

(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
2025年1月2日(02.01.2025)



(10) 国際公開番号

WO 2025/005147 A1

(51) 国際特許分類:

C07H 19/11 (2006.01) C07H 23/00 (2006.01)
C07H 19/213 (2006.01) C12N 15/113 (2010.01)
C07H 21/04 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2024/023211

(22) 国際出願日: 2024年6月26日(26.06.2024)

(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 2023-105223 2023年6月27日(27.06.2023) JP

(71) 出願人: 学校法人東京理科大学(TOKYO UNIVERSITY OF SCIENCE FOUNDATION) [JP/JP]; 〒1628601 東京都新宿区神楽坂一丁目3番地 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 和田 猛(WADA Takeshi); 〒1628601 東京都新宿区神楽坂一丁目3番地 学校法人東京理科大学内 Tokyo (JP). 佐藤 一樹(SATO Kazuki); 〒1628601 東京都新宿区神楽坂一丁目3番地 学校法人東京理科大学内 Tokyo

(JP). 赫多 聖(KAKUTA Kiyoshi); 〒1628601 東京都新宿区神楽坂一丁目3番地 学校法人東京理科大学内 Tokyo (JP).

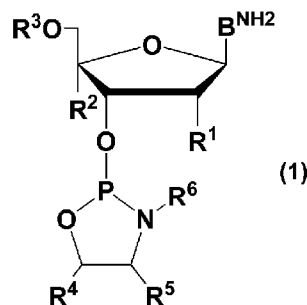
(74) 代理人: 正林 真之, 外(SHOBAYASHI Masayuki et al.); 〒1000005 東京都千代田区丸の内1-7-12 サピアタワー Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, 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, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(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,

(54) Title: NUCLEOTIDE MONOMER, AND METHOD FOR PRODUCING NUCLEIC ACID OLIGOMER

(54) 発明の名称: ヌクレオチドモノマー、及び核酸オリゴマーの製造方法



(57) Abstract: Provided is a novel nucleotide monomer that has a nucleobase with an unsubstituted amino group and yields a nucleic acid oligomer at a high yield. Also provided is a method for producing the nucleic acid oligomer at a high yield. The nucleotide monomer according to the present invention is represented by general formula (1). In the formula: R¹ represents a hydrogen atom or the like; R² represents a hydrogen atom; R¹ and R² are bonded to each other to form a prescribed 5-member or higher ring; R³ is a hydrogen atom or a protecting group of a hydroxyl group; R⁴ is an aryl group having or not having a substituent; R⁵ is a hydrogen atom or the like and R⁶ represents an alkyl group of three or more carbons, the alkyl group having or not having a substituent, and having or nor having a heteroatom in the molecular chain, or R⁵ and R⁶ are bonded to each other to form a prescribed 5-member or higher ring having a branched chain; B^{NH2} represents a nucleobase that is adenine A, guanine G, cytosine C, 5-methylcytosine ^mC, thymine, or uracil; and the amino group in A, G, C, and ^mC is not substituted.

MW, MZ, NA, RW, SC, 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)）

(57) 要約：アミノ基が置換されていない核酸塩基を有し、かつ、高い収率で核酸オリゴマーを与える新規なヌクレオチドモノマー、及び収率の高い核酸オリゴマーの製造方法を提供する。本発明に係るヌクレオチドモノマーは一般式（1）で表される。式中、 R^1 は水素原子等、 R^2 は水素原子を表し、又は、 R^1 及び R^2 は互いに結合して所定の5員以上の環を形成し、 R^3 は水素原子又は水酸基の保護基、 R^4 は置換基を有し又は有しないアリール基、 R^5 は水素原子等、 R^6 は置換基を有し又は有せず、かつ、分子鎖中にヘテロ原子を有し又は有しない炭素原子数3以上のアルキル基を表し、又は、 R^5 及び R^6 は互いに結合して、分岐鎖を有する所定の5員以上の環を形成し、 $B^{N^H^2}$ はアデニンA、グアニンG、シトシンC、5-メチルシトシン^mC、チミン、又はウラシルである核酸塩基を表し、A、G、C、及び^mC中のアミノ基は置換されていない。

明 細 書

発明の名称：

ヌクレオチドモノマー、及び核酸オリゴマーの製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、ヌクレオチドモノマー、及び核酸オリゴマーの製造方法に関する。

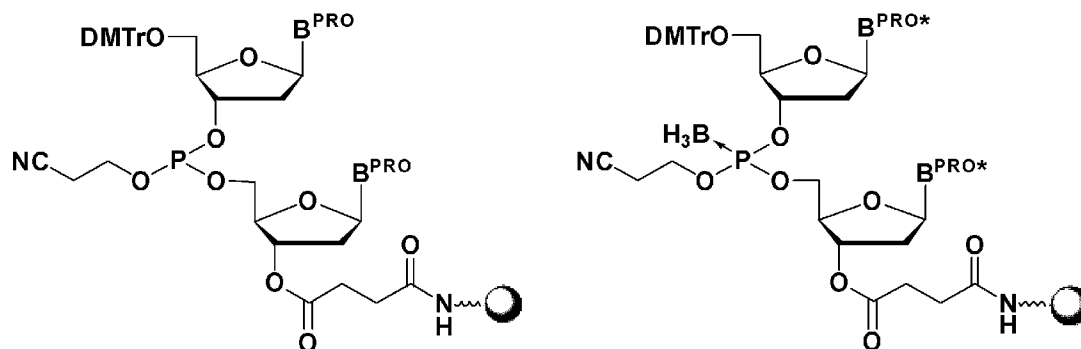
背景技術

[0002] 標的核酸と相補的な塩基配列を有するアンチセンス分子は、標的核酸と相補的な二重鎖を形成し、標的核酸からのタンパク質生成を阻害することができる。標的核酸として疾病関連遺伝子を選択した場合には、アンチセンス分子は、疾病関連遺伝子に直接働きかけるため、遺伝子治療に有効な医薬として注目されている。

[0003] アンチセンス分子（核酸オリゴマー）は、標的となるタンパク質の生成を効率よく阻害する観点から主として、細胞膜透過性、ヌクレアーゼ耐性、体内（例えば、pH 7.4 の環境下）での化学的安定性、及び特定の塩基配列とのみ安定な二重鎖を形成する性質を有することが求められる。アンチセンス分子としては、例えば、ボラノホスフェート化合物を用いて得られる核酸オリゴマー（以下、「ボラノホスフェート型核酸オリゴマー」と称する）が知られている。

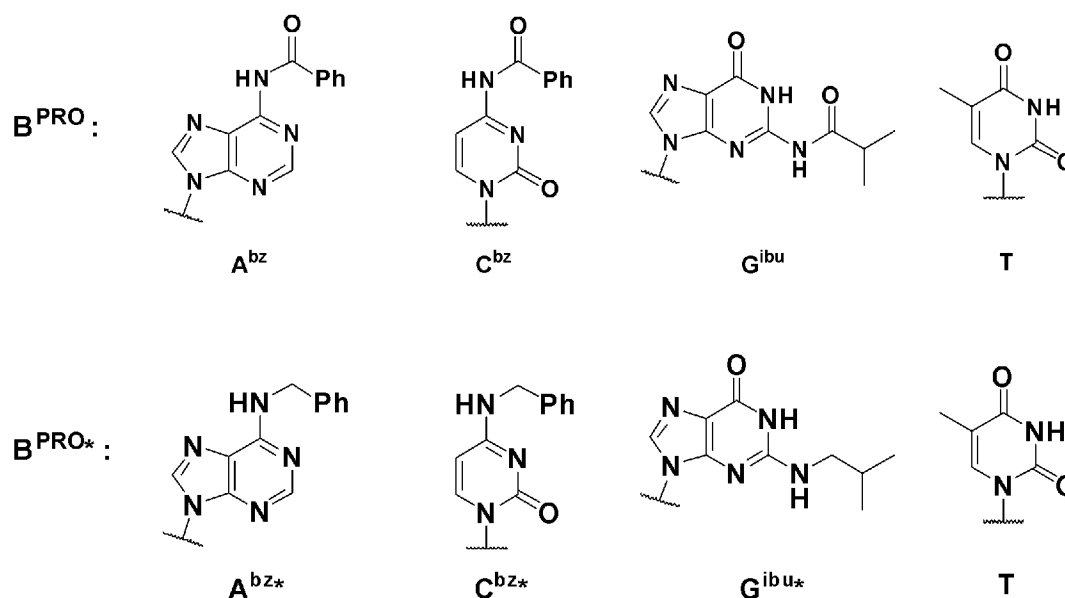
[0004] 核酸の化学合成法としては、核酸塩基部のアミノ基にアシル系の保護基を導入したモノマーを用い、下記左式で表されるようなホスファイトトリエステル中間体を経由して、適切な化学修飾を施すことによってオリゴマーを得る方法が公知である。原理的には、このホスファイトトリエステル中間体とボラノ化剤とを反応させることによりボラノ化して、下記右式で表されるようなボラノホスフェート型核酸オリゴマーを得ることができる。

[化1]



(上記左式及び上記右式において、DMTrは、4, 4'-ジメトキシトリチル基を表し、丸印は、固相担体を表し、B^{PRO}及びB^{PRO*}は、下記式で表される核酸塩基を表す。)

[化2]



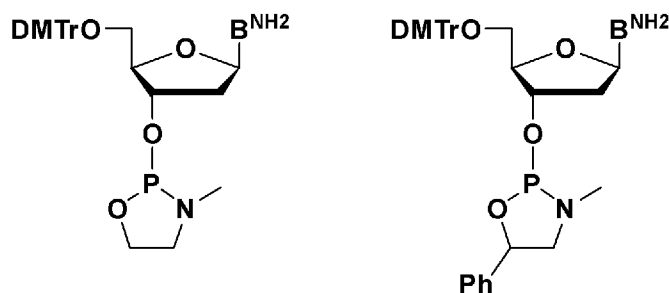
(上記式において、Phは、フェニル基を表す。)

[0005] しかし、上記ボラノ化の過程で、アデニン、シトシン、及びグアニンのアミノ基を保護するアシル系の保護基がボラノ化剤により還元されて脱保護することができなくなるため、上記方法は、核酸塩基がチミン又はウラシルである場合にしか用いることができない。

[0006] そこで、アミノ基が保護されていない核酸塩基を有するヌクレオチドモノ

マーを用いて、ボラノホスフェート型核酸オリゴマーを包含する核酸オリゴマーを得る方法が公知である（非特許文献1及び2）。ヌクレオチドモノマーとして、非特許文献1及び2では、それぞれ、下記左式で表されるヌクレオチドモノマー及び下記右式で表されるヌクレオチドモノマーが用いられる。下記のような環状構造を有するモノマーを用いることで、穏和な酸性条件下でもアミノ基との副反応が抑制され、塩基部が無保護でもオリゴマーを得ることが可能となる。

[化3]



（上記式において、DMTr及びPhは、前述の通りであり、B^{NH2}は、アデニン、グアニン、シトシン、5-メチルシトシン、チミン、及びウラシルからなる群より選ばれる核酸塩基を表し、該アデニン、該グアニン、該シトシン、及び該5-メチルシトシン中のアミノ基は、置換されていない。）

先行技術文献

非特許文献

- [0007] 非特許文献1: Nucl. Nucl. Nucleic Acids, 2010, Vol. 29, pp. 144-154
 非特許文献2: Bioorg. Med. Chem. Lett., 2006, Vol. 16, pp. 3111-3114

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0008] しかし、本発明者らの検討によれば、非特許文献1又は2に開示されているような従来のヌクレオチドモノマーを用いた場合、得られる核酸オリゴマ

一の鎖長に限界がある。この原因は、以下の通りである。上記ヌクレオチドモノマーは、アミノ基が無保護であることで、極性が高いため、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる精製時に、シリカゲルとの親和性が極端に高く、よって、精製が困難となりやすい。このことで、ヌクレオチドモノマーの純度が低下しやすいため、核酸オリゴマーの合成効率が低下し、結果として、核酸オリゴマーの鎖長が長くなりにくい。更に、上記ヌクレオチドモノマーは、リン原子周辺の立体障害が極端に小さいために、加水分解に対する反応性が高すぎ、縮合条件下、速やかに加水分解してしまうことで、上記ヌクレオチドモノマーの実効濃度が低下しやすいことも原因として挙げられる。

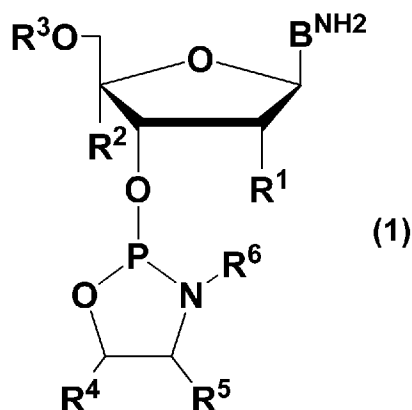
[0009] 本発明は、アミノ基が置換されていない核酸塩基を有し、かつ、高い収率で核酸オリゴマーを与える新規なヌクレオチドモノマー、及び収率の高い核酸オリゴマーの製造方法を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0010] 上記課題を解決するための具体的な手段には、以下の実施態様が含まれる。

<1> 下記一般式(1)で表されるヌクレオチドモノマー。

[化4]



(一般式(1)中、R¹は、水素原子、水酸基、アルコキシ基、アルケニルオキシ基、アシルオキシ基、トリヒドロカルビルシリルオキシ基、アルコキシ

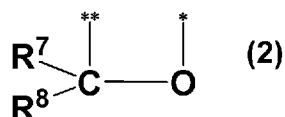
アルコキシ基、ハロアルコキシアルコキシ基、又はハロゲニル基を表し、 R^2 は、水素原子を表し、又は、 R^1 及び R^2 は、互いに結合して、置換基を有し又は有せず、かつ、ヘテロ原子を有し又は有しない5員以上の環を形成し、 R^3 は、水素原子又は水酸基の保護基を表し、 R^4 は、置換基を有し又は有しないアリール基を表し、 R^5 は、水素原子、ハロゲニル基、又は置換基を有し若しくは有しないアルキル基を表し、 R^6 は、置換基を有し又は有せず、かつ、分子鎖中にヘテロ原子を有し又は有しない炭素原子数3以上のアルキル基を表し、又は、 R^5 及び R^6 は、互いに結合して、分岐鎖を有し、かつ、前記分岐鎖以外に置換基を有し又は有せず、かつ、ヘテロ原子を有し又は有しない5員以上の環を形成し、 B^{NH2} は、アデニン、グアニン、シトシン、5-メチルシトシン、チミン、及びウラシルからなる群より選ばれる核酸塩基を表し、該アデニン、該グアニン、該シトシン、及び該5-メチルシトシン中のアミノ基は、置換されていない。)

[0011] <2> 前記 R^6 が表すアルキル基は、分岐状である<1>に記載のヌクレオチドモノマー。

[0012] <3> 前記 R^6 が表すアルキル基は、炭素原子数が6以上14以下である<1>又は<2>に記載のヌクレオチドモノマー。

[0013] <4> R^1 は、水素原子、水酸基、アルコキシ基、アルケニルオキシ基、アシルオキシ基、トリヒドロカルビルシリルオキシ基、アルコキシアルコキシ基、ハロアルコキシアルコキシ基、又はハロゲニル基を表し、 R^2 は、水素原子を表し、又は、 R^1 及び R^2 は、互いに結合して、下記一般式(2)で表される二価の基を形成する<1>~<3>のいずれかに記載のヌクレオチドモノマー。

[化5]



(一般式(2)中、 R^7 及び R^8 は、それぞれ独立して、水素原子又は炭素原

子数 1 ～ 10 のアルキル基を表し、又は、互いに結合して環を形成し、* 及び ** は、結合手を表し、* で表される結合手は、一般式 (1) において、 R^1 が直結する炭素原子に結合し、** で表される結合手は、一般式 (1) において、 R^2 が直結する炭素原子に結合する。)

[0014] <5> 前記ヌクレオチドモノマーにおいてリン原子の立体化学は制御されている<1>～<4>のいずれかに記載のヌクレオチドモノマー。

[0015] <6> 下記一般式 (1 a) で表されるヌクレオチドモノマーを縮合させて、下記一般式 (3 a) で表されるヌクレオチド単位を含む第一の前駆体核酸オリゴマーを得る縮合工程と、

前記第一の前駆体核酸オリゴマーをボラノ化剤によりボラノ化して、下記一般式 (4 a) で表されるヌクレオチド単位を含む第二の前駆体核酸オリゴマーを得るボラノ化工程、又は

前記第一の前駆体核酸オリゴマーを酸化剤により酸化して、下記一般式 (5 a) で表されるヌクレオチド単位を含む第三の前駆体核酸オリゴマーを得る酸化工程と、

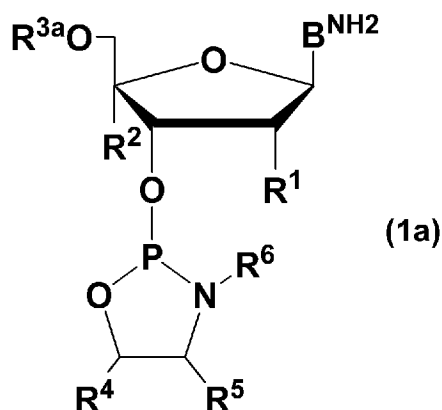
前記第二の前駆体核酸オリゴマー又は前記第三の前駆体核酸オリゴマーから、 R^{3a} で表される保護基を脱離させて、下記一般式 (4 b) で表されるヌクレオチド単位を含む第四の前駆体核酸オリゴマー、又は下記一般式 (5 b) で表されるヌクレオチド単位を含む第五の前駆体核酸オリゴマーを得る脱保護工程と、

の組み合わせを 1 回実行し又は 2 回以上繰り返し実行する鎖長伸長工程、並びに

前記第四の前駆体核酸オリゴマー又は前記第五の前駆体核酸オリゴマーにおいて、5' - 水酸基及びアミノ基に対し保護基によるキャッピングを行って又は行わないで、下記一般式 (4 c) で表されるヌクレオチド単位を含む第六の前駆体核酸オリゴマー又は下記一般式 (5 c) で表されるヌクレオチド単位を含む第七の前駆体核酸オリゴマーから、下記一般式 (6) で表されるリン酸保護基を脱離させて、更に、前記キャッピングを行った場合には前

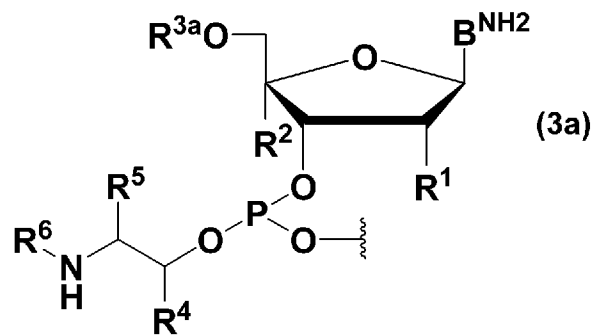
記保護基を脱離させて、下記一般式（７）で表されるヌクレオチド単位及び下記一般式（８）で表されるヌクレオチド単位からなる群より選ばれる少なくとも１種を含む核酸オリゴマーを得る核酸オリゴマー生成工程を含む核酸オリゴマーの製造方法。

[化6]



