61 (+16)	67 (+13)
dC	45	54

[0203] 標的鎖として一本鎖オリゴDNA 3' - d (CGCAAYAAACGA) - 5' (配列番号19~21) について、Yがミスマッチである場合 (すなわち:

- (1) Y = シトシン (C) (配列番号19)
- (2) Y = アデニン (A) (配列番号20)
- (3) Y = チミン (T) (配列番号21)

である場合) の各オリゴヌクレオチドの二重鎖形成能を上記表8のために行った操作と同様にして調べた。結果を表9に示す。

[0204] [表9]

X	T <sub>m</sub> (°C) (ΔT <sub>m</sub> : ミスマッチ-マッチ)			
	マッチ		ミスマッチ	
	Y=G	Y=C	Y=A	Y=T
G-クランプリンカー(PO)	30	17 (-13)	13 (-17)	16 (-14)
dG-クランプ(PO)	61	24 (-37)	38 (-23)	34 (-27)
dC	45	24 (-21)	32 (-13)	29 (-16)

[0205] さらに、標的鎖として一本鎖オリゴRNA 3' - r (CGCAAYAAA CGA) - 5' (配列番号22~24) について、Yがミスマッチである場合 (すなわち:

- (1) Y = シトシン (C) (配列番号22)
- (2) Y = アデニン (A) (配列番号23)
- (3) Y = ウラシル (U) (配列番号24)

である場合) の各オリゴヌクレオチドの二重鎖形成能を上記表7のために行った操作と同様にして調べた。結果を表10に示す。

[0206] [表10]

X	$T_m$ (°C) ( $\Delta T_m$ : ミスマッチ-マッチ)			
	マッチ		ミスマッチ	
	Y=G	Y=C	Y=A	Y=U
G-クランプリンカー(PO)	34	13 (-21)	15 (-19)	23 (-11)
dG-クランプ(PO)	67	38 (-29)	44 (-23)	41 (-26)
dC	54	32 (-22)	39 (-15)	31 (-23)

[0207] 表8~10に示すように、対面塩基がマッチのグアニンを有する標的一本鎖オリゴDNAおよび一本鎖オリゴRNAのそれぞれを用いた場合において、G-クランプリンカー(PO)を導入したオリゴヌクレオチド(ODN 3X)は、dG-クランプ(PO)やdCを含む相当するオリゴヌクレオチドと比較して、 $T_m$ 値は大きく低下した。一方で、G-クランプリンカー(PO)を導入したオリゴヌクレオチド(ODN 3X)は、標的一本鎖オリゴDNAおよび一本鎖オリゴRNAにおいても、対面塩基がグアニンである時と比較して、対面塩基がシトシン、アデニンまたはチミンのいずれかであると10°C以上低下していた。このことから、G-クランプリンカー(PO)を導入したオリゴヌクレオチド(ODN 3X)は、dG-クランプ(PO)またはdCを用いる場合と比較して、マッチグアニン配列に対しては親和性が低下するが、塩基認識能は同様に保持していることがわかる。

[0208] (実施例4: マウス投与用のアンチセンスオリゴヌクレオチドの作製と評価

)

(1) マウス投与用アンチセンスオリゴヌクレオチドの作製手順

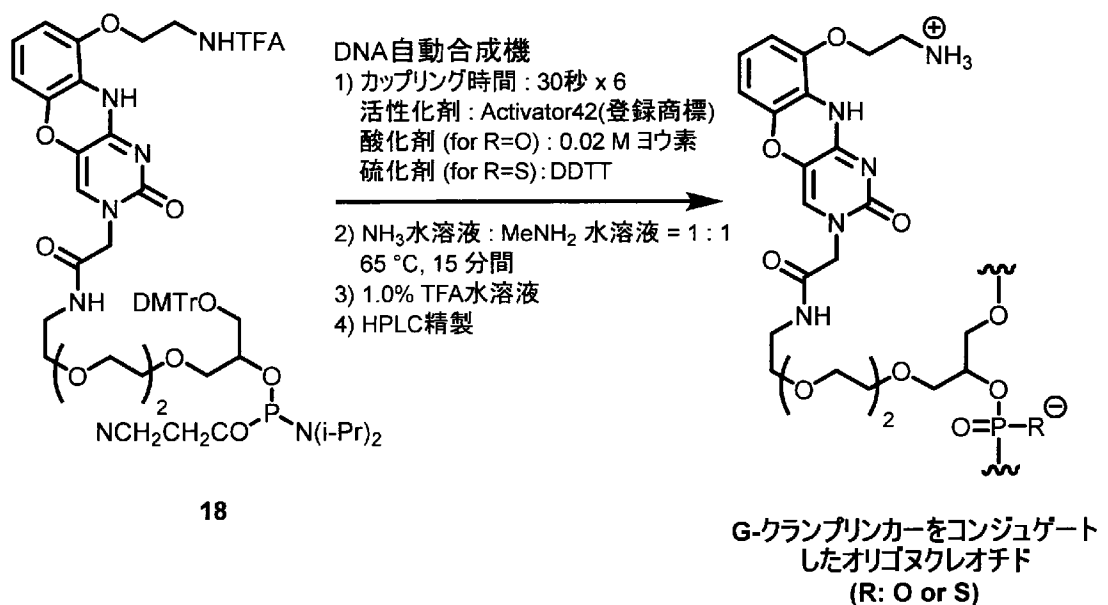
G-クランプリンカー (PO) またはG-クランプリンカー (PS) (これらをまとめて単に「G-クランプリンカー」ともいうこともある) をコンジュゲートさせたアンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO) のマウスの各臓器での発現抑制効果を検証するため、表12のようなG-クランプリンカーをコンジュゲートしたASOを設計・合成した。マウスMALAT1 (Metastasis Associated in Lung Adenocarcinoma Transcript-1) を標的とし、G. Hungらによって報告されている配列 (Nucleic Acid Ther., 2013, 23, 369-378) のcETを2', 4'-BNA/LNAに置換したギャップマー型のPSオリゴ核酸とした。このASOの5'末端にG-クランプリンカー (PO) またはG-クランプリンカー (PS) を1個または3個導入した、GCL(10)、GCL(30)、GCL(1S)、GCL(3S)の4種類を設計した。コンジュゲート体名の定義として、カッコの前のGCLは、G-クランプリンカー (PO) またはG-クランプリンカー (PS) をコンジュゲートしたASOを意味し、GCLの後のカッコの中の数字はG-クランプリンカー (PO) またはG-クランプリンカー (PS) の導入数、「O」や「S」はG-クランプリンカーに含まれる結合がそれぞれPOかPSかを表す。更に、例えば、カッコなしでGCLと表記する場合には、4種類全てを含むものとする。また例えば、GCL3と示す場合には、GCL(30)とGCL(3S)の2種類を含むものとする。

[0209] なお、比較対象として、以下に示すdG-クランプやdtC<sup>o</sup>も同様にASOにコンジュゲートした、GCS(4種類)、PXS(4種類)も同様に合成した。(これらの構造を表12に示す)。

[0210] GCL(10)、GCL(1S)、GCL(30)、GCL(3S)は、化合物18 (G-クランプリンカー部分を含むアミダイト体) を用い、DNA自動合成機 (GeneDesign社製nS-8 Oligonucleotides Synthesizer) で合成した。1.0 μmolスケール、DMTr<sup>o</sup>nモードで行った。5-[3, 5-ビス(トリフルオロメチル)フェニル]-1H-テトラゾール (Activator42 (登録商標)) をすべて

のカップリング工程で活性剤として使用した。酸化剤にはヨウ素水を、硫化剤には3-[(ジメチルアミノメチレン)アミノ]-3H-1,2,4-ジチアゾール-5-チオン, DDTT)を用いた。化合物18、天然体、および<sup>m</sup>C以外の2',4'-BNA/LNA改変体ホスホロアミダイトを、ACN溶液中で100mMにて調製し、<sup>m</sup>C 2',4'-BNA/LNA改変ホスホロアミダイトを、ACN/THF(1/1)溶液中で100mMにて調製した。化合物18、天然体、および2',4'-BNA/LNA改変体のカップリング時間は、それぞれ180秒間、30秒間、および12分間で行った。固体(CPG)で支持されたオリゴヌクレオチドを切断し、各核酸塩基およびホスホロジエステル結合の保護基を、混合溶液(メチルアミン水溶液(40%)およびアンモニア水溶液(28%)(容量比1:1))で65℃にて15分間除去した。

