

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7235512号

(P7235512)

(45)発行日 令和5年3月8日(2023.3.8)

(24)登録日 令和5年2月28日(2023.2.28)

(51)国際特許分類

F I

C 0 7 H 21/04 (2006.01)

C 0 7 H 21/04

A

請求項の数 20 (全63頁)

(21)出願番号	特願2018-567264(P2018-567264)	(73)特許権者	398050098
(86)(22)出願日	平成29年6月22日(2017.6.22)		バイオジェン・エムエイ・インコーポレ
(65)公表番号	特表2019-518778(P2019-518778		イテッド
	A)		B i o g e n M A I n c .
(43)公表日	令和1年7月4日(2019.7.4)		アメリカ合衆国02142マサチューセ
(86)国際出願番号	PCT/US2017/038643		ッツ州ケンブリッジ、ピニー・ストリー
(87)国際公開番号	WO2017/223258		ト225番
(87)国際公開日	平成29年12月28日(2017.12.28)	(74)代理人	100118902
審査請求日	令和2年6月18日(2020.6.18)		弁理士 山本 修
(31)優先権主張番号	62/354,433	(74)代理人	100106208
(32)優先日	平成28年6月24日(2016.6.24)		弁理士 宮前 徹
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100120112
			中西 基晴
		(74)代理人	100188374
			弁理士 一宮 維幸

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 キャッピング工程を有さないチオール化オリゴヌクレオチドの合成

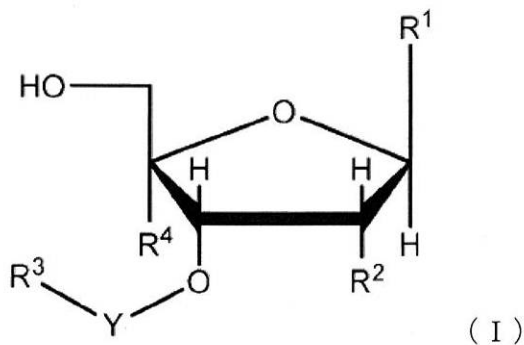
## (57)【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

オリゴヌクレオチドを調製するためのプロセスであって

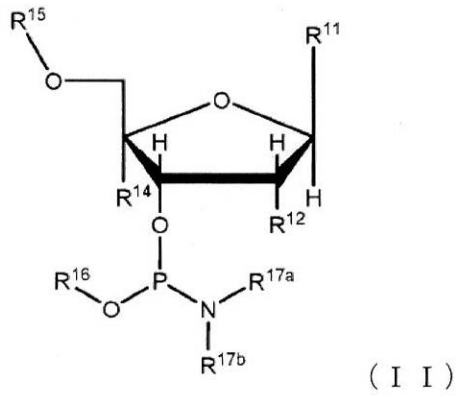
a) 式(I)の化合物:

## 【化1】



を式(II)の化合物:

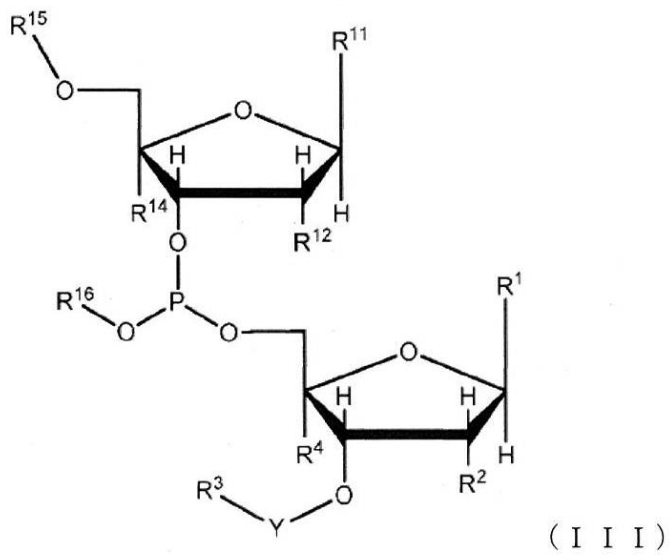
【化 2】



10

と反応させて、式 ( I I I ) の化合物：

【化 3】



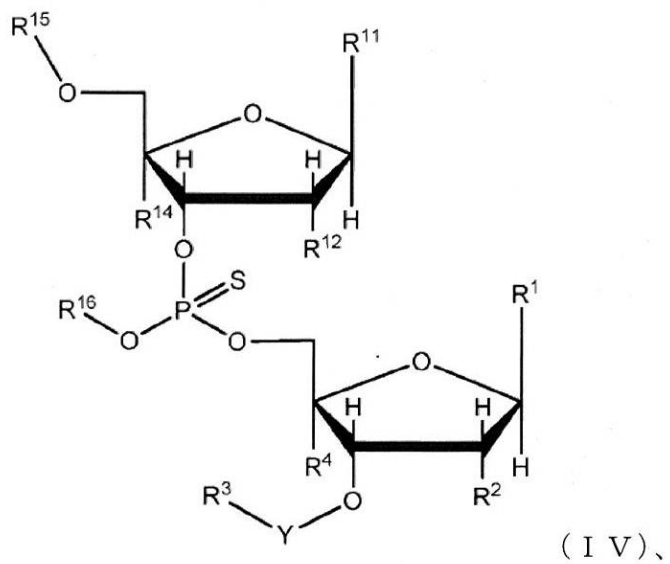
20

30

を形成することと；

b) 前記式 ( I I I ) の化合物を、硫化剤を用いて硫化して、式 ( I V ) の化合物：

【化 4】

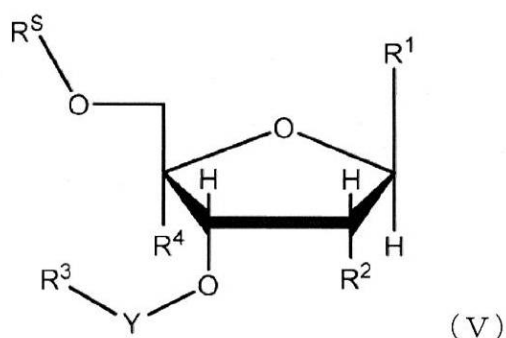


40

50

を形成し、式 ( I ) の未反応化合物から式 ( V ) の化合物：

【化 5】



10

を形成することと；

を含み、

式中

各  $R^1$  及び  $R^{11}$  は、独立して、核酸塩基であり、前記核酸塩基の  $NH_2$  が、存在する場合、アミン保護基によって保護されており；

各  $R^2$  及び  $R^{12}$  は、H、ハロ、及び  $C_{1-6}$  アルコキシによって置換されていてもよい  $C_{1-6}$  アルコキシからなる群から独立して選択され；

$R^3$  は、リンカーを含んでもよい固体支持体であり；

$Y$  は、非存在、ヌクレオチド、または 2 以上のヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドであり；

各  $R^4$  は、独立して H であるか、または  $R^2$  の前記アルコキシ基と共に環を形成し；

各  $R^{14}$  は、独立して H であるか、または  $R^{12}$  の前記アルコキシ基と共に環を形成し；

；

$R^{15}$  は、ヒドロキシ保護基であり；

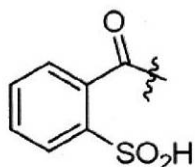
$R^{16}$  は、 $-CN$  によって置換されていてもよい  $C_{1-6}$  アルキルであり；

$R^{17a}$  及び  $R^{17b}$  は、独立して  $C_{1-6}$  アルキルであり；

ここで、( i ) 前記硫化剤は、3 - アミノ - 1, 2, 4 - ジチアゾール - 5 - チオン (  $XH$  または  $ADTT$  ) であり、かつ  $R^S$  は、 $-C(SH)(=N)-CN$  であるか、( i i ) 前記硫化剤は、フェニルアセチルジスルフィド (  $PADS$  ) であり、かつ  $R^S$  は、 $-C(=O)CH_2C_6H_5$  であるか、( i i i ) 前記硫化剤は、3 -  $\angle$  (ジメチルアミノ - メチリデン) アミノ - 3 H - 1, 2, 4 - ジチアゾール - 3 - チオン (  $DDTT$  ) であり、かつ  $R^S$  は、 $-C(=S)NHC(=S)N=CHN(CH_3)_2$  であるか、または ( i v ) 前記硫化剤は、3 H - 1, 2 - ベンゾジチオール - 3 - オン 1, 1 - ジオキサイド (  $Beaucage$  試薬 ) であり、かつ  $R^S$  は、

30

【化 6】



40

であり；

前記硫化剤は、工程 b ) において 0 ~ 30 分間再循環され、式 ( I ) の未反応化合物を前記式 ( V ) の化合物に変換し、かつ前記式 ( I I I ) の化合物を前記式 ( I V ) の化合物に変換し；

前記硫化剤は、前記リンカー、または第 1 ヌクレオチドが前記固体支持体に直接付着しているときには前記第 1 ヌクレオチドに対して、3 ~ 6 当量で添加され、式 ( I ) の未反応化合物を式 ( V ) の化合物に変換し、かつ前記式 ( I I I ) の化合物を前記式 ( I V )

50

の化合物に変換し；

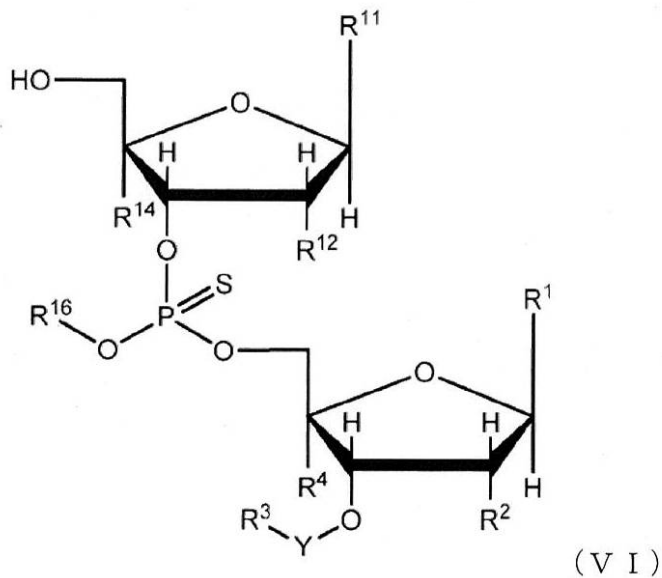
前記式 ( I )、( I I )、( I I I )、( I V )、及び ( V ) の化合物が、薬学的に許容可能な塩の形態であってもよく；

式 ( I ) の未反応化合物は、式 ( I ) の未反応化合物の 5' - OH をカップリングする他の試薬を添加することなく、前記硫化剤または硫化工程 b ) の副生成物によってカップリングされる、前記プロセス。

【請求項 2】

c) 前記式 ( I V ) の化合物を脱保護して、式 ( V I ) の化合物：

【化 7】



またはその薬学的に許容可能な塩を形成する工程をさらに含む、請求項 1 に記載のプロセス。

【請求項 3】

d) 前記式 ( V I ) の化合物を式 ( I I ) の化合物と反応させて、式 ( V I I ) の化合物：

10

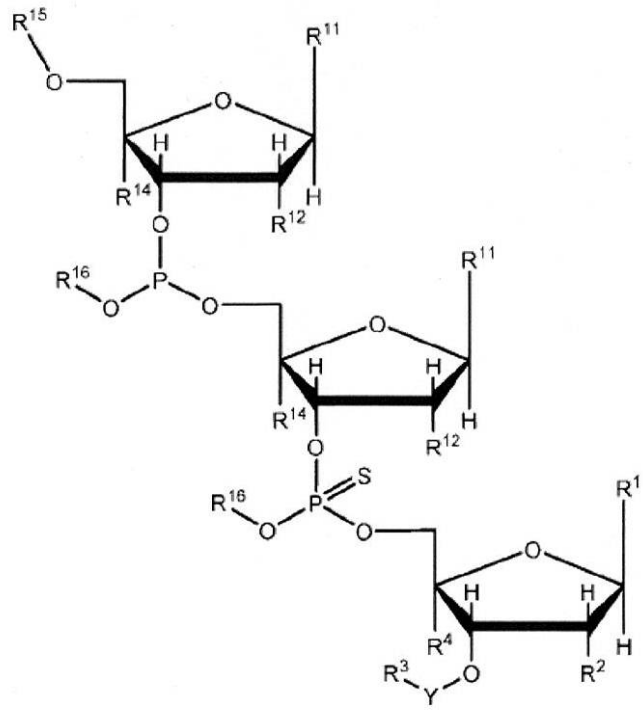
20

30

40

50

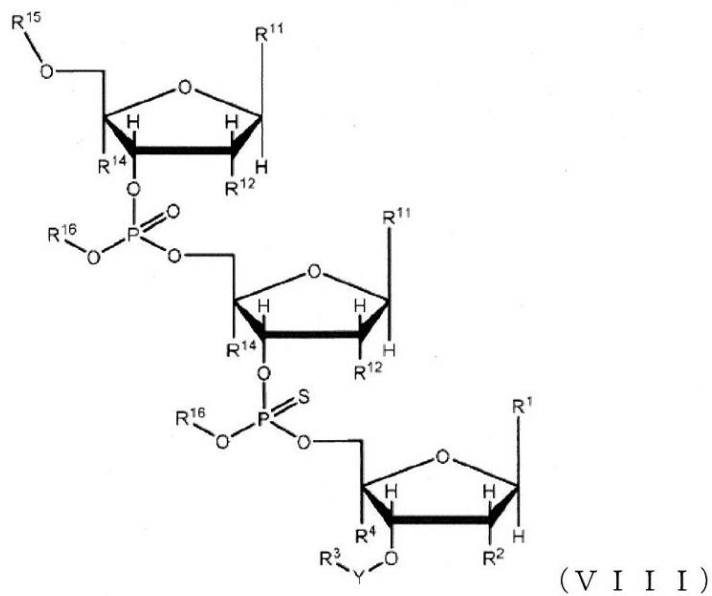
## 【化 8】



またはその薬学的に許容可能な塩を形成する工程と；

e) 前記式 (VII) の化合物を、酸化剤を用いて酸化して、式 (VII I) の化合物：

## 【化 9】



を形成する工程と

をさらに含む、請求項 2 に記載のプロセス。

## 【請求項 4】

f) 前記式 (VII I) の化合物を脱保護して、式 (IX) の化合物：

10

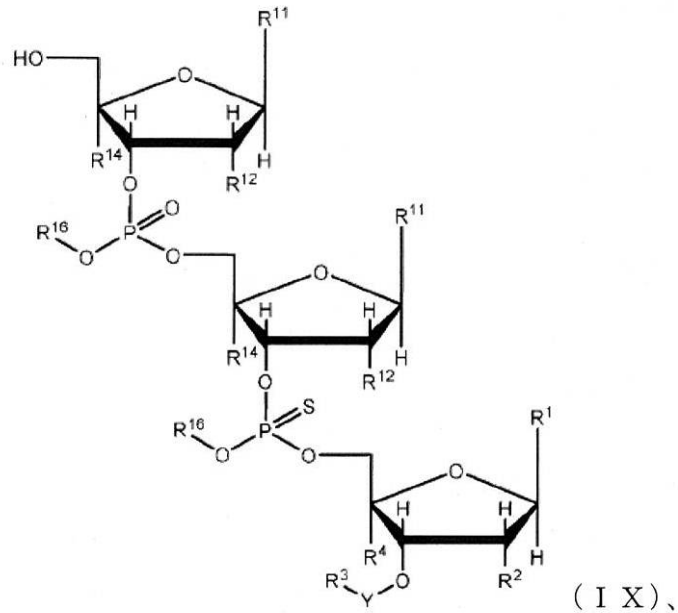
20

30

40

50

【化 1 0】

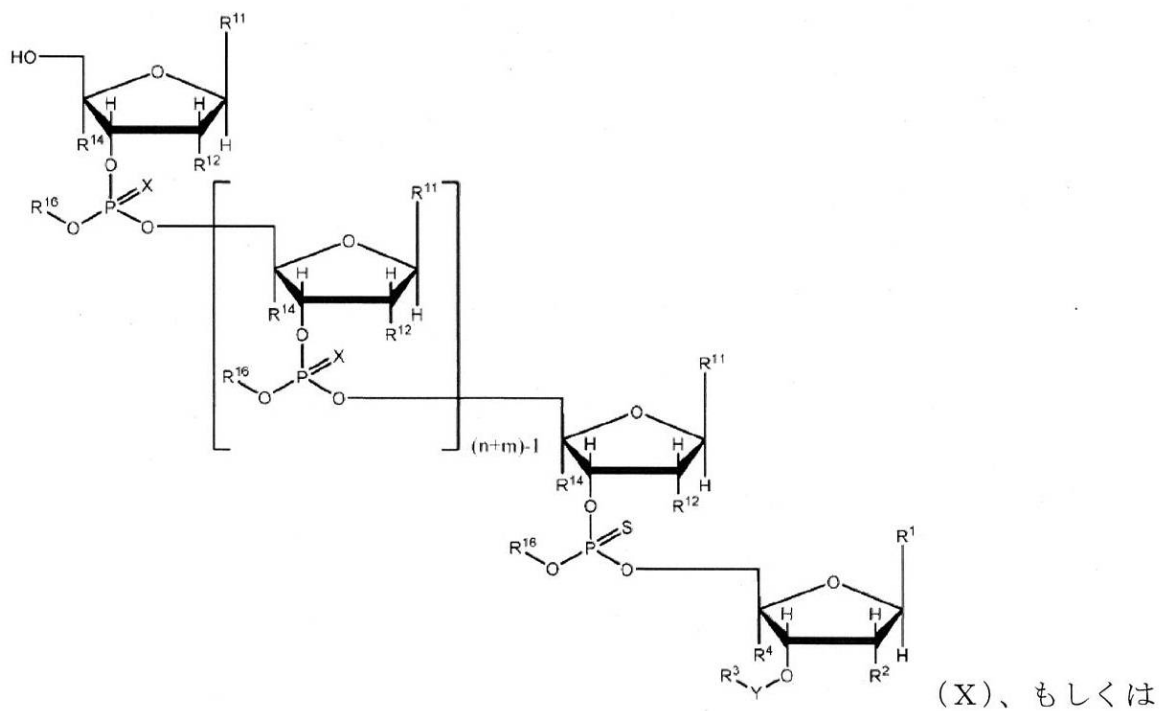


またはその薬学的に許容可能な塩  
を形成する工程をさらに含む、請求項 3 に記載のプロセス。

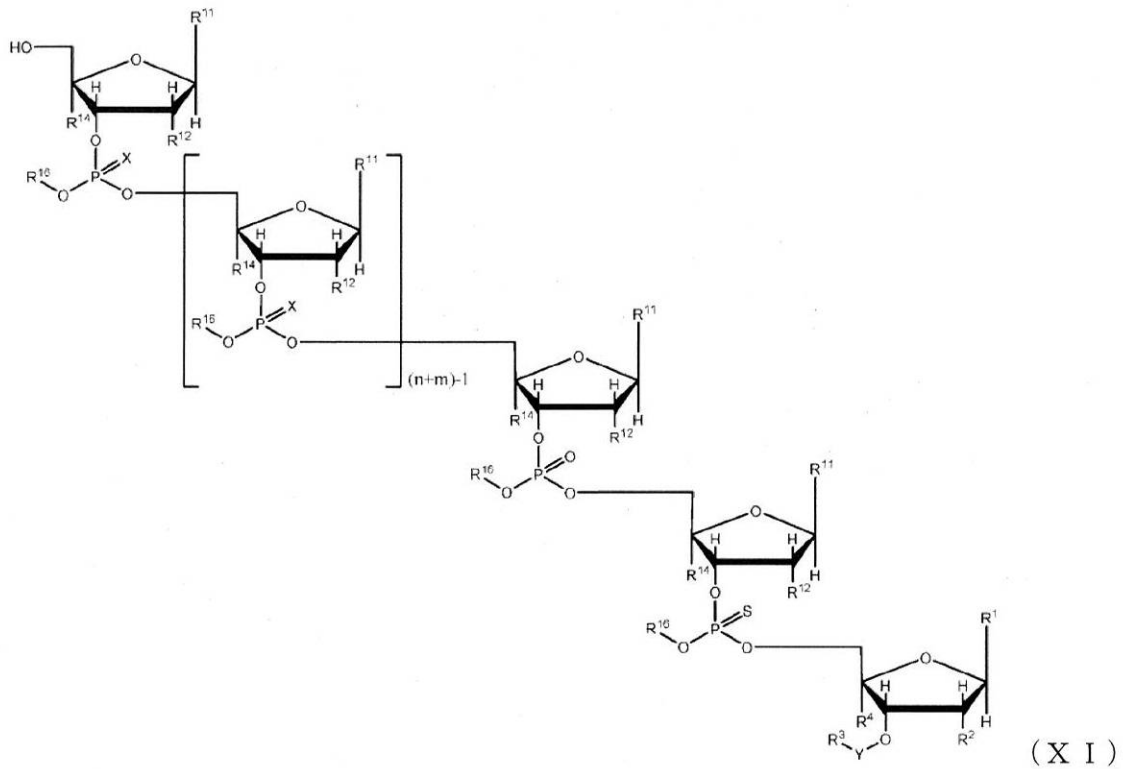
【請求項 5】

前記式 (VI) の化合物または前記式 (IX) の化合物によって開始して、工程 a)、b)、及び c) が  $n$  回繰り返され、工程 d)、e) 及び f) が  $m$  回繰り返され、工程 a)、b)、及び c)、ならびに工程 d)、e) 及び f) の繰り返しが、互いに対していずれの順序で行われてもよく、 $n$  が少なくとも 1 であり、 $m$  が 0、1、2、3、または 4 であり、式 (X) もしくは (XI) のオリゴヌクレオチド：

【化 1 1】

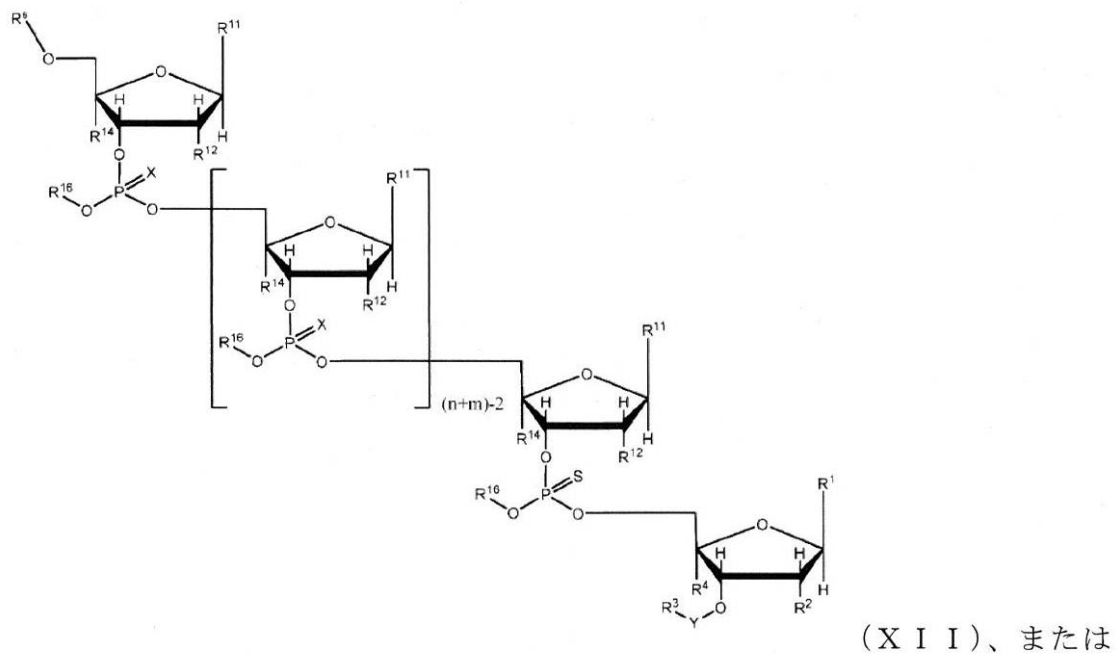


## 【化 1 2】



またはその薬学的に許容可能な塩を形成すること、あるいは、オリゴヌクレオチドを形成することにおいて、工程 a、b、及び c、または工程 d、e、及び f の各繰り返しにより、式 (V I) または (I X) のいくつかの未反応化合物を結果として生じ、これが、過剰の硫化剤または前記硫化工程後の前記硫化剤の副生成物と反応して、式 (X I I) または (X I I I) の化合物：

## 【化 1 3】



10

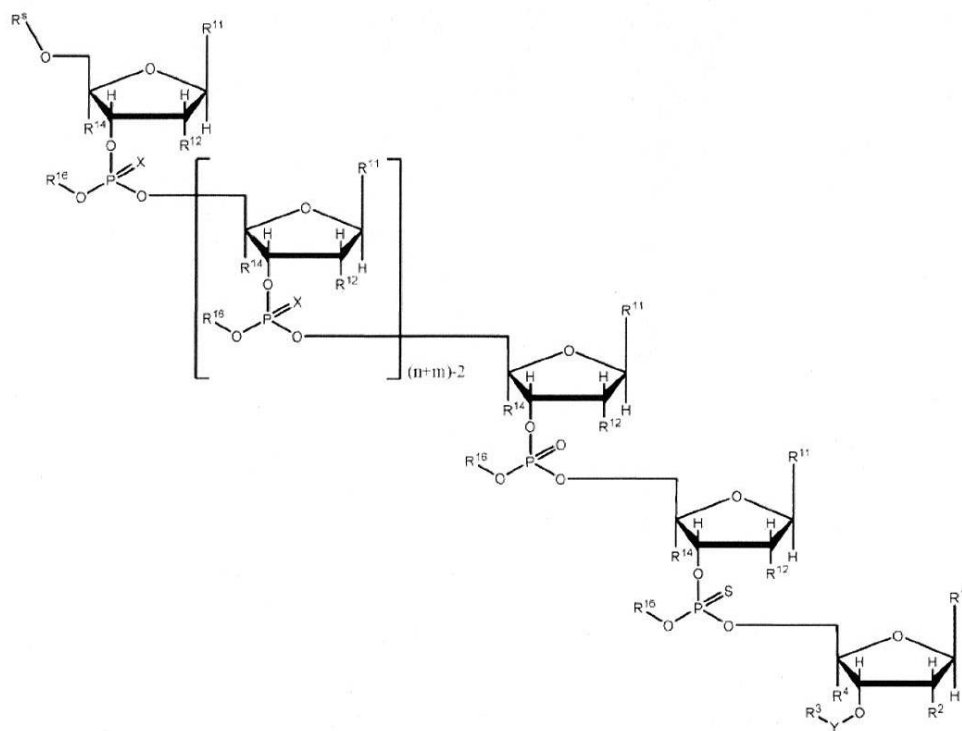
20

30

40

50

## 【化 1 4】

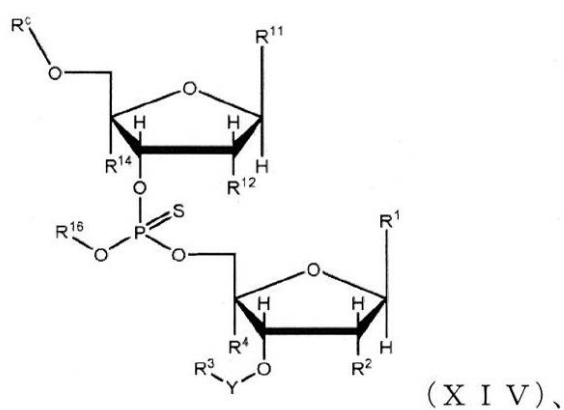


式中、各 X は、S または O から独立して選択され、ただし、前記式 (X)、(X I)、(X I I)、または (X I I I) の化合物において、4、3、2、1、または 0 回のみ、X が O である；を形成する、請求項 4 に記載のプロセス。

