

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-522046

(P2017-522046A)

(43) 公表日 平成29年8月10日 (2017.8.10)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 C 0 8 4
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/00 G	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 262 頁)

(21) 出願番号	特願2017-516650 (P2017-516650)	(71) 出願人	516133984
(86) (22) 出願日	平成27年6月8日 (2015.6.8)		ソルスティス バイオロジクス, リミティッド
(85) 翻訳文提出日	平成29年2月2日 (2017.2.2)		アイルランド国 2 ダブリン, ハーコート ストリート 88
(86) 国際出願番号	PCT/US2015/034749	(74) 代理人	100091096
(87) 国際公開番号	W02015/188197		弁理士 平木 祐輔
(87) 国際公開日	平成27年12月10日 (2015.12.10)	(74) 代理人	100118773
(31) 優先権主張番号	62/009, 123		弁理士 藤田 節
(32) 優先日	平成26年6月6日 (2014.6.6)	(74) 代理人	100122389
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 新井 栄一
		(74) 代理人	100111741
			弁理士 田中 夏夫
		(74) 代理人	100169971
			弁理士 菊田 尚子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生物可逆的および生物不可逆的基を有するポリヌクレオチド構築物

(57) 【要約】

本発明は、パッセンジャー鎖、R I S C複合体に取り込み可能なガイド鎖、ならびに (i) ガイド鎖中の3'末端またはヌクレオチド間生物不可逆的基;または (i i) パッセンジャー鎖中の5'末端、3'末端、またはヌクレオチド間生物不可逆的基、およびガイド鎖またはパッセンジャー鎖中の5'末端、3'末端、またはヌクレオチド間ジスルフィド生物可逆的基を含有するハイブリダイズポリヌクレオチド構築物を特徴とする。本発明はまた、ハイブリダイズポリヌクレオチド構築物を用いて、ポリヌクレオチドを細胞に送達する方法を特徴とする。本発明はさらに、ハイブリダイズポリヌクレオチド構築物を用いて、細胞内のポリペプチドの発現を低下させる方法を特徴とする。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

パッセンジャー鎖、RISC複合体に取り込み可能なガイド鎖、ならびに

(i) 前記ガイド鎖中の3'末端またはヌクレオチド間生物不可逆的基；または

(ii) 前記パッセンジャー鎖中の5'末端、3'末端、またはヌクレオチド間生物不可逆的基、および前記ガイド鎖または前記パッセンジャー鎖中の5'末端、3'末端、またはヌクレオチド間ジスルフィド生物可逆的基を含むハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

【請求項 2】

前記ジスルフィド生物可逆的基を含み、前記ジスルフィド生物可逆的基が、 $-S-S-$ (リンクA) $-B$ を含み、
式中、

リンクAが、Bに結合された sp^3 混成炭素原子および $-S-S-$ に結合された炭素原子を含む二価または三価リンカーであり、ここで、リンクAが三価リンカーである場合、リンクAの第3の原子価が、 $-S-S-$ と結合して、任意選択的に置換される $C_3 \sim 9$ ヘテロシクリレンを形成し、

Bが、5'末端リン(V)基、3'末端リン(V)基、またはヌクレオチド間リン(V)基である、請求項1に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

【請求項 3】

パッセンジャー鎖およびRISC複合体に取り込み可能なガイド鎖を含むハイブリダイズポリヌクレオチド構築物であって、前記パッセンジャー鎖および前記ガイド鎖のそれぞれが、下式：

$5' - D - (Nuc - E)_n - Nuc - F$ 、またはその塩
で表される構造を有し、式中、

各nが、独立して、10～150の整数であり、

各Nucが、独立して、ヌクレオシドであり；

前記ガイド鎖のDが、ヒドロキシル、リン酸塩、またはジスルフィド生物可逆的基であり；

前記パッセンジャー鎖のDが、H、ヒドロキシル、任意選択的に置換される $C_1 \sim 6$ アルコキシ、保護されたヒドロキシル基、リン酸塩、二リン酸塩、三リン酸塩、四リン酸塩、五リン酸塩、5'キャップ、ホスホチオール、任意選択的に置換される $C_1 \sim 6$ アルキル、アミノ含有基、ビオチン含有基、ジゴキシゲニン含有基、コレステロール含有基、色素含有基、クエンチャー含有基、ポリペプチド、炭水化物、中性有機ポリマー、正荷電ポリマー、治療剤、標的化部分、エンドソームエスケープ部分、生物不可逆的基、またはジスルフィド生物可逆的基であり；

各Eが、独立して、リン酸塩、ホスホチオエート、生物不可逆的基、またはジスルフィド生物可逆的基であり；

各Fが、独立して、H、ヒドロキシル、任意選択的に置換される $C_1 \sim 6$ アルコキシ、保護されたヒドロキシル基、一リン酸塩、二リン酸塩、三リン酸塩、四リン酸塩、五リン酸塩、ホスホチオール、任意選択的に置換される $C_1 \sim 6$ アルキル、アミノ含有基、ビオチン含有基、ジゴキシゲニン含有基、コレステロール含有基、色素含有基、クエンチャー含有基、ポリペプチド、炭水化物、中性有機ポリマー、正荷電ポリマー、治療剤、標的化部分、エンドソームエスケープ部分、生物不可逆的基、またはジスルフィド生物可逆的基であり；

ここで、前記ジスルフィド生物可逆的基の少なくとも1つが、 $-S-S-$ (リンクA) $-B$ を含み、
式中、

リンクAが、独立して、Bに結合された sp^3 混成炭素原子および $-S-S-$ に結合された炭素原子を含む二価または三価リンカーであり、ここで、リンクAが三価リンカーである場合、リンクAの第3原子価が、 $-S-S-$ と結合して、任意選択的に置換されるC

3 ~ 9 ヘテロシクリレンを形成し；

Bが、独立して、5'末端リン(V)基、3'末端リン(V)基、またはヌクレオチド間リン(V)基であり；

ここで、前記ハイブリダイズポリヌクレオチド構築物が、前記ガイド鎖中の少なくとも1つの生物不可逆的基を含み、または前記ハイブリダイズポリヌクレオチド構築物が、-S-S-(リンクA)-Bおよび少なくとも1つの生物不可逆的基を含むハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

【請求項4】

少なくとも1つのジスルフィド生物可逆的基を含み、前記ジスルフィド生物可逆的基が、以下の構造：

$(R^1)_q - (\text{リンクC}) - S - S - (\text{リンクA}) - B$
を有し、式中、

各qが、独立して、1~10の整数であり；

各リンクCが、独立して、結合または12Da~10000Daの分子量を有する多価リンカーであり；

各 R^1 が、独立して、H、アジド、ポリペプチド、炭水化物、中性有機ポリマー、正電ポリマー、治療剤、標的化部分、またはエンドソームエスケープ部分である、請求項2または3に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

【請求項5】

第2のパッセンジャー鎖または第2のガイド鎖をさらに含み、リンクCが、前記第2のパッセンジャー鎖または前記第2のガイド鎖の-S-S-(リンクA)-Bにさらに結合された多価リンカーである、請求項4に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

【請求項6】

リンクCが、1つまたは複数のモノマーを含み、前記モノマーのそれぞれが、独立して、任意選択的に置換される $C_1 \sim 6$ アルキレン；任意選択的に置換される $C_2 \sim 6$ アルケニレン；任意選択的に置換される $C_2 \sim 6$ アルキニレン；任意選択的に置換される $C_3 \sim 8$ シクロアルキレン；任意選択的に置換される $C_3 \sim 8$ シクロアルケニレン；任意選択的に置換される $C_6 \sim 14$ アリーレン；N、O、およびSから選択される1~4個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される $C_1 \sim 9$ ヘテロアリーレン；N、O、およびSから選択される1~4個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される $C_1 \sim 9$ ヘテロシクリレン；イミノ；任意選択的に置換されるN；O；または $S(O)_m$ （ここで、mが、0、1、または2である）である、請求項4または5に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

【請求項7】

リンクCが、1つまたは複数のモノマーを含み、前記モノマーのそれぞれが、独立して、任意選択的に置換される $C_1 \sim 6$ アルキレン；任意選択的に置換される $C_3 \sim 8$ シクロアルキレン；任意選択的に置換される $C_3 \sim 8$ シクロアルケニレン；任意選択的に置換される $C_6 \sim 14$ アリーレン；N、O、およびSから選択される1~4個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される $C_1 \sim 9$ ヘテロアリーレン；N、O、およびSから選択される1~4個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される $C_1 \sim 9$ ヘテロシクリレン；イミノ；任意選択的に置換されるN；O；または $S(O)_m$ （ここで、mが、0、1、または2である）である、請求項6に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

【請求項8】

リンクCが、1つまたは複数のモノマーを含み、前記モノマーのそれぞれが、独立して、任意選択的に置換される $C_1 \sim 6$ アルキレン；任意選択的に置換される $C_3 \sim 8$ シクロアルキレン；任意選択的に置換される $C_3 \sim 8$ シクロアルケニレン；任意選択的に置換される $C_6 \sim 14$ アリーレン；N、O、およびSから選択される1~4個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される $C_1 \sim 9$ ヘテロアリーレン；N、O、およびSから選択される1~4個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される $C_1 \sim 9$ ヘテロシクリレン；任意選択的に置換されるN；O；または $S(O)_m$ （ここで、mが、0、1、または2であ

10

20

30

40

50

る)である、請求項 7 に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

【請求項 9】

リンク C が、1～500 の前記モノマーを含む、請求項 4～8 のいずれか一項に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

【請求項 10】

リンク C が、1～300 の前記モノマーを含む、請求項 9 に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

【請求項 11】

リンク C が、1つまたは複数の $C_1 \sim 6$ アルキレンオキシ基を含む、請求項 4～10 のいずれか一項に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

10

【請求項 12】

リンク C が、100 個未満の $C_1 \sim 6$ アルキレンオキシ基を含む、請求項 11 に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

【請求項 13】

リンク C が、1つまたは複数のポリ（アルキレンオキシド）を含む、請求項 4～12 のいずれか一項に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

【請求項 14】

前記ポリ（アルキレンオキシド）が、ポリエチレンオキシド、ポリプロピレンオキシド、ポリ（トリメチレンオキシド）、ポリブチレンオキシド、ポリ（テトラメチレンオキシド）、およびそのジブロックまたはトリブロックコポリマーから選択される、請求項 13

20

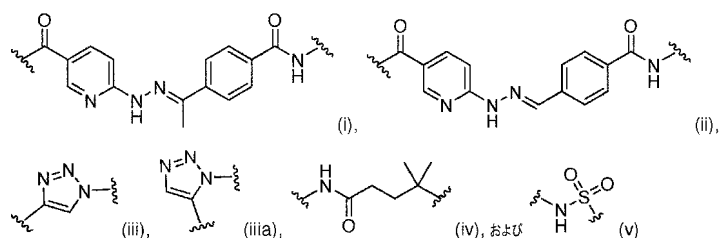
【請求項 15】

前記ポリ（アルキレンオキシド）が、ポリエチレンオキシドである、請求項 13 または 14 に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

【請求項 16】

リンク C が、

【化 1】



30

、およびその組合せからなる群から独立して選択される 1つまたは複数の基を含む、請求項 4～15 のいずれか一項に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

【請求項 17】

第 2 のパッセンジャー鎖または第 2 のガイド鎖をさらに含み、前記パッセンジャー鎖が、前記生物不可逆的基によって前記第 2 のパッセンジャー鎖に連結され、または前記ガイド鎖が、前記生物不可逆的基によって前記第 2 のガイド鎖に連結される、請求項 2～16

40

【請求項 18】

少なくとも 1つのジスルフィド生物可逆的基を含み、リンク A が、任意選択的に置換される $C_1 \sim 6$ アルキレン；任意選択的に置換される $C_2 \sim 6$ アルケニレン；任意選択的に置換される $C_2 \sim 6$ アルキニレン；任意選択的に置換される $C_3 \sim 8$ シクロアルキレン；任意選択的に置換される $C_3 \sim 8$ シクロアルケニレン；任意選択的に置換される $C_6 \sim 14$ アリーレン；N、O、および S から選択される 1～4 個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される $C_1 \sim 9$ ヘテロアリーレン；N、O、および S から選択される 1～4 個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される $C_1 \sim 9$ ヘテロシクリレン；任意選択的に置換される N；O；または S (O)_m（ここで、各 m が、独立して、0、1、または 2 であ

50

る) からなる群から独立して選択される 1 つ、2 つ、または 3 つのモノマーを含む、請求項 2 ～ 17 のいずれか一項に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

【請求項 19】

リンク A が、任意選択的に置換される $C_1 \sim 6$ アルキレン；任意選択的に置換される $C_2 \sim 6$ アルケニレン；任意選択的に置換される $C_3 \sim 8$ シクロアルキレン；任意選択的に置換される $C_3 \sim 8$ シクロアルケニレン；任意選択的に置換される $C_6 \sim 14$ アリーレン；N、O、および S から選択される 1 ～ 4 個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される $C_1 \sim 9$ ヘテロアリーレン；N、O、および S から選択される 1 ～ 4 個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される $C_1 \sim 9$ ヘテロシクリレン；任意選択的に置換される N；O；または $S(O)_m$ (ここで、各 m が、独立して、0、1、または 2 である) からなる群から独立して選択される 1 つ、2 つ、または 3 つのモノマーを含む、請求項 18 に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

10

【請求項 20】

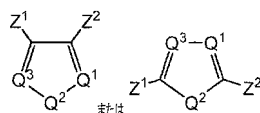
リンク A が、任意選択的に置換される $C_1 \sim 6$ アルキレン；任意選択的に置換される $C_6 \sim 14$ アリーレン；N、O、および S から選択される 1 ～ 4 個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される $C_1 \sim 9$ ヘテロアリーレン；または O からなる群から独立して選択される 1 つ、2 つ、または 3 つのモノマーを含む、請求項 19 に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

【請求項 21】

リンク A が、2 つまたは 3 つのモノマーを含み、前記モノマーのうちの 1 つが、構造：

20

【化 2】



を有し、

式中、

Z^1 が $-S-S-$ への結合であり；

Z^2 が、リンク A の別のモノマーへの結合であり；

Q^1 が、N または CR^2 であり；

30

Q^2 が、O、S、 NR^3 、または $-C(R^5)=C(R^6)-$ であり；

Q^3 が、 R^4 に結合される N または C であり；

R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、および R^6 のそれぞれが、独立して、H、 $C_2 \sim 7$ アルカノイル； $C_1 \sim 6$ アルキル； $C_2 \sim 6$ アルケニル； $C_2 \sim 6$ アルキニル； $C_1 \sim 6$ アルキルスルフィニル； $C_6 \sim 10$ アリール；アミノ；($C_6 \sim 10$ アリール) $-C_1 \sim 4$ -アルキル； $C_3 \sim 8$ シクロアルキル；($C_3 \sim 8$ シクロアルキル) $-C_1 \sim 4$ -アルキル； $C_3 \sim 8$ シクロアルケニル；($C_3 \sim 8$ シクロアルケニル) $-C_1 \sim 4$ -アルキル；ハロ； $C_1 \sim 9$ ヘテロシクリル； $C_1 \sim 9$ ヘテロアリール；($C_1 \sim 9$ ヘテロシクリル) オキシ；($C_1 \sim 9$ ヘテロシクリル) アザ；ヒドロキシ； $C_1 \sim 6$ チオアルコキシ； $-(CH_2)_q CO_2 R^A$ (ここで、 q が、0 ～ 4 の整数であり、 R^A が、 $C_1 \sim 6$ アルキル、 $C_6 \sim 10$ アリール、および ($C_6 \sim 10$ アリール) $-C_1 \sim 4$ -アルキルからなる群から選択される)； $-(CH_2)_q CONR^B R^C$ (ここで、 q が、0 ～ 4 の整数であり、 R^B および R^C が、独立して、水素、 $C_1 \sim 6$ アルキル、 $C_6 \sim 10$ アリール、および ($C_6 \sim 10$ アリール) $-C_1 \sim 4$ -アルキルからなる群から選択される)； $-(CH_2)_q SO_2 R^D$ (ここで、 q が、0 ～ 4 の整数であり、 R^D が、 $C_1 \sim 6$ アルキル、 $C_6 \sim 10$ アリール、および ($C_6 \sim 10$ アリール) $-C_1 \sim 4$ -アルキルからなる群から選択される)； $-(CH_2)_q SO_2 NR^E R^F$ (ここで、 q が、0 ～ 4 の整数であり、 R^E および R^F のそれぞれが、独立して、水素、アルキル、アリール、および ($C_6 \sim 10$ アリール) $-C_1 \sim 4$ -アルキルからなる群から選択される)；チオール；アリールオキシ；シクロアルコキシ；アリールアルコキシ；($C_1 \sim 9$ ヘテロシクリル) $-C_1 \sim 4$ -アルキ

40

50

ル；(C₁～₉ヘテロアリール)－C₁～₄－アルキル；C₃～₁₂シリル；シアノ；または－S(O)R^H(ここで、R^Hが、水素、C₁～₆アルキル、C₆～₁₀アリール、および(C₆～₁₀アリール)－C₁～₄－アルキルからなる群から選択される)であり；またはR⁵およびR⁶が、それぞれが結合される前記原子と一緒に、結合して、C₆アリール、C₂～₇ヘテロアリール、およびC₂～₇ヘテロシクリルからなる群から選択される環式基を形成し、ここで、前記環式基が、C₂～₇アルカノイル；C₁～₆アルキル；C₂～₆アルケニル；C₂～₆アルキニル；C₁～₆アルキルスルフィニル；C₆～₁₀アリール；アミノ；(C₆～₁₀アリール)－C₁～₄－アルキル；C₃～₈シクロアルキル；(C₃～₈シクロアルキル)－C₁～₄－アルキル；C₃～₈シクロアルケニル；(C₃～₈シクロアルケニル)－C₁～₄－アルキル；ハロ；C₁～₉ヘテロシクリル；C₁～₉ヘテロアリール；(C₁～₉ヘテロシクリル)オキシ；(C₁～₉ヘテロシクリル)アザ；ヒドロキシ；C₁～₆チオアルコキシ；－(CH₂)_qCO₂R^A(ここで、qが、0～4の整数であり、R^Aが、C₁～₆アルキル、C₆～₁₀アリール、および(C₆～₁₀アリール)－C₁～₄－アルキルからなる群から選択される)；－(CH₂)_qCONR^BR^C(ここで、qが、0～4の整数であり、R^BおよびR^Cが、独立して、水素、C₁～₆アルキル、C₆～₁₀アリール、および(C₆～₁₀アリール)－C₁～₄－アルキルからなる群から選択される)；－(CH₂)_qSO₂R^D(ここで、qが、0～4の整数であり、R^Dが、C₁～₆アルキル、C₆～₁₀アリール、および(C₆～₁₀アリール)－C₁～₄－アルキルからなる群から選択される)；－(CH₂)_qSO₂NR^ER^F(ここで、qが、0～4の整数であり、R^EおよびR^Fのそれぞれが、独立して、水素、アルキル、アリール、および(C₆～₁₀アリール)－C₁～₄－アルキルからなる群から選択される)；チオール；アリールオキシ；シクロアルコキシ；アリールアルコキシ；(C₁～₉ヘテロシクリル)－C₁～₄－アルキル；(C₁～₉ヘテロアリール)－C₁～₄－アルキル；C₃～₁₂シリル；シアノ；および－S(O)R^H(ここで、R^Hが、水素、C₁～₆アルキル、C₆～₁₀アリール、および(C₆～₁₀アリール)－C₁～₄－アルキルからなる群から選択される)からなる群から選択される1つ、2つ、または3つの置換基で任意選択的に置換される、請求項20に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

10

20

【請求項22】

Q¹がCR²である、請求項21に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

30

【請求項23】

R²が、H、ハロ、またはC₁～₆アルキルである、請求項21または22に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

【請求項24】

Q²が、Oまたは－C(R⁵)＝C(R⁶)－である、請求項21～23のいずれか一項に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

【請求項25】

Q²が、－C(R⁵)＝C(R⁶)－である、請求項21～24のいずれか一項に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

【請求項26】

R⁵が、H、ハロ、またはC₁～₆アルキルである、請求項21～25のいずれか一項に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

40

【請求項27】

R⁶が、H、ハロ、またはC₁～₆アルキルである、請求項21～26のいずれか一項に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

【請求項28】

R⁵およびR⁶が、それぞれが結合される前記原子と一緒に、結合して、C₂～₇アルカノイル；C₁～₆アルキル；C₂～₆アルケニル；C₂～₆アルキニル；C₁～₆アルキルスルフィニル；C₆～₁₀アリール；アミノ；(C₆～₁₀アリール)－C₁～₄－アルキル；C₃～₈シクロアルキル；(C₃～₈シクロアルキル)－C₁～₄－アルキル

50

； $C_3 \sim 8$ シクロアルケニル； $(C_3 \sim 8 \text{ シクロアルケニル}) - C_1 \sim 4$ - アルキル；ハロ； $C_1 \sim 9$ ヘテロシクリル； $C_1 \sim 9$ ヘテロアリール； $(C_1 \sim 9 \text{ ヘテロシクリル})$ オキシ； $(C_1 \sim 9 \text{ ヘテロシクリル})$ アザ；ヒドロキシ； $C_1 \sim 6$ チオアルコキシ； $-(CH_2)_q CO_2 R^A$ （ここで、 q が、0～4 の整数であり、 R^A が、 $C_1 \sim 6$ アルキル、 $C_6 \sim 10$ アリール、および $(C_6 \sim 10 \text{ アリール}) - C_1 \sim 4$ - アルキルからなる群から選択される）； $-(CH_2)_q CONR^B R^C$ （ここで、 q が、0～4 の整数であり、 R^B および R^C が、独立して、水素、 $C_1 \sim 6$ アルキル、 $C_6 \sim 10$ アリール、および $(C_6 \sim 10 \text{ アリール}) - C_1 \sim 4$ - アルキルからなる群から選択される）； $-(CH_2)_q SO_2 R^D$ （ここで、 q が、0～4 の整数であり、 R^D が、 $C_1 \sim 6$ アルキル、 $C_6 \sim 10$ アリール、および $(C_6 \sim 10 \text{ アリール}) - C_1 \sim 4$ - アルキルからなる群から選択される）； $-(CH_2)_q SO_2 NR^E R^F$ （ここで、 q が、0～4 の整数であり、 R^E および R^F のそれぞれが、独立して、水素、アルキル、アリール、および $(C_6 \sim 10 \text{ アリール}) - C_1 \sim 4$ - アルキルからなる群から選択される）；チオール；アリールオキシ；シクロアルコキシ；アリールアルコキシ； $(C_1 \sim 9 \text{ ヘテロシクリル}) - C_1 \sim 4$ - アルキル； $(C_1 \sim 9 \text{ ヘテロアリール}) - C_1 \sim 4$ - アルキル； $C_3 \sim 12$ シリル；シアノ；および $-S(O)R^H$ （ここで、 R^H が、水素、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_6 \sim 10$ アリール、および $(C_6 \sim 10 \text{ アリール}) - C_1 \sim 4$ - アルキルからなる群から選択される）からなる群から選択される 1 つ、2 つ、または 3 つの置換基で任意選択的に置換される $C_2 \sim 5$ ヘテロアリールを形成する、請求項 21～27 のいずれか一項に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

10

20

【請求項 29】

前記 $C_2 \sim 5$ ヘテロアリールが、2 個の窒素原子を含む、請求項 28 に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

【請求項 30】

前記 $C_2 \sim 5$ ヘテロアリールが、 $C_1 \sim 6$ アルキルで置換される、請求項 28 または 29 に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

【請求項 31】

Q^2 が O である、請求項 28～30 のいずれか一項に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

【請求項 32】

Q^3 が CR^4 である、請求項 28～31 のいずれか一項に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

30

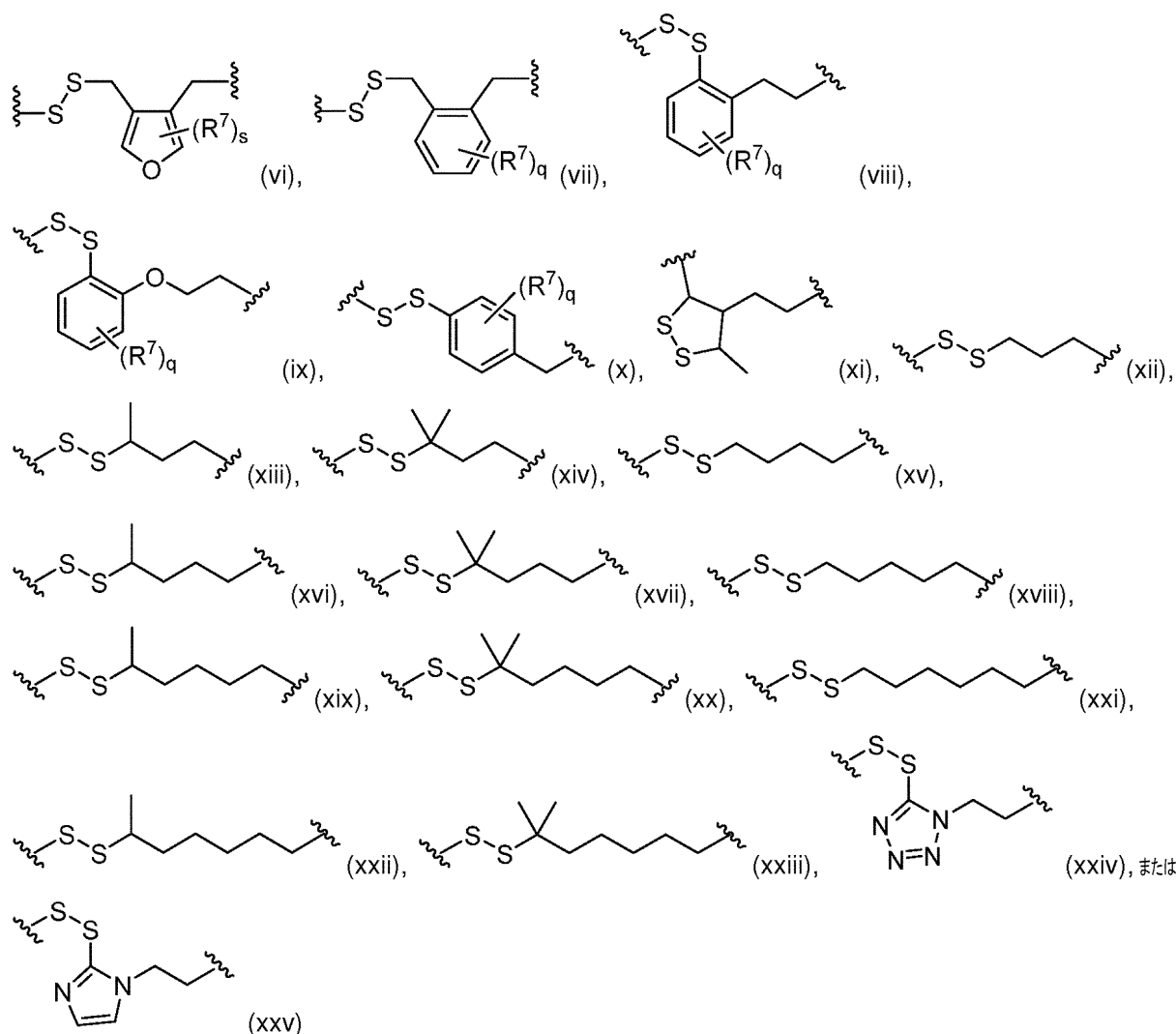
【請求項 33】

R^4 が、H、ハロ、または $C_1 \sim 6$ アルキルである、請求項 28～32 のいずれか一項に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

【請求項 34】

少なくとも 1 つのジスルフィド生物可逆的基を含み、リンク A および $-S-S-$ が結合して、構造：

【化 3】



10

20

30

40

50

を形成し、
式中、

各 R^7 が、独立して、 $C_2 \sim 7$ アルカノイル； $C_1 \sim 6$ アルキル； $C_2 \sim 6$ アルケニル； $C_2 \sim 6$ アルキニル； $C_1 \sim 6$ アルキルスルフィニル； $C_6 \sim 10$ アリール；アミノ；
 $(C_6 \sim 10 \text{ アリール}) - C_1 \sim 4 - \text{アルキル}$ ； $C_3 \sim 8$ シクロアルキル； $(C_3 \sim 8 \text{ シクロアルキル}) - C_1 \sim 4 - \text{アルキル}$ ； $C_3 \sim 8$ シクロアルケニル； $(C_3 \sim 8 \text{ シクロアルケニル}) - C_1 \sim 4 - \text{アルキル}$ ；ハロ； $C_1 \sim 9$ ヘテロシクリル； $C_1 \sim 9$ ヘテロアリール； $(C_1 \sim 9 \text{ ヘテロシクリル})$ オキシ； $(C_1 \sim 9 \text{ ヘテロシクリル})$ アザ；ヒドロキシ； $C_1 \sim 6$ チオアルコキシ； $-(CH_2)_q CO_2 R^A$ （ここで、 q が、0～4 の整数であり、 R^A が、 $C_1 \sim 6$ アルキル、 $C_6 \sim 10$ アリール、および $(C_6 \sim 10 \text{ アリール}) - C_1 \sim 4 - \text{アルキル}$ からなる群から選択される）； $-(CH_2)_q CONR^B R^C$ （ここで、 q が、0～4 の整数であり、 R^B および R^C が、独立して、水素、 $C_1 \sim 6$ アルキル、 $C_6 \sim 10$ アリール、および $(C_6 \sim 10 \text{ アリール}) - C_1 \sim 4 - \text{アルキル}$ からなる群から選択される）； $-(CH_2)_q SO_2 R^D$ （ここで、 q が、0～4 の整数であり、 R^D が、 $C_1 \sim 6$ アルキル、 $C_6 \sim 10$ アリール、および $(C_6 \sim 10 \text{ アリール}) - C_1 \sim 4 - \text{アルキル}$ からなる群から選択される）； $-(CH_2)_q SO_2 NR^E R^F$ （ここで、 q が、0～4 の整数であり、 R^E および R^F のそれぞれが、独立して、水素、アルキル、アリール、および $(C_6 \sim 10 \text{ アリール}) - C_1 \sim 4 - \text{アルキル}$ からなる群から選択される）；チオール；アリールオキシ；シクロアルコキシ；アリールアルコキシ； $(C_1 \sim 9 \text{ ヘテロシクリル}) - C_1 \sim 4 - \text{アルキル}$ ； $(C_1 \sim 9 \text{ ヘテロアリール}) - C_1 \sim 4 - \text{アルキル}$ ； $C_3 \sim 12$ シリル；シアノ；または $-S(O)R^H$ （ここで、 R^H が、水素、

$C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_6 \sim 10$ アリール、および ($C_6 \sim 10$ アリール) - $C_1 \sim 4$ - アルキルからなる群から選択される) であり; または 2 つの隣接する R^7 基が、各前記 R^7 が結合される前記原子と一緒に、結合して、 C_6 アリール、 $C_2 \sim 5$ ヘテロシクリル、または $C_2 \sim 5$ ヘテロアリールからなる群から選択される環式基を形成し、ここで、前記環式基が、 $C_2 \sim 7$ アルカノイル; $C_1 \sim 6$ アルキル; $C_2 \sim 6$ アルケニル; $C_2 \sim 6$ アルキニル; $C_1 \sim 6$ アルキルスルフィニル; $C_6 \sim 10$ アリール; アミノ; ($C_6 \sim 10$ アリール) - $C_1 \sim 4$ - アルキル; $C_3 \sim 8$ シクロアルキル; ($C_3 \sim 8$ シクロアルキル) - $C_1 \sim 4$ - アルキル; $C_3 \sim 8$ シクロアルケニル; ($C_3 \sim 8$ シクロアルケニル) - $C_1 \sim 4$ - アルキル; ハロ; $C_1 \sim 9$ ヘテロシクリル; $C_1 \sim 9$ ヘテロアリール; ($C_1 \sim 9$ ヘテロシクリル) オキシ; ($C_1 \sim 9$ ヘテロシクリル) アザ; ヒドロキシ; $C_1 \sim 6$ チオアルコキシ; - (CH_2)_q $CO_2 R^A$ (ここで、 q が、0 ~ 4 の整数であり、 R^A が、 $C_1 \sim 6$ アルキル、 $C_6 \sim 10$ アリール、および ($C_6 \sim 10$ アリール) - $C_1 \sim 4$ - アルキルからなる群から選択される); - (CH_2)_q $CONR^B R^C$ (ここで、 q が、0 ~ 4 の整数であり、 R^B および R^C が、独立して、水素、 $C_1 \sim 6$ アルキル、 $C_6 \sim 10$ アリール、および ($C_6 \sim 10$ アリール) - $C_1 \sim 4$ - アルキルからなる群から選択される); - (CH_2)_q $SO_2 R^D$ (ここで、 q が、0 ~ 4 の整数であり、 R^D が、 $C_1 \sim 6$ アルキル、 $C_6 \sim 10$ アリール、および ($C_6 \sim 10$ アリール) - $C_1 \sim 4$ - アルキルからなる群から選択される); - (CH_2)_q $SO_2 NR^E R^F$ (ここで、 q が、0 ~ 4 の整数であり、 R^E および R^F のそれぞれが、独立して、水素、アルキル、アリール、および ($C_6 \sim 10$ アリール) - $C_1 \sim 4$ - アルキルからなる群から選択される); チオール; アリールオキシ; シクロアルコキシ; アリールアルコキシ; ($C_1 \sim 9$ ヘテロシクリル) - $C_1 \sim 4$ - アルキル; ($C_1 \sim 9$ ヘテロアリール) - $C_1 \sim 4$ - アルキル; $C_3 \sim 12$ シリル; シアノ; および - $S(O) R^H$ (ここで、 R^H が、水素、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_6 \sim 10$ アリール、および ($C_6 \sim 10$ アリール) - $C_1 \sim 4$ - アルキルからなる群から選択される) からなる群から選択される 1 つ、2 つ、または 3 つの置換基で任意選択的に置換され;

q が、0、1、2、3、または 4 であり;

s が、0、1、または 2 である、請求項 2 ~ 20 のいずれか一項に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

【請求項 35】

R^7 が、ハロまたは任意選択的に置換される $C_1 \sim 6$ アルキルである、請求項 34 に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

【請求項 36】

リンク A および - $S-S$ - が結合して、式 (v i) の構造を形成し、 s が、0 または 1 である、請求項 34 または 35 に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

【請求項 37】

s が 0 である、請求項 36 に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

【請求項 38】

リンク A および - $S-S$ - が結合して、式 (v i i)、(v i i i)、(i x)、または (x) の構造を形成し、 q が、0、1、または 2 である、請求項 34 ~ 37 のいずれか一項に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

【請求項 39】

q が、0 または 1 である、請求項 38 に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

【請求項 40】

2 つの隣接する R^7 基が、各前記 R^7 が結合される前記原子と一緒に、結合して、1 つ、2 つ、または 3 つの $C_1 \sim 6$ アルキル基で任意選択的に置換される $C_2 \sim 5$ ヘテロアリールを形成する、請求項 39 に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

【請求項 41】

リンク A および - $S-S$ - が結合して、構造:

10

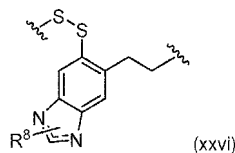
20

30

40

50

【化 4】



を形成し、

点線が、ただ 1 つの二重結合を表し、

R^8 が、空の原子価を有する前記窒素原子に結合され、H、 $C_2 \sim 7$ アルカノイル； $C_1 \sim 6$ アルキル； $C_2 \sim 6$ アルケニル； $C_2 \sim 6$ アルキニル； $C_1 \sim 6$ アルキルスルフィ
 ニル； $C_6 \sim 10$ アリール；アミノ；($C_6 \sim 10$ アリール) - $C_1 \sim 4$ - アルキル； $C_3 \sim 8$ シクロアルキル；($C_3 \sim 8$ シクロアルキル) - $C_1 \sim 4$ - アルキル； $C_3 \sim 8$ シ
 クロアルケニル；($C_3 \sim 8$ シクロアルケニル) - $C_1 \sim 4$ - アルキル；ハロ； $C_1 \sim 9$
 ヘテロシクリル； $C_1 \sim 9$ ヘテロアリール；($C_1 \sim 9$ ヘテロシクリル) オキシ；(C_1
 ~ 9 ヘテロシクリル) アザ；ヒドロキシ； $C_1 \sim 6$ チオアルコキシ；- (CH_2)_q CO
 $2 R^A$ (ここで、q が、0～4 の整数であり、 R^A が、 $C_1 \sim 6$ アルキル、 $C_6 \sim 10$ ア
 リール、および ($C_6 \sim 10$ アリール) - $C_1 \sim 4$ - アルキルからなる群から選択される
)；- (CH_2)_q $CONR^B R^C$ (ここで、q が、0～4 の整数であり、 R^B および R^C
 C が、独立して、水素、 $C_1 \sim 6$ アルキル、 $C_6 \sim 10$ アリール、および ($C_6 \sim 10$ ア
 リール) - $C_1 \sim 4$ - アルキルからなる群から選択される)；- (CH_2)_q $SO_2 R^D$
 D (ここで、q が、0～4 の整数であり、 R^D が、 $C_1 \sim 6$ アルキル、 $C_6 \sim 10$ アリール
 、および ($C_6 \sim 10$ アリール) - $C_1 \sim 4$ - アルキルからなる群から選択される)；-
 (CH_2)_q $SO_2 NR^E R^F$ (ここで、q が、0～4 の整数であり、 R^E および R^F の
 それぞれが、独立して、水素、アルキル、アリール、および ($C_6 \sim 10$ アリール) - C_1
 ~ 4 - アルキルからなる群から選択される)；チオール；アリールオキシ；シクロアル
 コキシ；アリールアルコキシ；($C_1 \sim 9$ ヘテロシクリル) - $C_1 \sim 4$ - アルキル；(C_1
 ~ 9 ヘテロアリール) - $C_1 \sim 4$ - アルキル； $C_3 \sim 12$ シリル；シアノ；または - S
 (O) R^H (ここで、 R^H が、水素、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_6 \sim 10$ アリール、および
 ($C_6 \sim 10$ アリール) - $C_1 \sim 4$ - アルキルからなる群から選択される)である、請求
 項 21 に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

【請求項 42】

R^8 が、H または $C_1 \sim 6$ アルキルである、請求項 41 に記載のハイブリダイズポリヌ
 クレオチド構築物。

【請求項 43】

少なくとも 1 つのジスルフィド生物可逆的基を含み、前記少なくとも 1 つのジスルフィ
 ド生物可逆的基が、1 つまたは複数のモノマーを含み、前記モノマーのそれぞれが、独立
 して、任意選択的に置換される $C_1 \sim 6$ アルキレン；任意選択的に置換される $C_2 \sim 6$ ア
 ルケニレン；任意選択的に置換される $C_2 \sim 6$ アルキニレン；任意選択的に置換される $C_3 \sim 8$ シクロアルキレン；任意選択的に置換される $C_3 \sim 8$ シクロアルケニレン；任意選
 択的に置換される $C_6 \sim 14$ アリーレン；N、O、および S から選択される 1～4 個のヘ
 テロ原子を有する任意選択的に置換される $C_1 \sim 9$ ヘテロアリーレン；N、O、および S
 から選択される 1～4 個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される $C_1 \sim 9$ ヘテロシ
 クリレン；イミノ；任意選択的に置換される N；O；または $S(O)_m$ (ここで、m が、
 0、1、または 2 である) である、請求項 1～42 のいずれか一項に記載のハイブリダイ
 ズポリヌクレオチド構築物。