[0211] [化36]



[0212] DMT r基を有する粗オリゴヌクレオチドを脱DMT r化し、簡易逆相カラム(Waters Sep-Pak (登録商標) Plus C18 Environmental Cartridges)で簡易精製した。具体的な手順として、Sep-Pakに粗オリゴヌクレオチドを添加した後、10%ACN水溶液で洗浄した。続いて、1%トリフルオロ酢酸水

溶液で脱DMTr化し、40%MeOH水溶液でオリゴヌクレオチドを溶出させた。次に、Waters社製 XBridge™ OST C18 2.5 μm (10×50mm) 逆相HPLC用カラムを用いて、溶離液Aに100mM酢酸トリエチルアンモニウム (TEAA) 緩衝液 (pH=7.0)、溶離液BにMeOHを用いるグラジエント溶離法により、HPLCでオリゴヌクレオチドを精製した。

[0213] 精製オリゴヌクレオチドの成分確認を、Waters社製XBridge™ OST C18 2.5 μm (4.6×50mm) での逆相HPLCおよびMALDI-TOF質量分析計で行った。全体の収率を260nmでのUV吸光度から計算した。なお、逆相HPLCの測定方法と条件は以下の表11の通りであった。

[0214] なお、GCS(10)、GCS(1S)、GCS(30)、GCS(3S)、PXS(10)、PXS(1S)、PXS(30)、PXS(3S)については株式会社ジーンデザインにて合成・精製を実施した。該アンチセンスオリゴヌクレオチドの配列情報は、表12の通りである。

[0215] [表11]

一般条件
分取クロマトグラフィー：Waters社製XBridge™ OST C18 2.5 μm (10×50mm)
分析クロマトグラフィー：Waters社製XBridge™ OST C18 2.5 μm (4.6×50 mm)
分取条件の流速：4.0mL/分
分析条件の流速：1.0mL/分
オリゴヌクレオチド検出用のUVの波長：260nm
カラムオープンの温度：50℃
溶離液A：100 mM TEAA (pH 7.0) 緩衝液
溶離液B：MeOH
分取条件と分析条件の両方でのMeOHのグラジエント (20分)
リテンションタイム (Rt) (分) (分析カラム条件)；
5-70%；ODN GCL(10) (Rt：11.2分)、ODN GCL(30) (Rt：11.5分)、ODN GCL(1S) (Rt：11.3分)、ODN GCL(3S) (Rt：11.8分)

[0216]

[表12]

ASO	配列(5'—3')	MALDI-TOF-Mass	
		計算値 [M-H]	測定値 [M-H]
GCL(10)	5'-XC <sup>ˆ</sup> TA <sup>ˆ</sup> gttcactgaa <sup>ˆ</sup> TGC-3' (配列番号 25)	5877.8	5879.2
GCL(30)	5'-XXXC <sup>ˆ</sup> TA <sup>ˆ</sup> gttcactgaa <sup>ˆ</sup> TGC-3' (配列番号 26)	7048.8	7050.4
GCL(1S)	5'-XC <sup>ˆ</sup> TA <sup>ˆ</sup> gttcactgaa <sup>ˆ</sup> TGC-3' (配列番号 27)	5893.8	5893.9
GCL(3S)	5'-XXX <sup>ˆ</sup> C <sup>ˆ</sup> TA <sup>ˆ</sup> gttcactgaa <sup>ˆ</sup> TGC-3' (配列番号 28)	7096.9	7098.1
GCS(10)	5'-YC <sup>ˆ</sup> TA <sup>ˆ</sup> gttcactgaa <sup>ˆ</sup> TGC-3' (配列番号 29)	5732.6	5731.7
GCS(30)	5'-YYYC <sup>ˆ</sup> TA <sup>ˆ</sup> gttcactgaa <sup>ˆ</sup> TGC-3' (配列番号 30)	6610.9	6608.3
GCS(1S)	5'-YC <sup>ˆ</sup> TA <sup>ˆ</sup> gttcactgaa <sup>ˆ</sup> TGC-3' (配列番号 31)	5748.5	5747.7
GCS(3S)	5'-YYY <sup>ˆ</sup> C <sup>ˆ</sup> TA <sup>ˆ</sup> gttcactgaa <sup>ˆ</sup> TGC-3' (配列番号 32)	6654.5	6656.5
PXS(10)	5'-ZC <sup>ˆ</sup> TA <sup>ˆ</sup> gttcactgaa <sup>ˆ</sup> TGC-3' (配列番号 33)	5671.9	5672.6
PXS(30)	5'-ZZZC <sup>ˆ</sup> TA <sup>ˆ</sup> gttcactgaa <sup>ˆ</sup> TGC-3' (配列番号 34)	6433.1	6431.1
PXS(1S)	5'-ZC <sup>ˆ</sup> TA <sup>ˆ</sup> gttcactgaa <sup>ˆ</sup> TGC-3' (配列番号 35)	5688.2	5688.7
PXS(3S)	5'-ZZZ <sup>ˆ</sup> C <sup>ˆ</sup> TA <sup>ˆ</sup> gttcactgaa <sup>ˆ</sup> TGC-3' (配列番号 36)	6477.0	6479.3

X : G-クランプリンカー部分

Y : dG-クランプ部分

Z : dtC<sup>o</sup>部分

<sup>ˆ</sup> : ホスホロチオエート結合 (PS 結合)

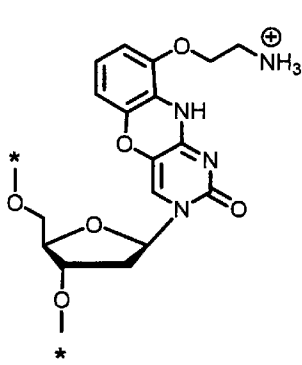
a, g, c, t : dA, dG, dC, T

A, G, C, T : 2', 4'-BNA/LNA with adenine, guanine, 5-methylcytosine and thymine

[0217] なお、本明細書において、用語「dG-クランプ部分」、「dG-クランプ(P O)」、「dG-クランプリンカー(PS)」、「dtC<sup>o</sup>部分」、「dtC<sup>o</sup>(P O)」および「dtC<sup>o</sup>(PS)」はそれぞれ以下の構造を指して言う。

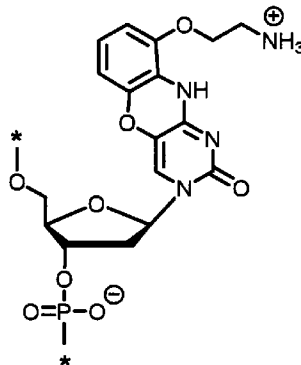
[0218]

[化37]



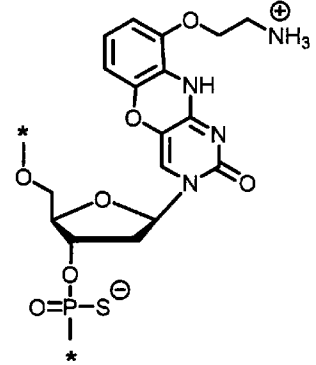
(\*は結合手を表す)

dG-クランプ部分



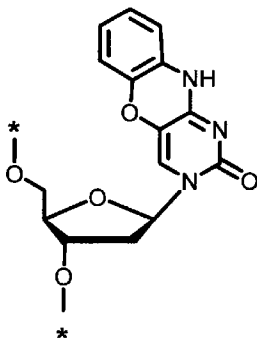
(\*は結合手を表す)

dG-クランプ(PO)