## 【請求項 6】

g) 前記式 (V I) の未反応化合物をキャッピング剤と反応させて、式 (X I V) の化合物：

## 【化 1 5】



またはその薬学的に許容可能な塩を形成する工程をさらに含み、R<sup>c</sup> が、前記キャッピング剤から形成されたヒドロキシ保護基である、請求項 3 に記載のプロセス。

## 【請求項 7】

h) 前記式 (V I I I) の化合物を脱保護して、式 (I X) の化合物：

10

20

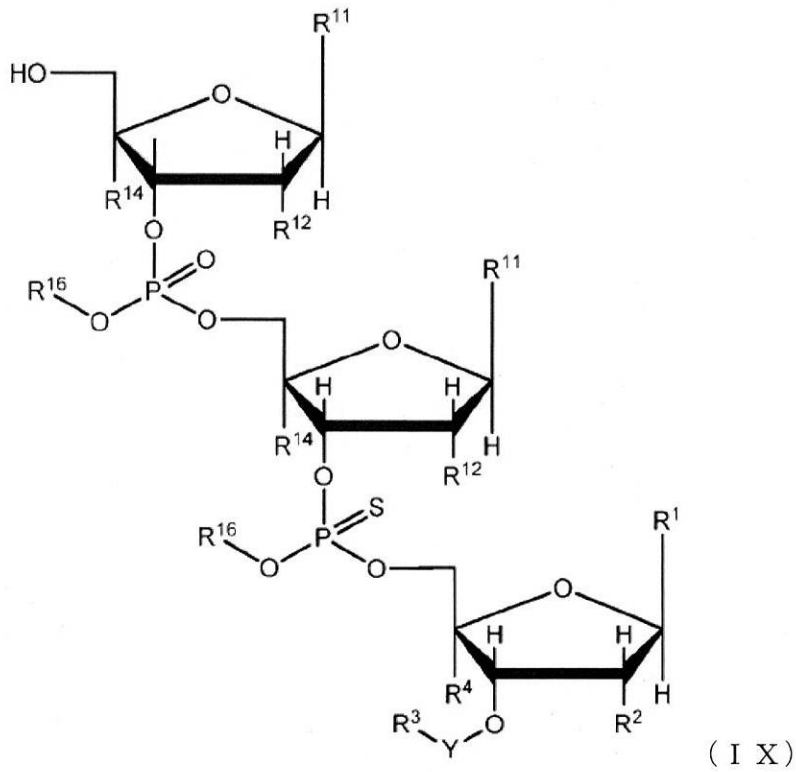
30

40

50



## 【化 1 6】



またはその薬学的に許容可能な塩を形成する工程をさらに含む、請求項 6 に記載のプロセス。

## 【請求項 8】

前記式 ( V I ) の化合物または前記式 ( I X ) の化合物によって開始して、工程 a )、b )、及び c ) が n 回繰り返され、工程 d )、e )、g ) 及び h ) が m 回繰り返され、工程 a )、b )、及び c ) ならびに工程 d )、e )、g ) 及び h ) の繰り返しが、互いに対していずれの順序で行われてもよく、n が少なくとも 1 であり、m が 0 以上であり、式 ( X ) もしくは ( X I ) のオリゴヌクレオチド：

10

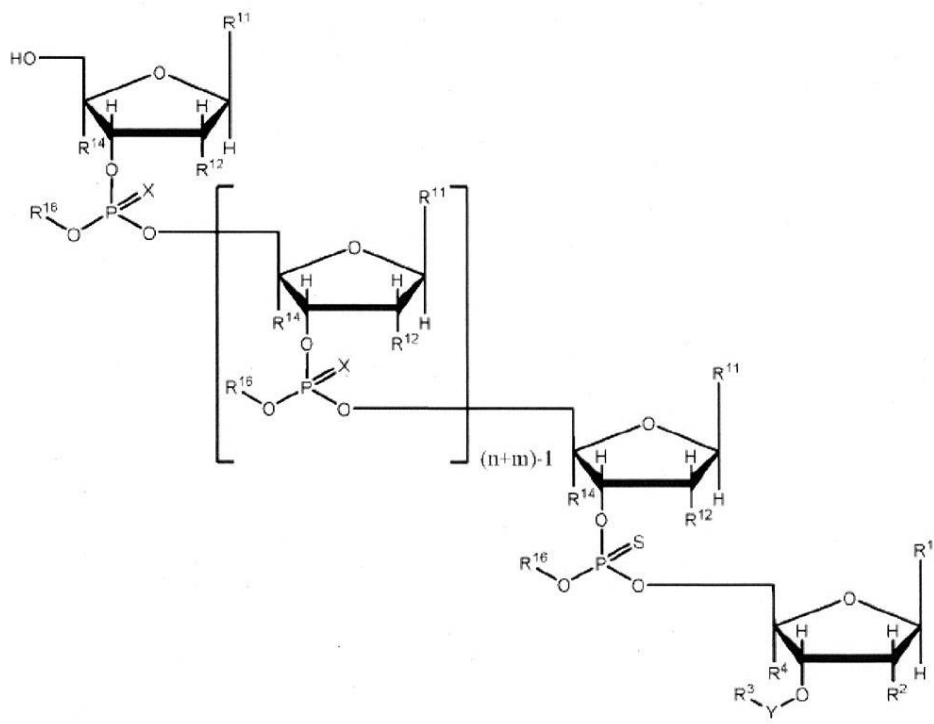
20

30

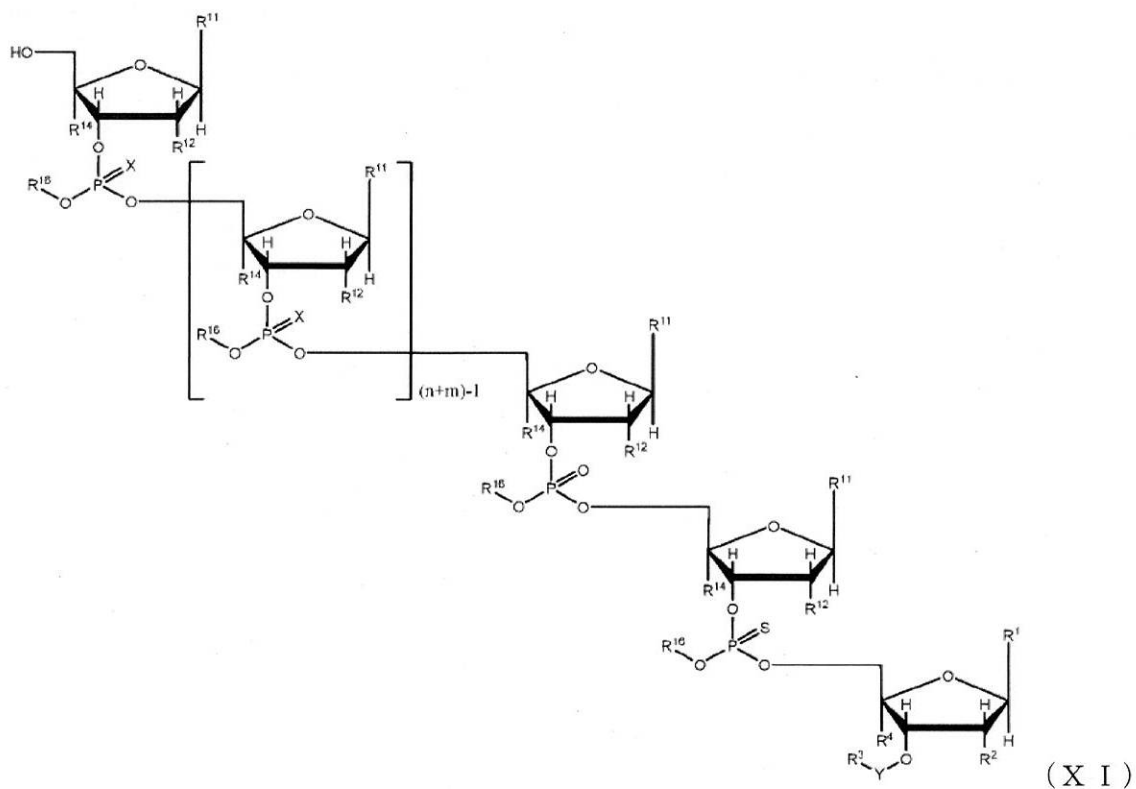
40

50

## 【化 1 7】



## 【化 1 8】



またはその薬学的に許容可能な塩を形成すること、あるいは、オリゴヌクレオチドを形成することにおいて、工程 a)、b)、及び c)、または工程 d)、e)、g) 及び h) の各繰り返しにより、式 (V I) または (I X) のいくつかの未反応化合物を結果として生じ、これが、過剰の硫化剤または前記硫化工程後の前記硫化剤の副生成物と反応して、式 (X I I) または (X I I I) の化合物：

10

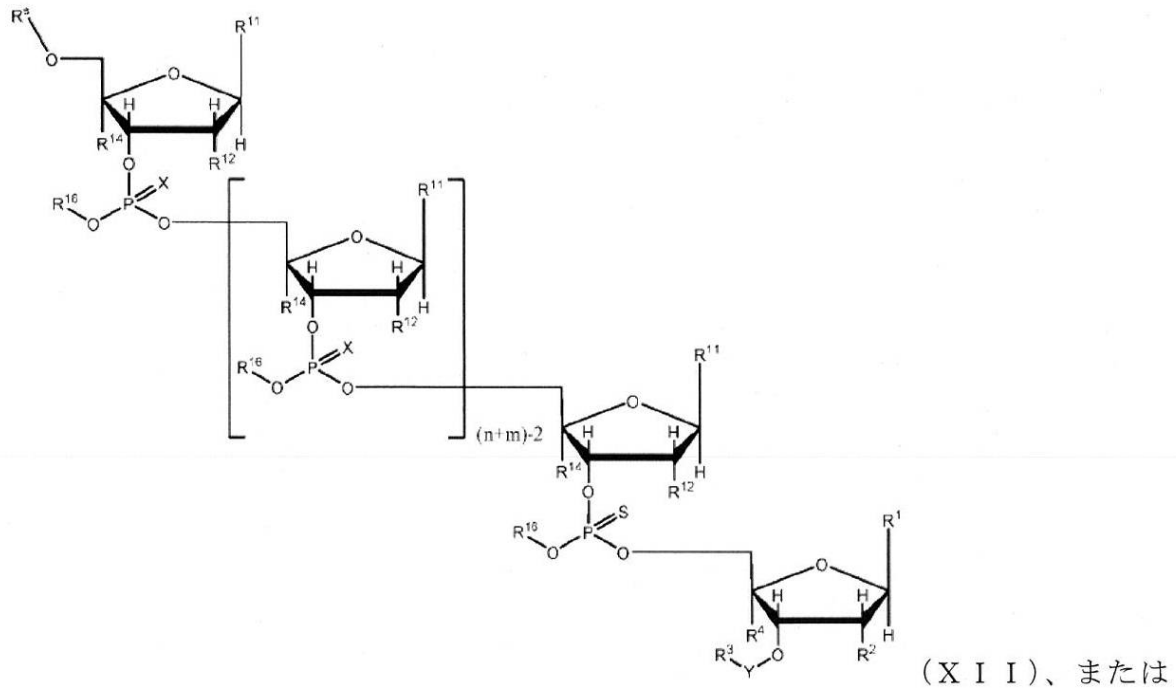
20

30

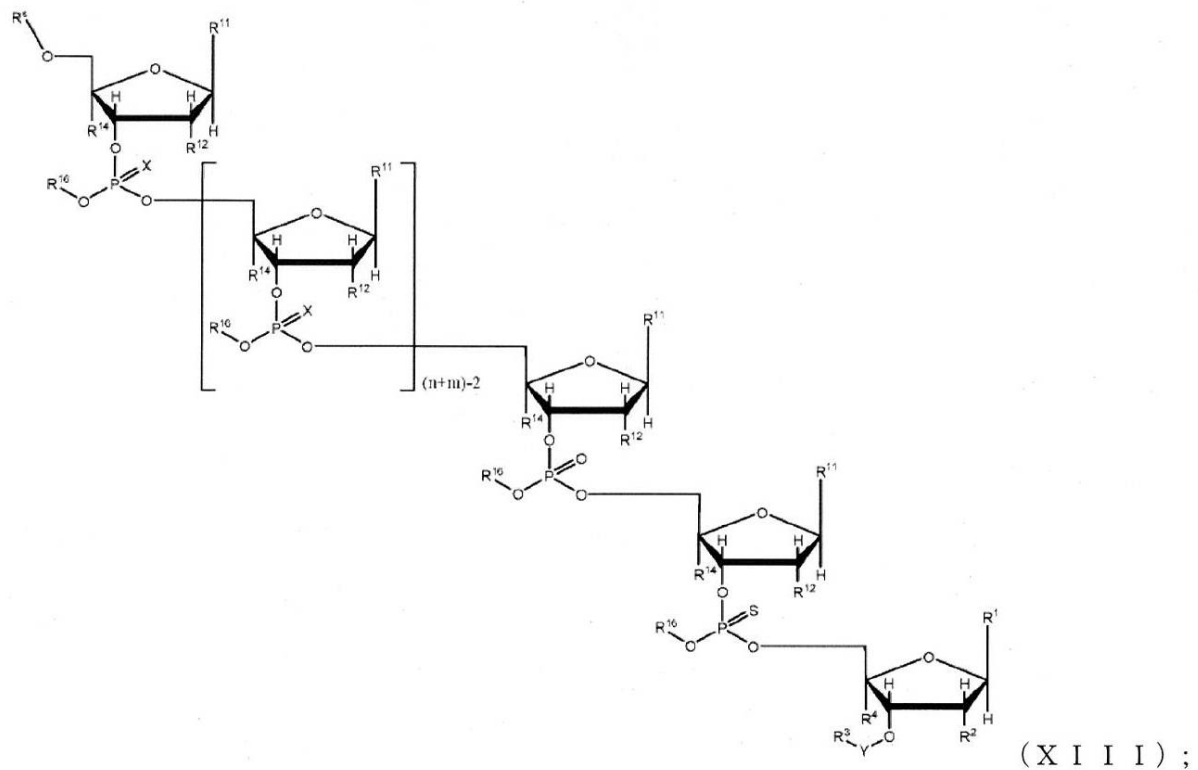
40

50

## 【化 19】



## 【化 20】



式中、各 X は、S または O から独立して選択される ; を形成する、請求項 7 に記載のプロセス。

## 【請求項 9】

n が、2 ~ 1000、2 ~ 500、2 ~ 100、2 ~ 50、または 2 ~ 25 である、請求項 5 または 8 に記載のプロセス。

## 【請求項 10】

前記固体支持体に付着した前記リンカーが開裂される、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載のプロセス。

【請求項 11】

前記硫化剤が、フェニルアセチルジスルフィド (PADS) であり、かつ  $R^S$  が、 $-C(=O)CH_2C_6H_5$  である、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載のプロセス。

【請求項 12】

前記硫化剤が、3 - アミノ - 1, 2, 4 - ジチアゾール - 5 - チオン (XH または ADTT) であり、かつ  $R^S$  が、 $-C(SH)(=N)-CN$  である、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載のプロセス。

【請求項 13】

前記硫化剤が、1 ~ 20 回、1 ~ 10 回、もしくは 1 ~ 5 回再循環される、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載のプロセス。

【請求項 14】

前記硫化剤の濃度が、0.02 M ~ 2.0 M または 0.05 M ~ 0.5 M である、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載のプロセス。

【請求項 15】

前記硫化剤が、0.02 M ~ 0.1 M の濃度で添加される 3 - -(ジメチルアミノ - メチリデン)アミノ - 3 H - 1, 2, 4 - ジチアゾール - 3 - チオン (DDTT) である、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載のプロセス。

【請求項 16】

(i) 前記核酸塩基が、シトシン、グアニン、アデニン、チミン、ウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、7 - メチルグアニン、5, 6 - ジヒドロウラシル、5 - メチルシトシン、及び 5 - ヒドロキシメチルシトシンからなる群から選択され、前記核酸塩基の前記  $NH_2$  基が、存在する場合、 $PhCO-$ 、 $CH_3CO-$ 、 $iPrCO-$ 、 $Me_2N-CH=$ 、または  $Me_2N-CMe=$  によって保護されている、または

(ii) 前記核酸塩基が、シトシン、グアニン、アデニン、チミン、ウラシル、及び 5 - メチルシトシンからなる群から選択され、前記核酸塩基の前記  $NH_2$  基が、存在する場合、 $PhCO-$ 、 $CH_3CO-$ 、 $iPrCO-$ 、 $Me_2N-CH=$ 、または  $Me_2N-CMe=$  によって保護されている、請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載のプロセス。

【請求項 17】

(i) 各  $R^2$  及び  $R^{12}$  が、H、F、及び  $C_{1-4}$  アルコキシによって置換されていてもよい  $C_{1-4}$  アルコキシからなる群から独立して選択され；

各  $R^4$  が、独立して H であるか、または  $R^2$  の前記アルコキシ基と共に環を形成し、前記環が、1 ~ 3 個の  $C_{1-4}$  アルキル基によって置換されていてもよい 5 または 6 員環であり；

$R^{16}$  が  $-CH_2CH_2CN$  であり；

$R^{17a}$  及び  $R^{17b}$  が、独立して、 $C_{1-4}$  アルキルであり；

各  $R^{14}$  が、独立して H であるか、または  $R^{12}$  の前記アルコキシ基と共に環を形成し、前記環が、1 ~ 3 個の  $C_{1-4}$  アルキル基によって置換されていてもよい 5 または 6 員環である；

請求項 1 ~ 16 のいずれか一項に記載のプロセス。

【請求項 18】

(i) Y が存在しない、

(ii) Y が、単一のヌクレオチドである、

(iii) Y が、2 ~ 50 のヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドである、

(iv) Y が、2 ~ 40 のヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドである、

(v) Y が、2 ~ 30 のヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドである、または

(vi) Y が、2 ~ 25 のヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドである、

請求項 1 ~ 17 のいずれか一項に記載のプロセス。

【請求項 19】

10

20

30

40

50

式 ( X ) の化合物が、 2 ~ 3 0 のヌクレオチドを含むアンチセンスオリゴヌクレオチドであり、

( i ) 前記アンチセンスオリゴヌクレオチドは、修飾 RNA のみを含んでいてもよい、

( i i ) 前記アンチセンスオリゴヌクレオチドは、DNA 及び修飾 RNA を含んでいてもよい、

( i i i ) 前記アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ギャップマーであってもよい、

( i v ) 前記アンチセンスオリゴヌクレオチドは、DNA のみを含んでいてもよい、

( v ) 前記アンチセンスオリゴヌクレオチドの配列は、配列番号 1 であってもよい、

( v i ) 前記アンチセンスオリゴヌクレオチドの配列は、配列番号 2 であってもよい、  
または

( v i i ) 前記アンチセンスオリゴヌクレオチドの配列は、配列番号 8 であってもよい、  
請求項 5 または 8 に記載のプロセス。

#### 【請求項 2 0】

各  $R^2$  及び  $R^{12}$  が、H、または、 $C_{1-4}$  アルコキシによって置換されていてもよい  $C_{1-4}$  アルコキシから独立して選択され；

$R^{15}$  が、4, 4'-ジメトキシトリチルであり；

$R^{16}$  が、 $-CH_2CH_2CN$  であり；

$R^{17a}$  及び  $R^{17b}$  が、独立して、 $C_{1-6}$  アルキルであり；

$R^S$  が、 $-C(=N)(SH)-CN$  または  $-C(=O)CH_2C_6H_5$  である、  
請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載のプロセス。

#### 【発明の詳細な説明】

#### 【技術分野】

#### 【0001】

#### 関連出願

この出願は、米国特許法第 119 ( e ) 条の下に、2016 年 6 月 24 日に出願された米国仮特許出願第 62 / 354, 433 号の出願日の優先権を主張し、その全内容が、参照により本明細書に組み込まれる。

#### 【0002】

#### 配列表

現出願は、ASCII フォーマットで電子的に提出されている配列表を包含し、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。当該 ASCII のコピーは、2017 年 6 月 20 日に作成されており、名称が 123429 - 00220 \_\_SL . txt であり、サイズが 3, 101 バイトである。

#### 【背景技術】

#### 【0003】

オリゴヌクレオチドは、研究及び医療目的で化学的に合成され得る短い DNA または RNA オリゴマーである。オリゴヌクレオチドは、特定の配列を生成するためにヌクレオチド残基を段階的に付加することによって典型的には調製される。チオール化オリゴヌクレオチドの現在の固相合成製造法は、サイクル当たり 4 反応、すなわち、脱保護（例えば、脱トリチル化）、カップリング、硫化、及びキャッピングの繰り返しを使用する。キャッピング工程は、各サイクルにおいてホスホロアミダイトとカップリングしなかったあらゆる未反応の 5' - ヒドロキシル基をブロックするように設計されたものであったため、失敗配列が、後のサイクルにおいてカップリング反応にさらに関与せず、失敗したカップリングのヌクレオチドが存在しない不純物を発生させる。キャッピング工程は、典型的には、塩基触媒、例えばピリジンまたは N - メチルモルホリンと共に無水酢酸を使用して行われる。

#### 【0004】

成長するオリゴマーに各ヌクレオチドを付加するために 4 つの工程のそれぞれを完了させる必要があるため、工程の数を減少させることが、各ヌクレオチドの付加に必要とされる時間を減少させ、その上、オリゴヌクレオチド合成を完了するのに必要とされる試薬

量を減少させる。そのため、オリゴヌクレオチドを調製するための新規の合成方法が必要とされている。

【発明の概要】

【0005】

本発明は、従来のサイクル当たり4反応ではなく、サイクル当たり3反応、すなわち、脱トリチル化、カップリング、及び硫化の繰り返しを使用した、完全または部分チオール化オリゴヌクレオチドの固相合成製造法を本明細書において記載する。

【0006】

典型的には、ヌクレオチドは、固体支持体に付着したオリゴマーの最後のヌクレオチドの遊離5'-ヒドロキシルを、適切なホスホロアミダイトとカップリングすることによって、成長するオリゴマー鎖に付加される。カップリング反応における非効率さは、後のカップリング反応において自由に反応する5'-ヒドロキシル基のいくらかのを脱離させ、結果として、単一なヌクレオチドが存在しない、しかしランダムである、複雑なオリゴマー混合物を生じさせる。したがって、未反応の5'-ヒドロキシルが後に反応することを防止するために、5'-ヒドロキシルが、硫化工程の前または後に、キャッピング試薬、例えば無水酢酸の使用を介してキャッピングされる。

【0007】

驚くべきことに、本発明者らは、硫化工程の前または後のキャッピング工程を排除したプロセスを開発した。特に、本発明者らは、驚くべきことに、未反応の5'-ヒドロキシル基を、プロセスに新たに導入される必要がある試薬、例えば、無水酢酸によってキャッピングするのではなく、硫化工程の際に発生する副生成物が未反応の5'-ヒドロキシ基をキャッピングするのに使用され得ることを発見した。これらの副生成物、または、ある特定の場合には、硫化剤それ自体、例えばPADSが、固体支持体にわたって再循環されて、ホスホロアミダイトとカップリングしなかった5'-ヒドロキシ基をキャッピングし得る。未反応の5'-ヒドロキシル基は、別個のキャッピング工程を必要とすることなく硫化副生成物と反応し、後のサイクルにおいてカップリングすることにはもはや利用することはできない。

【0008】

完全チオール化オリゴヌクレオチド（すなわち、ホスホロチオレート（-P=S）結合のみを含むオリゴヌクレオチド）に関して、キャッピング工程は全く必要でなく、上記プロセスは、サイクル当たり3反応のみ（脱保護、カップリング、及び硫化）を含む。

【0009】

ここで記載されているプロセスは、ホスホロチオレート（-P=S）及びホスホジエステル（-P=O）の両結合を含む部分チオール化オリゴヌクレオチドを調製するのにも使用され得る。部分チオール化オリゴヌクレオチドは、サイクルにおける第3工程が、-P=O結合または-P=S結合のいずれが望ましいかに応じて酸化または硫化のいずれかである、4反応工程サイクルによって従来的に調製されている。本明細書で記載されているプロセスの使用は、硫化工程の後のキャッピング工程を排除するのに使用され得る。しかし、酸化工程の副生成物は、未反応の5'-ヒドロキシをキャッピングしないため、残存量の未反応の5'-ヒドロキシル基が、酸化工程の後に残存し得る。しかし、少数の、例えば、4つ以下の-P=O結合を含む部分チオール化オリゴヌクレオチドに関しては、酸化工程後にキャッピング工程を用いなくても、本明細書で記載されているプロセスを使用することができる。多数の、例えば5以上の-P=O結合を含む部分チオール化オリゴヌクレオチドに関しては、本明細書で記載されているプロセスを使用することができるが、例えば無水酢酸を用いた従来のキャッピング工程を、各酸化工程の後に使用してもよい。しかし、キャッピング工程は、どれだけ多くの-P=O結合が存在するかにかかわらず、硫化工程後になお必要とされない。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】3工程オリゴヌクレオチド合成方法の図を示す。

10

20

30

40

50

【図 2】従来の 4 工程オリゴヌクレオチド合成方法の図を示す。なお、硫化工程は、サイクルプロセス当たり従来の 4 反応においてキャッピング工程の前または後に実施されてよい。

【図 3】PADS を用いた 4 反応サイクル（上部）；PADS を用いた 3 反応サイクル（中央）；及びキサンタンヒドリドを用いた 3 反応サイクル（下部）について質量分析によって純度を比較したクロマトグラムである。

【図 4】硫化剤として PADS を用いた 4 反応サイクルプロセス（下部）及び 3 反応サイクルプロセス（上部）によって調製された B I I B 0 7 8 を比較した R P I P H P L C クロマトグラムである。

【図 5】硫化剤として PADS を用いた 4 反応サイクルプロセス（下部）及び 3 反応サイクルプロセス（上部）によって調製された B I I B 0 7 8 を比較した R P I P H P L C クロマトグラムである。

10

【図 6】硫化剤として PADS を用いた 4 反応サイクルプロセス（下部）及び 3 反応サイクルプロセス（上部）によって調製された B I I B 0 7 8 を比較した質量分析クロマトグラムである。

【図 7】硫化剤として PADS を用いた 4 反応サイクルプロセス（下部）及び 3 反応サイクルプロセス（上部）によって調製された B I I B 0 7 8 を比較した質量分析クロマトグラムである。

【図 8】PADS を、アセトニトリル - d<sub>3</sub> 中、3 - ピコリンによってエージングした、BuOH、P(OMe)<sub>3</sub> 及び PADS の反応混合物の経時的な <sup>1</sup>H NMR スペクトルを示す。

20

【図 9】PADS を、アセトニトリル - d<sub>3</sub> 中、N - メチルイミダゾールによってエージングした、BuOH、P(OMe)<sub>3</sub> 及び PADS の反応混合物の経時的な <sup>1</sup>H NMR スペクトルを示す。