【請求項 44】

前記少なくとも 1 つのジスルフィド生物可逆的基が、1 つまたは複数のモノマーを含み
 、前記モノマーのそれぞれが、独立して、任意選択的に置換される $C_1 \sim 6$ アルキレン；
 任意選択的に置換される $C_3 \sim 8$ シクロアルキレン；任意選択的に置換される $C_3 \sim 8$ シ
 クロアルケニレン；任意選択的に置換される $C_6 \sim 14$ アリーレン；N、O、および S か

ら選択される1～4個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される $C_1 \sim 9$ ヘテロアリーレン；N、O、およびSから選択される1～4個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される $C_1 \sim 9$ ヘテロシクリレン；イミノ；任意選択的に置換されるN；O；または $S(O)_m$ （ここで、mが、0、1、または2である）である、請求項44に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

【請求項45】

前記少なくとも1つのジスルフィド生物可逆的基が、1つまたは複数のモノマーを含み、前記モノマーのそれぞれが、独立して、任意選択的に置換される $C_1 \sim 6$ アルキレン；任意選択的に置換される $C_3 \sim 8$ シクロアルキレン；任意選択的に置換される $C_3 \sim 8$ シクロアルケニレン；任意選択的に置換される $C_6 \sim 14$ アリーレン；N、O、およびSから選択される1～4個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される $C_1 \sim 9$ ヘテロアリーレン；N、O、およびSから選択される1～4個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される $C_1 \sim 9$ ヘテロシクリレン；任意選択的に置換されるN；O；または $S(O)_m$ （ここで、mが、0、1、または2である）である、請求項45に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

10

【請求項46】

前記モノマーの少なくとも1つが $S(O)_m$ であり、mが2である、請求項43～45のいずれか一項に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

【請求項47】

前記生物可逆的基が、2～500の前記モノマーを含む、請求項43～46のいずれか一項に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

20

【請求項48】

前記少なくとも1つのジスルフィド生物可逆的基が、2～300の前記モノマーを含む、請求項47に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

【請求項49】

前記少なくとも1つのジスルフィド生物可逆的基が、2～200の前記モノマーを含む、請求項48に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

【請求項50】

前記少なくとも1つのジスルフィド生物可逆的基が、1つまたは複数の $C_1 \sim 6$ アルキレンオキシ基を含む、請求項43～49のいずれか一項に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

30

【請求項51】

前記少なくとも1つのジスルフィド生物可逆的基が、100個未満の $C_1 \sim 6$ アルキレンオキシ基を含む、請求項50に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

【請求項52】

前記少なくとも1つのジスルフィド生物可逆的基が、1つまたは複数のポリ（アルキレンオキシド）を含む、請求項43～51のいずれか一項に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

【請求項53】

前記ポリ（アルキレンオキシド）が、ポリエチレンオキシド、ポリプロピレンオキシド、ポリ（トリメチレンオキシド）、ポリブチレンオキシド、ポリ（テトラメチレンオキシド）、およびそのジブロックまたはトリブロックコポリマーから選択される、請求項52に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

40

【請求項54】

前記ポリ（アルキレンオキシド）が、ポリエチレンオキシドである、請求項52または53に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

【請求項55】

前記生物不可逆的基の少なくとも1つが、炭水化物を含む、請求項1～54のいずれか一項に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

【請求項56】

50

前記炭水化物が、マンノース、N-アセチルガラクトサミン、またはD-グルシトールである、請求項55に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

【請求項57】

前記生物不可逆的基の少なくとも1つが、標的化部分を含む、請求項1～56のいずれか一項に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

【請求項58】

前記標的化部分が、葉酸塩リガンド、前立腺特異的膜抗原（PSMA）、小胞体標的化基、またはアルブミン結合基である、請求項57に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

【請求項59】

前記生物不可逆的基の少なくとも1つが、ポリペプチドを含む、請求項1～58のいずれか一項に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

【請求項60】

前記ポリペプチドが、細胞透過性ペプチドまたはエンドソームエスケープ部分である、請求項59に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

【請求項61】

少なくとも1つの生物可逆的基を含み、前記生物可逆的基の少なくとも1つが、炭水化物を含む、請求項1～62のいずれか一項に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

【請求項62】

前記炭水化物が、マンノース、N-アセチルガラクトサミン、またはD-グルシトールである、請求項61に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

【請求項63】

少なくとも1つの生物可逆的基を含み、前記生物可逆的基の少なくとも1つが、標的化部分を含む、請求項1～62のいずれか一項に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

【請求項64】

前記標的化部分が、葉酸塩リガンド、前立腺特異的膜抗原（PSMA）、小胞体標的化基、またはアルブミン結合基である、請求項63に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

【請求項65】

少なくとも1つの前記生物可逆的基が、ポリペプチドを含む、請求項1～64のいずれか一項に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

【請求項66】

前記ポリペプチドが、細胞透過性ペプチドまたはエンドソームエスケープ部分である、請求項65に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

【請求項67】

前記ガイド鎖が、前記生物不可逆的基を含む、請求項1～66のいずれか一項に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

【請求項68】

1つの前記生物不可逆的基が、前記ガイド鎖の第2のヌクレオシドおよび第3のヌクレオシドを連結する、請求項77に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

【請求項69】

1つの前記生物不可逆的基が、前記ガイド鎖の第5のヌクレオシドおよび第6のヌクレオシドを連結する、請求項67または68に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

【請求項70】

1つの前記生物不可逆的基が、前記ガイド鎖の第17のヌクレオシドおよび第18のヌクレオシドを連結する、請求項67～69のいずれか一項に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

10

20

30

40

50

【請求項 7 1】

前記ガイド鎖が、1～5つの前記生物不可逆的基を含む、請求項 6 7～7 0 のいずれか一項に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

【請求項 7 2】

前記ガイド鎖が、1つの前記生物不可逆的基を含む、請求項 7 1 に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

【請求項 7 3】

前記パッセンジャー鎖が、少なくとも1つの前記生物不可逆的基を含む、請求項 1～7 2 のいずれか一項に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

【請求項 7 4】

前記生物不可逆的基が、前記パッセンジャー鎖の2つのヌクレオシドを連結し、前記ヌクレオシドが、5'方向において天然RISCを介した切断部位から離れて少なくとも1つのヌクレオシドに配置される、請求項 7 3 に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

【請求項 7 5】

前記生物不可逆的基が、前記パッセンジャー鎖の第1および第2のヌクレオシドを連結する、請求項 7 4 に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

【請求項 7 6】

前記ガイド鎖が、少なくとも1つのジスルフィド生物可逆的基を含む、請求項 1～7 5 のいずれか一項に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

【請求項 7 7】

前記ジスルフィド生物可逆的基が、前記ガイド鎖の3つの5'末端ヌクレオシドから選択される2つの連続ヌクレオシドを連結する、請求項 7 6 に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

【請求項 7 8】

前記ジスルフィド生物可逆的基が、前記ガイド鎖の3つの3'末端ヌクレオシドから選択される2つの連続ヌクレオシドを連結する、請求項 7 6 または 7 7 に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

【請求項 7 9】

前記パッセンジャー鎖が、少なくとも1つのジスルフィド生物可逆的基を含む、請求項 1～7 8 のいずれか一項に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

【請求項 8 0】

前記ジスルフィド生物可逆的基が、前記パッセンジャー鎖の3つの5'末端ヌクレオシドから選択される2つの連続ヌクレオシドを連結する、請求項 7 9 に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

【請求項 8 1】

前記ジスルフィド生物可逆的基が、前記パッセンジャー鎖の3つの3'末端ヌクレオシドから選択される2つの連続ヌクレオシドを連結する、請求項 7 9 または 8 0 に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

【請求項 8 2】

前記生物不可逆的基が、前記パッセンジャー鎖の5'末端基である、請求項 1～8 1 のいずれか一項に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

【請求項 8 3】

前記生物不可逆的基が、前記ガイド鎖または前記パッセンジャー鎖の3'末端基である、請求項 1～8 2 のいずれか一項に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

【請求項 8 4】

前記生物不可逆的基が、前記ガイド鎖の3'末端基である、請求項 8 3 に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

【請求項 8 5】

前記生物不可逆的基が、前記パッセンジャー鎖の3'末端基である、請求項 8 3 または

10

20

30

40

50

84に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

【請求項86】

前記生物不可逆的基が、1つまたは複数のモノマーを含み、前記モノマーのそれぞれが、独立して、任意選択的に置換される $C_1 \sim 6$ アルキレン；任意選択的に置換される $C_2 \sim 6$ アルケニレン；任意選択的に置換される $C_2 \sim 6$ アルキニレン；任意選択的に置換される $C_3 \sim 8$ シクロアルキレン；任意選択的に置換される $C_3 \sim 8$ シクロアルケニレン；任意選択的に置換される $C_6 \sim 14$ アリーレン；N、O、およびSから選択される1～4個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される $C_1 \sim 9$ ヘテロアリーレン；N、O、およびSから選択される1～4個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される $C_1 \sim 9$ ヘテロシクリレン；任意選択的に置換されるN；O；または $S(O)_m$ （ここで、mが、0、1、または2である）である、請求項1～85のいずれか一項に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

10

【請求項87】

前記1つまたは複数のモノマーのそれぞれが、独立して、任意選択的に置換される $C_1 \sim 6$ アルキレン；任意選択的に置換される $C_2 \sim 6$ アルケニレン；任意選択的に置換される $C_3 \sim 8$ シクロアルキレン；任意選択的に置換される $C_3 \sim 8$ シクロアルケニレン；任意選択的に置換される $C_6 \sim 14$ アリーレン；N、O、およびSから選択される1～4個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される $C_1 \sim 9$ ヘテロアリーレン；N、O、およびSから選択される1～4個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される $C_1 \sim 9$ ヘテロシクリレン；任意選択的に置換されるN；O；または $S(O)_m$ （ここで、mが、0、1、または2である）である、請求項86に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

20

【請求項88】

前記1つまたは複数のモノマーのそれぞれが、独立して、任意選択的に置換される $C_1 \sim 6$ アルキレン；任意選択的に置換される $C_6 \sim 14$ アリーレン；N、O、およびSから選択される1～4個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される $C_1 \sim 9$ ヘテロアリーレン；任意選択的に置換されるN；O；または $S(O)_m$ （ここで、mが、0、1、または2である）である、請求項87に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

【請求項89】

少なくとも1つの前記モノマーが $S(O)_m$ であり、mが、0または2である、請求項86～88のいずれか一項に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

30

【請求項90】

mが2である、請求項89に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

【請求項91】

前記生物不可逆的基が、独立して、1～200の前記モノマーを含む、請求項86～90のいずれか一項に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

【請求項92】

前記生物不可逆的基が、独立して、1～150の前記モノマーを含む、請求項91に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

【請求項93】

前記生物不可逆的基が、独立して、1～100の前記モノマーを含む、請求項92に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

40

【請求項94】

前記生物不可逆的基が、独立して、1～3の前記モノマーを含む、請求項93に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

【請求項95】

前記生物不可逆的基が、独立して、1つの前記モノマーを含む、請求項94に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

【請求項96】

前記生物不可逆的基が、独立して、任意選択的に置換される $C_3 \sim 6$ アルキル；任意選

50

択的に置換される $C_3 \sim 6$ アルケニル；任意選択的に置換される $C_3 \sim 6$ アルキニル；任意選択的に置換される $C_3 \sim 8$ シクロアルキル；任意選択的に置換される $C_3 \sim 8$ シクロアルケニル；任意選択的に置換される ($C_3 \sim 8$ シクロアルキル) - $C_1 \sim 4$ - アルキル；任意選択的に置換される ($C_3 \sim 8$ シクロアルケニル) - $C_1 \sim 4$ - アルキル；任意選択的に置換される $C_6 \sim 14$ アリール；任意選択的に置換される ($C_6 \sim 14$ アリール) - $C_1 \sim 4$ - アルキル；N、O、および S から選択される 1 ～ 4 個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される $C_1 \sim 9$ ヘテロアリール；N、O から選択される 1 ～ 4 個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される ($C_1 \sim 9$ ヘテロアリール) - $C_1 \sim 4$ - アルキル；N、O、および S から選択される 1 ～ 4 個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される $C_1 \sim 9$ ヘテロシクリル（ここで、前記ヘテロシクリルは、S-S 結合を含まない）；および N、O、および S から選択される 1 ～ 4 個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される ($C_1 \sim 9$ ヘテロシクリル) - $C_1 \sim 4$ - アルキル（ここで、前記ヘテロシクリルは、S-S 結合を含まない）からなる群から独立して選択される置換基で置換されるリン酸塩またはホスホロチオエートである、請求項 1 ～ 95 のいずれか一項に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

10

【請求項 97】

前記ハイブリダイズポリヌクレオチドが、前記ジスルフィド生物可逆的基を含み、前記ジスルフィドを、ヌクレオチド間リン (V) 基、5' 末端基、または 3' 末端基に連結する原子の最も短い鎖が 3 である、請求項 1 ～ 96 のいずれか一項に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

20

【請求項 98】

前記ハイブリダイズポリヌクレオチド構築物が、前記ジスルフィド生物可逆的基を含み、前記ジスルフィドを、ヌクレオチド間リン (V) 基、5' 末端基、または 3' 末端基に連結する原子の最も長い鎖が 6 である、請求項 1 ～ 97 のいずれか一項に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

【請求項 99】

前記ハイブリダイズポリヌクレオチド構築物が、前記ジスルフィド生物可逆的基を含み、前記ジスルフィド生物可逆的基が、前記ジスルフィドに近接する少なくとも 1 つの嵩高い基を含む、請求項 1 ～ 98 のいずれか一項に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

30

【請求項 100】

前記ガイド鎖が、19 以上のヌクレオシドを含む、請求項 1 ～ 99 のいずれか一項に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

【請求項 101】

前記ガイド鎖が、100 未満のヌクレオシドを含む、請求項 1 ～ 100 のいずれか一項に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

【請求項 102】

前記ガイド鎖が、50 未満のヌクレオシドを含む、請求項 101 に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

【請求項 103】

前記ガイド鎖が、32 未満のヌクレオシドを含む、請求項 102 に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

40

【請求項 104】

前記パッセンジャー鎖が、19 以上のヌクレオシドを含む、請求項 1 ～ 103 のいずれか一項に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

【請求項 105】

前記パッセンジャー鎖が、100 未満のヌクレオシドを含む、請求項 1 ～ 104 のいずれか一項に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

【請求項 106】

前記パッセンジャー鎖が、50 未満のヌクレオシドを含む、請求項 105 に記載のハイ

50

ブリダイズポリヌクレオチド構築物。

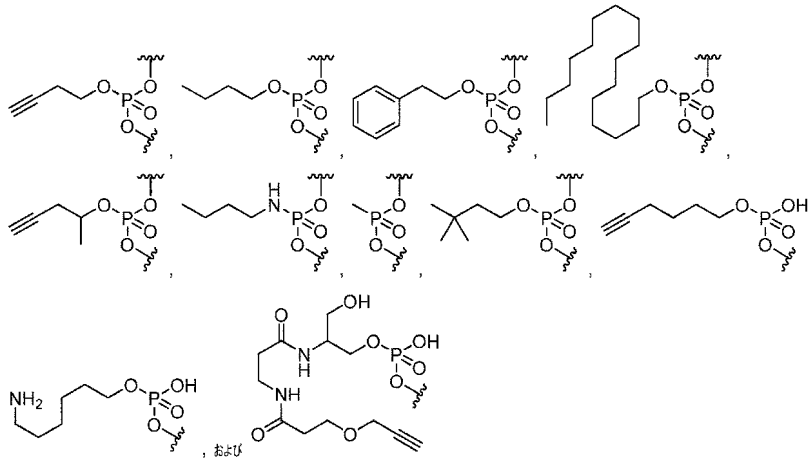
【請求項 107】

前記パッセンジャー鎖が、32未満のヌクレオシドを含む、請求項106に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

【請求項 108】

前記生物不可逆的基の少なくとも1つが、

【化5】



10

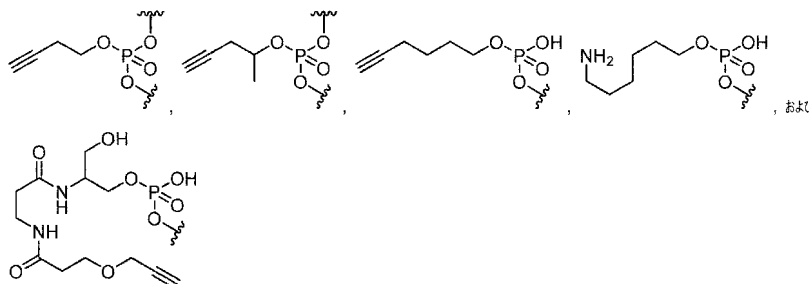
20

、またはその塩からなる群から選択される、請求項1～107のいずれか一項に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド。

【請求項 109】

前記生物不可逆的基の少なくとも1つが、ポリペプチド、炭水化物、標的化部分、または送達ドメインを、

【化6】



30

、またはその塩からなる群から選択される部分に結合することによって形成され、前記部分が、前記ガイド鎖または前記パッセンジャー鎖の5'末端内または5'末端に結合された2つの連続ヌクレオシドを連結する、請求項1～107のいずれか一項に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物。

【請求項 110】

ポリヌクレオチド構築物を細胞に送達する方法であって、前記細胞を、請求項1～109のいずれか一項に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物と接触させる工程を含み、前記接触の後、前記ポリヌクレオチド構築物が、前記細胞内に存在する方法。

40

【請求項 111】

細胞内のポリペプチドの発現を低下させる方法であって、前記細胞を、請求項1～109のいずれか一項に記載のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物と接触させる工程を含み、前記接触の後、前記細胞内の前記ポリペプチドの発現が低下される方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、細胞をトランスフェクトするための組成物および方法に関する。

50

【背景技術】

【0002】

インビトロおよびインビボの両方での細胞への核酸送達は、様々な組み換えウイルスベクター、脂質送達系、およびエレクトロポレーションを用いて行われている。このような技術は、遺伝子発現のノックアウトにより様々な疾患および障害を治療しようとして、遺伝子治療のための、または様々な生物系を研究するための遺伝的構築物を提供してきた。

【0003】

ポリヌクレオチドなどのポリアニオン性ポリマーは、細胞膜を越えて容易に拡散しない。培養細胞についてのこの問題を克服するために、カチオン性脂質が、典型的に、取り込みを促進するためにアニオン性ポリヌクレオチドと組み合わせられる。残念ながら、この複合体は、一般に、細胞に対して毒性を有し、これは、生存細胞のトランスフェクションを確実にするために、カチオン性脂質の曝露時間および濃度の両方が、注意深く制御されなければならないことを意味する。

【0004】

mRNAを選択的に分解する細胞機構としてのRNA干渉(RNAi)の発見は、細胞培養物における細胞表現型の標的化された操作および指向性治療(directed therapeutics)の開発の可能性の両方を可能にする(Behlke, Mol. Ther. 13, 644-670, 2006; Xie et al., Drug Discov. Today 11, 67-73, 2006)。しかしながら、それらのサイズおよび負(アニオン性)荷電の性質のため、siRNAは、細胞に侵入する能力のない巨大分子である。実際に、siRNAは、膜拡散性分子の細胞送達についてのリピンスキーの「ルールオブファイブ(Rule of 5s)」(一般にサイズを500Da未満に限定する)の25倍過剰である。その結果、送達ビヒクルまたはトランスフェクション剤の非存在下で、裸のsiRNAは、ミリモル濃度でも細胞に侵入しない(Barquiner et al., Gene Ther. 11 Suppl 1, S3-9, 2004)。siRNA送達の問題を解決するために、siRNAを凝縮し、かつ細胞膜を穿孔するカチオン性脂質の使用に大きな注目が集まっている。広く使用されているが、トランスフェクション試薬は、多くの細胞型、特に、初代細胞および造血細胞系統(TおよびB細胞、マクロファージ)への効率的な送達を達成することができない。さらに、リポフェクション試薬は、腫瘍細胞における軽度から初代細胞における高度までの様々な程度の細胞毒性を引き起こすことが多い。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

したがって、細胞をトランスフェクトする向上した能力を有するポリヌクレオチド構築物が必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0006】

一般に、本発明は、生物不可逆的(non-bioreversible)基または生物不可逆的基と生物可逆的(bioreversible)基との組合せを有するハイブリダイズポリヌクレオチドを提供する。特に、本発明は、ガイド鎖およびパッセンジャー鎖を有するハイブリダイズポリヌクレオチド構築物を特徴とし、ここで、ガイド鎖は、生物不可逆的基を含む。

【0007】

第1の態様において、本発明は、パッセンジャー鎖、RISC複合体に取り込み可能なガイド鎖、ならびに

(i) ガイド鎖中の3'末端またはヌクレオチド間生物不可逆的基；または

(ii) パッセンジャー鎖中の5'末端、3'末端、またはヌクレオチド間生物不可逆的基、およびガイド鎖またはパッセンジャー鎖中の5'末端、3'末端、またはヌクレオチド間ジスルフィド生物可逆的基

10

20

30

40

50

を含むハイブリダイズポリヌクレオチド構築物を提供する。

【0008】

特定の実施形態において、ハイブリダイズポリヌクレオチド構築物は、少なくとも1つのジスルフィド生物可逆的基を含む。

【0009】

ある実施形態において、ジスルフィド生物可逆的基は、 $-S-S-$ （リンクA） $-B$ を含み、
式中、

リンクAが、Bに結合された sp^3 混成炭素原子および $-S-S-$ に結合された炭素原子を含む二価または三価リンカーであり、ここで、リンクAが三価リンカーである場合、
リンクAの第3の原子価が、 $-S-S-$ と結合して、任意選択的に置換される $C_3 \sim 9$ ヘテロシクリレンを形成し、

Bが、5'末端リン(V)基、3'末端リン(V)基、またはヌクレオチド間リン(V)基である。

【0010】

いくつかの実施形態において、ハイブリダイズポリヌクレオチド構築物は、パッセンジャー鎖およびRISC複合体に取り込み可能なガイド鎖を含み、ここで、パッセンジャー鎖およびガイド鎖のそれぞれが、下式：

$5'-D-(Nuc-E)_n-Nuc-F$ 、またはその塩

で表される構造を有し、式中、

各nが、独立して、10～150の整数であり、

各Nucが、独立して、ヌクレオシドであり；

ガイド鎖のDが、ヒドロキシル、リン酸塩、またはジスルフィド生物可逆的基であり；

パッセンジャー鎖のDが、H、ヒドロキシル、任意選択的に置換される $C_1 \sim 6$ アルコキシ、保護されたヒドロキシル基、リン酸塩、二リン酸塩、三リン酸塩、四リン酸塩、五リン酸塩、5'キャップ、ホスホチオール、任意選択的に置換される $C_1 \sim 6$ アルキル、アミノ含有基、ビオチン含有基、ジゴキシゲニン含有基、コレステロール含有基、色素含有基、クエンチャー含有基、ポリペプチド、炭水化物、中性有機ポリマー、正荷電ポリマー、治療剤、標的化部分、エンドソームエスケープ部分、生物不可逆的基、またはジスルフィド生物可逆的基であり；

各Eが、独立して、リン酸塩、ホスホロチオエート、生物不可逆的基、またはジスルフィド生物可逆的基であり；

各Fが、独立して、H、ヒドロキシル、任意選択的に置換される $C_1 \sim 6$ アルコキシ、保護されたヒドロキシル基、一リン酸塩、二リン酸塩、三リン酸塩、四リン酸塩、五リン酸塩、ホスホチオール、任意選択的に置換される $C_1 \sim 6$ アルキル、アミノ含有基、ビオチン含有基、ジゴキシゲニン含有基、コレステロール含有基、色素含有基、クエンチャー含有基、ポリペプチド、炭水化物、中性有機ポリマー、正荷電ポリマー、治療剤、標的化部分、エンドソームエスケープ部分、生物不可逆的基、またはジスルフィド生物可逆的基であり；

例えば、ここで、ジスルフィド生物可逆的基の少なくとも1つが、 $-S-S-$ （リンクA） $-B$ を含み、
式中、

リンクAが、独立して、Bに結合された sp^3 混成炭素原子および $-S-S-$ に結合された炭素原子を含む二価または三価リンカーであり、ここで、リンクAが三価リンカーである場合、リンクAの第3原子価が、 $-S-S-$ と結合して、任意選択的に置換される $C_3 \sim 9$ ヘテロシクリレンを形成し；

Bが、独立して、5'末端リン(V)基、3'末端リン(V)基、またはヌクレオチド間リン(V)基であり；

ここで、ハイブリダイズポリヌクレオチド構築物が、ガイド鎖中の少なくとも1つの生物不可逆的基を含み、またはハイブリダイズポリヌクレオチド構築物が、ジスルフィド生物

10

20

30

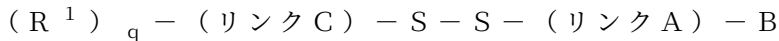
40

50

可逆的基および少なくとも1つの生物不可逆的基を含む。

【0011】

特定の実施形態において、ジスルフィド生物可逆的基は、以下の構造：



を有し、式中、

各 q が、独立して、1～10の整数であり；

各リンクCが、独立して、結合または12Da～10000Daの分子量を有する多価リンカーであり；

各 R^1 が、独立して、H、アジド、ポリペプチド、炭水化物、中性有機ポリマー、正荷電ポリマー、治療剤、標的化部分、またはエンドソームエスケープ部分である。

10

【0012】

ある実施形態において、ハイブリダイズポリヌクレオチド構築物は、第2のパッセンジャー鎖または第2のガイド鎖をさらに含有し（例えば、ハイブリダイズポリヌクレオチド構築物は、2つのパッセンジャー鎖および2つのガイド鎖を含有する）、ここで、リンクCは、第2のパッセンジャー鎖または第2のガイド鎖の $-S-S-(\text{リンクA})-B$ にさらに結合される多価リンカーである（例えば、リンクCは、2つのガイド鎖または2つのパッセンジャー鎖に結合される）。

【0013】

他の実施形態において、リンクCは、1つまたは複数のモノマーを含み、ここで、モノマーのそれぞれが、独立して、任意選択的に置換される $C_1 \sim 6$ アルキレン；任意選択的に置換される $C_2 \sim 6$ アルケニレン；任意選択的に置換される $C_2 \sim 6$ アルキニレン；任意選択的に置換される $C_3 \sim 8$ シクロアルキレン；任意選択的に置換される $C_3 \sim 8$ シクロアルケニレン；任意選択的に置換される $C_6 \sim 14$ アリーレン；N、O、およびSから選択される1～4個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される $C_1 \sim 9$ ヘテロアリーレン；N、O、およびSから選択される1～4個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される $C_1 \sim 9$ ヘテロシクリレン；イミノ；任意選択的に置換されるN；O；または $S(O)_m$ （ここで、 m が、0、1、または2である）である。さらに他の実施形態において、リンクCは、1つまたは複数のモノマーを含み、ここで、モノマーのそれぞれが、独立して、任意選択的に置換される $C_1 \sim 6$ アルキレン；任意選択的に置換される $C_3 \sim 8$ シクロアルキレン；任意選択的に置換される $C_3 \sim 8$ シクロアルケニレン；任意選択的に置換される $C_6 \sim 14$ アリーレン；N、O、およびSから選択される1～4個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される $C_1 \sim 9$ ヘテロアリーレン；N、O、およびSから選択される1～4個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される $C_1 \sim 9$ ヘテロシクリレン；イミノ；任意選択的に置換されるN；O；または $S(O)_m$ （ここで、 m が、0、1、または2である）である。さらに他の実施形態において、リンクCは、1つまたは複数のモノマーを含み、ここで、モノマーのそれぞれが、独立して、任意選択的に置換される $C_1 \sim 6$ アルキレン；任意選択的に置換される $C_3 \sim 8$ シクロアルキレン；任意選択的に置換される $C_3 \sim 8$ シクロアルケニレン；任意選択的に置換される $C_6 \sim 14$ アリーレン；N、O、およびSから選択される1～4個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される $C_1 \sim 9$ ヘテロアリーレン；N、O、およびSから選択される1～4個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される $C_1 \sim 9$ ヘテロシクリレン；任意選択的に置換されるN；O；または $S(O)_m$ （ここで、 m が、0、1、または2である）である。

20

30

40

【0014】

ある実施形態において、リンクCは、1～500のモノマー（例えば、1～300のモノマー、1～200のモノマー、1～150のモノマー、または1～100のモノマー）を含む。いくつかの実施形態において、リンクCは、1つまたは複数の $C_1 \sim 6$ アルキレンオキシ基（例えば、100個未満の $C_1 \sim 6$ アルキレンオキシ基）を含む。特定の実施形態において、リンクCは、1つまたは複数のポリ（アルキレンオキシド）（例えば、ポリエチレンオキシド、ポリプロピレンオキシド、ポリ（トリメチレンオキシド）、ポリブチレンオキシド、ポリ（テトラメチレンオキシド）、およびそのジブロックまたはトリブ

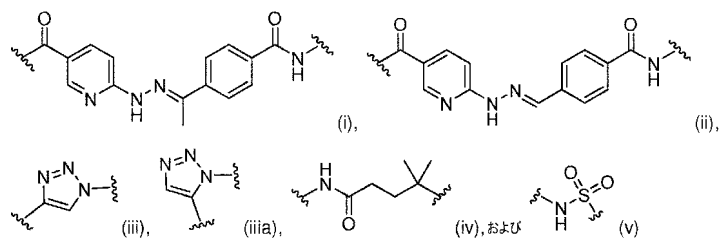
50

ロックコポリマー（例えば、ポリ（アルキレンオキシド）は、ポリエチレンオキシドである）を含む。

【0015】

特定の実施形態において、リンク C は、

【化1】



10

、およびその組合せからなる群から独立して選択される1つまたは複数の基を含む。

【0016】

さらなる実施形態において、ハイブリダイズポリヌクレオチド構築物は、第2のパスセンジャー鎖または第2のガイド鎖をさらに含有し（例えば、ハイブリダイズポリヌクレオチド構築物は、2つのパスセンジャー鎖および2つのガイド鎖を含有する）、ここで、パスセンジャー鎖またはガイド鎖は、生物不可逆的基によって第2のパスセンジャー鎖または第2のガイド鎖に共有結合される（例えば、2つのパスセンジャー鎖または2つのガイド鎖は、生物不可逆的基によって共有結合される）。

20

【0017】

いくつかの実施形態において、リンク A は、任意選択的に置換される $C_1 \sim 6$ アルキレン；任意選択的に置換される $C_2 \sim 6$ アルケニレン；任意選択的に置換される $C_2 \sim 6$ アルキニレン；任意選択的に置換される $C_3 \sim 8$ シクロアルキレン；任意選択的に置換される $C_3 \sim 8$ シクロアルケニレン；任意選択的に置換される $C_6 \sim 14$ アリーレン；N、O、および S から選択される 1～4 個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される $C_1 \sim 9$ ヘテロアリーレン；N、O、および S から選択される 1～4 個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される $C_1 \sim 9$ ヘテロシクリレン；任意選択的に置換される N；O；または $S(O)_m$ （ここで、各 m が、独立して、0、1、または 2 である）からなる群から独立して選択される 1つ、2つ、または 3つのモノマーを含む。他の実施形態において、リンク A は、任意選択的に置換される $C_1 \sim 6$ アルキレン；任意選択的に置換される $C_2 \sim 6$ アルケニレン；任意選択的に置換される $C_3 \sim 8$ シクロアルキレン；任意選択的に置換される $C_3 \sim 8$ シクロアルケニレン；任意選択的に置換される $C_6 \sim 14$ アリーレン；N、O、および S から選択される 1～4 個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される $C_1 \sim 9$ ヘテロアリーレン；N、O、および S から選択される 1～4 個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される $C_1 \sim 9$ ヘテロシクリレン；任意選択的に置換される N；O；または $S(O)_m$ （ここで、各 m が、独立して、0、1、または 2 である）からなる群から独立して選択される 1つ、2つ、または 3つのモノマーを含む。さらに他の実施形態において、リンク A は、任意選択的に置換される $C_1 \sim 6$ アルキレン；任意選択的に置換される $C_6 \sim 14$ アリーレン；N、O、および S から選択される 1～4 個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される $C_1 \sim 9$ ヘテロアリーレン；または O からなる群から独立して選択される 1つ、2つ、または 3つのモノマーを含む。

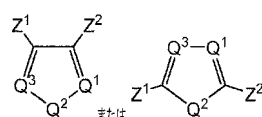
30

40

【0018】

ある実施形態において、リンク A は、2つまたは3つのモノマーを含み、モノマーのうちの1つは、構造：

【化2】



50

を有し、
式中、

Z^1 が $-S-S-$ への結合であり；

Z^2 が、リンク A の別のモノマーへの結合であり；

Q^1 が、N または CR^2 であり；

Q^2 が、O、S、 NR^3 、または $-C(R^5)=C(R^6)-$ であり；

Q^3 が、 R^4 に結合される N または C であり；

R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、および R^6 のそれぞれが、独立して、H、 $C_{2\sim7}$ アルカノイル； $C_{1\sim6}$ アルキル； $C_{2\sim6}$ アルケニル； $C_{2\sim6}$ アルキニル； $C_{1\sim6}$ アルキルスルフィニル； $C_{6\sim10}$ アリール；アミノ；($C_{6\sim10}$ アリール) $-C_{1\sim4}$ $-$ アルキル； $C_{3\sim8}$ シクロアルキル；($C_{3\sim8}$ シクロアルキル) $-C_{1\sim4}$ $-$ アルキル； $C_{3\sim8}$ シクロアルケニル；($C_{3\sim8}$ シクロアルケニル) $-C_{1\sim4}$ $-$ アルキル；ハロ； $C_{1\sim9}$ ヘテロシクリル； $C_{1\sim9}$ ヘテロアリール；($C_{1\sim9}$ ヘテロシクリル) オキシ；($C_{1\sim9}$ ヘテロシクリル) アザ；ヒドロキシ； $C_{1\sim6}$ チオアルコキシ； $-(CH_2)_q CO_2 R^A$ (ここで、 q が、0～4 の整数であり、 R^A が、 $C_{1\sim6}$ アルキル、 $C_{6\sim10}$ アリール、および ($C_{6\sim10}$ アリール) $-C_{1\sim4}$ $-$ アルキルからなる群から選択される)； $-(CH_2)_q CONR^B R^C$ (ここで、 q が、0～4 の整数であり、 R^B および R^C が、独立して、水素、 $C_{1\sim6}$ アルキル、 $C_{6\sim10}$ アリール、および ($C_{6\sim10}$ アリール) $-C_{1\sim4}$ $-$ アルキルからなる群から選択される)； $-(CH_2)_q SO_2 R^D$ (ここで、 q が、0～4 の整数であり、 R^D が、 $C_{1\sim6}$ アルキル、 $C_{6\sim10}$ アリール、および ($C_{6\sim10}$ アリール) $-C_{1\sim4}$ $-$ アルキルからなる群から選択される)； $-(CH_2)_q SO_2 NR^E R^F$ (ここで、 q が、0～4 の整数であり、 R^E および R^F のそれぞれが、独立して、水素、アルキル、アリール、および ($C_{6\sim10}$ アリール) $-C_{1\sim4}$ $-$ アルキルからなる群から選択される)；チオール；アリールオキシ；シクロアルコキシ；アリールアルコキシ；($C_{1\sim9}$ ヘテロシクリル) $-C_{1\sim4}$ $-$ アルキル；($C_{1\sim9}$ ヘテロアリール) $-C_{1\sim4}$ $-$ アルキル； $C_{3\sim12}$ シリル；シアノ；または $-S(O)R^H$ (ここで、 R^H が、水素、 $C_{1\sim6}$ アルキル、 $C_{6\sim10}$ アリール、および ($C_{6\sim10}$ アリール) $-C_{1\sim4}$ $-$ アルキルからなる群から選択される)であり；または R^5 および R^6 が、それぞれが結合される原子と一緒に、結合して、 C_6 アリール、 $C_{2\sim7}$ ヘテロアリール、および $C_{2\sim7}$ ヘテロシクリルからなる群から選択される環式基を形成し、ここで、環式基が、 $C_{2\sim7}$ アルカノイル； $C_{1\sim6}$ アルキル； $C_{2\sim6}$ アルケニル； $C_{2\sim6}$ アルキニル； $C_{1\sim6}$ アルキルスルフィニル； $C_{6\sim10}$ アリール；アミノ；($C_{6\sim10}$ アリール) $-C_{1\sim4}$ $-$ アルキル； $C_{3\sim8}$ シクロアルキル；($C_{3\sim8}$ シクロアルキル) $-C_{1\sim4}$ $-$ アルキル； $C_{3\sim8}$ シクロアルケニル；($C_{3\sim8}$ シクロアルケニル) $-C_{1\sim4}$ $-$ アルキル；ハロ； $C_{1\sim9}$ ヘテロシクリル； $C_{1\sim9}$ ヘテロアリール；($C_{1\sim9}$ ヘテロシクリル) オキシ；($C_{1\sim9}$ ヘテロシクリル) アザ；ヒドロキシ； $C_{1\sim6}$ チオアルコキシ； $-(CH_2)_q CO_2 R^A$ (ここで、 q が、0～4 の整数であり、 R^A が、 $C_{1\sim6}$ アルキル、 $C_{6\sim10}$ アリール、および ($C_{6\sim10}$ アリール) $-C_{1\sim4}$ $-$ アルキルからなる群から選択される)； $-(CH_2)_q CONR^B R^C$ (ここで、 q が、0～4 の整数であり、 R^B および R^C が、独立して、水素、 $C_{1\sim6}$ アルキル、 $C_{6\sim10}$ アリール、および ($C_{6\sim10}$ アリール) $-C_{1\sim4}$ $-$ アルキルからなる群から選択される)； $-(CH_2)_q SO_2 R^D$ (ここで、 q が、0～4 の整数であり、 R^D が、 $C_{1\sim6}$ アルキル、 $C_{6\sim10}$ アリール、および ($C_{6\sim10}$ アリール) $-C_{1\sim4}$ $-$ アルキルからなる群から選択される)； $-(CH_2)_q SO_2 NR^E R^F$ (ここで、 q が、0～4 の整数であり、 R^E および R^F のそれぞれが、独立して、水素、アルキル、アリール、および ($C_{6\sim10}$ アリール) $-C_{1\sim4}$ $-$ アルキルからなる群から選択される)；チオール；アリールオキシ；シクロアルコキシ；アリールアルコキシ；($C_{1\sim9}$ ヘテロシクリル) $-C_{1\sim4}$ $-$ アルキル；($C_{1\sim9}$ ヘテロアリール) $-C_{1\sim4}$ $-$ アルキル； $C_{3\sim12}$ シリル；シアノ；および $-S(O)R^H$ (ここで、 R^H が、水素、 $C_{1\sim6}$ アルキル、 $C_{6\sim10}$ アリール、および ($C_{6\sim10}$ アリール

10

20

30

40

50

) -C₁ ~ 4-アルキルからなる群から選択される) からなる群から選択される1つ、2つ、または3つの置換基で任意選択的に置換される。

【0019】

いくつかの実施形態において、Q¹がCR²である。特定の実施形態において、R²が、H、ハロ、またはC₁ ~ 6アルキルである。他の実施形態において、Q²が、Oまたは-C(R⁵)=C(R⁶)-である。さらに他の実施形態において、Q²が、-C(R⁵)=C(R⁶)-である。さらに他の実施形態において、R⁵が、H、ハロ、またはC₁ ~ 6アルキルである。ある実施形態において、R⁶が、H、ハロ、またはC₁ ~ 6アルキルである。