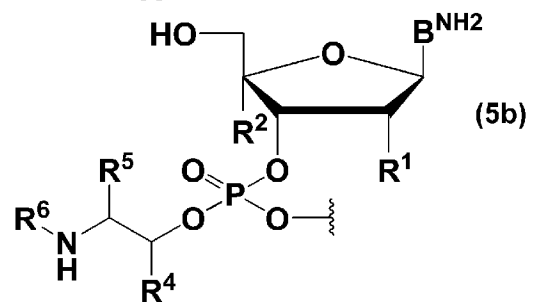
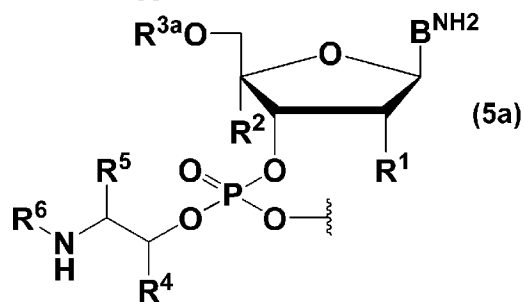
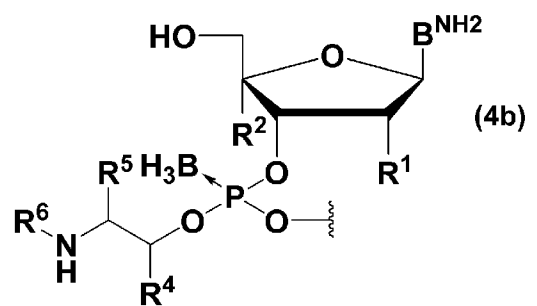
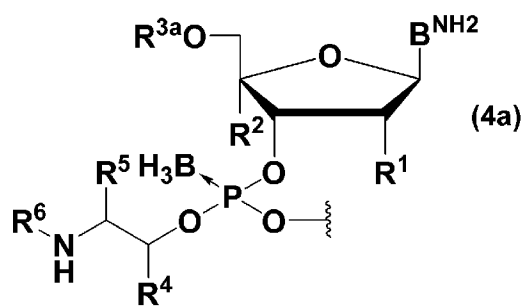
（一般式（１ a）中、 R^1 は、水素原子、水酸基、アルコキシ基、アルケニルオキシ基、アシルオキシ基、トリヒドロカルビルシリルオキシ基、アルコキシアルコキシ基、ハロアルコキシアルコキシ基、又はハロゲニル基を表し、 R^2 は、水素原子を表し、又は、 R^1 及び R^2 は、互いに結合して、置換基を有し又は有せず、かつ、ヘテロ原子を有し又は有しない５員以上の環を形成し、 R^{3a} は、水酸基の保護基を表し、 R^4 は、置換基を有し又は有しないアリール基を表し、 R^5 は、水素原子、ハロゲニル基、又は置換基を有し若しくは有しないアルキル基を表し、 R^6 は、置換基を有し又は有せず、かつ、分子鎖中にヘテロ原子を有し又は有しない炭素原子数３以上のアルキル基を表し、又は、 R^5 及び R^6 は、互いに結合して、分岐鎖を有し、かつ、前記分岐鎖以外に置換基を有し又は有せず、かつ、ヘテロ原子を有し又は有しない５員以上の環を形成し、 B^{NH2} は、アデニン、グアニン、シトシン、５－メチルシトシン、チミン、及びウラシルからなる群より選ばれる核酸塩基を表し、該アデニン、該グアニン、該シトシン、及び該５－メチルシトシン中のアミノ基は、置換されていない。）

[化7]



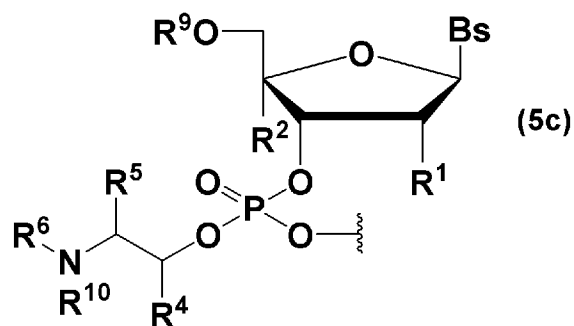
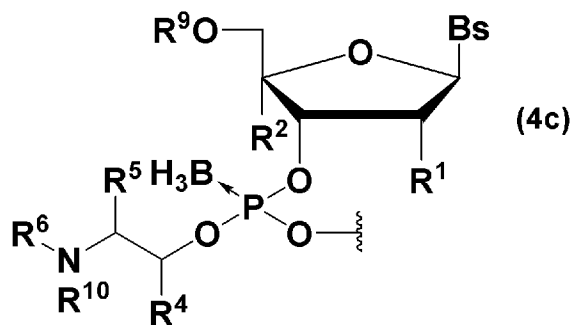
(一般式 (3 a) 中、 R^1 、 R^2 、 R^{3a} 、 $R^4 \sim R^6$ 、及び B^{NH_2} は、前記の通りである。)

[化8]



(一般式 (4 a)、(5 a)、(4 b)、及び (5 b) 中、 R^1 、 R^2 、 R^{3a} 、 $R^4 \sim R^6$ 、及び B^{NH_2} は、前記の通りである。)

[化9]

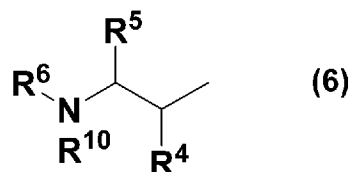


(一般式(4c)及び(5c)中、 R^1 、 R^2 、及び $R^4 \sim R^6$ は、前記の通りであり、

前記キャッピングを行った場合、 R^9 は、水酸基の保護基を表し、 R^{10} は、アミノ基の保護基を表し、Bsは、アデニン、グアニン、シトシン、5-メチルシトシン、チミン、及びウラシルからなる群より選ばれる核酸塩基を表し、該アデニン、該グアニン、該シトシン、及び該5-メチルシトシン中のアミノ基は、アミノ基の保護基で置換されており、

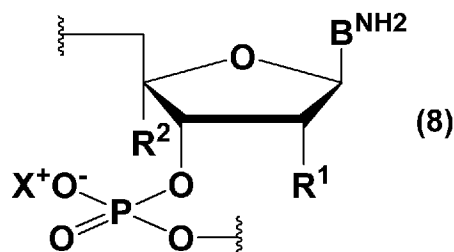
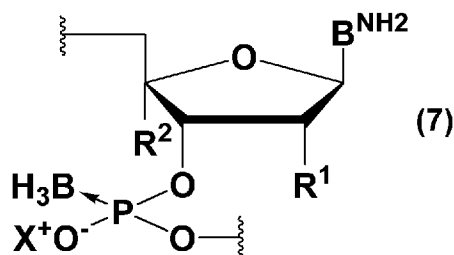
前記キャッピングを行わなかった場合、 R^9 及び R^{10} は、水素原子を表し、Bsは、 B^{NH_2} を表す。)

[化10]



(一般式(6)中、 $R^4 \sim R^6$ 及び R^{10} は、前記の通りである。)

[化11]



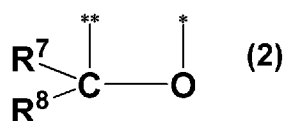
(一般式 (7) 及び (8) 中、 R^1 、 R^2 、及び B^{NH2} は、前記の通りであり、 X^+ は、カウンターカチオンを表す。)

[0016] <7> 前記 R^6 が表すアルキル基は、分岐状である<6>に記載の製造方法。

[0017] <8> 前記 R^6 が表すアルキル基は、炭素原子数が6以上14以下である<6>又は<7>に記載の製造方法。

[0018] <9> R^1 は、水素原子、水酸基、アルコキシ基、アルケニルオキシ基、アシルオキシ基、トリヒドロカルビルシリルオキシ基、アルコキシアルコキシ基、ハロアルコキシアルコキシ基、又はハロゲニル基を表し、 R^2 は、水素原子を表し、又は、 R^1 及び R^2 は、互いに結合して、下記一般式 (2) で表される二価の基を形成する<6>～<8>のいずれかに記載の製造方法。

[化12]



(一般式 (2) 中、 R^7 及び R^8 は、それぞれ独立して、水素原子又は炭素原子数1～10のアルキル基を表し、又は、互いに結合して環を形成し、*及

び**は、結合手を表し、*で表される結合手は、一般式（1 a）において、 R^1 が直結する炭素原子に結合し、**で表される結合手は、一般式（1 a）において、 R^2 が直結する炭素原子に結合する。）

[0019] <10> 前記ヌクレオチドモノマー及び前記ヌクレオチド単位においてリン原子の立体化学は制御されている<6>～<9>のいずれかに記載の製造方法。

発明の効果

[0020] 本発明によれば、アミノ基が置換されていない核酸塩基を有し、かつ、高い収率で核酸オリゴマーを与える新規なヌクレオチドモノマー、及び収率の高い核酸オリゴマーの製造方法を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0021] [図1]図1（a）及び図1（b）は、それぞれ、比較合成例1及び合成例1エントリー3において行った逆相HPLCのチャートを示す図である。

[図2]図2（a）～図2（c）は、それぞれ、合成例2エントリー2及び6並びに比較合成例2において行った逆相HPLCのチャートを示す図である。

[図3]図3（a）及び図3（b）は、それぞれ、比較合成例3及び合成例3において行った逆相HPLCのチャートを示す図である。

[図4]図4（a）及び図4（b）は、それぞれ、比較合成例4及び合成例4において行った逆相HPLCのチャートを示す図である。

[図5]図5（a）～図5（c）は、それぞれ、比較合成例5及び6並びに合成例5において行った逆相HPLCのチャートを示す図である。

発明を実施するための形態

[0022] 以下、本発明の実施形態について説明する。なお、本発明は以下の実施形態に限定されない。本明細書において「工程」との語は、独立した工程だけではなく、他の工程と明確に区別できない場合であってもその工程の所期の目的が達成されれば、本用語に含まれる。また、本明細書において「～」は、その前後に記載される数値をそれぞれ最小値及び最大値として含む範囲を示すものとする。更に、本明細書において組成物中の各成分の量は、組成物

中に各成分に該当する物質が複数存在する場合、特に断らない限り、組成物中に存在する当該複数の物質の合計量を意味する。

[0023] <ヌクレオチドモノマー>

本実施形態に係るヌクレオチドモノマーは、上記一般式（１）で表される。一般式（１）で表されるヌクレオチドモノマーにおいて、 R^4 は、置換基を有し又は有しないアリール基を表し、 R^6 は、置換基を有し又は有せず、かつ、分子鎖中にヘテロ原子を有し又は有しない炭素原子数３以上のアルキル基を表し、又は、 R^6 は、 R^5 と結合して、分岐鎖を有し、かつ、前記分岐鎖以外に置換基を有し又は有せず、かつ、ヘテロ原子を有し又は有しない５員以上の環を形成する。これにより、一般式（１）で表されるヌクレオチドモノマーは、アミノ基が置換されていない核酸塩基を有しつつも、極性が低くなるために、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる精製が容易となり、高い純度で得ることができ、よって、高い収率で核酸オリゴマーを与えることができる。更に、上記ヌクレオチドモノマーは、リン原子周辺に適切な立体障害が付与されることで、加水分解が抑制され、縮合反応時に実効濃度を高く保つことができ、縮合効率を向上させることが可能である。

[0024] R^1 が表すアルコキシ基としては、炭素原子数１～１２のアルコキシ基が好ましく、炭素原子数１～６のアルコキシ基がより好ましく、例えば、メトキシ基、エトキシ基、*n*-プロポキシ基、*i*-プロポキシ基、*n*-ブトキシ基、*sec*-ブトキシ基、*tert*-ブトキシ基、*n*-ペンチルオキシ基等を挙げることができる。

[0025] R^1 が表すアルケニルオキシ基としては、例えば、ビニルオキシ基、アリルオキシ基、１-プロペニルオキシ基、イソプロペニルオキシ基、２-メチル-１-プロペニルオキシ基、２-メチルアリルオキシ基、２-ブテニルオキシ基等を挙げることができる。

[0026] R^1 が表すアシルオキシ基としては、例えば、炭素原子数１から６のアルキル-カルボニルオキシ基（例えば、メチルカルボニルオキシ基、エチルカルボニルオキシ基等）、炭素原子数６から１０のアリール-カルボニルオキシ

(例えば、ベンゾイルオキシ基)等が挙げられる。

[0027] R^1 が表すトリヒドロカルビルシリルオキシ基としては、例えば、トリメチルシリルオキシ基、トリエチルシリルオキシ基、トリイソプロピルシリルオキシ基、*t*-ブチルジメチルシリルオキシ基等のトリアルキルシリルオキシ基、*t*-ブチルジフェニルシリルオキシ基等のアルキルジアリールシリルオキシ基等を挙げることができる。

[0028] R^1 が表すアルコキシアルコキシ基としては、例えば、メトキシメトキシ基、メトキシエトキシ基、エトキシメトキシ基、エトキシエトキシ基、(2-シアノエトキシ)メトキシ基等を挙げることができる。

[0029] R^1 が表すハロアルコキシアルコキシ基としては、例えば、(2-フルオロ)エトキシメトキシ基、(2, 2-ジフルオロ)エトキシメトキシ基、(2-クロロ)メトキシエトキシ基、(2, 2-ジクロロ)エトキシメトキシ基等を挙げることができる。

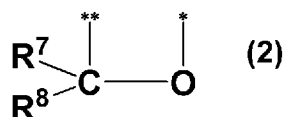
[0030] R^1 が表すハロゲニル基としては、例えば、フルオロ基、クロロ基、ブロモ基等を挙げることができ、フルオロ基が好ましい。

[0031] R^1 としては、二重鎖形成能の点から、上記の中でも、水素原子、水酸基、アルコキシ基、トリアルキルシリルオキシ基、アルコキシアルコキシ基、ハロアルコキシアルコキシ基、及びハロゲニル基が好ましい。

[0032] R^1 及び R^2 は、互いに結合して、置換基を有し又は有せず、かつ、ヘテロ原子を有し又は有しない5員以上の環を形成してもよい。前記置換基としては、例えば、前記環を形成している原子に結合した置換基が挙げられ、具体的には、置換基を有し又は有しないアルキル基、オキシ基(=O)等が挙げられる。前記アルキル基としては、例えば、メチル基、エチル基等が挙げられる。該アルキル基が置換基を有する場合、当該置換基としては、例えば、フルオロ基、クロロ基、ブロモ基等のハロゲニル基、アミノ基、イミノ基等が挙げられる。ヘテロ原子としては、例えば、酸素原子、窒素原子、硫黄原子等が挙げられる。前記環の員数は、好ましくは5~10員、より好ましくは5~8員、更により好ましくは5~7員である。

[0033] 二重鎖形成能の点から、 R^1 及び R^2 は、互いに結合して、下記一般式（2）で表される二価の基を形成することが好ましい。

[化13]

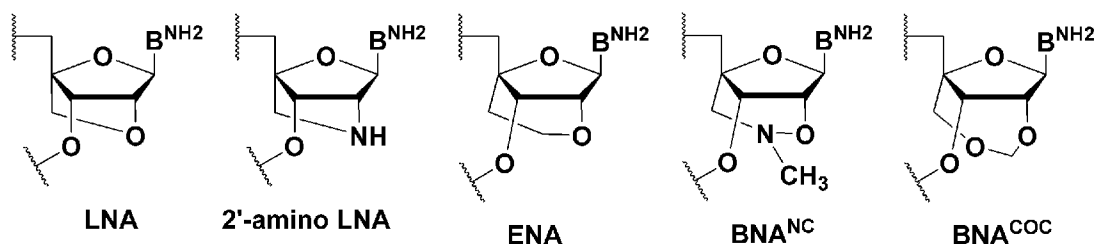


[0034] 一般式（2）中、 R^7 及び R^8 は、それぞれ独立して、水素原子又は炭素原子数1～10のアルキル基を表し、又は、互いに結合して環を形成し、*及び**は、結合手を表し、*で表される結合手は、一般式（1）において、 R^1 が直結する炭素原子に結合し、**で表される結合手は、一般式（1）において、 R^2 が直結する炭素原子に結合する。

[0035] R^7 又は R^8 が表すアルキル基としては、例えば、直鎖状又は分岐鎖状の炭素原子数1～10のアルキル基を挙げることができ、具体的には、例えば、メチル基、エチル基、*n*-プロピル基、*i*-プロピル基、*n*-ブチル基、*t*-ブチル基、*n*-ヘキシル基、及び*n*-オクチル基等が挙げられる。 R^7 及び R^8 が互いに結合して環を形成する場合、当該環として、具体的には、例えば、シクロプロパン環、シクロブタン環、シクロヘキサン環等が挙げられる。

[0036] R^1 及び R^2 は、互いに結合して、置換基を有し又は有せず、かつ、ヘテロ原子を有し又は有しない5員以上の環を形成した場合、該環の具体例としては、下記式で示す環が挙げられる。

[化14]



（式中、 B^{NH_2} は、前記の通りである。）

[0037] R^3 が表す水酸基の保護基としては、例えば、アセチル基、フェニルアセチ

ル基、フェノキシアセチル基、クロロアセチル基、ピバロイル基、ベンジル基、4-メトキシベンジル基、ベンゾイル基、4-メトキシベンゾイル基、トリフェニルメチル基、4, 4'-ジメトキシトリチル (DMTr) 基、4-メトキシトリチル (MMTr) 基、9-フェニルキサントニル基、t-ブトキシカルボニル基、トリメチルシリル基、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、シアノメトキシメチル基、2-(シアノエトキシ) エチル基、シアノエトキシメチル基等を挙げることができる。中でも、酸性条件下で容易に除去可能であり、固相合成における鎖長伸長に適している点で、4, 4'-ジメトキシトリチル基が好ましい。

[0038] R⁴は、置換基を有し又は有しないアリール基を表し、合成の容易さ、反応性、オリゴマー生成時のリン酸部位の脱保護の容易さ、立体化学を制御する場合は縮合時の立体選択性の高さ等の点で、置換基を有し又は有しない炭素原子数6～20のアリール基を表すことが好ましく、置換基を有し又は有しない炭素原子数6～14のアリール基を表すことがより好ましく、置換基を有し又は有しない炭素原子数6～10のアリール基を表すことが更により好ましい。前記置換基としては、例えば、置換基を有し又は有しないアルキル基、水酸基、アミノ基、アルコキシ基、ハロゲン基等が挙げられる。前記アルキル基としては、例えば、メチル基、エチル基等が挙げられる。該アルキル基が置換基を有する場合、当該置換基としては、例えば、水酸基、アミノ基、アルコキシ基、イミノ基、ハロゲン基等が挙げられる。前記アルコキシ基としては、例えば、メトキシ基、エトキシ基等が挙げられる。前記ハロゲン基としては、例えば、フルオロ基、クロロ基、ブロモ基等が挙げられる。R⁴としては、例えば、フェニル基、ナフチル基等が挙げられ、合成の容易さ、反応性等の点で、フェニル基が好ましい。

[0039] R⁵が表すハロゲン基としては、例えば、フルオロ基、クロロ基、ブロモ基等を挙げることができ、フルオロ基が好ましい。

[0040] R⁵が表す置換基を有し若しくは有しないアルキル基としては、置換基を有し若しくは有しない炭素原子数1～12のアルキル基が好ましく、置換基を

有し若しくは有しない炭素原子数 1 ～ 6 のアルキル基がより好ましい。前記置換基としては、例えば、水酸基、アミノ基、アルコキシ基、イミノ基、ハロゲニル基等が挙げられる。前記アルコキシ基としては、例えば、メトキシ基、エトキシ基等が挙げられる。前記ハロゲニル基としては、例えば、フルオロ基、クロロ基、ブロモ基等が挙げられる。R⁵が表す置換基を有し若しくは有しないアルキル基としては、例えば、メチル基、エチル基、*n*-プロピル基、*i*-プロピル基、*n*-ブチル基、*sec*-ブチル基、*tert*-ブチル基、*n*-ペンチル基等が挙げられる。

[0041] R⁵としては、合成の容易さ等の点から、水素原子が好ましい。

[0042] R⁶は、置換基を有し又は有せず、かつ、分子鎖中にヘテロ原子を有し又は有しない炭素原子数 3 以上のアルキル基を表す。R⁶が表すアルキル基は、モノマーの収率及び純度、得られる核酸オリゴマーの収率の向上しやすさ等の点で、炭素原子数が 3 以上 20 以下であることが好ましく、炭素原子数が 6 以上 14 以下であることがより好ましく、炭素原子数が 8 以上 12 以下であることが更により好ましい。前記置換基としては、例えば、水酸基、アミノ基、アルコキシ基、イミノ基、ハロゲニル基等が挙げられる。前記アルコキシ基としては、例えば、メトキシ基、エトキシ基等が挙げられる。前記ハロゲニル基としては、例えば、フルオロ基、クロロ基、ブロモ基等が挙げられる。ヘテロ原子としては、例えば、酸素原子、窒素原子、硫黄原子等が挙げられる。R⁶が表すアルキル基は、モノマーの収率及び純度、得られる核酸オリゴマーの収率の向上しやすさ等の点で、分岐状であることが好ましい。R⁶としては、例えば、*i*-プロピル基、*sec*-ブチル基、*tert*-ブチル基、ネオペンチル基、*i*-ペンチル基、*sec*-ペンチル基、3-ペンチル基、*tert*-ペンチル基、*i*-ヘキシル基、2-エチルヘキシル基、1-メチルヘプチル基、3-メチルオクチル基、テトラヒドロゲラニル基（即ち、3,7-ジメチルオクチル基）等が挙げられ、テトラヒドロゲラニル基が好ましい。

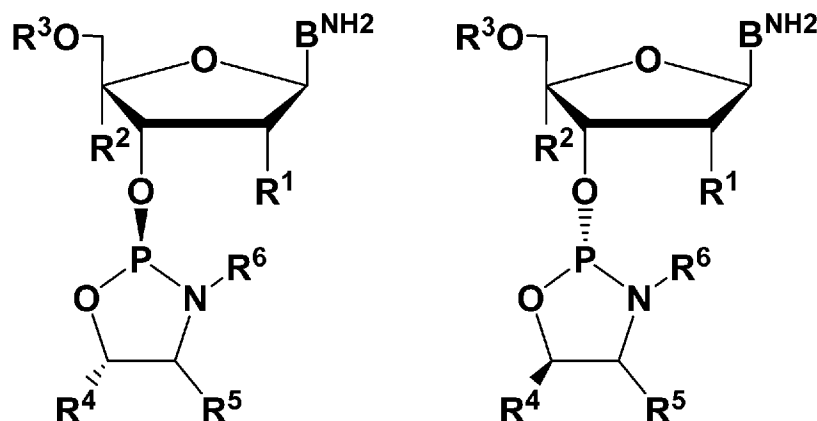
[0043] R⁵及びR⁶は、互いに結合して、分岐鎖を有し、かつ、前記分岐鎖以外に