【発明を実施するための形態】

【0011】

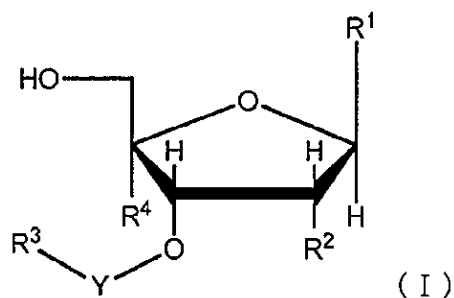
本発明の第 1 実施形態は、オリゴヌクレオチドを調製するためのプロセスであって

a) 式 (I) の化合物：

【0012】

【化 1】

30



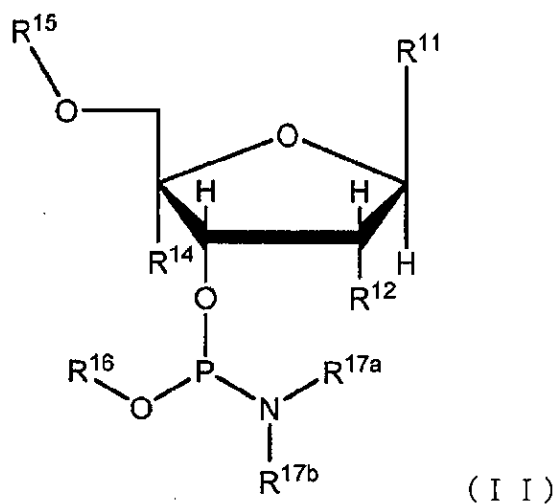
【0013】

を式 (II) の化合物：

40

【0014】

【化 2】



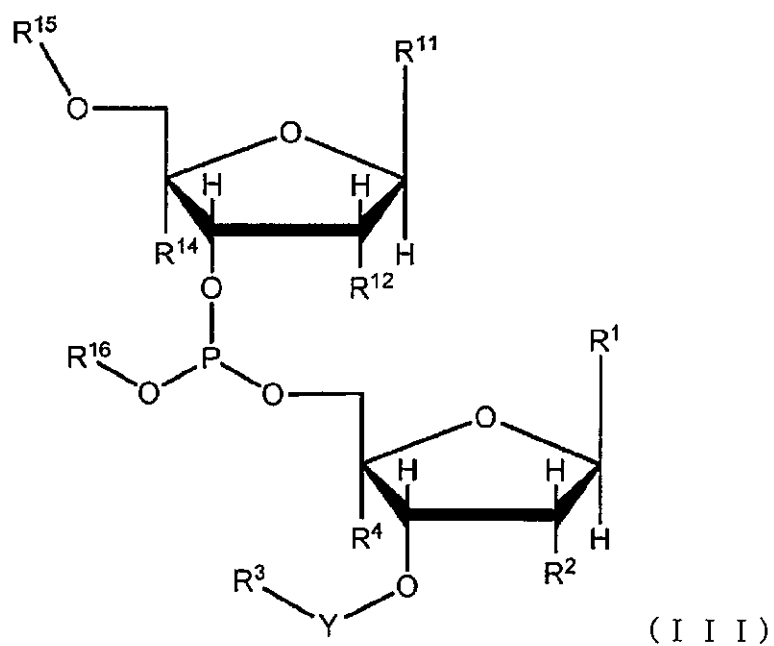
10

【 0 0 1 5 】

と反応させて、式 ( I I I ) の化合物：

【 0 0 1 6 】

【化 3】



20

30

【 0 0 1 7 】

を形成することと；

b) 式 ( I I I ) の化合物を、硫化剤を用いて硫化して、式 ( I V ) の化合物：

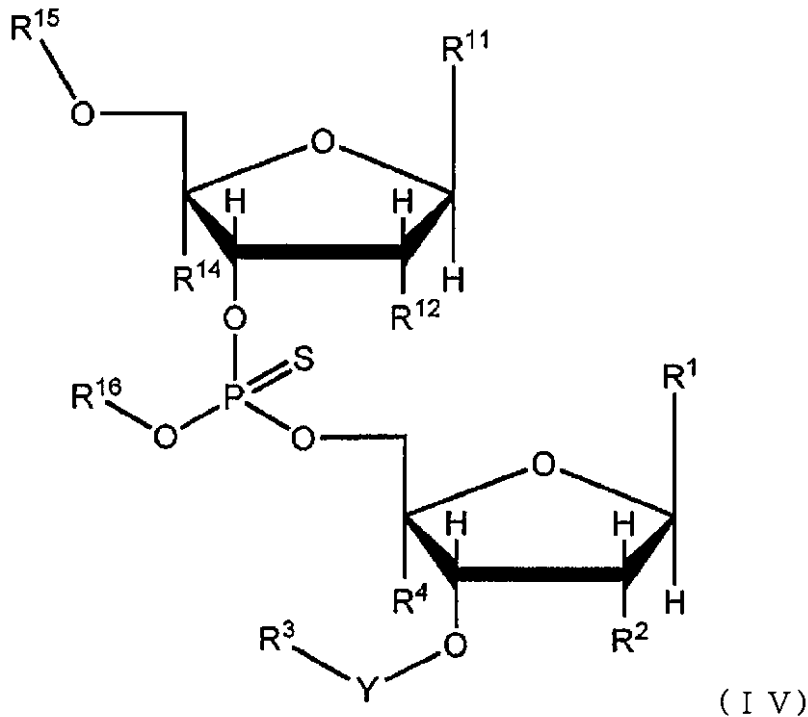
40

【 0 0 1 8 】

50



【化 4】

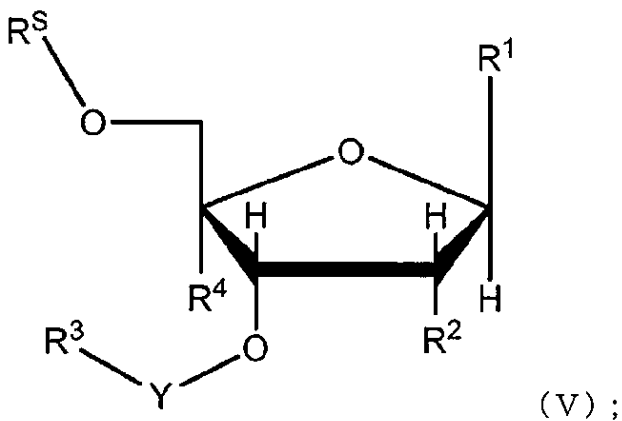


【 0 0 1 9 】

を形成し、式 ( I ) の未反応化合物から式 ( V ) の化合物：

【 0 0 2 0 】

【化 5】



【 0 0 2 1 】

を形成することと；

を含み、

式中、

各  $R^1$  及び  $R^{11}$  は、独立して、核酸塩基であり、核酸塩基の  $NH_2$  が、存在する場合、アミン保護基によって保護されており；

各  $R^2$  及び  $R^{12}$  は、H、ハロ、及び  $C_{1-6}$  アルコキシによって任意選択的に置換されている  $C_{1-6}$  アルコキシからなる群から独立して選択され；

$R^3$  は、リンカーを任意選択的に含む固体支持体であり；

Y は、非存在、ヌクレオチド、または 2 以上のヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドであり；

各  $R^4$  は、独立して H であるか、または  $R^2$  のアルコキシ基と共に環を形成し；

各  $R^{14}$  は、独立して H であるか、または  $R^{12}$  のアルコキシ基と共に環を形成し；

$R^{15}$  は、ヒドロキシ保護基であり；

$R^{16}$  は、 $-CN$ によって任意選択的に置換されている $C_{1-6}$ アルキルであり；

$R^{17a}$ 及び $R^{17b}$ は、独立して $C_{1-6}$ アルキルであり；

$R^S$ は、硫化剤の副生成物から形成されたヒドロキシ保護基であり；

硫化剤は、式(I)の未反応化合物から式(V)の化合物に実質的に完全に変換し、かつ式(III)の化合物から式(V)の化合物に変換するのに十分な時間量で反応され；

式(I)の未反応化合物から式(V)の化合物に実質的に完全に変換し、かつ式(III)の化合物から式(V)の化合物に変換するのに十分な量の硫化剤が添加され；

式(I)、(II)、(III)、(V)、及び(V)の化合物が、任意選択的に、薬学的に許容可能な塩の形態である、上記プロセスである。

10

#### 【0022】

本明細書において使用されているとき、「十分な時間量」は、反応条件に基づいて当業者によって決定され得る。例えば、第13実施形態において提供されている時間、すなわち、0～30分、例えば、0、5、10、15、20、25、または30分は、「十分な時間量」である。

#### 【0023】

本明細書において使用されているとき、「実質的に完全に変換すること」は、反応条件に基づいて当業者によって決定され得る。特に、実質的に完全に変換することは、式(I)の未反応化合物または式(III)の50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%または100%を、それぞれ、式(V)または式(V)に変換することを意味する。

20

#### 【0024】

第1実施形態のいくつかの態様において、上記プロセスは、工程bの後に追加のキャッピング工程を含まない。具体的には、式(I)、(VI)、または(IX)の任意の未反応化合物は、式(I)、(VI)、または(IX)の任意の未反応化合物をキャッピングするいずれの他の試薬も添加する必要なく、硫化工程bの副生成物によってキャッピングされる。

#### 【0025】

第1実施形態の特定の態様において、

$R^{11}$ は、シトシン、グアニン、アデニン、チミン(または5-メチルウラシル)、ウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、7-メチルグアニン、5,6-ジヒドロウラシル、5-メチルシトシン、及び5-ヒドロキシメチルシトシンからなる群から選択され、ここで、核酸塩基の $NH_2$ 基は、存在する場合、 $PhCO-$ 、 $CH_3CO-$ 、 $iPrCO-$ 、 $Me_2N-CH=$ 、または $Me_2N-CMe=$ によって保護されている。

30

$R^{12}$ は、H、ハロ、 $C_{1-4}$ アルコキシ、及び $C_{1-4}$ アルコキシ $C_{1-4}$ アルコキシからなる群から選択され；

各 $R^{14}$ は、独立してHであるか、または $R^{12}$ のアルコキシ基と共に5もしくは6員環を形成し；

$R^{15}$ は、4,4'-ジメトキシトリチル、[ビス-(4-メトキシフェニル)フェニルメチル](DMT)またはトリチル(トリフェニルメチル、Tr)から選択されるヒドロキシ保護基である。

40

$R^{16}$ は、 $-CN$ で置換された $C_{1-4}$ アルキルであり；

$R^{17a}$ 及び $R^{17b}$ は、独立して、 $C_{1-4}$ アルキルである。

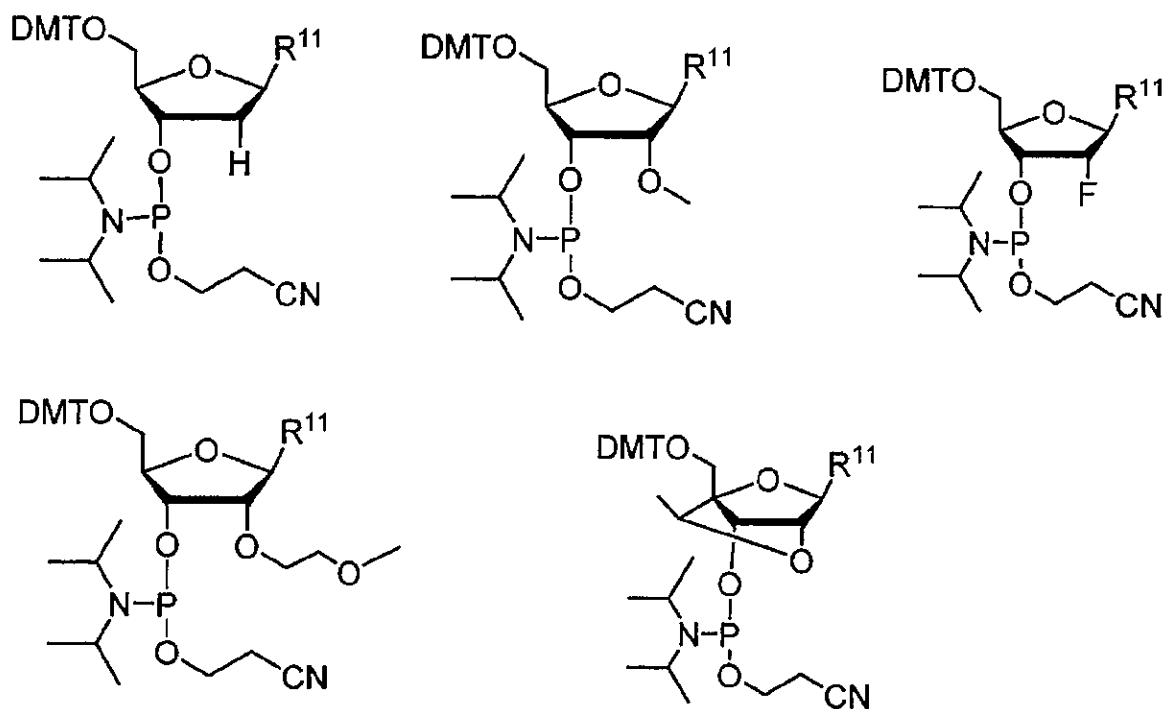
#### 【0026】

特定の実施形態において、

第1実施形態の具体的な態様において、式(II)は、以下の構造式：

#### 【0027】

## 【化 6】



10

20

## 【 0 0 2 8】

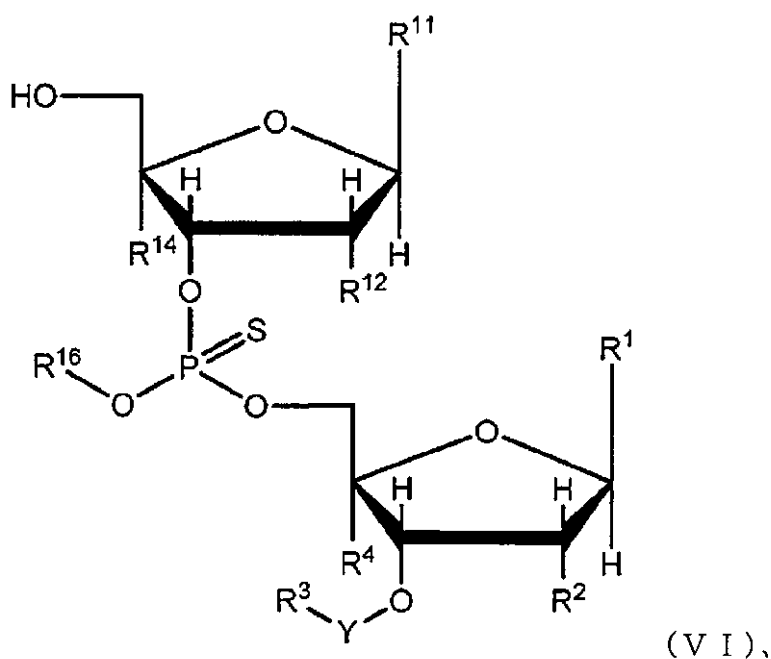
式中、DMTOは、4,4'-ジメトキシトリチル保護5'-ヒドロキシであり、 $R^1$ は、第1実施形態で定義されている通りである；のいずれか1つから選択される。

## 【 0 0 2 9】

本発明の第2実施形態は、第1実施形態またはこれらのいずれかの態様で記載されているプロセスであって、c)式(IV)の化合物を脱保護して式(VI)の化合物：

## 【 0 0 3 0】

## 【化 7】



(VI),

## 【 0 0 3 1】

またはその薬学的に許容可能な塩を形成する工程をさらに含む、上記プロセスである。

## 【 0 0 3 2】

30

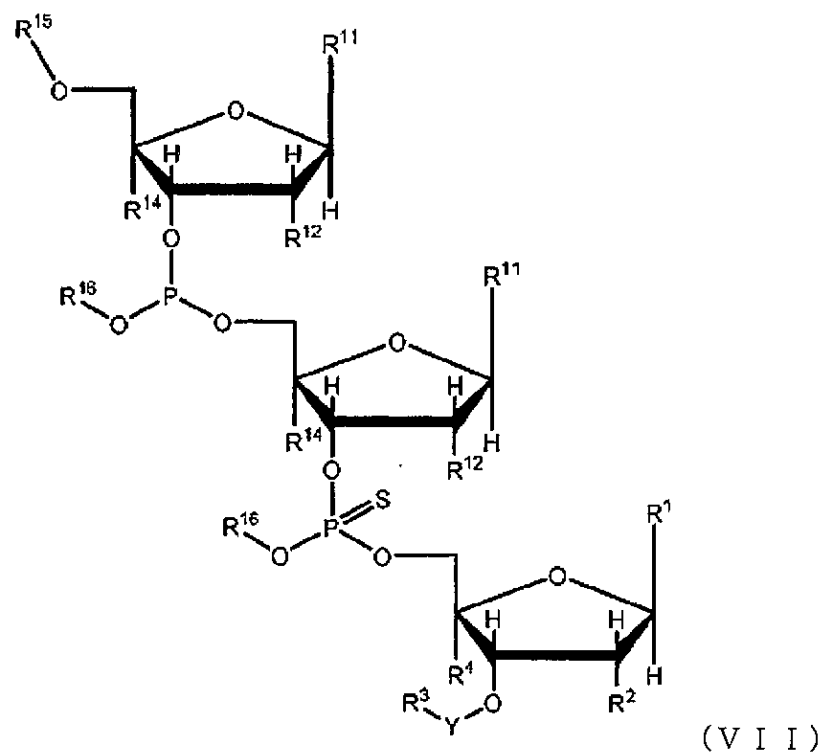
40

50

本発明の第3実施形態は、第2実施形態で記載されているプロセスであって、d)式(VI)の化合物を式(II)の化合物と反応させて、式(VII)の化合物：

【0033】

【化8】



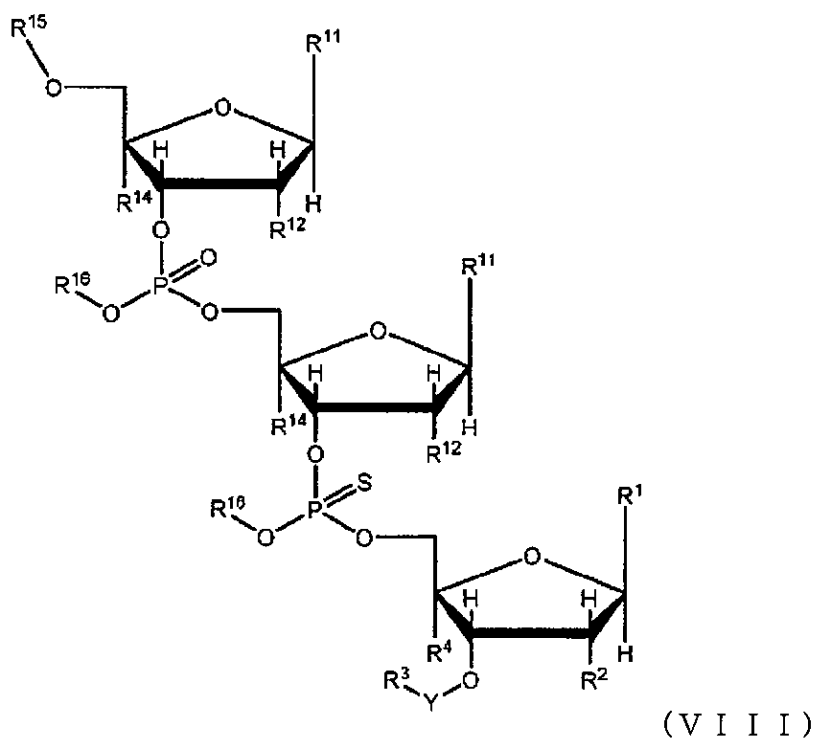
【0034】

またはその薬学的に許容可能な塩を形成する工程と；

e)式(VII)の化合物を、酸化剤を用いて酸化して、式(VIII)の化合物：

【0035】

【化9】



10

20

30

40

50

【 0 0 3 6 】

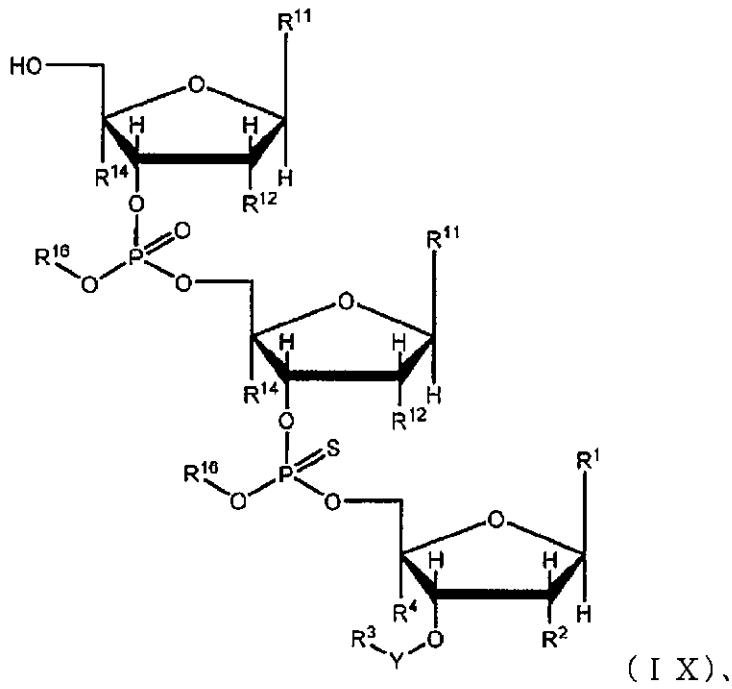
を形成する工程とをさらに含む、上記プロセスである。

【 0 0 3 7 】

本発明の第 4 実施形態は、第 3 実施形態で記載されているプロセスであって、 f ) 式 ( V I I I ) の化合物を脱保護して式 ( I X ) の化合物：

【 0 0 3 8 】

【 化 1 0 】



【 0 0 3 9 】

またはその薬学的に許容可能な塩を形成する工程をさらに含む、上記プロセスである。

【 0 0 4 0 】

本発明の第 5 実施形態は、第 2 及び第 4 実施形態で記載されているプロセスであって、式 ( V I ) の化合物または式 ( I X ) の化合物によって開始して、工程 a )、b )、及び c ) が n 回繰り返され、工程 d )、e ) 及び f ) が m 回繰り返され、工程 a )、b )、及び c )、ならびに工程 d )、e ) 及び f ) の繰り返しが、互いに対していずれの順序で行われてもよく、n が少なくとも 1 以上であり、m が 0、1、2、3、または 4 であり、式 ( X ) もしくは ( X I ) のオリゴヌクレオチド：

【 0 0 4 1 】

10

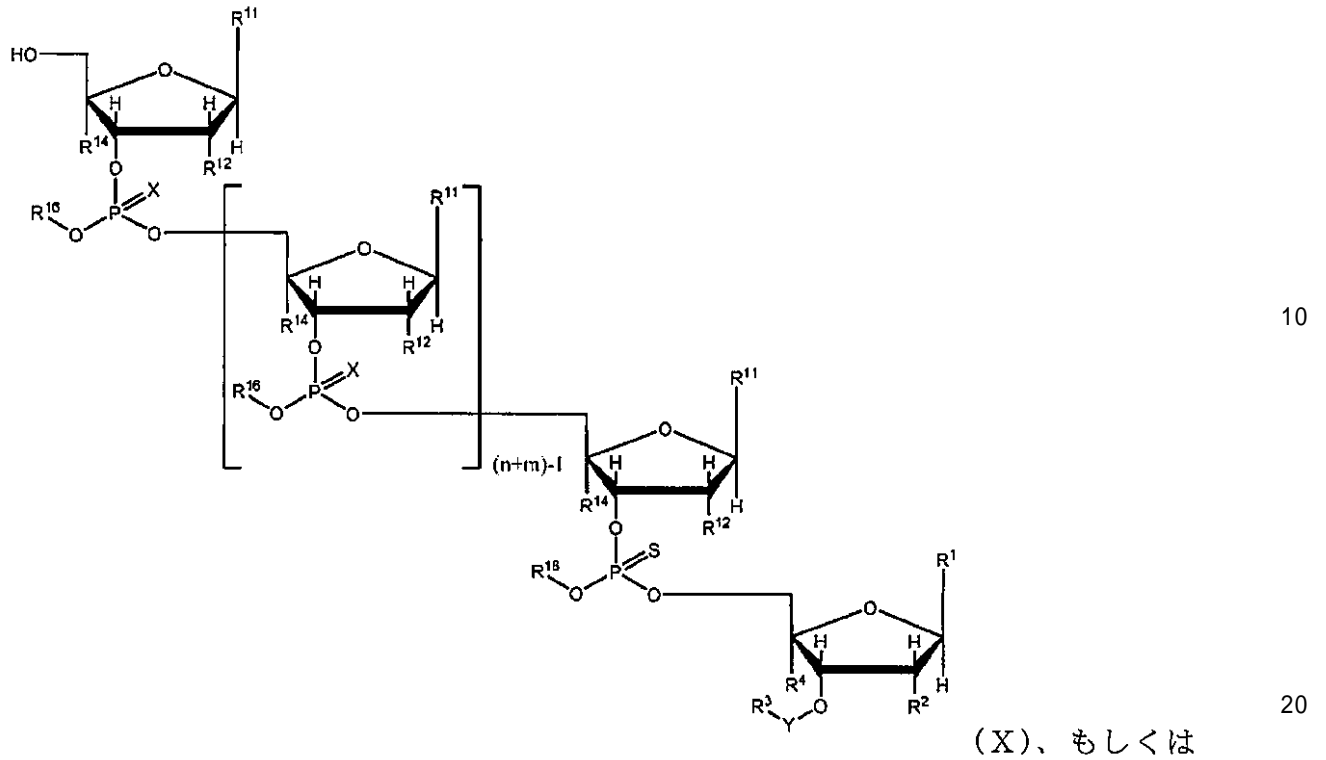
20

30

40

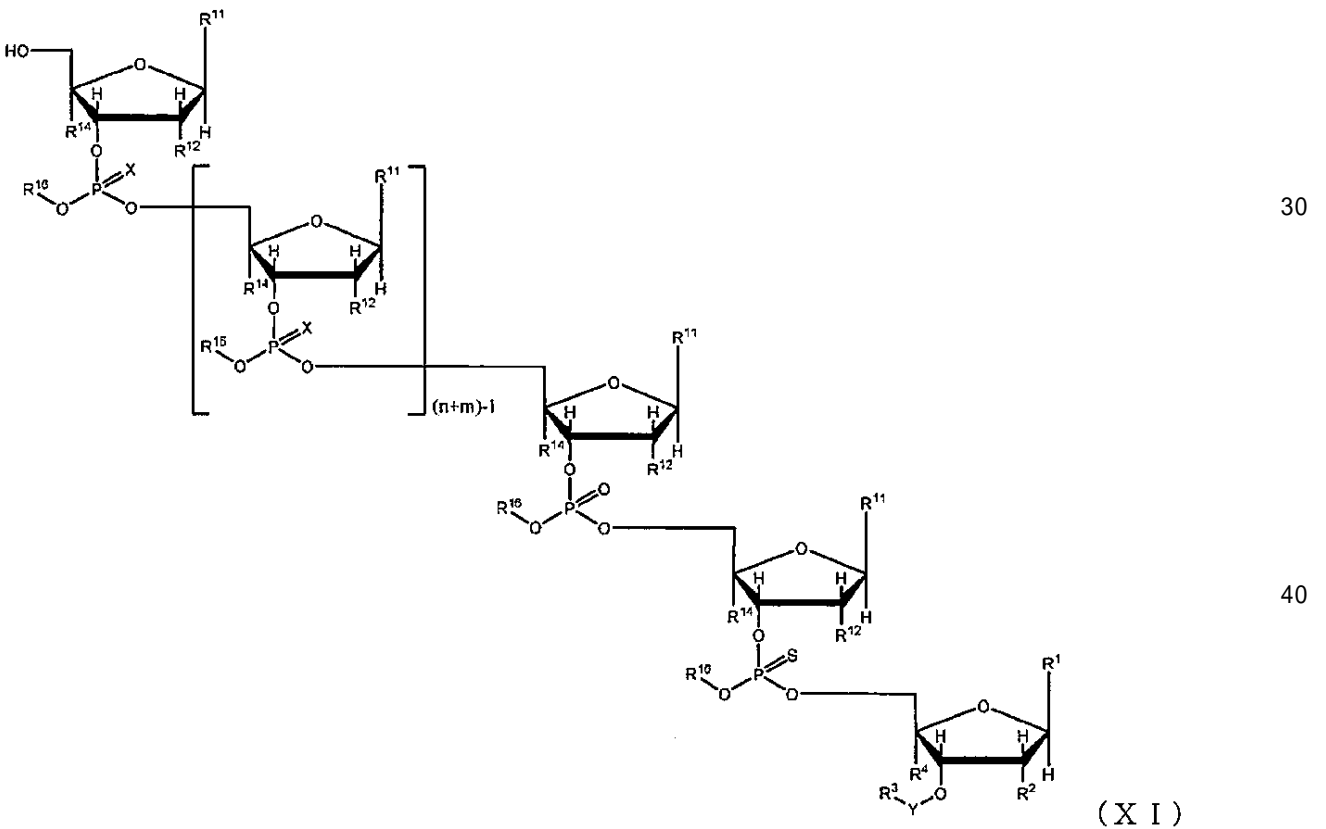
50

【化 1 1】



【 0 0 4 2】

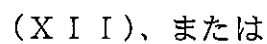
【化 1 2】



【 0 0 4 3】

またはその薬学的に許容可能な塩を形成すること、あるいは、オリゴヌクレオチドを形成することにおいて、工程 a、b、及び c、または工程 d、e、及び f の各繰り返しにより