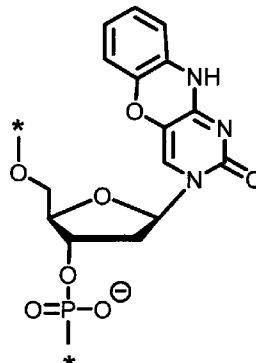
(\*は結合手を表す)

dG-クランプ(PS)



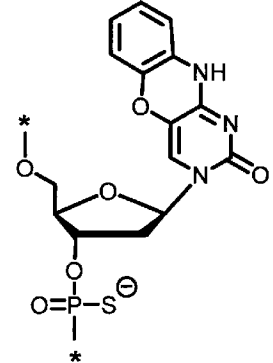
(\*は結合手を表す)

dtC°部分



(\*は結合手を表す)

dtC°(PO)



(\*は結合手を表す)

dtC°(PS)

[0219] (2) マウス投与用アンチセンスオリゴヌクレオチドの T<sub>m</sub> 値の評価

GCL、GCS、PXS中の5'末端に導入した、それぞれG-クランプリンカー、dG-クランプ、dtC°が、mMALAT1-RNA標的配列に結合する際に与える影響を評価するために、mMALAT1-RNAのモデル配列を用いて、T<sub>m</sub>測定により評価した。この標的モデルRNA配列は、ASOと相補的な配列部(16-mer)の3'側にオーバーハング領域となるGAAGを含む20-merの配列とした。マウス投与用のアンチセンスオリゴヌクレオチドの二重鎖形成能を、上記と同様にして、各種オリゴヌクレオチドと標的鎖とをアニーリング処理して二重鎖を形成させた後、T<sub>m</sub>値を測定した。より詳細には、各オリゴヌクレオチド(終濃度2 μM)と塩化ナトリウム(終濃度100 mM)のリン酸緩衝液(10

mM, pH 7.0) のサンプル溶液を 100℃で加熱し、室温までゆっくり冷却した。その後、窒素気流下で 5℃まで冷却し、測定を開始した。0.5℃/分で 90℃まで昇温し、0.5℃間隔で 260nm における吸光度をプロットした。T<sub>m</sub> 値を中線法により算出し、独立した 3 回の測定における平均値とした。結果を表 13 に示す。

[0220] [表13]

ASO	T <sub>m</sub> (ΔT <sub>m</sub> = T <sub>m</sub> - T <sub>m</sub> (naked ASO/oRNA)) (°C)			
	x:1		x:3	
	y: O	y: S	y: O	y: S
GCL(xy)	58 (+5)	57 (+4)	59 (+6)	58 (+5)
PXS(xy)	58 (+5)	58 (+5)	59 (+6)	58 (+5)
GCS(xy)	67 (+14)	66 (+13)	71 (+18)	71 (+18)

標的RNA配列 (oRNA) : 3'-r(GAAGGAUCAAGUGACUUACG)-5' (3'側の4-merがoverhang領域) (配列番号 37)

Naked ASO/oRNAのT<sub>m</sub>値は53℃。

[0221] GCLとPXSとでは、リガンド数に関わらず同等の T<sub>m</sub> 値を示した。また、GCL、PXS、GCSでは、PO結合、PS結合に関わらず同等の T<sub>m</sub> 値を示し、naked ASOよりもGCL、PXSは 4℃から 6℃、GCSは 13℃から 18℃も T<sub>m</sub> 値を上昇させた。標的oRNAのオーバーハング中の 5' 側(3' -GAAG-5')がグアニンになるため、GCL、PXS、GCSともに、それぞれG-クランプリンカー、dT C<sup>o</sup>、dG-クランプが、oRNAの相補マッチグアニンに対して水素結合形成し安定化に寄与したものと考えられる。

[0222] (3) マウス投与用のアンチセンスオリゴヌクレオチドの評価

(ASO投与および臓器採取)

マウス (B a l b / c、雌、5 週齢、7 匹) を日本エスエルシー株式会社より購入し、動物実験施設に搬入した。少なくとも 5 ~ 7 日間のマウスの馴化期間の後、マウス個体当たり 100 μg となるように調製した GCL、GCS、および PXS の生理食塩水溶液を尾静脈に単回投与した。比較対象として非コン

ジュゲートASO（リガンドおよびリンカーを結合していないASO：「naked ASO」）をマウス個体当たり100 $\mu$ gになるように調製した生理食塩水溶液を尾静脈に単回投与した。ネガティブコントロールは生理食塩水とした。

[0223] ASO投与から72時間後、3種混合麻酔薬（メドミジン・ミダゾラム・ブトルファノール）の腹腔内投与によりマウスを麻酔し、開腹後、腹部大動脈を切開することで脱血死させ、大腿より25～50mgの骨格筋組織を採取し、あらかじめ500 $\mu$ L／チューブのRNAprotect Tissue Reagent (Thermo)を分注した96-well Collection Microtubes (Qiagen)の各2mLチューブに入れ、組織片が試薬に浸漬された状態で保存（-30 $^{\circ}$ C）した。

[0224] (total RNA調製、逆転写およびリアルタイムPCR)

回収した組織片からのtotal RNA抽出にはMagMAX mirVana Total RNA Isolation Kit (Thermo; 以下mirVanaキットという)を使用した。組織片を保存している96-well Collection Microtubesを遠心分離（1000 $\times$ g, 3分間、4 $^{\circ}$ C）し、RNAprotect Tissue Reagentを除去した後、mirVanaキット添付のlysis buffer（0.7%の2-メルカプトエタノール添加）およびステンレスビーズ（5mm径、QIAGEN）1個をCollection Microtubesの各チューブに加え、TissueLyser II (QIAGEN)により室温下、30Hz、2分間のホモジナイズ処理を5回以上繰り返すことで組織ホモジネートを作製した。

[0225] 組織ホモジネートからのtotal RNAの抽出および精製をmirVanaキットのプロトコルに従って行い、工程をKingFisher Flex (Thermo)によって自動化した。各RNAサンプルの濃度を、Quant-iT RiboGreen RNA Assay Kit (Thermo)によって決定した。約10ngのtotal RNAからHigh-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo)を用いて逆転写産物を調製した。反応についてはキットのプロトコルに従った。各逆転写産物についてPowerUp SYBR Green Master Mix (Thermo)を用いてリアルタイムPCRを行った。PCRの内部コントロールはGapdhとした。PCR

反応はStepOnePlusリアルタイムPCRシステム (Thermo) によって実施し、95℃、20秒間の熱処理に引き続き、95℃、3秒の熱変性および60℃、30秒の伸長反応を45サイクル行った。Malat1発現量の解析を、Malat1およびGapdhの増幅曲線より得られるCt値の比較(ΔΔCt法)によって行った。結果を図5に示す。

[0226] 上記試験に用いたPCRプライマー配列を以下に示す：

mMalat1\_F4 : 5' -d(ACATTCCTTGAGGTGGCAA)-3' (配列番号38)

mMalat1\_R4 : 5' -d(CACCCGCAAAGGCCTACATA)-3' (配列番号39)

mGapdh\_F3 : 5' -d(TCACCACCATGGAGAAGGC)-3' (配列番号40)

mGapdh\_R3 : 5' -d(GCTAAGCAGTTGGTGGTGCA)-3' (配列番号41)

[0227] 図5に示すように、G-クランプリンカー1個をPO結合でASOに導入したGCL(10)は、骨格筋におけるmMALAT1 RNAの発現量を、naked ASOと比較して、統計的な有意差をもって抑制させており、肝臓以外の臓器、器官または組織として、少なくとも骨格筋に対して非常に優れた活性を有していた。このことから、実施例1で作製されたG-クランプリンカーは、骨格筋に対して選択的に核酸医薬を送達するドラッグデリバリーシステム製剤に応用可能であることがわかる。

[0228] また、dtC°を3個、PS結合でASOに導入したPXS(3S)を投与した場合は、骨格筋におけるmMALAT1 RNAの発現量を、naked ASOと比較して、統計的な有意差をもって抑制させており、骨格筋において非常に優れた活性を有していた。このことから、dtC°も、肝臓以外の臓器、器官または組織として、少なくとも骨格筋に対して核酸医薬を送達するドラッグデリバリーシステム製剤に応用可能であることがわかる。