置換基を有し又は有せず、かつ、ヘテロ原子を有し又は有しない5員以上の環を形成してもよい。前記環の員数は、好ましくは5～10員、より好ましくは5～8員、更により好ましくは5～7員である。前記置換基としては、例えば、置換基を有し又は有しないアルキル基、水酸基、アミノ基、アルコキシ基、イミノ基、ハロゲニル基等が挙げられる。前記アルキル基としては、例えば、メチル基、エチル基等が挙げられる。該アルキル基が置換基を有する場合、当該置換基としては、例えば、水酸基、アミノ基、アルコキシ基、イミノ基、ハロゲニル基等が挙げられる。前記アルコキシ基としては、例えば、メトキシ基、エトキシ基等が挙げられる。前記ハロゲニル基としては、例えば、フルオロ基、クロロ基、ブロモ基等が挙げられる。ヘテロ原子としては、例えば、酸素原子、窒素原子、硫黄原子等が挙げられる。前記分岐鎖としては、例えば、置換基を有し又は有せず、かつ、分子鎖中にヘテロ原子を有し又は有しないアルキル基が挙げられる。該アルキル基は、得られる核酸オリゴマーの収率、得られる核酸オリゴマー中のヌクレオチド単位におけるリン原子の立体化学の制御のしやすさ等の点で、炭素原子数が1以上15以下であることが好ましく、炭素原子数が2以上10以下であることがより好ましく、炭素原子数が3以上8以下であることが更により好ましい。前記分岐鎖中の置換基としては、例えば、水酸基、アミノ基、アルコキシ基、イミノ基、ハロゲニル基等が挙げられる。前記アルコキシ基としては、例えば、メトキシ基、エトキシ基等が挙げられる。前記ハロゲニル基としては、例えば、フルオロ基、クロロ基、ブロモ基等が挙げられる。前記分岐鎖中のヘテロ原子としては、例えば、酸素原子、窒素原子、硫黄原子等が挙げられる。前記アルキル基としては、メチル基、エチル基、*n*-プロピル基、*i*-プロピル基、*n*-ブチル基、*sec*-ブチル基、*tert*-ブチル基、*n*-ペンチル基等が挙げられる。

[0044] 得られる核酸オリゴマー中のヌクレオチド単位におけるリン原子の立体化学の制御のしやすさ等の点で、前記ヌクレオチドモノマーにおいてリン原子の立体化学は制御されていることが好ましい。リン原子の立体化学が制御さ

れている前記ヌクレオチドモノマーとしては、例えば、下記左式で表される S p 体、下記右式で表される R p 体が挙げられる。下記左式及び下記右式において、 $R^1 \sim R^6$ 、及び B^{NH2} は、前記の通りである。

[化15]



[0045] 本実施形態に係るヌクレオチドモノマーは、例えば、実施例に示す方法と同様にして製造することができる。

[0046] <核酸オリゴマーの製造方法>

本実施形態に係る核酸オリゴマーの製造方法は、上記縮合工程と、上記ボラノ化工程又は上記酸化工程と、上記脱保護工程と、の組み合わせを1回実行し又は2回以上繰り返し実行する鎖長伸長工程、並びに上記核酸オリゴマー生成工程を含む。この製造方法により、高い収率で核酸オリゴマーを得ることができる。

[0047] 前記縮合工程では、固相担体に担持されたヌクレオシド構造中や核酸オリゴマーのヌクレオシド構造中のリボース構造の5'位の炭素原子に結合する水酸基と上記一般式(1a)で表されるヌクレオチドモノマーの亜リン酸部とが縮合する。 R^{3a} が表す水酸基の保護基は、 R^3 が表す水酸基の保護基と同様である。

[0048] 前記縮合工程では、酸性活性化剤を用いることができる。酸性活性化剤としては、例えば、1-フェニルイミダゾリウムトリフラート、N-シアノメチルピロリジウムトリフラート、N-シアノメチルジメチルアンモニウムト

リフラート等が挙げられる。酸性活性化剤は、1種単独で用いても2種以上を組み合わせ用いてもよい。前記縮合工程における縮合反応は、例えば、氷冷下（0℃）以上室温（25℃）以下、好ましくは20℃以上25℃以下の範囲で、例えば、1分以上数時間以下、好ましくは2分以上1時間以下の範囲で行うことができる。反応溶媒としては、例えば、不活性溶媒等を挙げることができる。不活性溶媒としては、例えば、アセトニトリル、イソブチロニトリル等を挙げることができる。反応溶媒は、1種単独で用いても2種以上を組み合わせ用いてもよい。

[0049] 前記ボラノ化工程では、ボラノ化剤を用いることができる。ボラノ化剤としては、例えば、ボラン／テトラヒドロフラン錯体、ジメチルスルフィドボラン等のボラン化合物等が挙げられる。ボラノ化剤は、1種単独で用いても2種以上を組み合わせ用いてもよい。前記ボラノ化工程におけるボラノ化反応は、例えば、氷冷下（0℃）以上室温（25℃）以下、好ましくは20℃以上25℃以下の範囲で、例えば、30秒以上数時間以下、好ましくは1分以上1時間以下の範囲で行うことができる。反応溶媒としては、例えば、不活性溶媒等を挙げることができる。不活性溶媒としては、例えば、アセトニトリル、テトラヒドロフラン、トルエン等を挙げることができる。反応溶媒は、1種単独で用いても2種以上を組み合わせ用いてもよい。

[0050] 前記酸化工程では、酸化剤を用いることができる。酸化剤としては、例えば、*t*-ブチルヒドロペルオキシド、*m*-クロロ過安息香酸、（2*R*, 8*a**S*）-（+）-（カンファリルスルホニル）オキサジリジン、（1*S*）-（+）-（8, 8-ジクロロカンファリルスルホニル）オキサジリジン等の過酸化物等が挙げられる。酸化剤は、1種単独で用いても2種以上を組み合わせ用いてもよい。前記酸化工程における酸化反応は、例えば、氷冷下（0℃）以上室温（25℃）以下、好ましくは20℃以上25℃以下の範囲で、例えば、1分以上数時間以下、好ましくは2分以上1時間以下の範囲で行うことができる。反応溶媒としては、例えば、不活性溶媒等を挙げることができる。不活性溶媒としては、例えば、アセトニトリル、トルエン、デカン等

を挙げることができる。反応溶媒は、1種単独で用いても2種以上を組み合わせ用いてもよい。

[0051] 前記脱保護工程では、脱保護剤を用いることができる。脱保護剤としては、例えば、カルボン酸、ハロゲン化アルキルカルボン酸等を挙げることができる。カルボン酸としては、酢酸等を挙げることができる。ハロゲン化アルキルカルボン酸としては、例えば、トリフルオロ酢酸、トリクロロ酢酸、ジクロロ酢酸等を挙げることができる。脱保護剤は、1種単独で用いても2種以上を組み合わせ用いてもよい。脱保護される前駆体核酸オリゴマーにおいて、5'位の炭素原子に結合する水酸基が有する保護基 R^{3a} がトリフェニルメチル基、4, 4'-ジメトキシトリチル(DMT r)基、4-メトキシトリチル(MMT r)基等のトリチル系の保護基であり、更に、該前駆体核酸オリゴマーがボラノ基を有する場合、脱保護工程において生じるトリチルカチオンとボラノ基との副反応を避けるために、カチオン捕捉剤を添加することが望ましい。カチオン捕捉剤としては、例えば、トリエチルシランが挙げられる。カチオン捕捉剤は、1種単独で用いても2種以上を組み合わせ用いてもよい。

[0052] 鎖長伸長工程では、上記縮合工程と、上記ボラノ化工程又は上記酸化工程と、上記脱保護工程と、の組み合わせを1回実行し又は2回以上繰り返し実行する。これにより、2量体以上の前駆体核酸オリゴマーが形成される。具体的には、上記組み合わせを1回実行することにより、2量体の前駆体核酸オリゴマーを得ることができ、上記組み合わせを n 回(n は2以上の整数)繰り返し実行することにより、($n+1$)量体の前駆体核酸オリゴマーを得ることができる。

[0053] 核酸オリゴマー生成工程では、リン酸保護基脱離剤を用いて、一般式(7)で表されるリン酸保護基を脱離させることができる。リン酸保護基脱離剤としては、例えば、ジアザビスクロウンデセン、1, 8-(ジメチルアミノ)ナフタレン、アンモニア水等の塩基等が挙げられる。リン酸保護基脱離剤は、1種単独で用いても2種以上を組み合わせ用いてもよい。リン酸保護

基脱離反応は、例えば、氷冷下（0℃）以上室温（25℃）以下、好ましくは20℃以上25℃以下の範囲で、例えば、15分以上24時間以下、好ましくは30分以上20時間以下の範囲で行うことができる。反応溶媒としては、例えば、不活性溶媒等を挙げることができる。不活性溶媒としては、例えば、アセトニトリル、エタノール等を挙げることができる。反応溶媒は、1種単独で用いても2種以上を組み合わせ用いてもよい。

[0054] 5'-水酸基に対し保護基によるキャッピングを行う場合、R⁹が表す水酸基の保護基としては、例えば、アセチル基、フェニルアセチル基、フェノキシアセチル基、4-tert-ブチルフェノキシアセチル基、4-イソプロピルフェノキシアセチル基、クロロアセチル基、トリフルオロアセチル基、プロピオニル基、ブチリル基、イソブチリル基、ピバロイル基、ベンジル基、4-メトキシベンジル基、ベンゾイル基、4-メトキシベンゾイル基、トリフェニルメチル基、4,4'-ジメトキシトリチル（DMTr）基、4-メトキシトリチル（MMTr）基、9-フェニルキサンテニル基、9-フルオレニルメチルオキシカルボニル基、t-ブトキシカルボニル基、トリメチルシリル基、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、シアノメトキシメチル基、2-（シアノエトキシ）エチル基、シアノエトキシメチル基、（ジメチルアミノ）メチル基等が挙げられる。

[0055] アミノ基に対し保護基によるキャッピングを行う場合、R¹⁰が表すアミノ基の保護基、及び、アデニン、グアニン、シトシン、又は5-メチルシトシンを表すBs中のアミノ基の保護基としては、例えば、アセチル基、フェニルアセチル基、フェノキシアセチル基、4-tert-ブチルフェノキシアセチル基、4-イソプロピルフェノキシアセチル基、クロロアセチル基、トリフルオロアセチル基、プロピオニル基、ブチリル基、イソブチリル基、ピバロイル基、ベンジル基、4-メトキシベンジル基、ベンゾイル基、4-メトキシベンゾイル基、トリフェニルメチル基、4,4'-ジメトキシトリチル（DMTr）基、4-メトキシトリチル（MMTr）基、9-フェニルキサンテニル基、9-フルオレニルメチルオキシカルボニル基、t-ブトキシ

カルボニル基、トリメチルシリル基、*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、シアノメトキシメチル基、2-(シアノエトキシ)エチル基、シアノエトキシメチル基、(ジメチルアミノ)メチル基等が挙げられる。

[0056] 5'-水酸基及びアミノ基に対する保護基によるキャッピング及び前記保護基の脱離は、公知の方法で行うことができる。

[0057] X^+ が表すカウンターカチオンとしては、例えば、アンモニウムイオン、有機アミン化合物由来のカチオン、又は金属カチオン等を挙げることができる。カウンターカチオンは、1種単独で用いても2種以上を組み合わせ用いてもよい。有機アミン化合物由来のカチオンとしては、有機溶媒への溶解度、及びカウンターカチオンの揮発性の観点から、例えば、三級アルキルアミン化合物由来のカチオン、又は第四級アンモニウム化合物由来のカチオンを挙げることができる。三級アルキルアミン化合物由来のカチオンとしては、例えば、トリエチルアミン由来のカチオン $HNEt_3^+$ (Et はエチル基を表す。)、及び1,8-ジアザビシクロ[5.4.0]ウンデセン由来のカチオンを挙げることができる。第四級アンモニウム化合物由来のカチオンとしては、例えば、テトラブチルアンモニウムイオンを挙げることができる。金属カチオンとしては、 Na^+ 、 Li^+ 、 K^+ 等が挙げられる。

[0058] 本実施形態に係る核酸オリゴマーの製造方法では、少なくとも前記縮合工程から前記核酸オリゴマー生成工程までを、固相担体を用いた反応により行うことが好ましい(固相法)。固相反応により核酸オリゴマーを製造する場合、核酸オリゴマーの3'末端の塩基を含むモノマーは、例えば、リボース構造の3'位の炭素原子に結合する酸素原子を介して、固相担体と結合することができる。この場合、モノマーと固相担体との間には、必要に応じてリンカーが存在してもよい。

[0059] 前記固相担体の種類は特に限定されず、例えば、定孔ガラス、オキサリル化一定孔ガラス、TentaGel支持体-アミノポリエチレングリコール誘導体化支持体、高架橋アミノメチルポリスチレン、Pros-ポリスチレ

ン／ジビニルベンゼンの共重合体等を挙げることができる。前記固相担体とモノマーとの連結には、固相担体上のアミノ基を利用することができる。前記固相担体上のアミノ基としては、3-アミノプロピル基、長鎖アルキルアミノ基（LCAA）等を挙げることができる。前記固相担体とモノマーの間には、リンカーが存在してもよい。前記リンカーとしては、スクニシル基、サルコシル基、スクシニルサルコシル基、オキサリル基等を挙げることができる。

[0060] 上述の通りにして得られた核酸オリゴマーは、適宜、固相担体から切り出すことができる。固相担体からの核酸オリゴマーの切り出しは、例えば、前記核酸オリゴマーが結合した固相担体をアンモニア水で処理することで行うことができる。固相担体からの核酸オリゴマーの切り出しで用いられるアンモニア水としては、例えば、25質量%アンモニア水又は25質量%アンモニア水-エタノール混合溶液（3：1、v／v）が挙げられる。固相担体からの核酸オリゴマーの切り出しは、例えば、前述した5'-水酸基に対する保護基の脱離又は前述したリン酸保護基の脱離と同時に行ってもよい。

[0061] 得られた核酸オリゴマーは、例えば、逆相高速液体クロマトグラフィー（逆相HPLC）、イオン交換HPLC、カラムクロマトグラフィー、再結晶等の公知の精製方法により精製することができる。

[0062] 本実施形態に係る核酸オリゴマーの製造方法では、前記ヌクレオチドモノマーのリン原子の立体化学が制御されていた場合、前記ヌクレオチド単位においてリン原子の立体化学は制御される。これにより、本実施形態に係る核酸オリゴマーの製造方法では、核酸オリゴマーを立体選択的に合成することができ、例えば、アンチセンス分子としての有効性、安全性等を効果的に向上させることが容易である。立体化学純度は、90%以上であることが好ましく、95%以上であることがより好ましい。

[0063] ・核酸オリゴマー

本実施形態に係る核酸オリゴマーの製造方法で得られた核酸オリゴマーは、上記一般式（7）で表されるヌクレオチド単位及び上記一般式（8）で表

されるヌクレオチド単位からなる群より選ばれる少なくとも1種を含む。上記一般式(7)で表されるヌクレオチド単位は、1種単独で用いても2種以上を組み合わせ用いてもよい。上記一般式(8)で表されるヌクレオチド単位は、1種単独で用いても2種以上を組み合わせ用いてもよい。

[0064] 一般式(7)で表されるヌクレオチド単位を含む核酸オリゴマーは、標的RNAとの親和性及びRNase H誘導活性に優れ、分解酵素耐性に特に優れる傾向にあり、毒性は高くなりにくい。一般式(8)で表されるヌクレオチド単位を含む核酸オリゴマーは、標的RNAとの親和性及びRNase H誘導活性に特に優れる傾向にあり、毒性は高くなりくいものの、分解酵素耐性は低くなりやすい。上記核酸オリゴマーは、一般式(7)で表されるヌクレオチド単位及び一般式(8)で表されるヌクレオチド単位を含むと、標的RNAとの親和性、RNase H誘導活性、及び分解酵素耐性を高く維持しつつ、毒性が低く抑えられていることが期待される。

[0065] 上記核酸オリゴマーの長さ(塩基長)としては、当該核酸オリゴマーが2つ以上の塩基を有する限り特に制限はなく、標的核酸の種類、長さ等に応じて所望の長さを適宜選択できる。当該核酸オリゴマーの長さは、特に限定されず、アンチセンス医薬への応用の観点から、8~50塩基であることが好ましく、10~30塩基であることがより好ましく、10~21塩基であることが更により好ましい。

[0066] 核酸オリゴマーの塩基配列は、標的核酸の塩基配列に基づいて設定される。二重鎖形成能の観点から、核酸オリゴマーの塩基配列は、標的核酸の塩基配列に対して相補的な塩基配列となるように適宜選択されるが、場合によって、異なる塩基を1つ以上含む塩基配列であってもよい。また、核酸オリゴマーにおいて、一般式(7)で表されるヌクレオチド単位及び一般式(8)で表されるヌクレオチド単位の割合は、標的RNAとの親和性、RNase H誘導活性、分解酵素耐性、及び血中滞留性が高く維持されるよう、適宜選択される。

[0067] 本実施形態に係る核酸オリゴマーは、一般式(7)で表されるヌクレオチ

ド単位及び一般式（８）で表されるヌクレオチド単位以外のヌクレオチド単位を有する核酸オリゴマーであってもよい。当該核酸オリゴマーにおいて、一般式（７）で表されるヌクレオチド単位及び一般式（８）で表されるヌクレオチド単位の合計の割合は、特に限定されず、二重鎖形成能の観点から、核酸オリゴマー中の全ヌクレオチド単位に対し、４０～１００モル％であることが好ましく、５０～１００モル％であることがより好ましく、６０～１００モル％であることが更により好ましく、７０～１００モル％であることが特に好ましい。

[0068] 本実施形態に係る核酸オリゴマーにおいて、５′末端は、水酸基又は水酸基の保護基であってよく、３′末端は、水酸基又は水酸基の保護基であってよい。水酸基の保護基の具体例は、前述の通りである。

実施例

[0069] 以下、実施例によって本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれら実施例によって制限されるものではない。

各種分析器は以下に示した機種を用いた。

^1H -核磁気共鳴スペクトル（ ^1H -NMR）：JEOL JNM-ECZ400S（４００MHz）

^{31}P -核磁気共鳴スペクトル（ ^{31}P -NMR）：JEOL JNM-ECZ400S（１６２MHz）

なお、 ^1H -NMRにはテトラメチルシラン（TMS）を内部標準として用い、 ^{31}P -NMRには８５％ H_3PO_4 を外部標準として用いた。

[0070] HRMS（ESI-TOF）：Sciex X500R QTOF

カラムクロマトグラフィーに充填するシリカゲルには、KANTO CHEMICALのSilica Gel 60NとFUJISILYSIA CHEMICAL LTD.のCHROMATOREX NH-DM1020とを用いた。

逆相HPLCに使用したカラム（精製）：Japan Analytical Industry JAIGEL-ODS, AP-SP-120-1

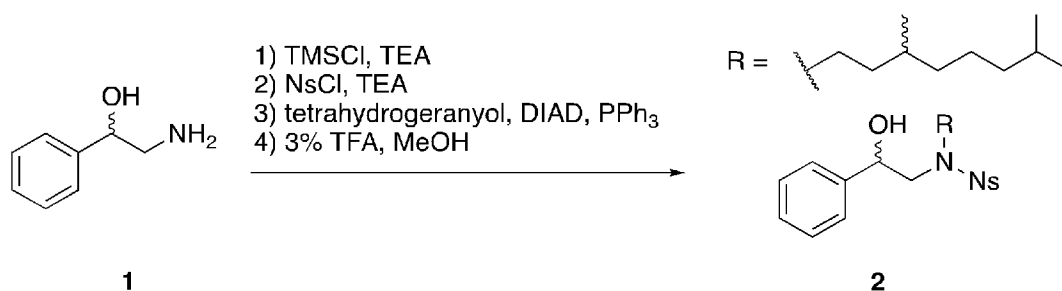
5

逆相HPLCに使用したカラム（分析）：waters μ -BOUNDAS PHERE, C18 5 μ m, 100 Å, 3.9mm×159mm

[0071] なお、特に断りのない限り、「%」は質量基準である。実施例中、DMTrは4, 4'-ジメトキシトリチルを示し、その他の略号は上記説明中のものと同義である。