【化 1 3】



【化 1 4】



50

式中、各 X は、S または O から独立して選択され、ただし、式 (X)、(XI)、(XII)、及び (XIII) の化合物において、4、3、2、1、または 0 回のみ、X が O である；を形成する、上記プロセスである。特に、n は、1 ~ 30、5 ~ 25、または 10 ~ 15 であり、m は、0、1、2、3、または 4 である。

#### 【0047】

第 5 実施形態で上記に記載されているプロセスは、所望のオリゴヌクレオチドを形成するためのヌクレオチドの段階的付加を含む。これらの工程は、それぞれ、ヌクレオチドを、成長するオリゴヌクレオチドに付加する、3 反応を含む。第 1 工程（工程 a 及び d に相当する）において、ヌクレオシド（例えば、式 (I) の化合物）の 5' 末端が、ヌクレオチド（例えば、式 (II) の化合物）の 3' 末端にカップリングされる。これらの 2 つの新たに結合されたヌクレオチド間の連結がホスホチオエート（すなわち、例えば、式 (IV)）におけるような P = S 結合）であるべきかまたはホスホジエステル（すなわち、例えば、式 (VII)）におけるような P = O 結合）であるべきかに応じて、オリゴヌクレオチドは、それぞれ、硫化される（工程 b）か、または酸化される（工程 e）かのいずれかとなる。最後に、次の 5' - ヒドロキシ基が脱保護され（工程 c または f、例えば、式 (VI) 及び (IX)）、上記プロセスが繰り返されて次のヌクレオシドを付加する。上記のように「式 (VI) 及び (IX) のいくつかの未反応化合物」は、カップリング工程 a) または d) が完了しても、式 (VI) 及び (IX) のいくつかの化合物が未反応で残存して後のカップリング反応に利用可能であり、結果として、所望のオリゴヌクレオチドと比較して、オリゴヌクレオチドが存在しないオリゴヌクレオチドを生じさせ得ることを意味する。所望のオリゴヌクレオチドと比較して、たった 1 つのオリゴヌクレオチドも存在しないオリゴヌクレオチド（「N - 1 不純物」）は、所望のオリゴヌクレオチドから分離することが難しい可能性があるため、N - 1 不純物の形成を防止するために、未反応の 5 - OH のヒドロキシのキャッピングが必要である。「いくつかの」により、例えば、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%、または 0.5% 未満が残存し得る任意の量が企図される。

#### 【0048】

そのため、このプロセスは、いずれのキャッピング工程も全く必要とすることなく、任意の数のホスホチオエート結合及び最大 4 つのホスホジエステルを有するオリゴヌクレオチドの合成を可能にする。なぜなら、いずれの未反応の 5' - ヒドロキシ基も、硫化剤それ自体、または硫化剤と 2 つのヌクレオシド間の連結におけるリン原子との反応の副生成物と反応するからである。これは、カップリング工程の後に未反応の 5' OH のいずれかをブロックするキャッピング工程が行われる従来の合成とは対照的である。

#### 【0049】

本発明の第 6 実施形態は、第 3 実施形態で記載されているプロセスであって、g) 式 (VI) の未反応化合物をキャッピング剤と反応させて、式 (XIV) の化合物：

#### 【0050】

10

20

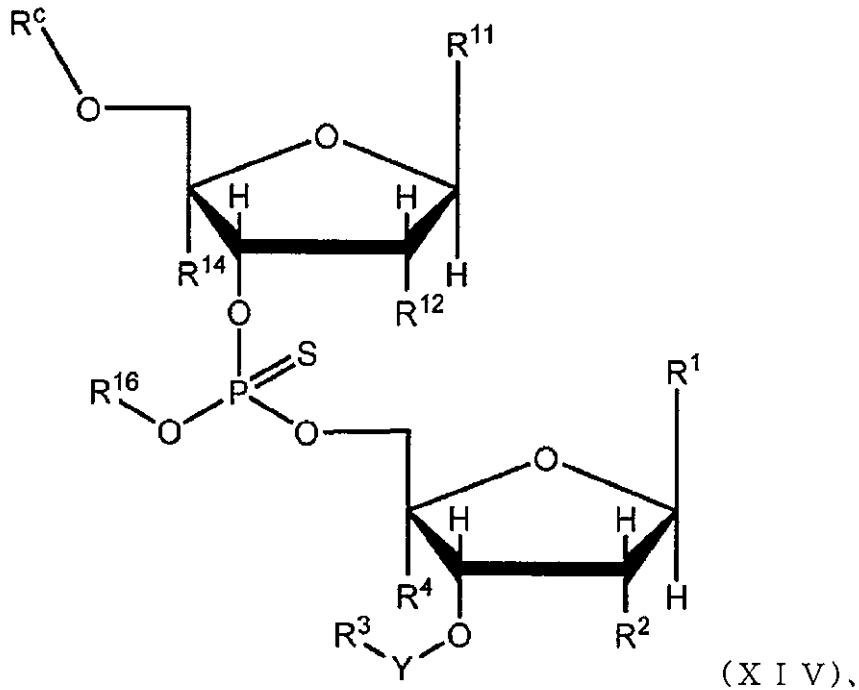
30

40

50



【化 1 5】



【0051】

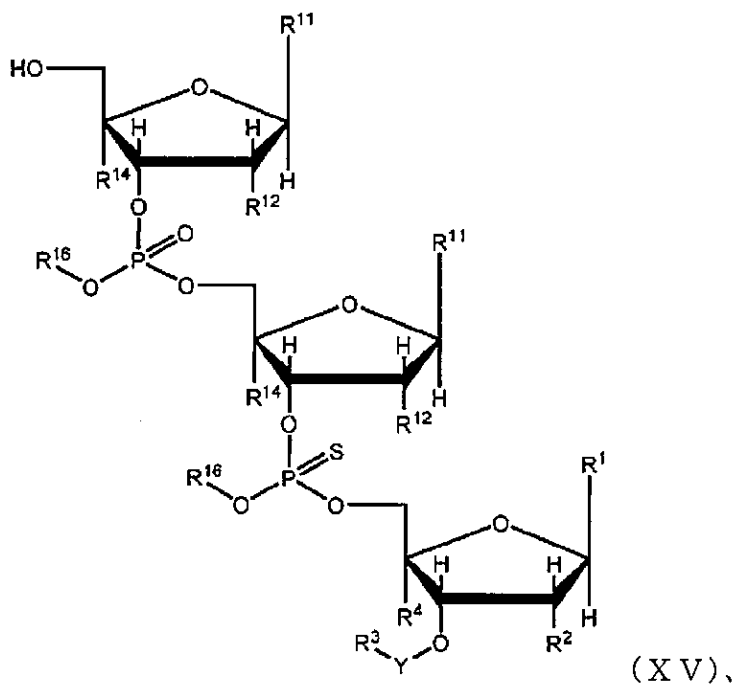
またはその薬学的に許容可能な塩を形成する工程をさらに含み、 $R^C$ が、キャッピング剤から形成されたヒドロキシ保護基である、上記プロセスである。「キャッピング剤」は、塩基触媒、例えばピリジンまたはN-メチルモルホリンを用いる、当業者に公知のいずれのキャッピング剤、例えば、無水酢酸であってもよい。

【0052】

本発明の第7実施形態は、第6実施形態で記載されているプロセスであって、h)式(VIII)の化合物を脱保護して式(XV)の化合物：

【0053】

【化 1 6】



【 0 0 5 4 】

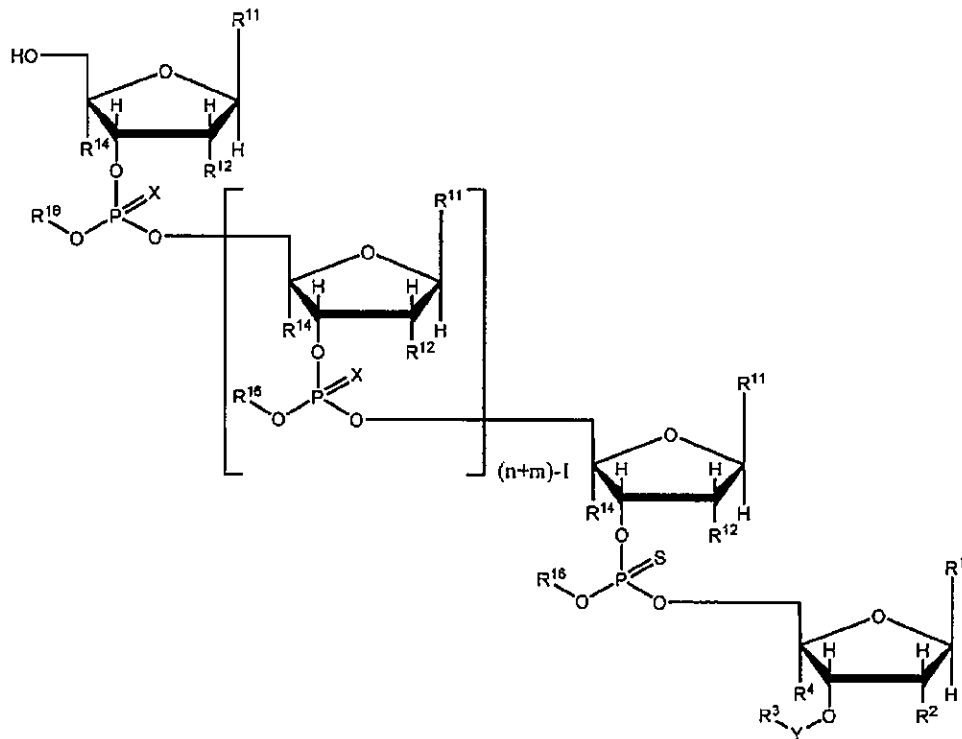
またはその薬学的に許容可能な塩を形成する工程をさらに含む、上記プロセスである。

【 0 0 5 5 】

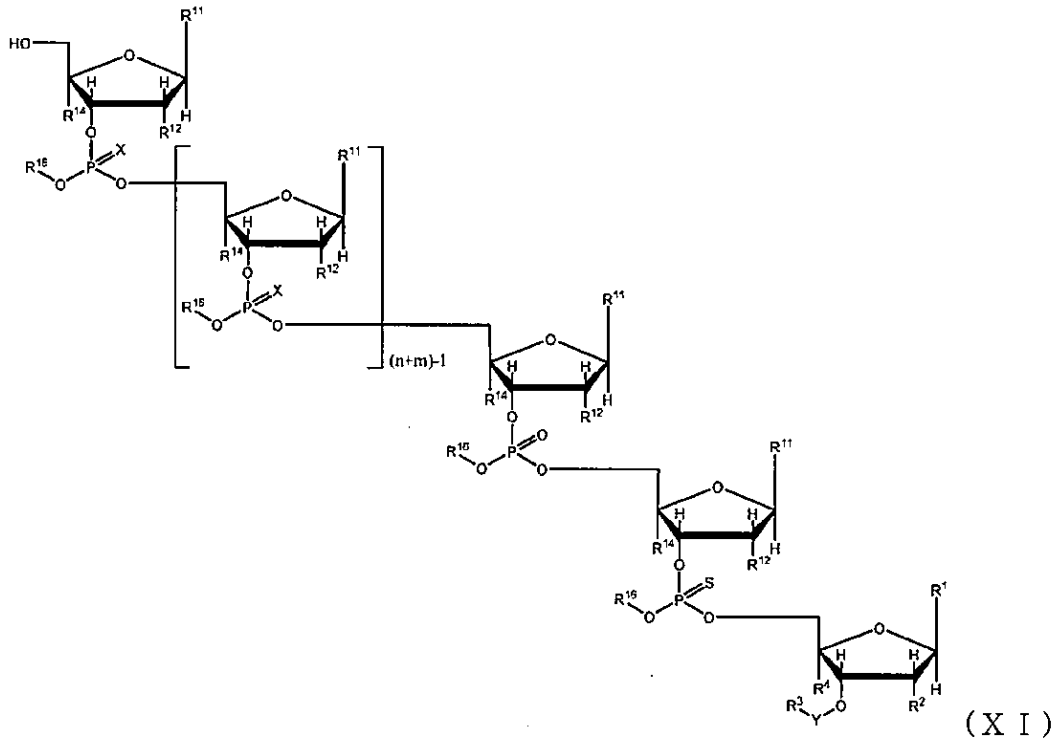
本発明の第 8 実施形態は、第 7 実施形態で記載されているプロセスであって、式 ( V I ) の化合物または式 ( I X ) の化合物によって開始して、工程 a )、b )、及び c ) が n 回繰り返され、工程 d )、e )、g ) 及び h ) が m 回繰り返され、工程 a )、b )、及び c ) ならびに工程 d )、e )、g ) 及び h ) の繰り返しが、互いに対していずれの順序で行われてもよく、n が少なくとも 1 であり、m が 0 以上であり、式 ( X ) もしくは ( X V I I ) のオリゴヌクレオチド：

【 0 0 5 6 】

【 化 1 7 】



## 【化 1 8】

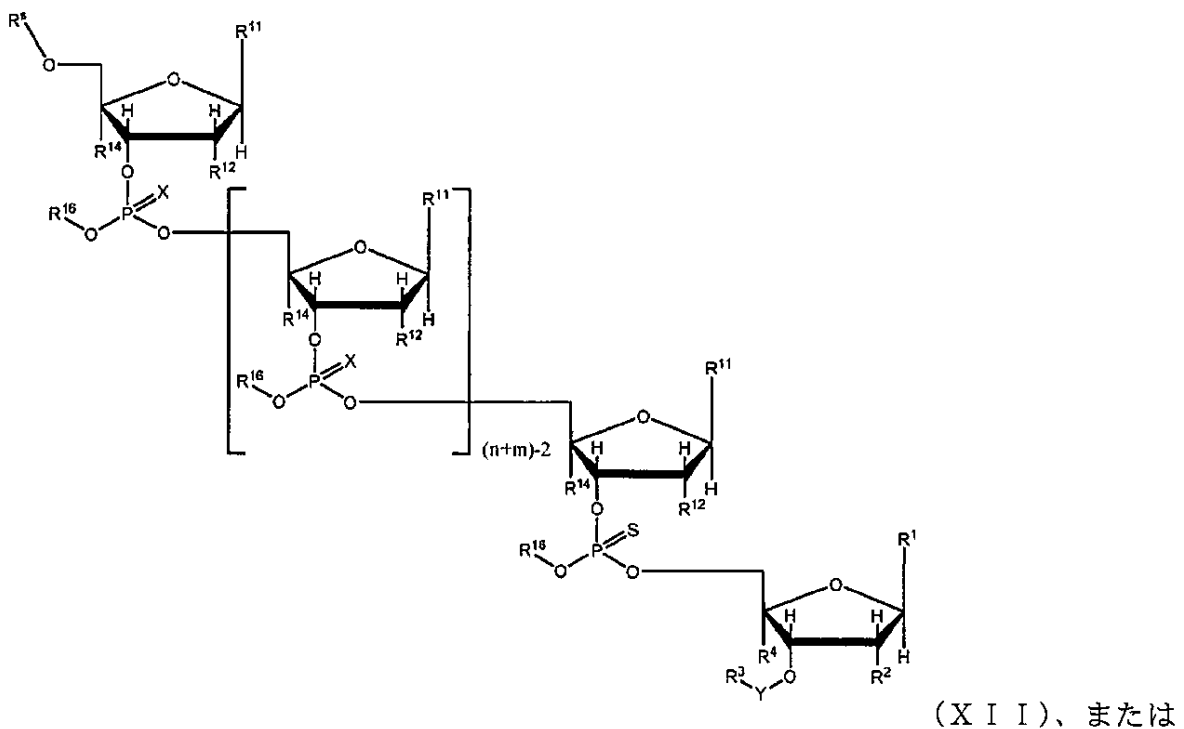


## 【 0 0 5 8】

またはその薬学的に許容可能な塩を形成すること、あるいは、オリゴヌクレオチドを形成することにおいて、工程 a、b、及び c、または工程 d、e、及び f の各繰り返しにより、式 (V I) 及び (I X) のいくつかの未反応化合物を結果として生じ、これが、過剰の硫化剤または硫化工程後の硫化剤の副生成物と反応して、式 X I I または X I I I の化合物：

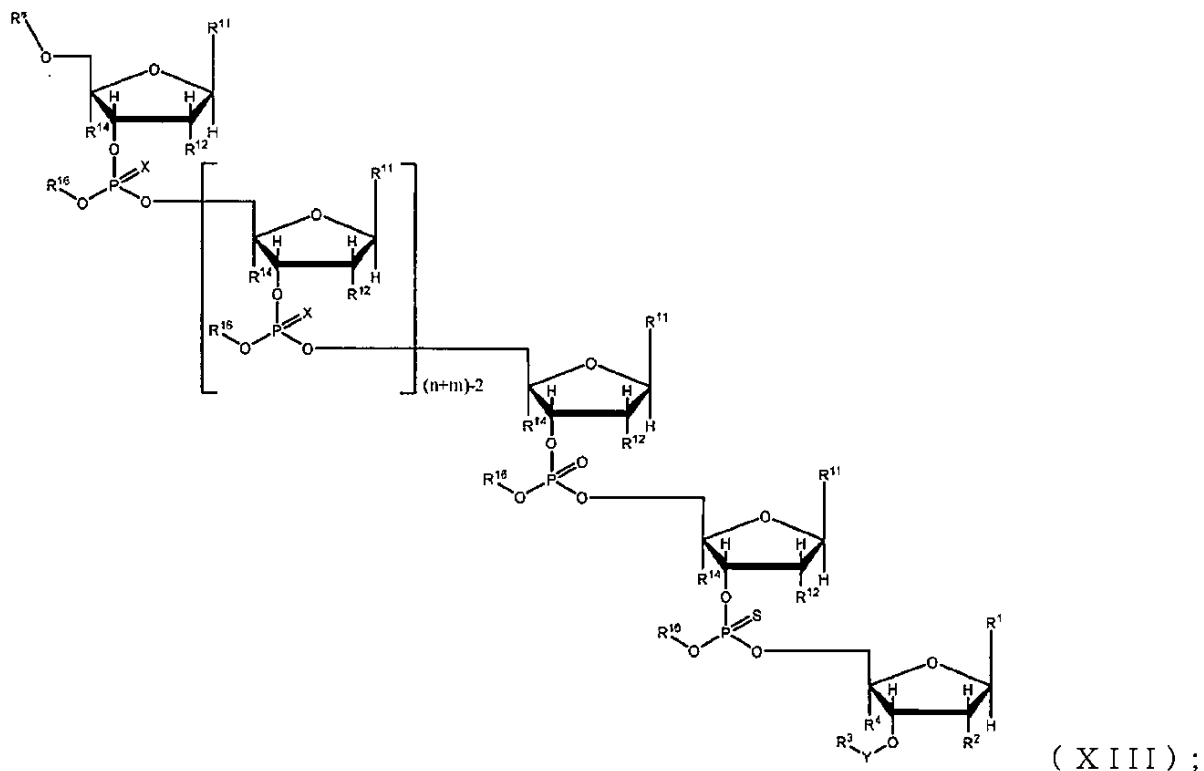
## 【 0 0 5 9】

## 【化 1 9】



【 0 0 6 0 】

【 化 2 0 】



【 0 0 6 1 】

式中、各 X は、S または O から独立して選択される；を形成する、上記プロセスである。特に、n は、1 ~ 30、5 ~ 25、または 10 ~ 15 であり、m は、0 ~ 10、0 ~ 5、または 5 ~ 10 である。

【 0 0 6 2 】

第 8 実施形態で上記に記載されているプロセスは、所望のオリゴヌクレオチドを形成するためのヌクレオチドの段階的付加を含む。これらの工程は、それぞれ、ホスホチオエート連結を含有するヌクレオチドを、成長するオリゴヌクレオチドに付加する、3 反応、及びホスホジエステル連結を含有するヌクレオチドを、成長するオリゴヌクレオチドに付加する、4 反応を含む。第 1 工程（工程 a 及び d に相当する）において、ヌクレオシド（例えば、式 I の化合物）の 5' 末端が、ヌクレオチド（例えば、式 II の化合物）の 3' 末端にカップリングされて、これら 2 つのヌクレオチドをカップリングする（化合物、例えば式（III）及び（VII）の化合物を形成する。これらの 2 つの新たに結合されたヌクレオチド間の連結が、ホスホチオエート（すなわち、P = S 結合）であるべきかまたはホスホジエステル（すなわち、P = O 結合）であるべきかに応じて、オリゴヌクレオチドは、硫化される（工程 b、化合物、例えば式（IV）の化合物を形成する）かまたは酸化される（工程 e、化合物、例えば式（IV）または（VII）の化合物を形成する）かのいずれかとなる。第 5 実施形態で上記に記載されているプロセスとは異なり、第 8 実施形態は、非限定数のホスホジエステル連結を許容するため、キャッピング工程は、各酸化工程（工程 g）の後に完了されなければならない。しかし、第 5 実施形態としては、硫化工程の後にキャッピング工程が必要とされない。第 5 実施形態としては、次の 5' - ヒドロキシ基が脱保護され（工程 c または h、例えば、式（VI）及び（IX））、上記プロセスが繰り返されて次のヌクレオシドを付加する。そのため、このプロセスは、任意の数のホスホチオエート結合及びホスホジエステル結合によるオリゴヌクレオチドの合成を可能にし、酸化工程を含むサイクルの後にのみキャッピング工程を必要とする。これは、硫化工程を含んでいても、未反応の 5' OH のいずれかをブロックするキャッピング工程がサイクルごとになされる従来の合成とは対照的である。

## 【 0 0 6 3 】

第 1、第 2、第 3、第 4、第 5、第 6、第 7、及び第 8 実施形態のいくつかの態様において、式 ( I )、( I I )、( I I I )、( I V )、( V )、( V I )、( V I I )、( V I I I )、( I X )、( X )、( X I )、( X I I )、( X I I I )、( X I V )、または ( X V ) の化合物が、塩ではない。

## 【 0 0 6 4 】

第 5 または第 8 実施形態の特定の態様において、 $n$  は、 $2 \sim 1000$  である。特に、 $n$  は、 $2 \sim 500$  である。特に、 $n$  は、 $2 \sim 50$  である。特に、 $n$  は、 $2 \sim 25$  である。

## 【 0 0 6 5 】

第 9 実施形態において、上記プロセスは、第 1、第 2、第 3、第 4、第 5、第 6、第 7、及び第 8 実施形態のいずれか 1 つ、またはこれらのいずれかの態様で記載されている通りであり、固体支持体に付着したリンカーが、開裂している。

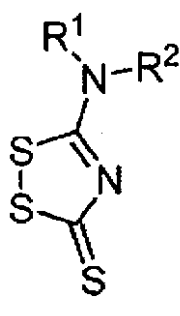
10

## 【 0 0 6 6 】

第 10 実施形態において、上記プロセスは、第 1、第 2、第 3、第 4、第 5、第 6、第 7、第 8、及び第 9 実施形態のいずれか 1 つ、またはこれらのいずれかの態様で記載されている通りであり、硫化剤が式 A の化合物：

## 【 0 0 6 7 】

## 【 化 2 1 】



20

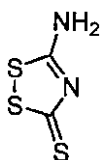
## 【 0 0 6 8 】

式中、 $R^1$  及び  $R^2$  の各々が、H、任意選択的に置換されているアルキル及び任意選択的に置換されているアリール基から独立して選択される；である。第 10 実施形態の特定の態様において、 $R^1$  及び  $R^2$  は、両方が H であり：

30

## 【 0 0 6 9 】

## 【 化 2 2 】



## 【 0 0 7 0 】

これは、3 - アミノ - 1, 2, 4 - ジチアゾール - 5 - チオン ( X H または A D T T ) として知られている。いくつかの態様において、 $R^S$  は、 $-C(SH)(=N)-CN$  である。

40

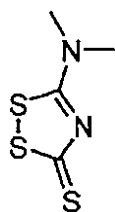
## 【 0 0 7 1 】

第 10 実施形態の特定の態様において、 $R^1$  及び  $R^2$  は、両方がメチルであり：

## 【 0 0 7 2 】

50

【化 2 3】



【0073】

これは、3 -  $\underline{\text{C}}(\text{N}, \text{N} - \text{ジメチルアミノ} - \text{メチリデン}) \text{アミノ}$  - 3H - 1, 2, 4 - ジチアゾール - 3 - チオン (DDTT) として知られている。いくつかの態様において、 $\text{R}^5$  は、 $-\text{C}(=\text{S})\text{NHC}(=\text{S})\text{N}=\text{CHN}(\text{CH}_3)_2$  である。

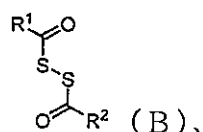
10

【0074】

第 11 実施形態において、上記プロセスは、第 1、第 2、第 3、第 4、第 5、第 6、第 7、第 8、及び第 9 実施形態のいずれか 1 つ、またはこれらのいずれかの態様で記載されている通りであり、硫化剤は、式 B の化合物：

【0075】

【化 2 4】



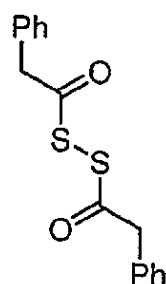
20

【0076】

式中、 $\text{R}^1$  及び  $\text{R}^2$  の各々は、H、任意選択的に置換されているアルキル及び任意選択的に置換されているアリール基から独立して選択される；である。第 10 実施形態の特定の態様において、 $\text{R}^1$  及び  $\text{R}^2$  は、両方がベンジル ( $\text{PhCH}_2$ ) であり：

【0077】

【化 2 5】



30

【0078】

これは、フェニルアセチルジスルフィド (PADS) として知られている。特定の態様において、 $\text{R}^5$  は、 $-\text{C}(=\text{O})\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$  である。

40

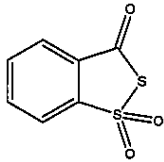
【0079】

第 12 実施形態において、上記プロセスは、第 1、第 2、第 3、第 4、第 5、第 6、第 7、第 8、及び第 9 実施形態のいずれか 1 つ、またはこれらのいずれかの態様で記載されている通りであり、硫化剤は、3H - 1, 2 - ベンゾジチオール - 3 - オン 1, 1 - ジオキサイド (Beaucage 試薬)：

【0080】

50

## 【化 2 6】

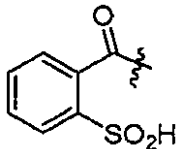


## 【0081】

である。第12実施形態の具体的な態様において、 $R^S$ は、

## 【0082】

## 【化 2 7】



## 【0083】

である。

## 【0084】

第13実施形態において、上記プロセスは、第1、第2、第3、第4、第5、第6、第7、第8、第9、第10、第11、及び第12実施形態のいずれか1つ、またはこれらのいずれかの態様で記載されている通りであり、硫化剤は、0～30分、例えば、0、5、10、15、20、25、または30分間硫化剤を再循環させることによって反応する。一実施形態において、硫化剤は、1～30分、1～20分、1～10分、または1～5分間再循環される。別の実施形態において、硫化剤は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10分間再循環される。

## 【0085】

第14実施形態において、上記プロセスは、第1、第2、第3、第4、第5、第6、第7、第8、第9、第10、第11、第12、及び第13実施形態のいずれか1つ、またはこれらのいずれかの態様で記載されている通りであり、硫化剤は、少なくとも0～20回、例えば、1、2、5、10、15、20回再循環される。一実施形態において、硫化剤は、1～20回、1～10回、または1～5回再循環される。

## 【0086】

第15実施形態において、上記プロセスは、第1、第2、第3、第4、第5、第6、第7、第8、第9、第10、第11、第12、第13、及び第14実施形態のいずれか1つ、またはこれらのいずれかの態様で記載されている通りであり、硫化剤は、固体支持体に付着した第1ヌクレオシドの量に対して3～6当量の硫化剤を再循環させることによって反応する。

## 【0087】

第16実施形態において、上記プロセスは、第1、第2、第3、第4、第5、第6、第7、第8、第9、第10、第11、第12、第13、第14、及び第15実施形態のいずれか1つ、またはこれらのいずれかの態様で記載されている通りであり、硫化試薬の濃度は、0.02M～2.0Mである。いくつかの態様において、硫化剤は、ピリジン、3-ピコリン、アセトニトリル、またはこれらの混合物に溶解される。第16実施形態の特定の態様において、硫化試薬の濃度は、0.05M～0.5Mである。特定の態様において、硫化試薬は、ピリジンに溶解された、0.02M～0.1M、例えば、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、または0.1Mの濃度で添加された3-(ジメチルアミノ-メチリデン)アミノ-3H-1,2,4-ジチアゾール-3-チオン(DDTT)である。特定の態様において、硫化試薬は、アセトニトリル(ACN)中、0.01M～0.2M、例えば、0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.10、0.