【0020】

さらに他の実施形態において、R⁵およびR⁶が、それぞれが結合される原子と一緒に、結合して、C₂ ~ 7アルカノイル；C₁ ~ 6アルキル；C₂ ~ 6アルケニル；C₂ ~ 6アルキニル；C₁ ~ 6アルキルスルフィニル；C₆ ~ 10アリール；アミノ；(C₆ ~ 10アリール)-C₁ ~ 4-アルキル；C₃ ~ 8シクロアルキル；(C₃ ~ 8シクロアルキル)-C₁ ~ 4-アルキル；C₃ ~ 8シクロアルケニル；(C₃ ~ 8シクロアルケニル)-C₁ ~ 4-アルキル；ハロ；C₁ ~ 9ヘテロシクリル；C₁ ~ 9ヘテロアリール；(C₁ ~ 9ヘテロシクリル)オキシ；(C₁ ~ 9ヘテロシクリル)アザ；ヒドロキシ；C₁ ~ 6チオアルコキシ；-(CH₂)_qCO₂R^A(ここで、qが、0 ~ 4の整数であり、R^Aが、C₁ ~ 6アルキル、C₆ ~ 10アリール、および(C₆ ~ 10アリール)-C₁ ~ 4-アルキルからなる群から選択される)；-(CH₂)_qCONR^BR^C(ここで、qが、0 ~ 4の整数であり、R^BおよびR^Cが、独立して、水素、C₁ ~ 6アルキル、C₆ ~ 10アリール、および(C₆ ~ 10アリール)-C₁ ~ 4-アルキルからなる群から選択される)；-(CH₂)_qSO₂R^D(ここで、qが、0 ~ 4の整数であり、R^Dが、C₁ ~ 6アルキル、C₆ ~ 10アリール、および(C₆ ~ 10アリール)-C₁ ~ 4-アルキルからなる群から選択される)；-(CH₂)_qSO₂NR^ER^F(ここで、qが、0 ~ 4の整数であり、R^EおよびR^Fのそれぞれが、独立して、水素、アルキル、アリール、および(C₆ ~ 10アリール)-C₁ ~ 4-アルキルからなる群から選択される)；チオール；アリールオキシ；シクロアルコキシ；アリールアルコキシ；(C₁ ~ 9ヘテロシクリル)-C₁ ~ 4-アルキル；(C₁ ~ 9ヘテロアリール)-C₁ ~ 4-アルキル；C₃ ~ 12シリル；シアノ；および-S(O)R^H(ここで、R^Hが、水素、C₁ ~ C₆アルキル、C₆ ~ 10アリール、および(C₆ ~ 10アリール)-C₁ ~ 4-アルキルからなる群から選択される)からなる群から選択される1つ、2つ、または3つの置換基で任意選択的に置換されるC₂ ~ 5ヘテロアリールを形成する。いくつかの実施形態において、C₂ ~ 5ヘテロアリールは、2個の窒素原子を含む(例えば、C₂ ~ 5ヘテロアリールは、C₁ ~ 6アルキルで任意選択的に置換される)。

【0021】

特定の実施形態において、Q²がOである。いくつかの実施形態において、Q³がCR⁴である。ある実施形態において、R⁴が、H、ハロ、またはC₁ ~ 6アルキルである。

【0022】

他の実施形態において、リンクAおよび-S-S-が結合して、構造：

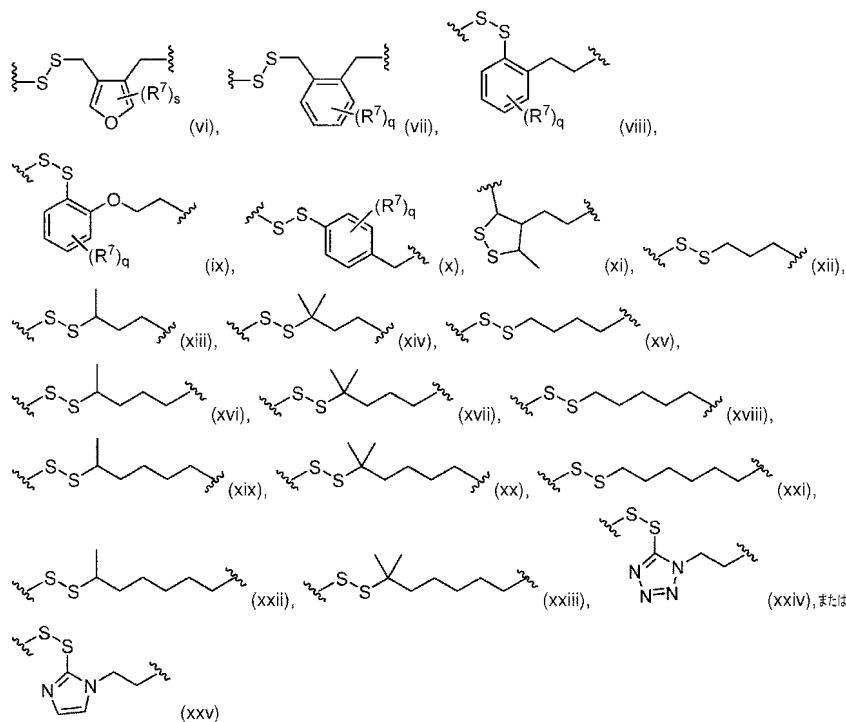
10

20

30

40

【化 3】



10

20

を形成し、
式中、

各 R^7 が、独立して、 $C_2 \sim 7$ アルカノイル； $C_1 \sim 6$ アルキル； $C_2 \sim 6$ アルケニル； $C_2 \sim 6$ アルキニル； $C_1 \sim 6$ アルキルスルフィニル； $C_6 \sim 10$ アリール；アミノ； $(C_6 \sim 10$ アリール) - $C_1 \sim 4$ - アルキル； $C_3 \sim 8$ シクロアルキル； $(C_3 \sim 8$ シクロアルキル) - $C_1 \sim 4$ - アルキル； $C_3 \sim 8$ シクロアルケニル； $(C_3 \sim 8$ シクロアルケニル) - $C_1 \sim 4$ - アルキル；ハロ； $C_1 \sim 9$ ヘテロシクリル； $C_1 \sim 9$ ヘテロアリール； $(C_1 \sim 9$ ヘテロシクリル) オキシ； $(C_1 \sim 9$ ヘテロシクリル) アザ；ヒドロキシ； $C_1 \sim 6$ チオアルコキシ； $-(CH_2)_q CO_2 R^A$ （ここで、 q が、0～4の整数であり、 R^A が、 $C_1 \sim 6$ アルキル、 $C_6 \sim 10$ アリール、および $(C_6 \sim 10$ アリール) - $C_1 \sim 4$ - アルキルからなる群から選択される）； $-(CH_2)_q CONR^B R^C$ （ここで、 q が、0～4の整数であり、 R^B および R^C が、独立して、水素、 $C_1 \sim 6$ アルキル、 $C_6 \sim 10$ アリール、および $(C_6 \sim 10$ アリール) - $C_1 \sim 4$ - アルキルからなる群から選択される）； $-(CH_2)_q SO_2 R^D$ （ここで、 q が、0～4の整数であり、 R^D が、 $C_1 \sim 6$ アルキル、 $C_6 \sim 10$ アリール、および $(C_6 \sim 10$ アリール) - $C_1 \sim 4$ - アルキルからなる群から選択される）； $-(CH_2)_q SO_2 NR^E R^F$ （ここで、 q が、0～4の整数であり、 R^E および R^F のそれぞれが、独立して、水素、アルキル、アリール、および $(C_6 \sim 10$ アリール) - $C_1 \sim 4$ - アルキルからなる群から選択される）；チオール；アリールオキシ；シクロアルコキシ；アリールアルコキシ； $(C_1 \sim 9$ ヘテロシクリル) - $C_1 \sim 4$ - アルキル； $(C_1 \sim 9$ ヘテロアリール) - $C_1 \sim 4$ - アルキル； $C_3 \sim 12$ シリル；シアノ；または $-S(O)R^H$ （ここで、 R^H が、水素、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_6 \sim 10$ アリール、および $(C_6 \sim 10$ アリール) - $C_1 \sim 4$ - アルキルからなる群から選択される）であり；または2つの隣接する R^7 基が、各 R^7 が結合される原子と一緒に、結合して、 C_6 アリール、 $C_2 \sim 5$ ヘテロシクリル、または $C_2 \sim 5$ ヘテロアリールからなる群から選択される環式基を形成し、ここで、環式基が、 $C_2 \sim 7$ アルカノイル； $C_1 \sim 6$ アルキル； $C_2 \sim 6$ アルケニル； $C_2 \sim 6$ アルキニル； $C_1 \sim 6$ アルキルスルフィニル； $C_6 \sim 10$ アリール；アミノ； $(C_6 \sim 10$ アリール) - $C_1 \sim 4$ - アルキル； $C_3 \sim 8$ シクロアルキル； $(C_3 \sim 8$ シクロアルキル) - $C_1 \sim 4$ - アルキル； $C_3 \sim 8$ シクロアルケニル； $(C_3 \sim 8$ シクロアルケニル) - $C_1 \sim 4$ - アルキル；ハロ； $C_1 \sim 9$ ヘテロシクリル； $C_1 \sim 9$ ヘテロアリール； $(C_1 \sim 9$ ヘテロシ

30

40

50

クリル) オキシ; ($C_1 \sim 9$ ヘテロシクリル) アザ; ヒドロキシ; $C_1 \sim 6$ チオアルコキシ; $-(CH_2)_q CO_2 R^A$ (ここで、 q が、0~4 の整数であり、 R^A が、 $C_1 \sim 6$ アルキル、 $C_6 \sim 10$ アリール、および ($C_6 \sim 10$ アリール) $-C_1 \sim 4$ -アルキルからなる群から選択される); $-(CH_2)_q CONR^B R^C$ (ここで、 q が、0~4 の整数であり、 R^B および R^C が、独立して、水素、 $C_1 \sim 6$ アルキル、 $C_6 \sim 10$ アリール、および ($C_6 \sim 10$ アリール) $-C_1 \sim 4$ -アルキルからなる群から選択される); $-(CH_2)_q SO_2 R^D$ (ここで、 q が、0~4 の整数であり、 R^D が、 $C_1 \sim 6$ アルキル、 $C_6 \sim 10$ アリール、および ($C_6 \sim 10$ アリール) $-C_1 \sim 4$ -アルキルからなる群から選択される); $-(CH_2)_q SO_2 NR^E R^F$ (ここで、 q が、0~4 の整数であり、 R^E および R^F のそれぞれが、独立して、水素、アルキル、アリール、および ($C_6 \sim 10$ アリール) $-C_1 \sim 4$ -アルキルからなる群から選択される); チオール; アリールオキシ; シクロアルコキシ; アリールアルコキシ; ($C_1 \sim 9$ ヘテロシクリル) $-C_1 \sim 4$ -アルキル; ($C_1 \sim 9$ ヘテロアリール) $-C_1 \sim 4$ -アルキル; $C_3 \sim 12$ シリル; シアノ; および $-S(O)R^H$ (ここで、 R^H が、水素、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_6 \sim 10$ アリール、および ($C_6 \sim 10$ アリール) $-C_1 \sim 4$ -アルキルからなる群から選択される) からなる群から選択される 1 つ、2 つ、または 3 つの置換基で任意選択的に置換され;

q が、0、1、2、3、または 4 であり;

s が、0、1、または 2 である。

【0023】

さらに他の実施形態において、 R^7 が、ハロまたは任意選択的に置換される $C_1 \sim 6$ アルキルである。さらに他の実施形態において、 s が、0 または 1 である (例えば、 s が 0 である)。いくつかの実施形態において、 q が、0、1、または 2 である (例えば、 q が、0 または 1 である)。

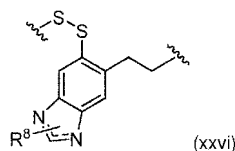
【0024】

特定の実施形態において、2 つの隣接する R^7 基が、各 R^7 が結合される原子と一緒に、結合して、1 つ、2 つ、または 3 つの $C_1 \sim 6$ アルキル基で任意選択的に置換される $C_2 \sim 5$ ヘテロアリールを形成する。

【0025】

ある実施形態において、リンク A および $-S-S-$ が結合して、構造:

【化 4】



を形成し、

式中、点線が、ただ 1 つの二重結合を表し、

R^8 が、空の原子価を有する窒素原子に結合され、H、 $C_2 \sim 7$ アルカノイル; $C_1 \sim 6$ アルキル; $C_2 \sim 6$ アルケニル; $C_2 \sim 6$ アルキニル; $C_1 \sim 6$ アルキルスルフィニル; $C_6 \sim 10$ アリール; アミノ; ($C_6 \sim 10$ アリール) $-C_1 \sim 4$ -アルキル; $C_3 \sim 8$ シクロアルキル; ($C_3 \sim 8$ シクロアルキル) $-C_1 \sim 4$ -アルキル; $C_3 \sim 8$ シクロアルケニル; ($C_3 \sim 8$ シクロアルケニル) $-C_1 \sim 4$ -アルキル; ハロ; $C_1 \sim 9$ ヘテロシクリル; $C_1 \sim 9$ ヘテロアリール; ($C_1 \sim 9$ ヘテロシクリル) オキシ; ($C_1 \sim 9$ ヘテロシクリル) アザ; ヒドロキシ; $C_1 \sim 6$ チオアルコキシ; $-(CH_2)_q CO_2 R^A$ (ここで、 q が、0~4 の整数であり、 R^A が、 $C_1 \sim 6$ アルキル、 $C_6 \sim 10$ アリール、および ($C_6 \sim 10$ アリール) $-C_1 \sim 4$ -アルキルからなる群から選択される); $-(CH_2)_q CONR^B R^C$ (ここで、 q が、0~4 の整数であり、 R^B および R^C が、独立して、水素、 $C_1 \sim 6$ アルキル、 $C_6 \sim 10$ アリール、および ($C_6 \sim 10$ アリール) $-C_1 \sim 4$ -アルキルからなる群から選択される); $-(CH_2)_q SO_2 R^D$ (こ

ここで、 q が、0～4の整数であり、 R^D が、 $C_1 \sim 6$ アルキル、 $C_6 \sim 10$ アリール、および ($C_6 \sim 10$ アリール) - $C_1 \sim 4$ - アルキルからなる群から選択される) ; - (CH_2) $_q$ $SO_2NR^ER^F$ (ここで、 q が、0～4の整数であり、 R^E および R^F のそれぞれが、独立して、水素、アルキル、アリール、および ($C_6 \sim 10$ アリール) - $C_1 \sim 4$ - アルキルからなる群から選択される) ; チオール; アリールオキシ; シクロアルコキシ; アリールアルコキシ; ($C_1 \sim 9$ ヘテロシクリル) - $C_1 \sim 4$ - アルキル; ($C_1 \sim 9$ ヘテロアリール) - $C_1 \sim 4$ - アルキル; $C_3 \sim 12$ シリル; シアノ; または - $S(O)R^H$ (ここで、 R^H が、水素、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_6 \sim 10$ アリール、および ($C_6 \sim 10$ アリール) - $C_1 \sim 4$ - アルキルからなる群から選択される) である。

【0026】

いくつかの実施形態において、 R^8 が、Hまたは $C_1 \sim 6$ アルキルである。

【0027】

他の実施形態において、ジスルフィド生物可逆的基の少なくとも1つが、1つまたは複数のモノマーを含み、ここで、モノマーのそれぞれが、独立して、任意選択的に置換される $C_1 \sim 6$ アルキレン; 任意選択的に置換される $C_2 \sim 6$ アルケニレン; 任意選択的に置換される $C_2 \sim 6$ アルキニレン; 任意選択的に置換される $C_3 \sim 8$ シクロアルキレン; 任意選択的に置換される $C_3 \sim 8$ シクロアルケニレン; 任意選択的に置換される $C_6 \sim 14$ アリーレン; N、O、およびSから選択される1～4個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される $C_1 \sim 9$ ヘテロアリーレン; N、O、およびSから選択される1～4個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される $C_1 \sim 9$ ヘテロシクリレン; イミノ; 任意選択的に置換されるN; O; または $S(O)_m$ (ここで、 m が、0、1、または2である) である。さらに他の実施形態において、生物可逆的基の少なくとも1つが、1つまたは複数のモノマーを含み、ここで、モノマーのそれぞれが、独立して、任意選択的に置換される $C_1 \sim 6$ アルキレン; 任意選択的に置換される $C_3 \sim 8$ シクロアルキレン; 任意選択的に置換される $C_3 \sim 8$ シクロアルケニレン; 任意選択的に置換される $C_6 \sim 14$ アリーレン; N、O、およびSから選択される1～4個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される $C_1 \sim 9$ ヘテロアリーレン; N、O、およびSから選択される1～4個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される $C_1 \sim 9$ ヘテロシクリレン; イミノ; 任意選択的に置換されるN; O; または $S(O)_m$ (ここで、 m が、0、1、または2である) である。さらに他の実施形態において、生物可逆的基の少なくとも1つが、1つまたは複数のモノマーを含み、ここで、モノマーのそれぞれが、独立して、任意選択的に置換される $C_1 \sim 6$ アルキレン; 任意選択的に置換される $C_3 \sim 8$ シクロアルキレン; 任意選択的に置換される $C_3 \sim 8$ シクロアルケニレン; 任意選択的に置換される $C_6 \sim 14$ アリーレン; N、O、およびSから選択される1～4個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される $C_1 \sim 9$ ヘテロアリーレン; N、O、およびSから選択される1～4個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される $C_1 \sim 9$ ヘテロシクリレン; 任意選択的に置換されるN; O; または $S(O)_m$ (ここで、 m が、0、1、または2である) である。特定の実施形態において、モノマーの少なくとも1つが $S(O)_m$ であり、 m が2である。

【0028】

いくつかの実施形態において、生物可逆的基の少なくとも1つが、2～500のモノマー (例えば、2～300のモノマー、2～200のモノマー、2～150のモノマー、または2～100のモノマー) を含む。ある実施形態において、生物可逆的基の少なくとも1つが、1つまたは複数の $C_1 \sim 6$ アルキレンオキシ基を含む (例えば、生物可逆的基の少なくとも1つが、100個未満の $C_1 \sim 6$ アルキレンオキシ基を含む)。特定の実施形態において、生物可逆的基の少なくとも1つが、1つまたは複数のポリ (アルキレンオキシド) (例えば、ポリエチレンオキシド、ポリプロピレンオキシド、ポリ (トリメチレンオキシド)、ポリブチレンオキシド、ポリ (テトラメチレンオキシド)、およびそのジブロックまたはトリブロックコポリマー) を含む。他の実施形態において、ポリ (アルキレンオキシド) は、ポリエチレンオキシドである。

【0029】

さらなる実施形態において、生物不可逆的基の少なくとも1つが、1つまたは複数の補助部分を含み、1つまたは複数の補助部分のそれぞれが、独立して、ポリペプチド、炭水化物、中性有機ポリマー、正荷電ポリマー、治療剤、標的化部分、およびエンドソームエスケープ部分である。

【0030】

ある実施形態において、生物不可逆的基の少なくとも1つが、炭水化物を含む（例えば、炭水化物は、マンノース、N-アセチルガラクトサミン、またはD-グルシトールである）。

【0031】

特定の実施形態において、生物不可逆的基の少なくとも1つが、標的化部分を含む（例えば、標的化部分は、葉酸塩リガンドであり、標的化部分は、前立腺特異的膜抗原（PSMA）であり、標的化部分は、小胞体標的化基であり、または標的化部分は、アルブミン結合基である）。

10

【0032】

他の実施形態において、生物不可逆的基の少なくとも1つが、ポリペプチドを含む（例えば、ポリペプチドは、細胞透過性ペプチドであり、またはポリペプチドは、エンドソームエスケープ部分である）。

【0033】

さらに他の実施形態において、生物可逆的基の少なくとも1つが、炭水化物を含む（例えば、炭水化物は、マンノース、N-アセチルガラクトサミン、またはD-グルシトールである）。特定の実施形態において、少なくとも1つのR¹が炭水化物である（例えば、炭水化物は、マンノース、N-アセチルガラクトサミン、またはD-グルシトールである）。

20

【0034】

さらに他の実施形態において、生物可逆的基の少なくとも1つが、標的化部分を含む（例えば、標的化部分は、葉酸塩リガンドであり、標的化部分は、前立腺特異的膜抗原（PSMA）であり、標的化部分は、小胞体標的化基であり、または標的化部分は、アルブミン結合基である）。ある実施形態において、少なくとも1つのR¹が標的化部分である（例えば、標的化部分は、葉酸塩リガンドであり、標的化部分は、前立腺特異的膜抗原（PSMA）であり、標的化部分は、小胞体標的化基であり、または標的化部分は、アルブミン結合基である）。

30

【0035】

特定の実施形態において、生物可逆的基の少なくとも1つが、ポリペプチドを含む（例えば、ポリペプチドは、細胞透過性ペプチドであり、ポリペプチドは、エンドソームエスケープ部分であり、またはガイド鎖は、生物不可逆的基を含む）。ある実施形態において、少なくとも1つのR¹がポリペプチドである（例えば、ポリペプチドは、細胞透過性ペプチドであり、ポリペプチドは、エンドソームエスケープ部分であり、またはガイド鎖は、生物不可逆的基を含む）。

【0036】

他の実施形態において、生物可逆的基の少なくとも1つが、ポリペプチドを含む（例えば、ポリペプチドは、細胞透過性ペプチドであり、またはポリペプチドは、エンドソームエスケープ部分である）。特定の他の実施形態において、少なくとも1つのR¹がポリペプチドである（例えば、ポリペプチドは、細胞透過性ペプチドであり、またはポリペプチドは、エンドソームエスケープ部分である）。

40

【0037】

他の実施形態において、少なくとも1つのR¹が、アジド、ポリペプチド、炭水化物、標的化部分、またはエンドソームエスケープ部分である。

【0038】

いくつかの実施形態において、生物不可逆的基のうちの1つが、ガイド鎖の第2のヌクレオシドおよび第3のヌクレオシドを連結する。特定の実施形態において、生物不可逆的

50

基のうちの1つが、ガイド鎖の第5のヌクレオシドおよび第6のヌクレオシドを連結する。他の実施形態において、生物不可逆的基のうちの1つが、ガイド鎖の第17のヌクレオシドおよび第18のヌクレオシドを連結する。さらに他の実施形態において、生物不可逆的基のうちの1つが、ガイド鎖の3'末端基である。

【0039】

特定の実施形態において、ガイド鎖は、1～5つの生物不可逆的基を含む（例えば、ガイド鎖は、1つの生物不可逆的基を含む）。

【0040】

ある実施形態において、パッセンジャー鎖は、少なくとも1つの生物不可逆的基を含む（例えば、パッセンジャー鎖は、1～5つの生物不可逆的基（例えば、1つの生物不可逆的基）を含む）。

10

【0041】

他の実施形態において、生物不可逆的基は、パッセンジャー鎖の2つのヌクレオシドを連結し、ここで、ヌクレオシドは、5'方向において天然RISCを介した切断部位から離れて少なくとも1つのヌクレオシドに配置される。さらに他の実施形態において、生物不可逆的基は、パッセンジャー鎖の第1および第2のヌクレオシドを連結する。さらに他の実施形態において、ガイド鎖は、ジスルフィド生物可逆的基の少なくとも1つを含む。

【0042】

いくつかの実施形態において、パッセンジャー鎖は、ジスルフィド生物可逆的基の少なくとも1つを含む。特定の実施形態において、ジスルフィド生物可逆的基は、ガイド鎖の3つの5'末端ヌクレオシドから選択される2つの連続ヌクレオシドを連結する（例えば、Bは、ガイド鎖の3つの5'末端ヌクレオシドから選択される2つの連続ヌクレオシドを連結するヌクレオチド間リン（V）基である）。ある実施形態において、特定の実施形態において、ジスルフィド生物可逆的基は、ガイド鎖の3つの3'末端ヌクレオシドから選択される2つの連続ヌクレオシドを連結する。

20

【0043】

他の実施形態において、生物可逆的基は、パッセンジャー鎖の5'末端基である（例えば、パッセンジャー鎖のDは、ジスルフィド生物可逆的基である）。特定の他の実施形態において、生物可逆的基は、ガイド鎖の5'末端基である（例えば、ガイド鎖のDは、ジスルフィド生物可逆的基である）。さらに他の実施形態において、生物可逆的基は、ガイド鎖の3'末端基である（例えば、ガイド鎖のFは、ジスルフィド生物可逆的基である）。さらに他の実施形態において、生物可逆的基は、パッセンジャー鎖の3'末端基である（例えば、パッセンジャー鎖のFは、ジスルフィド生物可逆的基である）。

30

【0044】

特定の実施形態において、ジスルフィド生物可逆的基は、パッセンジャー鎖の3つの5'末端ヌクレオシドから選択される2つの連続ヌクレオシドを連結する（例えば、Bは、パッセンジャー鎖の3つの5'末端ヌクレオチドから選択される2つの連続ヌクレオチドを連結するヌクレオチド間リン（V）基である）。

【0045】

ある実施形態において、ジスルフィド生物可逆的基は、パッセンジャー鎖の3つの3'末端ヌクレオシドから選択される2つの連続ヌクレオシドを連結する（例えば、Bは、パッセンジャー鎖の3つの3'末端ヌクレオシドから選択される2つの連続ヌクレオシドを連結するヌクレオチド間リン（V）基である）。

40

【0046】

他の実施形態において、生物不可逆的基は、パッセンジャー鎖の5'末端基である（例えば、パッセンジャー鎖のDは、生物不可逆的基である）。さらに他の実施形態において、生物不可逆的基は、ガイド鎖の3'末端基である（例えば、ガイド鎖のFは、生物不可逆的基である）。さらに他の実施形態において、生物不可逆的基は、パッセンジャー鎖の3'末端基である（例えば、パッセンジャー鎖のFは、生物不可逆的基である）。

【0047】

50

いくつかの実施形態において、生物不可逆的基は、1つまたは複数のモノマーを含み、モノマーのそれぞれが、独立して、任意選択的に置換される $C_1 \sim 6$ アルキレン；任意選択的に置換される $C_2 \sim 6$ アルケニレン；任意選択的に置換される $C_2 \sim 6$ アルキニレン；任意選択的に置換される $C_3 \sim 8$ シクロアルキレン；任意選択的に置換される $C_3 \sim 8$ シクロアルケニレン；任意選択的に置換される $C_6 \sim 14$ アリーレン；N、O、およびSから選択される1～4個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される $C_1 \sim 9$ ヘテロアリーレン；N、O、およびSから選択される1～4個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される $C_1 \sim 9$ ヘテロシクリレン；任意選択的に置換されるN；O；またはS (O)_m（ここで、mが、0、1、または2である）である。特定の実施形態において、1つまたは複数のモノマーのそれぞれが、独立して、任意選択的に置換される $C_1 \sim 6$ アルキレン；任意選択的に置換される $C_2 \sim 6$ アルケニレン；任意選択的に置換される $C_3 \sim 8$ シクロアルキレン；任意選択的に置換される $C_3 \sim 8$ シクロアルケニレン；任意選択的に置換される $C_6 \sim 14$ アリーレン；N、O、およびSから選択される1～4個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される $C_1 \sim 9$ ヘテロアリーレン；N、O、およびSから選択される1～4個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される $C_1 \sim 9$ ヘテロシクリレン；任意選択的に置換されるN；O；またはS (O)_m（ここで、mが、0、1、または2である）である。他の実施形態において、1つまたは複数のモノマーのそれぞれが、独立して、任意選択的に置換される $C_1 \sim 6$ アルキレン；任意選択的に置換される $C_6 \sim 14$ アリーレン；N、O、およびSから選択される1～4個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される $C_1 \sim 9$ ヘテロアリーレン；任意選択的に置換されるN；O；またはS (O)_m（ここで、mが、0、1、または2である）である。さらに他の実施形態において、モノマーの少なくとも1つが、S (O)_mであり、mが、0または2である（例えば、mが2である）。

【0048】

特定の実施形態において、生物不可逆的基は、独立して、1～200のモノマーを含む。ある実施形態において、生物不可逆的基は、独立して、1～150のモノマーを含む。他の実施形態において、生物不可逆的基は、独立して、1～100のモノマーを含む。さらに他の実施形態において、生物不可逆的基は、独立して、1～3つのモノマーを含む。さらに他の実施形態において、生物不可逆的基は、独立して、1つのモノマーを含む。

【0049】

ある実施形態において、生物不可逆的基は、独立して、任意選択的に置換される $C_3 \sim 6$ アルキル；任意選択的に置換される $C_3 \sim 6$ アルケニル；任意選択的に置換される $C_3 \sim 6$ アルキニル；任意選択的に置換される $C_3 \sim 8$ シクロアルキル；任意選択的に置換される $C_3 \sim 8$ シクロアルケニル；任意選択的に置換される($C_3 \sim 8$ シクロアルキル)－ $C_1 \sim 4$ －アルキル；任意選択的に置換される($C_3 \sim 8$ シクロアルケニル)－ $C_1 \sim 4$ －アルキル；任意選択的に置換される $C_6 \sim 14$ アリール；任意選択的に置換される($C_6 \sim 14$ アリール)－ $C_1 \sim 4$ －アルキル；N、O、およびSから選択される1～4個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される $C_1 \sim 9$ ヘテロアリール；N、Oから選択される1～4個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される($C_1 \sim 9$ ヘテロアリール)－ $C_1 \sim 4$ －アルキル；N、O、およびSから選択される1～4個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される $C_1 \sim 9$ ヘテロシクリル（ここで、ヘテロシクリルは、S－S結合を含まない）；およびN、O、およびSから選択される1～4個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される($C_1 \sim 9$ ヘテロシクリル)－ $C_1 \sim 4$ －アルキル（ここで、ヘテロシクリルは、S－S結合を含まない）からなる群から独立して選択される置換基で置換されるリン酸塩またはホスホロチオエートである。

【0050】

いくつかの実施形態において、－S－S－を、ヌクレオチド間リン(V)基、5'末端基、または3'末端基に連結する原子の最も短い鎖は3である。他の実施形態において、－S－S－を、ヌクレオチド間リン(V)基、5'末端基、または3'末端基に連結する原子の最も長い鎖は6である。さらに他の実施形態において、少なくとも1つのジスルフ

ィド生物可逆的基は、独立して、ジスルフィドに近接する少なくとも1つの嵩高い基 (bulky group) を含む。

【0051】

他の実施形態において、ガイド鎖は、19以上のヌクレオシドを含む (例えば、ガイド鎖のnは、17以上である)。さらに他の実施形態において、ガイド鎖は、100未満のヌクレオシドを含む (例えば、ガイド鎖のnは、98以下である)。さらに他の実施形態において、ガイド鎖は、50未満のヌクレオシドを含む (例えば、ガイド鎖のnは、48以下である)。特定の実施形態において、ガイド鎖は、32未満のヌクレオシドを含む (例えば、ガイド鎖のnは、30以下である)。いくつかの実施形態において、パッセンジャー鎖は、19以上のヌクレオシドを含む。

10

【0052】

他の実施形態において、パッセンジャー鎖は、19以上のヌクレオシドを含む (例えば、パッセンジャー鎖のnは、17以上である)。さらに他の実施形態において、パッセンジャー鎖は、100未満のヌクレオシドを含む (例えば、パッセンジャー鎖のnは、98以下である)。さらに他の実施形態において、パッセンジャー鎖は、50未満のヌクレオシドを含む (例えば、パッセンジャー鎖のnは、48以下である)。特定の実施形態において、パッセンジャー鎖は、32未満のヌクレオシドを含む (例えば、パッセンジャー鎖のnは、30以下である)。いくつかの実施形態において、パッセンジャー鎖は、19以下のヌクレオシドを含む。

20

【0053】

第2の態様において、本発明は、ポリヌクレオチド構築物を細胞に送達する方法であって、細胞を、上記の態様のいずれかの実施形態のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物と接触させる工程を含む方法を提供する。

【0054】

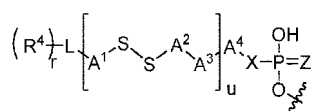
第3の態様において、本発明は、細胞内のポリペプチドの発現を低下させる方法であって、細胞を、第1の態様のいずれかの実施形態のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物と接触させる工程を含む方法を提供する。

【0055】

特定の実施形態において、上記の態様のいずれかの生物可逆的または生物不可逆的基は、式 (I I) または

30

【化5】



の基、またはその塩であり、
式中、uが、0または1であり；

A¹が、任意選択的に置換されるN；O；S；任意選択的に置換されるC₁～₆アルキレン；任意選択的に置換されるC₂～₆アルケニレン；任意選択的に置換されるC₂～₆アルキニレン；任意選択的に置換されるC₃～₈シクロアルキレン；任意選択的に置換されるC₃～₈シクロアルケニレン；任意選択的に置換される(C₃～₈シクロアルキル)－C₁～₄－アルキレン；任意選択的に置換される(C₃～₈シクロアルケニル)－C₁～₄－アルキレン；任意選択的に置換されるC₆～₁₄アリーレン；任意選択的に置換される(C₆～₁₄アリール)－C₁～₄－アルキレン；N、O、およびSから選択される1～4個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換されるC₁～₉ヘテロアリーレン；N、O、およびSから選択される1～4個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される(C₁～₉ヘテロアリール)－C₁～₄－アルキレン；N、O、およびSから選択される1～4個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換されるC₁～₉ヘテロシクリレン；およびN、O、およびSから選択される1～4個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される(C₁～₉ヘテロシクリル)－C₁～₄－アルキレンのうちの1つまたは複数を含むか

40

50

またはそれらである結合またはリンカーであり、ただし、 A^1 が、任意選択的に置換される N、O、および S のうちの 1 つまたは複数を含む場合、任意選択的に置換される N、O、または S は、ジスルフィドに直接結合されず；各 A^2 が、独立して、任意選択的に置換される $C_1 \sim 6$ アルキレン；任意選択的に置換される $C_3 \sim 8$ シクロアルキレン；任意選択的に置換される $C_3 \sim 8$ シクロアルケニレン；任意選択的に置換される $C_6 \sim 14$ アリーレン；N、O、および S から選択される 1～4 個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される $C_1 \sim 9$ ヘテロアリーレン；および N、O、および S から選択される 1～4 個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される $C_1 \sim 9$ ヘテロシクリレンからなる群から選択され；または A^1 および A^2 が、 $-S-S-$ と一緒に結合して、任意選択的に置換される 5～16 員環を形成し；

A^3 が、結合、任意選択的に置換される $C_1 \sim 6$ アルキレン；任意選択的に置換される $C_3 \sim 8$ シクロアルキレン；任意選択的に置換される $C_3 \sim 8$ シクロアルケニレン；任意選択的に置換される $C_6 \sim 14$ アリーレン、N、O、および S から選択される 1～4 個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される $C_1 \sim 9$ ヘテロアリーレン；N、O、および S から選択される 1～4 個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される $C_1 \sim 9$ ヘテロシクリレン；O；任意選択的に置換される N；および S からなる群から選択され；

A^4 が、任意選択的に置換される $C_1 \sim 6$ アルキレン；任意選択的に置換される $C_3 \sim 8$ シクロアルキレン；および N、O、および S から選択される 1～4 個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される $C_1 \sim 9$ ヘテロシクリレンからなる群から選択され；

L が存在しないか、または 1 つまたは複数の共役部分を含むかまたはそれらからなる共役基であり；

各 R^4 が、独立して、水素、任意選択的に置換される $C_1 \sim 6$ アルキル、親水性官能基、または小分子、ポリペプチド、炭水化物、中性有機ポリマー、正荷電ポリマー、治療剤、標的化部分、エンドソームエスケープ部分、およびそれらの組合せからなる群から選択される補助部分を含む基であり；

r が、独立して、1～10 の整数である。

【0056】

生物不可逆的基の場合、u が 0 である。

【0057】

ある実施形態において、生物可逆的基は、式 (I I) の基またはその塩であり、式中、u が 1 である。

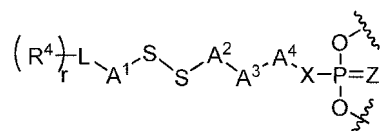
【0058】

他の実施形態において、生物可逆的基は、式 (I I) の基またはその塩であり、式中、u が 0 である。

【0059】

特定の実施形態において、生物可逆的基が、式

【化 6】



の基またはその塩である場合、式中、 A^2 、 A^3 、および A^4 が結合して、 $C_4 \sim 5$ アルキレンを形成する。

【0060】

特定の実施形態において、生物可逆的基が、式

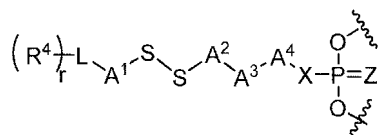
10

20

30

40

【化 7】



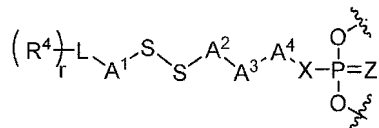
の基またはその塩である場合、式中、 A^2 、 A^3 、および A^4 が結合して、 $C_4 \sim 5$ アルキレンを形成する。

【0061】

他の実施形態において、生物可逆的基が、式

10

【化 8】



の基またはその塩である場合、基 $-A^2 - A^3 - A^4 - X-$ は、リン酸塩、アミド、エステル、またはアルケニレンを含まない。

【0062】

いくつかの実施形態において、各 X が O である。特定の実施形態において、各 Z が O である。

20

【0063】

本発明のいずれかの態様のいくつかの実施形態において、全てのヌクレオシドが、リボヌクレオシドであり、例えば、ここで、各リボヌクレオチドの $2'$ 位が、 F 、 $-OMe$ 、または $-O-Et-O-Me$ のいずれかで置換される。

【0064】

定義

本明細書において使用される際の「約」という用語は、記載される値の $\pm 10\%$ の値を表す。

【0065】

本明細書において使用される際の「活性化カルボニル」という用語は、 $-C(O)R^A$ (式中、 R^A が、ハロゲン、任意選択的に置換される $C_1 \sim 6$ アルコキシ、任意選択的に置換される $C_6 \sim 10$ アリールオキシ、任意選択的に置換される $C_2 \sim 9$ ヘテロアリールオキシ (例えば、 $-OBt$)、任意選択的に置換される $C_2 \sim C_9$ ヘテロシクリルオキシ (例えば、 $-OSu$)、任意選択的に置換されるピリジニウム (例えば、4-ジメチルアミノピリジニウム)、または $-N(OMe)Me$ である) の式で表される官能基を表す。

30

【0066】

本明細書において使用される際の「活性化リン中心」という用語は、置換基の少なくとも1つが、ハロゲン、任意選択的に置換される $C_1 \sim 6$ アルコキシ、任意選択的に置換される $C_6 \sim 10$ アリールオキシ、リン酸塩、二リン酸塩、三リン酸塩、四リン酸塩、任意選択的に置換されるピリジニウム (例えば、4-ジメチルアミノピリジニウム)、または任意選択的に置換されるアンモニウムである、三価リン (III) または五価リン (V) 中心を表す。

40

【0067】

本明細書において使用される際の「活性化ケイ素中心」という用語は、置換基の少なくとも1つが、ハロゲン、任意選択的に置換される $C_1 \sim 6$ アルコキシ、またはアミノである、四置換ケイ素中心を表す。

【0068】

本明細書において使用される際の「活性化硫黄中心」という用語は、置換基の少なくとも1つが、ハロゲン、任意選択的に置換される $C_1 \sim 6$ アルコキシ、任意選択的に置換される $C_6 \sim 10$ アリールオキシ、リン酸塩、二リン酸塩、三リン酸塩、四リン酸塩、任意

50

選択的に置換されるピリジニウム（例えば、4-ジメチルアミノピリジニウム）、または任意選択的に置換されるアンモニウムである、四価硫黄を表す。

【0069】

本明細書において使用される際の「アルカノイル」という用語は、カルボニル基を介して親分子基に結合された水素またはアルキル基（例えば、ハロアルキル基）を表し、ホルミル（すなわち、カルボキシアルデヒド基）、アセチル、プロピオニル、ブチリル、イソブチリルなどによって例示される。例示的な非置換アルカノイル基は、1～7個の炭素を含む。ある実施形態において、アルキル基は、本明細書に記載される1つ、2つ、3つ、または4つの置換基でさらに置換される。