[0072] <アミノアルコールの合成>

[化16]



[0073] 上記スキーム左端に記載のアミノアルコール誘導体1（11.33g, 83mmol）をアルゴン雰囲気下でピリジン（10mL×3回），トルエン（10mL×3回）で共沸乾燥し、テトラヒドロフラン（500mL）に溶解した。得られたテトラヒドロフラン溶液を攪拌しつつ，トリエチルアミン（TEA, 17.5mL, 124.5mmol），クロロトリメチルシラン（TMSCl, 15.7mL, 124.5mmol）を加え，2時間攪拌した。その後，メタノール（5.5mL）を加え，反応を停止し，溶媒を減圧留去した。得られた無色結晶の混合物をジクロロメタン（160mL）に溶解し，その溶液を0℃に冷却した後，トリエチルアミン（TEA, 29.0mL, 166mmol）を加え，2-ニトロベンゼンスルホニルクロリド（NsCl, 19.31g, 87.15mmol）を10回に分けて加え，3時間攪拌した。メタノール（5mL）を加えて反応を停止し，ジクロロメタン（150mL）を加え，飽和重曹水（300mL×3回）で洗浄した。水層をジクロロメタン（100mL×2回）で逆抽出した。集めた有機層を無

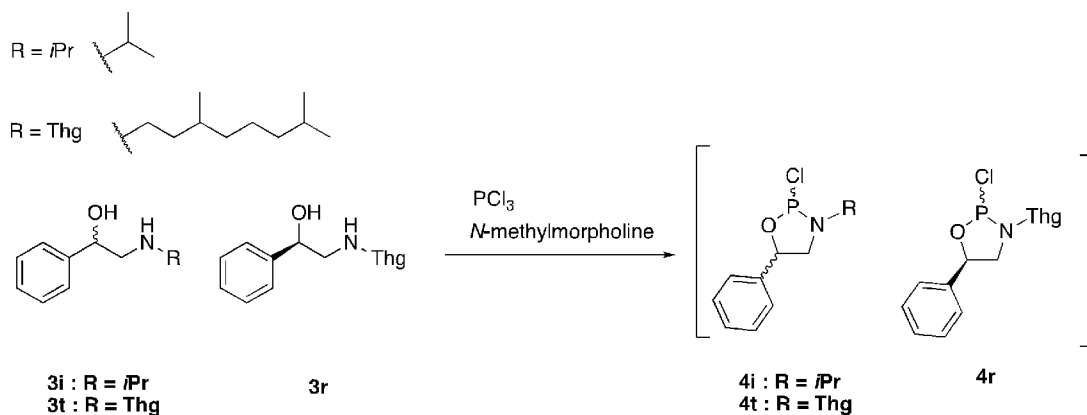
水硫酸ナトリウムで乾燥、ろ過し、溶媒を減圧留去し、無色結晶の混合物を得た。

[0074] 得られた混合物をTHF (260 mL) に溶解させ、テトラヒドロゲラニオール (22.3 mL, 116 mmol), トリフェニルホスフィン (44.0 g, 166 mmol) を加え、0℃に冷却した。ここにアゾジカルボン酸ジイソプロピル/テトラヒドロフラン溶液 (DIAD, 33.0 mL, 166 mmol / 150 mL) を加え、室温まで昇温して24時間攪拌した。メタノール (7 mL) を加え、反応を停止し、溶媒を減圧留去した。得られた混合物にヘキサン-酢酸エチル (6 : 1, v/v) を350 mL加え0℃まで冷却し、析出してきた結晶をろ別し得られた溶液を減圧留去した。この操作を3回繰り返し、得られた混合物に酢酸エチル (500 mL) を加え、飽和食塩水 (200 mL × 3回) で洗浄した。水層を酢酸エチル (200 mL × 2回) で逆抽出した。集めた有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥、ろ過し、溶媒を減圧留去し、淡黄色のオイル状の混合物を得た。

[0075] 得られた混合物にメタノール (41.5 mL) と3%トリフルオロ酢酸/ジクロロメタン溶液 (360 mL) を順次加え、終夜攪拌した。その後、有機層を飽和重曹水 (200 mL × 3回) で洗浄し、水層をジクロロメタン (200 mL × 3回) で逆抽出した。集めた有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥、ろ過し、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒 クロロホルム-ヘキサン (1 : 1, v/v) → クロロホルム) で分離精製することで目的化合物2を得た (淡黄色のオイル状)。収量 : 32.4 g, 70 mmol, 収率 : 84%。

[0076] $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.05–8.02 (m, 1H), 7.72–7.60 (m, 3H), 7.36–7.26 (m, 5H), 4.90 (dt, $J=8.5, 3.5$ Hz, 1H), 3.56–3.29 (m, 4H), 2.76 (dd, $J=8.7, 3.2$ Hz, 1H), 1.60–1.03 (m, 10H), 0.90–0.81 (m, 9H)
HRMS (ESI-TOF) : Calcd for $[\text{M}+1\text{H}]^{1+}$, 46

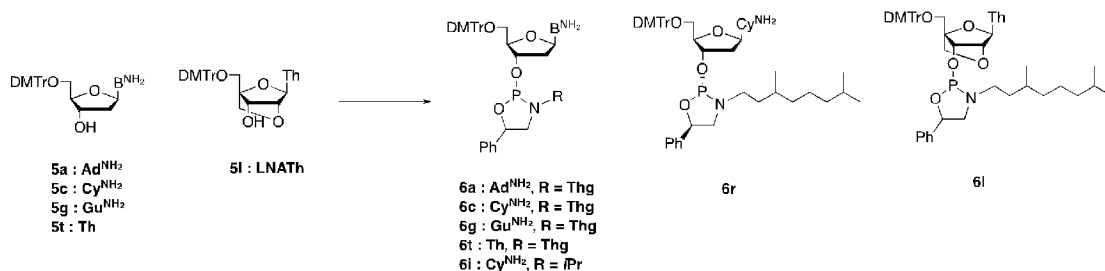
[0080] [化18]



[0081] アミノアルコール誘導体 3 i、3 t、又は 3 r (3 i : 0.67 g, 3.8 mmol ; 3 t : 13.9 g, 50 mmol ; 3 r : 1.4 g, 5.0 mmol) をアルゴン雰囲気下、トルエン (5 mL × 3 回) で共沸乾燥し、トルエン (3 i : 3.7 mL ; 3 t : 40.0 mL ; 3 r : 3.3 mL)、N-メチルモルホリン (3 i : 0.9 mL, 7.9 mmol ; 3 t : 11.5 mL, 105 mmol ; 3 r : 1.15 mL, 10.5 mmol) を加えた。混合溶液を三塩化リン (3 i : 0.3 mL, 3.9 mmol ; 3 t : 11.5 mL, 105 mmol ; 3 r : 0.5 mL, 5.3 mmol) のトルエン (3 i : 2.5 mL ; 3 t : 40 mL ; 3 r : 3.0 mL) 溶液に対し、0℃で10分かけて加えた。反応混合物を室温で2時間攪拌後、生じた塩をアルゴン雰囲気下、−78℃でろ別し、溶媒を減圧留去して目的化合物 4 i、4 t、及び 4 r を得た (4 i : 淡黄色のオイル状, 1.18 g ; 4 t : 淡黄色のオイル状, 18.2 g ; 4 r : 淡黄色のオイル状, 2.0 g)。これ以上の精製は行わず、次の反応に用いた。

[0082] <モノマーの合成>

[化19]

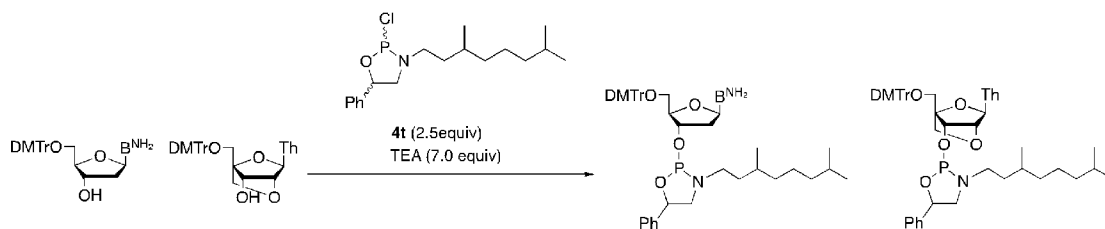


[0083] 上記式中、B^{NH₂}は、A d^{NH₂}、C y^{NH₂}、G u^{NH₂}、又はT hであり、A d^{NH₂}は、アミノ基が置換されていないアデニンを表し、C y^{NH₂}は、アミノ基が置換されていないシトシンを表し、G u^{NH₂}は、アミノ基が置換されていないグアニンを表し、T hは、チミンを表す。

[0084] (オキサザホスホリジンモノマーの合成)

オキサザホスホリジンモノマー6 a、6 c、6 g、6 t、6 i、6 r、及び6 iは既知の方法を参考に合成した(J. Am. Chem. Soc., 2008, 130, 47, pp. 16031-16037)。

[化20]



[0085] 上記スキーム左端に記載のヌクレオシド誘導体5 a、5 c、5 g、5 t、又は5 l (A : 2.2 g, 4.0 mmol ; C : 3.2 g, 6.0 mmol ; G : 2.6 g, 4.5 mmol ; T : 1.4 g, 2.5 mmol ; LNAT : 1.7 g, 3.0 mmol) をアルゴン雰囲気下で、ピリジン、トルエン、THFで1 mL×3回ずつ共沸乾燥しTHF (A : 10 mL ; C : 15 mL ; G : 10.3 mL ; T : 10 mL ; LNAT : 7.5 mL) とトリエチルアミン (A : 3.9 mL, 28 mmol ; C : 5.8 mL, 42 mmol ; G : 4.4 mL, 31.5 mmol ; T : 3.9 mL, 28 mmol

; L N A T : 2.9 mL, 21 mmol) を加えた。得られた T H F 溶液を所定温度 (A, C, T, L N A T : -78°C ; G : -40°C) にて攪拌しつつ、0.6 M の化合物 4 t / テトラヒドロフラン溶液 (A : 3.4 g, 10 mmol; C : 5.1 g, 15 mmol; G : 3.8 g, 11.3 mmol; T : 2.1 g, 6.25 mmol; L N A T : 2.6 g, 7.7 mmol) を 5 分かけて加えた。その後、チミジン誘導体のみ室温まで昇温し、それ以外の誘導体は前記所定温度を保って 2 時間攪拌した。クロロホルム 280 mL で希釈した後、飽和重曹水溶液で洗浄した (50 mL $\times$ 3 回)。水層をクロロホルムにより逆抽出した (50 mL $\times$ 3 回)。有機層を集めて硫酸ナトリウムにより水分を除去した後に、有機層の溶媒を減圧留去して、得られた残渣をアルゴン雰囲気下で、トルエンで 1 mL $\times$ 3 回共沸乾燥した。アミノシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分離精製した。オキサザホスホリジンモノマー 6 g についてのみ、その後、一部の残渣を逆相 H P L C により分離精製した。分離精製の具体的な手順は、以下の通りである。

[0086] A : 得られた残渣の 70 % をアミノシリカゲルカラムクロマトグラフィー [N H - シリカゲル, トルエン $\rightarrow$ 酢酸エチル (100 : 0 $\rightarrow$ 80 : 20, v / v), トリエチルアミン 0.5 %] で分離精製した。

C : 得られた残渣の 51 % をアミノシリカゲルカラムクロマトグラフィー [N H - シリカゲル, トルエン $\rightarrow$ 酢酸エチル $\rightarrow$ t B u O H (99 : 1, v / v), トリエチルアミン 0.5 %] で分離精製した。

G : 得られた残渣の全量をアミノシリカゲルカラムクロマトグラフィー [N H - シリカゲル, クロロホルム $\rightarrow$ クロロホルム $\rightarrow$ t B u O H (93 : 7, v / v), トリエチルアミン 0.5 %] で分離精製し、溶媒を減圧留去して得られた粗精製物の 51 % を逆相 H P L C (移動相 : アセトニトリル $\rightarrow$ クロロホルム (85 : 15, v / v)) で分離精製した。

T : 得られた残渣の全量をアミノシリカゲルカラムクロマトグラフィー [N H - シリカゲル, トルエン $\rightarrow$ トルエン $\rightarrow$ 酢酸エチル (80 : 20, v / v), トリエチルアミン 0.5 %] で分離精製した。

LNAT：得られた残渣の95%をアミノシリカゲルカラムクロマトグラフィー [NH-シリカゲル, トルエン-酢酸エチル (100:0-80:20, v/v), トリエチルアミン0.5%] で分離生成した。

[0087] 分離精製物から溶媒を減圧留去することで目的化合物（オキサザホスホリジンモノマー6a、6c、6g、6t、又は6l）を得た。収量 A: 0.82 g, 0.95 mmol, 34%; C: 0.80 g, 0.96 mmol, 39%; G: 0.61 g, 0.70 mmol, 30%; T: 1.02 g, 1.20 mmol, 55%; LNat: 0.82 g, 0.93 mmol, 31%

[0088] オキサザホスホリジンモノマー6a

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.31 (d, $J=2.3$ Hz, 1H), 7.99 (s, 1H), 7.41–7.16 (m, 14H), 6.80–6.74 (m, 4H), 6.48–6.44 (m, 1H), 5.67 (br, 2H), 5.59–5.54 (m, 1H), 5.01 (qd, $J=5.8, 2.9$ Hz, 1H), 4.23 (t, $J=3.4$ Hz, 1H), 3.77–3.74 (m, 6H), 3.58–3.34 (m, 3H), 3.09–2.97 (m, 2H), 2.95–2.85 (m, 2H), 2.61–2.54 (m, 1H), 1.62–1.04 (m, 10H), 0.88–0.82 (m, 9H)

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, CDCl_3) δ 142.7, 142.1, 142.0, 141.5.

[0089] オキサザホスホリジンモノマー6c

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.92 (td, $J=4.8, 2.4$ Hz, 1H), 7.43–7.17 (m, 14H), 6.84–6.77 (m, 4H), 6.33–6.28 (m, 1H), 5.51 (qd, $J=7.3, 2.4$ Hz, 1H), 5.42–5.34 (m, 1H), 4.90–4.81 (m, 1H), 3.77–3.71 (m, 6H), 3.50–3.36 (m, 3H), 3.09–2.84 (m, 3H), 2.60–2.

5.3 (m, 1H), 2.33–2.21 (m, 1H), 1.58–1.02 (m, 10H), 0.88–0.80 (m, 9H)

^{31}P -NMR (162 MHz, CDCl_3) δ 142.6, 144.0, 142.1, 141.6.

[0090] オキサザホスホリジンモノマー 6 g

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.64 (s, 1H), 7.43–7.15 (m, 14H), 6.78 (dd, $J=11.4, 8.7$ Hz, 4H), 6.27–6.20 (m, 3H), 5.55 (t, $J=7.1$ Hz, 1H), 4.97 (d, $J=2.7$ Hz, 1H), 4.20 (d, $J=2.7$ Hz, 1H), 3.74–3.71 (m, 6H), 3.55–3.31 (m, 3H), 3.13–2.98 (m, 2H), 2.96–2.86 (m, 1H), 2.79 (td, $J=13.6, 7.9$ Hz, 1H), 2.50–2.46 (m, 1H), 1.68–1.05 (m, 10H), 0.88–0.81 (m, 9H)

^{31}P -NMR (162 MHz, CDCl_3) δ 142.8, 142.3, 142.2, 141.9.

[0091] オキサザホスホリジンモノマー 6 t

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.48 (br, 1H), 7.62 (d, $J=1.4$ Hz, 1H), 7.42–7.19 (m, 14H), 6.85–6.79 (m, 4H), 6.42 (dd, $J=7.5, 6.2$ Hz, 1H), 5.51–5.45 (m, 1H), 4.92–4.86 (m, 1H), 4.09 (t, $J=2.5$ Hz, 1H), 3.76 (dt, $J=8.2, 3.4$ Hz, 6H), 3.53–3.33 (m, 3H), 3.07–2.95 (m, 2H), 2.92–2.83 (m, 1H), 2.47–2.29 (m, 2H), 1.60–1.01 (m, 13H), 0.88–0.80 (m, 9H)

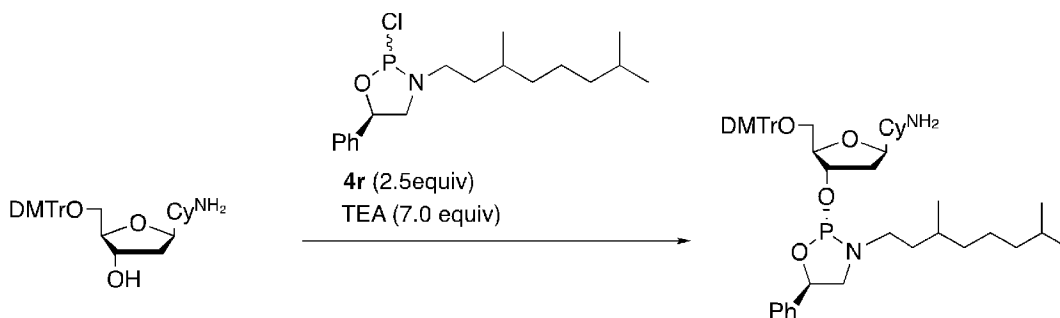
^{31}P -NMR (162 MHz, CDCl_3) δ 143.9, 143.4, 142.5, 142.1.

[0092] オキサザホスホリジンモノマー 6 l

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.99 (s, 1H), 7.73 (d, $J=1.4$ Hz, 1H), 7.48–7.45 (m, 2H), 7.37–7.18 (m, 12H), 6.86–6.81 (m, 2H), 6.78–6.73 (m, 2H), 5.66 (d, $J=9.6$ Hz, 1H), 5.47 (dt, $J=56.3, 7.3$ Hz, 1H), 4.61–4.58 (m, 1H), 4.53–4.47 (m, 1H), 3.87–3.70 (m, 8H), 3.61–3.49 (m, 1H), 3.44–3.34 (m, 1H), 3.12–2.79 (m, 3H), 1.57–1.02 (m, 13H), 0.88–0.73 (m, 9H)

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, CDCl_3) δ 145.3, 144.9, 142.3, 141.7.