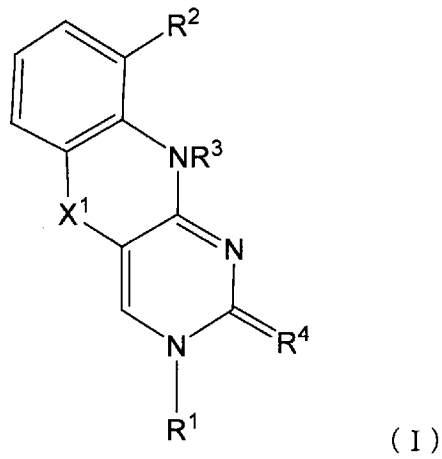
### 産業上の利用可能性

[0229] 本発明は、例えば、医薬品の開発および製造において有用である。

## 請求の範囲

[請求項1] 以下の式（1）で表される化合物、またはその薬学的に許容し得る塩：

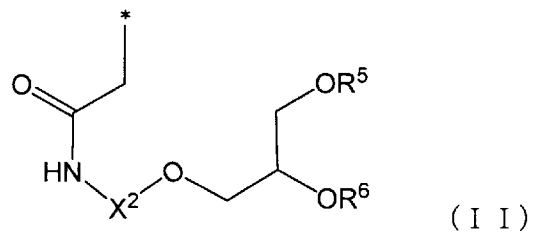
[化1]



(式（1）中、

R¹は、以下の式（11）：

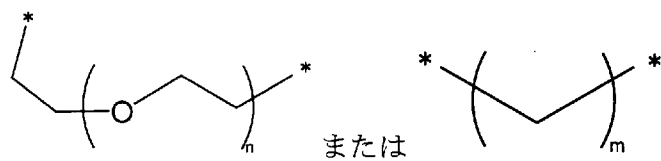
[化2]



(式（11）中、

X²は以下の式：

[化3]



(ここで、nは2～4のいずれかの整数であり、

mは2～4のいずれかの整数であり、そして  
\*は結合手である)で表される基であり、

R<sup>5</sup>は水素原子、分岐または環を形成していてもよい炭素数1～7のアルキル基、あるいは核酸合成の水酸基の保護基であり、

R<sup>6</sup>は、水素原子、核酸合成の水酸基の保護基、分岐または環を形成していてもよい炭素数1から7のアルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数2から7のアルケニル基、該α群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよくそしてヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数3から10のアリール基、α群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよくそしてヘテロ原子を含んでいてもよい炭素数3から12のアリール部分を有するアラルキル基、該α群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいアシル基、該α群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいシリル基、該α群から選択される任意の置換基を1以上有していてもよいリン酸基、核酸合成の保護基で保護されたリン酸基、 $-P(R^{14})R^{15}$  [式中、R<sup>14</sup>およびR<sup>15</sup>は、それぞれ独立して、水酸基、核酸合成の保護基で保護された水酸基、メルカプト基、核酸合成の保護基で保護されたメルカプト基、アミノ基、炭素数1から6のアルコキシ基、炭素数1から6のアルキルチオ基、炭素数1から6のシアノアルコキシ基、または炭素数1から6のアルキル基を有するジアルキルアミノ基を表す]を表し、

ここで、該α群は、水酸基、核酸合成の保護基で保護された水酸基、炭素数1から6の直鎖アルキル基、炭素数1から6の直鎖アルコキシ基、メルカプト基、核酸合成の保護基で保護されたメルカプト基、炭素数1から6の直鎖アルキルチオ基、アミノ基、炭素数1から6の直鎖アルキルアミノ基、核酸合成の保護基で保護されたアミノ基、およびハロゲン原子からなり、

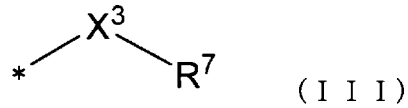
\*は結合手である)

で表される基であり、

$R^2$ は、水素原子、水酸基、ニトロ基、アミノ基、または以下の式

( I I I ) :

[化4]

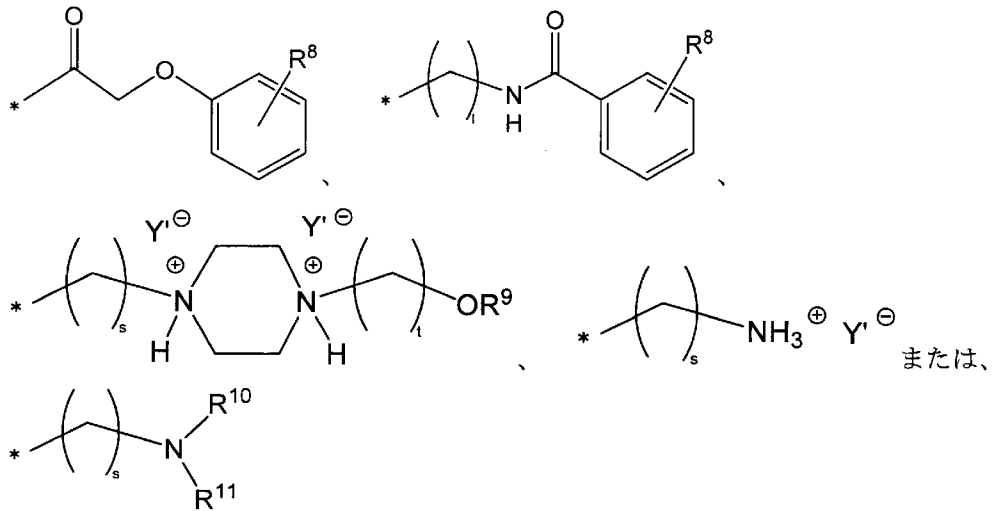


(式 ( I I I ) 中、

$X^3$ は酸素原子または硫黄原子であり、

$R^7$ は以下の式 :

[化5]



(ここで、

$R^8$ は水素原子、水酸基、分岐または環を形成していてもよい炭素数 1 ~ 7 のアルキル基、あるいは分岐または環を形成していてもよい炭素数 1 ~ 7 のアルコキシ基であり、

$R^9$ は水素原子、あるいは分岐または環を形成していてもよい炭素数 1 ~ 7 のアルキル基であり、

$R^{10}$ および  $R^{11}$ はそれぞれ独立して、水素原子、分岐または環を形成していてもよい炭素数 1 ~ 7 のアルキル基、またはアミノ基

の保護基であり、

Y' は薬学的に許容し得るアニオンであり、

s は 2 ~ 4 のいずれかの整数であり、

t は 2 ~ 4 のいずれかの整数であり、

l は 1 ~ 5 のいずれかの整数であり、

そして

\*は結合手である) で表される基である)

で表される基であり、

R<sup>3</sup>は水素原子、分岐または環を形成していてもよい炭素数 1 ~ 7 のアルキル基、またはアミノ基の保護基であり、

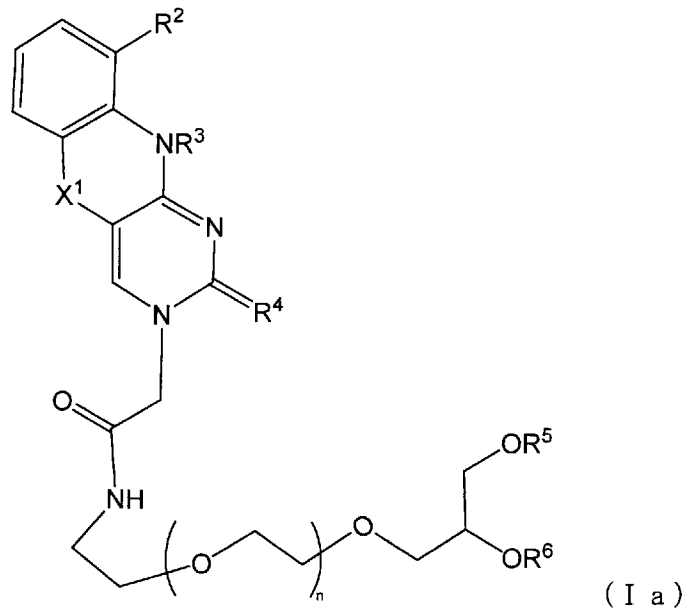
R<sup>4</sup>は酸素原子または硫黄原子であり、

X<sup>1</sup>は酸素原子または硫黄原子である)。

[請求項2]