10

20

30

40

50

11、0.12、0.13、0.14、0.15、0.16、0.17、0.18、0.19、0.2 Mの濃度で添加された3H-1,2-ベンゾジチオール-3-オン1,1-ジオキサイド(Beaucage試薬)である。特定の態様において、硫化試薬は、アセトニトリル(ACN)/3-ピコリン中、0.01 M~0.2 M、例えば、0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.10、0.11、0.12、0.13、0.14、0.15、0.16、0.17、0.18、0.19、0.2 Mの濃度で添加されたフェニルアセチルジスルフィド(PADS)である。特定の態様において、硫化試薬は、ピリジン中、0.01 M~0.2 M、例えば、0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.10、0.11、0.12、0.13、0.14、0.15、0.16、0.17、0.18、0.19、0.2 Mの濃度で添加された3-アミノ-1,2,4-ジチアゾール-5-チオン(XHまたはADTT)である。

10

#### 【0088】

ある特定の実施形態において、上記の硫化試薬(例えば、フェニルアセチルジスルフィド(PADS)または3-アミノ-1,2,4-ジチアゾール-5-チオン(XH))は、本発明のプロセスでの使用の前に塩基で処理される(すなわち、エージング)。例示的な塩基として、限定されないが、N-メチルイミダゾール、ピリジン及び3-ピコリンが挙げられる。硫化試薬は、1分~5日、例えば5分~24時間、10分~12時間、30分~10時間、1時間~8時間、2時間~6時間、または3時間~5時間、塩基によってエージングされ(すなわち、塩基で処理され)得る。一実施形態において、硫化試薬は、4時間エージングされる。別の実施形態において、硫化試薬PADSは、本発明のプロセスにおいて使用される前に、3-ピコリンによって4時間エージングされる。

20

#### 【0089】

第17実施形態において、上記プロセスは、第1、第2、第3、第4、第5、第6、第7、第8、第9、第10、第11、第12、第13、第14、第15、及び第16実施形態のいずれか1つ、またはこれらのいずれかの態様で記載されている通りであり、核酸塩基は、シトシン、グアニン、アデニン、チミン(または5-メチルウラシル)、ウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、7-メチルグアニン、5,6-ジヒドロウラシル、5-メチルシトシン、及び5-ヒドロキシメチルシトシンからなる群から選択され、ここで、核酸塩基のNH<sub>2</sub>基は、存在する場合、PhCO-、CH<sub>3</sub>CO-、iPrCO-、Me<sub>2</sub>N-CH=、またはMe<sub>2</sub>N-CMe=によって保護されている。特定の実施形態において、核酸塩基は、シトシン、グアニン、アデニン、チミン(または5-メチルウラシル)、ウラシル、及び5-メチルシトシンからなる群から選択され、ここで、核酸塩基のNH<sub>2</sub>基は、存在する場合、PhCO-、CH<sub>3</sub>CO-、iPrCO-、Me<sub>2</sub>N-CH=、またはMe<sub>2</sub>N-CMe=によって保護されている。

30

#### 【0090】

第18実施形態において、上記プロセスは、第1、第2、第3、第4、第5、第6、第7、第8、第9、第10、第11、第12、第13、第14、第15、第16、及び第17実施形態のいずれか1つ、またはこれらのいずれかの態様で記載されている通りであり、各R<sup>2</sup>及びR<sup>12</sup>は、H、F、及びC<sub>1-4</sub>アルコキシによって任意選択的に置換されているC<sub>1-4</sub>アルコキシからなる群から独立して選択され；各R<sup>4</sup>は、独立してHであるか、またはR<sup>2</sup>のアルコキシ基と共に環を形成し、ここで、当該環は、1~3個のC<sub>1-4</sub>アルキル基によって任意選択的に置換されている5または6員環であり；R<sup>16</sup>は、-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CNであり；R<sup>17a</sup>及びR<sup>17b</sup>は、独立して、C<sub>1-4</sub>アルキルであり；各R<sup>14</sup>は、独立してHであるか、またはR<sup>12</sup>のアルコキシ基と共に環を形成し、当該環は、1~3個のC<sub>1-4</sub>アルキル基によって任意選択的に置換されている5または6員環である。

40

#### 【0091】

第19実施形態において、上記プロセスは、第1、第2、第3、第4、第5、第6、第7、第8、第9、第10、第11、第12、第13、第14、第15、第16、第17及び第18実施形態のいずれか1つ、またはこれらのいずれかの態様で記載されている通り

50



であり、各  $R^2$  及び  $R^{12}$  は、H または  $C_{1-4}$  アルコキシによって任意選択的に置換されている  $C_{1-4}$  アルコキシから独立して選択され； $R^{15}$  は、4, 4'-ジメトキシトリチルであり； $R^{16}$  は、 $-CH_2CH_2CN$  であり； $R^{17a}$  及び  $R^{17b}$  は、独立して、 $C_{1-6}$  アルキルであり； $R^5$  は、 $-C(=N)(SH)-CN$  または  $-C(=O)CH_2CH_5$  である。

#### 【0092】

第20実施形態において、上記プロセスは、第1、第2、第3、第4、第5、第6、第7、第8、第9、第10、第11、第12、第13、第14、第15、第16、第17、第18、及び第19実施形態のいずれか1つ、またはこれらのいずれかの態様で記載されている通りであり、Yは、存在しない。代替的には、Yは、単一のヌクレオチドである。代替的には、Yは、2～50のヌクレオチド、特に、2～40のヌクレオチド、2～30のヌクレオチド、または2～25のヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドである。

10

#### 【0093】

第21実施形態において、上記プロセスは、第1、第2、第3、第4、第5、第6、第7、第8、第9、第10、第11、第12、第13、第14、第15、第16、第17、第18、第19、及び第20実施形態のいずれか1つ、またはこれらのいずれかの態様で記載されている通りであり、式(X)または(XI)の化合物は、2～30のヌクレオチドを含むアンチセンスオリゴヌクレオチドである。特定の態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、修飾RNAのみを含む。代替的には、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、DNA及び修飾RNAを含む。特に、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ギャップマーである。代替的には、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、DNAのみを含む。

20

#### 【0094】

第22実施形態において、上記プロセスは、第1、第2、第3、第4、第5、第6、第7、第8、第9、第10、第11、第12、第13、第14、第15、第16、第17、第18、第19、第20、及び第21実施形態のいずれか1つ、またはこれらのいずれかの態様で記載されている通りであり、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、(5'～3')の配列

T C A C T T T C A T A A T G C T G G (配列番号1)、

ここで、オリゴヌクレオチドの各インターヌクレオシド連結は、ホスホロチオエート連結であり、オリゴヌクレオチドの各ヌクレオシドは、2'-O-メトキシエチル(MOE)ヌクレオシドであり、各シトシンは、5-メチルシトシンである；を有するホスホロチオエートオリゴヌクレオチドである。配列番号1は、B I I B 0 5 8 としても知られており、W O 2 0 0 7 / 0 0 2 3 9 0、W O 2 0 1 0 / 1 4 8 2 4 9、及びU S 8, 9 8 0, 8 5 3 に記載されており、それぞれの教示は、参照により本明細書に組み込まれる。

30

#### 【0095】

第23実施形態において、上記プロセスは、第1、第2、第3、第4、第5、第6、第7、第8、第9、第10、第11、第12、第13、第14、第15、第16、第17、第18、第19、第20、及び第21実施形態のいずれか1つ、またはこれらのいずれかの態様で記載されている通りであり、アンチセンスオリゴヌクレオチドの配列は、5-10-5 MOE ギャップマーであり、(5'～3')の配列

40

C A G G A T A C A T T T C T A C A G C T (配列番号2)、

ここで、ヌクレオシド1～5及び16～20は、それぞれ、2'-O-メトキシエチルリボース修飾ヌクレオシドであり、ヌクレオシド6～15は、それぞれ、2'-デオキシヌクレオシドであり、ヌクレオシド2～3、4～5、16～17、及び18～19間のインターヌクレオシド連結は、ホスホジエステル連結であり、ヌクレオシド1～2、3～4、5～6、6～7、7～8、8～9、9～10、10～11、11～12、12～13、13～14、14～15、15～16、17～18、及び19～20間のインターヌクレオシド連結は、ホスホロチオエート連結であり、各シトシンは、5'-メチルシトシンである；を有する。配列番号2は、以下の化学表記法によって記載されている：m C e s A e o G e s G e o A e s T d s A d s m C d s A d s T d s T d s T d s m C

50

d s T d s A d s m C e o A e s G e o m C e s T e ;

A = アデニン、

m C = 5' - メチルシトシン

G = グアニン、

T = チミン、

e = 2' - O - メトキシエチルリボース修飾糖、

d = 2' - デオキシリボース糖、

s = ホスホロチオエートインターヌクレオシド連結、及び

o = ホスホジエステルインターヌクレオシド連結。

配列番号 2 は、B I I B 0 6 7 または I S I S 6 6 6 8 5 3 として知られている通りであり、W O 2 0 1 5 1 5 3 8 0 0 に記載されており、その教示は、参照により本明細書に組み込まれる。

10

【 0 0 9 6 】

第 2 4 実施形態において、上記プロセスは、第 1、第 2、第 3、第 4、第 5、第 6、第 7、第 8、第 9、第 10、第 11、第 12、第 13、第 14、第 15、第 16、第 17、第 18、第 19、第 20、及び第 21 実施形態のいずれか 1 つ、またはこれらのいずれかの態様で記載されている通りであり、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、4 - 8 - 6 ギャップマーであり、( 5' ~ 3' ) の配列：

G C C C C T A G C G C G C G A C U C ( 配列番号 8 )

ここで、ヌクレオシド 1 ~ 4 及び 13 ~ 18 は、それぞれ、2' - O - メトキシエチルリボース修飾ヌクレオシドであり、ヌクレオシド 5 ~ 12 は、それぞれ、2' - デオキシリボヌクレオチドであり、ヌクレオシド 2 ~ 3、3 ~ 4、13 ~ 14、14 ~ 15、及び 15 ~ 16 間のインターヌクレオシド連結は、ホスホジエステル連結であり、ヌクレオシド 1 ~ 2、4 ~ 5、5 ~ 6、6 ~ 7、7 ~ 8、8 ~ 9、9 ~ 10、10 ~ 11、11 ~ 12、12 ~ 13、16 ~ 17 及び 17 ~ 18 間のインターヌクレオシド連結は、ホスホロチオエート連結であり、各シトシンは、5 - メチルシトシンであり、ウラシルは、5 - メチルウラシルである；を有する。配列番号 8 以下の化学表記法によって記載されている：

20

【 0 0 9 7 】

【 化 2 8 】



30

下線 = M o E リボヌクレオチド

G = グアニン

<sup>Me</sup>C = 5 - メチルシトシン

T = チミン

A = アデニン

<sup>Me</sup>U = 5 - メチルウラシル (チミンとしても知られている)

P = O = ホスホジエステルインターヌクレオシド連結

任意の他のインターヌクレオシド連結は、ホスホロチオエステル連結である。

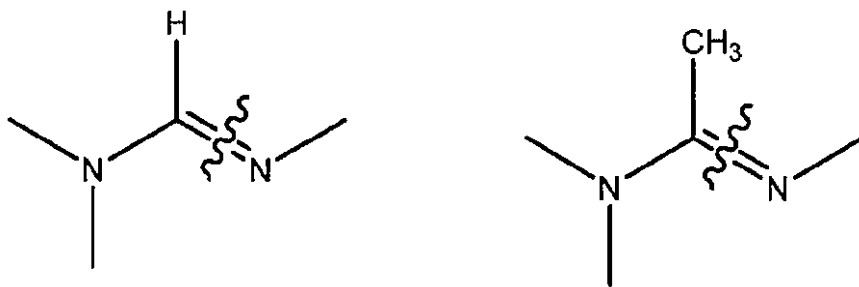
40

【 0 0 9 8 】

「アミン保護基」は、アミン基、NH<sub>2</sub>を保護するのに好適な任意の基を包含し、例えば、限定されないが、PhCO -、CH<sub>3</sub>CO -、iPrCO -、及びMe<sub>2</sub>N - CH =、Me<sub>2</sub>N - CMe = が挙げられる。Me<sub>2</sub>N - CH = 及び Me<sub>2</sub>N - CMe = によって保護されるアミノ基の得られる構造は以下の通りである：

【 0 0 9 9 】

【化 29】



10

【0100】

さらなるアミン保護基は、Greene, TW et al., *Protective Groups in Organic Synthesis*, 4th Ed., John Wiley and Sons (2007)に見出され得る。

【0101】

理論によって拘束されることを望まないが、カップリング工程の際にカップリングしなかった5'-ヒドロキシは、例えばPADSなどの硫化剤による硫化からヒドロキシル誘導体を、またはキサンタンヒドリドからN-シアノカーボンイミドチオエートを、またはDDTTからN,N-ジメチルチオ尿素-N-チオカルボキシレートを形成すると考えられる：

20

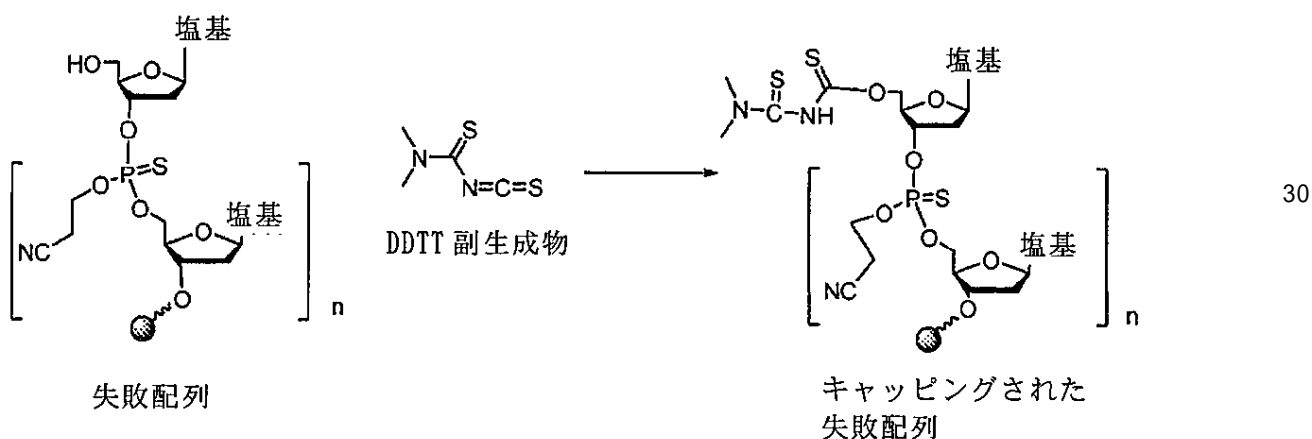
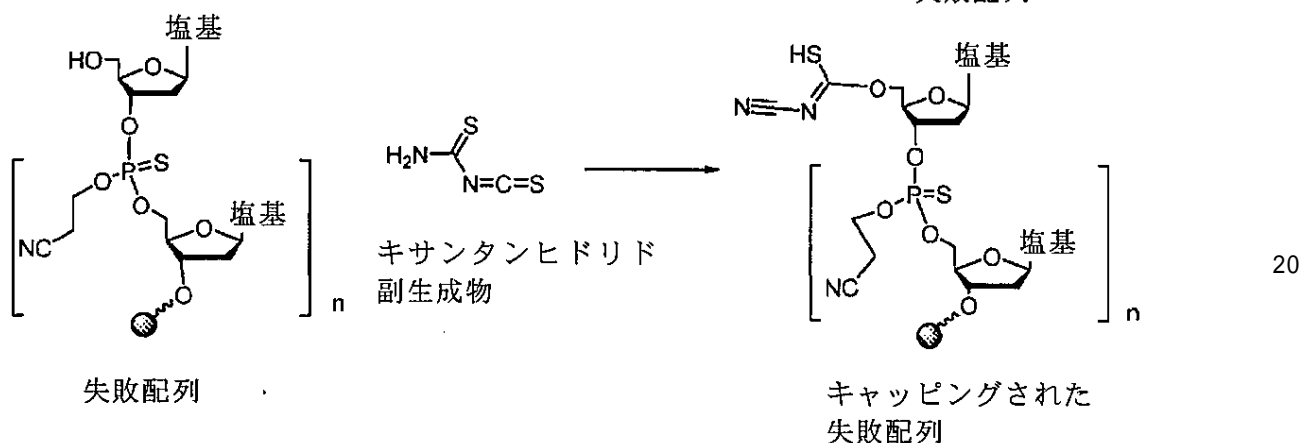
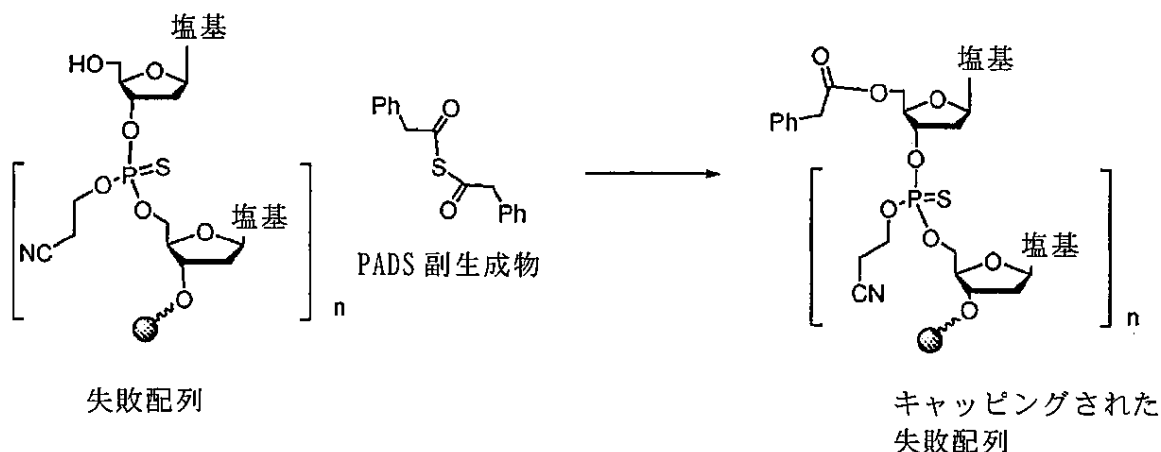
【0102】

30

40

50

## 【化 3 0】



【 0 1 0 3 】

「ヒドロキシ保護基」は、ヒドロキシ基OHを保護するのに好適な任意の基を包含する。これらの保護基及びヒドロキシ保護基のさらなる例は、Greene, T W et al., *Protective Groups in Organic Synthesis*, 4th Ed., John Wiley and Sons (2007)に見出され得る。

【 0 1 0 4 】

具体的な実施形態において、ヒドロキシ保護基は、キャッピング剤から形成され（例えば、式（XIV）におけるR<sup>c</sup>）、例えば、アセチル（Ac）；ベンゾイル（Bz）；ベンジル（Bn）；  
-メトキシエトキシメチルエーテル（MEM）；メトキシメチルエーテル（MOM）；メトキシトリチル〔（4-メトキシフェニル）ジフェニルメチル、MMT）；p-メトキシベンジルエーテル（PMB）；メチルチオメチルエーテル；ピバロイル（Piv）；テトラヒドロピラニル（THP）；テトラヒドロフラン（THF）；シリルエーテル（限定されないが、トリメチルシリル（TMS）、tert-ブチルジメチル

シリル ( T B D M S )、トリ - イソ - プロピルシリルオキシメチル ( T O M )、及びトリイソプロピルシリル ( T I P S ) エーテルを含む) ; メチルエーテル、ならびにエトキシエチルエーテル ( E E ) から選択され得る。

#### 【 0 1 0 5 】

代替的には、ヒドロキシ保護基は、ヌクレオシドまたはヌクレオチドの 5' - ヒドロキシをブロックし (例えば、式 ( I I )、( I I I )、( I V )、( V I I )、及び ( V I I I ) における  $R^{15}$ )、特定の態様においては、4, 4' - ジメトキシトリチル、[ビス - (4 - メトキシフェニル) フェニルメチル] ( D M T ) またはトリチル (トリフェニルメチル、 T r ) から選択される、酸に不安定な保護基である。

#### 【 0 1 0 6 】

「核酸塩基」は、ヌクレオシドの複素環式塩基部分を意味する。核酸塩基は、天然に存在するものであっても、修飾されていてもよい。ある特定の実施形態において、核酸塩基は、別の核酸の核酸塩基に水素結合することが可能である任意の原子または原子の基を含んでいてよい。特に、核酸塩基は、複素環式塩基、典型的には、プリン及びピリミジンである。「非修飾」または「天然」核酸塩基、例えば、プリン核酸塩基であるアデニン ( A ) 及びグアニン ( G )、ならびにピリミジン核酸塩基であるチミン ( T )、シトシン ( C ) 及びウラシル ( U ) に加えて、当業者に公知の多くの修飾核酸塩基または核酸塩基類似体が、本明細書に記載されている方法によって合成される化合物への組み込みに適している。ある特定の実施形態において、修飾核酸塩基は、親核酸塩基、例えば 7 - デアザプリン、5 - メチルシトシン、または G - クランプなどに構造がかなり類似する核酸塩基である。ある特定の実施形態において、核酸塩基類似体は、例えば三環式フェノキサジン核酸塩基類似体などの、より複雑な構造を含む。上記の修飾核酸塩基の調製のための方法は、当業者に周知である。

#### 【 0 1 0 7 】

「ヌクレオシド」は、複素環式塩基部分及び糖部分を含む化合物を意味する。

#### 【 0 1 0 8 】

「ヌクレオチド」は、ホスフェート連結基を含むヌクレオシドを意味する。

#### 【 0 1 0 9 】

「オリゴヌクレオチド」は、複数の連結されたヌクレオシドを含む化合物を指す。ある特定の実施形態において、複数のヌクレオシドの 1 つ以上が修飾されている。ある特定の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、1 つ以上のリボヌクレオシド ( R N A ) 及び/またはデオキシリボヌクレオシド ( D N A ) を含む。

#### 【 0 1 1 0 】

「インターヌクレオシド連結」は、オリゴヌクレオチドの隣接するヌクレオシド間の共有結合的連結を意味する。

#### 【 0 1 1 1 】

「ギャップマー」は、リボヌクレアーゼ H 開裂を支持する複数のヌクレオシドを有する内部領域が、1 つ以上のヌクレオシドを有する外部領域間に位置付けられているキメラアンチセンス化合物を意味し、ここで、内部領域を含むヌクレオシドは、外部領域を含むヌクレオシド (複数可) とは化学的に異なっている。

#### 【 0 1 1 2 】

本明細書において使用されているとき、「アルキル」という用語は、完全飽和の分岐または非分岐炭化水素部分を指す。好ましくは、アルキルは、1 ~ 20 個の炭素原子、より好ましくは 1 ~ 16 個の炭素原子、1 ~ 10 個の炭素原子、1 ~ 6 個の炭素原子、または 1 ~ 4 個の炭素原子を含む。いくつかの実施形態において、アルキルは、6 ~ 20 個の炭素原子を含む。アルキルの代表例として、限定されないが、メチル、エチル、n - プロピル、イソ - プロピル、n - ブチル、sec - ブチル、イソ - ブチル、tert - ブチル、n - ペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、n - ヘキシル、3 - メチルヘキシル、2, 2 - ジメチルペンチル、2, 3 - ジメチルペンチル、n - ヘプチル、n - オクチル、n - ノニル、または n - デシルが挙げられる。

10

20

30

40

50

## 【0113】

「アリール」という用語は、環部分において6～14個の炭素原子を有する単環式、二環式または三環式芳香族炭化水素基を指す。一実施形態において、アリールという用語は、6～10個の炭素原子を有する単環式及び二環式芳香族炭化水素基を指す。アリール基の代表例として、フェニル、ナフチル、フルオレニル、及びアントラセニルが挙げられる。

## 【0114】

「アリール」という用語はまた、少なくとも1つの環が芳香族であり、1または2つの非芳香族炭化水素環（複数可）に縮合している二環式または三環式基も指す。非限定例として、テトラヒドロナフタレン、ジヒドロナフタレニル及びインダニルが挙げられる。