【0070】

本明細書において使用される際の「(C_{x1}～y₁ アリール) - C_{x2}～y₂ - アルキル」という用語は、x₂～y₂個の炭素原子のアルキレン基を介して親分子基に結合されたx₁～y₁個の炭素原子のアリール基を表す。例示的な非置換(C_{x1}～y₁ アリール) - C_{x2}～y₂ - アルキル基は、7～16個の炭素である。ある実施形態において、アルキレンおよびアリールはそれぞれ、それぞれの基について本明細書において定義される1つ、2つ、3つ、または4つの置換基でさらに置換され得る。「アルキル」が後ろに続く他の基が同様に定義され、ここで、「アルキル」は、特に断りのない限り、C₁～₆アルキレンを指し、結合される化学構造は、本明細書において定義されるとおりである。

【0071】

本明細書において使用される際の「アルケニル」という用語は、1つ、2つ、または3つの炭素-炭素二重結合を含有する非環式一価直鎖状または分枝鎖状炭化水素基を表す。アルケニル基の非限定的な例としては、エテニル、プロパー-1-エニル、プロパー-2-エニル、1-メチルエテニル、ブター-1-エニル、ブター-2-エニル、ブター-3-エニル、1-メチルプロパー-1-エニル、2-メチルプロパー-1-エニル、および1-メチルプロパー-2-エニルが挙げられる。アルケニル基は、本明細書において定義されるアリール、シクロアルキル、ヘテロシクリル（例えば、ヘテロアリール）、およびアルキルについて記載される置換基からなる群から独立して選択される1つ、2つ、3つ、または4つの置換基で任意選択的に置換され得る。さらに、アルケニル基が、本発明の生物可逆的基中に存在する場合、それは、本明細書において定義される共役部分、親水性官能基、または補助部分に結合されるチオエステルまたはジスルフィド基で置換され得る。

【0072】

本明細書において使用される際の「アルケニレン」という用語は、1個の水素が除去され、それによって二価になった直鎖状または分枝鎖状アルケニル基を指す。アルケニレン基の非限定的な例としては、エテン-1, 1-ジイル；エテン-1, 2-ジイル；プロパー-1-エン-1, 1-ジイル、プロパー-2-エン-1, 1-ジイル；プロパー-1-エン-1, 2-ジイル、プロパー-1-エン-1, 3-ジイル；プロパー-2-エン-1, 1-ジイル；プロパー-2-エン-1, 2-ジイル；ブター-1-エン-1, 1-ジイル；ブター-1-エン-1, 2-ジイル；ブター-1-エン-1, 3-ジイル；ブター-1-エン-1, 4-ジイル；ブター-2-エン-1, 1-ジイル；ブター-2-エン-1, 2-ジイル；ブター-2-エン-1, 3-ジイル；ブター-2-エン-1, 4-ジイル；ブター-2-エン-2, 3-ジイル；ブター-3-エン-1, 1-ジイル；ブター-3-エン-1, 2-ジイル；ブター-3-エン-1, 3-ジイル；ブター-3-エン-2, 3-ジイル；ブター-1, 2-ジエン-1, 1-ジイル；ブター-1, 2-ジエン-1, 3-ジイル；ブター-1, 2-ジエン-1, 4-ジイル；ブター-1, 3-ジエン-1, 1-ジイル；ブター-1, 3-ジエン-1, 2-ジイル；ブター-1, 3-ジエン-1, 3-ジイル；ブター-1, 3-ジエン-1, 4-ジイル；ブター-1, 3-ジエン-2, 3-ジイル；ブター-2, 3-ジエン-1, 1-ジイル；およびブター-2, 3-ジエン-1, 2-ジイルが挙げられる。アルケニレン基は、アルケニル基について記載されるように非置換であってもまたは置換されていてもよい（例えば、任意選択的に置換されるアルケニレン）。

【0073】

本明細書において使用される際の「アルコキシ」という用語は、特に規定されない限り、式-O R（式中、Rが、 $C_1 \sim 6$ アルキル基である）の化学置換基を表す。ある実施形態において、アルキル基は、本明細書において定義される1つ、2つ、3つ、または4つの置換基でさらに置換され得る。

【0074】

本明細書において使用される際の「アルキル」という用語は、特に規定されない限り、1～12個の炭素を有する非環式直鎖状または分枝鎖状飽和炭化水素基を指す。アルキル基は、メチル；エチル； n -およびイソプロピル； n -、*sec*-、イソ-および*tert*-ブチル；ネオペンチルなどによって例示され、（1）アルコキシ；（2）アルキルスルフィニル；（3）アミノ；（4）アリールアルコキシ；（5）（アリールアルキル）アザ；（6）アジド；（7）ハロ；（8）（ヘテロシクリル）オキシ；（9）（ヘテロシクリル）アザ；（10）ヒドロキシ；（11）ニトロ；（12）オキソ；（13）アリーロキシ；（14）スルフィド；（15）チオアルコキシ；（16）チオール；（17）-CO₂R^A（ここで、R^Aが、（a）アルキル、（b）アリール、（c）水素、および（d）アリールアルキルからなる群から選択される）；（18）-C(O)NR^BR^C（ここで、R^BおよびR^Cのそれぞれが、独立して、（a）水素、（b）アルキル、（c）アリール、および（d）アリール-アルキレンからなる群から選択される）；（19）-SO₂R^D（ここで、R^Dが、（a）アルキル、（b）アリール、および（c）アリール-アルキレンからなる群から選択される）；（20）-SO₂NR^ER^F（ここで、R^EおよびR^Fのそれぞれが、独立して、（a）水素、（b）アルキル、（c）アリールおよび（d）アリールアルキルからなる群から選択される）；（21）シリル；（22）シアノ；および（23）-S(O)R^H（ここで、R^Hが、（a）水素、（b）アルキル、（c）アリール、および（d）アリールアルキルからなる群から選択される）からなる群から独立して選択される1つ、2つ、3つ、または、2個以上の炭素のアルキル基の場合、4つの置換基で任意選択的に置換され得る。ある実施形態において、これらの基のそれぞれが、本明細書に記載されるようにさらに置換され得る。いくつかの実施形態において、親分子基に結合するアルキル炭素原子は、オキソ置換されない。

【0075】

本明細書において使用される際の「アルキレン」という用語は、少なくとも2個の水素原子の除去によって直鎖状または分枝鎖状飽和炭化水素から誘導される飽和二価、三価、または四価炭化水素基を指す。アルキレンは、任意選択の置換基ではない1つのアザ基に結合される場合、三価であり得；アルキレンは、任意選択の置換基ではない2つのアザ基に結合される場合、三価または四価であり得る。本明細書において定義されるアルキレンの原子価は、任意選択の置換基を含まない。アルキレン基の非限定的な例としては、メチレン、エタン-1，2-ジイル、エタン-1，1-ジイル、プロパン-1，3-ジイル、プロパン-1，2-ジイル、プロパン-1，1-ジイル、プロパン-2，2-ジイル、ブタン-1，4-ジイル、ブタン-1，3-ジイル、ブタン-1，2-ジイル、ブタン-1，1-ジイル、およびブタン-2，2-ジイル、ブタン-2，3-ジイルが挙げられる。「C_x～yアルキレン」という用語は、 $x \sim y$ 個の炭素を有するアルキレン基を表す。 x の例示的な値は、1、2、3、4、5、および6であり、 y の例示的な値は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、および12である。ある実施形態において、アルキレンは、アルキル基について本明細書において定義される1つ、2つ、3つ、または4つの置換基でさらに置換され得る。同様に、「エン（ene）」という接尾辞は、本明細書において定義される対応する一価基の二価基を示す。例えば、アルケニレン、アルキニレン、アリーレン、アリールアルキレン、シクロアルキレン、シクロアルキルアルキレン、シクロアルケニレン、ヘテロアリーレン、ヘテロアリールアルキレン、ヘテロシクリレン、およびヘテロシクリルアルキレンが、アルケニル、アルキニル、アリール、アリールアルキル、シクロアルキル、シクロアルキルアルキルシクロアルケニル、ヘテロアリール、ヘテロアリールアルキル、ヘテロシクリル、およびヘテロシクリルアルキルの二価形態である。アリールアルキレン、シクロアルキルアルキレン、ヘテロアリールアルキレン、お

よびヘテロシクリルアルキレンの場合、この基における2つの原子価は、非環式部分のみに位置するか、または1つは環式部分におよび1つは非環式部分に位置し得る。さらに、アルキルもしくはアルキレン、アルケニルもしくはアルケニレン、またはアルキニルもしくはアルキニレン基が、生物可逆的または生物不可逆的中に存在する場合、それは、本明細書において定義される共役部分、親水性官能基、または補助部分に結合されるエステル、チオエステル、またはジスルフィド基で置換され得る。例えば、アリールーC₁-アルキレンまたはヘテロシクリルーC₁-アルキレンのアルキレン基は、オキシ基でさらに置換されて、それぞれのアリーロイルおよび（ヘテロシクリル）オイル置換基が得られる。

【0076】

本明細書において使用される際の「アルキレンオキシ」という用語は、二価基-R-O-（ここで、Rがアルキレンである）を指す。

10

【0077】

本明細書において使用される際の「アルキニル」という用語は、少なくとも1つの炭素-炭素三重結合を含有する2~6個の炭素原子の一価直鎖状または分枝鎖状炭化水素基を表し、エチニル、1-プロピニルなどによって例示される。アルキニル基は、本明細書において定義されるアリール、アルケニル、シクロアルキル、ヘテロシクリル（例えば、ヘテロアリール）、およびアルキルについて記載される置換基から独立して選択される1つ、2つ、3つ、または4つの置換基で任意選択的に置換され得る。

【0078】

本明細書において使用される際の「アルキニレン」という用語は、1つまたは2つの炭素-炭素三重結合を含み、非置換である場合、CおよびHのみを含有する直鎖状または分枝鎖状二価置換基を指す。アルケニレン基の非限定的な例としては、エチン-1, 2-ジイル；プロパー-1-イン-1, 3-ジイル；プロパー-2-イン-1, 1-ジイル；ブター-1-イン-1, 3-ジイル；ブター-1-イン-1, 4-ジイル；ブター-2-イン-1, 1-ジイル；ブター-2-イン-1, 4-ジイル；ブター-3-イン-1, 1-ジイル；ブター-3-イン-1, 2-ジイル；ブター-3-イン-2, 2-ジイル；およびブター-1, 3-ジイン-1, 4-ジイルが挙げられる。アルキニレン基は、アルキニル基について記載されるように非置換であってもまたは置換されていてもよい（例えば、任意選択的に置換されるアルキニレン）。

20

【0079】

本明細書において使用される際の「アミノ」という用語は、-N(R^{N1})₂または-N(R^{N1})C(NR^{N1})N(R^{N1})₂を表し、式中、各R^{N1}が、独立して、H、OH、NO₂、N(R^{N2})₂、SO₂OR^{N2}、SO₂R^{N2}、SOR^{N2}、N-保護基、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、アリール、アリールーアルキル、シクロアルキル、シクロアルキルアルキル、ヘテロシクリル（例えば、ヘテロアリール）、ヘテロシクリルアルキル（例えば、ヘテロアリールアルキル）であり、または2つのR^{N1}が結合して、ヘテロシクリルを形成し、各R^{N2}が、独立して、H、アルキル、またはアリールである。一実施形態において、アミノは、-NH₂、または-NHR^{N1}であり、ここで、R^{N1}が、独立して、OH、NO₂、NH₂、NR^{N2}₂、SO₂OR^{N2}、SO₂R^{N2}、SOR^{N2}、アルキル、またはアリールであり、各R^{N2}が、H、アルキル、またはアリールであり得る。各R^{N1}基は、独立して、本明細書に記載されるように非置換であってもまたは置換されていてもよい。さらに、アミノ基が、本発明の生物可逆的基中に存在する場合、それは、本明細書において定義される共役部分、親水性官能基、または補助部分に結合されるエステル、チオエステル、またはジスルフィド基で置換され得る。

30

40

【0080】

本明細書において使用される際の「抗体」という用語は、最も広い意味で使用され、具体的には、例えば、単一のモノクローナル抗体、ポリエピトープ特異性（polyepitopic specificity）を有する抗体組成物、一本鎖抗体、および抗体の断片（例えば、抗原結合断片またはFc領域）を包含する。本明細書において使用される

50

際の「抗体」は、それらが、抗原を認識し、および／または本明細書に記載される所望のアゴニストまたはアンタゴニスト特性のいずれかを示す限り、インタクトな免疫グロブリンまたは抗体分子、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（すなわち、少なくとも2つのインタクトな抗体から形成される二重特異性抗体）および免疫グロブリン断片（F a b、F（a b'）₂、またはF vなど）を含む。抗体または断片は、ヒト化、ヒト、またはキメラ抗体または断片であり得る。

【0081】

本明細書において使用される際の「アリール」という用語は、1つまたは2つの芳香環を有する単環式、二環式、または多環式炭素環系を表し、フェニル、ナフチル、1, 2-ジヒドロナフチル、1, 2, 3, 4-テトラヒドロナフチル、フルオレニル、インダニル、インデニルなどによって例示され、(1) アルカノイル（例えば、ホルミル、アセチルなど）；(2) アルキル（例えば、アルコキシアルキル、アルキルスルフィニルアルキル、アミノアルキル、アジドアルキル、アシルアルキル、ハロアルキル（例えば、ペルフルオロアルキル）、ヒドロキシアルキル、ニトロアルキル、またはチオアルコキシアルキル）；(3) アルケニル；(4) アルキニル；(5) アルコキシ（例えば、ペルフルオロアルコキシ）；(6) アルキルスルフィニル；(7) アリール；(8) アミノ；(9) アリールアルキル；(10) アジド；(11) シクロアルキル；(12) シクロアルキルアルキル；(13) シクロアルケニル；(14) シクロアルケニルアルキル；(15) ハロ；(16) ヘテロシクリル（例えば、ヘテロアリール）；(17) (ヘテロシクリル) オキシ；(18) (ヘテロシクリル) アザ；(19) ヒドロキシ；(20) ニトロ；(21) チオアルコキシ；(22) $-(CH_2)_q CO_2 R^A$ （ここで、qが、0～4の整数であり、R^Aが、(a) アルキル、(b) アリール、(c) 水素、および(d) アリールアルキルからなる群から選択される）；(23) $-(CH_2)_q CONR^B R^C$ （ここで、qが、0～4の整数であり、R^BおよびR^Cが、独立して、(a) 水素、(b) アルキル、(c) アリール、および(d) アリールアルキルからなる群から選択される）；(24) $-(CH_2)_q SO_2 R^D$ （ここで、qが、0～4の整数であり、R^Dが、(a) アルキル、(b) アリール、および(c) アリールアルキルからなる群から選択される）；(25) $-(CH_2)_q SO_2 NR^E R^F$ （ここで、qが、0～4の整数であり、R^EおよびR^Fのそれぞれが、独立して、(a) 水素、(b) アルキル、(c) アリール、および(d) アリールアルキルからなる群から選択される）；(26) チオール；(27) アリールオキシ；(28) シクロアルコキシ；(29) アリールアルコキシ；(30) ヘテロシクリルアルキル（例えば、ヘテロアリールアルキル）；(31) シリル；(32) シアノ；および(33) $-S(O)R^H$ （ここで、R^Hが、(a) 水素、(b) アルキル、(c) アリール、および(d) アリールアルキルからなる群から選択される）からなる群から独立して選択される1つ、2つ、3つ、4つ、または5つの置換基で任意選択的に置換され得る。ある実施形態において、これらの基のそれぞれが、本明細書に記載されるようにさらに置換され得る。さらに、アリール基が、本発明の生物可逆的基中に存在する場合、それは、本明細書において定義される共役部分、親水性官能基、または補助部分に結合されるエステル、チオエステル、またはジスルフィド基で置換され得る。

【0082】

本明細書において使用される際の「アリールアルキル」という用語は、アリール基で置換されたアルキル基を表す。アリールおよびアルキル部分は、本明細書に記載されるように、個々の基として置換され得る。

【0083】

「補助部分」という用語は、本明細書に開示されるヌクレオチド構築物に結合され得る、小分子、ポリペプチド、炭水化物、中性有機ポリマー、正荷電ポリマー、治療剤、標的化部分、エンドソームエスケープ部分、およびそれらの任意の組合せを含むがこれらに限定されない任意の部分の指す。一般に、ただし必ずしも当てはまるわけではないが、「補助部分」は、ジスルフィド生物可逆的基または生物不可逆的基上に存在する1つまたは複数の共役基に対する1つまたは複数の共有結合を形成することによって、本明細書に開示

されるヌクレオチド構築物に連結または結合される。しかしながら、代替的な実施形態において、「補助部分」は、ヌクレオチド糖分子の2'、3'、もしくは5'位などのジスルフィド生物可逆的基、または核酸塩基の任意の部分に存在する共役基に加えて、ヌクレオチド構築物の任意の部分に対する1つまたは複数の共有結合を形成することによって、本明細書に開示されるヌクレオチド構築物に連結または結合され得る。特定の補助部分の名称が、遊離分子を意味することがあるが、このような遊離分子が、ヌクレオチド構築物に結合されることが理解されよう。当業者は、ヌクレオチド構築物に対する特定の補助部分の適切な結合点を容易に理解するであろう。

【0084】

本明細書において使用される際の「アザ」という用語は、二価 $-N(R^{N1})-$ 基または三価 $-N=$ 基を表す。アザ基は、 R^{N1} がHであるかもしくは存在しない場合、非置換であってもよく、または R^{N1} が「アミノ」について定義されるとおりである場合、置換されていてもよい。アザは、「N」、例えば、「任意選択的に置換されるN」と呼ばれることもある。2つのアザ基は、連結されて、「ジアザ」が形成され得る。

【0085】

本明細書において使用される際の「アジド」という用語は、 N_3 基を表す。

【0086】

本明細書において使用される際の「生物可逆的基」という用語は、例えば、1つまたは複数の細胞内酵素（例えば、細胞内レダクターゼ）の作用を介して細胞内で能動的に切断され得るか、またはこの基を、細胞内環境もしくは細胞内に存在する条件（例えば、pH、還元もしくは酸化環境、またはグルタチオンなどの細胞内種との反応）に曝露することなどによって、細胞内で受動的に切断され得る官能基を含む部分を表す。生物可逆的基は、その中に、ポリヌクレオチドのリン酸塩またはホスホロチオエートを組み込む。例示的な生物可逆的基としては、ジスルフィドが挙げられる。他の例示的な生物可逆的基としては、チオエステルが挙げられる。

【0087】

本明細書において使用される際の「嵩高い基」という用語は、本明細書において定義される任意の置換基または置換基の群を表し、嵩高い基のラジカルは、ラジカルが sp^3 混成炭素である場合、1個以下の水素原子を保有し、ラジカルが sp^2 混成炭素である場合、水素原子を保有しない。ラジカルは、 sp 混成炭素ではない。嵩高い基は、炭素原子を介してのみ別の基に結合する。例えば、「ジスルフィド結合に結合された嵩高い基」、「ジスルフィド結合に結合された嵩高い基」、および「ジスルフィド結合に連結された嵩高い基」という表現は、嵩高い基が、炭素ラジカルを介してジスルフィド結合に結合されることを示す。

【0088】

本明細書において使用される際の「カルベン」という用語は、6個の価電子および構造 $=C$ ：または $-C(R^B)$ を有する二価炭素種である官能基を表し：式中、 R^B が、H、任意選択的に置換される $C_{1\sim12}$ アルキル、任意選択的に置換される $C_{6\sim14}$ アリール、任意選択的に置換される $(C_{6\sim14}$ アリール) $-C_{1\sim12}$ -アルキレン、または任意選択的に置換されるカルボニルから選択され；Cが、共有結合の一部ではない2つの電子を有する炭素である。2つの電子は、対形成していても（例えば、一重項カルベン）または対形成していなくてもよい（例えば、三重項カルベン）。

【0089】

本明細書において使用される際の「炭素環式」という用語は、任意選択的に置換される $C_{3\sim12}$ 単環式、二環式、または三環式構造を表し、ここで、環（芳香族または非芳香族であり得る）は、炭素原子によって形成される。炭素環式構造としては、シクロアルキル、シクロアルケニル、およびアリール基が挙げられる。

【0090】

本明細書において使用される際の「炭水化物」という用語は、酸素、窒素または硫黄原子が各炭素原子に結合された少なくとも5個の炭素原子（直鎖状、分枝鎖状または環状で

10

20

30

40

50

あり得る)を有する1つまたは複数の単糖単位を含む化合物を表す。したがって、「炭水化物」という用語は、単糖、二糖、三糖、四糖、オリゴ糖、および多糖を包含する。代表的な炭水化物としては、糖類(約4~9つの単糖単位を含有する単糖、二糖、三糖およびオリゴ糖)、ならびにデンプン、グリコーゲン、セルロースおよび多糖ガムなどの多糖類が挙げられる。具体的な単糖としては、 $C_5 \sim 6$ 糖が挙げられ;二糖および三糖としては、2つまたは3つの単糖単位(例えば、 $C_5 \sim 6$ 糖)を有する糖が挙げられる。

【0091】

本明細書において使用される際の「カルボニル」という用語は、 $C(O)$ 基を表す。「カルボニル」を含む官能基の例としては、エステル、ケトン、アルデヒド、無水物、塩化アシル、アミド、カルボン酸、およびカルボン酸塩が挙げられる。

10

【0092】

本明細書において使用される際の、ポリヌクレオチドに関連する「相補的」という用語は、ワトソン・クリック相補的を意味する。

【0093】

本明細書において使用される際の「カップリング反応の成分」という用語は、カップリング反応に関与することができる分子種を表す。カップリング反応の成分としては、ヒドリドシラン、アルケン、およびアルキンが挙げられる。

【0094】

本明細書において使用される際の「環状付加反応の成分」という用語は、環状付加反応に関与することができる分子種を表す。結合形成が $[4n+2]$ 個の π 電子(ここで、 n が1である)を必要とする環状付加反応において、1つの成分が、 2π 電子を提供し、別の成分が、 4π 電子を提供する。 2π 電子を提供する環状付加反応の代表的な成分としては、アルケンおよびアルキンが挙げられる。 4π 電子を提供する環状付加反応の代表的な成分としては、1,3-ジエン、 α, β -不飽和カルボニル、およびアジドが挙げられる。

20

【0095】

本明細書において使用される際の「共役基」という用語は、1つまたは複数の共役部分を含有する二価以上の原子価の基を表す。共役基は、1つまたは複数の補助部分を、生物可逆的基(例えば、ジスルフィド部分を含有する基)に連結する。

【0096】

本明細書において使用される際の「共役部分」という用語は、適切な条件下で、別の基(例えば、求核剤、求電子剤、環状付加反応における成分、またはカップリング反応における成分である官能基)に対する1つまたは複数の共有結合を形成することができる官能基を表す。この用語は、結合反応の残基、例えば、アミド基も指す。このような基の例が、本明細書に示されている。

30

【0097】

本明細書において使用される際の「カップリング反応」という用語は、1つの成分が $Si-H$ または $C-H$ などの非極性 σ 結合を含み、第2の成分がアルケンまたはアルキンなどの π 結合を含む、2つの成分の反応であって、 $C-H$ 、 $Si-C$ 、もしくは $C-C$ 結合を形成する π 結合を介した σ 結合の正味付加または2つの成分間の単一の共有結合の形成のいずれかをもたらす反応を表す。1つのカップリング反応は、アルケンを経由した $Si-H$ の付加(ヒドロシリル化としても知られている)である。他のカップリング反応としては、スティルカップリング、鈴木カップリング、菌頭カップリング、檜山カップリング、およびヘック反応が挙げられる。カップリング反応を促進するために、触媒が使用され得る。典型的な触媒は、 $Fe(II)$ 、 $Cu(I)$ 、 $Ni(0)$ 、 $Ni(II)$ 、 $Pd(0)$ 、 $Pd(II)$ 、 $Pd(IV)$ 、 $Pt(0)$ 、 $Pt(II)$ 、または $Pt(IV)$ を含むものである。

40

【0098】

本明細書において使用される際の「環状付加反応」という用語は、活性化がないか、化学触媒による活性化、または熱エネルギーを用いた活性化のいずれかがあり、 n が、1、

50

2、または3であるとき、 $[4n+2]$ 個の π 電子が結合形成に関与する、2つの成分の反応を表す。環状付加反応はまた、 $[4n]$ 個の π 電子が関与し、光化学活性化があり、 n が、1、2、または3である、2つの成分の反応である。望ましくは、 $[4n+2]$ 個の π 電子が結合形成に関与し、 $n=1$ である。代表的な環状付加反応としては、1, 3-ジエンとのアルケンの反応（ディールス・アルダー反応）、 α , β -不飽和カルボニルとのアルケンの反応（ヘテロディールス・アルダー反応（hetero Diels-Alder reaction））、およびアジド化合物とのアルキンの反応（ヒュスゲン環状付加）が挙げられる。

【0099】

本明細書において使用される際の「シクロアルケニル」という用語は、特に規定されない限り、3～10個の炭素を有する非芳香族炭素環式基（例えば、 $C_3 \sim C_{10}$ シクロアルキレン）を指す。シクロアルケニルの非限定的な例としては、シクロプロパー-1-エニル、シクロプロパー-2-エニル、シクロブター-1-エニル、シクロブター-2-エニル、シクロペンター-1-エニル、シクロペンター-2-エニル、シクロペンター-3-エニル、ノルボルネン-1-イル、ノルボルネン-2-イル、ノルボルネン-5-イル、およびノルボルネン-7-イルが挙げられる。シクロアルケニル基は、シクロアルキルについて記載されるように非置換であってもまたは置換されていてもよい（例えば、任意選択的に置換されるシクロアルケニル）。

【0100】

本明細書において使用される際の「シクロアルケニレン」という用語は、特に規定されない限り、3～10個の炭素を有する二価炭素環式非芳香族基（例えば、 $C_3 \sim C_{10}$ シクロアルケニレン）を指す。シクロアルケニレンの非限定的な例としては、シクロプロパー-1-エン-1, 2-ジイル；シクロプロパー-2-エン-1, 1-ジイル；シクロプロパー-2-エン-1, 2-ジイル；シクロブター-1-エン-1, 2-ジイル；シクロブター-1-エン-1, 3-ジイル；シクロブター-1-エン-1, 4-ジイル；シクロブター-2-エン-1, 1-ジイル；シクロブター-2-エン-1, 4-ジイル；シクロペンター-1-エン-1, 2-ジイル；シクロペンター-1-エン-1, 3-ジイル；シクロペンター-1-エン-1, 4-ジイル；シクロペンター-1-エン-1, 5-ジイル；シクロペンター-2-エン-1, 1-ジイル；シクロペンター-2-エン-1, 4-ジイル；シクロペンター-2-エン-1, 5-ジイル；シクロペンター-3-エン-1, 1-ジイル；シクロペンター-1, 3-ジエン-1, 2-ジイル；シクロペンター-1, 3-ジエン-1, 3-ジイル；シクロペンター-1, 3-ジエン-1, 4-ジイル；シクロペンター-1, 3-ジエン-1, 5-ジイル；シクロペンター-1, 3-ジエン-5, 5-ジイル；ノルボルナジエン-1, 2-ジイル；ノルボルナジエン-1, 3-ジイル；ノルボルナジエン-1, 4-ジイル；ノルボルナジエン-1, 7-ジイル；ノルボルナジエン-2, 3-ジイル；ノルボルナジエン-2, 5-ジイル；ノルボルナジエン-2, 6-ジイル；ノルボルナジエン-2, 7-ジイル；およびノルボルナジエン-7, 7-ジイルが挙げられる。シクロアルケニレンは、シクロアルキルについて記載されるように非置換であってもまたは置換されていてもよい（例えば、任意選択的に置換されるシクロアルケニレン）。

【0101】

本明細書において使用される際の「シクロアルキル」という用語は、特に規定されない限り、3～10個の炭素を有する環状アルキル基（例えば、 $C_3 \sim C_{10}$ シクロアルキル）を指す。シクロアルキル基は、単環式または二環式であり得る。二環式シクロアルキル基は、ビスクロ [p. q. 0] アルキルタイプのものであってもよく、ここで、p および q のそれぞれが、独立して、1、2、3、4、5、6、または7であり、ただし、p および q の和が、2、3、4、5、6、7、または8である。あるいは、二環式シクロアルキル基は、架橋シクロアルキル構造、例えば、ビスクロ [p. q. r] アルキルを含んでもよく、ここで、r が、1、2、または3であり、p および q のそれぞれが、独立して、1、2、3、4、5、または6であり、ただし、p、q、および r の和が、3、4、5、6、7、または8である。シクロアルキル基は、スピロ環式基、例えば、スピロ [p. q]

アルキルであってもよく、ここで、p および q のそれぞれが、独立して、2、3、4、5、6、または7であり、ただし、p および q の和が、4、5、6、7、8、または9である。シクロアルキルの非限定的な例としては、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、1-ビシクロ [2. 2. 1.] ヘプチル、2-ビシクロ [2. 2. 1.] ヘプチル、5-ビシクロ [2. 2. 1.] ヘプチル、7-ビシクロ [2. 2. 1.] ヘプチル、およびデカリニルが挙げられる。シクロアルキル基は、本明細書において定義されるように非置換であってもまたは置換されていてもよい（例えば、任意選択的に置換されるシクロアルキル）。本開示のシクロアルキル基は、(1) アルカノイル（例えば、ホルミル、アセチルなど）；(2) アルキル（例えば、アルコキシアルキル、アルキルスルフィニルアルキル、アミノアルキル、アジドアルキル、アシルアルキル、ハロアルキル（例えば、ペルフルオロアルキル）、ヒドロキシアルキル、ニトロアルキル、またはチオアルコキシアルキル）；(3) アルケニル；(4) アルキニル；(5) アルコキシ（例えば、ペルフルオロアルコキシ）；(6) アルキルスルフィニル；(7) アリール；(8) アミノ；(9) アリールアルキル；(10) アジド；(11) シクロアルキル；(12) シクロアルキルアルキル；(13) シクロアルケニル；(14) シクロアルケニルアルキル；(15) ハロ；(16) ヘテロシクリル（例えば、ヘテロアリール）；(17) (ヘテロシクリル) オキシ；(18) (ヘテロシクリル) アザ；(19) ヒドロキシ；(20) ニトロ；(21) チオアルコキシ；(22) $-(CH_2)_q CO_2 R^A$ （ここで、q が、0~4の整数であり、 R^A が、(a) アルキル、(b) アリール、(c) 水素、および (d) アリールアルキルからなる群から選択される）；(23) $-(CH_2)_q CONR^B R^C$ （ここで、q が、0~4の整数であり、 R^B および R^C が、独立して、(a) 水素、(b) アルキル、(c) アリール、および (d) アリールアルキルからなる群から選択される）；(24) $-(CH_2)_q SO_2 R^D$ （ここで、q が、0~4の整数であり、 R^D が、(a) アルキル、(b) アリール、および (c) アリールアルキルからなる群から選択される）；(25) $-(CH_2)_q SO_2 NR^E R^F$ （ここで、q が、0~4の整数であり、 R^E および R^F のそれぞれが、独立して、(a) 水素、(b) アルキル、(c) アリール、および (d) アリールアルキルからなる群から選択される）；(26) チオール；(27) アリールオキシ；(28) シクロアルコキシ；(29) アリールアルコキシ；(30) ヘテロシクリルアルキル（例えば、ヘテロアリールアルキル）；(31) シリル；(32) シアノ；および (33) $-S(O)R^H$ （ここで、 R^H が、(a) 水素、(b) アルキル、(c) アリール、および (d) アリールアルキルからなる群から選択される）で任意選択的に置換され得る。ある実施形態において、これらの基のそれぞれが、本明細書に記載されるようにさらに置換され得る。

【0102】

本明細書において使用される際の「シクロアルキルアルキル」という用語は、シクロアルキル基で置換されたアルキル基を表す。シクロアルキルおよびアルキル部分は、本明細書に記載されるように、個々の基として置換され得る。

【0103】

本明細書において使用される際の「求電子剤」または「求電子基」という用語は、電子が豊富な中心に求引され、1つまたは複数の共有結合を形成するように、1つまたは複数の求核剤から電子対を受け取ることができる官能基を表す。求電子剤としては、限定はされないが、カチオン；分極中性分子；ニトレン；アジドなどのニトレン前駆体；カルベン；カルベン前駆体；活性化ケイ素中心；活性化カルボニル；ハロゲン化アルキル；擬ハロゲン化アルキル；エポキシド；電子不足アリール；活性化リン中心；および活性化硫黄中心が挙げられる。典型的に見られる求電子剤としては、 H^+ および NO^+ などのカチオン、 HCl などの分極中性分子、ハロゲン化アルキル、ハロゲン化アシル、アルデヒドなどのカルボニル含有化合物、ならびにメシレート、トリフレートおよびトシレートなどの良好な脱離基に連結される原子が挙げられる。

【0104】

本明細書において使用される際の「エンドソームエスケープ部分」という用語は、エン

ドソーム内容物の放出を促進し、またはエンドソームなどの内部細胞コンパートメントからの分子の脱出を可能にする部分を表す。

【0105】

本明細書において使用される際の「ハロ」という用語は、臭素、塩素、ヨウ素、およびフッ素から選択されるハロゲンを表す。

【0106】

本明細書において使用される際の「ハロアルキル」という用語は、ハロゲン基（すなわち、F、Cl、Br、またはI）で置換される、本明細書において定義されるアルキル基を表す。ハロアルキルは、1個、2個、3個、または、2個以上の炭素のアルキル基の場合、4個のハロゲンで置換されてもよく、または、ハロゲン基がFである場合、ハロアルキル基は、ペルフルオロアルキルであり得る。ある実施形態において、ハロアルキル基は、アルキル基について記載されるように、1つ、2つ、3つ、または4つの置換基でさらに任意選択的に置換され得る。

10

【0107】

本明細書において使用される際の「ヘテロアリール」という用語は、芳香族である、本明細書において定義されるヘテロシクリルのサブセット（すなわち、それらは、単環式または多環式環系内に $4n+2$ 個の π 電子を含有する）を表す。一実施形態において、ヘテロアリールは、ヘテロシクリル基について定義されるように、1つ、2つ、3つ、または4つの置換基で置換される。

【0108】

20

本明細書において使用される際の「ヘテロアリールアルキル」という用語は、ヘテロアリール基で置換されたアルキル基を表す。ヘテロアリールおよびアルキル部分は、本明細書に記載されるように、個々の基として置換され得る。

【0109】

本明細書において使用される際の「ヘテロシクリル」という用語は、特に規定されない限り、窒素、酸素、および硫黄を含む群から独立して選択される1個、2個、3個、または4個のヘテロ原子を含有する、5員、6員または7員環を表す。5員環は、0～2個の二重結合を有し、6員および7員環は、0～3個の二重結合を有する。特定のヘテロシクリル基は、2～9個の炭素原子を含む。他のこのような基は、最大で12個の炭素原子を含み得る。「ヘテロシクリル」という用語はまた、1つまたは複数の炭素および／またはヘテロ原子が、単環式環、例えば、キヌクリジニル基の2つの隣接していないメンバーを架橋する架橋多環式構造を有する複素環化合物を表す。「ヘテロシクリル」という用語は、上記の複素環のいずれかが、1つ、2つ、または3つの炭素環、例えば、アリール環、シクロヘキサン環、シクロヘキセン環、シクロペンタン環、シクロペンテン環、またはインドリル、キノリル、イソキノリル、テトラヒドロキノリル、ベンゾフリル、ベンゾチエニルなどの別の単環式複素環に縮合された、二環式、三環式、および四環式基を含む。縮合ヘテロシクリルの例としては、トロパンおよび1, 2, 3, 5, 8, 8a-ヘキサヒドロインドリジンが挙げられる。複素環式基としては、ピロリル、ピロリニル、ピロリジニル、ピラゾリル、ピラゾリニル、ピラゾリジニル、イミダゾリル、イミダゾリニル、イミダゾリジニル、ピリジル、ピペリジニル、ホモピペリジニル、ピラジニル、ピペラジニル、ピリミジニル、ピリダジニル、オキサゾリル、オキサゾリジニル、イソオキサゾリル、イソオキサゾリジニル、モルホリニル、チオモルホリニル、チアゾリル、チアゾリジニル、イソチアゾリル、イソチアゾリジニル、インドリル、キノリニル、イソキノリニル、ベンズイミダゾリル、ベンゾチアゾリル、ベンゾオキサゾリル、フリル、チエニル、チアゾリジニル、イソチアゾリル、イソインダゾイル、トリアゾリル、テトラゾリル、オキサジアゾリル、プリニル、チアジアゾリル（例えば、1, 3, 4-チアジアゾール）、テトラヒドロフラニル、ジヒドロフラニル、テトラヒドロチエニル、ジヒドロチエニル、ジヒドロインドリル、テトラヒドロキノリル、テトラヒドロイソキノリル、ピラニル、ジヒドロピラニル、ジチアゾリル、ベンゾフラニル、ベンゾチエニルなどが挙げられる。さらに他の例示的なヘテロシクリルとしては、2, 3, 4, 5-テトラヒドロ-2-オキソ-オキ

30

40

50

サゾリル；2，3-ジヒドロ-2-オキソ-1H-イミダゾリル；2，3，4，5-テトラヒドロ-5-オキソ-1H-ピラゾリル（例えば、2，3，4，5-テトラヒドロ-2-フェニル-5-オキソ-1H-ピラゾリル）；2，3，4，5-テトラヒドロ-2，4-ジオキソ-1H-イミダゾリル（例えば、2，3，4，5-テトラヒドロ-2，4-ジオキソ-5-メチル-5-フェニル-1H-イミダゾリル）；2，3-ジヒドロ-2-チオオキソ-1，3，4-オキサジアゾリル（例えば、2，3-ジヒドロ-2-チオオキソ-5-フェニル-1，3，4-オキサジアゾリル）；4，5-ジヒドロ-5-オキソ-1H-トリアゾリル（例えば、4，5-ジヒドロ-3-メチル-4-アミノ-5-オキソ-1H-トリアゾリル）；1，2，3，4-テトラヒドロ-2，4-ジオキソピリジニル（例えば、1，2，3，4-テトラヒドロ-2，4-ジオキソ-3，3-ジエチルピリジニル）；2，6-ジオキソ-ピペリジニル（例えば、2，6-ジオキソ-3-エチル-3-フェニルピペリジニル）；1，6-ジヒドロ-6-オキソピリジミニル（oxopyridiminy l）；1，6-ジヒドロ-4-オキソピリミジニル（例えば、2-（メチルチオ）-1，6-ジヒドロ-4-オキソ-5-メチルピリミジン-1-イル）；1，2，3，4-テトラヒドロ-2，4-ジオキソピリミジニル（例えば、1，2，3，4-テトラヒドロ-2，4-ジオキソ-3-エチルピリミジニル）；1，6-ジヒドロ-6-オキソ-ピリダジニル（例えば、1，6-ジヒドロ-6-オキソ-3-エチルピリダジニル）；1，6-ジヒドロ-6-オキソ-1，2，4-トリアジニル（例えば、1，6-ジヒドロ-5-イソプロピル-6-オキソ-1，2，4-トリアジニル）；2，3-ジヒドロ-2-オキソ-1H-インドリル（例えば、3，3-ジメチル-2，3-ジヒドロ-2-オキソ-1H-インドリルおよび2，3-ジヒドロ-2-オキソ-3，3'-スビロプロパン-1H-インドール-1-イル）；1，3-ジヒドロ-1-オキソ-2H-イソ-インドリル；1，3-ジヒドロ-1，3-ジオキソ-2H-イソ-インドリル；1H-ベンゾピラゾリル（例えば、1-（エトキシカルボニル）-1H-ベンゾピラゾリル）；2，3-ジヒドロ-2-オキソ-1H-ベンズイミダゾリル（例えば、3-エチル-2，3-ジヒドロ-2-オキソ-1H-ベンズイミダゾリル）；2，3-ジヒドロ-2-オキソ-ベンゾオキサゾリル（例えば、5-クロロ-2，3-ジヒドロ-2-オキソ-ベンゾオキサゾリル）；2，3-ジヒドロ-2-オキソ-ベンゾオキサゾリル；2-オキソ-2H-ベンゾピラニル；1，4-ベンゾジオキサニル；1，3-ベンゾジオキサニル；2，3-ジヒドロ-3-オキソ，4H-1，3-ベンゾチアジニル；3，4-ジヒドロ-4-オキソ-3H-キナゾリニル（例えば、2-メチル-3，4-ジヒドロ-4-オキソ-3H-キナゾリニル）；1，2，3，4-テトラヒドロ-2，4-ジオキソ-3H-キナゾリル（例えば、1-エチル-1，2，3，4-テトラヒドロ-2，4-ジオキソ-3H-キナゾリル）；1，2，3，6-テトラヒドロ-2，6-ジオキソ-7H-プリニル（例えば、1，2，3，6-テトラヒドロ-1，3-ジメチル-2，6-ジオキソ-7H-プリニル）；1，2，3，6-テトラヒドロ-2，6-ジオキソ-1H-プリニル（例えば、1，2，3，6-テトラヒドロ-3，7-ジメチル-2，6-ジオキソ-1H-プリニル）；2-オキソベンズ[c，d]インドリル；1，1-ジオキソ-2H-ナフト[1，8-c，d]イソチアゾリル；および1，8-ナフチレンジカルボキサミドが挙げられる。複素環式基は、式