前記式 (1) が以下の式 (1a) で表される、請求項 1 に記載の化合物、またはその薬学的に許容し得る塩：

[化6]



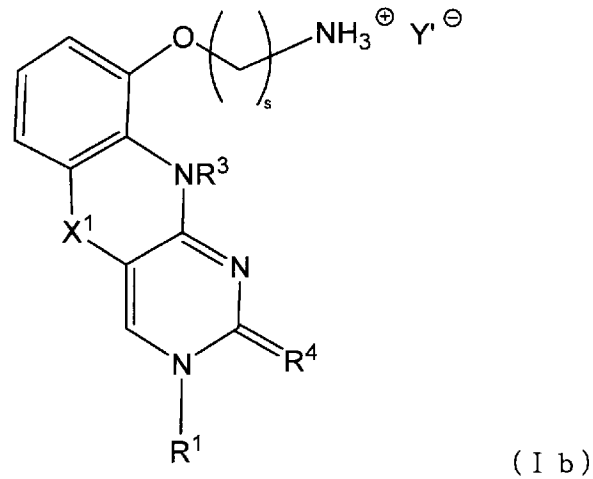
(式 (1a) 中、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>、X<sup>1</sup>、および n は上記に定義した通りである)。

[請求項3]

前記式 (1) が以下の式 (1b) で表される、請求項 1 に記載の化

化合物、またはその薬学的に許容し得る塩：

[化7]

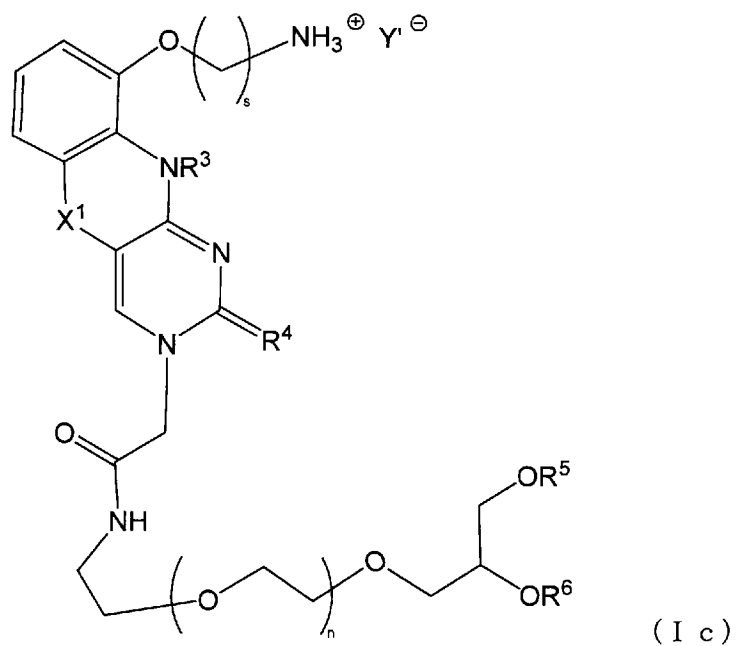


(式 ( I b ) 中、 $R^1$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $X^1$ 、 $Y'$ 、および  $s$  は上記に定義した通りである)。

[請求項4]

前記式 ( I ) が以下の式 ( I c ) で表される、請求項 1 に記載の化合物、またはその薬学的に許容し得る塩：

[化8]



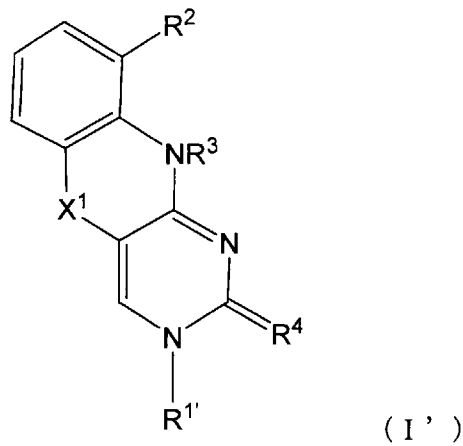
(式 ( I c ) 中、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $X^1$ 、 $Y'$ 、 $n$  および  $s$  は上

記に定義した通りである)。

[請求項5] 請求項1から4のいずれかに記載の化合物、またはその薬学的に許容し得る塩由来のリガンドを含む、ドラッグデリバリーシステム製剤。

[請求項6] ドラッグデリバリーシステム製剤であって、  
以下の式 (I') :

[化9]



(式 (I') 中、

R¹' は、

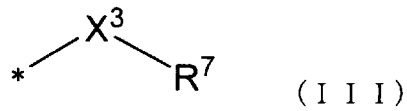
水素原子、分岐または環を形成していてもよい炭素数1~7のアルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数1~7のアルコキシ基、あるいは分岐していてもよい炭素数1~6のアルキルチオ基；もしくは

リボース-1-イル構造および2-デオキシリボース-1-イル構造からなる群から選択される化学構造を含むペントース部分；

であり、

R²は、水素原子、水酸基、ニトロ基、アミノ基、または以下の式 (III) :

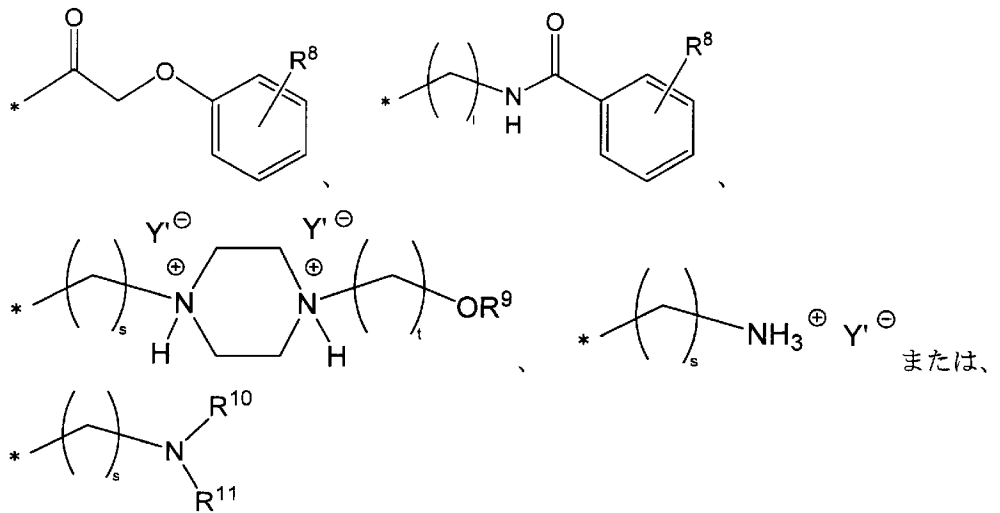
[化10]



(式 ( I I I ) 中、

X<sup>3</sup>は酸素原子または硫黄原子であり、R<sup>7</sup>は以下の式：

[化11]



(ここで、

R<sup>8</sup>は水素原子、水酸基、分岐または環を形成していてもよい炭素数1～7のアルキル基、あるいは分岐または環を形成していてもよい炭素数1～7のアルコキシ基であり、

R<sup>9</sup>は水素原子、あるいは分岐または環を形成していてもよい炭素数1～7のアルキル基であり、

R<sup>10</sup>およびR<sup>11</sup>はそれぞれ独立して、水素原子、分岐または環を形成していてもよい炭素数1～7のアルキル基、またはアミノ基の保護基であり、

Y' は薬学的に許容し得るアニオンであり、

s は2～4のいずれかの整数であり、

t は 2 ~ 4 のいずれかの整数であり、

l は 1 ~ 5 のいずれかの整数であり、そして

\* は結合手である) で表される基である)