## 【0115】

アルキルまたはアリールの両方の基についての任意選択的な置換基は、各事象において、 $C_1-6$ アルキル、 $C_2-6$ アルケニル、 $C_2-6$ アルキニル、3～7員のカルボシクリル、3～7員のヘテロシクリル、ハロ、 $-CN$ 、 $-C(O)R^a$ 、 $-C(O)_2R^a$ 、 $-C(O)N(R^a)_2$ 、 $-OR^a$ 、 $-N(R^a)_2$ 、 $-N(R^a)C(O)R^a$ 、 $-N(R^a)N(R^a)_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-N(R^a)C(O)_2R^a$ 、 $-N(R^a)C(O)N(R^a)_2$ 、 $-N(R^a)S(O)_2R^a$ 、 $-SR^a$ 、 $-S(O)R^a$ 、 $-S(O)_2R^a$ 、 $-S(O)N(R^a)_2$ 、及び $-S(O)_2N(R^a)_2$ から独立して選択され；

$R^a$ は、各事象において、 $H$ 、 $C_1-6$ アルキル、3～6員の単環式カルボシクリル、及び3～6員の単環式ヘテロシクリルから独立して選択される。

## 【0116】

本明細書において使用されているとき、「カルボシクリル」という用語は、3～7個の炭素原子、3～6、または5～7個の炭素原子の飽和または不飽和の単環式または二環式炭化水素基を指す。「カルボシクリル」という用語は、シクロアルキル基及び芳香族基を包含する。「シクロアルキル」という用語は、3～7個の炭素原子、3～6個の炭素原子、または5～7個の炭素原子の完全飽和の単環式または二環式炭化水素基を指す。例示的な単環式カルボシクリル基として、限定されないが、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロプロベニル、シクロブテニル、シクロペンテニル、シクロヘキセニル、シクロヘプテニル、シクロブタジエニル、シクロペンタジエニル、シクロヘキサジエニル、シクロヘプタジエニル、フェニル及びシクロヘプタトリエニルが挙げられる。例示的な二環式カルボシクリル基として、ビスクロ[2.1.1]ヘキシル、ビスクロ[2.2.1]ヘプチル、ビスクロ[2.2.1]ヘプテニル、トリシクロ[2.2.1.0<sup>2,6</sup>]ヘプタニル、6,6-ジメチルビスクロ[3.1.1]ヘプチル、または2,6,6-トリメチルビスクロ[3.1.1]ヘプチル、スピロ[2.2]ペンテニル、及びスピロ[3.3]ヘプタニルが挙げられる。

## 【0117】

「架橋環系」という用語は、本明細書において使用されているとき、カルボシクリルまたはヘテロシクリル環を有する環系であって、当該環の2つの非隣接原子が、 $C$ 、 $N$ 、 $O$ 、または $S$ から選択される1つ以上（好ましくは1～3つ）の原子によって接続されている（架橋されている）、上記環系である。架橋環系は、6～7環員を有してよい。

## 【0118】

「スピロ環系」という用語は、本明細書において使用されているとき、2つの環を有する環系であって、環のそれぞれが、カルボシクリルまたはヘテロシクリルから独立して選択され、2つの環構造が1つの環原子を共通して有している、上記環系である。スピロ環系は、5～7環員を有する。

## 【0119】

本明細書において使用されているとき、「ヘテロシクリル」という用語は、3～7環員、または特に3～6環員もしくは5～7環員を有する飽和または不飽和の、単環式または二環式（例えば、架橋もしくはスピロ環系）環系であって、これらの少なくとも1つが、ヘテロ原子であり、これらの最大4つ（例えば、1、2、3、または4）が、ヘテロ原子であってよく、当該ヘテロ原子が、 $O$ 、 $S$ 及び $N$ から独立して選択され、ここで、 $C$ が酸

10

20

30

40

50

化され得（例えば、 $C(O)$ ）、 $N$ が酸化（例えば、 $N(O)$ ）または四級化され得、 $S$ が、スルホキシド及びスルホンに任意選択的に酸化され得る、上記環系を指す。不飽和複素環式環として、ヘテロアリアル環が挙げられる。本明細書において使用されているとき、「ヘテロアリアル」という用語は、 $O$ 、 $S$ 及び $N$ から独立して選択される1～4個のヘテロ原子を有する芳香族の5または6員の単環式環系であって、 $N$ が、酸化（例えば、 $N(O)$ ）または四級化され得、 $S$ が、スルホキシド及びスルホンに任意選択的に酸化され得る、上記環系を指す。一実施形態において、ヘテロシクリルは、3～7員の飽和単環式、3～6員の飽和単環式、または5～7員の飽和単環式環である。一実施形態において、ヘテロシクリルは、3～7員の単環式、3～6員の単環式または5～7員の単環式環である。別の実施形態において、ヘテロシクリルは、6～7員の二環式環である。ヘテロシクリル基は、ヘテロ原子または炭素原子において付着され得る。ヘテロシクリルの例として、アジリジニル、オキシラニル、チイラニル、オキサジリジニル、ジオキシラニル、アゼチジニル、オキセタニル、チエタニル、ピロリジニル、テトラヒドロフラニル、チオラニル、イミダゾリジニル、ピラゾリジニル、オキサゾリジニル、イソオキサゾリジニル、チアゾリジニル、イソチアゾリジニル、ジオキサラニル、ジチオラニル、オキサチオラニル、ピペリジニル、テトラヒドロピラニル、チアニル、ピペラジニル、モルホリニル、チオモルホリニル、ジオキサニル、ジチアニル、トリオキサニル、トリチアニル、アゼパニル、オキセパニル、チエパニル、ジヒドロフラニル、イミダゾリニル、ジヒドロピラニル、及びヘテロアリアル環などが挙げられ、これらとして、アジリニル、オキシレニル、チイレニル、ジアジリニル、アゼチル、オキセチル、チエチル、ピロリル、フラニル、チオフェニル（またはチエニル）、イミダゾリル、ピラゾリル、オキサゾリル、イソオキサゾリル、チアゾリル、イソチアゾリル、フラザニル、オキサジアゾリル、チアジアゾリル、ジチアゾリル、トリアゾリル、テトラゾリル、ピリジニル、ピラニル、チオピラニル、ピラジニル、ピリミジニル、ピリダジニル、オキサジニル、チアジニル、ジオキシニル、ジチイニル、オキサチアニル、トリアジニル、テトラジニル、アゼピニル、オキセピニル、チエピニル、ジアゼピニル、及びチアゼピニルなどが挙げられる。二環式複素環式環系の例として、3 - アザピシクロ[3.1.0]ヘキサニル、3 - アザピシクロ[3.1.1]ヘプタニル、2 - アザスピロ[3.3]ヘプタニル、2 - オキサ - 6 - アザスピロ[3.3]ヘプタニル、及び5 - アザスピロ[2.3]ヘキサニルが挙げられる。

【0120】

「ハロゲン」または「ハロ」は、フルオロ、クロロ、ブromoまたはヨードであってよい。

【実施例】

【0121】

例示

実施例1 オリゴヌクレオチド合成。

オリゴヌクレオチドを、固体支持体としてNittophase HL UnyLinker (Kinovate、 $350 \mu\text{mol/g}$ を投入)を用いてAKTA100固相合成機を使用して0.72～2.2mmolスケールで合成した。各ヌクレオチドを付着させるための合成サイクルは、3反応工程：脱トリチル化、カップリング、及び硫化；からなる。脱トリチル化工程を、試薬としてトルエン(10%)中ジクロロ酢酸によって達成した。カップリング工程を、固体支持体を通して、対応するホスホロアミダイト(アセトニトリル中0.1～0.2M)及び4,5 - ジシアノイミダゾール(0.1M N - メチルイミダゾールを含有するアセトニトリル中1.0M)の溶液を循環させることによって行った。硫化工程を、以下の溶液：(a)アセトニトリル/3 - ピコリン(1:1、v/v)中0.2M PADS；(b)ピリジン中0.2Mの3 - アミノ - 1,2,4 - ジチアゾール - 5 - チオン(XH)；(c)アセトニトリル中0.2Mの3H - 1,2 - ベンゾジチオール - 3 - オン1,1 - ジオキサイド(Beaucage試薬)；または(d)ピリジン中0.1Mの3 - ((ジメチルアミノ - メチリデン)アミノ) - 3H - 1,2,4 - ジチアゾール - 3 - チオン(DDTT)；のうちいずれか1つを循環させることによって完了させた。対照実験では、合成は、4反応工程：脱トリチル化、カップリング、及び

硫化、及びカップリング工程からなる。硫化工程後にカップリング工程を用いることを除いて、全ての工程を上記と同様に実施した。カップリングを、アセトニトリル中の無水酢酸、ピリジン、及びN - メチルイミダゾールの混合物によって行った。支持体からのオリゴヌクレオチドの開裂及び塩基の脱保護を昇温（50～60）にて濃水酸化アンモニウム中で実施した。合成反応パラメータを以下の表1にまとめる。オリゴヌクレオチド生成物をLC - MSによって分析した。

【0122】

【表1 - 1】

表1 - プロセスプロトコル

プロセス工程	変数	3反応サイクル	4反応サイクル	単位
合成支持体	支持体	Nittophase UnyLinker HL	Nittophase UnyLinker HL	$\mu\text{mol/g}$
	投入	350	350	$\mu\text{mol/g}$
脱トリチル化	試薬	10% DCA	10% DCA	
	脱ブロック体積	3	3	CV*
	反応時間	3-6	3-6	分
カップリング	当量アミダイト	1.5	1.5	eq**
	濃アミダイト	0.2	0.2	M
	活性化剤：アミダイト比	5:1	5:1	
	活性化剤	DCI [1.0M] 及び NMI [0.1M]	DCI [1.0M] 及びNMI [0.1M]	
	リサイクル流量	240	240	cm/時
	リサイクル時間	3.2	3.2	分
硫化	試薬	ACN/3-ピコリン中 0.2M PADS (1:1、 v/v) または ピリジン中0.2M XH または ACN 中 0.2M Beaucage試薬 または ピリジン中 0.1M DDTT	ACN/3-ピコリン (1:1、 v/v) 中 0.2M PADS	ピリジン中 0.2M XH
	投入体積	1.1	1.2	1.1
	反応時間	リサイクル形態	形態を通して流動	形態を通してリサイクルまたは流動
		5	3.3	5

10

20

30

40

50



【表 1 - 2】

酸化	試薬	水 / ピリジン 中 0.5Mヨウ素	水/ピリジン中0.5Mヨウ 素	
	投入体積	2.0	2.0	CV
	接触時間	5	5	分
キャッピング	試薬	なし	キャッピング A、 2:3:5 [NMI/ ピリジン /ACN] キャッピング B、 1:4 [Ac <sub>2</sub> O/ACN]	
	キャッピング投入体積		0.3	CV
	反応時間		3~8	分
リン脱保護	試薬	50% TEA	50% TEA	
	投入体積	1.6	1.6	CV
	反応時間	90	90	分

\* CV : カラム体積

\*\* eq. : 当量

## 【 0 1 2 3 】

プロセスによって調製されるオリゴヌクレオチド :

1. B I I B 0 5 8 ( 配列番号 1 )、18マーホスホロチオエートオリゴヌクレオチド、各リボオリゴヌクレオチドは、2' 位にメトキシ - エチル ( M o E ) を含む。
2. B I I B 0 6 7 ( 配列番号 2 )、5 - 1 0 - 5 ギャップマーホスホチオエステル及びホスホジエステル混合骨格オリゴヌクレオチド。ギャップマーの中心ブロックは、10デオキシリボヌクレオチドであり、これは、2' - M o E リボヌクレオチドのブロックによりフランクされている。
3. 以下の表 2 に示すホスホロチオエートオリゴヌクレオチド A、B、C、D、及び E。
4. B I I B 0 7 8 ( 配列番号 8 )、4 - 8 - 6 ギャップマーホスホチオエステル及びホスホジエステル混合骨格オリゴヌクレオチド。ギャップマーの中心ブロックは、8デオキシリボヌクレオチドであり、これは、2' - M o E リボヌクレオチドのブロックによりフランクされている。

## 【 0 1 2 4 】

## 【 化 3 1 】



## 【 0 1 2 5 】

( 配列番号 8 )

下線 : M o E リボヌクレオチド

P = O : ホスホジエステル

任意の他のもの : ホスホチオエステル

## 【 0 1 2 6 】

10

20

30

40

50

## 【表 2】

表 2. ホスホロチオエートオリゴヌクレオチド A、B、C、D、及び E

コード	配列タイプ	ホスホロチオエートオリゴヌクレオチド配列
A	全 DNA 配列	<sup>Me</sup> CGA <sup>Me</sup> CT ATA <sup>Me</sup> CG <sup>Me</sup> CG <sup>Me</sup> CAA TATGG (配列番号 3)
B	5-10-5 ギャップマー ギャップマーの中心ブロックは、10 デオキシリボヌクレオチドであり、これは、2'-OMe リボヌクレオチドのブロックによりフランクされている。	<sup>Me</sup> CGA <sup>Me</sup> CU ATA <sup>Me</sup> CG <sup>Me</sup> CG <sup>Me</sup> CAA UAUGG (配列番号 4)
C	5-10-5 ギャップマー ギャップマーの中心ブロックは、10 デオキシリボヌクレオチドであり、これは、2'-OMe リボヌクレオチドのブロックによりフランクされている。	<sup>Me</sup> CGA <sup>Me</sup> CT ATA <sup>Me</sup> CG <sup>Me</sup> CG <sup>Me</sup> CAA TATGG (配列番号 5)
D	5-10-5 ギャップマー ギャップマーの中心ブロックは、10 デオキシリボヌクレオチドであり、これは、cEt リボヌクレオチドのブロックによりフランクされている。	<sup>Me</sup> CGA <sup>Me</sup> CU ATA <sup>Me</sup> CG <sup>Me</sup> CG <sup>Me</sup> CAA UAUGG (配列番号 6)
E	5-10-5 ギャップマー ギャップマーの中心ブロックは、10 デオキシリボヌクレオチドであり、これは、2'-フルオロリボヌクレオチドのブロックによりフランクされている。	CGACU ATA <sup>Me</sup> CG <sup>Me</sup> CG <sup>Me</sup> CAA UAUGG (配列番号 7)

10

20

30

## 【0127】

結果

1. B I I B 0 5 8

B I I B 0 5 8 を本発明のプロセス（すなわち、3 反応サイクル）を使用して調製し、サイクルプロセス当たり従来の 4 反応のものと比較した。PADS 及びキサンタンヒドリドを硫化剤として使用した。硫化反応を、5 分間、再循環モードとした。各プロセスの結果を表 3 に示す。

## 【0128】

40

50

## 【表 3】

表 3. B I I B 0 5 8 の粗収率及び純度の比較

	PADS		キサンタンヒドリド
	4反応サイクル	3反応サイクル	3反応サイクル
合計オリゴヌクレオチド収率 (%)	84.06	86.56	86.31
DMT/オリゴヌクレオチドの収率 (%)	70.81	77.12	76.89
合計純度 (%)	83.08	89.19	89.09
MS純度 (%)	91.97	93.29	93.67
UV純度 (%)	91.59	95.50	95.02

10

## 【0129】

PADSを硫化剤として用いて4反応サイクルを3反応サイクルと比較すると、B I I B 0 5 8 の収率及び純度が3反応サイクルにおいて増大し、新たな不純物が発生しなかった。PADSと同様に実施した3反応サイクルにおけるキサンタンヒドリド。質量分析クロマトグラムの比較を図3に与える。

## 【0130】

20

## 2. B I I B 0 6 7

PADSを硫化剤として用いて、B I I B 0 6 7 を本発明のプロセス（すなわち、3反応サイクル）を使用して調製し、サイクルプロセス当たり従来の4反応のものと比較した。硫化反応を、5分間、再循環モードとした。B I I B 0 0 5 8 とは異なり、B I I B 0 6 7 は、P=O結合ならびにP=S結合を含む。そのため、3つの異なる反応を行った：1) 4反応サイクル、2) 3反応サイクル、及び3) 酸化工程の後のみにキャッピング工程を有する3反応サイクル。そのため、かかるヌクレオチドについては硫化工程ではなく酸化が含まれており、酸化工程の後にキャッピング工程を行わなかった。各プロセスの結果を表4に示す。

## 【0131】

30

## 【表 4】

表 4. B I I B 0 6 7 の粗収率及び純度の比較

	4反応サイクル	3反応サイクル	
		酸化後のキャッピング反応を有さず	酸化後のキャッピング反応を有する
合計オリゴヌクレオチド収率 (%)	86.60	95.5	101.28
DMT/オリゴヌクレオチド (%)	66.70	76.5	80.74
質量純度 (%)	89.00	90.70	87.84
UV純度 (%)	86.50	88.30	90.75
合計純度 (%)	76.99	80.09	79.71

40

## 【0132】

4反応サイクルを、酸化後にキャッピング反応を用いない3反応サイクルと比較すると、B I I B 0 6 7 の収率及び純度が増大し、新たな不純物が発生しなかった。酸化反応の

50

後にのみキャッピング工程を有しても、3反応サイクルによって調製されるB I I B 0 6 7の全体の純度は改善されなかった。そのため、キャッピングを有さない3反応サイクルは、P = O結合を含むオリゴヌクレオチドについても使用することができる。

【 0 1 3 3 】

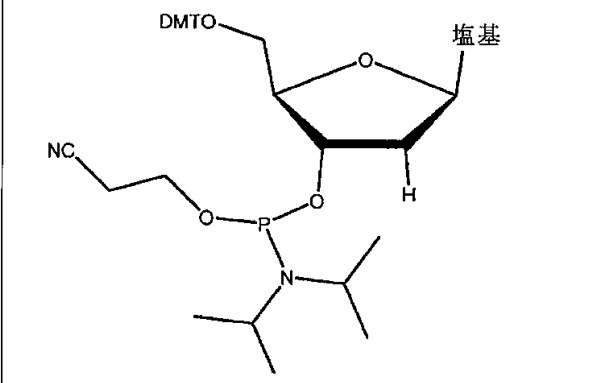
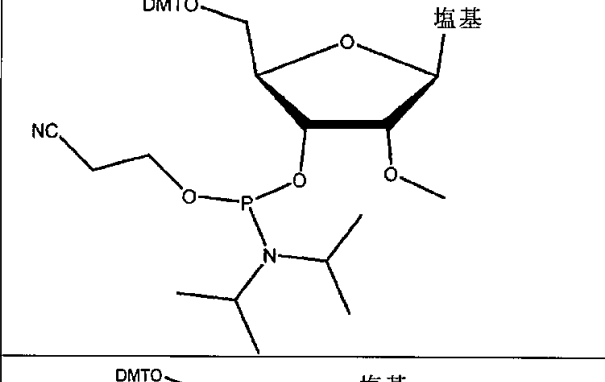
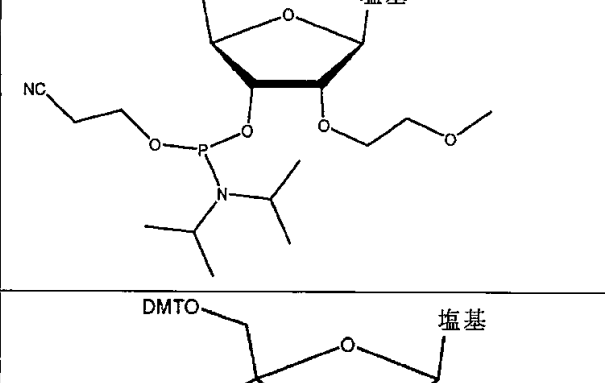
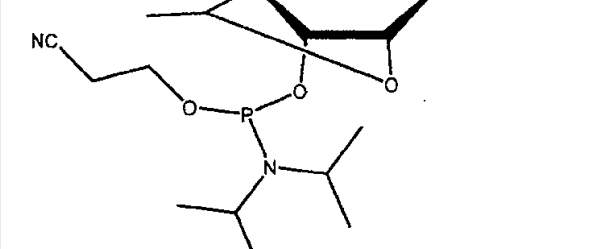
3.オリゴヌクレオチドA、B、C、D、及びE

オリゴヌクレオチドA、B、C、D、及びEを本発明のプロセスを使用して調製し、サイクルプロセス当たり従来の4反応のものと比較した。表5は、合成に使用したアミダイトを与える。使用した硫化剤を表6に示す。

【 0 1 3 4 】

【表5 - 1】

表5. 合成のためのアミダイト

5' ODMT-デオキシ-ホスホロアミダイト		H
5' ODMT-2' OMe-ホスホロアミダイト		OMe
5' ODMT-2' MoE-ホスホロアミダイト		MoE
5' ODMT-cEt-ホスホロアミダイト		cEt

10

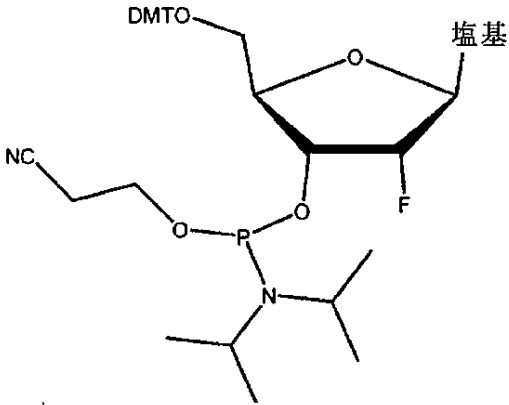
20

30

40

50

【表 5 - 2】

5' ODMT-2' F-ホ スホロアミダイ ト		F
--------------------------------	--	---

10

【 0 1 3 5 】

【表 6】

表 6． 対応するオリゴヌクレオチドの合成に使用した硫化試薬

オリゴヌクレオチ ド	硫化試薬	
A	XH	PADS
B	XH	PADS
C	XH	PADS
D	XH	PADS
E	XH	PADS

20

【 0 1 3 6 】

表 7 に示すように、本発明のプロセスからの粗オリゴヌクレオチドの収率、UV 純度及び MS 不純物プロファイルは、従来の 4 反応サイクルプロセスによって調製された粗オリゴヌクレオチドと同様である。

30

【 0 1 3 7 】

40

50

【表 7 - 1】

表 7. 生成物における DMT の光学収率 (OD) 及び R P I P H P L C 純度

硫化試薬	オリゴヌクレオチド	4反応サイクル	3反応サイクル	結論
キサンタンヒドリド	A	142.10D/ $\mu\text{mol}$ UV:73.61%	146.80D/ $\mu\text{mol}$ UV:78.65%	1. 3反応サイクルプロセスからの粗生成物の収率及びUV純度は、4反応サイクルプロセスからの粗生成物と同様である。 2. 3反応サイクルプロセスからのMS不純物プロファイルは、4反応サイクルプロセスからの粗生成物と匹敵する。
	B	149.80D/ $\mu\text{mol}$ UV:78.20%	155.70D/ $\mu\text{mol}$ UV:79.71%	上記と同じ
	C	150.40D/ $\mu\text{mol}$ UV:80.56%	154.30D/ $\mu\text{mol}$ UV:82.36%	上記と同じ
	D	126.30D/ $\mu\text{mol}$ UV:71.15%	129.40D/ $\mu\text{mol}$ UV:73.31%	上記と同じ
	E	133.10D/ $\mu\text{mol}$ UV:71.34%	137.80D/ $\mu\text{mol}$ UV:73.10%	上記と同じ
PADS	A	146.70D/ $\mu\text{mol}$ UV:83.32%	154.90D/ $\mu\text{mol}$ UV:77.66%	上記と同じ
	B	150.10D/ $\mu\text{mol}$ UV:81.33%	154.30D/ $\mu\text{mol}$ UV:79.17%	上記と同じ
	C	158.80D/ $\mu\text{mol}$ UV:79.27%	159.20D/ $\mu\text{mol}$ UV:78.80%	上記と同じ
	D	107.50D/ $\mu\text{mol}$ UV:72.29%	129.30D/ $\mu\text{mol}$ UV:71.13%	1. 3反応サイクルプロセスからの粗生成物の収率及びUV純度は、4反応サイクルプロセスからの粗生成物と同様である。 2. 3反応サイクルプロセスからのMS

10

20

30

40

50

【表 7 - 2】

				不純物プロファイルは、4反応サイクルプロセスからの粗生成物と同様である。3反応サイクルプロセスでのN-1不純物は、4反応サイクルプロセスからの粗生成物より多い。	10
	E	141.00D/ $\mu\text{mol}$ UV:73.90%	140.90D/ $\mu\text{mol}$ UV:75.77%	1. 3反応サイクルプロセスからの粗生成物の収率及びUV純度は、4反応サイクルプロセスからの粗生成物と同様である。 2. 3反応サイクルプロセスからのMS不純物プロファイルは、4反応サイクルプロセスからの粗生成物と匹敵する。	20
Beaucage 試薬	A	167.4 OD/ $\mu\text{mol}$ UV:79.70%	166.10D/ $\mu\text{mol}$ UV:78.39%	上記と同じ	30

【0138】

4. B I I B 0 7 8

B I I B 0 7 8 を本発明のプロセス（すなわち、3反応サイクル）を使用して調製し、従来の、サイクルプロセス当たり4反応のものと比較した。PADSを硫化剤として使用した。硫化反応を、3分間、再循環モードとした。各プロセスの結果を表8及び図4～7に示す。

【0139】

10

20

30

40

50

## 【表 8】

表 8. B I I B 0 7 8 の粗収率及び純度の比較

	PADS	
	4反応サイクルプロセス	3反応サイクルプロセス
DMT/オリゴヌクレオチドの収率 (%)	63.5	71.7
合計純度 (%)	81.29	83.46
MS純度 (%)	86.80	87.82
UV純度 (%)	93.65	95.04

10

## 【0140】

4 反応サイクルを、PADS を硫化剤として用いる 3 反応サイクルと比較すると、B I I B 0 7 8 の収率及び純度が 3 反応サイクルにおいて増大し、新たな不純物が発生しなかった。HPLC クロマトグラム及び質量分析クロマトグラムの比較を図 4～7 に与える。

## 【0141】

実施例 2. 硫化及びキャッピングについての二役の PADS の NMR 研究

最初の NMR 実験において、PADS をアセトニトリル - d<sub>3</sub> 中の 3 - ピコリンにおいて 22 °C で 16 時間エージングした (スキーム 1)。エージング後、n - BuOH を溶液に添加し、異なる点において NMR スペクトルを採取した。スペクトルは、PHCH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>Bu の形成が非常に遅いことを示した。

20

## 【0142】

上記と同じ手順の後の別個の実験において、BuOH の添加後、反応混合物に P(OMe)<sub>3</sub> を添加し、反応混合物の NMR スペクトルを異なる点において記録した。P(OMe)<sub>3</sub> は、固相合成におけるホスファイト中間体と同様の構造を有する。スペクトルは、約 2 分で P(OMe)<sub>3</sub> の硫化が完了し、BuOH のエステル化 (キャッピング) が生じたことを示した (図 8)。

## 【0143】

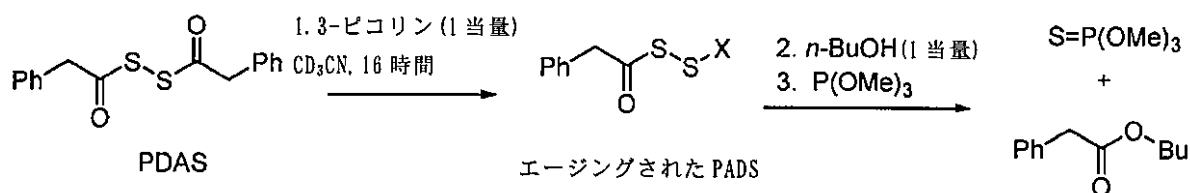
これらの実験結果は、硫化の際に活性なキャッピング試薬が発生し、存在するアルコールをキャッピングしたことを実証した。

30

スキーム 1.