[0093] [化21]



[0094] 上記スキーム左端に記載のヌクレオシド誘導体 5 c (1.1 g, 2.0 mmol) をアルゴン雰囲気下で、ピリジン、トルエン、THF で 1 mL × 3 回ずつ共沸乾燥し THF (5.0 mL) とトリエチルアミン (1.9 mL, 14.0 mmol) を加えた。得られた THF 溶液を −78℃ にて攪拌しつつ、0.6 M の化合物 4 r / テトラヒドロフラン溶液 (1.7 g, 5.0 mmol) を 5 分かけて加えた。その後、−78℃ を保って 2 時間攪拌した。クロロホルム 280 mL で希釈した後、飽和重曹水溶液で洗浄した (50 mL × 3 回)。水層をクロロホルムにより逆抽出した (50 mL × 3 回)。有機層を集めて硫酸ナトリウムにより水分を除去した後に、有機層の溶媒を減

圧留去して、得られた残渣をアルゴン雰囲気下で、トルエンで1 mL × 3回共沸乾燥した。アミノシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分離精製した。分離精製の具体的な手順は、以下の通りである。

[0095] 得られたすべての残渣をアミノシリカゲルカラムクロマトグラフィー [NH-シリカゲル, トルエン→酢酸エチル-*t*BuOH (99 : 1, v/v), トリエチルアミン 0.5%] で分離精製した。

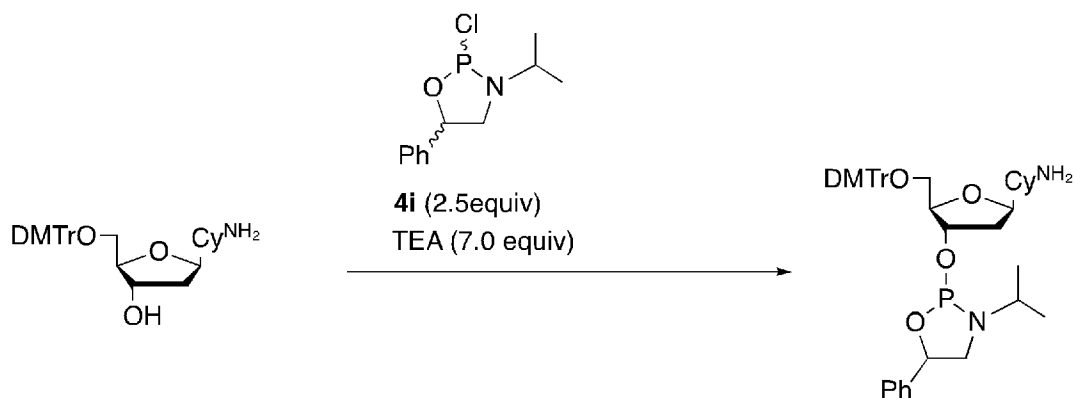
[0096] 分離精製物から溶媒を減圧留去することで目的化合物（オキサザホスホリジンモノマー 6r）を得た。収量 6r : 0.86 g, 1.02 mmol, 51%

[0097] オキサザホスホリジンモノマー 6r

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.96 (1H), 7.42–7.17 (14H), 6.82–6.73 (4H), 6.25–6.32 (1H), 5.56–5.48 (1H), 5.35 (1H), 4.91–4.84 (1H), 4.07–3.98 (1H), 3.75–3.70 (6H), 3.46–3.39 (3H), 3.09–2.81 (3H), 2.58 (1H), 2.40–2.28 (1H), 1.60–1.07 (10H), 0.89–0.84 (9H)

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, CDCl_3) δ 144.7, 144.2

[0098] [化22]



[0099] 上記スキーム左端に記載のヌクレオシド誘導体 5c (0.8 g, 1.5 mmol) をアルゴン雰囲気下で、ピリジン、トルエン, THF で 1 mL × 3

回ずつ共沸乾燥しTHF（3.8 mL）とトリエチルアミン（1.5 mL，10.5 mmol）を加えた。得られたTHF溶液を -78°C にて攪拌しつつ、0.6 Mの化合物4 i / テトラヒドロフラン溶液（0.9 g，3.8 mmol）を5分かけて加えた。その後、 -78°C を保って2時間攪拌した。クロロホルム280 mLで希釈した後、飽和重曹水溶液で洗浄した（50 mL $\times$ 3回）。水層をクロロホルムにより逆抽出した（50 mL $\times$ 3回）。有機層を集めて硫酸ナトリウムにより水分を除去した後に、有機層の溶媒を減圧留去して、得られた残渣をアルゴン雰囲気下で、トルエンで1 mL $\times$ 3回共沸乾燥した。アミノシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分離精製した。分離精製の具体的な手順は、以下の通りである。

[0100] 得られたすべての残渣をアミノシリカゲルカラムクロマトグラフィー [NH-シリカゲル，クロロホルム $\rightarrow$ クロロホルム-*t*BuOH（89：11，v/v），トリエチルアミン0.5%] で分離精製した。

[0101] 分離精製物から溶媒を減圧留去することで目的化合物（オキサザホスホリジンモノマー6 i）を得た。収量 6 i：0.30 g，0.41 mmol，27%

[0102] オキサザホスホリジンモノマー6 i

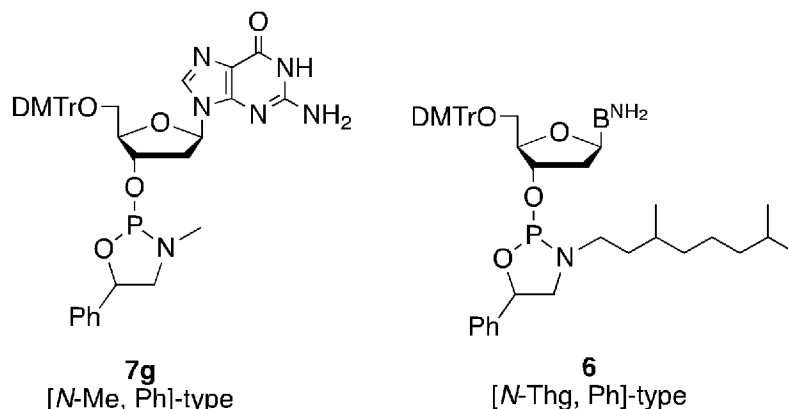
$^1\text{H-NMR}$ （400 MHz， CDCl_3 ） δ 7.98–8.07（1H），7.14–7.45（14H），6.72–6.85（4H），6.23–6.32（1H），5.42–5.53（1H），5.25–5.35（1H），4.80–4.97（1H），3.99–4.11（1H），3.69–3.79（6H），3.26–3.56（4H），2.79–2.90（1H），2.52–2.68（1H），2.22–2.38（1H），1.17–1.24（3H），1.09–1.16（3H）

$^{31}\text{P-NMR}$ （162 MHz， CDCl_3 ） δ 144.1，141.8

[0103] <固相法による核酸オリゴマーの合成>

以下、インターヌクレオチド結合のうち、ボラノホスフェート結合を下付きのPBにより、リン酸ジエステル結合を下付きのPOにより表現する。

[化23]

[0104] (d N_{PB}Tの固相合成)

[合成例1]

スクシニルリンカーを介して固相担体に担持された5'-O-ジメトキシトリチルチミジン(0.5 μmol)に対して3%ジクロロ酢酸/ジクロロメタン溶液(5回×12s, 1mL/回)を加えて、脱トリチル化した後に、モレキュラーシーブスによって乾燥させたアセトニトリルとジクロロメタンで固相担体の洗浄を行った。固相担体を5分間乾燥させたのちに[N-Thg, Ph]-typeのオキサザホスホリジンモノマー6a、6c、6g、又は6t(A:25.8mg(60当量、30 μmol); C:25.0mg(60当量、30 μmol); G:26.3mg(60当量、30 μmol); T:25.5mg(60当量、30 μmol))を加えた。固相担体を5分間乾燥させたのちに、アルゴン雰囲気下で、酸性活性化剤として1-フェニルイミダゾリウムトリフラート(1.0M)を含むアセトニトリル-イソブチロニトリル(7:3, v/v, 150 μL)溶液を反応溶媒として加え、10分間ボルテックスミキサーで攪拌することで縮合を行った。オキサザホスホリジンモノマーの縮合後、固相担体を、乾燥させたアセトニトリル(1mL×3回)とジクロロメタン(1mL×3回)とで洗浄した。固相担体を5分間乾燥させたのちに、アルゴン雰囲気下でモレキュラーシーブスによって乾燥させたテトラヒドロフランを950 μL, 1.0Mボラン/テトラヒドロフラン錯体溶液を50 μL加え、2分間ボルテックスミキサー

で攪拌することでボラノ化を行った。固相担体を、テトラヒドロフラン（1 mL×3回）とジクロロメタン（1 mL×3回）とで洗浄した。3%ジクロロ酢酸／ジクロロメタントリエチルシラン（1：1，v／v）溶液によりジメトキシトリチル基の脱保護を行った（5回×12 s、1 mL／回）。その後、固相担体を、乾燥させたジクロロメタン（1 mL×3回）とアセトニトリル（1 mL×3回）とで洗浄し、5分間乾燥させた。遊離となった5'－水酸基に対して4－ジメチルアミノピリジンを10 mg、2，6－ルチジンを450 µL、無水酢酸を50 µL加えて1分間アセチル化を行った。固相担体を、乾燥させたジクロロメタン（1 mL×3回）とアセトニトリル（1 mL×3回）とで洗浄し、5分間乾燥させた。予め調製しておいた10%ジアザビスクロウンデセン／アセトニトリル溶液を加えて60分間リン酸部位の保護基の除去を行い、ボラノホスホジエステル結合へと変換させた。固相担体を、乾燥させたアセトニトリル（1 mL×3回）で洗浄したのちに25%アンモニア水／エタノール（3：1，v／v，5 mL）溶液で後述する条件のもと反応を行い、核酸塩基部のアセチル基の脱保護、核酸塩基部の窒素原子とボランとの配位結合の切断と固相担体からの切り出しを行った（dC_{PB}T、dG_{PB}T、及びT_{PB}T：室温条件，17時間；dA_{PB}T：室温条件，3時間、50℃，17時間）。反応後、反応溶液をろ過し、アセトニトリルを用いて洗浄を行った。溶媒を減圧留去し、粗生成物を逆相HPLCにて分析した。逆相HPLCは、0.1 M TEAA緩衝液（pH 7）中で、0～20%アセトニトリルの直線濃度勾配を使用して、60分間、30℃にて、流速0.5 mL／minで行った。結果を表1に示す。

[0105] [比較合成例1]

スクシニルリンカーを介して固相担体に担持された5'－ヒドロキシチミジン（0.5 µmol）に対して[N－Me，Ph]－typeのオキサザホスホリジンモノマー7 g（30.0 mg、80当量、40 µmol）を加えた。固相担体を乾燥させたのちに、アルゴン雰囲気下で、酸性活性化剤としてN－シアノメチルピロリジウムトリフラート（1.0 M）を含むアセト

ニトリル溶液（200 μ L）を反応溶媒として加え、3分間攪拌することで縮合を行った。オキサザホスホリジンモノマーの縮合後、固相担体を、乾燥させたアセトニトリルとジクロロメタンとで洗浄した。固相担体を乾燥させたのちに、アルゴン雰囲気下でジクロロメタンを200 μ L、ジメチルスルフィドボランを20 μ L加え、5分間攪拌することでボラノ化を行った。固相担体をジクロロメタンで洗浄した。3%ジクロロ酢酸／ジクロロメタートリエチルシラン（1：1，v／v）溶液によりジメトキシトリチル基の脱保護を行った。その後、固相担体を、乾燥させたジクロロメタンとアセトニトリルとで洗浄し、乾燥させた。遊離となった5'－水酸基に対して予め調製しておいた36%N－メチルイミダゾール／テトラヒドロフラン溶液300 μ Lと22%無水酢酸／テトラヒドロフラン溶液250 μ Lを順次加え、30秒間攪拌することでアセチル化を行なった。その後、固相担体を乾燥させたアセトニトリルで洗浄し、乾燥させた。4%ジアザビスクロウンデセン／アセトニトリル溶液で1時間半反応させることでリン酸部位の保護基の除去を行なった。25%アンモニア水溶液で17時間反応させ固相担体からの切り出しを行い、目的物を含む混合物を得た。混合物はHPLCにより分析を行なった。結果を表1に示す。

[0106] [表1]

	エントリー	モノマー	アルキル基	生成物	全ての生成物に対する 目的物の割合(%)
合成例 1	1	6a	T h g	d A _{P B} T	99
	2	6c	T h g	d C _{P B} T	97
	3	6g	T h g	d G _{P B} T	99
	4	6t	T h g	T _{P B} T	98
比較合成例 1	5	7g	M e	d G _{P B} T	80

[0107] 表1中の百分率は、HPLCの分析結果における面積比：目的物／観測される全ての生成物より算出した。

[0108] 図1（a）及び図1（b）に、それぞれ、比較合成例1及び合成例1エントリー3における逆相HPLC分析の結果を示す。比較合成例では、溶出時間の短い部分に未反応のチミジンが多く観測され、溶出時間の長い部分には

、副生成物が多く観測された。一方、合成例 1 エントリー 3 では、未反応体や副生成物が顕著に少なかった。全ての生成物に対する目的物の割合（％）は合成例 1 エントリー 3 の方が 19％高い。これらの結果から、 $[N-Me, Ph]$ -type のオキサザホスホリジンモノマーでは、モノマーの加水分解や酸化が進行しやすく、副反応が起きやすいが、 $[N-Thg, Ph]$ -type では、窒素原子周辺の立体障害が十分であるために、モノマーが安定であり、上記のような副反応が進行しづらいことによって、望みの縮合反応が効率的に進行したと考えられる。以上より、核酸オリゴマーを合成するためには、 $[N-Thg, Ph]$ -type の方が適していることが確認された。

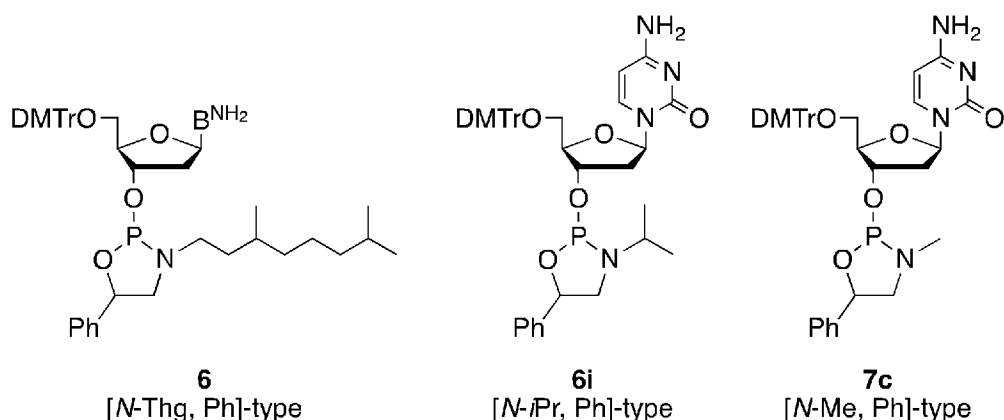
[0109] (HPLC の溶出条件)

合成例 1 : 0-20%CH₃CN in 0.1 M TEAA buffer for 60 min

比較合成例 1 : 0-8%CH₃CN in 0.1 M TEAA buffer for 20 min, 8%CH₃CN in 0.1 M TEAA buffer for 40 min

[0110] (dN_{PO}T の固相合成)

[化24]



[0111] [合成例 2]

スクシニルリンカーを介して固相担体に担持された 5' -O-ジメトキシ

トリチルーチミジン ($0.5 \mu\text{mol}$) に対して 3%ジクロロ酢酸/ジクロロメタン溶液 (5回 $\times$ 12s, 1mL/回) を加えて、脱トリチル化した後に、モレキュラーシーブスによって乾燥させたアセトニトリルとジクロロメタンで固相担体の洗浄を行った。固相担体を 5 分間乾燥させたのちにオキサザホスホリジンモノマー 6a、6c、6g、6t、6l、又は 6i (A: 25.8mg (60当量、 $30 \mu\text{mol}$) ; C(Thg): 25.0mg (60当量、 $30 \mu\text{mol}$) ; G: 26.3mg (60当量、 $30 \mu\text{mol}$) ; T: 25.5mg (60当量、 $30 \mu\text{mol}$) ; LNAT: 26.3mg (60当量、 $30 \mu\text{mol}$) ; C(iPr): 22.1mg (60当量、 $30 \mu\text{mol}$)) を加えた。固相担体を 5 分間乾燥させたのちに、アルゴン雰囲気下で、酸性活性化剤として 1-フェニルイミダゾリウムトリフラート (1.0M) を含むアセトニトリル-イソブチロニトリル (7:3, v/v, 150 μL) 溶液を反応溶媒として加え、10分間ボルテックスミキサーで攪拌することで縮合を行った。オキサザホスホリジンモノマーの縮合後、固相担体を、乾燥させたアセトニトリル (1mL $\times$ 3回) とジクロロメタン (1mL $\times$ 3回) とで洗浄した。固相担体を 5 分間乾燥させたのちに、予め調整しモレキュラーシーブスによって乾燥しておいた 1.0M t-ブチルヒドロペルオキシド/トルエン溶液をアルゴン雰囲気下で 500 μL 加え、5分間ボルテックスで攪拌することで酸化を行った。固相担体を、ジクロロメタン (1mL $\times$ 6回) で洗浄した。3%ジクロロ酢酸/ジクロロメタン溶液によりジメトキシトリチル基の脱保護を行った (5回 $\times$ 12s, 1mL/回)。その後、固相担体を、乾燥させたジクロロメタン (1mL $\times$ 3回) とアセトニトリル (1mL $\times$ 3回) とで洗浄したのちに 25%アンモニア水/エタノール (3:1, v/v, 5mL) 溶液を室温条件で 3 時間反応させ、リン酸部の保護基の除去と固相担体からの切り出しを行った反応後、反応溶液をろ過し、アセトニトリルを用いて洗浄を行った。溶媒を減圧留去し、粗生成物を逆相 HPLC にて前述と同様に分析した。結果を表 2 に示す。

[0112] [比較合成例 2]

モノマーとして、[N-Thg, Ph]-typeのオキサザホスホリジンモノマー6の代わりに[N-Me, Ph]-typeのオキサザホスホリジンモノマー7cを用いる以外は、[合成例2]と同様の条件で2量体を合成し、分析を行った。結果を表2に示す。

[0113] [表2]

	エントリー	モノマー	アルキル基	生成物	HPLC収率(%)
合成例2	1	6a	Thg	dA _{PO} T	99
	2	6c	Thg	dC _{PO} T	99
	3	6g	Thg	dG _{PO} T	99
	4	6t	Thg	T _{PO} T	99
	5	6l	Thg	LNAT _{PO} T	99
	6	6i	iPr	dC _{PO} T	99
比較合成例2	7	7c	Me	dC _{PO} T	97

[0114] 表2中、HPLC収率は、逆相HPLCの結果におけるピーク面積比 $dN_{PO}T / (T + dN_{PO}T)$ より算出した。

[0115] 図2(a)～図2(c)に、合成例2エントリー2及び6並びに比較合成例2における逆相HPLC分析の結果を示す。比較合成例2では、未反応のチミジンが観測されているのに対して、合成例2エントリー2及び6では、比較合成例2と比較して未反応のチミジンが観測されておらず、それぞれ目的物のHPLC収率は2%高かった。上記合成例2では、2量体を合成したが、オリゴマー合成時では、縮合回数が増えるため、縮合効率の高いモノマーを用いる方が望ましい。核酸オリゴマーを合成するためには、炭素原子数3以上で分岐状であるアルキル基を有している方が適していることが確認された。

[0116] (HPLCの溶出条件)

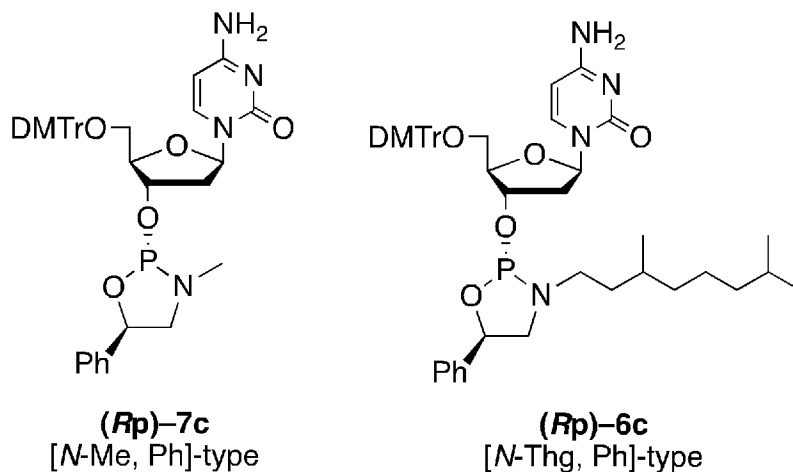
0-20%CH₃CN in 0.1M TEAA buffer for 60min

[0117] ((Rp)-C_{PB}Tの固相合成)

リン原子の立体化学が制御されたモノマーを用いて、リン原子の立体化学が制御された((Rp)-C_{PB}Tの固相合成を行なった。下記[N-Me, P

h] - t y p e のオキサザホスホリジンモノマーは、非特許文献 2 に合成例が記載されている公知の化合物である。

[化25]



[0118] [比較合成例 3]

スクシニルリンカーを介して固相担体に担持された 5' - ヒドロキシチミジン ($0.5 \mu\text{mol}$) に対して、立体制御した [N-Me, Ph] - t y p e のオキサザホスホリジンモノマー (Rp) - 7 c (30.0 mg 、 80 当量、 $40 \mu\text{mol}$) を加えた。固相担体を乾燥させたのちに、アルゴン雰囲気下で、酸性活性化剤として N - シアノメチルピロリジウムトリフラート (1.0 M) を含むアセトニトリル溶液 ($200 \mu\text{L}$) を反応溶媒として加え、3 分間攪拌することで縮合を行った。オキサザホスホリジンモノマーの縮合後、固相担体を乾燥させたアセトニトリルとジクロロメタンとで洗浄した。固相担体を乾燥させたのちに、アルゴン雰囲気下でジクロロメタンを $200 \mu\text{L}$ 、ジメチルスルフィドボランを $20 \mu\text{L}$ 加え、5 分間攪拌することでボラノ化を行った。固相担体を、ジクロロメタンで洗浄した。3 % ジクロロ酢酸 / ジクロロメタン - トリエチルシラン ($1 : 1$, v / v) 溶液によりジメトキシトリチル基の脱保護を行った。その後、固相担体を、乾燥させたジクロロメタンとアセトニトリルとで洗浄し、乾燥させた。遊離となった 5' - 水酸基に対して予め調整しておいた 36 % N - メチルイミダゾール / テ

トラヒドロフラン溶液 300 μ L と 22% 無水酢酸／テトラヒドロフラン溶液 250 μ L を順次加え、30 秒間攪拌することでアセチル化を行なった。その後、固相担体を乾燥させたアセトニトリルで洗浄し、乾燥させた。4% ジアザビスクロウンデセン／アセトニトリル溶液で 1 時間半反応させることでリン酸部位の保護基の除去を行なった。その後、固相担体を、乾燥させたアセトニトリルで洗浄し、乾燥させたのち 25% アンモニア水溶液で 1 時間反応させ固相担体からの切り出しを行い、目的物を含む混合物を得た。混合物は HPLC により分析を行なった。結果を表 3 に示す。