で表される基であり、

R<sup>3</sup> は水素原子、分岐または環を形成していてもよい炭素数 1 ~ 7 のアルキル基、またはアミノ基の保護基であり、

R<sup>4</sup> は酸素原子または硫黄原子であり、

X<sup>1</sup> は酸素原子または硫黄原子である)

で表される化合物、またはその薬学的に許容し得る塩由来のリガンドを含む、ドラッグデリバリーシステム製剤。

[請求項7] 前記式 (1') における R<sup>1'</sup> が前記ペントース部分である、請求項 6 に記載のドラッグデリバリーシステム製剤。

[請求項8] 前記ペントース部分が人工核酸モノマーから塩基部分が脱離した部分である、請求項 7 に記載のドラッグデリバリーシステム製剤。

[請求項9] 前記人工核酸モノマーが 2' , 4' -BNA/LNA モノマーである、請求項 8 に記載のドラッグデリバリーシステム製剤。

[請求項10] 前記リガンドが、ポリ核酸と結合したコンジュゲート体の形態で含有されている、請求項 5 から 9 のいずれかに記載のドラッグデリバリーシステム製剤。

[請求項11] 前記リガンドが、前記ポリ核酸の 5' 末端に結合している、請求項 10 に記載のドラッグデリバリーシステム製剤。

[請求項12] 前記コンジュゲート体が、1 つの前記ポリ核酸に対して 1 ~ 3 個の前記リガンドが結合したものである、請求項 10 または 11 に記載のドラッグデリバリーシステム製剤。

[請求項13] 前記ポリ核酸がオリゴヌクレオチドである、請求項 10 から 13 のいずれかに記載のドラッグデリバリーシステム製剤。

[請求項14] 前記オリゴヌクレオチドが、アンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA、または核酸アプタマーである、請求項 13 に記載のドラッグ

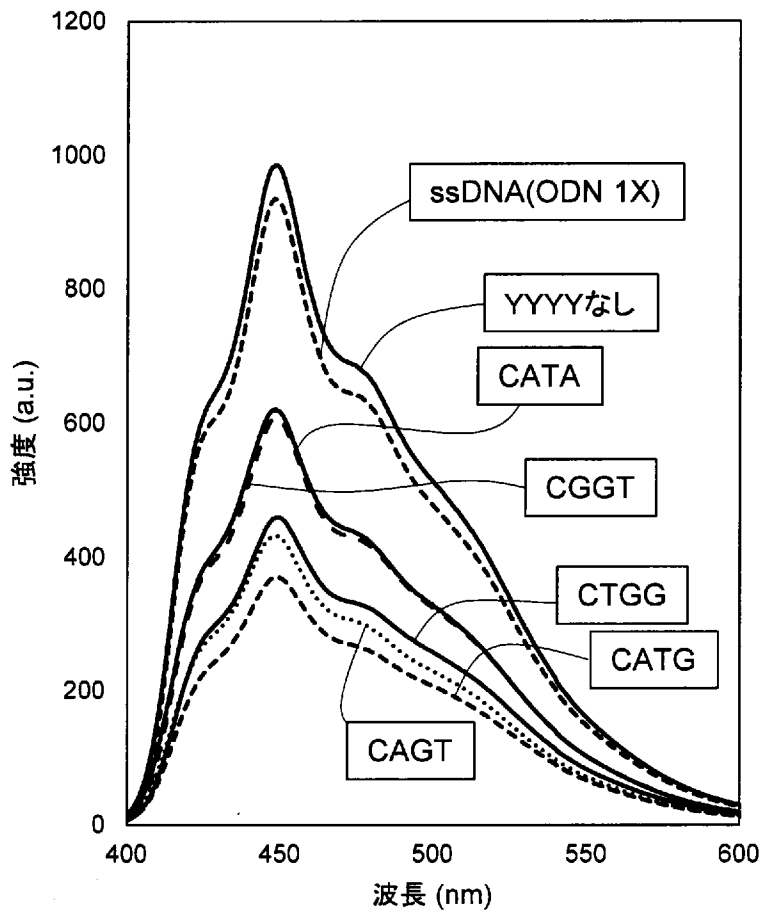
グデリバリーシステム製剤。

[請求項15] 骨格筋への送達のために用いられる、請求項5から14のいずれかに記載のドラッグデリバリーシステム製剤。

[請求項16] 請求項5から15のいずれかに記載のドラッグデリバリーシステム製剤を含有する、医薬品。

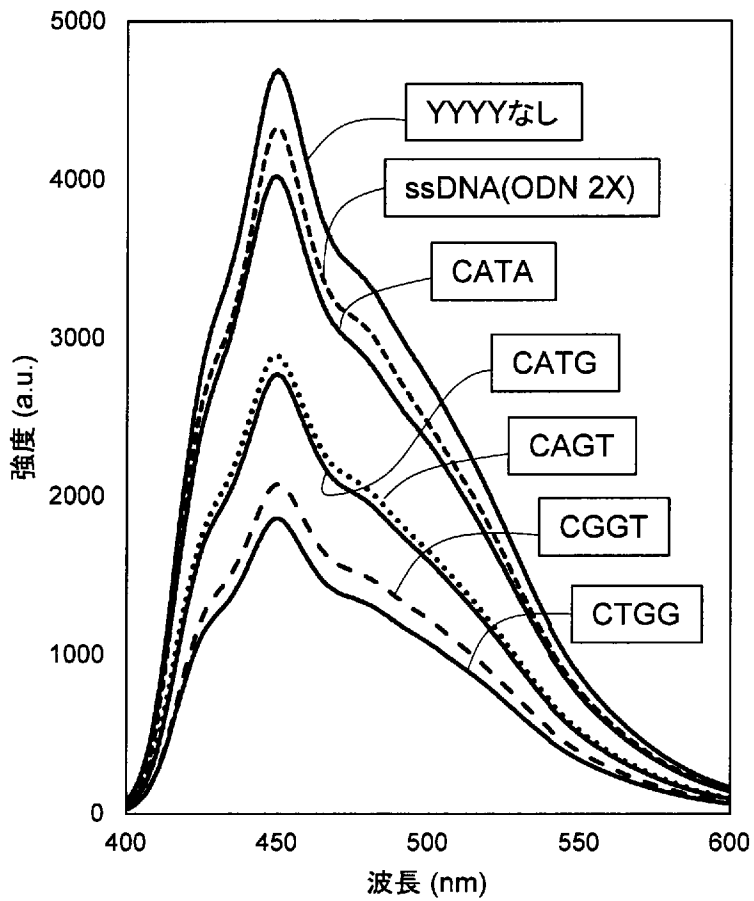
[図1]

DNAとハイブリダイズしたODN 1Xの蛍光スペクトル



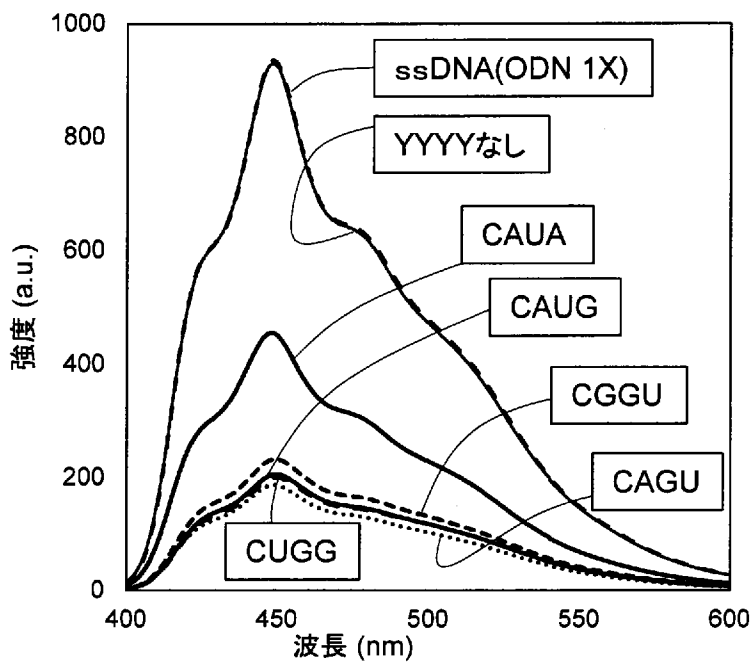
[図2]