## 【0144】

## 【化 3 2】



40

## 【0145】

塩基として N - メチルイミダゾールを用いて同じ実験を繰り返して PADS をエージングし、同様の結果を得た (スキーム 2)。P(OMe)<sub>3</sub> を添加しないと、エステル化反応は非常に遅いが、BuOH のエステル化は硫化反応後すぐに生じた。これらの結果は、同じく、硫化及びキャッピングが、一旦硫化が起こって生じたことを示した (図 9)。

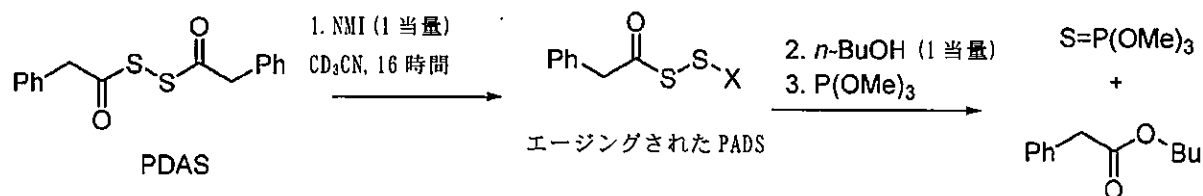
スキーム 2. NM I における PADS のエージング

## 【0146】

50



## 【化 3 3】



## 【 0 1 4 7】

NMI : N - メチルイミダゾール

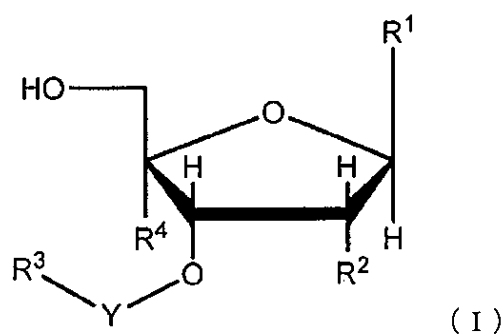
10

発明の態様

[ 態様 1 ] オリゴヌクレオチドを調製するためのプロセスであって

a) 式 ( I ) の化合物 :

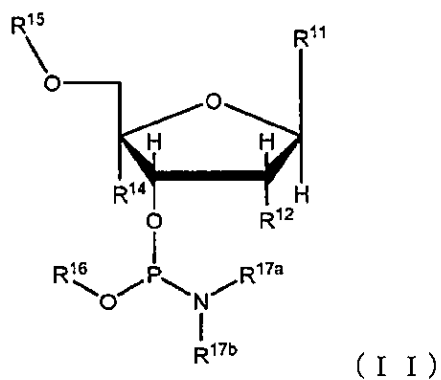
## 【化 3 4】



20

を式 ( I I ) の化合物 :

## 【化 3 5】



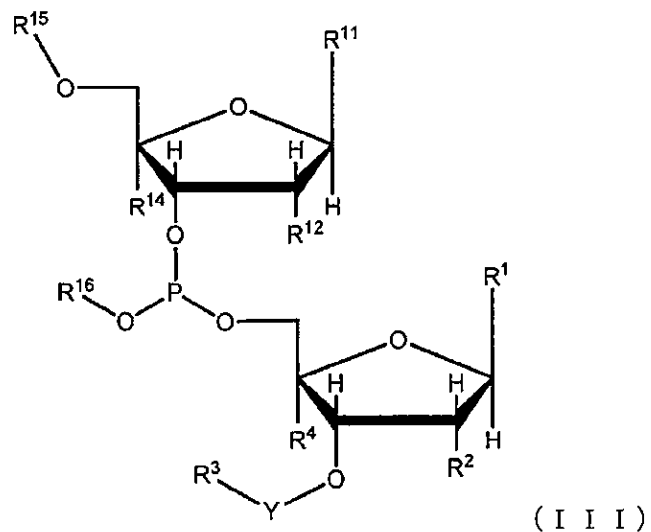
30

と反応させて、式 ( I I I ) の化合物 :

40

50

【化 3 6】

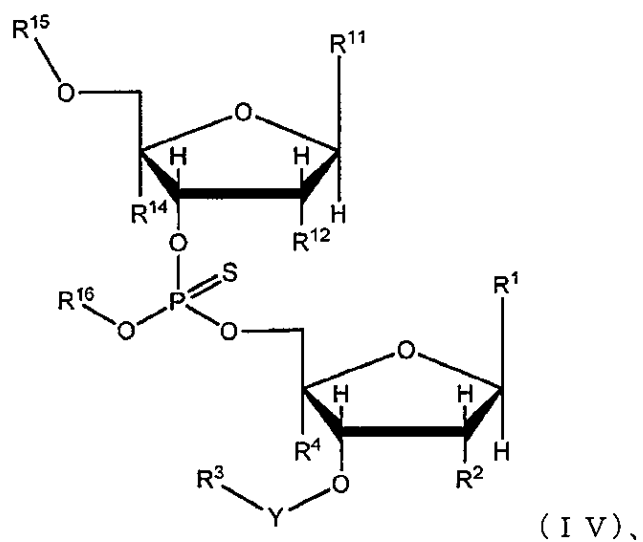


10

を形成することと；

b) 前記式 ( I I I ) の化合物を、硫化剤を用いて硫化して、式 ( I V ) の化合物：

【化 3 7】

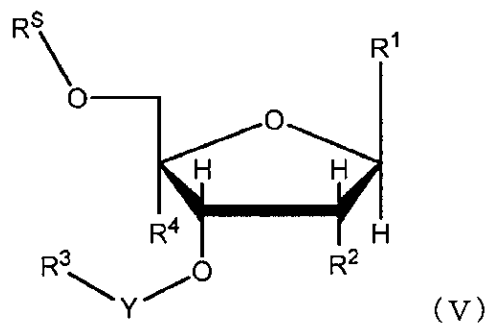


20

30

を形成し、式 ( I ) の未反応化合物から式 ( V ) の化合物：

【化 3 8】



40

を形成することと；

を含み、

式中

50

各  $R^1$  及び  $R^{11}$  は、独立して、核酸塩基であり、前記核酸塩基の  $NH_2$  が、存在する場合、アミン保護基によって保護されており；

各  $R^2$  及び  $R^{12}$  は、H、ハロ、及び  $C_{1-6}$  アルコキシによって任意選択的に置換されている  $C_{1-6}$  アルコキシからなる群から独立して選択され；

$R^3$  は、リンカーを任意選択的に含む固体支持体であり；

Y は、非存在、ヌクレオチド、または 2 以上のヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドであり；

各  $R^4$  は、独立して H であるか、または  $R^2$  の前記アルコキシ基と共に環を形成し；

各  $R^{14}$  は、独立して H であるか、または  $R^{12}$  の前記アルコキシ基と共に環を形成し；

；

$R^{15}$  は、ヒドロキシ保護基であり；

$R^{16}$  は、 $-CN$  によって任意選択的に置換されている  $C_{1-6}$  アルキルであり；

$R^{17a}$  及び  $R^{17b}$  は、独立して  $C_{1-6}$  アルキルであり；

$R^S$  は、前記硫化剤の副生成物から形成されたヒドロキシ保護基であり；

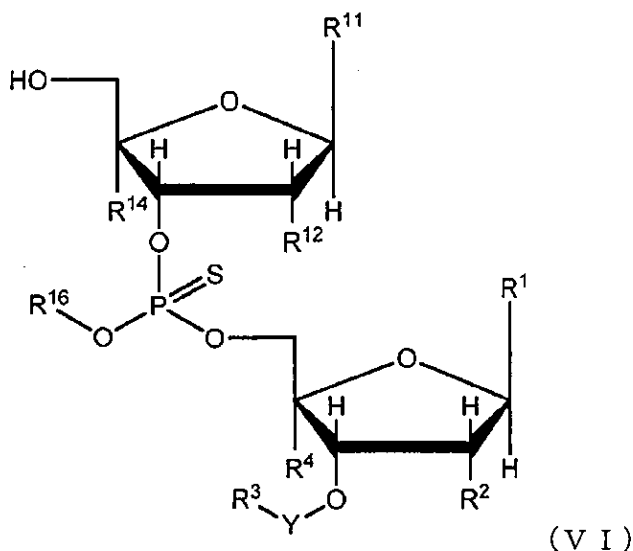
前記硫化剤は、式 (I) の未反応化合物から前記式 (V) の化合物に実質的に完全に変換し、かつ前記式 (III) の化合物から前記式 (IV) の化合物に変換するのに十分な時間量で反応され；

式 (I) の未反応化合物から式 (V) の化合物に実質的に完全に変換し、かつ前記式 (III) の化合物から前記式 (IV) の化合物に変換するのに十分な量の硫化剤が添加され；

前記式 (I)、(II)、(III)、(IV)、及び (V) の化合物が、任意選択的に、薬学的に許容可能な塩の形態である、前記プロセス。

[ 態様 2 ] c) 前記式 (IV) の化合物を脱保護して、式 (VI) の化合物：

【化 39】



またはその薬学的に許容可能な塩を形成する工程をさらに含む、態様 1 に記載のプロセス。

[ 態様 3 ] d) 前記式 (VI) の化合物を式 (II) の化合物と反応させて、式 (VII) の化合物：

10

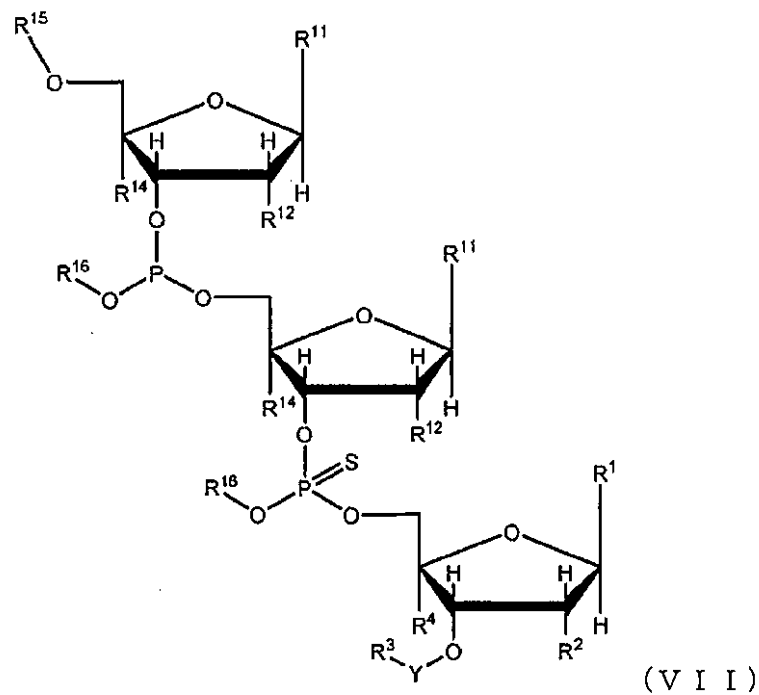
20

30

40

50

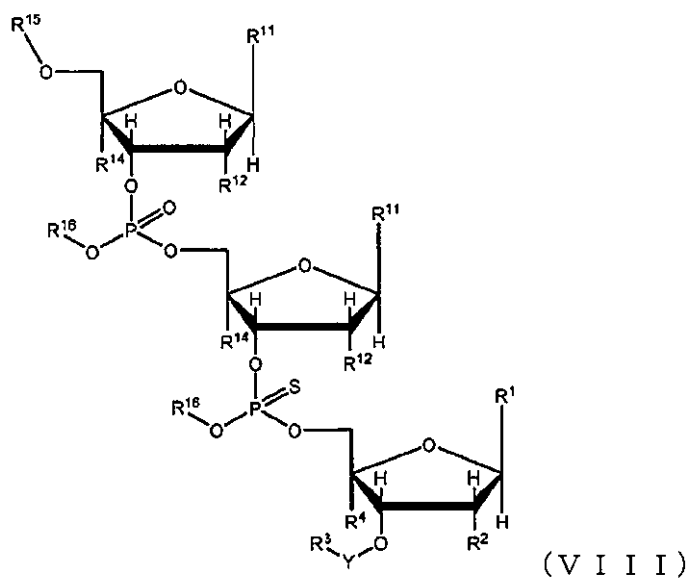
【化 4 0】



またはその薬学的に許容可能な塩を形成する工程と；

e) 前記式 (VII) の化合物を、酸化剤を用いて酸化して、式 (VIII) の化合物：

【化 4 1】



を形成する工程と

をさらに含む、態様 2 に記載のプロセス。

[ 態様 4 ] f) 前記式 (VIII) の化合物を脱保護して、式 (IX) の化合物：

10

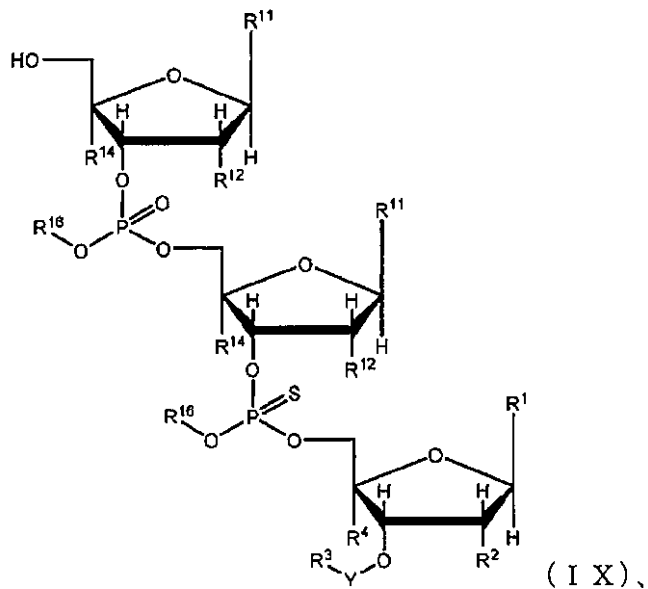
20

30

40

50

## 【化 4 2】

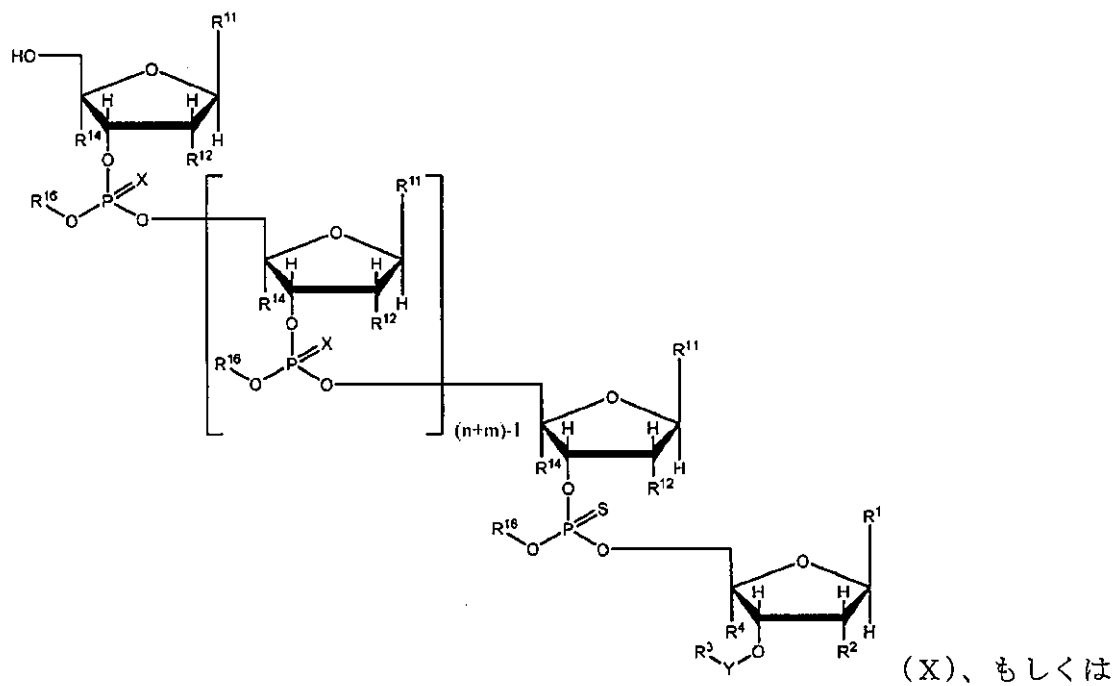


またはその薬学的に許容可能な塩

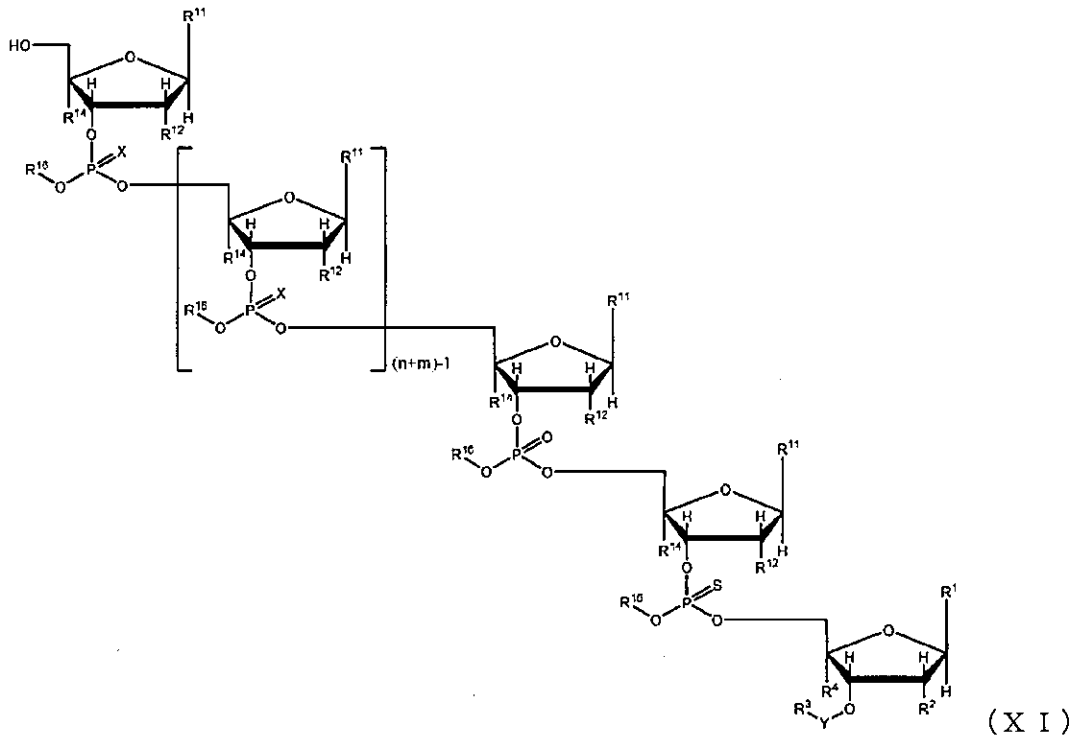
を形成する工程をさらに含む、態様 3 に記載のプロセス。

〔態様 5〕前記式 (VI) の化合物または前記式 (IX) の化合物によって開始して、工程 a)、b)、及び c) が  $n$  回繰り返され、工程 d)、e) 及び f) が  $m$  回繰り返され、工程 a)、b)、及び c)、ならびに工程 d)、e) 及び f) の繰り返しが、互いに対していずれの順序で行われてもよく、 $n$  が少なくとも 1 であり、 $m$  が 0、1、2、3、または 4 であり、式 (X) もしくは (XI) のオリゴヌクレオチド：

## 【化 4 3】

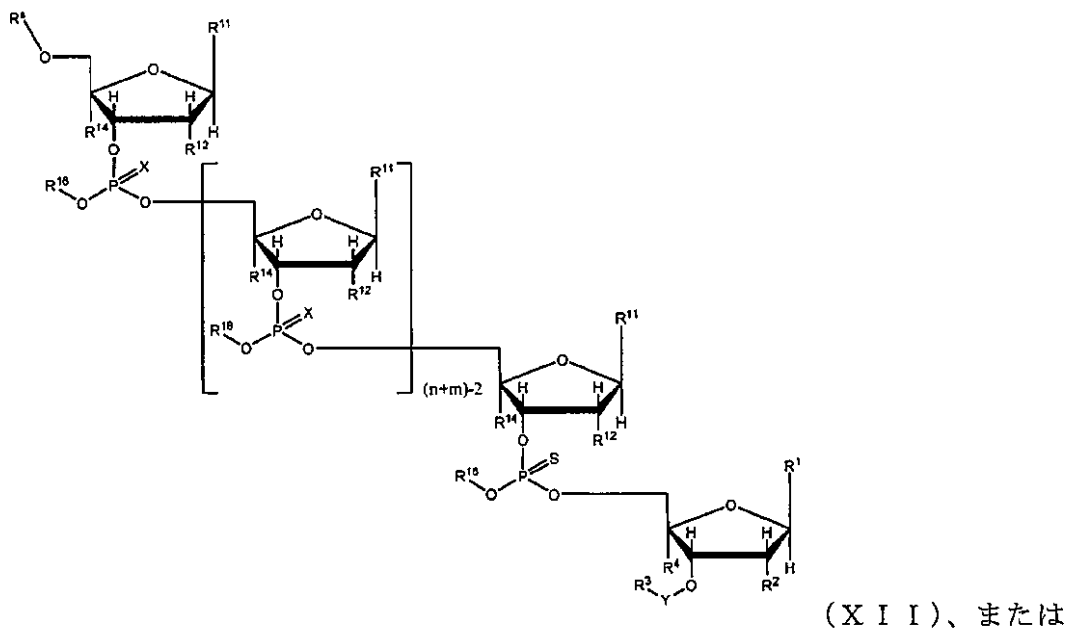


## 【化 4 4】



またはその薬学的に許容可能な塩を形成すること、あるいは、オリゴヌクレオチドを形成することにおいて、工程 a、b、及び c、または工程 d、e、及び f の各繰り返しにより、式 (V I) または (I X) のいくつかの未反応化合物を結果として生じ、これが、過剰の硫化剤または前記硫化工程後の前記硫化剤の副生成物と反応して、式 (X I I) または (X I I I) の化合物：

## 【化 4 5】



10

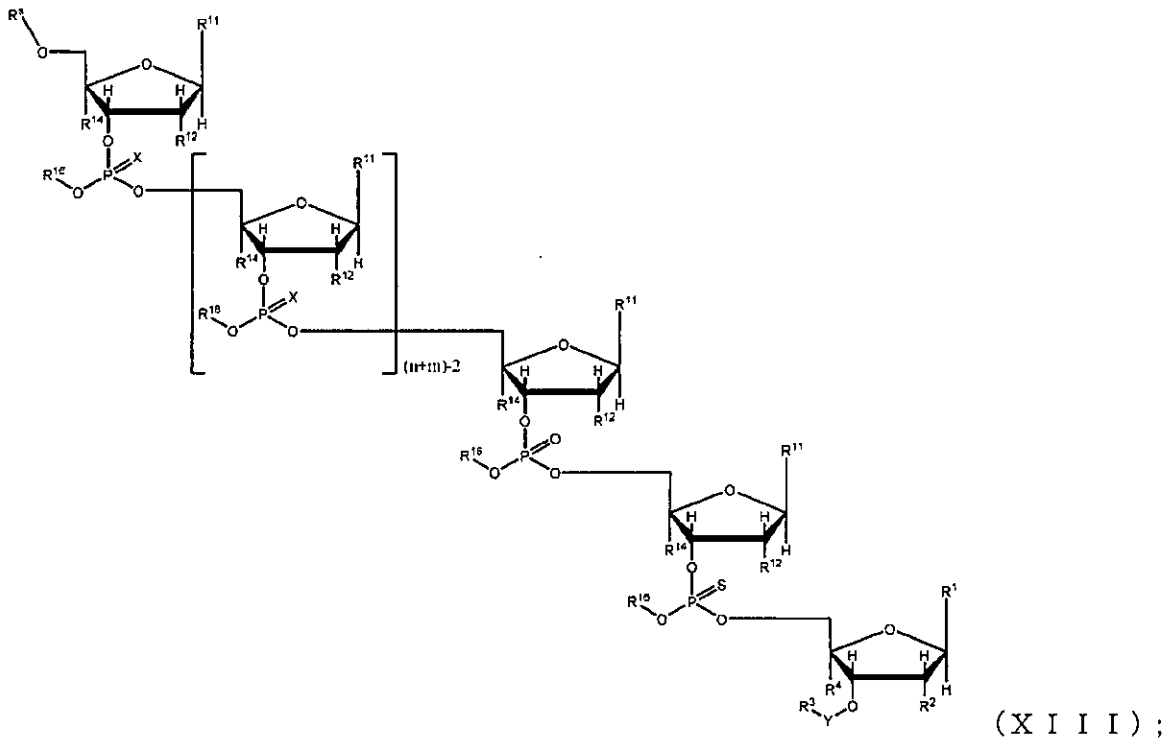
20

30

40

50

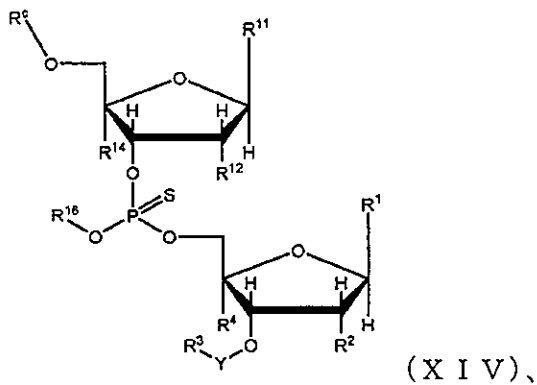
## 【化 4 6】



式中、各 X は、S または O から独立して選択され、ただし、前記式 (X)、(XI)、(XII)、または (XIII) の化合物において、4、3、2、1、または 0 回のみ、X が O である；を形成する、態様 2 または 4 に記載のプロセス。

[ 態様 6 ] g) 前記式 (VI) の未反応化合物をキャッピング剤と反応させて、式 (XIV) の化合物：

## 【化 4 7】



またはその薬学的に許容可能な塩を形成する工程をさらに含み、R<sup>c</sup> が、前記キャッピング剤から形成されたヒドロキシ保護基である、態様 3 に記載のプロセス。