[0119] [合成例 3]

スクシニルリンカーを介して固相担体に担持された 5' - ヒドロキシチミジン (0.5 μ mol) に対して、立体制御した [N-Thg, Ph] - type のオキサザホスホリジンモノマー (Rp) - 6c (18.8 mg, 45 当量、23 μ mol) を加えた。固相担体を乾燥させたのちに、アルゴン雰囲気下で、酸性活性化剤として N-シアノメチルピロリジウムトリフラート (1.0 M) を含むアセトニトリル-イソブチロニトリル (7:3, v/v, 160 μ L) 溶液を反応溶媒として加え、5 分間攪拌することで縮合を行った。オキサザホスホリジンモノマーの縮合後、固相担体を、乾燥させたアセトニトリルとジクロロメタンとで洗浄した。固相担体を乾燥させたのちに、アルゴン雰囲気下で 0.05 M ボラン／テトラヒドロフラン錯体テトラヒドロフラン溶液で 2 分間の条件でボラノ化を行なった。固相担体を、ジクロロメタンで洗浄した。3% ジクロロ酢酸／ジクロロメタン-トリエチルシラン (1:1, v/v) 溶液によりジメトキシトリチル基の脱保護を行った。その後、固相担体を乾燥させたジクロロメタンとアセトニトリルとで洗浄し、乾燥させた。遊離となった 5' - 水酸基に対して 4-ジメチルアミノピリジン 10 mg、2,6-ルチジン 450 μ L、無水酢酸 50 μ L を加えて 60 秒間攪拌することでアセチル化を行った。その後、固相担体を、乾燥させたアセトニトリルで洗浄し、乾燥させた。10% ジアザビスクロウンデセン／アセトニトリル溶液で 1 時間反応させることでリン酸部位の保護基の除

去を行なった。その後、固相担体を、乾燥させたアセトニトリルで洗浄し、乾燥させたのち25%アンモニア水-エタノール（3：1、v／v）17時間反応させ固相担体からの切り出しを行い、目的物を含む混合物を得た。混合物はHPLCにより分析を行なった。結果を表3に示す。

[0120] [表3]

	2量体の立体化学純度 (Sp:Rp)	HPLC収率 (%)
比較合成例3	22:78	89
合成例3	7:93	95

[0121] 表3中、立体化学純度は、HPLCの結果において、Sp体C_{PB}TとRp体C_{PB}Tとの面積比より算出した。HPLC収率は、HPLCの結果における面積比（Rp）-C_{PB}T／（T+（Rp）-C_{PB}T）より算出した。

[0122] 図3（a）及び図3（b）に、それぞれ、比較合成例3及び合成例3における逆相HPLC分析の結果を示す。比較合成例3と比較して、合成例3の方が目的物の収率及び立体化学純度が高い結果となった。これらの結果から、[N-Me, Ph]-typeでは、縮合反応条件におけるエピメリ化が顕著であるのに対し、[N-Thg, Ph]-typeでは、窒素原子の周辺の立体障害が十分であるために、立体化学純度が維持されと考えられる。よって、立体化学を制御した合成を行うためには、[N-Thg, Ph]-typeの方が適していることが確認された。

[0123] （HPLCの溶出条件）

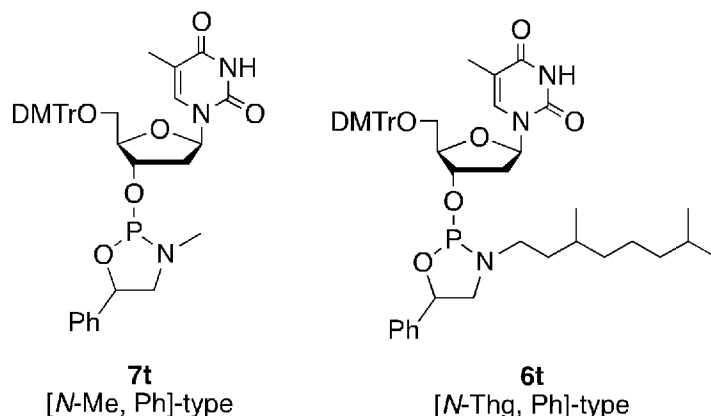
比較合成例3：0-15%CH₃CN in 0.1M TEAA buffer for 45min

合成例3：5-25%CH₃CN in 0.1M TEAA buffer for 20min

[0124] （T_{PB}T_{PB}Tの固相合成）

オキサザホスホリジン環の窒素原子にテトラヒドロゲラニル基を有するチミジンモノマーを用いて、T_{PB}T_{PB}Tの固相合成を行なった。

[化26]



[0125] [比較合成例4]

スクシニルリンカーを介して固相担体に担持された5'-ヒドロキシチミジン ($0.5 \mu\text{mol}$) に対して、以下の (i) 工程、(ii) 工程、及び (iii) 工程の組み合わせを2回繰り返すことで鎖長伸長反応を行った。

[0126] (i) 工程：固相担体に [N-Me, Ph]-type のオキサザホスホリジンモノマー 7t (30.0 mg 、80当量、 $40 \mu\text{mol}$) を加えた。固相担体を乾燥させたのちに、アルゴン雰囲気下で、酸性活性化剤として N-シアノメチルピロリジウムトリフラート (1.0 M) を含むアセトニトリル溶液 ($200 \mu\text{L}$) を反応溶媒として加え、3分間攪拌することで縮合を行った。オキサザホスホリジンモノマーの縮合後、固相担体を、乾燥させたアセトニトリルとジクロロメタンとで洗浄した。

[0127] (ii) 工程：固相担体を乾燥させたのちに、アルゴン雰囲気下でジクロロメタンを $200 \mu\text{L}$ 、ジメチルスルフィドボランを $20 \mu\text{L}$ 加え、5分間攪拌することでボラノ化を行った。固相担体をジクロロメタンとメタノールで洗浄した。

[0128] (iii) 工程：前記 (ii) 工程後の固相担体について、3%ジクロロ酢酸／ジクロロメタノートリエチルシラン ($1:1$, v/v) 溶液によりジメトキシトリチル基の脱保護を行った。

[0129] その後、固相担体を、乾燥させたジクロロメタンとアセトニトリルとで洗浄し、乾燥させた。遊離となった5'-水酸基に対して4-ジメチルアミノピリジン10mg、2,6-ルチジン450 μ L、無水酢酸50 μ Lを加えて60秒間アセチル化を行った。固相担体を、乾燥させたジクロロメタンとアセトニトリルとで洗浄し、乾燥させた。予め調製しておいた4%ジアザビスクロウンデセン／アセトニトリル溶液を加えて17時間リン酸部位の保護基の除去を行った。その後、固相担体を、乾燥させたアセトニトリルで洗浄し乾燥させた。25%アンモニア水溶液で1時間反応させ固相単体からの切り出しを行い、目的物を含む混合物を得た。混合物はHPLCにより分析を行なった。結果を表4に示す。

[0130] [合成例4]

スクシニルリンカーを介して固相担体に担持された5'-ヒドロキシチミジン(0.5 μ mol)に対して、以下の(i)工程、(ii)工程、及び(iii)工程の組み合わせを2回繰り返すことで鎖長伸長反応を行った。

[0131] (i)工程：固相担体に[N-Thg, Ph]-typeのオキサザホスホリジンモノマー6t(25.5mg, 60当量、30 μ mol)を加えた。固相担体を乾燥させたのちに、アルゴン雰囲気下で、酸性活性化剤としてN-フェニルイミダゾリウムトリフラート(1.0M)を含むアセトニトリル-イソブチロニトリル(7:3, v/v, 200 μ L)を反応溶媒として加え、10分間攪拌することで縮合を行った。オキサザホスホリジンモノマーの縮合後、固相担体を、乾燥させたアセトニトリルとジクロロメタンとで洗浄した。

[0132] (ii)工程：固相担体を乾燥させたのちに、アルゴン雰囲気下で1Mジメチルスルフィドボラン／トルエン溶液で15分間ボラノ化を行った。固相担体をジクロロメタンとエタノールで洗浄した。

[0133] (iii)工程：前記(ii)工程後の固相担体について、3%ジクロロ酢酸／ジクロロメタン-トリエチルシラン(1:1, v/v)溶液によりジメトキシトリチル基の脱保護を行った。

[0134] その後、固相担体を、乾燥させたジクロロメタンとアセトニトリルとで洗浄し、乾燥させた。遊離となった5'-水酸基に対して4-ジメチルアミノピリジン10mg、2,6-ルチジン450 μ L、無水酢酸50 μ Lを加えて60秒間アセチル化を行った。固相担体を、乾燥させたジクロロメタンとアセトニトリルとで洗浄し、乾燥させた。予め調製しておいた10%ジアザビスクロウンデセン／アセトニトリル溶液を加えて1時間リン酸部位の保護基の除去を行った。その後、固相担体を、乾燥させたアセトニトリルで洗浄し乾燥させた。25%アンモニア水-エタノール（3：1、v／v）で17時間反応させ固相担体からの切り出しを行い、目的物含む混合物を得た。混合物はHPLCにより分析を行なった。結果を表4に示す。

[0135] [表4]

	HPLC収率(%)
比較合成例4	76
合成例4	91

[0136] 表4中、HPLC収率は、HPLCの結果における面積比 $T_{PB}T_{PB}T / (T + T_{PB}T + T_{PB}T_{PB}T)$ より算出した。

[0137] 図4(a)及び図4(b)に、それぞれ、比較合成例4及び合成例4における逆相HPLC分析の結果を示す。比較合成例4では、2量体が多く観測されているのに対して、合成例4では、比較合成例4と比較して、2量体の割合が少なく、目的物のHPLC収率は15%高かった。上記合成例では、3量体を合成したが、オリゴマー合成時では、縮合回数が増えるため、縮合効率の高いモノマーを用いる方が望ましく、核酸オリゴマーを合成するためには、[N-Thg, Ph]-typeの方が適していることが確認された。

[0138] (HPLCの溶出条件)

比較合成例4：0-25%CH₃CN in 0.1M TEAA buffer for 70min

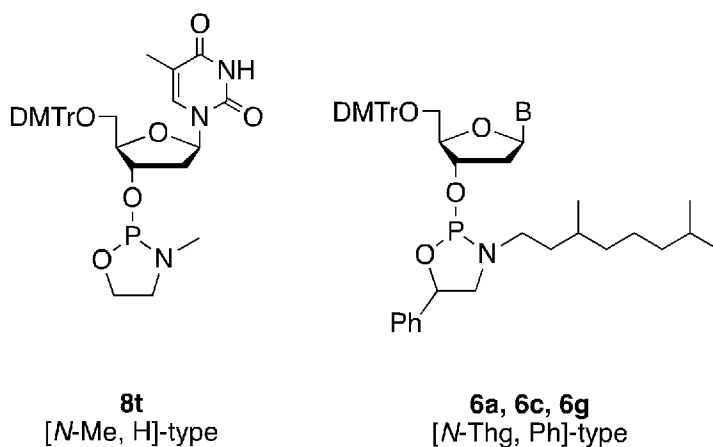
合成例4：0-30%CH₃CN in 0.1M TEAA buffer

f o r 6 0 m i n

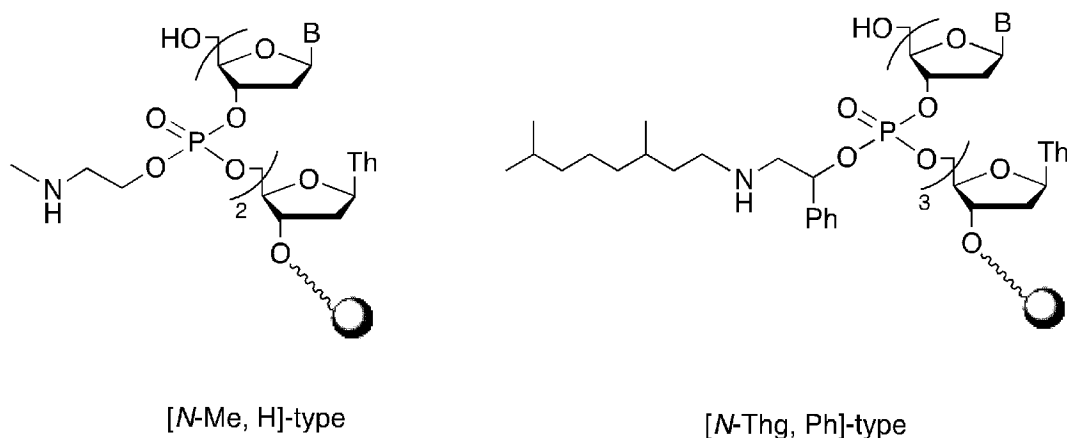
[0139] (ホスホトリエステル 3 量体又は 4 量体中間体における、リン酸部位の保護基の除去条件の比較検討)

オキサザホスホリジン環に Ph 基を有するモノマーを用いて、酸化体の 3 量体又は 4 量体の固相合成を行なった。下記 [N-Me, H]-type のオキサザホスホリジンモノマーは、非特許文献 1 に合成例が記載されている公知の化合物である。

[化27]



[化28]



[0140] [比較合成例 5]

スクシニルリンカーを介して固相担体に担持された 5' - ヒドロキシチミジン (0.5 μmol) に対して、以下の (i) 工程、(ii) 工程、及び

(i i i) 工程の組み合わせを2回繰り返すことで鎖長伸長反応を行った。

[0141] (i) 工程：固相担体に [N - M e , H] - t y p e のオキサザホスホリジンモノマー 8 t (13.0 mg、40 当量、20 μ mol) を加えた。固相担体を乾燥させたのちに、アルゴン雰囲気下で、酸性活性化剤として 1 H - テトラゾール (0.45 M) を含むアセトニトリル溶液 (200 μ L) を反応溶媒として加え、3 分間攪拌することで縮合を行った。オキサザホスホリジンモノマーの縮合後、固相担体を、乾燥させたアセトニトリルとジクロロメタンとで洗浄した。

[0142] (i i) 工程：固相担体を乾燥させたのちに、アルゴン雰囲気下で 1 M t - ブチルヒドロペルオキシドを 200 μ L 加え、3 分間攪拌することで酸化を行った。固相担体をジクロロメタンで洗浄した。

[0143] (i i i) 工程：前記 (i i) 工程後の固相担体について、3 % ジクロロ酢酸 / ジクロロメタン溶液によりジメトキシトリチル基の脱保護を行った。

[0144] その後、固相担体を、乾燥させたジクロロメタンとアセトニトリルとで洗浄し、乾燥させた。室温下、25 % アンモニア水溶液で 1 時間反応させ固相担体からの切り出しとリン酸部位の脱保護を行い、目的物 T_{PO}T_{PO}T を含む混合物を得た。混合物は HPLC により分析を行なった。結果を表 5 に示す。

[0145] [比較合成例 6]

アンモニア処理を、室温下で 1 時間行う代わりに 55 °C で 17 時間行なった以外は、[比較合成例 4] と同様の操作で目的物 T_{PO}T_{PO}T を得た。混合物は HPLC により分析を行なった。結果を表 5 に示す。

[0146] [合成例 5]

スクシニルリンカーを介して固相担体に担持された 5' - ヒドロキシチミジン (0.5 μ mol) に対して、以下の (i) 工程、(i i) 工程、及び (i i i) 工程の組み合わせを 3 回繰り返すことで鎖長伸長反応を行った。

[0147] (i) 工程：固相担体に [N - T h g , P h] - t y p e のオキサザホスホリジンモノマー 6 a、6 c、又は 6 g (60 当量、30 μ mol) を加え

た。固相担体を乾燥させたのちに、アルゴン雰囲気下で、酸性活性化剤としてN-フェニルイミダゾリウムトリフラート（1.0M）を含むアセトニトリル-イソブチロニトリル（7：3，v/v，200 μ L）溶液を反応溶媒として加え、10分間攪拌することで縮合を行った。オキサザホスホリジンモノマーの縮合後、固相担体を、乾燥させたアセトニトリルとジクロロメタンとで洗浄した。

[0148] (ii) 工程：固相担体を乾燥させたのちに、アルゴン雰囲気下で1M t-ブチルヒドロペルオキシドを200 μ L加え、5分間攪拌することで酸化を行った。固相担体をジクロロメタンで洗浄した。

[0149] (iii) 工程：前記(ii)工程後の固相担体について、3%ジクロロ酢酸/ジクロロメタン溶液によりジメトキシトリチル基の脱保護を行った。

[0150] その後、固相担体を、乾燥させたジクロロメタンとアセトニトリルとで洗浄し、乾燥させた。室温下、25%アンモニア水-エタノール（3：1，v/v）で3時間反応させ固相担体からの切り出しとリン酸部位の脱保護を行い、目的物A_{PO}G_{PO}C_{PO}Tを含む混合物を得た。混合物はHPLCにより分析を行なった。結果を表5に示す。

[0151] [表5]

	鎖長の長さ	アンモニア処理		
		室温、1時間	55℃、12時間	室温、3時間
比較合成例5	3量体	4%	—	—
比較合成例6	3量体	—	100%	—
合成例5	4量体	—	—	100%

[0152] 表5の中の百分率は、ホスホジエステルの脱保護の進行率を示しており、HPLCの分析結果における面積比：ホスホジエステル誘導体（脱保護反応後の脱保護完了体）／（ホスホジエステル誘導体（脱保護反応前の脱保護未完了体）＋ホスホジエステル誘導体（脱保護反応後の脱保護完了体））より算出した。

[0153] 図5(a)～図5(c)に、比較合成例5及び6並びに合成例5における

逆相HPLC分析の結果を示す。比較合成例5では、1時間のアンモニア処理により4%しか脱保護が進行せず、脱保護反応が極めて遅いことが示唆された。比較合成例6に示す通り、ホスホジエステルの脱保護の進行率を100%にするには、反応温度を55℃まで高くし、反応時間を12時間まで長くする必要があった。一方、合成例5では、室温条件下、3時間で脱保護が完了しており、温和な条件下で迅速に反応が進行していた。上記合成例では、3量体又は4量体を合成したが、オリゴマー合成時では、リン酸部位の保護基の数が増えるため、リン酸部位の保護基は簡便に脱保護できる方が望ましく、核酸オリゴマーを合成するためには、合成例5で用いた[N-Thg, Ph]-typeのモノマーの方が適していることが確認された。

[0154] (HPLCの溶出条件)

比較合成例5及び6並びに合成例5 : 0-20%CH₃CN in 0.1M TEAA buffer for 60min

[0155] [実施例1] PB核酸オリゴマー(4量体)及びPB/POキメラ型核酸オリゴマー(4量体)の合成

スクシニルリンカーを介して固相担体に担持された5'-O-ジメトキシトリチルチミジン(0.5 μmol)に対して3%ジクロロ酢酸/ジクロロメタン溶液(5回×12s, 1mL/回)を加えて、脱トリチル化した後に、モレキュラーシーブスによって乾燥させたアセトニトリルとジクロロメタンで固相担体の洗浄を行い、固相担体の真空乾燥を行った。次に、以下の(i)工程、(ii)工程、及び(iii)工程の組み合わせを3回繰り返すことでオリゴマーの鎖長伸長反応を行った。

[0156] (i)工程 : 配列に応じて選択されたオキサザホスホリジンモノマー(60当量、30 μmol)を加えた固相担体を5分間乾燥させたのちに、アルゴン雰囲気下で、酸性活性化剤として1-フェニルイミダゾリウムトリフラート(1.0M)を含むアセトニトリル-イソブチロニトリル(7:3, v/v, 150 μL)溶液を反応溶媒として加え、10分間ボルテックスミキサーで攪拌することで縮合を行った。縮合後、固相担体を、乾燥させたアセ

トニトリル（1 mL×3回）とジクロロメタン（1 mL×3回）とで洗浄した。

[0157] (i i) 工程：リン酸部位修飾に応じて選択された0.05 M ボラン／テトラヒドロフラン錯体テトラヒドロフラン溶液又は1.0 M t-ブチルテトラヒドロペルオキシド／トルエン溶液を2分間又は5分間アルゴン雰囲気下で反応させた。その後、反応溶液を除去し、反応後の固相担体を、行った反応に応じて、以下の通りに洗浄した。ボラノ化した場合は、固相担体を、乾燥させたテトラヒドロフラン（1 mL×3回）と乾燥させたエタノール（1 mL×3回）とジクロロメタン（1 mL×3回）とで洗浄した。酸化した場合は、固相担体を、ジクロロメタン（1 mL×6回）で洗浄した。

[0158] (i i i) 工程：前記(i i) 工程後の固相担体を、3%ジクロロ酢酸／ジクロロメタン－トリエチルシラン（1：1、v/v）溶液（1 mL）と12秒間反応させた。同様の操作を5回繰り返した後、ジクロロメタン（1 mL）で3回、アセトニトリル（1 mL）で3回洗浄を行い、固相担体を真空乾燥させた。