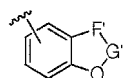
10

20

30

40

【化9】



の基も含み、式中、

F' が、-CH₂-、-CH₂O-および-O-からなる群から選択され、G' が、-C(O)-および-(C(R')(R''))_v-からなる群から選択され、ここで、R' およびR''のそれぞれが、独立して、水素または1～4個の炭素原子のアルキルからなる群から選択され、vが1～3であり、1，3-ベンゾジオキサニル、1，4-ベンゾジオ

50

キサニルなどの基を含む。本明細書に記載されるヘテロシクリル基のいずれも、(1) アルカノイル (例えば、ホルミル、アセチルなど) ; (2) アルキル (例えば、アルコキシアルキレン、アルキルスルフィニルアルキレン、アミノアルキレン、アジドアルキレン、アシルアルキレン、ハロアルキレン (例えば、ペルフルオロアルキル)、ヒドロキシアルキレン、ニトロアルキレン、またはチオアルコキシアルキレン) ; (3) アルケニル ; (4) アルキニル ; (5) アルコキシ (例えば、ペルフルオロアルコキシ) ; (6) アルキルスルフィニル ; (7) アリール ; (8) アミノ ; (9) アリールーアルキレン ; (10) アジド ; (11) シクロアルキル ; (12) シクロアルキルーアルキレン ; (13) シクロアルケニル ; (14) シクロアルケニルーアルキレン ; (15) ハロ ; (16) ヘテロシクリル (例えば、ヘテロアリール) ; (17) (ヘテロシクリル) オキシ ; (18) (ヘテロシクリル) アザ ; (19) ヒドロキシ ; (20) オキソ ; (21) ニトロ ; (22) スルフィド ; (23) チオアルコキシ ; (24) $-(CH_2)_q CO_2 R^A$ (ここで、 q が、0~4 の整数であり、 R^A が、(a) アルキル、(b) アリール、(c) 水素、および (d) アリールーアルキレンからなる群から選択される) ; (25) $-(CH_2)_q CONR^B R^C$ (ここで、 q が、0~4 の整数であり、 R^B および R^C が、独立して、(a) 水素、(b) アルキル、(c) アリール、および (d) アリールーアルキレンからなる群から選択される) ; (26) $-(CH_2)_q SO_2 R^D$ (ここで、 q が、0~4 の整数であり、 R^D が、(a) アルキル、(b) アリール、および (c) アリールーアルキレンからなる群から選択される) ; (27) $-(CH_2)_q SO_2 NR^E R^F$ (ここで、 q が、0~4 の整数であり、 R^E および R^F のそれぞれが、独立して、(a) 水素、(b) アルキル、(c) アリール、および (d) アリールーアルキレンからなる群から選択される) ; (28) チオール ; (29) アリールオキシ ; (30) シクロアルコキシ ; (31) アリールアルコキシ ; (32) ヘテロシクリルーアルキレン (例えば、ヘテロアリールーアルキレン) ; (33) シリル ; (34) シアノ ; および (35) $-S(O)R^H$ (ここで、 R^H が、(a) 水素、(b) アルキル、(c) アリール、および (d) アリールーアルキレンからなる群から選択される) からなる群から独立して選択される1つ、2つ、3つ、4つまたは5つの置換基で任意選択的に置換され得る。ある実施形態において、これらの基のそれぞれが、本明細書に記載されるようにさらに置換され得る。例えば、アリールー C_1 -アルキレンまたはヘテロシクリルー C_1 -アルキレンのアルキレン基は、それぞれのアリーロイルおよび(ヘテロシクリル) オイル置換基を得るように、オキソ基でさらに置換され得る。さらに、ヘテロシクリル基が、本発明の生物可逆的基中に存在する場合、それは、本明細書において定義される共役部分、親水性官能基、または補助部分に結合されるエステル、チオエステル、またはジスルフィド基で置換され得る。

【0110】

本明細書において使用される際の「ヘテロシクリルアルキル」という用語は、ヘテロシクリル基で置換されたアルキル基を表す。ヘテロシクリルおよびアルキル部分は、本明細書に記載されるように、個々の基として置換され得る。

【0111】

本明細書において使用される際の「親水性官能基」という用語は、水に対する親和性を与え、アルキル部分の水溶性を高める部分を表す。親水性官能基は、イオン性または非イオン性であり得、正に荷電した、負に荷電した、および/または水素結合相互作用に関与することができる部分を含む。例示的な親水性官能基としては、ヒドロキシ、アミノ、カルボキシル、カルボニル、チオール、リン酸塩 (例えば、一リン酸塩、二リン酸塩、または三リン酸塩)、ポリアルキレンオキシド (例えば、ポリエチレングリコール)、およびヘテロシクリルが挙げられる。

【0112】

本明細書において同義的に使用される「ヒドロキシル」および「ヒドロキシ」という用語は、 $-OH$ 基を表す。

【0113】

本明細書において使用される際の「イミン」という用語は、炭素と窒素との間に二重結

合を有する基を表し、これは、「 $C=N$ 」と表すことができる。陽子がイミン官能基に対して α である特定の実施形態において、イミンはまた、互変異性エナミンの形態であってもよい。あるタイプのイミン結合は、イミン結合の窒素が、三価窒素に共有結合されたヒドラゾン結合（例えば、 $C=N-N(R)_2$ ）である。ある実施形態において、各Rが、独立して、H、OH、任意選択的に置換される $C_1 \sim 6$ アルコキシ、または任意選択的に置換される $C_1 \sim 6$ アルキルであり得る。

【0114】

本明細書において使用される際の「ヌクレオチド間基」という用語は、2つの連続ヌクレオシドを共有結合する基を表す。ヌクレオチド間基は、本明細書において定義される生物不可逆的または生物可逆的基であり得る。ヌクレオチド間リン(V)基は、リン酸塩またはホスホロチオエートである。ヌクレオチド間基の1個の酸素原子が、1つのヌクレオシドの3'位にあり、ヌクレオチド間基の別の酸素原子が、別の隣接するヌクレオシドの5'位にある。

【0115】

本明細書において使用される際の「RISC複合体に取り込み可能な」という用語は、RISC複合体に取り込まれるガイド鎖の能力およびガイド鎖にハイブリダイズされるパッセンジャー鎖のRISCを介した分解の能力を指す。したがって、このポリヌクレオチドは、ガイド鎖の5'位における生物不可逆的ヌクレオチド間基または天然RISCを介した切断部位を含む3つの連続するヌクレオチドを含まない。好ましい天然RISCを介した切断部位は、ガイド鎖の第10および第11のヌクレオチドに相補的な2つのヌクレオシド間のパッセンジャー鎖に位置する。

【0116】

本明細書において使用される際の「ニトレン」という用語は、6つの価電子および構造 $=N$ ：または $-NR^A$ を有する一価窒素種を表し：式中、 R^A が、任意選択的に置換される $C_1 \sim 12$ アルキル、任意選択的に置換される $C_6 \sim 12$ アリール、任意選択的に置換される $(C_6 \sim 12 \text{ アリール}) - C_1 \sim 12$ - アルキレン、または任意選択的に置換されるカルボニルから選択され；Nが、4つの価電子を有する窒素であり、そのうちの少なくとも2つが、対形成している。2つの残りの電子は、対形成していても（すなわち、一重項ニトレン）または対形成していなくてもよい（すなわち、三重項ニトレン）。

【0117】

本明細書において使用される際の「ニトロ」という用語は、 $-NO_2$ 基を表す。

【0118】

本明細書において使用される際の「生物不可逆的基」という用語は、生物可逆的基ではない官能基を含む部分を指す。生物不可逆的基は、その中に、ポリヌクレオチドのリン酸塩またはホスホロチオエートを組み込む。例えば、生物不可逆的基は、ポリヌクレオチドに対する1つまたは複数の結合点に応じて、ヌクレオチド間生物不可逆的基または末端生物不可逆的基であり得る。ヌクレオチド間生物不可逆的基は、ポリヌクレオチドの2つのヌクレオチドを連結するリン酸塩またはホスホロチオエートの酸素または硫黄原子に結合される官能基を含む部分を含有する。末端生物不可逆的基は、ポリヌクレオチドの末端リン酸塩またはホスホロチオエートの1個または2個の酸素および／または硫黄原子に結合される官能基を含む部分を含有する。生物不可逆的基は、リン酸塩またはホスホロチオエート、または本明細書に記載される任意の他の連結基の酸素または硫黄原子に結合される、 $C_3 \sim 6$ アルキレン、アルケニレン、アルキニレン、アリーレン、アリールアルキレン、シクロアルキレン、シクロアルキルアルキレン、またはシクロアルケニレンを含み得る。

【0119】

「非天然アミノ酸」は、天然に産生されないかまたは哺乳動物中に見られないアミノ酸である。

【0120】

「非極性 σ 結合」とは、ポーリングの目盛りにしたがって測定した際に、1.0単位以

10

20

30

40

50

下だけ異なる電気陰性度値を有する2つの元素間の共有結合を意味する。非極性 σ 結合の非限定的な例としては、C-C、C-H、Si-H、Si-C、C-Cl、C-Br、C-I、C-B、およびC-Sn結合が挙げられる。

【0121】

本明細書において使用される際の「核酸塩基」という用語は、ヌクレオチドまたはヌクレオシドの糖部分の1'位に見られる窒素含有複素環を表す。核酸塩基は、非修飾であるかまたは修飾され得る。本明細書において使用される際、「非修飾」または「天然」核酸塩基としては、プリン塩基アデニン(A)およびグアニン(G)、ならびにピリミジン塩基チミン(T)、シトシン(C)およびウラシル(U)が挙げられる。修飾核酸塩基としては、5-メチルシトシン(5-me-Cまたはm5c)、5-ヒドロキシメチルシトシン、キサンチン、ヒポキサンチン、2-アミノアデニン、アデニンおよびグアニンの6-メチルおよび他のアルキル誘導体、アデニンおよびグアニンの2-プロピルおよび他のアルキル誘導体、2-チオウラシル、2-チオチミンおよび2-チオシトシン、5-ハロウラシルおよびシトシン、5-プロピニルウラシルおよびシトシン、6-アゾウラシル、シトシンおよびチミン、5-ウラシル(擬ウラシル)、4-チオウラシル、8-ハロ、8-アミノ、8-チオール、8-チオアルキル、8-ヒドロキシルおよび他の8-置換アデニンおよびグアニン、5-ハロ、特に、5-ブロモ、5-トリフルオロメチルおよび他の5-置換ウラシルおよびシトシン、7-メチルグアニンおよび7-メチルアデニン、8-アザグアニンおよび8-アザアデニン、7-デアザグアニンおよび7-デアザアデニンおよび3-デアザグアニンおよび3-デアザアデニンなどの他の合成および天然核酸塩基が挙げられる。さらなる核酸塩基としては、米国特許第3,687,808号明細書に開示されているもの; The Concise Encyclopedia Of Polymer Science and Engineering, pages 858-859, Kroschwitz, J. I., ed. John Wiley & Sons, 1990に開示されているもの; Englisch et al., Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613によって開示されているもの; および Sanghvi, Y. S., Chapter 15, Antisense Research and Applications, pages 289-302 (Crooke et al., ed., CRC Press, 1993)によって開示されているものが挙げられる。5-置換ピリミジン、6-アザピリミジンならびにN-2、N-6およびO-6置換プリン(2-アミノプロピルアデニン、5-プロピニルウラシルおよび5-プロピニルシトシンを含む)を含むいくつかの核酸塩基が、本発明のポリマー化合物の結合親和性を高めるのに特に有用である。5-メチルシトシン置換は、核酸二本鎖の安定性を0.6~1.2℃高めることが示されている。(Sanghvi et al., eds., Antisense Research and Applications 1993, CRC Press, Boca Raton, pages 276-278)。これらは、特定の実施形態において、2'-O-メトキシエチル糖修飾物と組み合わせられてもよい。これらの修飾核酸塩基ならびに他の修飾核酸塩基のいくつかの調製を教示する米国特許としては、限定はされないが、上述される米国特許第3,687,808号明細書; 同第4,845,205号明細書; 同第5,130,302号明細書; 同第5,134,066号明細書; 同第5,175,273号明細書; 同第5,367,066号明細書; 同第5,432,272号明細書; 同第5,457,187号明細書; 同第5,459,255号明細書; 同第5,484,908号明細書; 同第5,502,177号明細書; 同第5,525,711号明細書; 同第5,552,540号明細書; 同第5,587,469号明細書; 同第5,594,121号明細書; 同第5,596,091号明細書; 同第5,614,617号明細書; および同第5,681,941号明細書が挙げられる。本開示の趣旨では、本明細書において使用される際の「修飾核酸塩基」は、本明細書に記載される1つまたは複数の保護基を含む、天然または非天然の核酸塩基をさらに表す。

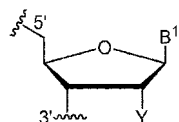
【0122】

本明細書において使用される際の「求核剤」という用語は、電子対または π 結合から電子を供与することによって、共有結合の形成に関与する任意選択的に置換される官能基を表す。求核剤は、アルケン、アルキン、アリアル、ヘテロアリアル、ジアザ基、ヒドロキシ基、アルコキシ基、アリアルオキシ基、アミノ基、アルキルアミノ基、アニリド基、チオ基、およびチオフエノキシ基から選択され得る。

【0123】

本明細書において使用される際の「ヌクレオシド」という用語は、糖-核酸塩基の組合せを表す。糖は、アノマー炭素における核酸塩基を含有する修飾糖またはアノマー炭素における核酸塩基ならびに各位置3および5における別の基への結合を含有する3, 5-ジデオキシペンタフラノース (dideoxypentafuranose) である。ペンタフラノースは、3, 5-ジデオキシリボースまたは2, 3, 5-トリデオキシリボースまたはその2位修飾形態（ここで、2位が、OR、R、ハロ（例えば、F）、SH、SR、NH₂、NHR、NR₂、またはCNで置換され、Rが、任意選択的に置換されるC₁~₆アルキル（例えば、(C₁~₆アルコキシ)-C₁~₆-アルキル)または任意選択的に置換される(C₆~₁₄アリアル)-C₁~₄-アルキルである)であり得る。修飾糖は、マンノース、アラビノース、グルコピラノース、ガラクトピラノースなどの非リボース糖、4-チオリボース、および他の糖、複素環、または炭素環である。ある実施形態において、「ヌクレオシド」という用語は、以下の構造：

【化10】



を有する二価基を指し、式中、B¹が核酸塩基であり；Yが、H、ハロゲン（例えば、F）、ヒドロキシル、任意選択的に置換されるC₁~₆アルコキシ（例えば、メトキシまたはメトキシエトキシ）、または保護されたヒドロキシル基であり；3'および5'のそれぞれが、別の基に対する結合の位置を示す。

【0124】

本明細書において使用される際の「ヌクレオチド」という用語は、二価基の3'または5'位に共有結合されたヌクレオチド間または末端リン(V)基あるいは生物可逆的または生物不可逆的基をさらに含むヌクレオシドを指す。ヌクレオチドは、ロックド核酸(LNA)、グリセロール核酸、モルホリノ核酸、およびトレオース核酸も含む。

【0125】

本明細書において同義的に使用される「オキサ」および「オキシ」という用語は、2つの基に連結された二価酸素原子を表す（例えば、オキシの構造は、-O-として示され得る）。

【0126】

本明細書において使用される際の「オキソ」という用語は、1つの基に連結された二価酸素原子を表す（例えば、オキソの構造は、=Oとして示され得る）。

【0127】

本明細書において使用される際の「リン(V)基」という用語は、構造-O-P(=Z^A)(-Z^B)-O-(式中、Z^Aが、OまたはSであり、Z^Bが、OH、SH、またはアミノである)を有する二価基、またはその塩を指す。

【0128】

本明細書において使用される際の「ポリヌクレオチド」という用語は、ヌクレオチド間リン(V)、生物可逆的、または生物不可逆的基の任意の組合せによって一緒に共有結合された11以上の連続ヌクレオシドを含有する構造を表す。ポリヌクレオチドは、直鎖状または環状であり得る。

【0129】

本明細書において使用される際の「ポリペプチド」という用語は、ペプチド結合によっ

て連結された2つ以上のアミノ酸残基を表す。さらに、本開示の趣旨では、「ポリペプチド」という用語および「タンパク質」という用語は、本明細書において全ての文脈において同義的に使用される。様々なポリペプチドが、本明細書において提供される方法および組成物の範囲内で使用され得る。いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、抗体または抗体の断片またはその抗原結合断片を含む。合成により作製されたポリペプチドは、DNAによって天然にコードされないアミノ酸の置換（例えば、非天然（*non-naturally occurring* または *unnatural*）アミノ酸）を含み得る。

【0130】

本明細書において使用される際の「Ph」という用語は、フェニルを表す。

【0131】

本明細書において使用される際の「光分解活性化」または「光分解」という用語は、光との反応の照射による化学反応の促進または開始を表す。光分解活性化に好適な光の波長は、200～500 nmの範囲であり、200～260 nmおよび300～460 nmの範囲の波長を含む。他の有用な範囲としては、200～230 nm、200～250 nm、200～275 nm、200～300 nm、200～330 nm、200～350 nm、200～375 nm、200～400 nm、200～430 nm、200～450 nm、200～475 nm、300～330 nm、300～350 nm、300～375 nm、300～400 nm、300～430 nm、300～450 nm、300～475 nm、および300～500 nmが挙げられる。

【0132】

本明細書において使用される際の「保護基」という用語は、官能基（例えば、ヒドロキシル、アミノ、またはカルボニル）が、化学合成（例えば、ポリヌクレオチド合成）中に1つまたは複数の望ましくない反応に関与することから保護することが意図される基を表す。本明細書において使用される際の「O-保護基」という用語は、酸素含有（例えば、フェノール、ヒドロキシルまたはカルボニル）基が、化学合成中に1つまたは複数の望ましくない反応に関与することから保護することが意図される基を表す。本明細書において使用される際の「N-保護基」という用語は、窒素含有（例えば、アミノまたはヒドラジン）基が、化学合成中に1つまたは複数の望ましくない反応に関与することから保護することが意図される基を表す。一般的に使用されるO-およびN-保護基は、参照により本明細書に援用される、Greene, "Protective Groups in Organic Synthesis," 3rd Edition (John Wiley & Sons, New York, 1999)に開示されている。例示的なO-およびN-保護基としては、アルカノイル、アリーロイル、またはカルバミル基（ホルミル、アセチル、プロピオニル、ピバロイル、t-ブチルアセチル、2-クロロアセチル、2-ブロモアセチル、トリフルオロアセチル、トリクロロアセチル、フタリル、o-ニトロフェノキシアセチル、α-クロロブチリル、ベンゾイル、4-クロロベンゾイル、4-ブロモベンゾイル、t-ブチルジメチルシリル、トリイソプロピルシリルオキシメチル、4, 4'-ジメトキシトリチル、イソブチリル、フェノキシアセチル、4-イソプロピルフェノキシアセチル、ジメチルホルムアミジノ、および4-ニトロベンゾイルなど）が挙げられる。

【0133】

カルボニル含有基を保護するための例示的なO-保護基としては、限定はされないが：アセタール、アシラール、1, 3-ジチアン、1, 3-ジオキサン、1, 3-ジオキソラン、および1, 3-ジチオランが挙げられる。

【0134】

他のO-保護基としては、限定はされないが：置換アルキル、アリール、およびアリール-アルキレンエーテル（例えば、トリチル；メチルチオメチル；メトキシメチル；ベンジルオキシメチル；シロキシメチル；2, 2, 2-トリクロロエトキシメチル；テトラヒドロピラニル；テトラヒドロフラニル；エトキシエチル；1-[2-(トリメチルシリル)エトキシ]エチル；2-トリメチルシリルエチル；t-ブチルエーテル；p-クロロフ

10

20

30

40

50

ェニル、p-メトキシフェニル、p-ニトロフェニル、ベンジル、p-メトキシベンジル、およびニトロベンジル）；シリルエーテル（例えば、トリメチルシリル；トリエチルシリル；トリイソプロピルシリル；ジメチルイソプロピルシリル；t-ブチルジメチルシリル；t-ブチルジフェニルシリル；トリベンジルシリル；トリフェニルシリル；およびジフェニルメチルシリル）；炭酸塩（例えば、メチル、メトキシメチル、9-フルオレニルメチル；エチル；2, 2, 2-トリクロロエチル；2-（トリメチルシリル）エチル；ビニル、アリル、ニトロフェニル；ベンジル；メトキシベンジル；3, 4-ジメトキシベンジル；およびニトロベンジル）が挙げられる。

【0135】

他のN-保護基としては、限定はされないが、保護または非保護D、LまたはD、L-アミノ酸（アラニン、ロイシン、フェニルアラニンなど）などのキラル補助基；スルホン含有基（ベンゼンスルホニル、p-トルエンスルホニルなど）；カルバメート形成基（ベンジルオキシカルボニル、p-クロロベンジルオキシカルボニル、p-メトキシベンジルオキシカルボニル、p-ニトロベンジルオキシカルボニル、2-ニトロベンジルオキシカルボニル、p-ブロモベンジルオキシカルボニル、3, 4-ジメトキシベンジルオキシカルボニル、3, 5-ジメトキシベンジルオキシカルボニル、2, 4-ジメトキシベンジルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、2-ニトロ-4, 5-ジメトキシベンジルオキシカルボニル、3, 4, 5-トリメトキシベンジルオキシカルボニル、1-（p-ビフェニル）-1-メチルエトキシカルボニル、 α , α -ジメチル-3, 5-ジメトキシベンジルオキシカルボニル、ベンズヒドリルオキシカルボニル、t-ブチルオキシカルボニル、ジイソプロピルメトキシカルボニル、イソプロピルオキシカルボニル、エトキシカルボニル、メトキシカルボニル、アリルオキシカルボニル、2, 2, 2-トリクロロエトキシカルボニル、フェノキシカルボニル、4-ニトロフェノキシカルボニル、フルオレニル-9-メトキシカルボニル、シクロペンチルオキシカルボニル、アダマンチルオキシカルボニル、シクロヘキシルオキシカルボニル、フェニルチオカルボニルなど）、アリール-アルキレン基（ベンジル、トリフェニルメチル、ベンジルオキシメチルなど）およびシリル基（トリメチルシリルなど）が挙げられる。有用なN-保護基は、ホルミル、アセチル、ベンゾイル、ピバロイル、t-ブチルアセチル、アラニル、フェニルスルホニル、ベンジル、t-ブチルオキシカルボニル（Boc）、およびベンジルオキシカルボニル（Cbz）である。

【0136】

本明細書において使用される際の「立体障害型」という用語は、分子間もしくは分子内求核剤または求電子剤の存在下で、少なくとも24時間の半減期を有する化学基を表す。

【0137】

本明細書において使用される際の「被験体」という用語は、ヒトまたは非ヒト動物（例えば、哺乳動物）を表す。

【0138】

本明細書において使用される際の「スルフィド」という用語は、二価-S-または=S基を表す。

【0139】

本明細書において使用される際の「標的化部分」という用語は、所与の標的細胞集団と関連する受容体または他の受容性部分と特異的に結合する、またはそれらと反応的に会合もしくは複合体形成する任意の部分を表す。

【0140】

本明細書において使用される際の「末端基」という用語は、ポリヌクレオチドにおける最初または最後のヌクレオシドに位置する基を指す。5'末端基は、ポリヌクレオチド中の最初のヌクレオシドの5'-炭素原子に結合された末端基である。3'末端基は、ポリヌクレオチド中の最後のヌクレオシドの3'-炭素原子に結合された末端基である。

【0141】

本明細書において使用される際の「治療有効用量」という用語は、疾患または障害の症

10

20

30

40

50

状を改善し、治療し、または少なくとも部分的に停止させる（例えば、細胞の増殖を阻害する）のに必要な本発明に係る s i R N A、またはポリヌクレオチドの量を表す。この用途に有効な量は、当然ながら、疾患の重症度および被験体の体重および全身状態に応じて決まる。典型的に、インビトロで使用される投与量は、医薬組成物のインビボ投与に有用な量において有用な指針を提供することができ、具体的な障害の治療に有効な投与量を決定するために、動物モデルが使用され得る。

【0142】

本明細書において使用される際の「チオカルボニル」という用語は、C (=S) 基を表す。「チオカルボニル」を含有する官能基の非限定的な例としては、チオエステル、チオケトン、チオアルデヒド、チオ無水物、塩化チオアシル、チオアミド、チオカルボン酸、およびチオカルボキシレートが挙げられる。

10

【0143】

本明細書において使用される際の「チオール」という用語は、-S H基を表す。

【0144】

本明細書において使用される際の「障害」という用語は、「疾患」、「症候群」、および「病態」（病状と同様）という用語とほぼ同義語であることが意図され、それらと同義的に使用される。これらは全て、正常な機能を損ない、典型的に、特徴的な兆候および症状によって発現される、被験体、またはその部分の1つによって示される異常な状態を示すためである。

【0145】

20

被験体における障害に関して使用される際の「治療する」という用語は、治療薬（例えば、本発明のヌクレオチド構築物）を被験体に投与することによって、障害の少なくとも1つの症状を軽減することを指すことが意図される。

【0146】

本明細書および添付の特許請求の範囲において使用される際、単数形（「a」、「and」、「the」）は、文脈上特に明記されない限り、複数の指示対象を含む。したがって、例えば、「標的化部分（a targeting moiety）」への言及は、複数のこのような標的化部分を含み、「細胞（the cell）」への言及は、当業者に公知の1つまたは複数の細胞への言及を含むなどである。

【0147】

30

特に定義されない限り、本明細書において使用される全ての技術用語および科学用語は、本開示が属する技術分野の当業者に一般的に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書に記載されるものと同様または均等な方法および材料を、開示される方法および組成物の実施に使用することができるが、例示的な方法、装置および材料が本明細書に記載されている。

【0148】

同様に、「を含む（comprise）」、「を含む（comprises）」、「を含む（comprising）」、「を含む（include）」、「を含む（includes）」、および「を含む（including）」は同義的に使用され、限定的であることは意図されていない。

40

【0149】

様々な実施形態の説明に「を含む（comprising）」という用語を使用する場合、当業者は、いくつかの具体例において、一実施形態が、代わりに、「から本質的になる（consisting essentially of）」または「からなる（consisting of）」という文言を用いて説明され得ることを理解することがさらに理解されるべきである。

【0150】

本開示の趣旨では、当該技術分野において存在する任意の用語が、本開示において明確に定義されるいずれかの用語と同じである場合、本開示に示される用語の定義が全ての点で優先されるものとする。

50

【図面の簡単な説明】

【0151】

【図1】図1Aは2つの鎖を含む本発明の siRNA を示し、ここで、鎖の一方が、本発明のジスルフィド結合を含む。図1Bは2つの鎖を含む本発明の siRNA を示し、ここで、両方の鎖が、本発明のジスルフィド結合を含む。

【図2】本発明の代表的なポリヌクレオチド構築物および同じポリヌクレオチドの RP-HPLC トレースを示す。

【図3】本発明のポリヌクレオチドの粗混合物の質量スペクトルを示し、その構造が図2に示される。

【図4】本発明の精製ポリヌクレオチドの質量スペクトルを示し、その構造が図2に示される。

【図5】図5Aは1つまたは3つの ADS 共役部位を有する本発明の一本鎖 RNA 構築物の構造を示す。図5Bは本発明の一本鎖 RNA 構築物のゲル分析の写真を示す。この構築物の構造が、図6A、6B、および8に記載される。図5Cは本発明の一本鎖 RNA 構築物のゲル分析の写真を示す。この構築物の構造が、図6A、6B、および7Aに記載される。図5Dは本発明の一本鎖 RNA 構築物のゲル分析の写真を示す。この構築物の構造が、図6A、6B、および7Bに記載される。

【図6A】本発明の代表的な siRNA 構築物の一般的構造を示す。

【図6B】図6Aに示される siRNA 構築物に組み込まれる ADS 共役基を示す。

【図7A】代表的な共役部分に連結された代表的な標的化部分（葉酸塩）の構造を示す。

【図7B】代表的な共役部分に連結された代表的な標的化部分（GalNAc）の構造を示す。

【図8】代表的な共役部分に連結された代表的な標的化部分（マンノース）の構造を示す。

【図9A】いくつかの例示的な生物可逆的および生物不可逆的基を示すグラフである。

【図9B】表7に列挙されるポリヌクレオチドの調製に使用されるいくつかの化合物を示すグラフである。

【図10】[3+2] 環状付加の前の2つの例示的な siRNA 構造を示す。

【図11】GalNAc-siRNA コンジュゲートの一覧を示す。

【図12】実施例2に記載される手順にしたがって決定される際のインビトロトランスフェクションデータを示す。鎖1は、パッセンジャー鎖であり、鎖2は、ガイド鎖である。各文字によって示される棒グラフは、表9に記載される siRNA 構造の1つの IC₅₀ (pM) を示す。SB-0165は対照である。各文字は、5' から 3' への順序におけるヌクレオチド間生物不可逆的基の位置に対応する（例えば、鎖1のAは、第1および第2のヌクレオチドを連結する生物不可逆的基を含む化合物 SB-0166 についての、24時間および48時間の時点での IC₅₀ データを示す）。

【図13A】C57/B16 マウスからの初代マウス肝細胞において ApoB 遺伝子発現をインビトロで阻害する際の、表5~7に列挙される例示的な siRNA 化合物の効力を示すグラフである。決定された IC₅₀ 値が、各グラフ下の表に示される。

【図13B】C57/B16 マウスからの初代マウス肝細胞において ApoB 遺伝子発現をインビトロで阻害する際の、表5~7に列挙される例示的な siRNA 化合物の効力を示すグラフである。決定された IC₅₀ 値が、各グラフ下の表に示される。

【図14A】KB細胞に結合する本発明の siRNA コンジュゲート（（葉酸塩）₃-siRNNA-Cy3）についての用量曲線を示す。

【図14B】本発明の siRNA コンジュゲート（（葉酸塩）₃-siRNNA-Cy3 または（葉酸塩）₁-siRNNA-Cy3）およびKB細胞の解離定数（K_d）を決定するグラフを示す。

【図15A】HepG2細胞に結合する本発明の siRNA コンジュゲート（（GalNAc）₉-siRNNA-Cy3）についての用量曲線を示す。

【図15B】本発明の siRNA コンジュゲート（（GalNAc）₉-siRNNA-C

10

20

30

40

50

y 3 または (G a l N A c)₃ - s i R N N - C y 3) および H e p G 2 細胞の解離定数 (K_d) を決定するグラフを示す。

【図 1 6 A】初代腹腔マクロファージに結合する本発明の s i R N A コンジュゲート (マンノース)₁₈ - s i R N N - C y 3 についての用量曲線を示す。

【図 1 6 B】本発明の s i R N A コンジュゲート ((マンノース)₁₈ - s i R N N - C y 3 または (マンノース)₆ - s i R N N - C y 3) および初代腹腔マクロファージの解離定数 (K_d) を決定するグラフを示す。

【図 1 7】腫瘍壊死因子-α (T N F - α) の腹腔内投与から 4 時間後の N F κ B - R E - L u c マウスの画像である。比較は、陰性対照に対して提供される。本発明の s i R N A で処置されたマウスは、陰性対照マウスと比較して減少したレベルのルシフェラーゼを示す。

10

【図 1 8 A - 1 8 B】C 5 7 B I 6 マウスにおいて A p o B 遺伝子発現をインビボで阻害する際の、表 5 に列挙される例示的な s i R N A 化合物の効力を示すグラフである。図 1 8 A は、ビヒクルのみの投与と比べた、インビボでの β 2 ミクログロブリン (B 2 M) 遺伝子発現に対して正規化された肝臓 A p o B 遺伝子発現によって測定される 7 2 時間の時点での用量反応関数を示すグラフである。図 1 8 B は、ビヒクルのみの投与と比べた、インビボでの B 2 M 遺伝子発現に対して正規化された s i R N A (S B 0 0 9 7、表 5 を参照) の投与の 9 6、7 2、4 8、および 2 4 時間後のインビボでの肝臓 A p o B 遺伝子発現の経時変化を示すグラフである。

【図 1 9 A - 1 9 B】ビヒクルに対する、本発明のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物の正規化された A p o B 発現レベルの比較を示すグラフである。

20

【図 2 0 A】図 2 0 B 中のデータについての陽性対照の構造を示す。陽性対照 (S B - 0 1 6 5) は、4 つの生物可逆的基 (o - (t - ブチルジチオ) フェネチルホスフェート) および 1 つの生物不可逆的基 (2 つのヌクレオシドを連結するホモプロパルギルホスフェート) を含む。

【図 2 0 B】図 2 0 A に示される陽性対照および生物不可逆的トリエステル E または Q を有するものの A p o B 遺伝子発現レベルの比較を示し、文字の表記は、図 1 2 と一致している。トリエステル E を有する陽性対照は、S B 0 1 9 0 であり、トリエステル Q を有する陽性対照は、S B 0 2 0 2 である。

【図 2 1 A - 2 1 B】ハウスキーピング遺伝子の発現に対して正規化された G a p D H 発現を示すグラフである。対照 (例えば、ビヒクル) または本発明のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物を腹腔内に投与されたマウスから単離されたマクロファージにおいて、G a p D H 発現を測定した。

30

【図 2 2】ハウスキーピング遺伝子の発現に対して正規化された G a p D H 発現を示すグラフである。ビヒクルまたは本発明のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物を投与されたマウスから単離されたマクロファージにおいて、G a p D H 発現を測定した。

【図 2 3 A - 2 3 B】マウス初代骨髄細胞実験からの結果を示す。図 2 3 A は、マクロファージにおけるマンノース受容体発現の正規化された量を経時的に示す。図 2 3 B は、表 5 に列挙される例示的な s i R N A 化合物での 4 8 時間の処理による処置後の B 2 M に対して正規化された G A P D H m R N A のグラフを示す。図 2 3 B は、本発明のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物の投与後の G a p D H m R N A レベルの用量依存的減少を示す。

40

【図 2 4 A - 2 4 B】本発明のハイブリダイズポリヌクレオチドについての G a p D H 発現の用量依存性および関連する I C₅₀ データを示すグラフである。G a p D H の発現を、ハウスキーピング遺伝子の発現に対して正規化した。

【図 2 5】インキュベーションの開始時 (0 時間) およびマウス血清中で、3 7 °C で 2 4 時間または 4 8 時間後の 2 ' 修飾 s i R N A のバンドを示す、臭化エチジウムで染色された 1 5 % の変性ゲル (d e n a t u r i n g g e l) の写真である。ゲルの右の 3 つのレーンは、本発明のハイブリダイズポリヌクレオチド構築物について得られたバンドを示し、左の 3 つのレーンは、対照のレーンである (ホスホトリエステル基を有さない s i R

50

NA)。

【発明を実施するための形態】

【0152】

特定の生物活性物質を細胞の内部に送達する能力は、細胞原形質膜の選択的透過性のために問題がある。細胞の原形質膜は、分子の細胞内取込みを、十分に極性でかつ約500ダルトン未満のサイズであるものに限定するバリアを形成する。タンパク質の細胞内在化を促進する過去の取り組みは、受容体リガンドとタンパク質の融合 (Ng et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99:10706-11, 2002) またはタンパク質をケージ化リポソーム担体へとパッケージングすることによるもの (Abu-Amer et al., J. Biol. Chem. 276:30499-503, 2001) に焦点を合わせていた。しかしながら、これらの技術は、不十分な細胞の取込みおよびエンドサイトーシス経路への細胞内隔離につながり得る。それらのアニオン電荷および約14,000ダルトンの大きなサイズのため、siRNAの送達は、ヒトを含む哺乳動物において、非常に困難な課題である。しかしながら、カチオン性荷電ペプチドおよびタンパク質は、ポリヌクレオチド送達の向上をもたらした。例えば、ペプチド形質導入ドメイン (PTD) を核酸に連結することは、ポリヌクレオチド送達のいくつかの向上をもたらした。

【0153】

本発明は、パッセンジャー鎖およびガイド鎖を含むハイブリダイズポリヌクレオチド構築物を提供し、ここで、パッセンジャー鎖は、5'末端、3'末端、またはヌクレオチド間生物不可逆的基を含有し、および／またはガイド鎖は、3'末端またはヌクレオチド間生物不可逆的基を含有する。これらのハイブリダイズポリヌクレオチド構築物は、生物不可逆的基の非存在のみが異なるハイブリダイズポリヌクレオチド構築物と比べて、遺伝子サイレンシングにおいて優れた有効性を示し得る。理論によって制約されるわけではないが、優れた有効性は、RISC複合体ローディングの速度の向上またはハイブリダイズポリヌクレオチド構築物の安定性の向上に起因し得る。

【0154】

本発明は、1つまたは複数の生物可逆的基 (例えば、ジスルフィド) を含むヌクレオチド構築物も提供する。立体障害型ジスルフィドは、特に有利である。少なくとも1つの嵩高い基に結合されたジスルフィドは、少なくとも1つの嵩高い基に結合されていないジスルフィドと比較して、ヌクレオチド構築物合成中により高い安定性を示す。これは、後者が、ヌクレオチド構築物のリン (III) 原子と反応して、ジスルフィド結合を切断し得るためである。

【0155】

比較的大きな部分、例えば、ポリペプチド、炭水化物、中性有機ポリマー、正荷電ポリマー、治療剤、標的化部分、エンドソームエスケープ部分、またはそれらの組合せは、生物可逆的基が細胞内で切断される能力に影響を与えずに、生物可逆的基に含まれ得る。本発明は、疎水性または親水性官能基を有する生物可逆的基、および／または共役部分を含むヌクレオチド構築物も提供し、ここで、これらの共役部分は、ヌクレオチド間または末端リン酸塩またはホスホロチオエートに対する、ポリペプチド、小分子、炭水化物、中性有機ポリマー、正荷電ポリマー、治療剤、標的化部分、エンドソームエスケープ部分、またはそれらの任意の組合せの結合を可能にする。本発明は、1つまたは複数の疎水性または親水性官能基を含む1つまたは複数の生物可逆的基、および／またはヌクレオチド構築物に対する、補助部分、例えば、ポリペプチド、小分子、炭水化物、中性有機ポリマー、正荷電ポリマー、治療剤、標的化部分、エンドソームエスケープ部分、またはそれらの任意の組合せの結合を可能にする1つまたは複数の共役部分を有する1つまたは複数の共役基を含むヌクレオチド構築物をさらに提供する。一実施形態において、本明細書に開示されるヌクレオチド構築物は、構築物の総負電荷を低減し、それによって、細胞による構築物の取込みを可能にするかまたは促進する特定の数の生物可逆的基を含有する。本明細書に記載されるヌクレオチド構築物は、ポリヌクレオチド自体、または結合された補助部分