DNAとハイブリダイズしたODN 2Xの蛍光スペクトル



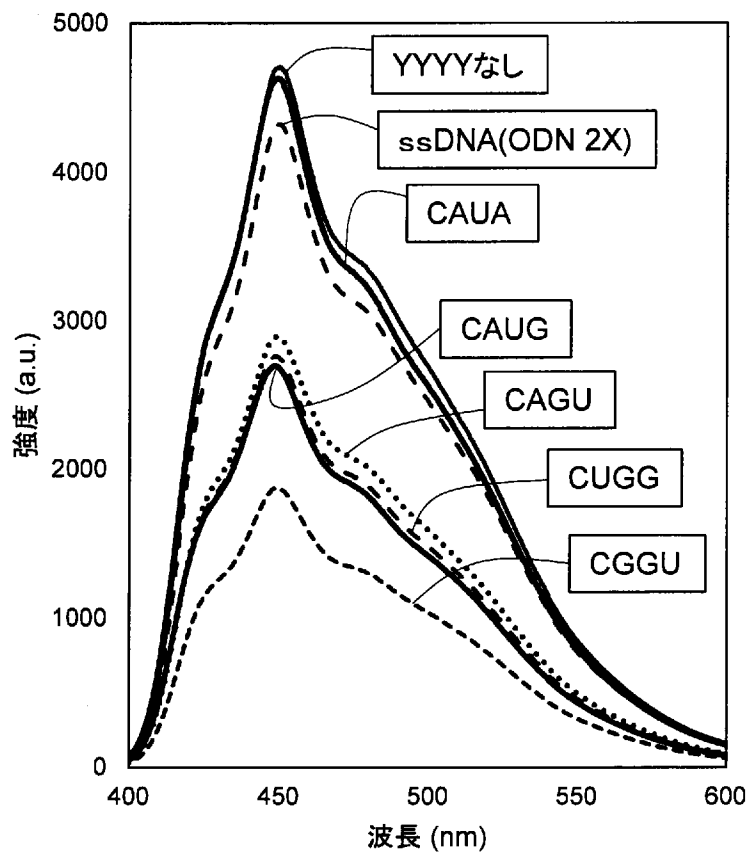
[図3]

RNAとハイブリダイズしたODN 1Xの蛍光スペクトル

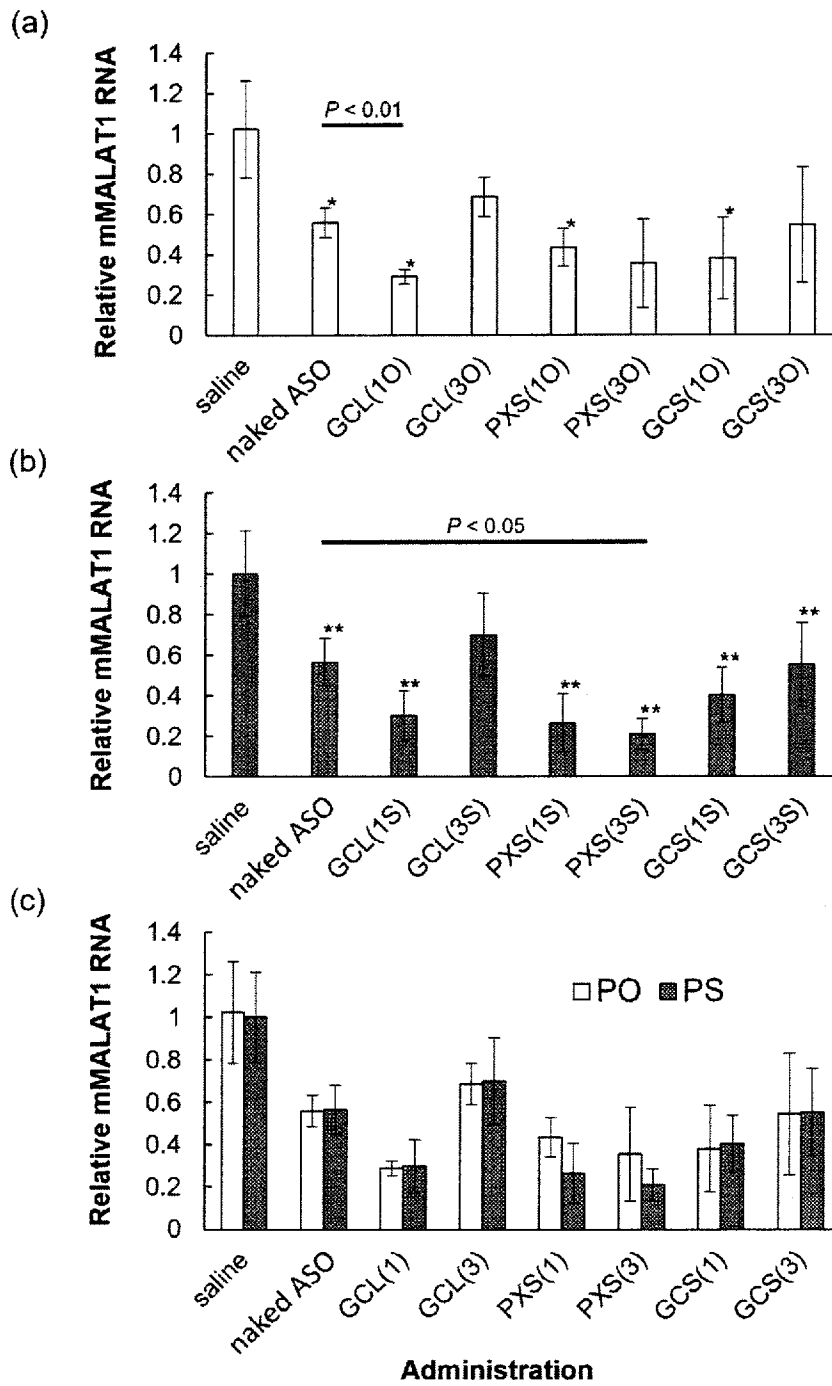


[図4]

RNAとハイブリダイズしたODN 2Xの蛍光スペクトル



[5]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/041129

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
<p><b>C07D 498/04</b>(2006.01)i; <b>A61K 31/5383</b>(2006.01)i; <b>A61K 31/7115</b>(2006.01)i; <b>A61K 48/00</b>(2006.01)i; <b>A61P 21/00</b>(2006.01)i; <b>C07H 19/23</b>(2006.01)i; <b>C12N 15/113</b>(2010.01)i; <b>C12N 15/115</b>(2010.01)i</p> <p>FI: C07D498/04 112T; A61K31/5383 ZNA; A61K31/7115; A61K48/00; A61P21/00; C07H19/23 CSP; C12N15/113 Z; C12N15/115 Z</p> <p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
C07D498/04; A61K31/5383; A61K31/7115; A61K48/00; A61P21/00; C07H19/23; C12N15/113; C12N15/115		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
<p>Published examined utility model applications of Japan 1922-1996</p> <p>Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2022</p> <p>Registered utility model specifications of Japan 1996-2022</p> <p>Published registered utility model applications of Japan 1994-2022</p>		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
CAplus/REGISTRY (STN)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2004/0033973 A1 (MANOHARAN, Muthiah) 19 February 2004 (2004-02-19) claims, paragraphs [0169]-[0176], [0220]-[0267]	6-14, 16
A		1-5, 15
A	US 2021/0189392 A1 (ALIGOS THERAPEUTICS, INC.) 24 June 2021 (2021-06-24) entire text	1-16
A	WO 2005/020885 A2 (ISIS PHARMACEUTICALS, INC.) 10 March 2005 (2005-03-10) entire text	1-16
A	US 2015/0111954 A1 (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD UNIVERSITY) 23 April 2015 (2015-04-23) entire text	1-16
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>“&amp;” document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
15 December 2022		27 December 2022
Name and mailing address of the ISA/JP		Authorized officer
<p>Japan Patent Office (ISA/JP)</p> <p>3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915</p> <p>Japan</p>		Telephone No.