[0159] (I V) 工程：その後、固相担体を、乾燥させたジクロロメタン（1 mL×3回）とアセトニトリル（1 mL×3回）とで洗浄し、5分間乾燥させた。遊離となった5'-水酸基に対して4-ジメチルアミノピリジン10 mg、2,6-ルチジン450 µL、無水酢酸50 µLを加えて1分間アセチル化を行った。固相担体を、乾燥させたジクロロメタン（1 mL×3回）とアセトニトリル（1 mL×3回）とで洗浄し、5分間乾燥させた。予め調整しておいた10%ジアザビスクロウンデセン／アセトニトリル溶液を加えて60分間リン酸部位の保護基の除去を行い、ボラノホスホジエステル結合又はホスホジエステル結合へと変換させた。その後、アセトニトリル（1 mL×3回）で洗浄した。

[0160] 洗浄後の固相担体に対して、25%アンモニア水－エタノール（3：1、v/v）を室温条件で3時間、50℃で17時間、核酸塩基部の脱保護、核酸塩基部の窒素原子とボランとの配位結合の切断、及び固相担体からの核酸

オリゴマーの切り出しを行った。固相担体をろ別し、ろ液を回収した後、溶媒の減圧留去を行った。

[0161] 溶媒の減圧留去後、粗生成物を逆相HPLCにて分析した。逆相HPLCは、0.1M TEAA緩衝液（pH7）中で、0～60%アセトニトリルの直線濃度勾配を使用して、60分間、30℃にて、流速0.5mL/minで行った。このようにして、PB核酸オリゴマー $C_{PB}A_{PB}G_{PB}T$ とPB/POキメラ型核酸オリゴマー $C_{PB}A_{PO}G_{PB}T$ を得た。

[0162] ・PB核酸オリゴマー $C_{PB}A_{PB}G_{PB}T$ について

収率：28%

HRMS (ESI-TOF) : Calcd for $[M-2H]^{2-}$, 582.6729; found, 582.6742

・PB/POキメラ型核酸 $C_{PB}A_{PO}G_{PB}T$ について

収率：33%

HRMS (ESI-TOF) : Calcd for $[M-2H]^{2-}$, 583.6540; found, 583.6559

[0163] [実施例2] PB/POキメラ型核酸オリゴマー（12量体）の合成

(i) 工程、(ii) 工程、及び(iii) 工程の組み合わせを11回繰り返す以外は[実施例1]と同様の条件でオリゴマーを合成した。

[0164] 得られたPB/POキメラ型核酸オリゴマー（12量体）を逆相HPLCにて分離精製した。逆相HPLC及び分離精製は、60℃で、5～40%メタノールの0.1Mヘキサフルオロイソプロパノール-0.008Mトリエチルアミン緩衝溶液を移動相として用いて流速0.5mL/分で20分間行った。このようにして、PB/POキメラ型核酸オリゴマー $C_{PB}A_{PO}G_{PB}T_{PO}C_{PB}A_{PO}G_{PB}T_{PO}C_{PB}A_{PO}G_{PB}T$ （配列番号1）を得た。

収率：3%

HRMS (ESI-TOF) : Calcd for $[M-4H]^{4-}$, 907.2133; found, 907.2129

[0165] [実施例3] PO核酸オリゴマー（12量体）の合成

(i) 工程、(ii) 工程、及び(iii) 工程の組み合わせを11回繰り返し、(IV) 工程を行わない以外は〔実施例1〕と同様の条件でオリゴマーを合成した。

[0166] 得られたPO核酸オリゴマー(12量体)を逆相HPLCにて分離精製した。逆相HPLC及び分離精製は、50℃で、5～25%メタノールの0.4Mヘキサフルオロイソプロパノール-0.016Mトリエチルアミン緩衝溶液を移動相として用いて流速0.5mL/分で10分間行った。このようにして、PO核酸オリゴマーC_{PO}A_{PO}G_{PO}T_{PO}C_{PO}A_{PO}G_{PO}T_{PO}C_{PO}A_{PO}G_{PO}T (配列番号2)を得た。

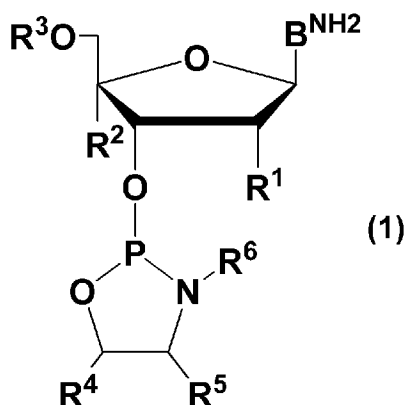
収率：14%

HRMS (ESI-TOF) : Calcd for [M-4H]⁴⁻, 910.1530; found, 910.1565

請求の範囲

[請求項1] 下記一般式（１）で表されるヌクレオチドモノマー。

[化1]



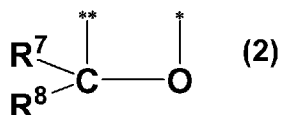
（一般式（１）中、 R^1 は、水素原子、水酸基、アルコキシ基、アルケニルオキシ基、アシルオキシ基、トリヒドロカルビルシリルオキシ基、アルコキシアルコキシ基、ハロアルコキシアルコキシ基、又はハロゲニル基を表し、 R^2 は、水素原子を表し、又は、 R^1 及び R^2 は、互いに結合して、置換基を有し又は有せず、かつ、ヘテロ原子を有し又は有しない５員以上の環を形成し、 R^3 は、水素原子又は水酸基の保護基を表し、 R^4 は、置換基を有し又は有しないアリール基を表し、 R^5 は、水素原子、ハロゲニル基、又は置換基を有し若しくは有しないアルキル基を表し、 R^6 は、置換基を有し又は有せず、かつ、分子鎖中にヘテロ原子を有し又は有しない炭素原子数３以上のアルキル基を表し、又は、 R^5 及び R^6 は、互いに結合して、分岐鎖を有し、かつ、前記分岐鎖以外に置換基を有し又は有せず、かつ、ヘテロ原子を有し又は有しない５員以上の環を形成し、 B^{NH2} は、アデニン、グアニン、シトシン、５－メチルシトシン、チミン、及びウラシルからなる群より選ばれる核酸塩基を表し、該アデニン、該グアニン、該シトシン、及び該５－メチルシトシン中のアミノ基は、置換されていない。）

[請求項2] 前記 R⁶ が表すアルキル基は、分岐状である請求項 1 に記載のヌクレオチドモノマー。

[請求項3] 前記 R⁶ が表すアルキル基は、炭素原子数が 6 以上 14 以下である請求項 1 に記載のヌクレオチドモノマー。

[請求項4] R¹ は、水素原子、水酸基、アルコキシ基、アルケニルオキシ基、アシルオキシ基、トリヒドロカルビルシリルオキシ基、アルコキシアルコキシ基、ハロアルコキシアルコキシ基、又はハロゲニル基を表し、R² は、水素原子を表し、又は、R¹ 及び R² は、互いに結合して、下記一般式 (2) で表される二価の基を形成する請求項 1 に記載のヌクレオチドモノマー。

[化2]



(一般式 (2) 中、R⁷ 及び R⁸ は、それぞれ独立して、水素原子又は炭素原子数 1 ~ 10 のアルキル基を表し、又は、互いに結合して環を形成し、* 及び ** は、結合手を表し、* で表される結合手は、一般式 (1) において、R¹ が直結する炭素原子に結合し、** で表される結合手は、一般式 (1) において、R² が直結する炭素原子に結合する。)

[請求項5] 前記ヌクレオチドモノマーにおいてリン原子の立体化学は制御されている請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載のヌクレオチドモノマー。

[請求項6] 下記一般式 (1 a) で表されるヌクレオチドモノマーを縮合させて、下記一般式 (3 a) で表されるヌクレオチド単位を含む第一の前駆体核酸オリゴマーを得る縮合工程と、

前記第一の前駆体核酸オリゴマーをボラノ化剤によりボラノ化して、下記一般式 (4 a) で表されるヌクレオチド単位を含む第二の前駆体核酸オリゴマーを得るボラノ化工程、又は

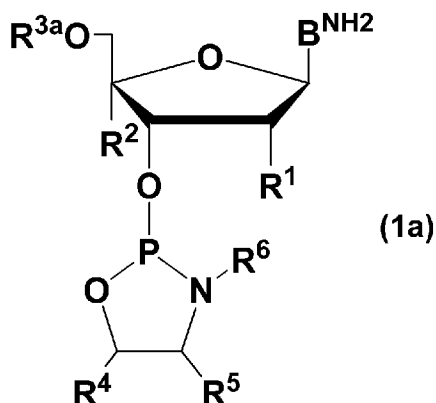
前記第一の前駆体核酸オリゴマーを酸化剤により酸化して、下記一般式（5 a）で表されるヌクレオチド単位を含む第三の前駆体核酸オリゴマーを得る酸化工程と、

前記第二の前駆体核酸オリゴマー又は前記第三の前駆体核酸オリゴマーから、 R^{3a} で表される保護基を脱離させて、下記一般式（4 b）で表されるヌクレオチド単位を含む第四の前駆体核酸オリゴマー、又は下記一般式（5 b）で表されるヌクレオチド単位を含む第五の前駆体核酸オリゴマーを得る脱保護工程と、

の組み合わせを1回実行し又は2回以上繰り返し実行する鎖長伸長工程、並びに

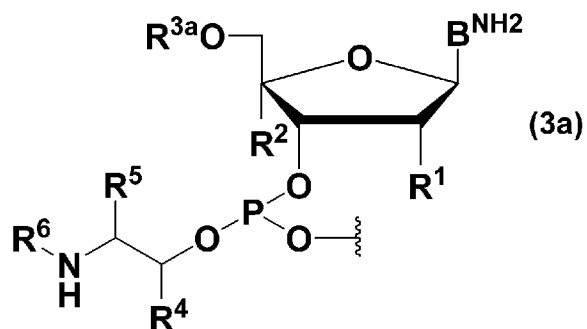
前記第四の前駆体核酸オリゴマー又は前記第五の前駆体核酸オリゴマーにおいて、5'-水酸基及びアミノ基に対し保護基によるキャッピングを行って又は行わないで、下記一般式（4 c）で表されるヌクレオチド単位を含む第六の前駆体核酸オリゴマー又は下記一般式（5 c）で表されるヌクレオチド単位を含む第七の前駆体核酸オリゴマーから、下記一般式（6）で表されるリン酸保護基を脱離させて、更に、前記キャッピングを行った場合には前記保護基を脱離させて、下記一般式（7）で表されるヌクレオチド単位及び下記一般式（8）で表されるヌクレオチド単位からなる群より選ばれる少なくとも1種を含む核酸オリゴマーを得る核酸オリゴマー生成工程を含む核酸オリゴマーの製造方法。

[化3]



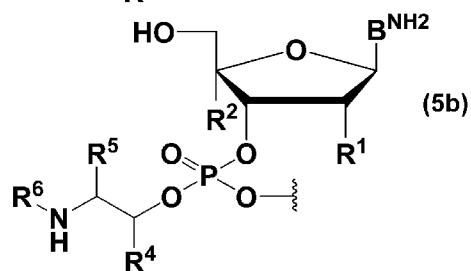
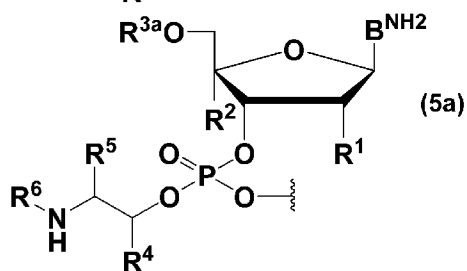
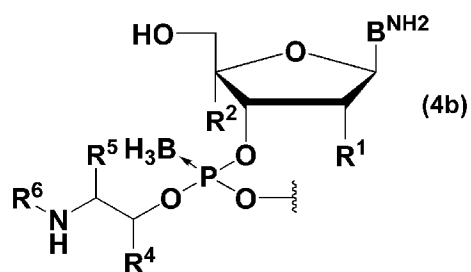
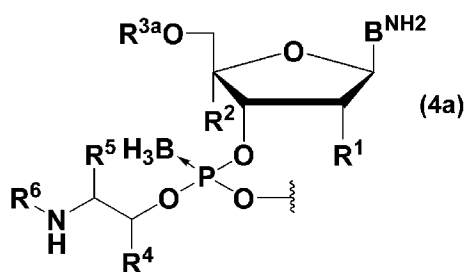
(一般式(1a)中、 R^1 は、水素原子、水酸基、アルコキシ基、アルケニルオキシ基、アシルオキシ基、トリヒドロカルビルシリルオキシ基、アルコキシアルコキシ基、ハロアルコキシアルコキシ基、又はハロゲニル基を表し、 R^2 は、水素原子を表し、又は、 R^1 及び R^2 は、互いに結合して、置換基を有し又は有せず、かつ、ヘテロ原子を有し又は有しない5員以上の環を形成し、 R^{3a} は、水酸基の保護基を表し、 R^4 は、置換基を有し又は有しないアリール基を表し、 R^5 は、水素原子、ハロゲニル基、又は置換基を有し若しくは有しないアルキル基を表し、 R^6 は、置換基を有し又は有せず、かつ、分子鎖中にヘテロ原子を有し又は有しない炭素原子数3以上のアルキル基を表し、又は、 R^5 及び R^6 は、互いに結合して、分岐鎖を有し、かつ、前記分岐鎖以外に置換基を有し又は有せず、かつ、ヘテロ原子を有し又は有しない5員以上の環を形成し、 B^{NH_2} は、アデニン、グアニン、シトシン、5-メチルシトシン、チミン、及びウラシルからなる群より選ばれる核酸塩基を表し、該アデニン、該グアニン、該シトシン、及び該5-メチルシトシン中のアミノ基は、置換されていない。)

[化4]



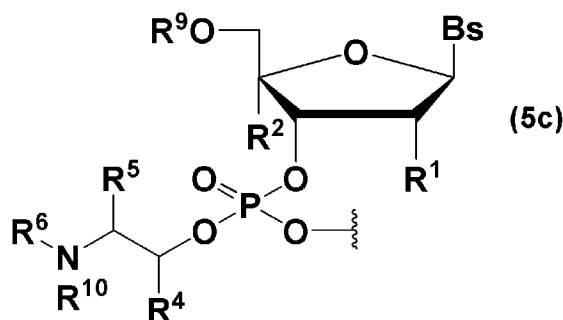
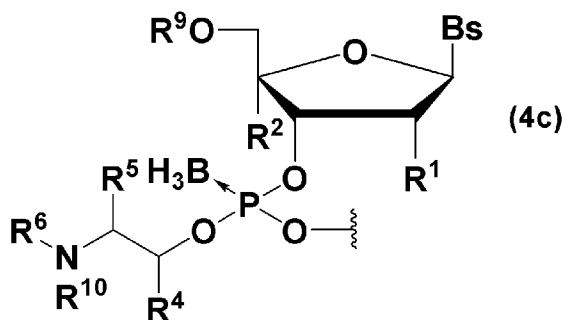
(一般式 (3 a) 中、 R^1 、 R^2 、 R^{3a} 、 $R^4 \sim R^6$ 、及び B^{NH2} は、前記の通りである。)

[化5]



(一般式 (4 a)、(5 a)、(4 b)、及び (5 b) 中、 R^1 、 R^2 、 R^{3a} 、 $R^4 \sim R^6$ 、及び B^{NH2} は、前記の通りである。)

[化6]

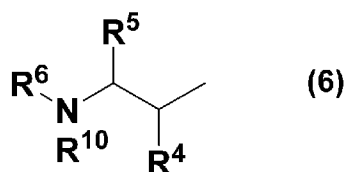


(一般式 (4 c) 及び (5 c) 中、 R^1 、 R^2 、及び $R^4 \sim R^6$ は、前記の通りであり、

前記キャッピングを行った場合、 R^9 は、水酸基の保護基を表し、 R^{10} は、アミノ基の保護基を表し、Bs は、アデニン、グアニン、シトシン、5-メチルシトシン、チミン、及びウラシルからなる群より選ばれる核酸塩基を表し、該アデニン、該グアニン、該シトシン、及び該5-メチルシトシン中のアミノ基は、アミノ基の保護基で置換されており、

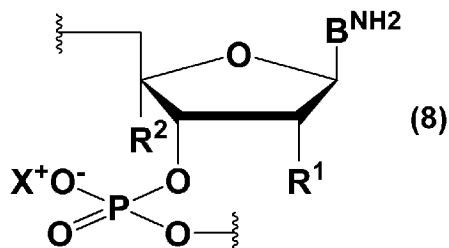
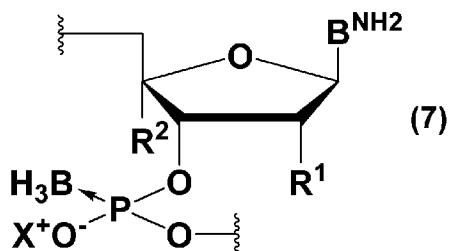
前記キャッピングを行わなかった場合、 R^9 及び R^{10} は、水素原子を表し、Bs は、 B^{NH_2} を表す。)

[化7]



(一般式 (6) 中、 $R^4 \sim R^6$ 及び R^{10} は、前記の通りである。)

[化8]



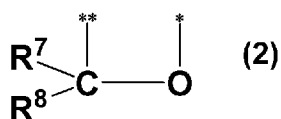
(一般式 (7) 及び (8) 中、 R^1 、 R^2 、及び B^{NH_2} は、前記の通りであり、 X^+ は、カウンターカチオンを表す。)

[請求項7] 前記 R^6 が表すアルキル基は、分岐状である請求項6に記載の製造方法。

[請求項8] 前記 R^6 が表すアルキル基は、炭素原子数が6以上14以下である請求項6に記載の製造方法。

[請求項9] R^1 は、水素原子、水酸基、アルコキシ基、アルケニルオキシ基、アシルオキシ基、トリヒドロカルビルシリルオキシ基、アルコキシアルコキシ基、ハロアルコキシアルコキシ基、又はハロゲニル基を表し、 R^2 は、水素原子を表し、又は、 R^1 及び R^2 は、互いに結合して、下記一般式 (2) で表される二価の基を形成する請求項6に記載の製造方法。

[化9]



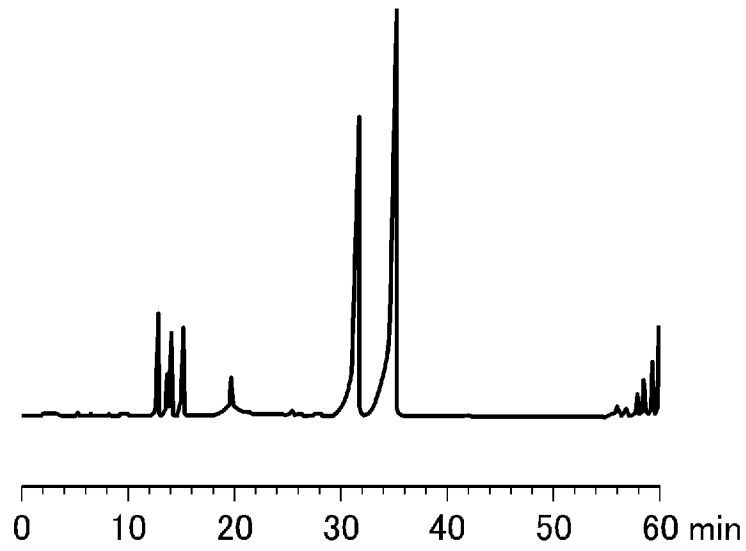
(一般式 (2) 中、 R^7 及び R^8 は、それぞれ独立して、水素原子又

は炭素原子数 1 ～ 10 のアルキル基を表し、又は、互いに結合して環を形成し、*及び**は、結合手を表し、*で表される結合手は、一般式 (1 a) において、 R^1 が直結する炭素原子に結合し、**で表される結合手は、一般式 (1 a) において、 R^2 が直結する炭素原子に結合する。)

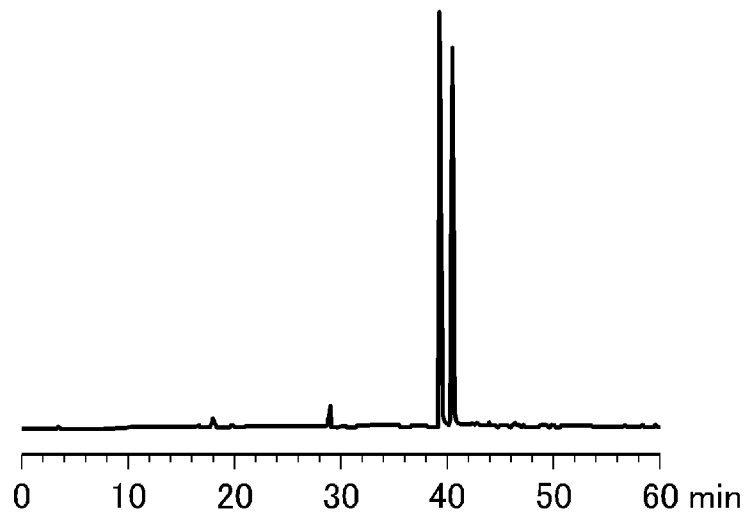
[請求項10] 前記ヌクレオチドモノマー及び前記ヌクレオチド単位においてリン原子の立体化学は制御されている請求項 6 ～ 9 のいずれかに記載の製造方法。