、例えば、小分子、ペプチド、ポリペプチド、炭水化物、中性有機ポリマー、正荷電ポリマー、治療剤、標的化部分、エンドソームエスケープ部分、またはそれらの組合せに連結されたポリヌクレオチドの細胞内輸送を可能にするか、または促進することができる。細胞内酵素（例えば、細胞内タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ、チオレドキシン、もしくはチオエステラーゼ）の作用または細胞内環境への曝露は、ジスルフィドまたはチオエステル結合の切断をもたらし、それによって、補助部分を放出し、および／またはポリヌクレオチドをアンマスクし得る（unmask）。次に、アンマスクされたポリヌクレオチドは、例えば、アンチセンスまたはRNAi-媒介性応答を開始することができる。さらに、本発明のヌクレオチド構築物はまた、リボソーム、またはカチオン性脂質などの担体を必要とせず、ポリヌクレオチド、またはジスルフィドまたはチオエステル結合を介して、結合された補助部分、例えば、小分子、ペプチド、ポリペプチド、炭水化物、中性有機ポリマー、正荷電ポリマー、治療剤、標的化部分、エンドソームエスケープ部分、またはそれらの組合せに連結されたポリヌクレオチドの細胞内送達を可能にするか、または促進する。好ましくは、補助部分とポリヌクレオチドとの結合は、ジスルフィド結合を含む。これらの特徴のそれぞれが、本明細書にさらに説明される。

10

【0156】

本発明は、アニオン性荷電ポリヌクレオチドに関連する電荷を低減または中和し、任意選択的に、分子、例えば、カチオン性ペプチド、標的化部分、および／またはエンドソームエスケープ部分にさらなる官能基を加えることによって、ポリヌクレオチドの細胞の取込みを促進し、向上させるための方法および組成物を提供する。特定の実施形態において、本発明の組成物は、カチオン電荷を有するヌクレオチド構築物を生成することによって、ポリヌクレオチドの取込みを促進し得る。

20

【0157】

本発明は、ヒトの障害を選択的に治療し、研究を促進するのに有用な配列特異的ポリヌクレオチドの送達のための組成物および方法を提供する。本発明の組成物および方法は、既存の核酸送達方法の欠点なしに、siRNA、RNA、およびDNAを含むポリヌクレオチドを、被験体および細胞に有効に送達する。本発明は、RNAi構築物を細胞に送達し難くするか、または構築物を送達不可能にするサイズおよび電荷の制限を克服する組成物および方法を提供する。核酸（例えば、dsRNA）のアニオン電荷を可逆的に中和することによって、本発明に係る生物可逆的基を含むヌクレオチド構築物は、核酸をインビトロおよびインビボで細胞に送達することができる。

30

【0158】

本発明は、電荷中和部分（例えば、生物不可逆的基、生物可逆的基；またはヌクレオチド間または末端リン（V）基の保護基として使用される成分（i）、式（II）の基、または式（IIa）の基）を含むヌクレオチド構築物を提供する。構築物は、細胞のトランスフェクションおよび細胞の調節に有用な補助部分をさらに含み得る。このような補助部分としては、小分子、ペプチド、ポリペプチド、炭水化物、中性有機ポリマー、正荷電ポリマー、治療剤、標的化部分、エンドソームエスケープ部分、またはそれらの任意の組合せが挙げられる。

【0159】

本発明は、特定の細胞（例えば、表面にアシアロ糖タンパク質受容体を有する細胞（例えば、肝細胞）、腫瘍細胞（例えば、表面に葉酸塩受容体を有する腫瘍細胞）、マンノース受容体を保有する細胞（例えば、マクロファージ、樹枝状細胞、および皮膚細胞（例えば、線維芽細胞またはケラチノサイト）））への標的化された送達のための1つまたは複数の標的化部分を含むヌクレオチド構築物の送達のための組成物および方法を提供する。マンノース受容体スーパーファミリーの非限定的な例としては、MR、Endo180、PLA2R、MGL、およびDEC205が挙げられる。本発明のヌクレオチド構築物の標的化された送達は、受容体媒介性内在化を含み得る。ある実施形態において、標的化部分は、マンノース、N-アセチルガラクトサミン（GalNAc）、または葉酸塩リガンドを含み得る。

40

50

【0160】

本明細書において実証されるように、核酸への1つまたは複数の除去可能な（例えば、可逆的に結合された）電荷中和部分の付加により、細胞トランスフェクションを促進することができる。配列組成にかかわらず、いずれの核酸も修飾することができる。したがって、本発明は、いずれかの特定の配列（すなわち、いずれかの特定の siRNA、dsRNA、DNA など）に限定されない。

【0161】

本発明は、ある実施形態において、細胞膜透過ならびにエキソ-およびエンドヌクレアーゼ分解に対する耐性を促進する化学的および生物物理学的特性に寄与する1つまたは複数の生物可逆的部分を有するヌクレオチド構築物を提供する。本発明は、本明細書に開示されるヌクレオチド構築物の合成のための試薬、例えば、ホスホラミダイト試薬をさらに提供する。さらに、これらの生物可逆的基は、合成プロセス中安定している。

10

【0162】

細胞内で、生物可逆的部分は、特定の内因性核酸とハイブリダイズし、および／またはそれに対する親和性を有することが可能な生物学的に活性なポリヌクレオチド化合物を得るために、酵素（例えば、チオレダクターゼ活性を有する酵素（例えば、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼまたはチオレドキシン））の作用、または細胞内条件（例えば、酸化または還元環境）または反応剤（例えば、グルタチオンまたは他の遊離チオール）への曝露によって除去され得る。

【0163】

生物可逆的部分は、特に発現を阻止または下方制御するように設計された、遺伝子または mRNA に属する標的配列に対する相補的配列の合成 DNA もしくは RNA または混合分子のアンチセンスポリヌクレオチドとともに使用され得る。これらの阻害性ポリヌクレオチドは、標的 mRNA 配列に対して、あるいは標的 DNA 配列に対して指向され、それらが相補的な核酸とハイブリダイズすることによって、転写または翻訳を阻害し得る。したがって、本明細書に開示されるヌクレオチド構築物は、遺伝子発現を有効に阻止または下方制御することができる。

20

【0164】

本発明のヌクレオチド構築物はまた、特定のビカテナリー（b i c a t e n a r y）DNA 領域（ホモプリン／ホモピリミジン配列またはプリン／ピリミジンが豊富な配列）に対して指向され、したがって、三重螺旋を形成し得る。特定の配列における三重螺旋の形成は、得られるポリヌクレオチドが反応性官能基を有するように作製される場合、遺伝子発現を調節または他の方法で制御し、および／または特定の核酸部位に導入される不可逆的な損傷を促進し得るタンパク質因子の相互作用を阻止することができる。

30

【0165】

ポリヌクレオチド

本発明は、ヌクレオチド間または末端リン（V）基に結合された1つまたは複数の電荷中和基（例えば、生物可逆的基、生物不可逆的基；または成分（i）、式（II）の基、または式（IIa）の基）を有するポリヌクレオチド（「ポリヌクレオチド構築物」）を含有するヌクレオチド構築物を提供する。1つまたは複数の電荷中和基は、ジスルフィドまたはチオエステル結合などの生物可逆的基を含有し得る。好ましくは、1つまたは複数の電荷中和基は、ジスルフィド結合を含む。1つまたは複数の電荷中和基は、ヌクレオチド間リン（V）基または末端リン（V）基（例えば、ジスルフィドまたはチオエステル結合；好ましくは、ジスルフィド結合を有する生物可逆的基）に連結された1つまたは複数の補助部分を含有し得る。このような補助部分の例としては、小分子、共役部分、親水性官能基、ポリペプチド、炭水化物、中性有機ポリマー、正荷電ポリマー、治療剤、標的化部分、エンドソームエスケープ部分、およびそれらの任意の組合せが挙げられる。生物可逆的基は、非修飾ヌクレオチド間架橋基または末端ヌクレオチド基を脱離させるために、例えば、分子内で、別個の反応に供することができる。本明細書において提供されるヌクレオチドの定義に記載されるように、様々な糖および骨格が用いられ得るが、ポリヌク

40

50

レオチドは、典型的に、リボース、デオキシリボース、またはLNA糖およびリン酸塩またはチオホスフェートヌクレオチド間リン(V)基を用いる。単一のポリヌクレオチドにおけるこれらの糖および架橋基の混合物も考えられる。

【0166】

本明細書に記載されるポリヌクレオチド構築物は、(例えば、受動的環境、酵素の作用、または他の反応剤への曝露によって)細胞内で選択的に切断され得、それによって、細胞へのポリヌクレオチドの細胞内送達を促進する生物可逆的基を特徴とする。例示的な生物可逆的基は、ジスルフィド結合を含む。

【0167】

例えば、本明細書に記載されるポリヌクレオチド構築物は、チオレダクターゼ活性を有する細胞内酵素によって切断され得るジスルフィド結合を含み得る。細胞内への侵入の際、これらのジスルフィド結合(例えば、式(I I)のA¹基およびA²基の間に含まれるもの)は、核酸をアンマスクするために、酵素によって選択的に切断され得る。本明細書に記載されるジスルフィド結合は、1つまたは複数の補助部分(例えば、1つまたは複数の標的化部分)および他のコンジュゲートで、または核酸の物理化学的特性を調節する基(例えば、ヒドロキシ(-OH)基などの疎水性基)で核酸を官能化するための有用な手段を提供することもできる。この手法は、別個の送達物質を使用せずに、標的化細胞送達を可能にするために、いくつかの構造的および機能的に異なる核酸に容易に一般化することができる。

【0168】

本明細書に記載されるポリヌクレオチド構築物は、例えば、1~40個の独立した生物可逆的基または生物不可逆的基を含み得る。例えば、本明細書に開示されるポリヌクレオチド構築物は、1~30、1~25、1~20、2~15、2~10、または1~5個の独立した生物可逆的または生物不可逆的基を含み得る。特定の実施形態において、構成ヌクレオチドの75%以下が、生物可逆的基を含む(例えば、20%、30%、40%、50%、55%、60%、65%、70%、または75%以下が、生物可逆的基を含む)。別の実施形態において、本発明のポリヌクレオチド構築物中の最大で90%のヌクレオチドが、生物可逆的基を有し得る。さらに別の実施形態において、生物可逆的基の半分以上が、疎水性末端、例えば、アルキル基を含む(例えば、(R⁴)_r-L-A¹が結合して、疎水性基を形成するとき)。いくつかの実施形態において、構成ヌクレオチドの75%以下が、生物不可逆的基を含む(例えば、20%、30%、40%、50%、55%、60%、65%、70%、または75%以下が、生物可逆的基を含む)。本明細書に開示されるポリヌクレオチド構築物は、例えば、共役部分、親水性官能基、ポリペプチド、小分子、炭水化物、中性有機ポリマー、正荷電ポリマー、治療剤、標的化部分、エンドソームエスケープ部分、またはそれらの任意の組合せを含む生物可逆的基の任意の組合せを特徴とし得る。ポリヌクレオチド構築物は、一般に、最大で150ヌクレオチド長さである。ある実施形態において、ポリヌクレオチド構築物は、5~100、5~75、5~50、5~25、8~40、10~32、15~30、または19~28ヌクレオチド長さからなる。

【0169】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド構築物は、1つまたは複数の成分(i)または式(I I)の基を含有し、成分のそれぞれが、独立して、ポリペプチド、炭水化物、中性有機ポリマー、正荷電ポリマー、治療剤、標的化部分、またはエンドソームエスケープ部分を含有し；ここで、成分(i)および式(I I)の基のそれぞれが、ポリヌクレオチド構築物のヌクレオチド間架橋基に対するリンカーを含み、このリンカーは、ジスルフィドまたはチオエステル(好ましくは、ジスルフィド、例えば、リンカーは、-L-A¹-S-S-A²-A³-A⁴-である)と、ジスルフィド基に近接し、ジスルフィド基を立体障害にする1つまたは複数の嵩高い基とを含有する。

【0170】

ある実施形態において、ポリヌクレオチド構築物は、1つまたは複数の成分(i)を含

有し、成分のそれぞれが、独立して、ポリペプチド、炭水化物、中性有機ポリマー、正荷電ポリマー、治療剤、標的化部分、またはエンドソームエスケープ部分を含有する。

【0171】

特定の実施形態において、ポリヌクレオチド構築物内の生物可逆的基の位置は、得られる構築物の安定性を向上させるように（例えば、ジスルフィド結合を切断するのに関与する試薬（例えば、酸化または還元環境）の非存在下でポリヌクレオチド構築物の半減期を増加させるように）選択される。特に、二本鎖ポリヌクレオチドの場合、生物可逆的基の位置は、哺乳動物の生理的温度で安定な二本鎖分子が形成されるようなものである。

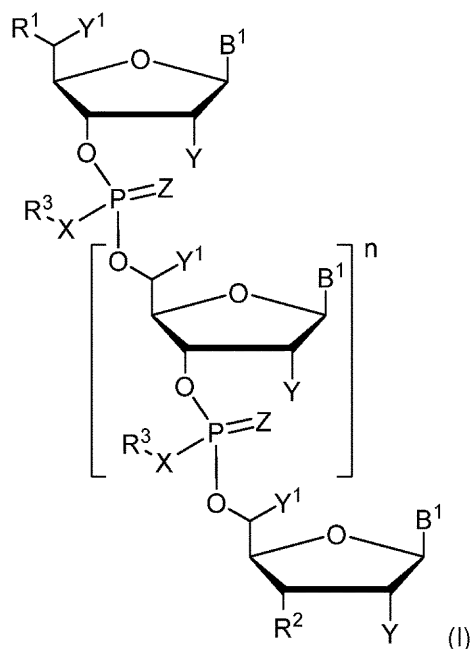
【0172】

他の実施形態において、各生物可逆的基の性質は、好ましい溶解度および送達特性を生み出すように選択され得る。こうした変動は、例えば、ヌクレオチド間架橋基または末端ヌクレオチド基とジスルフィド基との間、および／またはジスルフィド基と任意の共役部分、親水性官能基、または補助部分との間のリンカー長さを調節することを含み得る。疎水性生物可逆的基によって引き起こされる溶解度の低下は、ポリヌクレオチド中の他の場所の1つまたは複数の疎水性生物可逆的基の使用によって、部分的に相殺され得る。特定の実施形態において、生物可逆的基に結合されたヌクレオシドは、2' OH基を含まず、代わりに、例えば、2' FまたはOMe基を含む。

【0173】

例えば、本明細書に記載されるポリヌクレオチド構築物のいくつかは、式 I

【化11】



で表される構造、またはその塩を含むことができ、

式中、nが、0～150の数であり；

各B¹が、独立して、核酸塩基であり；

各Xが、独立して、存在しないか、O、S、および任意選択的に置換されるNからなる群から選択され；

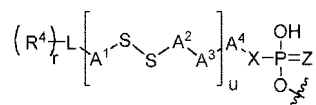
各Yが、独立して、水素、ヒドロキシル、ハロ、任意選択的に置換されるC₁～6アルコキシ、および保護されたヒドロキシル基からなる群から選択され；

各Y¹が、独立して、Hまたは任意選択的に置換されるC₁～6アルキル（例えば、メチル）であり；

各Zが、独立して、OまたはSであり；

R¹が、H、ヒドロキシル、任意選択的に置換されるC₁～6アルコキシ、保護されたヒドロキシル基、一リン酸塩、二リン酸塩、三リン酸塩、四リン酸塩、五リン酸塩、5'

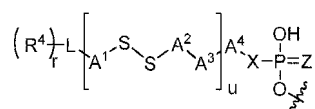
キャップ、ホスホチオール、任意選択的に置換される $C_1 \sim 6$ アルキル、アミノ含有基、ビオチン含有基、ジゴキシゲニン含有基、コレステロール含有基、色素含有基、クエンチャー含有基、ポリペプチド、炭水化物、中性有機ポリマー、正荷電ポリマー、治療剤、標的化部分、エンドソームエスケープ部分、およびオリゴヌクレオチドに連結するリンカーに対する結合、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択され、または R^1 が、
【化 1 2】



10

またはその塩であり；

R^2 が、H、ヒドロキシル、任意選択的に置換される $C_1 \sim 6$ アルコキシ、保護されたヒドロキシル基、一リン酸塩、二リン酸塩、三リン酸塩、四リン酸塩、五リン酸塩、任意選択的に置換される $C_1 \sim 6$ アルキル、アミノ含有基、ビオチン含有基、ジゴキシゲニン含有基、コレステロール含有基、クエンチャー含有基、ホスホチオール、ポリペプチド、炭水化物、中性有機ポリマー、正荷電ポリマー、治療剤、標的化部分、エンドソームエスケープ部分、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択され、または R^2 が、
【化 1 3】

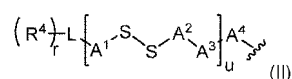


20

またはその塩であり；

各 R^3 が、独立して、存在しないか、水素、任意選択的に置換される $C_1 \sim 6$ アルキル、または式 I I：

【化 1 4】



30

の構造を有する基であり、

式中、各 A^1 が、独立して、任意選択的に置換される N；O；S；任意選択的に置換される $C_1 \sim 6$ アルキレン；任意選択的に置換される $C_2 \sim 6$ アルケニレン；任意選択的に置換される $C_2 \sim 6$ アルキニレン；任意選択的に置換される $C_3 \sim 8$ シクロアルキレン；任意選択的に置換される $C_3 \sim 8$ シクロアルケニレン；任意選択的に置換される $(C_3 \sim 8$ シクロアルキル) - $C_1 \sim 4$ - アルキレン；任意選択的に置換される $(C_3 \sim 8$ シクロアルケニル) - $C_1 \sim 4$ - アルキレン；任意選択的に置換される $C_6 \sim 14$ アリーレン；任意選択的に置換される $(C_6 \sim 14$ アリール) - $C_1 \sim 4$ - アルキレン；N、O、および S から選択される 1～4 個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される $C_1 \sim 9$ ヘテロアリーレン；N、O、および S から選択される 1～4 個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される $(C_1 \sim 9$ ヘテロアリール) - $C_1 \sim 4$ - アルキレン；N、O、および S から選択される 1～4 個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される $C_1 \sim 9$ ヘテロシクリレン；および N、O、および S から選択される 1～4 個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される $(C_1 \sim 9$ ヘテロシクリル) - $C_1 \sim 4$ - アルキレンのうちの 1 つまたは複数を含有するかまたはそれらである結合またはリンカーであり、ただし、 A^1 が、任意選択的に置換される N、O、および S のうちの 1 つまたは複数を含む場合、任意選択的に置換される N、O、または S は、ジスルフィドに直接結合されず；各 A^2 が、独立して、任意選択的に置換される $C_1 \sim 6$ アルキレン；任意選択的に置換される $C_3 \sim 8$ シクロアルキレン；任意選択的に置換される $C_3 \sim 8$ シクロアルケニレン；任意選択的に置換される $C_6 \sim 14$ アリーレン；N、O、および S から選択される 1～4 個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される $C_1 \sim 9$ ヘテロアリーレン；および N、O、および S から選

40

50

置される 1～4 個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される $C_1 \sim 9$ ヘテロシクリレンからなる群から選択され；または A^1 および A^2 が、 $-S-S-$ と一緒に結合して、任意選択的に置換される 5～16 員環を形成し；

各 A^3 が、独立して、結合、任意選択的に置換される $C_1 \sim 6$ アルキレン；任意選択的に置換される $C_3 \sim 8$ シクロアルキレン；任意選択的に置換される $C_3 \sim 8$ シクロアルケニレン；任意選択的に置換される $C_6 \sim 14$ アリーレン、N、O、および S から選択される 1～4 個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される $C_1 \sim 9$ ヘテロアリーレン；N、O、および S から選択される 1～4 個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される $C_1 \sim 9$ ヘテロシクリレン；O；任意選択的に置換される N；および S からなる群から選択され；

各 A^4 が、独立して、任意選択的に置換される $C_1 \sim 6$ アルキレン；任意選択的に置換される $C_3 \sim 8$ シクロアルキレン；および N、O、および S から選択される 1～4 個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される $C_1 \sim 9$ ヘテロシクリレンからなる群から選択され；

各 L が、独立して、存在しないか、または 1 つまたは複数の共役部分を含むかまたはそれらからなる共役基であり；

各 R^4 が、独立して、水素、任意選択的に置換される $C_1 \sim 6$ アルキル、親水性官能基、または小分子、ポリペプチド、炭水化物、中性有機ポリマー、正荷電ポリマー、治療剤、標的化部分、エンドソームエスケープ部分、およびそれらの組合せからなる群から選択される補助部分を含む基であり；

各 r が、独立して、1～10 の整数であり；

各 u が、独立して、0 または 1 であり；

ここで、 R^1 、 R^2 、および R^3 の少なくとも 1 つにおいて、 A^2 、 A^3 、および A^4 が結合して、 $-S-S-$ および X を連結する最も短い鎖内に少なくとも 3 個の原子を有する基を形成し；

ここで、少なくとも 1 つの R^3 が、式 (II) の構造を有する。

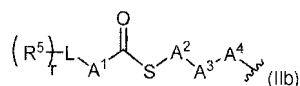
【0174】

ある実施形態において、L が、別のポリヌクレオチド（例えば、式 (I) の別のポリヌクレオチド）に対する結合を含む。特定の実施形態において、 Y^1 が H である。

【0175】

本発明のポリヌクレオチドおよびヌクレオチドにおけるジスルフィド結合は、別の生物可逆的基、例えば、チオエステル部分で置換され得る。例えば、式 (II)、(IIa)、(VII)、または (VIIa) の基は、式 (IIb)：

【化15】



の基で置換され得る。

【0176】

本明細書に記載される合成方法は、このようなポリヌクレオチドおよびヌクレオチドを調製するように構成され得る。したがって、チオエステル含有基は、本発明の範囲内であると考えられる。

【0177】

式 (I) のいくつかの実施形態は、X および Z が両方とも O であるもの（例えば、リン酸塩）を含む。ある実施形態において、本明細書に開示されるポリヌクレオチド構築物は、主に、式 (I) の構造を含むが、式 (I) の示されるヌクレオチド間リン (V) 基が、本明細書に記載される別のヌクレオチド間リン (V) 基（例えば、修飾ポリヌクレオチド骨格）で置換される。代替的な実施形態において、本明細書に開示されるポリヌクレオチド構築物は、主に、式 (I) の構造を含むが、式 (I) の示される基 R^1 および/または R^2 が、基 R^3 を有する末端ヌクレオチド基で置換される。本明細書に開示されるポリヌ

10

20

30

40

50

クレオチド構築物は、修飾ポリヌクレオチド骨格を有し得る。修飾ポリヌクレオチド骨格の例としては、例えば、ホスホロチオエート、キラルホスホロチオエート、ホスオロジチオエート、アミノアルキルホスホトリエステル、3'-アルキレンホスホネートおよびキラルホスホネートを含むメチルおよび他のアルキルホスホネート、ホスフィネート、3'-アミノホスホロアミデートおよびアミノアルキルホスホロアミデートを含むホスホロアミデート、チオノホスホロアミデート、チオノアルキルホスホネート、チオノアルキルホスホトリエステル、および通常の3'-5'結合を有するボラノホスフェート、これらの2'-5'結合類似体、および逆転極性を有するものが挙げられ、ここで、ヌクレオシド単位の隣接する対は、結合される(5'-3'に対して3'-5'または5'-2'に対して2'-5')。上記のリン含有結合の調製を教示する代表的な米国特許としては、

米国特許第3,687,808号明細書；同第4,469,863号明細書；同第4,476,301号明細書；同第5,023,243号明細書；同第5,177,196号明細書；同第5,188,897号明細書；同第5,264,423号明細書；同第5,276,019号明細書；同第5,278,302号明細書；同第5,286,717号明細書；同第5,321,131号明細書；同第5,399,676号明細書；同第5,405,939号明細書；同第5,453,496号明細書；同第5,455,233号明細書；同第5,466,677号明細書；同第5,476,925号明細書；同第5,519,126号明細書；同第5,536,821号明細書；同第5,541,306号明細書；同第5,550,111号明細書；同第5,563,253号明細書；同第5,571,799号明細書；同第5,587,361号明細書；および同第5,625,050号明細書が挙げられ、これらのそれぞれが、参照により本明細書に援用される。リン原子を含まない修飾ポリヌクレオチド骨格を有する本明細書に開示されるヌクレオチド構築物は、短鎖アルキルまたはシクロアルキルヌクレオチド間架橋基、混合型ヘテロ原子およびアルキルまたはシクロアルキルヌクレオチド間架橋基、または1つまたは複数の短鎖ヘテロ原子または複素環式ヌクレオチド間架橋基によって形成される骨格を有してもよい。これらとしては、モルホリノ結合(ヌクレオシドの糖部分から部分的に形成される)；シロキサン骨格；スルフィド、スルホキシドおよびスルホン骨格；ホルムアセチルおよびチオホルムアセチル骨格；メチレンホルムアセチルおよびチオホルムアセチル骨格；アルケン含有骨格；スルファメート骨格；メチレンイミノおよびメチレンヒドラジノ骨格；スルホネートおよびスルホンアミド骨格；アミド骨格；ならびに混合N、O、SおよびCH₂成分部分を有する他の骨格を有するものが挙げられる。上記のポリヌクレオチドの調製を教示する代表的な米国特許としては、米国特許第5,034,506号明細書；同第5,166,315号明細書；同第5,185,444号明細書；同第5,214,134号明細書；同第5,216,141号明細書；同第5,235,033号明細書；同第5,264,562号明細書；同第5,264,564号明細書；同第5,405,938号明細書；同第5,434,257号明細書；同第5,466,677号明細書；同第5,470,967号明細書；同第5,489,677号明細書；同第5,541,307号明細書；同第5,561,225号明細書；同第5,596,086号明細書；同第5,602,240号明細書；同第5,610,289号明細書；同第5,602,240号明細書；同第5,608,046号明細書；同第5,610,289号明細書；同第5,618,704号明細書；同第5,623,070号明細書；同第5,663,312号明細書；同第5,633,360号明細書；同第5,677,437号明細書；および5,677,439号明細書が挙げられ、これらのそれぞれが、参照により本明細書に援用される。

10

20

30

40

【0178】

例示的な-A¹-S-S-A²-A³-A⁴-または-S-S-A²-A³-A⁴-基が以下のとおりであり：

Chemical structures illustrating various thiol-terminated compounds and disulfide linkages, categorized by their functional groups and substituents:

- Linear aliphatic thiol-terminated compounds (e.g., $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{SH}$).
- Branched aliphatic thiol-terminated compounds (e.g., $(\text{CH}_3)_2\text{CH}(\text{CH}_2)_4\text{SH}$).
- Cyclic thiol-terminated compounds (e.g., cyclohexylthiol).
- Aromatic thiol-terminated compounds (e.g., benzylthiol, 4-mercaptophenylthiol).
- Thiol-terminated compounds with specific functional groups (e.g., thiol-terminated amide, thiol-terminated ether, thiol-terminated sulfonate).
- Disulfide linkages connecting various thiol-terminated compounds (e.g., $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{SSCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$).
- Disulfide linkages connecting thiol-terminated compounds to specific functional groups (e.g., thiol-terminated amide, thiol-terminated ether, thiol-terminated sulfonate).
- Disulfide linkages connecting thiol-terminated compounds to specific functional groups (e.g., thiol-terminated amide, thiol-terminated ether, thiol-terminated sulfonate).

各 R⁹ が、独立して、ハロ、任意選択的に置換される C₁ ~₆ アルキル；任意選択的に置換される C₂ ~₆ アルケニル；任意選択的に置換される C₂ ~₆ アルキニル；任意選択的に置換される C₃ ~₈ シクロアルキル；任意選択的に置換される C₃ ~₈ シクロアルケニル；任意選択的に置換される (C₃ ~₈ シクロアルキル) - C₁ ~₄ - アルキル；任意選択的に置換される (C₃ ~₈ シクロアルケニル) - C₁ ~₄ - アルキル；任意選択的に置換される C₆ ~₁₄ アリール；任意選択的に置換される (C₆ ~₁₄ アリール) - C₁ ~₄ - アルキル；窒素、酸素、および硫黄から選択される 1 ~ 4 個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される C₁ ~₉ ヘテロアリール；窒素、酸素から選択される 1 ~ 4 個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される (C₁ ~₉ ヘテロアリール) - C₁ ~₄ - アルキル；窒素、酸素、および硫黄から選択される 1 ~ 4 個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される C₁ ~₉ ヘテロシクリル；窒素、酸素、および硫黄から選択される 1 ~ 4 個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される (C₁ ~₉ ヘテロシクリル) - C₁ ~₄ - アルキル；アミノ；または任意選択的に置換される C₁ ~₆ アルコキシであり；または 2 つの隣接する R⁹ 基が、各 R⁹ が結合される原子と一緒に、結合して、C₆ アリール、C₂ ~₅ ヘテロシクリル、または C₂ ~₅ ヘテロアリールからなる群から選択される環式基を形成し、ここで、環式基が、C₂ ~₇ アルカノイル；C₁ ~₆ アルキル；C₂ ~₆ ア

50

ルケニル； $C_2 \sim 6$ アルキニル； $C_1 \sim 6$ アルキルスルフィニル； $C_6 \sim 10$ アリール；アミノ；($C_6 \sim 10$ アリール) - $C_1 \sim 4$ - アルキル； $C_3 \sim 8$ シクロアルキル；($C_3 \sim 8$ シクロアルキル) - $C_1 \sim 4$ - アルキル； $C_3 \sim 8$ シクロアルケニル；($C_3 \sim 8$ シクロアルケニル) - $C_1 \sim 4$ - アルキル；ハロ； $C_1 \sim 9$ ヘテロシクリル； $C_1 \sim 9$ ヘテロアリール；($C_1 \sim 9$ ヘテロシクリル) オキシ；($C_1 \sim 9$ ヘテロシクリル) アザ；ヒドロキシ； $C_1 \sim 6$ チオアルコキシ；- (CH_2)_q $CO_2 R^A$ (ここで、q が、0 ~ 4 の整数であり、 R^A が、 $C_1 \sim 6$ アルキル、 $C_6 \sim 10$ アリール、および ($C_6 \sim 10$ アリール) - $C_1 \sim 4$ - アルキルからなる群から選択される)；- (CH_2)_q $CONR^B R^C$ (ここで、q が、0 ~ 4 の整数であり、 R^B および R^C が、独立して、水素、 $C_1 \sim 6$ アルキル、 $C_6 \sim 10$ アリール、および ($C_6 \sim 10$ アリール) - $C_1 \sim 4$ - アルキルからなる群から選択される)；- (CH_2)_q $SO_2 R^D$ (ここで、q が、0 ~ 4 の整数であり、 R^D が、 $C_1 \sim 6$ アルキル、 $C_6 \sim 10$ アリール、および ($C_6 \sim 10$ アリール) - $C_1 \sim 4$ - アルキルからなる群から選択される)；- (CH_2)_q $SO_2 NR^E R^F$ (ここで、q が、0 ~ 4 の整数であり、 R^E および R^F のそれぞれが、独立して、水素、アルキル、アリール、および ($C_6 \sim 10$ アリール) - $C_1 \sim 4$ - アルキルからなる群から選択される)；チオール；アリールオキシ；シクロアルコキシ；アリールアルコキシ；($C_1 \sim 9$ ヘテロシクリル) - $C_1 \sim 4$ - アルキル；($C_1 \sim 9$ ヘテロアリール) - $C_1 \sim 4$ - アルキル； $C_3 \sim 12$ シリル；シアノ；および - $S(O)R^H$ (ここで、 R^H が、水素、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_6 \sim 10$ アリール、および ($C_6 \sim 10$ アリール) - $C_1 \sim 4$ - アルキルからなる群から選択される) からなる群から選択される 1 つ、2 つ、または 3 つの置換基で任意選択的に置換され；

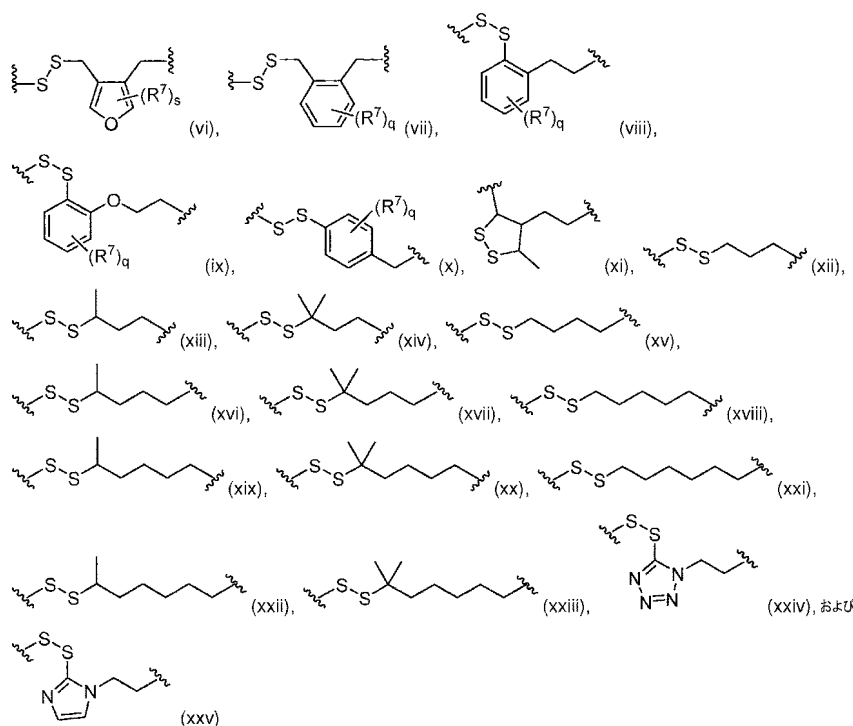
q が、0、1、2、3、または 4 であり；

s が、0、1、または 2 である。

【0179】

本発明の生物可逆的基に含まれる例示的な基は、以下のもの：

【化 17】



であり、

式中、

各 R^7 が、独立して、 $C_2 \sim 7$ アルカノイル； $C_1 \sim 6$ アルキル； $C_2 \sim 6$ アルケニル； $C_2 \sim 6$ アルキニル； $C_1 \sim 6$ アルキルスルフィニル； $C_6 \sim 10$ アリール；アミノ；

($C_6 \sim 10$ アリール) - $C_1 \sim 4$ - アルキル; $C_3 \sim 8$ シクロアルキル; ($C_3 \sim 8$ シクロアルキル) - $C_1 \sim 4$ - アルキル; $C_3 \sim 8$ シクロアルケニル; ($C_3 \sim 8$ シクロアルケニル) - $C_1 \sim 4$ - アルキル; ハロ; $C_1 \sim 9$ ヘテロシクリル; $C_1 \sim 9$ ヘテロアリール; ($C_1 \sim 9$ ヘテロシクリル) オキシ; ($C_1 \sim 9$ ヘテロシクリル) アザ; ヒドロキシ; $C_1 \sim 6$ チオアルコキシ; - (CH_2)_q $CO_2 R^A$ (ここで、 q が、0~4 の整数であり、 R^A が、 $C_1 \sim 6$ アルキル、 $C_6 \sim 10$ アリール、および ($C_6 \sim 10$ アリール) - $C_1 \sim 4$ - アルキルからなる群から選択される); - (CH_2)_q $CONR^B R^C$ (ここで、 q が、0~4 の整数であり、 R^B および R^C が、独立して、水素、 $C_1 \sim 6$ アルキル、 $C_6 \sim 10$ アリール、および ($C_6 \sim 10$ アリール) - $C_1 \sim 4$ - アルキルからなる群から選択される); - (CH_2)_q $SO_2 R^D$ (ここで、 q が、0~4 の整数であり、 R^D が、 $C_1 \sim 6$ アルキル、 $C_6 \sim 10$ アリール、および ($C_6 \sim 10$ アリール) - $C_1 \sim 4$ - アルキルからなる群から選択される); - (CH_2)_q $SO_2 NR^E R^F$ (ここで、 q が、0~4 の整数であり、 R^E および R^F のそれぞれが、独立して、水素、アルキル、アリール、および ($C_6 \sim 10$ アリール) - $C_1 \sim 4$ - アルキルからなる群から選択される); チオール; アリールオキシ; シクロアルコキシ; アリールアルコキシ; ($C_1 \sim 9$ ヘテロシクリル) - $C_1 \sim 4$ - アルキル; ($C_1 \sim 9$ ヘテロアリール) - $C_1 \sim 4$ - アルキル; $C_3 \sim 12$ シリル; シアノ; または - $S(O)R^H$ (ここで、 R^H が、水素、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_6 \sim 10$ アリール、および ($C_6 \sim 10$ アリール) - $C_1 \sim 4$ - アルキルからなる群から選択される) であり; または 2 つの隣接する R^7 基が、各 R^7 が結合される原子と一緒に、結合して、 C_6 アリール、 $C_2 \sim 5$ ヘテロシクリル、または $C_2 \sim 5$ ヘテロアリールからなる群から選択される環式基を形成し、ここで、環式基が、 $C_2 \sim 7$ アルカノイル; $C_1 \sim 6$ アルキル; $C_2 \sim 6$ アルケニル; $C_2 \sim 6$ アルキニル; $C_1 \sim 6$ アルキルスルフィニル; $C_6 \sim 10$ アリール; アミノ; ($C_6 \sim 10$ アリール) - $C_1 \sim 4$ - アルキル; $C_3 \sim 8$ シクロアルキル; ($C_3 \sim 8$ シクロアルキル) - $C_1 \sim 4$ - アルキル; $C_3 \sim 8$ シクロアルケニル; ($C_3 \sim 8$ シクロアルケニル) - $C_1 \sim 4$ - アルキル; ハロ; $C_1 \sim 9$ ヘテロシクリル; $C_1 \sim 9$ ヘテロアリール; ($C_1 \sim 9$ ヘテロシクリル) オキシ; ($C_1 \sim 9$ ヘテロシクリル) アザ; ヒドロキシ; $C_1 \sim 6$ チオアルコキシ; - (CH_2)_q $CO_2 R^A$ (ここで、 q が、0~4 の整数であり、 R^A が、 $C_1 \sim 6$ アルキル、 $C_6 \sim 10$ アリール、および ($C_6 \sim 10$ アリール) - $C_1 \sim 4$ - アルキルからなる群から選択される); - (CH_2)_q $CONR^B R^C$ (ここで、 q が、0~4 の整数であり、 R^B および R^C が、独立して、水素、 $C_1 \sim 6$ アルキル、 $C_6 \sim 10$ アリール、および ($C_6 \sim 10$ アリール) - $C_1 \sim 4$ - アルキルからなる群から選択される); - (CH_2)_q $SO_2 R^D$ (ここで、 q が、0~4 の整数であり、 R^D が、 $C_1 \sim 6$ アルキル、 $C_6 \sim 10$ アリール、および ($C_6 \sim 10$ アリール) - $C_1 \sim 4$ - アルキルからなる群から選択される); - (CH_2)_q $SO_2 NR^E R^F$ (ここで、 q が、0~4 の整数であり、 R^E および R^F のそれぞれが、独立して、水素、アルキル、アリール、および ($C_6 \sim 10$ アリール) - $C_1 \sim 4$ - アルキルからなる群から選択される); チオール; アリールオキシ; シクロアルコキシ; アリールアルコキシ; ($C_1 \sim 9$ ヘテロシクリル) - $C_1 \sim 4$ - アルキル; ($C_1 \sim 9$ ヘテロアリール) - $C_1 \sim 4$ - アルキル; $C_3 \sim 12$ シリル; シアノ; および - $S(O)R^H$ (ここで、 R^H が、水素、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_6 \sim 10$ アリール、および ($C_6 \sim 10$ アリール) - $C_1 \sim 4$ - アルキルからなる群から選択される) からなる群から選択される 1 つ、2 つ、または 3 つの置換基で任意選択的に置換され;

q が、0、1、2、3、または 4 であり;

s が、0、1、または 2 である。

【0180】

本発明は、本発明のポリヌクレオチド構築物を製造するための方法をさらに提供する。ヌクレオチドおよびポリヌクレオチドの調製のための方法が、当該技術分野において公知である。例えば、ポリヌクレオチドを調製するためのホスホラミダイト化学の実施が、Caruthers and Beaucage およびその他の公開論文から公知である。