**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
  - a.  forming part of the international application as filed:
    - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
    - on paper or in the form of an image file.
  - b.  furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
  - c.  furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
    - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
    - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

"The form of Annex C/ST.25 text file" above shall read as "the form of ST.26."

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

(Invention 1) Claims 1-5 and parts referring to claim 5 in claims 10-16 (hereinafter, referred to as "claims 1-5, etc.")

Claims 1-5, etc. have the special technical feature of a compound represented by formula (I), and are thus classified as invention 1.

(Invention 2) Claims 6-9 and parts other than the parts referring to claim 5 in claims 10-16 (hereinafter, referred to as "claims 6-9, etc.")

Claims 6-9, etc. share, with claim 1 classified as invention 1, the common technical feature of a structure except for R1 in formula (I). However, said technical feature does not make a contribution over the prior art in light of the disclosure of document 1, and thus cannot be said to be a special technical feature. Furthermore, there are no other same or corresponding special technical features between these inventions.

In addition, claims 6-9, etc. are not dependent on claim 1. Furthermore, claims 6-9, etc. are not substantially identical to or similarly closely related to any of the claims classified as invention 1.

Therefore, claims 6-9, etc. cannot be classified as invention 1.

In addition, claims 6-9, etc. has the special technical feature of a drug delivery system formulation containing a ligand derived from a compound represented by formula (I'), and are thus classified as invention 2.

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

- Remark on Protest**
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
  - The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
  - No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No. <b>PCT/JP2022/041129</b>
---

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
US 2004/0033973 A1	19 February 2004	(Family: none)	
US 2021/0189392 A1	24 June 2021	WO 2021/119325 A1 TW 202135832 A	
WO 2005/020885 A2	10 March 2005	(Family: none)	
US 2015/0111954 A1	23 April 2015	WO 2013/071079 A1	

<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））</p> <p>C07D 498/04(2006.01)i; A61K 31/5383(2006.01)i; A61K 31/7115(2006.01)i; A61K 48/00(2006.01)i; A61P 21/00(2006.01)i; C07H 19/23(2006.01)i; C12N 15/113(2010.01)i; C12N 15/115(2010.01)i</p> <p>FI: C07D498/04 112T; A61K31/5383 ZNA; A61K31/7115; A61K48/00; A61P21/00; C07H19/23 CSP; C12N15/113 Z; C12N15/115 Z</p>																				
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））</p> <p>C07D498/04; A61K31/5383; A61K31/7115; A61K48/00; A61P21/00; C07H19/23; C12N15/113; C12N15/115</p> <p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922 - 1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971 - 2022年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996 - 2022年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994 - 2022年</td> </tr> </table> <p>国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）</p> <p>CAplus/REGISTRY (STN)</p>			日本国実用新案公報	1922 - 1996年	日本国公開実用新案公報	1971 - 2022年	日本国実用新案登録公報	1996 - 2022年	日本国登録実用新案公報	1994 - 2022年										
日本国実用新案公報	1922 - 1996年																			
日本国公開実用新案公報	1971 - 2022年																			
日本国実用新案登録公報	1996 - 2022年																			
日本国登録実用新案公報	1994 - 2022年																			
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>US 2004/0033973 A1 (MANOHARAN MUTHIAH) 19.02.2004 (2004 - 02 - 19) 請求の範囲, [0169]-[0176], [0220]-[0267]</td> <td>6-14, 16</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td></td> <td>1-5, 15</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2021/0189392 A1 (Aligos Therapeutics, Inc.) 24.06.2021 (2021 - 06 - 24) 全文</td> <td>1-16</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2005/020885 A2 (ISIS PHARMACEUTICALS, INC.) 10.03.2005 (2005 - 03 - 10) 全文</td> <td>1-16</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2015/0111954 A1 (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD UNIVERSITY) 23.04.2015 (2015 - 04 - 23) 全文</td> <td>1-16</td> </tr> </tbody> </table>			引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	X	US 2004/0033973 A1 (MANOHARAN MUTHIAH) 19.02.2004 (2004 - 02 - 19) 請求の範囲, [0169]-[0176], [0220]-[0267]	6-14, 16	A		1-5, 15	A	US 2021/0189392 A1 (Aligos Therapeutics, Inc.) 24.06.2021 (2021 - 06 - 24) 全文	1-16	A	WO 2005/020885 A2 (ISIS PHARMACEUTICALS, INC.) 10.03.2005 (2005 - 03 - 10) 全文	1-16	A	US 2015/0111954 A1 (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD UNIVERSITY) 23.04.2015 (2015 - 04 - 23) 全文	1-16
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号																		
X	US 2004/0033973 A1 (MANOHARAN MUTHIAH) 19.02.2004 (2004 - 02 - 19) 請求の範囲, [0169]-[0176], [0220]-[0267]	6-14, 16																		
A		1-5, 15																		
A	US 2021/0189392 A1 (Aligos Therapeutics, Inc.) 24.06.2021 (2021 - 06 - 24) 全文	1-16																		
A	WO 2005/020885 A2 (ISIS PHARMACEUTICALS, INC.) 10.03.2005 (2005 - 03 - 10) 全文	1-16																		
A	US 2015/0111954 A1 (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD UNIVERSITY) 23.04.2015 (2015 - 04 - 23) 全文	1-16																		
<p><input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>																				
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの</p> <p>“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</p> <p>“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）</p> <p>“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献</p> <p>“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</p> <p>“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</p> <p>“&amp;” 同一パテントファミリー文献</p>																				
<p>国際調査を完了した日</p> <p>15. 12. 2022</p>	<p>国際調査報告の発送日</p> <p>27. 12. 2022</p>																			
<p>名称及びあて先</p> <p>日本国特許庁(ISA/JP)</p> <p>〒100-8915</p> <p>日本国</p> <p>東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>	<p>権限のある職員（特許庁審査官）</p> <p>櫛引 智子 4P 3235</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3457</p>																			

## 第 I 欄      ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

- a.  出願時における国際出願の一部を構成する配列表  
     附属書C/ST.25テキストファイル形式  
     紙形式又はイメージファイル形式
- b.  国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c.  国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表  
     附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))  
     紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)

2.  さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見:

上記「附属書 C/ST.25テキストファイル形式」は「ST.26形式」と読み替える。

## 第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

（発明1）請求項1-5及び請求項10-16のうち請求項5を引用する部分（以下、「請求項1-5等」という。）

請求項1-5等は、式（I）で表される化合物という特別な技術的特徴を有しているので、発明1に区分する。

（発明2）請求項6-9及び請求項10-16のうち請求項5を引用する部分以外（以下、「請求項6-9等」という。）

請求項6-9等は、発明1に区分された請求項1と、共通の技術的特徴として、式（I）のR1を除く構造を有している。しかしながら、当該技術的特徴は、文献1の開示内容に照らして、先行技術に対する貢献をもたらすものではないから、当該技術的特徴は、特別な技術的特徴であるとはいえない。また、これらの発明の間には、他に同一の又は対応する特別な技術的特徴は存在しない。

さらに、請求項6-9等は、請求項1の従属請求項ではない。また、請求項6-9等は、発明1に区分されたいずれの請求項に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にはない。

したがって、請求項6-9等は発明1に区分できない。

そして、請求項6-9等は、式（I'）で表される化合物由来のリガンドを含むドラッグデリバリーシステム製剤という特別な技術的特徴を有しているので、発明2に区分する。

- 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
- 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
- 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
- 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

国際調査報告  
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2022/041129

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
US 2004/0033973 A1	19.02.2004	(ファミリーなし)	
US 2021/0189392 A1	24.06.2021	WO 2021/119325 A1 TW 202135832 A	
WO 2005/020885 A2	10.03.2005	(ファミリーなし)	
US 2015/0111954 A1	23.04.2015	WO 2013/071079 A1	