[図1]

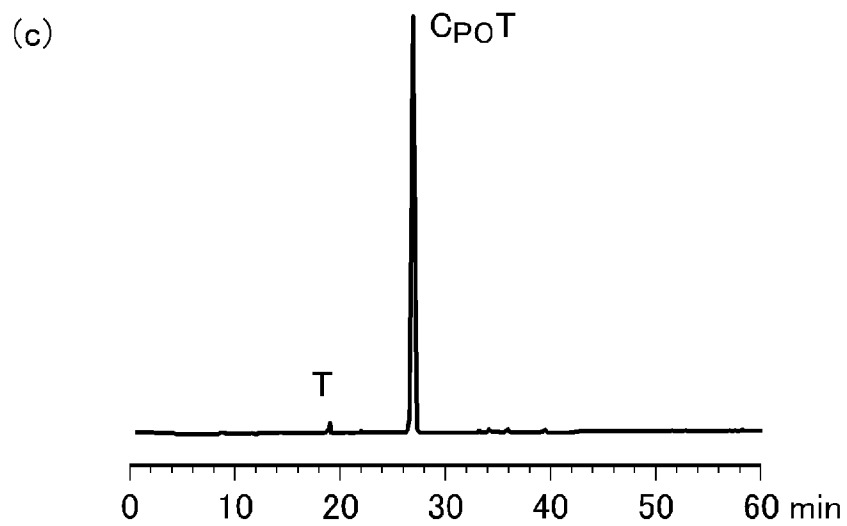
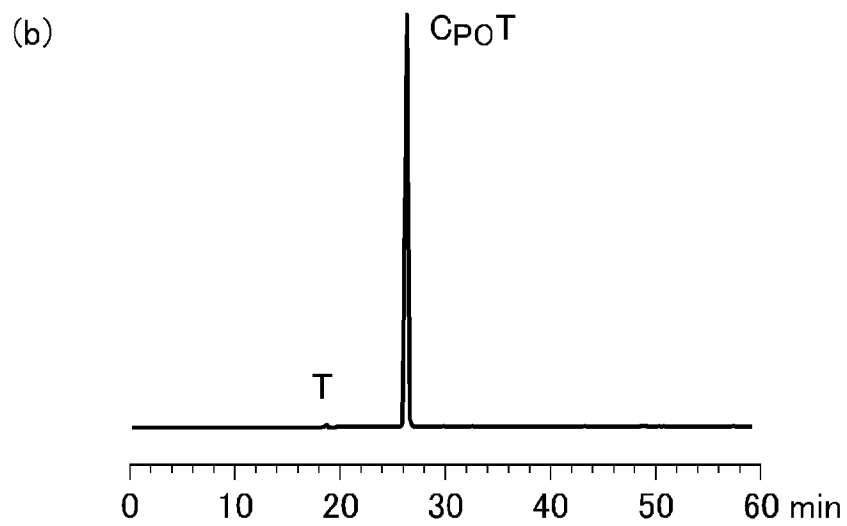
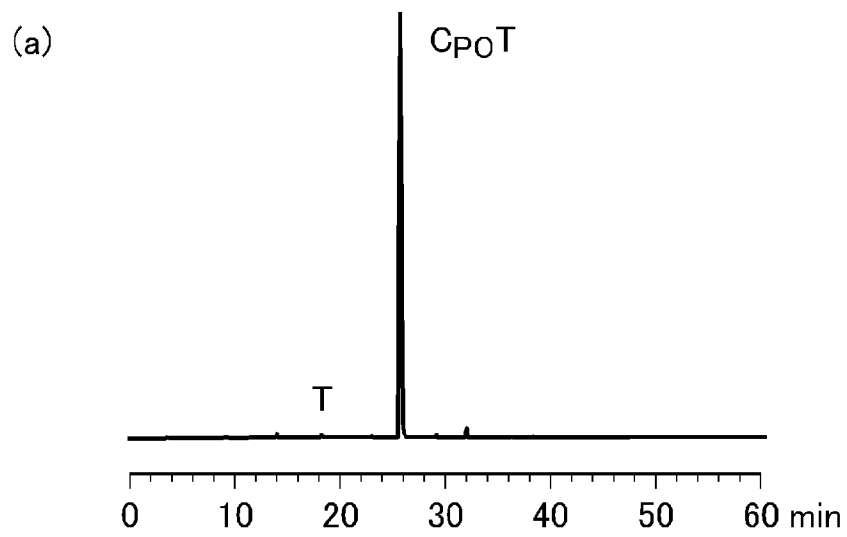
(a)



(b)

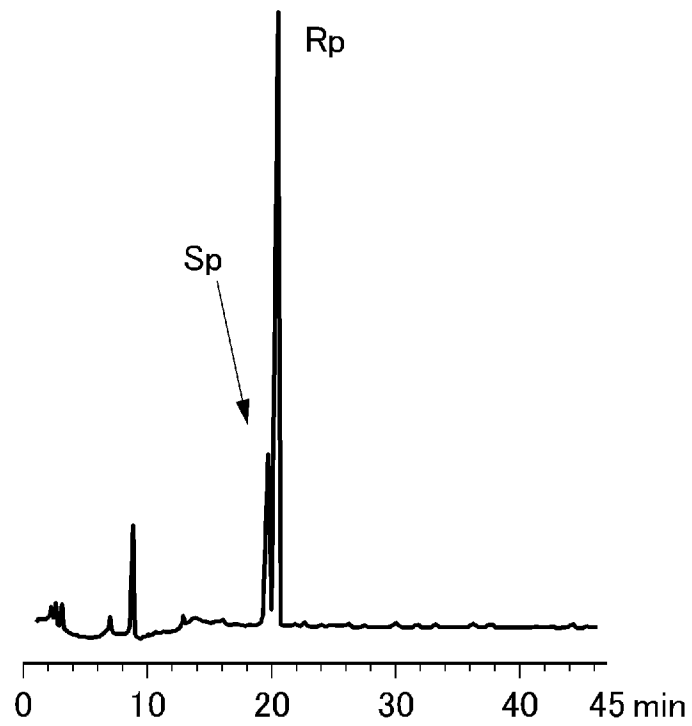


[図2]

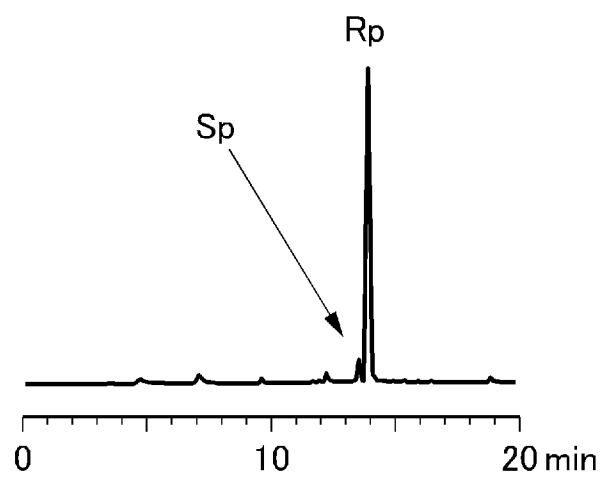


[図3]

(a)

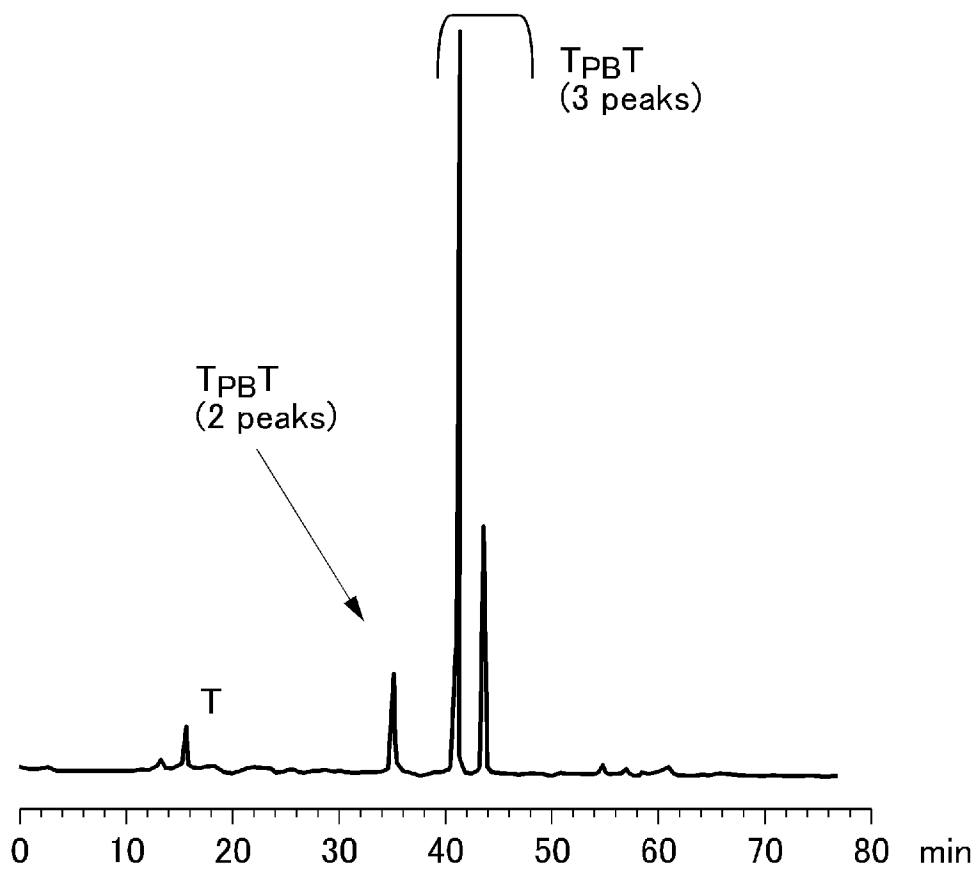


(b)

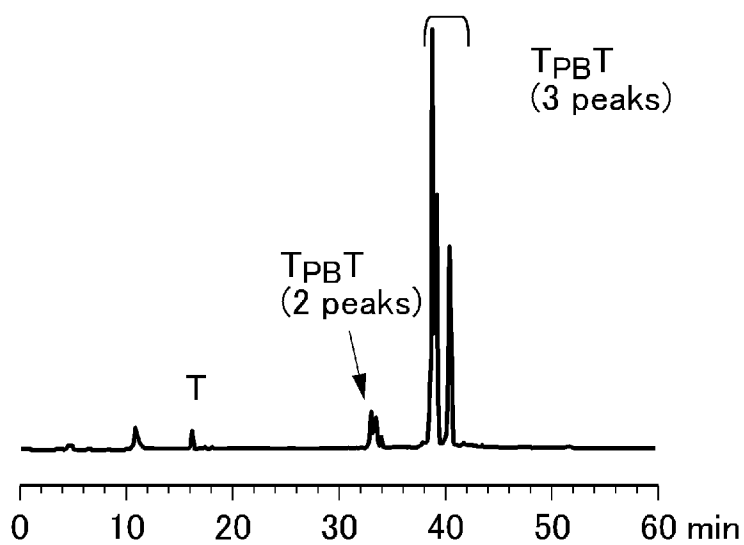


[図4]

(a)

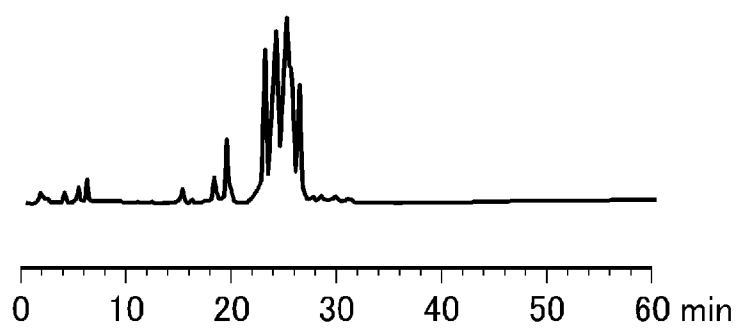


(b)

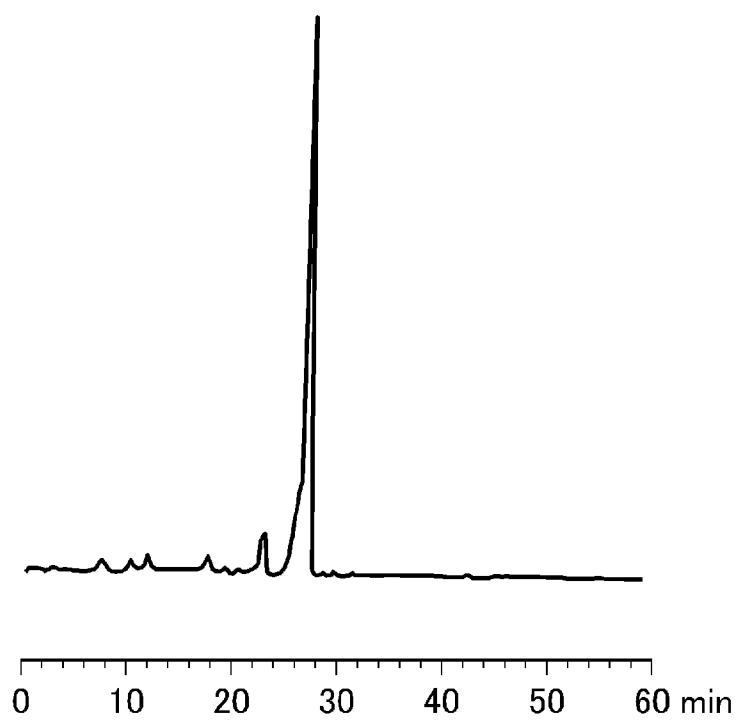


[図5]

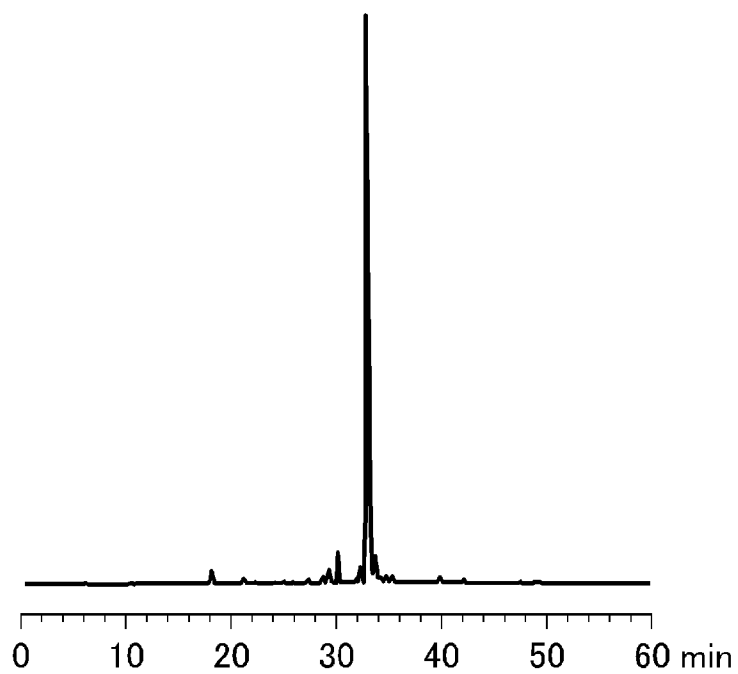
(a)



(b)



(c)



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/023211

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07H 19/11(2006.01)i; **C07H 19/213**(2006.01)i; **C07H 21/04**(2006.01)i; **C07H 23/00**(2006.01)i; **C12N 15/113**(2010.01)n
FI: C07H19/11 CSP; C07H19/213; C07H21/04 ZNA; C07H21/04 A; C07H23/00; C12N15/113 Z

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07H19/11; C07H19/213; C07H21/04; C07H23/00; C12N15/113

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2024
Registered utility model specifications of Japan 1996-2024
Published registered utility model applications of Japan 1994-2024

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS/REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2005/092909 A1 (TOUDAI TLO, LTD.) 06 October 2005 (2005-10-06) claims, table 1	1-2, 4-5
Y		6-7, 9-10
A		3, 8
Y	WADA, T. et al. Stereoselective synthesis of dinucleoside branophosphoates by an oxazaphospholidine method. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 18 April 2006, vol. 16, no. 12, pp. 3111-3114 scheme 2	6-10
A		1-5
X	JP 2020-525442 A (WAVE LIFE SCIENCES LTD.) 27 August 2020 (2020-08-27) claims, paragraphs [0003]-[0006], [2767], [2931]	1-5
Y		6-10
A	US 6160109 A (ISIS PHARMACEUTICALS, INC.) 12 December 2000 (2000-12-12) entire text	1-10



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
“D” document cited by the applicant in the international application
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date
“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 August 2024

Date of mailing of the international search report

10 September 2024

Name and mailing address of the ISA/JP

**Japan Patent Office (ISA/JP)
3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915
Japan**

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/023211

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2024/023211

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO	2005/092909	A1	06 October 2005	(Family: none)	
JP	2020-525442	A	27 August 2020	US 2022/0356204 A1	
				claims, paragraphs [0003]-[0006], [2208], [2277]	
				WO 2018/237194 A1	
				CN 111051281 A	
				EP 3642182 A1	
US	6160109	A	12 December 2000	WO 2000/000499 A1	
				AU 4728899 A	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

C07H 19/11(2006.01)i; C07H 19/213(2006.01)i; C07H 21/04(2006.01)i; C07H 23/00(2006.01)i;
C12N 15/113(2010.01)n
FI: C07H19/11 CSP; C07H19/213; C07H21/04 ZNA; C07H21/04 A; C07H23/00; C12N15/113 Z

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））
C07H19/11; C07H19/213; C07H21/04; C07H23/00; C12N15/113

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの
日本国実用新案公報 1922-1996年
日本国公開実用新案公報 1971-2024年
日本国実用新案登録公報 1996-2024年
日本国登録実用新案公報 1994-2024年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）
CAplus/REGISTRY (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	WO 2005/092909 A1（株式会社東京大学TLO）06.10.2005（2005-10-06） 請求の範囲，表1	1-2, 4-5
Y		6-7, 9-10
A		3, 8
Y	WADA, T. et al., Stereoselective synthesis of dinucleoside branophosphoates by an oxazaphospholidine method, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2006.04.18, Vol.16, No.12, pp.3111-3114 Scheme 2	6-10
A		1-5
X	JP 2020-525442 A（ウェイブ ライフ サイエンスズ リミテッド）27.08.2020 （2020-08-27） 特許請求の範囲，[0003]-[0006]，[2767]，[2931]	1-5
Y		6-10

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

“D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献

“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に
公表されたもの

“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若し
くは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を
付す）

“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の
後に公表された文献

“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵
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

“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性
又は進歩性がないと考えられるもの

“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献
との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がな
いと考えられるもの

“&” 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

21.08.2024

国際調査報告の発送日

10.09.2024

名称及びあて先

日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

権限のある職員（特許庁審査官）

早川 裕之 4P 2668

電話番号 03-3581-1101 内線 3443

様式 PCT/ISA/210（第2ページ）（2022年7月）

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	US 6160109 A (ISIS PHARMACEUTICALS, INC.) 12.12.2000 (2000 - 12 - 12) 全文	1-10

第 I 欄 ス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ス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
- b. ☐ 国際出願日後に、国際調査のために提出された配列表（PCT規則13の3.1(a)）
☐ 配列表が出願時の国際出願の開示の範囲を超えるものではない旨の陳述書が添付されていた。

2. ☐ この国際出願で開示されたスクレオチド又はアミノ酸配列に関して、この国際調査報告は、WIPO標準ST.26に準拠する配列表なしで有意義な国際調査をすることができる限度において作成された。

3. 補足意見：

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/JP2024/023211

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO	2005/092909	A1	06.10.2005	(ファミリーなし)	
JP	2020-525442	A	27.08.2020	US	2022/0356204 A1
				Claims, [0003]-[0006], [2208], [2277]	
				WO	2018/237194 A1
				CN	111051281 A
				EP	3642182 A1
US	6160109	A	12.12.2000	WO	2000/000499 A1
				AU	4728899 A