例えば、それぞれが参照により本明細書に援用される、米国特許第4,458,066号明細書；同第4,500,707号明細書；同第5,132,418号明細書；同第4,415,732号明細書；同第4,668,777号明細書；同第4,973,679号明細書；同第5,278,302号明細書、同第5,153,319号明細書；同第5,218,103号明細書；同第5,268,464号明細書；同第5,000,307号明細書；同第5,319,079号明細書；同第4,659,774号明細書；同第4,672,110号明細書；同第4,517,338号明細書；同第4,725,677号明細書；およびRE34,069号明細書には、ポリヌクレオチド合成の方法が記載されている。さらに、ホスホラミダイト化学の実施が、Beaucage et al., Tetrahedron, 48:2223-2311, 1992；およびBeaucage et al., Tetrahedron, 49:6123-6194, 1993、ならびにこれらの文献に引用される参照文献によって体系的に概説されており、これらの全てが、参照により本明細書に援用される。

10

【0181】

核酸合成装置は、市販されており、それらの使用は、所望され得る妥当な長さのほぼあらゆるポリヌクレオチドを生成するのに有効であると当業者によって一般に理解される。

【0182】

ホスホラミダイト化学を実施する際、有用な5'OH糖遮断基は、トリチル、モノメトキシトリチル、ジメトキシトリチルおよびトリメトキシトリチル、特に、ジメトキシトリチル(DMTri)である。ホスホラミダイト化学を実施する際、有用な亜リン酸塩活性化基は、ジアルキル置換窒素基および窒素複素環である。一手法は、ジイソプロピルアミノ活性化基の使用を含む。

20

【0183】

ポリヌクレオチドは、Mermade-6固相自動ポリヌクレオチド合成装置または任意の市販の自動ポリヌクレオチド合成装置によって合成され得る。トリエステル、ホスホラミダイト、またはリン酸水素カップリング化学（例えば、M. Caruthers, Oligonucleotides: Antisense Inhibitors of Gene Expression, pp. 7-24, J. S. Cohen, ed. (CRC Press, Inc. Boca Raton, Fla., 1989)；Oligonucleotide synthesis, a practical approach, Ed. M. J. Gait, IRL Press, 1984；およびOligonucleotides and Analogues, A Practical Approach, Ed. F. Eckstein, IRL Press, 1991に記載されている）が、これらの合成装置によって用いられて、所望のポリヌクレオチドが得られる。例えば、Journal of American Chemical Society, 112:1253-1255, 1990に記載されているようなBeaucage試薬、またはBeaucage et al., Tetrahedron Letters 22:1859-1862, 1981に記載されているような硫黄元素が、ホスホラミダイトまたはリン酸水素化学とともに使用されて、置換ホスホロチオエートポリヌクレオチドが得られる。

30

40

【0184】

例えば、本明細書に記載される保護基を含有する試薬は、保護が所望される多くの用途に使用することができる。このような用途としては、限定はされないが、固相および液相、ポリヌクレオチド合成などが挙げられる。

【0185】

例えば、構造基が、リボースの2'-O位置にメチル、プロピルまたはアリル基、または2'-O基を置換するフルオロ基、またはリボヌクレオシド塩基にプロモ基などの、ポリヌクレオチドへの組み込みのためのヌクレオシドのリボースまたは塩基に任意選択的に付加される。ホスホラミダイト化学とともに使用するために、2'-デオキシホスホラミダイト、2'-O-メチルホスホラミダイトおよび2'-O-ヒドロキシルホスホラミダ

50

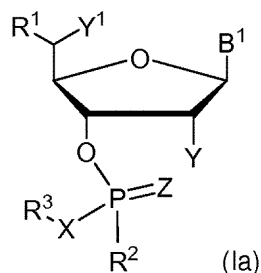
イトを含む様々なホスホラミダイト試薬が市販されている。このような合成のための任意の他の手段も用いられてもよい。ポリヌクレオチドの実際の合成は、十分に当業者の技能の範囲内である。ホスホロチオエート、メチルホスホネートおよびアルキル化誘導体などの他のポリヌクレオチドを調製するための類似の技術を使用することも周知である。蛍光標識、ビオチン化または他の結合ポリヌクレオチドを合成するのに、類似の技術ならびにビオチン、Cy 3、フルオレセイン、アクリジンまたはソラーレンで修飾されたホスホラミダイトおよび／またはCPG (Glen Research (Sterling Va.)) から入手可能) などの、市販の修飾ホスホラミダイトおよび制御多孔性ガラス (controlled-pore glass) (CPG) 製品を使用することも周知である。

10

【0186】

式 (I a) :

【化18】



20

、またはその塩、

B¹ が核酸塩基であり；

X が、O、S、または任意選択的に置換されるNであり；

Y が、水素、ヒドロキシル、ハロ、任意選択的に置換されるC₁ ~ 6 アルコキシ、または保護されたヒドロキシル基であり；

Y¹ が、独立して、Hまたは任意選択的に置換されるC₁ ~ 6 アルキル（例えば、メチル）であり；

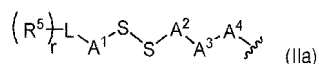
Z が存在せず；

R¹ が、保護ヒドロキシル（例えば、4, 4'-ジメトキシトリチル基 (DMT)）であり；

R² が、-N(R³)R⁴または-N(C₁ ~ 6 アルキル)₂（例えば、-N(iPr)₂）であり；

R³ が、式 (II a) :

【化19】



30

の構造を有する基であり、

式中、A¹ が、任意選択的に置換されるN、O、S、任意選択的に置換されるC₁ ~ 6 アルキレン；任意選択的に置換されるC₂ ~ 6 アルケニレン；任意選択的に置換されるC₂ ~ 6 アルキニレン；任意選択的に置換されるC₃ ~ 8 シクロアルキレン；任意選択的に置換されるC₃ ~ 8 シクロアルケニレン；任意選択的に置換される(C₃ ~ 8 シクロアルキル) - C₁ ~ 4 - アルキレン；任意選択的に置換される(C₃ ~ 8 シクロアルケニル) - C₁ ~ 4 - アルキレン；任意選択的に置換されるC₆ ~ 14 アリーレン；任意選択的に置換される(C₆ ~ 14 アリール) - C₁ ~ 4 - アルキレン；窒素、酸素、および硫黄から選択される1 ~ 4個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換されるC₁ ~ 9 ヘテロアリーレン；窒素、酸素から選択される1 ~ 4個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される(C₁ ~ 9 ヘテロアリール) - C₁ ~ 4 - アルキレン；窒素、酸素、および硫黄から選択される1 ~ 4個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換されるC₁ ~ 9 ヘテロシクリレ

40

50

ン；および窒素、酸素、および硫黄から選択される1～4個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される(C₁～₉ヘテロシクリル)－C₁～₄－アルキレンの1つまたは複数を含有するかまたはそれからなる結合またはリンカーであり、ただし、A¹が、アミノ、O、およびSの1つまたは複数を含む場合、アミノ、O、およびSのいずれもジスルフィドに直接結合せず；A²が、任意選択的に置換されるC₁～₆アルキレン；任意選択的に置換されるC₃～₈シクロアルキレン；任意選択的に置換されるC₃～₈シクロアルケニレン；任意選択的に置換されるC₆～₁₄アリーレン；窒素、酸素、および硫黄から選択される1～4個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換されるC₁～₉ヘテロアリーレン；および窒素、酸素、および硫黄から選択される1～4個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換されるC₁～₉ヘテロシクリレンからなる群から選択され；またはA¹およびA²が、－S－S－と一緒に結合して、任意選択的に置換される5～16員環を形成し；

A³が、結合、任意選択的に置換されるC₁～₆アルキレン；任意選択的に置換されるC₃～₈シクロアルキレン；任意選択的に置換されるC₃～₈シクロアルケニレン；任意選択的に置換されるC₆～₁₄アリーレン、窒素、酸素、および硫黄から選択される1～4個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換されるC₁～₉ヘテロアリーレン；窒素、酸素、および硫黄から選択される1～4個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換されるC₁～₉ヘテロシクリレン；O；任意選択的に置換されるN；およびSからなる群から選択され；

A⁴が、任意選択的に置換されるC₁～₆アルキレン；任意選択的に置換されるC₃～₈シクロアルキレン；および窒素、酸素、および硫黄から選択される1～4個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換されるC₁～₉ヘテロシクリレンからなる群から選択され；

Lが、結合、または1つまたは複数の共役部分を含むかまたはそれらからなる共役基であり；

R⁵が、水素、任意選択的に置換されるC₁～₆アルキル、親水性官能基、または小分子、ポリペプチド、炭水化物、中性有機ポリマー、正荷電ポリマー、治療剤、標的化部分、エンドソームエスケープ部分、およびそれらの組合せからなる群から選択される補助部分を含有基であり；

rが、1～10の整数であり；

ここで、A²、A³、およびA⁴が結合して、－S－S－およびXを連結する最も短い鎖内に少なくとも3個の原子を有する基を形成し；

各R⁴およびR⁶が、独立して、水素；任意選択的に置換されるC₁～₆アルキル；任意選択的に置換されるC₂～₇アルカノイル；ヒドロキシル；任意選択的に置換されるC₁～₆アルコキシ；任意選択的に置換されるC₃～₈シクロアルキル；任意選択的に置換されるC₃～₈シクロアルケニル；任意選択的に置換されるC₆～₁₄アリール；任意選択的に置換されるC₆～₁₅アリーロイル；窒素、酸素、および硫黄から選択される1～4個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換されるC₁～₉ヘテロシクリル；および窒素、酸素、および硫黄から選択される1～4個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換されるC₃～₁₀（複素環）オイルからなる群から選択される。

【0187】

本発明は、本明細書に開示される製造方法を用いることによって合成されるポリヌクレオチド構築物を処理するための方法をさらに提供する。例えば、ポリヌクレオチド構築物の合成後、核酸塩基が、1つまたは複数の保護基を含有する場合、保護基は除去されてもよく；および／または保護基によって保護される親水性官能基または共役部分を含有する任意の－L－A¹－S－S－A²－A³－A⁴－の場合、保護基は除去されてもよい。

【0188】

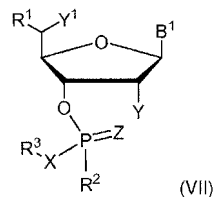
さらに、ポリヌクレオチド構築物の合成後、小分子、ポリペプチド、炭水化物、中性有機ポリマー、正荷電ポリマー、治療剤、標的化部分、およびエンドソームエスケープ部分の1つまたは複数を含有する基が、1つまたは複数の生物可逆的基の1つまたは複数の共役部分に連結され得る。

【0189】

ヌクレオチド

本発明は、単一のヌクレオチドを含有する化合物（「本発明の化合物」）を用いることができる。このような化合物は、式（VII）：

【化20】



10

で表される構造、またはその塩を有してもよく、式中、

B¹ が核酸塩基であり；

Xが、O、S、またはNR⁴であり；

Yが、水素、ヒドロキシル、ハロ、任意選択的に置換されるC₁～6アルコキシ、または保護されたヒドロキシル基であり；

Y¹ が、独立して、Hまたは任意選択的に置換されるC₁～6アルキル（例えば、メチル）であり；

Zが、存在しないか、O、またはSであり；

R¹ が、ヒドロキシル、任意選択的に置換されるC₁～6アルコキシ、保護されたヒドロキシル基、一リン酸塩、二リン酸塩、三リン酸塩、四リン酸塩、および五リン酸塩、5'キャップ、ホスホチオール、任意選択的に置換されるC₁～6アルキル、アミノ含有基、ビオチン含有基、ジゴキシゲニン含有基、コレステロール含有基、色素含有基、クエンチャー含有基、ポリペプチド、炭水化物、中性有機ポリマー、正荷電ポリマー、治療剤、標的化部分、エンドソームエスケープ部分、またはそれらの任意の組合せであり；

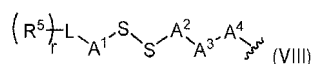
20

R² が、H、ヒドロキシル、任意選択的に置換されるC₁～6アルコキシ、保護されたヒドロキシル基、一リン酸塩、二リン酸塩、三リン酸塩、四リン酸塩、五リン酸塩、およびアミノ、5'キャップ、ホスホチオール、任意選択的に置換されるC₁～6アルキル、アミノ含有基、ビオチン含有基、ジゴキシゲニン含有基、コレステロール含有基、色素含有基、クエンチャー含有基、ポリペプチド、炭水化物、中性有機ポリマー、正荷電ポリマー、治療剤、標的化部分、エンドソームエスケープ部分、またはそれらの任意の組合せであり；

30

R³ が、式（VIII）：

【化21】



の構造を有する基であり、式中、

A¹ が、任意選択的に置換されるN；O；S；任意選択的に置換されるC₁～6アルキレン；任意選択的に置換されるC₂～6アルケニレン；任意選択的に置換されるC₂～6アルキニレン；任意選択的に置換されるC₃～8シクロアルキレン；任意選択的に置換されるC₃～8シクロアルケニレン；任意選択的に置換される（C₃～8シクロアルキル）-C₁～4-アルキレン；任意選択的に置換される（C₃～8シクロアルケニル）-C₁～4-アルキレン；任意選択的に置換されるC₆～14アリーレン；任意選択的に置換される（C₆～14アリール）-C₁～4-アルキレン；N、O、およびSから選択される1～4個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換されるC₁～9ヘテロアリーレン；N、O、およびSから選択される1～4個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される（C₁～9ヘテロアリール）-C₁～4-アルキレン；N、O、およびSから選択される1～4個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換されるC₁～9ヘテロシクリレン；およびN、O、およびSから選択される1～4個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される（

40

50

C₁ ~ 9 ヘテロシクリル) - C₁ ~ 4 - アルキレンのうちの1つまたは複数を含むかまたはそれからなる結合またはリンカーであり、ただし、A¹が、任意選択的に置換されるN、O、およびSのうちの1つまたは複数を含む場合、任意選択的に置換されるN、O、またはSは、ジスルフィドに直接結合されず；A²が、任意選択的に置換されるC₁ ~ 6 アルキレン；任意選択的に置換されるC₃ ~ 8 シクロアルキレン；任意選択的に置換されるC₃ ~ 8 シクロアルケニレン；任意選択的に置換されるC₆ ~ 14 アリーレン；N、O、およびSから選択される1 ~ 4個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換されるC₁ ~ 9 ヘテロアリーレン；およびN、O、およびSから選択される1 ~ 4個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換されるC₁ ~ 9 ヘテロシクリレンからなる群から選択され；またはA¹およびA²が、-S-S-と一緒に結合して、任意選択的に置換される5 ~ 16員環を形成し；

A³が、結合、任意選択的に置換されるC₁ ~ 6 アルキレン；任意選択的に置換されるC₃ ~ 8 シクロアルキレン；任意選択的に置換されるC₃ ~ 8 シクロアルケニレン；任意選択的に置換されるC₆ ~ 14 アリーレン、N、O、およびSから選択される1 ~ 4個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換されるC₁ ~ 9 ヘテロアリーレン；N、O、およびSから選択される1 ~ 4個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換されるC₁ ~ 9 ヘテロシクリレン；O；任意選択的に置換されるN；およびSからなる群から選択され；

A⁴が、任意選択的に置換されるC₁ ~ 6 アルキレン；任意選択的に置換されるC₃ ~ 8 シクロアルキレン；およびN、O、およびSから選択される1 ~ 4個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換されるC₁ ~ 9 ヘテロシクリレンからなる群から選択され；

Lが、存在しないか、または1つまたは複数の共役部分を含むかまたはそれらからなる共役基であり；

R⁵が、存在しないか、水素、任意選択的に置換されるC₁ ~ 6 アルキル、親水性官能基、または小分子、ポリペプチド、炭水化物、中性有機ポリマー、正荷電ポリマー、治療剤、標的化部分、エンドソームエスケープ部分、またはそれらの任意の組合せからなる群から選択される補助部分を含む基であり、ここで、親水性官能基が、任意選択的に、保護基で保護され；

rが、1 ~ 10の整数であり；

ここで、A²、A³、およびA⁴が結合して、-S-S-A¹-R⁵および-X-を連結する最も短い鎖内に少なくとも3個の原子を有する基を形成し；

各R⁴およびR⁶が、独立して、水素；任意選択的に置換されるC₁ ~ 6 アルキル；任意選択的に置換されるC₂ ~ 7 アルカノイル；ヒドロキシル；任意選択的に置換されるC₁ ~ 6 アルコキシ；任意選択的に置換されるC₃ ~ 8 シクロアルキル；任意選択的に置換されるC₃ ~ 8 シクロアルケニル；任意選択的に置換されるC₆ ~ 14 アリール；任意選択的に置換されるC₆ ~ 15 アリーロイル；窒素、酸素、および硫黄から選択される1 ~ 4個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換されるC₁ ~ 9 ヘテロシクリル；および窒素、酸素、および硫黄から選択される1 ~ 4個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換されるC₃ ~ 10 (複素環) オイルからなる群から選択される。

【0190】

式(VII)の化合物の他の実施形態は、以下のものを含み：Zが存在せず；

A¹が、結合、任意選択的に置換されるC₁ ~ 6 アルキレン；任意選択的に置換されるC₂ ~ 6 アルケニレン；任意選択的に置換されるC₂ ~ 6 アルキニレン；任意選択的に置換されるC₃ ~ 8 シクロアルキレン；任意選択的に置換されるC₃ ~ 8 シクロアルケニレン；任意選択的に置換される(C₃ ~ 8 シクロアルキル) - C₁ ~ 4 - アルキレン；任意選択的に置換される(C₃ ~ 8 シクロアルケニル) - C₁ ~ 4 - アルキレン；任意選択的に置換されるC₆ ~ 14 アリーレン；任意選択的に置換される(C₆ ~ 14 アリール) - C₁ ~ 4 - アルキレン；窒素、酸素、および硫黄から選択される1 ~ 4個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換されるC₁ ~ 9 ヘテロアリーレン；窒素、酸素から選択される1 ~ 4個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される(C₁ ~ 9 ヘテロアリール) - C₁ ~ 4 - アルキレン；窒素、酸素、および硫黄から選択される1 ~ 4個のヘテロ原子を有す

る任意選択的に置換される $C_1 \sim 9$ ヘテロシクリレン；および窒素、酸素、および硫黄から選択される 1～4 個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される ($C_1 \sim 9$ ヘテロシクリル) - $C_1 \sim 4$ - アルキレンからなる群から選択され； A^2 が、任意選択的に置換される $C_1 \sim 6$ アルキレン；任意選択的に置換される $C_3 \sim 8$ シクロアルキレン；任意選択的に置換される $C_3 \sim 8$ シクロアルケニレン；任意選択的に置換される $C_6 \sim 14$ アリーレン；窒素、酸素、および硫黄から選択される 1～4 個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される $C_1 \sim 9$ ヘテロアリーレン；および窒素、酸素、および硫黄から選択される 1～4 個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される $C_1 \sim 9$ ヘテロシクリレンからなる群から選択され；または A^1 および A^2 が、 $-S-S-$ と一緒に結合して、任意選択的に置換される 5～16 員環を形成し；

A^3 が、結合、任意選択的に置換される $C_1 \sim 6$ アルキレン；任意選択的に置換される $C_3 \sim 8$ シクロアルキレン；任意選択的に置換される $C_3 \sim 8$ シクロアルケニレン；任意選択的に置換される $C_6 \sim 14$ アリーレン、窒素、酸素、および硫黄から選択される 1～4 個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される $C_1 \sim 9$ ヘテロアリーレン；窒素、酸素、および硫黄から選択される 1～4 個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される $C_1 \sim 9$ ヘテロシクリレン；O； NR^6 ；および S からなる群から選択され；

A^4 が、任意選択的に置換される $C_1 \sim 6$ アルキレン；任意選択的に置換される $C_3 \sim 8$ シクロアルキレン；および窒素、酸素、および硫黄から選択される 1～4 個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される $C_1 \sim 9$ ヘテロシクリレンからなる群から選択され；

L が、結合、または 1 つまたは複数の共役部分を含むかまたはそれらからなる共役基であり；

R^5 が存在しないか、水素、任意選択的に置換される $C_1 \sim 6$ アルキル、親水性官能基、または小分子、ポリペプチド、炭水化物、中性有機ポリマー、正荷電ポリマー、治療剤、標的化部分、エンドソームエスケープ部分、およびそれらの組合せからなる群から選択される補助部分を含む基であり；

r が、1～10 の整数であり；

ここで、 A^2 、 A^3 、および A^4 が結合して、 $-S-S-$ および X を連結する最も短い鎖内に少なくとも 3 個の原子を有する基を形成し；

各 R^4 が、独立して、水素；任意選択的に置換される $C_1 \sim 6$ アルキル；任意選択的に置換される $C_2 \sim 7$ アルカノイル；ヒドロキシル；任意選択的に置換される $C_1 \sim 6$ アルコキシ；任意選択的に置換される $C_3 \sim 8$ シクロアルキル；任意選択的に置換される $C_3 \sim 8$ シクロアルケニル；任意選択的に置換される $C_6 \sim 14$ アリール；任意選択的に置換される $C_6 \sim 15$ アリーロイル；窒素、酸素、および硫黄から選択される 1～4 個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される $C_2 \sim 9$ ヘテロシクリル；または窒素、酸素、および硫黄から選択される 1～4 個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される $C_3 \sim 10$ (複素環) オイルである。

【0191】

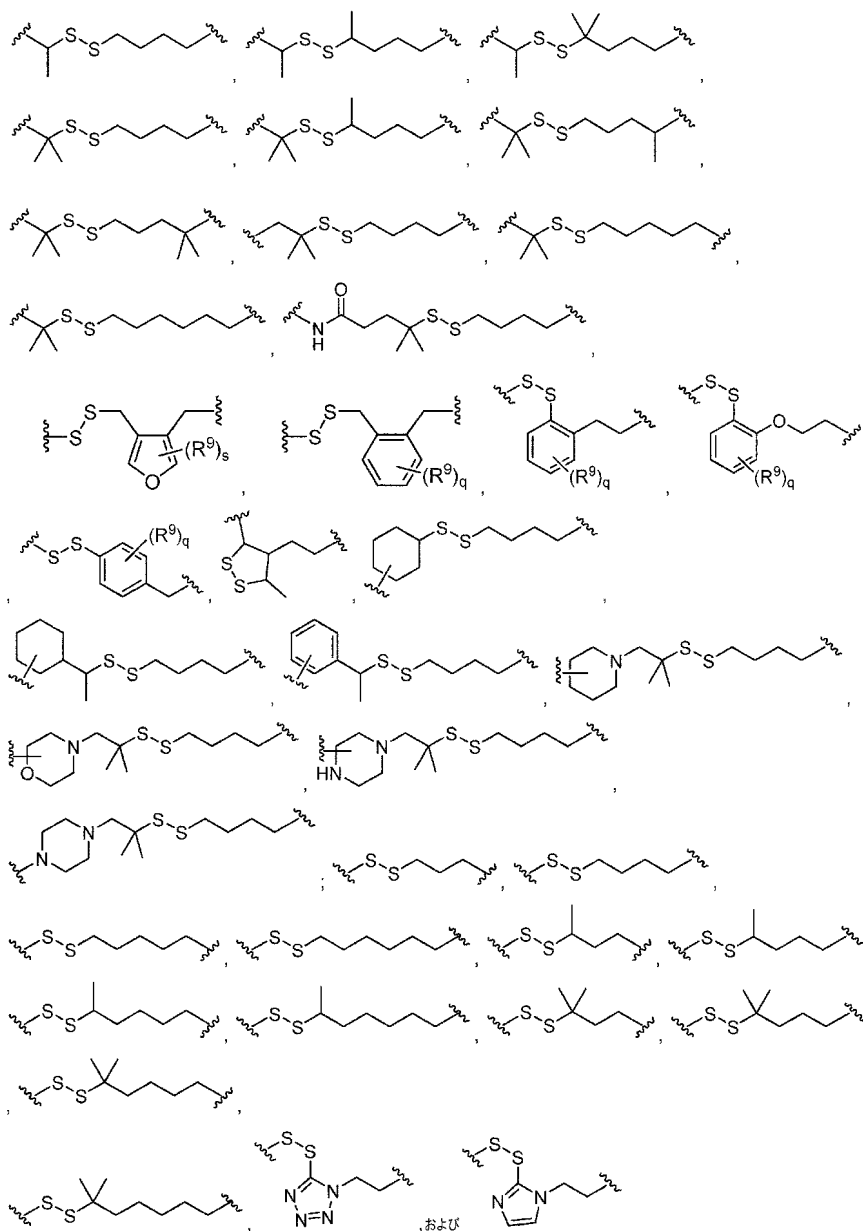
式 (V I I) の化合物のさらに他の実施形態において、 $-A^1-S-S-A^2-A^3-A^4-$ または $-S-S-A^2-A^3-A^4-$ 基は、以下のもの：

10

20

30

【化 2 2】



10

20

30

40

50

のうちの1つであり、
式中、

各 R^9 が、独立して、ハロ、任意選択的に置換される $C_1 \sim 6$ アルキル；任意選択的に置換される $C_2 \sim 6$ アルケニル；任意選択的に置換される $C_2 \sim 6$ アルキニル；任意選択的に置換される $C_3 \sim 8$ シクロアルキル；任意選択的に置換される $C_3 \sim 8$ シクロアルケニル；任意選択的に置換される $(C_3 \sim 8$ シクロアルキル) - $C_1 \sim 4$ - アルキル；任意選択的に置換される $(C_3 \sim 8$ シクロアルケニル) - $C_1 \sim 4$ - アルキル；任意選択的に置換される $C_6 \sim 14$ アリール；任意選択的に置換される $(C_6 \sim 14$ アリール) - $C_1 \sim 4$ - アルキル；窒素、酸素、および硫黄から選択される1～4個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される $C_1 \sim 9$ ヘテロアリール；窒素、酸素から選択される1～4個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される $(C_1 \sim 9$ ヘテロアリール) - $C_1 \sim 4$ - アルキル；窒素、酸素、および硫黄から選択される1～4個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される $C_1 \sim 9$ ヘテロシクリル；窒素、酸素、および硫黄から選択される1～4個のヘテロ原子を有する任意選択的に置換される $(C_1 \sim 9$ ヘテロシクリル) - $C_1 \sim 4$ - アルキル；アミノ；または任意選択的に置換される $C_1 \sim 6$ アルコキシであり；または2つの隣接する R^9 基が、各 R^9 が結合される原子と一緒に、結合して、 C_6 アリール、 $C_2 \sim 5$ ヘテロシクリル、または $C_2 \sim 5$ ヘテロアリールからなる群から選択される環式

基を形成し、ここで、環式基が、 $C_2 \sim 7$ アルカノイル； $C_1 \sim 6$ アルキル； $C_2 \sim 6$ アルケニル； $C_2 \sim 6$ アルキニル； $C_1 \sim 6$ アルキルスルフィニル； $C_6 \sim 10$ アリール；アミノ；($C_6 \sim 10$ アリール) - $C_1 \sim 4$ - アルキル； $C_3 \sim 8$ シクロアルキル；($C_3 \sim 8$ シクロアルキル) - $C_1 \sim 4$ - アルキル； $C_3 \sim 8$ シクロアルケニル；($C_3 \sim 8$ シクロアルケニル) - $C_1 \sim 4$ - アルキル；ハロ； $C_1 \sim 9$ ヘテロシクリル； $C_1 \sim 9$ ヘテロアリール；($C_1 \sim 9$ ヘテロシクリル) オキシ；($C_1 \sim 9$ ヘテロシクリル) アザ；ヒドロキシ； $C_1 \sim 6$ チオアルコキシ；- (CH_2)_q CO₂ R^A (ここで、q が、0 ~ 4 の整数であり、R^A が、 $C_1 \sim 6$ アルキル、 $C_6 \sim 10$ アリール、および ($C_6 \sim 10$ アリール) - $C_1 \sim 4$ - アルキルからなる群から選択される)；- (CH_2)_q CONR^B R^C (ここで、q が、0 ~ 4 の整数であり、R^B および R^C が、独立して、水素、 $C_1 \sim 6$ アルキル、 $C_6 \sim 10$ アリール、および ($C_6 \sim 10$ アリール) - $C_1 \sim 4$ - アルキルからなる群から選択される)；- (CH_2)_q SO₂ R^D (ここで、q が、0 ~ 4 の整数であり、R^D が、 $C_1 \sim 6$ アルキル、 $C_6 \sim 10$ アリール、および ($C_6 \sim 10$ アリール) - $C_1 \sim 4$ - アルキルからなる群から選択される)；- (CH_2)_q SO₂ NR^E R^F (ここで、q が、0 ~ 4 の整数であり、R^E および R^F のそれぞれが、独立して、水素、アルキル、アリール、および ($C_6 \sim 10$ アリール) - $C_1 \sim 4$ - アルキルからなる群から選択される)；チオール；アリールオキシ；シクロアルコキシ；アリールアルコキシ；($C_1 \sim 9$ ヘテロシクリル) - $C_1 \sim 4$ - アルキル；($C_1 \sim 9$ ヘテロアリール) - $C_1 \sim 4$ - アルキル； $C_3 \sim 12$ シリル；シアノ；および - S(O) R^H (ここで、R^H が、水素、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_6 \sim 10$ アリール、および ($C_6 \sim 10$ アリール) - $C_1 \sim 4$ - アルキルからなる群から選択される) からなる群から選択される 1 つ、2 つ、または 3 つの置換基で任意選択的に置換され；

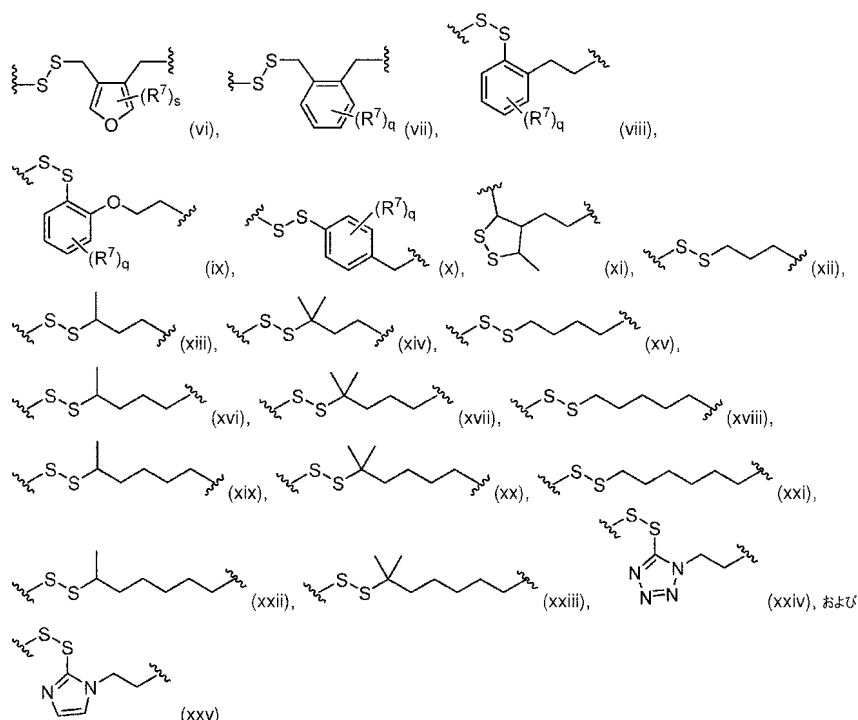
q が、0、1、2、3、または 4 であり；

s が、0、1、または 2 である。

【0192】

さらに他の実施形態において、生物可逆的基は、以下の構造：

【化23】



のうちの 1 つを含有し、

式中、

各 R⁷ が、独立して、 $C_2 \sim 7$ アルカノイル； $C_1 \sim 6$ アルキル； $C_2 \sim 6$ アルケニル； $C_2 \sim 6$ アルキニル； $C_1 \sim 6$ アルキルスルフィニル； $C_6 \sim 10$ アリール；アミノ；

($C_6 \sim 10$ アリール) - $C_1 \sim 4$ - アルキル; $C_3 \sim 8$ シクロアルキル; ($C_3 \sim 8$ シクロアルキル) - $C_1 \sim 4$ - アルキル; $C_3 \sim 8$ シクロアルケニル; ($C_3 \sim 8$ シクロアルケニル) - $C_1 \sim 4$ - アルキル; ハロ; $C_1 \sim 9$ ヘテロシクリル; $C_1 \sim 9$ ヘテロアリール; ($C_1 \sim 9$ ヘテロシクリル) オキシ; ($C_1 \sim 9$ ヘテロシクリル) アザ; ヒドロキシ; $C_1 \sim 6$ チオアルコキシ; - (CH_2)_q $CO_2 R^A$ (ここで、 q が、0~4 の整数であり、 R^A が、 $C_1 \sim 6$ アルキル、 $C_6 \sim 10$ アリール、および ($C_6 \sim 10$ アリール) - $C_1 \sim 4$ - アルキルからなる群から選択される); - (CH_2)_q $CONR^B R^C$ (ここで、 q が、0~4 の整数であり、 R^B および R^C が、独立して、水素、 $C_1 \sim 6$ アルキル、 $C_6 \sim 10$ アリール、および ($C_6 \sim 10$ アリール) - $C_1 \sim 4$ - アルキルからなる群から選択される); - (CH_2)_q $SO_2 R^D$ (ここで、 q が、0~4 の整数であり、 R^D が、 $C_1 \sim 6$ アルキル、 $C_6 \sim 10$ アリール、および ($C_6 \sim 10$ アリール) - $C_1 \sim 4$ - アルキルからなる群から選択される); - (CH_2)_q $SO_2 NR^E R^F$ (ここで、 q が、0~4 の整数であり、 R^E および R^F のそれぞれが、独立して、水素、アルキル、アリール、および ($C_6 \sim 10$ アリール) - $C_1 \sim 4$ - アルキルからなる群から選択される); チオール; アリールオキシ; シクロアルコキシ; アリールアルコキシ; ($C_1 \sim 9$ ヘテロシクリル) - $C_1 \sim 4$ - アルキル; ($C_1 \sim 9$ ヘテロアリール) - $C_1 \sim 4$ - アルキル; $C_3 \sim 12$ シリル; シアノ; または - $S(O) R^H$ (ここで、 R^H が、水素、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_6 \sim 10$ アリール、および ($C_6 \sim 10$ アリール) - $C_1 \sim 4$ - アルキルからなる群から選択される) であり; または 2 つの隣接する R^7 基が、各 R^7 が結合される原子と一緒に、結合して、 C_6 アリール、 $C_2 \sim 5$ ヘテロシクリル、または $C_2 \sim 5$ ヘテロアリールからなる群から選択される環式基を形成し、ここで、環式基が、 $C_2 \sim 7$ アルカノイル; $C_1 \sim 6$ アルキル; $C_2 \sim 6$ アルケニル; $C_2 \sim 6$ アルキニル; $C_1 \sim 6$ アルキルスルフィニル; $C_6 \sim 10$ アリール; アミノ; ($C_6 \sim 10$ アリール) - $C_1 \sim 4$ - アルキル; $C_3 \sim 8$ シクロアルキル; ($C_3 \sim 8$ シクロアルキル) - $C_1 \sim 4$ - アルキル; $C_3 \sim 8$ シクロアルケニル; ($C_3 \sim 8$ シクロアルケニル) - $C_1 \sim 4$ - アルキル; ハロ; $C_1 \sim 9$ ヘテロシクリル; $C_1 \sim 9$ ヘテロアリール; ($C_1 \sim 9$ ヘテロシクリル) オキシ; ($C_1 \sim 9$ ヘテロシクリル) アザ; ヒドロキシ; $C_1 \sim 6$ チオアルコキシ; - (CH_2)_q $CO_2 R^A$ (ここで、 q が、0~4 の整数であり、 R^A が、 $C_1 \sim 6$ アルキル、 $C_6 \sim 10$ アリール、および ($C_6 \sim 10$ アリール) - $C_1 \sim 4$ - アルキルからなる群から選択される); - (CH_2)_q $CONR^B R^C$ (ここで、 q が、0~4 の整数であり、 R^B および R^C が、独立して、水素、 $C_1 \sim 6$ アルキル、 $C_6 \sim 10$ アリール、および ($C_6 \sim 10$ アリール) - $C_1 \sim 4$ - アルキルからなる群から選択される); - (CH_2)_q $SO_2 R^D$ (ここで、 q が、0~4 の整数であり、 R^D が、 $C_1 \sim 6$ アルキル、 $C_6 \sim 10$ アリール、および ($C_6 \sim 10$ アリール) - $C_1 \sim 4$ - アルキルからなる群から選択される); - (CH_2)_q $SO_2 NR^E R^F$ (ここで、 q が、0~4 の整数であり、 R^E および R^F のそれぞれが、独立して、水素、アルキル、アリール、および ($C_6 \sim 10$ アリール) - $C_1 \sim 4$ - アルキルからなる群から選択される); チオール; アリールオキシ; シクロアルコキシ; アリールアルコキシ; ($C_1 \sim 9$ ヘテロシクリル) - $C_1 \sim 4$ - アルキル; ($C_1 \sim 9$ ヘテロアリール) - $C_1 \sim 4$ - アルキル; $C_3 \sim 12$ シリル; シアノ; および - $S(O) R^H$ (ここで、 R^H が、水素、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_6 \sim 10$ アリール、および ($C_6 \sim 10$ アリール) - $C_1 \sim 4$ - アルキルからなる群から選択される) からなる群から選択される 1 つ、2 つ、または 3 つの置換基で任意選択的に置換され;

q が、0、1、2、3、または 4 であり;

s が、0、1、または 2 である。

【0193】

特定の実施形態において、補助部分は、共役基に見られる共役部分に対する 1 つまたは複数の共有結合を形成することによって、ジスルフィド結合を含有する基に結合され得る。

【0194】

10

20

30

40

50

コンジュゲート

本発明のヌクレオチド構築物は、1つまたは複数の共役部分を有する1つまたは複数の共役基を含有し得る。共役部分はまた、様々な他の補助部分、例えば、小分子、ポリペプチド、炭水化物、中性有機ポリマー、正荷電ポリマー、治療剤、標的化部分、エンドソームエスケープ部分、またはそれらの組合せを、ヌクレオチド構築物に結合するのに使用され得る。いくつかの実施形態において、2種以上の共役部分が、ヌクレオチド構築物中に存在し、それによって、ヌクレオチド構築物に対する補助部分の選択的および／または連続的カップリングが可能になる。ポリヌクレオチド構築物における結合の位置は、ポリマーの合成における適切なヌクレオチド構築物の使用によって決定される。もう1つの共役部分を含有するヌクレオチド構築物が、適切な条件下で、補助部分における1つまたは複数の対応する共役部分と反応する。補助部分は、ペプチドまたはポリペプチド中に、共役部分、例えば、末端またはリジンアミン基およびチオール基を本質的に有してもよく、または共役部分を導入するために、小さい連結基を含むように修飾され得る。このような連結基の導入は、当該技術分野において周知である。本発明のヌクレオチド構築物に結合された補助部分が、任意の必要な連結基を含むことが理解されよう。