[ 態様 7 ] h) 前記式 (VII) の化合物を脱保護して、式 (IX) の化合物：

10

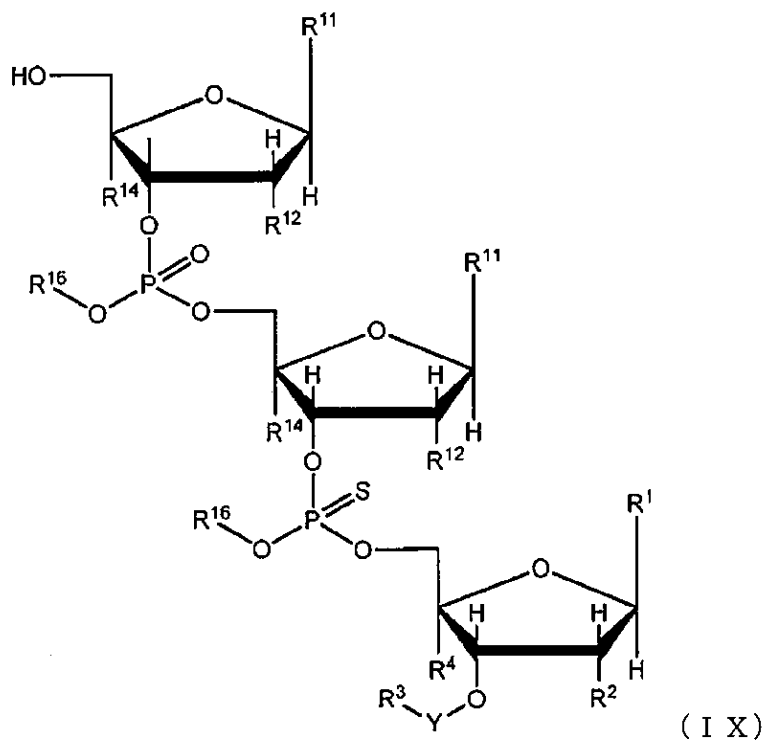
20

30

40

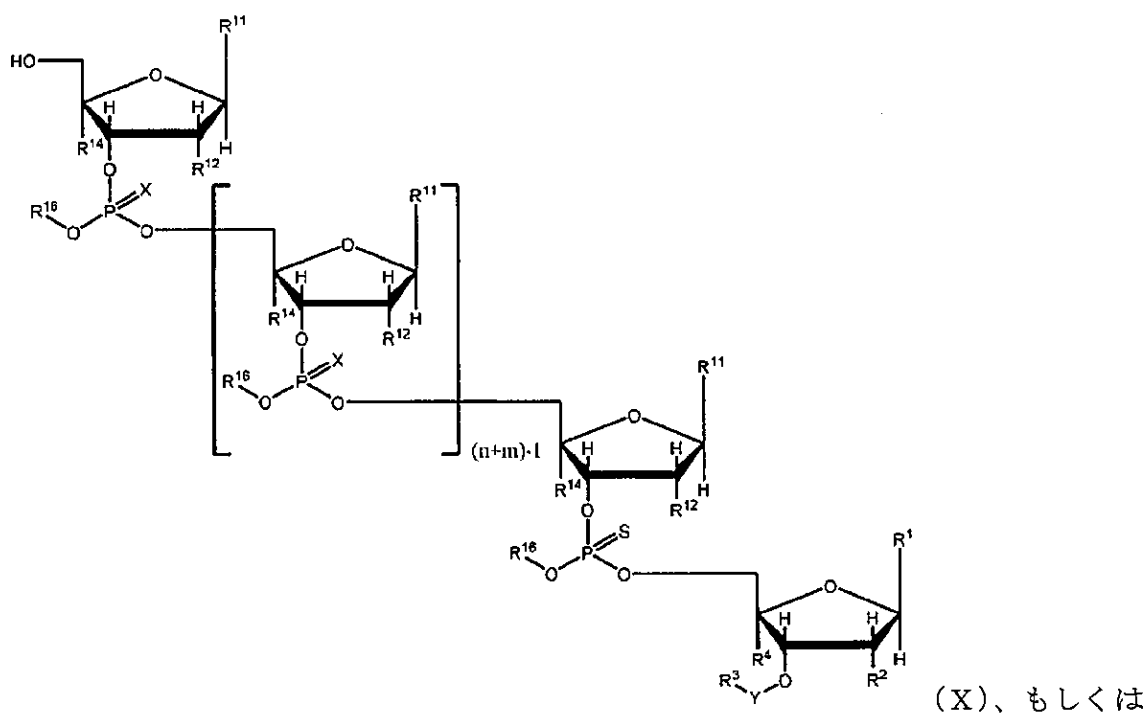
50

【化 4 8】



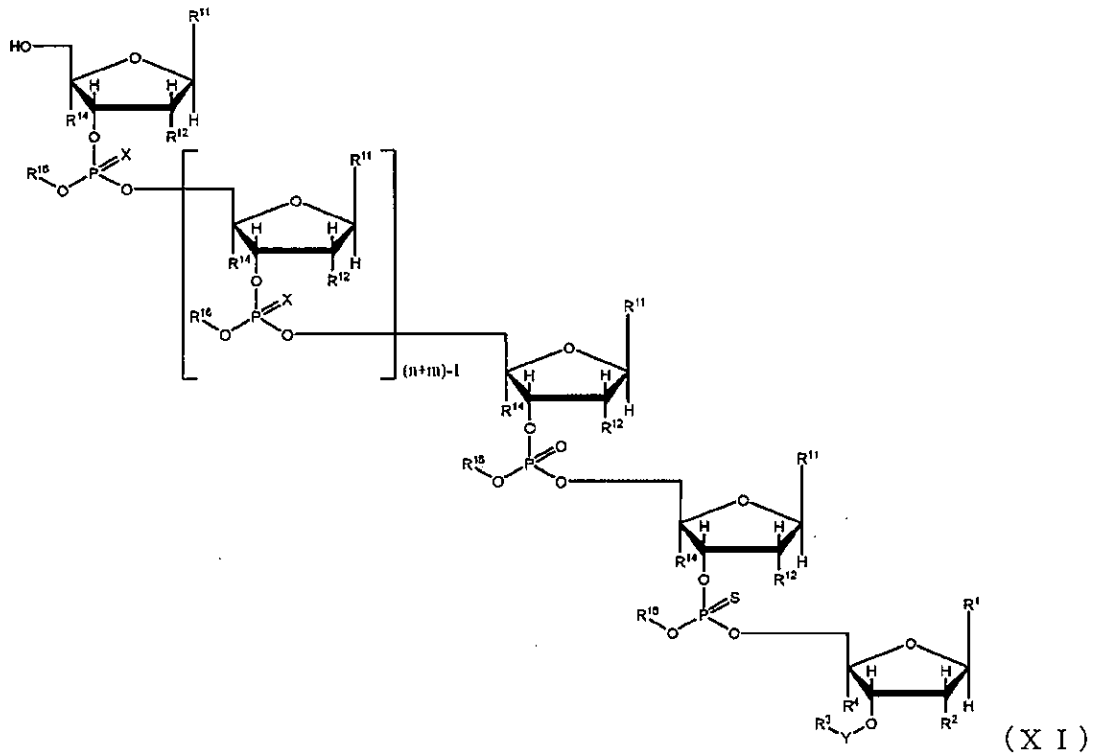
またはその薬学的に許容可能な塩を形成する工程をさらに含む、態様 6 に記載のプロセス。  
 [ 態様 8 ] 前記式 ( V I ) の化合物または前記式 ( I X ) の化合物によって開始して、工程 a )、b )、及び c ) が n 回繰り返され、工程 d )、e )、g ) 及び h ) が m 回繰り返され、工程 a )、b )、及び c ) ならびに工程 d )、e )、g ) 及び h ) の繰り返しが、互いに対していずれの順序で行われてもよく、n が少なくとも 1 であり、m が 0 以上であり、式 ( X ) もしくは ( X V I I ) のオリゴヌクレオチド：

【化 4 9】



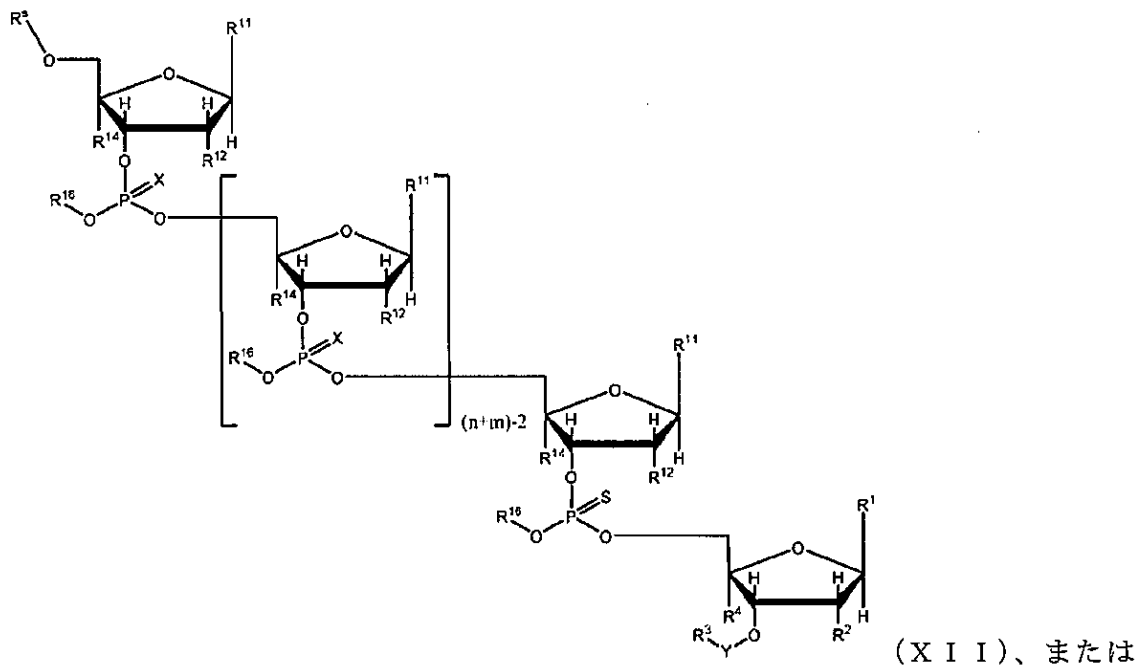


## 【化 5 0】



またはその薬学的に許容可能な塩を形成すること、あるいは、オリゴヌクレオチドを形成することにおいて、工程 a、b、及び c、または工程 d、e、及び f の各繰り返しにより、式 (VI) または (IX) のいくつかの未反応化合物を結果として生じ、これが、過剰の硫化剤または前記硫化工程後の前記硫化剤の副生成物と反応して、式 (XII) または (XIII) の化合物：

## 【化 5 1】



10

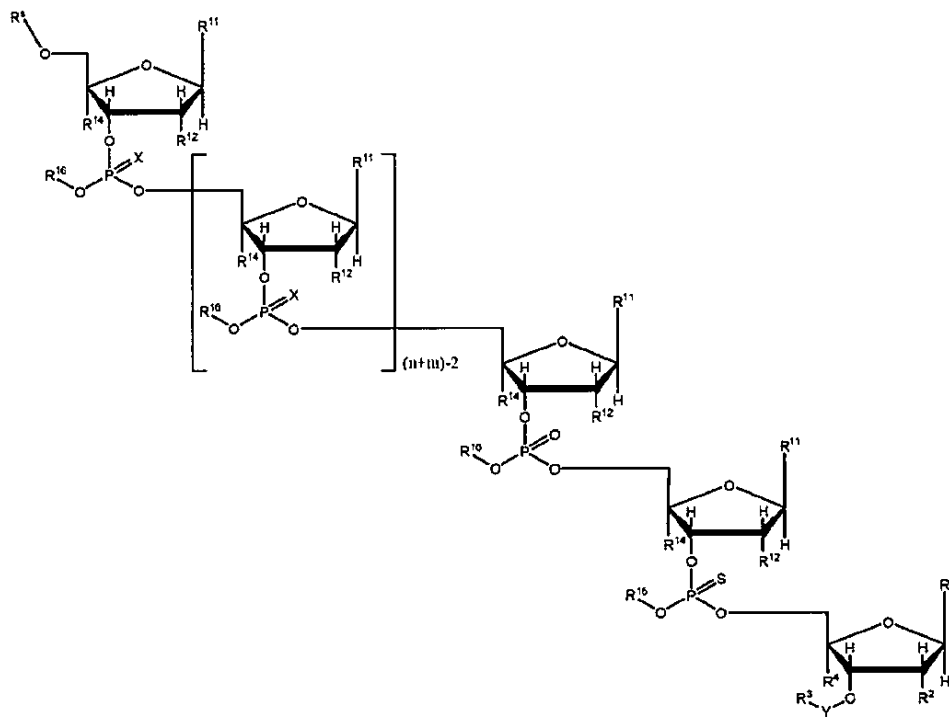
20

30

40

50

## 【化 5 2】



式中、各 X は、S または O から独立して選択される；を形成する、態様 7 に記載のプロセス。

〔態様 9〕n が、2 ~ 1000 である、態様 5 または 8 に記載のプロセス。

〔態様 10〕n が、2 ~ 500 である、態様 5 または 8 に記載のプロセス。

〔態様 11〕n が、2 ~ 100 である、態様 5 または 8 に記載のプロセス。

〔態様 12〕n が、2 ~ 50 である、態様 5 または 8 に記載のプロセス。

〔態様 13〕n が、2 ~ 25 である、態様 5 または 8 に記載のプロセス。

〔態様 14〕前記固体支持体に付着した前記リンカーが開裂される、態様 1 ~ 13 のいずれかに記載のプロセス。

〔態様 15〕前記硫化剤が、3 - アミノ - 1, 2, 4 - ジチアゾール - 5 - チオン (XH または ADTT) であり、R<sup>S</sup> が、-C(SH)(=N)-CN である、態様 1 ~ 14 のいずれかに記載のプロセス。

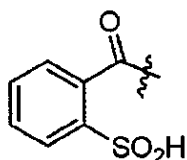
〔態様 16〕前記硫化剤が、フェニルアセチルジスルフィド (PADS) であり、R<sup>S</sup> が、-C(=O)CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> である、態様 1 ~ 14 のいずれかに記載のプロセス。

〔態様 17〕前記硫化剤が、3 - (ジメチルアミノ - メチリデン) アミノ - 3 H - 1, 2, 4 - ジチアゾール (DDTT) であり、R<sup>S</sup> が、-C(=S)NHC(=S)N=CNH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> である、態様 1 ~ 14 のいずれかに記載のプロセス。

〔態様 18〕前記硫化剤が、3 H - 1, 2 - ベンゾジチオール - 3 - オン 1, 1 - ジオキサイド (Beaucage 試薬) である、態様 1 ~ 14 のいずれかに記載のプロセス。

〔態様 19〕R<sup>S</sup> が、

## 【化 5 3】



である、態様 14 に記載のプロセス。

[ 態様 2 0 ] 前記硫化剤が、前記硫化剤を 0 ~ 3 0 分間再循環させることによって反応する、態様 1 ~ 1 9 のいずれかに記載のプロセス。

[ 態様 2 1 ] 前記硫化剤が、少なくとも 0 ~ 2 0 回再循環される、態様 1 ~ 2 0 のいずれかに記載のプロセス。

[ 態様 2 2 ] 前記硫化剤が、1 ~ 2 0 回、1 ~ 1 0 回、または 1 ~ 5 回再循環される、態様 1 ~ 2 0 のいずれかに記載のプロセス。

[ 態様 2 3 ] 前記硫化剤は、前記リンカー、または第 1 ヌクレオチドが前記固体支持体に直接付着しているときには前記第 1 ヌクレオチドに対して、3 ~ 6 当量の硫化剤を再循環させることによって反応する、態様 1 ~ 2 2 のいずれかに記載のプロセス。

[ 態様 2 4 ] 前記硫化試薬の濃度が、0 . 0 2 M ~ 2 . 0 M である、態様 1 ~ 2 3 のいずれかに記載のプロセス。

10

[ 態様 2 5 ] 前記硫化試薬の濃度が、0 . 0 5 M ~ 0 . 5 M である、態様 1 ~ 2 4 のいずれかに記載のプロセス。

[ 態様 2 6 ] 前記硫化試薬が、0 . 0 2 M ~ 0 . 1 M の濃度で添加される 3 - (ジメチルアミノ - メチリデン) アミノ) - 3 H - 1 , 2 , 4 - ジチアゾール ( D D T T ) である、態様 1 ~ 2 5 のいずれかに記載のプロセス。

[ 態様 2 7 ] 前記核酸塩基が、シトシン、グアニン、アデニン、チミン、ウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、7 - メチルグアニン、5 , 6 - ジヒドロウラシル、5 - メチルシトシン、及び 5 - ヒドロキシメチルシトシンからなる群から選択され、前記核酸塩基の前記 N H <sub>2</sub> 基が、存在する場合、P h C O - 、C H <sub>3</sub> C O - 、i P r C O - 、M e <sub>2</sub> N - C H = 、または M e <sub>2</sub> N - C M e = によって保護されている、態様 1 ~ 2 6 のいずれかに記載のプロセス。

20

[ 態様 2 8 ] 前記核酸塩基が、シトシン、グアニン、アデニン、チミン、ウラシル、及び 5 - メチルシトシンからなる群から選択され、前記核酸塩基の前記 N H <sub>2</sub> 基が、存在する場合、P h C O - 、C H <sub>3</sub> C O - 、i P r C O - 、M e <sub>2</sub> N - C H = 、または M e <sub>2</sub> N - C M e = によって保護されている、態様 1 ~ 2 7 のいずれかに記載のプロセス。

[ 態様 2 9 ] 各 R <sup>2</sup> 及び R <sup>1 2</sup> が、H、F、及び C <sub>1</sub> - 4 アルコキシによって任意選択的に置換されている C <sub>1</sub> - 4 アルコキシからなる群から独立して選択され；

各 R <sup>4</sup> が、独立して H であるか、または R <sup>2</sup> の前記アルコキシ基と共に環を形成し、前記環が、1 ~ 3 個の C <sub>1</sub> - 4 アルキル基によって任意選択的に置換されている 5 または 6 員環であり；

30

R <sup>1 6</sup> が - C H <sub>2</sub> C H <sub>2</sub> C N であり；

R <sup>1 7 a</sup> 及び R <sup>1 7 b</sup> が、独立して、C <sub>1</sub> - 4 アルキルであり；

各 R <sup>1 4</sup> が、独立して H であるか、または R <sup>1 2</sup> の前記アルコキシ基と共に環を形成し、前記環が、1 ~ 3 個の C <sub>1</sub> - 4 アルキル基によって任意選択的に置換されている 5 または 6 員環である；

態様 1 ~ 2 8 のいずれかに記載のプロセス。

[ 態様 3 0 ] 各 R <sup>2</sup> 及び R <sup>1 2</sup> が、H、または、C <sub>1</sub> - 4 アルコキシによって任意選択的に置換されている C <sub>1</sub> - 4 アルコキシから独立して選択され；

R <sup>1 5</sup> が、4 , 4 ' - ジメトキシトリチルであり；

40

R <sup>1 6</sup> が、- C H <sub>2</sub> C H <sub>2</sub> C N であり；

R <sup>1 7 a</sup> 及び R <sup>1 7 b</sup> が、独立して、C <sub>1</sub> - 6 アルキルであり；

R <sup>S</sup> が、- C ( = N ) ( S H ) - C N または - C ( = O ) C H <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> である；

態様 1 ~ 2 9 のいずれかに記載のプロセス。

[ 態様 3 1 ] Y が存在しない、態様 1 ~ 3 0 のいずれかに記載のプロセス。

[ 態様 3 2 ] Y が、単一のヌクレオチドである、態様 1 ~ 3 0 のいずれかに記載のプロセス。

[ 態様 3 3 ] Y が、2 ~ 5 0 のヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドである、態様 1 ~ 3 0 のいずれかに記載のプロセス。

[ 態様 3 4 ] Y が、2 ~ 4 0 のヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドである、態様 1 ~

50

30のいずれかに記載のプロセス。

〔態様35〕Yが、2～30のヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドである、態様1～30のいずれかに記載のプロセス。

〔態様36〕Yが、2～25のヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドである、態様1～30のいずれかに記載のプロセス。

〔態様37〕式(X)の化合物が、2～30のヌクレオチドを含むアンチセンスオリゴヌクレオチドである、態様1～36のいずれかに記載のプロセス。

〔態様38〕前記アンチセンスオリゴヌクレオチドが、修飾RNAのみを含む、態様37に記載のプロセス。

〔態様39〕前記アンチセンスオリゴヌクレオチドが、DNA及び修飾RNAを含む、態様37に記載のプロセス。

〔態様40〕前記アンチセンスオリゴヌクレオチドが、ギャップマーである、態様37に記載のプロセス。

〔態様41〕前記アンチセンスオリゴヌクレオチドが、DNAのみを含む、態様37に記載のプロセス。

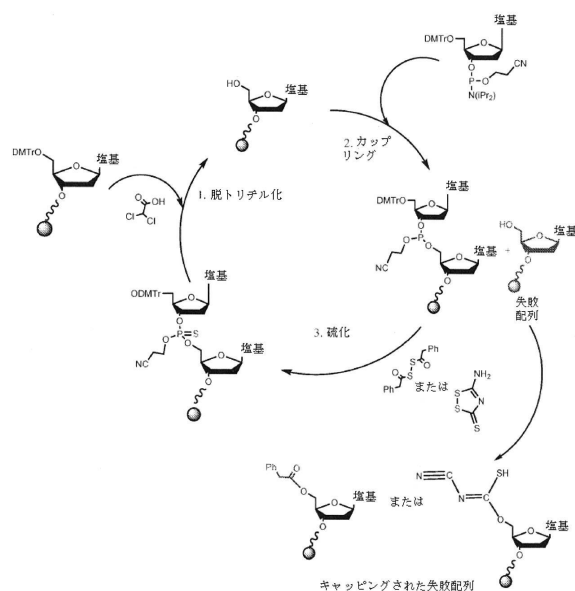
〔態様42〕前記アンチセンスオリゴヌクレオチドの配列が、配列番号1である、態様37に記載のプロセス。

〔態様43〕前記アンチセンスオリゴヌクレオチドの配列が、配列番号2である、態様37に記載のプロセス。

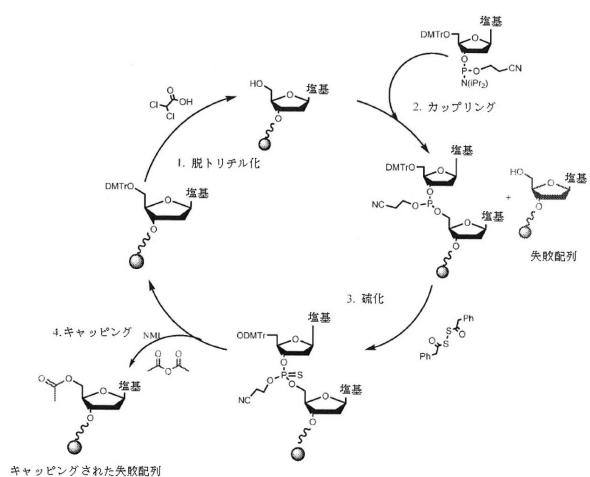
〔態様44〕前記アンチセンスオリゴヌクレオチドの配列が、配列番号8である、態様37に記載のプロセス。

【図面】

【図1】



【図2】



10

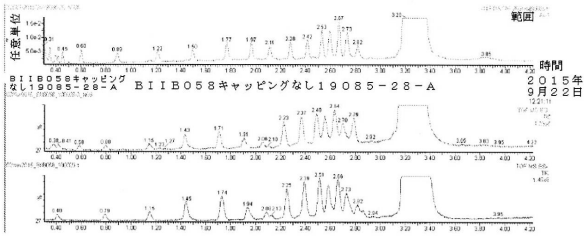
20

30

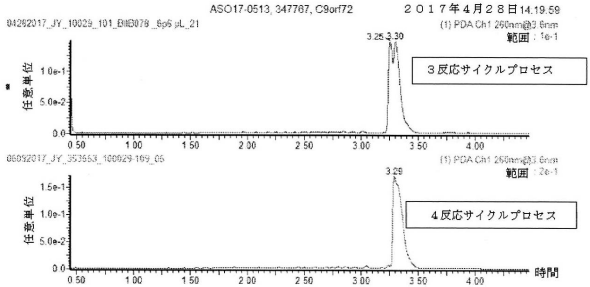
40

50

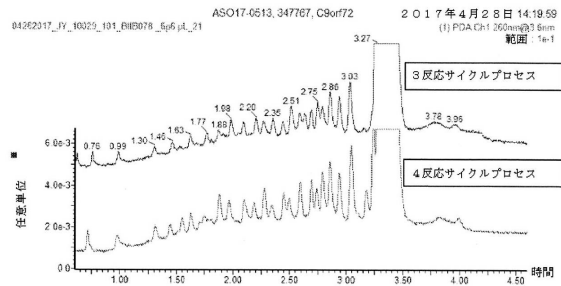
【図 3】



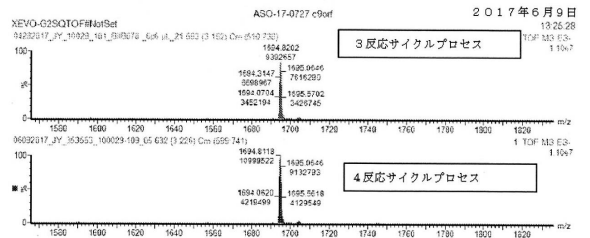
【図 4】



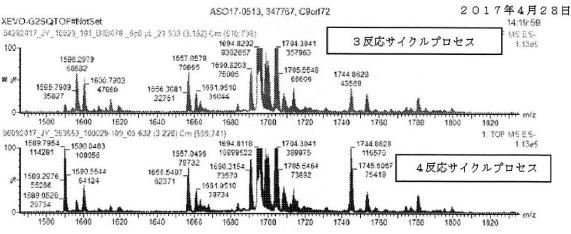
【図 5】



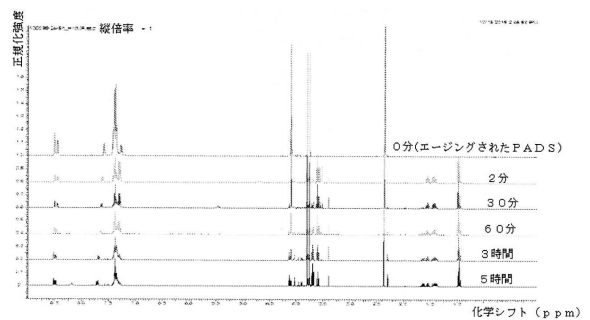
【図 6】



【図 7】



【図 8】



10

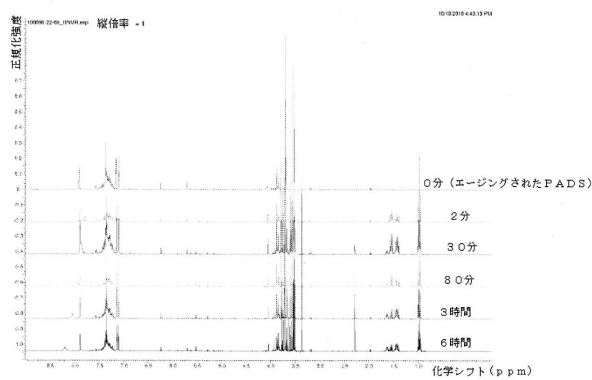
20

30

40

50

【図 9】



10

【配列表】

0007235512000001.app

20

30

40

50

## フロントページの続き

- (72)発明者 シー , シアーンリン  
アメリカ合衆国 0 2 1 4 2 マサチューセッツ州ケンブリッジ、ピニー・ストリート 2 2 5 番 バイ  
オジェン・エムエイ・インコーポレイテッド
- (72)発明者 ヤン , ジミン  
アメリカ合衆国 0 2 1 4 2 マサチューセッツ州ケンブリッジ、ピニー・ストリート 2 2 5 番 バイ  
オジェン・エムエイ・インコーポレイテッド
- (72)発明者 キースマン , ウィリアム・エフ  
アメリカ合衆国 0 2 1 4 2 マサチューセッツ州ケンブリッジ、ピニー・ストリート 2 2 5 番 バイ  
オジェン・エムエイ・インコーポレイテッド
- (72)発明者 フィロン , ヤニック  
アメリカ合衆国 0 2 1 4 2 マサチューセッツ州ケンブリッジ、ピニー・ストリート 2 2 5 番 バイ  
オジェン・エムエイ・インコーポレイテッド
- 審査官 鳥居 福代
- (56)参考文献 米国特許第 0 6 8 0 9 1 9 5 ( U S , B 1 )  
ZACHARIA S CHERUVALLATH , ORGANIC PROCESS RESEARCH AND DEVELOPMENT , 米  
国 , 2000年05月 , VOL:4, NR:3 , PAGE(S):199 - 204
- (58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)  
C 0 7 H  
C A p l u s / R E G I S T R Y ( S T N )