10

【0195】

多様な結合形成方法が、補助部分を本明細書に記載されるヌクレオチド構築物に結合するのに使用され得る。例示的な反応としては、トリアゾールを形成するためのアジドとアルキンとのヒュスゲン環状付加；ジエノフィルとジエン／ヘテロジエンとのディールス・アルダー反応；エン反応などの他のペリ環状反応を介した結合形成；アミドまたはチオアミド結合形成；スルホンアミド結合形成；アルコールまたはフェノールアルキル化（例えば、ジアゾ化合物を用いる）、オキシム、ヒドラゾン、またはセミカルバジド基を形成するための縮合反応、求核剤（例えば、アミンおよびチオール）によるコンジュゲート付加反応、ジスルフィド結合形成、およびカルボン酸官能基における求核置換（例えば、アミン、チオール、またはヒドロキシル求核剤による）が挙げられる。結合形成の他の例示的な方法は、本明細書に記載され、当該技術分野において公知である。

20

【0196】

求核剤／求電子剤反応

求核剤および求電子剤は、限定はされないが、C-H結合への求電子剤による挿入、O-H結合への求電子剤による挿入、N-H結合への求電子剤による挿入、アルケンにわたる求電子剤の付加、アルキンにわたる求電子剤の付加、求電子性カルボニル中心への付加、求電子性カルボニル中心における置換、ケテンへの付加、イソシアネートへの求核付加、イソチオシアネートへの求核付加、活性化ケイ素中心における求核置換、ハロゲン化アルキルの求核置換、擬ハロゲン化アルキルにおける求核置換、活性化カルボニルにおける求核付加／脱離、 α , β -不飽和カルボニルへの求核剤の1, 4-コンジュゲート付加、エポキシドの求核開環、電子不足芳香族化合物の芳香族求核置換、活性化リン中心への求核付加、活性化リン中心における求核置換、活性化硫黄中心への求核付加、および活性化硫黄中心における求核置換から選択される結合形成反応に関与することができる。

30

【0197】

求核性共役部分は、任意選択的に置換されるアルケン、任意選択的に置換されるアルキン、任意選択的に置換されるアリール、任意選択的に置換されるヘテロシクリル、ヒドロキシル基、アミノ基、アルキルアミノ基、アニリド基、およびチオ基から選択され得る。

40

【0198】

求電子性共役部分は、ニトレン、アジドなどのニトレン前駆体、カルベン、カルベン前駆体、活性化ケイ素中心、活性化カルボニル、無水物、イソシアネート、チオイソシアネート、スクシンイミジルエステル、スルホスクシンイミジルエステル、マレイミド、ハロゲン化アルキル、擬ハロゲン化アルキル、エポキシド、エビスルフィド、アジリジン、電子不足アリール、活性化リン中心、および活性化硫黄中心から選択され得る。

【0199】

例えば、共役は、ヒドラゾン結合である結合を形成する縮合反応を介して起こり得る。

50

【0200】

アミド結合の形成を介した共役は、カルボキシルベースの共役部分の活性化と、それに続く、第一級アミンベースの共役部分との反応によって媒介され得る。活性化剤は、EDC（1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸塩）、EDAC（1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸塩）、DCC（ジシクロヘキシルカルボジイミド）、CMC（1-シクロヘキシル-3-（2-モルホリノエチル）カルボジイミド）、DIC（ジイソプロピルカルボジイミド）またはウッドワード試薬（Woodward's reagent）K（N-エチル-3-フェニルイソオキサゾリウム-3'-スルホネート）のような様々なカルボジイミドであり得る。第一級アミンベースの共役部分との活性化NHSEステルベースの共役部分の反応も、アミド結合の形成をもたらす。

10

【0201】

ヌクレオチド構築物は、カルボニルベースの共役部分を含有し得る。第二級アミンの形成による共役は、アミンベースの共役部分を、アルデヒドベースの共役部分と反応させた後、シアノ水素化ホウ素ナトリウムのような水素化物供与体を用いて還元することによって行うことができる。アルデヒドベースの共役部分は、例えば、糖部分の酸化またはSFB（スクシンイミジル-p-ホルミルベンゾエート）もしくはSFPA（スクシンイミジル-p-ホルミルフェノキシアセテート）との反応によって導入され得る。

【0202】

エーテル形成はまた、補助部分を本発明のヌクレオチド構築物と共役させるのに使用され得る。エーテル結合を介した共役は、エポキシドベースの共役部分と、ヒドロキシベースの共役部分との反応によって媒介され得る。

20

【0203】

チオールはまた、共役部分として使用され得る。例えば、ジスルフィド結合の形成を介した共役は、ピリジルジスルフィドに媒介されるチオール-ジスルフィド交換によって行うことができる。スルフヒドリルベースの共役部分の導入は、例えば、トラウト試薬（Traut's Reagent）（2-イミノチオラン）SATA（N-スクシンイミジルS-アセチルチオアセテート、SATP（スクシンイミジルアセチルチオプロピオネート）、SPDP（N-スクシンイミジル3-（2-ピリジルジチオ）プロピオネート、SMPPT（スクシンイミジルオキシカルボニル- α -メチル- α -（2-ピリジルジチオ）トルエン）、N-アセチルホモシステインチオラクトン、SAMSA（S-アセチルメルカプトコハク酸無水物）、AMBH（2-アセドアミド-4-メルカプト酪酸ヒドラジド）、およびシスタミン（2, 2'-ジチオビス（エチルアミン）によって媒介される。

30

【0204】

チオエーテル結合の形成を介した共役は、スルフヒドリルベースの共役部分を、マレイミド-またはヨードアセチルベースの共役部分と反応させることによって、またはエポキシドベースの共役部分と反応させることによって行うことができる。マレイミドベースの共役部分は、SMCC（スクシンイミジル-4-（N-マレイミドメチル）シクロヘキサ-1-カルボキシレート）、スルホ-SMCC（スルホスクシンイミジル4-（N-マレイミドメチル）-シクロヘキサ-1-カルボキシレート）、MBS（m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル）、スルホ-MBS（m-マレイミドベンゾイル-N-スルホヒドロキシスクシンイミドエステル）、SMPB（スクシンイミジル-4-（p-マレイミドフェニル）ブチレート）、スルホ-SMPB（スルホスクシンイミジル4-（p-マレイミドフェニル）ブチレート）、GMBS（N- α -マレイミドブチリル-オキシスクシンイミドエステル）、スルホGMBS（N- α -マレイミドブチリル-オキシスルホスクシンイミドエステル）によって導入することができる。

40

【0205】

チオールベースの共役部分は、ヨードアセチルベースの共役部分とも反応することができる。ヨードアセチルベースの共役部分は、SIAB（N-スクシンイミジル（4-ヨードアセチル）アミノベンゾエート、スルホSIAB（スルホスクシンイミジル（4-ヨ

50

ードアセチル)ーアミノベンゾエート)、S I A X (スクシンイミジル6ー[(ヨードアセチルーアミノ)ヘキサノエート)、S I A X X (スクシンイミジル6ー[6ー((ヨードアセチル)アミノ)ーヘキサノイル)アミノ]ヘキサノエート)、S I A C (スクシンイミジル4ー((ヨードアセチル)アミノ)メチル)ーシクロヘキサノールーカルボキシレート)、S I A C X (スクシンイミジル6ー((4ー(ヨードアセチル)アミノ)メチル)ーシクロヘキサノールーカルボニル)アミノ)ヘキサノエート)、およびN P I A (pーニトロフェニルヨードアセテート)とともに挿入され得る。

【0206】

カルバメート結合の形成を介した共役は、ヒドロキシベースの共役部分と、C D I (N, N'ーカルボニルジイミダゾール)またはD S C (N, N'ージスクシンイミジルカーボネート)またはNーヒドロキシスクシンイミジルクロロホルメートとの反応と、それに続く、アミンベースの共役部分との反応によって行うことができる。

10

【0207】

光溶解性および熱分解性共役

あるいは、共役部分は、所望の共有結合を形成するために、光分解または熱分解活性化を用いることができる。アジド官能基を含む共役部分が一例である。したがって、共役は、光反応性共役部分の導入によって行うこともできる。光反応性共役部分は、アリールアジド、ハロゲン化アリールアジド、ベンゾフェノン、特定のジアゾ化合物およびジアジリン誘導体である。それらは、アミノベースの共役部分または活性化水素結合を有する共役部分と反応する。

20

【0208】

アジドベースの共役部分は、UV不安定性であり、光分解の際に、アリールベースの共役部分またはアルケニルベースの共役部分などの求核性共役部分と反応し得るニトレン求電子剤の形成をもたらし得る。あるいは、これらのアジド化合物の加熱も、ニトレン形成をもたらし得る。

【0209】

環状付加反応

環状付加反応は、所望の共有結合を形成するのに使用され得る。代表的な環状付加反応としては、限定はされないが、アルケンベースの共役部分と、1, 3ージエンベースの共役部分との反応(ディールス・アルダー反応)、アルケンベースの共役部分と、 α , β ー不飽和カルボニルベースの共役部分との反応(ヘテロディールス・アルダー反応)、およびアルキンベースの共役部分と、アジドベースの共役部分との反応(ヒュスゲン環状付加)が挙げられる。環状付加反応のための反応剤を含む共役部分の選択される非限定的な例は、アルケン、アルキン、1, 3ージエン、 α , β ー不飽和カルボニル、およびアジドである。例えば、アジドとアルキンとのヒュスゲン環状付加(クリック反応)は、多様な生物学的実体の官能化のために使用されている。

30

【0210】

カップリング反応

共役部分は、限定はされないが、ヒドロシリル化のための反応剤、オレフィン交差メタセシス、コンジュゲート付加、スティルカップリング、鈴木カップリング、菌頭カップリング、檜山カップリング、およびヘック反応も含む。これらの反応のための共役部分としては、ヒドリドシラン、アルケン(例えば、エノンまたはエノエートなどの活性化アルケン)、アルキン、ハロゲン化アリール、擬ハロゲン化アリール(例えば、トリフレートまたはノナフレート)、ハロゲン化アルキル、および擬ハロゲン化アルキル(例えば、トリフレート、ノナフレート、およびホスフェート)が挙げられる。クロスカップリング反応のための触媒は、当該技術分野において周知である。このような触媒は、有機金属錯体または金属塩(例えば、Pd(0)、Pd(II)、Pt(0)、Pt(II)、Pt(IV)、Cu(I)、またはRu(II))であり得る。リガンド(例えば、PPh₃、PCy₃、BINAP、dpppe、dpppf、SIMes、またはSIPr)および金属塩(例えば、LiCl)などの添加剤が、クロスカップリング反応を促進するのに加えられ

40

50

てもよい。

【0211】

共役のための補助部分

様々な補助部分が、本発明のヌクレオチド構築物（例えば、s i R N A）に共役され得、補助部分はいくつもの生物学的または化学的效果を有し得る。生物学的効果としては、限定はされないが、細胞内在化（i n t r a c e l l u l a r i z a t i o n）の誘導、細胞表面への結合、特定の細胞型の標的化、エンドソームエスケープの許容、インビボでのポリヌクレオチドの半減期の改変、および治療効果の付与が挙げられる。化学的效果としては、限定はされないが、溶解度、溶解、および反応性の変化が挙げられる。

【0212】

小分子

小分子ベースの補助部分（例えば、約1000Da以下の分子量を有する有機化合物）は、本発明のヌクレオチド構築物に共役され得る。このような小分子の例としては、限定はされないが、置換もしくは非置換アルカン、アルケン、またはアルキン、例えば、ヒドロキシー置換、NH₂置換、モノー、ジー、もしくはトリアルキルアミノ置換、グアニジノ置換、ヘテロシクリル置換、およびそれらの保護形態が挙げられる。他の小分子としては、ステロイド（例えば、コレステロール）、他の脂質、胆汁酸、およびアミノ酸が挙げられる。中性もしくは正電荷を与えるために、またはポリヌクレオチドの親水性または疎水性を改変するために、小分子が、ポリヌクレオチドに加えられてもよい。

【0213】

ポリペプチド

ポリペプチド（融合ポリペプチドを含む）は、モノマーがアミド結合によって一緒に結合されたアミノ酸残基であるポリマーを指す。アミノ酸が、 α -アミノ酸であるとき、L-光学異性体またはD-光学異性体のいずれも使用され得る。ポリペプチドは、アミノ酸配列を包含し、糖タンパク質、レトロインベルソ（r e t r o - i n v e r s o）ポリペプチド、D-アミノ酸など修飾配列を含む。ポリペプチドは、天然タンパク質、ならびに組み換えまたは合成により合成されたものを含む。ポリペプチドは、ポリペプチドの特定の断片または部分に起因し得る機能を有する2つ以上のドメインを含み得る。あるドメインは、例えば、少なくとも1つの有用なエピトープまたは機能ドメインを示すポリペプチドの一部を含む。2つ以上のドメインが、各ドメインがその機能を保持するが、単一のペプチドまたはポリペプチド（例えば、融合ポリペプチド）を含むように機能的に連結され得る。例えば、PTDの機能性断片は、形質導入活性を保持する断片を含む。生物学的に機能性の断片は、例えば、抗体分子に結合することができるエピトープ程度の小さい断片から、細胞内の表現型変化の特徴的誘導またはプログラミングに参与することができる大きいポリペプチドまでサイズが変動し得る。

【0214】

ある実施形態において、レトロインベルソポリペプチドが使用される。「レトロインベルソ」は、1つまたは複数のアミノ酸におけるアミノ-カルボキシ反転ならびにエナンチオマー変化（すなわち、左旋性（L）から右旋性（D）への変化）を意味する。本発明のポリペプチドは、例えば、アミノ酸配列のアミノ-カルボキシ反転、1つまたは複数のD-アミノ酸を含有するアミノ-カルボキシ反転、および1つまたは複数のD-アミノ酸を含有する非反転配列を包含する。安定し、生物活性を保持するレトロインベルソペプチド模倣薬が、Brugidou et al. (Biochem. Biophys. Res. Comm. 214 (2): 685-693, 1995) および Chorev et al. (Trends Biotechnol. 13 (10): 438-445, 1995) によって記載されているように、考案され得る。レトロインベルソポリペプチドの全体的な構造的特徴は、親L-ポリペプチドのものと類似している。しかしながら、これらの2つの分子は、キラル二次構造要素を本質的に共有するため、ほぼ鏡像である。ペプチド結合逆転およびキラリティーの反転に基づく主鎖ペプチド模倣薬は、ペプチドおよびタンパク質についての重要な構造的変化を表し、生物工学にとって非常に有意義であ

10

20

30

40

50

る。抗原性および免疫原性は、天然の抗原ペプチドおよびポリペプチドの全ての-D-およびレトロインベルソ-異性体などの代謝的に安定した抗原によって達成され得る。いくつかのPTD由来のペプチド模倣薬が、本明細書に示される。

【0215】

ポリペプチドおよび断片は、天然由来のポリペプチドまたはドメインと同じかまたは実質的に同じアミノ酸配列を有し得る。「実質的に同一」は、アミノ酸配列が、完全にはないが、ほぼ同じであるが、それが関連する配列の機能的活性を保持することを意味する。機能的活性の一例は、断片が、形質導入が可能であるか、またはRNAに結合することが可能であることである。例えば、形質導入活性を有する完全長TATの断片が本明細書に記載されている。一般に、2つのペプチド、ポリペプチドまたはドメインは、それらの配列が少なくとも85%、90%、95%、98%または99%同一である場合、または配列中に保存的変異がある場合、「実質的に同一」である。BLASTプログラム(Altschulet al., 1990)などのコンピュータプログラムが、配列同一性を比較するのに使用され得る。

【0216】

本発明のポリペプチドは、ペプチド結合または修飾ペプチド結合、すなわち、ペプチド等電子体によって互いに結合されたアミノ酸から構成することができ、20遺伝子コード化アミノ酸以外のアミノ酸を含有し得る。ポリペプチドは、翻訳後プロセッシングなどの天然のプロセス、または当該技術分野において周知の化学修飾技術のいずれかによって修飾され得る。このような修飾は、基本的なテキストおよびより詳細な研究論文、ならびに大量の研究文献に十分に記載されている。修飾は、骨格、アミノ酸側鎖およびアミノまたはカルボキシル末端を含む、ポリペプチドのいずれの場所で行うこともできる。同じタイプの修飾が、所与のペプチドまたはポリペプチドにおけるいくつかの部位において同じかまたは様々な程度で存在し得ることが理解されよう。また、所与のポリペプチドが、多くのタイプの修飾を含んでいてもよい。ポリペプチドは、例えば、ユビキチン化の結果として分岐していてもよく、分岐を有するかまたは有さない、環状であってもよい。環状、分岐、および分岐環状ポリペプチドは、翻訳後の天然のプロセスによって生じるものであってもよく、または合成方法によって作製され得る。修飾は、アセチル化、アシル化、ADP-リボシル化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質もしくは脂質誘導体の共有結合、ホスホチジルイノシトールの共有結合、架橋、環化、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、共有結合架橋の形成、システインの形成、ピログルタメートの形成、ホルミル化、 γ -カルボキシル化、グリコシル化、GPIアンカー形成、ヒドロキシル化、ヨウ素化、メチル化、ミリスチル化、酸化、ペグ化、タンパク質分解プロセッシング、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、タンパク質へのアミノ酸の転移RNA媒介性付加(アルギニル化など)、およびユビキチン化が挙げられる。(例えば、Proteins—Structure And Molecular Properties, 2nd Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York (1993); Posttranslational Covalent Modification of Proteins, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, pgs. 1-12 (1983); Seifter et al., Meth Enzymol 182: 626-646 (1990); Rattan et al., Ann N. Y. Acad Sci 663: 48-62 (1992)を参照)。

【0217】

本発明のポリペプチドドメインまたは融合ポリペプチドは、 α -アミノ基のt-BOCまたはFMOC保護を含むものなどの一般的に使用される方法によって合成され得る。いずれの方法も、単一のアミノ酸が、ペプチドまたはポリペプチドのC末端から開始する各工程で加えられる段階的合成を含む(Coligan, et al., Current Protocols in Immunology, Wiley Interscien

ce, 1991, Unit 9を参照)。本発明のポリペプチドは、ポリマーのg当たり0.1~1.0mMolのアミンを含有するコポリ(スチレンージビニルベンゼン)を用いて、Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85:2149, 1962;およびStewart and Young, Solid Phase Peptides Synthesis, Freeman, San Francisco, 1969、pp. 27-62に記載されているものなどの周知の固相ペプチド合成方法によって合成することもできる。化学合成の完了時に、ポリペプチドは、脱保護され、0℃で約1/4~1時間にわたって液体のHF-10%のアニソールによる処理によってポリマーから切断され得る。試薬の蒸発の後、ポリペプチドは、1%の酢酸溶液でポリマーから抽出され、次に、それが、凍結乾燥されて、粗材料が得られる。ポリペプチドは、溶媒として5%の酢酸を用いたSephadex G-15におけるゲルろ過などの技術によって精製され得る。カラム溶出液の適切な画分の凍結乾燥により、均質なペプチドまたはポリペプチドが得られ、次に、それが、アミノ酸分析、薄層クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、紫外吸収分光法、モル旋光度、または溶解度測定などの標準的な技術によって特性評価され得る。必要に応じて、ポリペプチドは、固相エドマン分解によって定量され得る。

10

【0218】

炭水化物

本発明のヌクレオチド構築物に結合され得る炭水化物ベースの補助部分は、単糖、二糖、および多糖を含む。例としては、アロース、アルトロース、アラビノース、クラジノース、エリトロース、エリトルロース、フルクトース、D-フシトール、L-フシトール、フコサミン、フコース、フクロース、ガラクトサミン、D-ガラクトサミニトール、N-アセチル-ガラクトサミン、ガラクトース、グルコサミン、N-アセチル-グルコサミン、グルコサミニトール、グルコース、グルコース-6-リン酸、グルコースグリセルアルデヒド、L-グリセロール-D-マンノース-ヘプロース、グリセロール、グリセロン、グルコースイドース、リキソース、マンノサミン、マンノース、マンノース-6-リン酸、ブシコース、キノボース、キノボサミン、ラムニトール、ラムノサミン、ラムノース、リボース、リブプロース、セドヘブツロース、ソルボース、タガトース、タロース、酒石酸、トレオース、キシロースおよびキシルロースが挙げられる。単糖は、D-またはL-立体配置であり得る。単糖はさらに、デオキシ糖(アルコールのヒドロキシ基が、水素で置換される)、アミノ糖(アルコールのヒドロキシ基が、アミノ基で置換される)、チオ糖(アルコールのヒドロキシ基が、チオールで置換されるか、またはC=Oが、C=Sで置換されるか、または環状形態の環酸素が、硫黄で置換される)、セレノ糖、テルロ糖、アザ糖(環炭素が、窒素で置換される)、イミノ糖(環酸素が、窒素で置換される)、ホスファノ糖(環酸素が、リンで置換される)、ホスファ糖(環炭素が、リンで置換される)、C-置換単糖(非末端炭素原子における水素が、炭素で置換される)、不飽和単糖、アルジトール(カルボニル基が、CHOH基で置換される、例えば、グルシトール)、アルドン酸(アルデヒド基が、カルボキシ基で置換される)、ケトアルドン酸、ウロン酸、アルダル酸などであり得る。アミノ糖としては、ガラクトサミン、グルコサミン、マンノサミン、フコサミン、キナボサミン、ノイラミン酸、ムラミン酸、ラクトースジアミン、アコサミン、バシロサミン、ダウノサミン、デソサミン、ホロサミン、ガロサミン、カノサミン、カノサミン、ミカミノース、ミオサミン、ペルソサミン、プノイモサミン、プルプロサミン、ロードスミンなどのアミノ単糖が挙げられる。単糖などがさらに置換され得ることが理解される。二糖および多糖としては、アベクオース、アクラボース、アミセトース、アミロペクチン、アミロース、アピオース、アルカノース、アスカリロース、アスコルビン酸、ボイビノース、セロビオース、セロトリオース、セルロース、チャコトリオース、チャルコース、キチン、コリトース、シクロデキストリン、シマロース、デキストリン、2-デオキシリボース、2-デオキシグルコースジギノース、ジギタロース、ジギトキソース、エバロース、エベミトロース、フルクトオリゴ糖、ガラクトオリゴ糖、ゲンチアノース、ゲニチオビオース、グルカン、グルイコーゲン(gluicogen)、グリコーゲン、

20

30

40

50

ハマメロース、ヘパリン、イヌリン、イソレボグルコセノン、イソマルトース、イソマルトトリオース、イソパノース、コジビオース、ラクトース、ラクトサミン、ラクトースジアミン、ラミナラビオース、レボグルコサン、レボグルコセノン、 β -マルトース、マルトトリオース、マンナン-オリゴ糖、マンニトリオース、メレジトース、メリビオース、ムラミン酸、ミカロース、ミシノース、ノイラミン酸、ミゲロース、ノジリマイコン、ノビオース、オレアンドロース、パノース、パラトース、プランテオース、プリメベロース、ラフィノース、ロドン、ルチノース、オレアンドロース、パノース、パラトース、プランテオース、プリメベロース、ラフィノース、ロジノース、ルチノース、サルメントース、セドヘプツロース、セドヘプツロサン、ソラトリオース、ソフォロース、スタキオース、ストレプトース、スクロース、 α , α -トレハロース、トラハロサミン、ツラノース、チベロース、キシロビオース、ウンベリフェロースなどが挙げられる。炭水化物は、本発明のポリヌクレオチド構築物において1つまたは複数の機能を果たすことができ、例えば、炭水化物は、標的化部分（例えば、マンノース）であり得、または水性媒体へのポリヌクレオチド構築物の溶解度を高めることができる（例えば、グルシトール）。

10

【0219】

ポリマー

本明細書に記載されるヌクレオチド構築物は、共有結合された中性または荷電（例えば、カチオン性）ポリマーベースの補助部分も含み得る。正荷電ポリマーの例としては、ポリ（エチレンイミン）（PEI）、スペルミン、スペルミジン、およびポリ（アミドアミン）（PAMAM）が挙げられる。中性ポリマーとしては、ポリ（ $C_1 \sim 6$ アルキレンオキシド）、例えば、ポリ（エチレングリコール）およびポリ（プロピレングリコール）ならびにそれらのコポリマー、例えば、ジ-およびトリブロックコポリマーが挙げられる。ポリマーの他の例としては、エステル化ポリ（アクリル酸）、エステル化ポリ（グルタミン酸）、エステル化ポリ（アスパラギン酸）、ポリ（ビニルアルコール）、ポリ（エチレン-コ-ビニルアルコール）、ポリ（N-ビニルピロリドン）、ポリ（アクリル酸）、ポリ（エチルオキサゾリン）、ポリ（アルキルアクリレート）、ポリ（アクリルアミド）、ポリ（N-アルキルアクリルアミド）、ポリ（N-アクリロイルモルホリン）、ポリ（乳酸）、ポリ（グリコール酸）、ポリ（ジオキサノン）、ポリ（カプロラクトン）、スチレン-無水マレイン酸コポリマー、ポリ（L-ラクチド-コ-グリコリド）コポリマー、ジビニルエーテル-無水マレイン酸コポリマー、N-（2-ヒドロキシプロピル）メタクリルアミドコポリマー（HMPA）、ポリウレタン、ポリ（2-エチルアクリル酸）、N-イソプロピルアクリルアミドポリマー、ポリホスファジンおよびポリ（N, N-ジアルキルアクリルアミド）が挙げられる。例示的なポリマー補助部分は、100、300、500、1000、または5000未満の分子量を有してもよい。他のポリマーは、当該技術分野において公知である。

20

30

【0220】

治療剤

診断/イメージング剤を含む治療剤は、補助部分として、本発明のヌクレオチド構築物に共有結合され得るか、または本明細書に記載されるように、共同療法（co-therapy）として投与され得る。それらは、天然化合物、合成有機化合物、または無機化合物であり得る。例示的な治療剤としては、限定はされないが、抗生物質、抗増殖剤、ラパマイシンマクロライド、鎮痛薬、麻酔薬、血管新生抑制剤、血管作用剤、抗凝固剤、免疫調節剤、細胞毒性薬、抗ウイルス剤、抗血栓薬、抗体、神経伝達物質、精神作用薬、およびそれらの組合せが挙げられる。治療剤のさらなる例としては、限定はされないが、細胞周期制御剤；サイクリンタンパク質産生を阻害する薬剤；インターロイキン1~13および腫瘍壊死因子を含むがこれらに限定されないサイトカイン；抗凝固剤、抗血小板剤；TNF受容体ドメインなどが挙げられる。典型的に、治療剤は、中性または正荷電である。場合によっては、治療剤が負荷電である場合、さらなる電荷中和部分（例えば、カチオン性ペプチド）が使用され得る。

40

【0221】

50

治療薬部分は、補助部分として、本明細書に開示されるヌクレオチド構築物に連結されて、診断アッセイ／イメージングを可能にし得る。このような部分の例としては、限定はされないが、同位体、放射性イメージング剤、マーカー、トレーサ、蛍光標識（例えば、ローダミン）、およびレポーター分子（例えば、ビオチン）などの検出可能な標識が挙げられる。

【0222】

例示的な診断薬としては、限定はされないが、ポジトロン放出型断層撮影法（PET）、コンピュータ断層撮影（CAT）、単一光子放射断層撮影、X線、蛍光透視法、および磁気共鳴イメージング（MRI）に使用されるものなどのイメージング剤が挙げられる。MRIにおける造影剤として使用するのに好適な材料としては、限定はされないが、ガドリニウムキレート、ならびに鉄、マグネシウム、マンガン、銅、およびクロムキレートが挙げられる。CATおよびX線に有用な材料の例としては、限定はされないが、ヨウ素系材料が挙げられる。

10

【0223】

好適であり得る放射線を放出する放射性イメージング剤（検出可能な放射性標識）の例は、インジウム-111、テクネチウム-99、または低線量ヨウ素-131によって例示される。補助部分として、本発明のヌクレオチド構築物とともに使用するためのまたはこれに結合される検出可能な標識、またはマーカーは、放射性標識、蛍光標識、核磁気共鳴活性標識、発光標識、発色団標識、PETスキャナー用の陽電子放出同位体、化学発光標識、または酵素標識であってもよい。蛍光標識としては、限定はされないが、緑色蛍光タンパク質（GFP）、フルオレセイン、およびローダミンが挙げられる。標識は、例えば限定はされないが、テクネチウム-99、ヨウ素-123および-131、タリウム-201、ガリウム-67、フッ素-18、インジウム-111などの例えば医療用同位体であり得る。

20

【0224】

当該技術分野において公知の他の治療剤が同様に、補助部分として、本発明のヌクレオチド構築物とともに使用されるか、またはこれに結合され得る。

【0225】

標的化部分

本発明は、補助部分として、例えば、標的化補助部分として、本明細書に開示されるヌクレオチド構築物に結合され得る1つまたは複数の標的化部分を提供する。標的化部分（例えば、細胞外標的化部分）は、本発明の構築物を、選択された標的化部分についての対応する結合パートナー（例えば、対応する受容体またはリガンド）を発現する所望のまたは選択された細胞集団に標的化させるその能力に基づいて選択される。例えば、本発明の構築物は、標的化部分として選択された上皮増殖因子（EGF）によって上皮増殖因子受容体（EGFR）を発現する細胞に標的化され得る。あるいは、標的化部分（例えば、細胞内標的化部分）は、本発明の構築物を、細胞内の所望の部位（例えば、小胞体、ゴルジ体、核、またはミトコンドリア）に標的化させることができる。細胞内標的化部分の非限定的な例としては、表3の化合物P38およびP39ならびにそのペプチド断片（すなわち、それぞれ、MKWVTFISLLFLFFSSAYS（配列番号56）およびMIRTL L L S T L V A G A L S（配列番号57））が挙げられる。

30

40

【0226】

したがって、本発明のポリヌクレオチド構築物は、細胞内標的化部分、細胞外標的化部分、およびそれらの組合せからなる群から選択される1つまたは複数の標的化部分を含み得る。したがって、本発明のポリヌクレオチド構築物に、1つまたは複数の細胞外標的化部分（例えば、葉酸塩、マンノース、ガラクトサミン（例えば、N-アセチルガラクトサミン）、および前立腺特異的膜抗原からなる群から独立して選択される各細胞外標的化部分）ならびに1つまたは複数の細胞内標的化部分（例えば、小胞体、ゴルジ体、核、もしくはミトコンドリアを標的にする部分）を含めることにより、特定の細胞集団内の特定の部位へのポリヌクレオチドの送達を促進することができる。ある実施形態において、標的

50

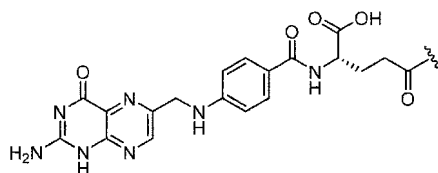
化部分は、1つまたは複数のマンノース炭水化物を含有する。マンノースは、類洞肝細胞および抗原提示細胞（例えば、マクロファージおよび樹枝状細胞）内で発現される175

KDa膜結合受容体であるマンノース受容体を標的にする。それは、マンノシル化された病原体およびタンパク質に結合し、それを内在化する非常に有効なエンドサイトーシス／リサイクリング受容体である（Lennartz et al. J. Biol. Chem. 262:9942-9944, 1987; Taylor et al. J. Biol. Chem. 265:12156-62, 1990）。

【0227】

本発明の細胞外標的化部分のいくつかは、本明細書に記載される。一実施形態において、標的化部分は、受容体結合ドメインである。別の実施形態において、標的化部分は、インスリン、インスリン様増殖因子受容体1（IGF1R）、IGF2R、インスリン様増殖因子（IGF；例えば、IGF 1または2）、上皮間葉転換因子受容体（c-met；肝細胞増殖因子受容体（HGFR）としても知られている）、肝細胞増殖因子（HGF）、上皮増殖因子受容体（EGFR）、上皮増殖因子（EGF）、ヘレグリン、線維芽細胞増殖因子受容体（FGFR）、血小板由来増殖因子受容体（PDGFR）、血小板由来増殖因子（PDGF）、血管内皮増殖因子受容体（VEGFR）、血管内皮増殖因子（VEGF）、腫瘍壊死因子受容体（TNFR）、腫瘍壊死因子 α （TNF- α ）、TNF- β 、葉酸塩受容体（FOLR）、葉酸塩、トランスフェリン、トランスフェリン受容体（TfR）、メソテリン、Fc受容体、c-kit受容体、c-kit、インテグリン（例えば、 $\alpha 4$ インテグリンまたは $\beta 1$ インテグリン）、P-セレクチン、スフィンゴシン-1-リン酸受容体-1（S1PR）、ヒアルロン酸受容体、白血球機能抗原-1（LFA-1）、CD4、CD11、CD18、CD20、CD25、CD27、CD52、CD70、CD80、CD85、CD95（Fas受容体）、CD106（血管細胞接着分子1（VCAM1）、CD166（活性化白血球細胞接着分子（ALCAM））、CD178（Fasリガンド）、CD253（TNF関連アポトーシス誘導リガンド（TRAIL））、ICOSリガンド、CCR2、CXCR3、CCR5、CXCL12（間質細胞由来因子1（SDF-1））、インターロイキン1（IL-1）、IL-1ra、IL-2、IL-3、IL-4、IL-6、IL-7、IL-8、CTLA-4、MART-1、gp100、MAGE-1、エフリン（Eph）受容体、エフリン細胞接着分子1（MAdCAM-1）、癌胎児性抗原（CEA）、Lewis^Y、MUC-1、上皮細胞接着分子（EPCAM）、癌抗原125（CA125）、前立腺特異的膜抗原（PSMA）、TAG-72抗原、およびこれらの断片を含む群から選択されるタンパク質であるか、またはそれに特異的に結合する。さらなる実施形態において、標的化部分は、赤芽球性白血病ウイルス性癌遺伝子ホモログ（Erbb）受容体（例えば、Erbb1受容体；Erbb2受容体；Erbb3受容体；およびErbb4受容体）である。他の実施形態において、標的化部分は、アシアロ糖タンパク質受容体、マンノ受容体、または葉酸塩受容体に選択的に結合し得る。特定の実施形態において、標的化部分は、1つまたは複数のN-アセチルガラクトサミン（GalNAc）、マンノース、または葉酸塩リガンドを含有する。いくつかの実施形態において、葉酸塩リガンドは、構造：

【化24】



を有する。

【0228】

標的化部分はまた、ボンベシン、ガストリン、ガストリン放出ペプチド、TGF- α およびTGF- β などの腫瘍増殖因子（TGF）、およびワクシニアウイルス増殖因子（V

VGF) から選択され得る。非ペプチジルリガンドは、標的化部分として使用することもでき、例えば、ステロイド、炭水化物、ビタミン、およびレクチンを含み得る。標的化部分はまた、ソマトスタチン (例えば、コア配列シクロ [Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys] (配列番号103) を有するソマトスタチン、ここで、例えば、ソマトスタチン類似体のC末端がThr-NH₂である)、ソマトスタチン類似体 (例えば、オクトレオチドおよびランレオチド)、ボンベシン、ボンベシン類似体などのポリペプチド、またはモノクローナル抗体などの抗体から選択され得る。

【0229】

本発明のヌクレオチド構築物において標的化補助部分として使用するための他のペプチドまたはポリペプチドは、KISSペプチドおよび類似体、ウロテンシンIIペプチドおよび類似体、GnRH IおよびIIペプチドおよび類似体、デプレオチド、バプレオチド、血管作動性腸管ペプチド (VIP)、コレシストキニン (CKK)、RGD含有ペプチド、メラニン細胞刺激ホルモン (MSH) ペプチド、ニューロテンシン、カルシトニン、抗腫瘍抗体の相補性決定領域由来のペプチド、グルタチオン、YIGSR (配列番号104) (白血球結合 (leukocyte-avid) ペプチド、例えば、血小板因子-4 (PF-4) のヘパリン結合領域およびリジンリッチ配列を含むP483H)、心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP)、 β -アミロイドペプチド、 δ -オピオイドアンタゴニスト (ITIPP (psi) など)、アネキシン-V、エンドセリン、ロイコトリエンB₄ (LTB₄)、走化性ペプチド (例えば、N-ホルミルメチオニルロイシルフェニルアラニン-リジン (fMLFK; 配列番号105)、GP I Ib/IIa 受容体アンタゴニスト (例えば、DMP444)、ヒト好中球エラスターゼ阻害剤 (EPI-HNE-2 および EPI-HNE-4)、プラスミン阻害剤、抗微生物ペプチド、アプチシド (apticide) (P280 および P274)、トロンボスポンジン受容体 (TP-1300 などの類似体を含む)、ビチスタチン、下垂体アデニルシクラーゼI型受容体 (PAC1)、フィブリン α 鎖、ファージディスプレイライブラリ由来のペプチド (例えば、配列番号13 および 14)、およびそれらの保存的置換物から選択され得る。

【0230】

本発明のヌクレオチド構築物において、標的化部分として使用するための免疫反応性リガンドは、抗原認識免疫グロブリン (「抗体」とも呼ばれる)、またはその抗原認識断片を含む。本明細書において使用される際、「免疫グロブリン」は、IgG、IgA、IgM、IgD、またはIgEなどの、免疫グロブリンの任意の認識されたクラスまたはサブクラスを指す。典型的なものは、免疫グロブリンのIgGクラスに含まれる免疫グロブリンである。免疫グロブリンは、任意の種に由来し得る。しかしながら、典型的に、免疫グロブリンは、ヒト、マウス、またはウサギ由来のものである。さらに、免疫グロブリンは、ポリクローナルまたはモノクローナルであり得るが、典型的にモノクローナルである。

【0231】

本発明の標的化部分は、抗原認識免疫グロブリン断片を含み得る。このような免疫グロブリン断片は、例えば、Fab'、F(ab')₂、F_vまたはFab断片、単一ドメイン抗体、ScFv、または他の抗原認識免疫グロブリン断片を含み得る。また、Fc断片は、標的化部分として用いられてもよい。このような免疫グロブリン断片は、例えば、タンパク質分解酵素消化、例えば、ペプシンもしくはパパイン消化、還元的アルキル化、または組み換え技術によって調製され得る。このような免疫グロブリン断片を調製するための材料および方法は、当業者に周知である。Parham, J. Immunology, 131, 2895, 1983; Lamoyi et al., J. Immunological Methods, 56, 235, 1983を参照されたい。

【0232】

本発明の標的化部分は、当該技術分野において公知であるが、本開示に具体例として示されていない標的化部分を含む。

【0233】

エンドソームエスケープ

10

20

30

40

50

本発明は、補助部分として、例えば、エンドソームエスケープ補助部分として、本明細書に開示されるヌクレオチド構築物に結合され得る1つまたは複数のエンドソームエスケープ部分を提供する。例示的なエンドソームエスケープ部分としては、化学療法薬（例えば、クロロキンなどのキノロン）；融合性脂質（例えば、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（DOPE））；およびポリエチレンイミン（PEI）などのポリマー；ポリ（ β -アミノエステル）；ポリアルギニン（例えば、オクタアルギニン）およびポリリジン（例えば、オクタリジン）などのペプチドまたはポリペプチド；プロトンスポンジ、ウイルスキャプシド、および本明細書に記載されるペプチド形質導入ドメインが挙げられる。例えば、融合性ペプチドは、インフルエンザAウイルスのM2タンパク質；インフルエンザウイルス赤血球凝集素のペプチド類似体；インフルエンザCウイルスのHEFタンパク質；フィロウイルスの膜貫通糖タンパク質；狂犬病ウイルスの膜貫通糖タンパク質；水疱性口内炎ウイルスの膜貫通糖タンパク質（G）；センダイウイルスの融合タンパク質；セムリキ森林熱ウイルスの膜貫通糖タンパク質；ヒト呼吸器合胞体ウイルス（RSV）の融合タンパク質；麻疹ウイルスの融合タンパク質；ニューカッスル病ウイルスの融合タンパク質；ビスナウイルスの融合タンパク質；マウス白血病ウイルスの融合タンパク質；HTLVウイルスの融合タンパク質；およびサル免疫不全ウイルス（SIV）の融合タンパク質に由来し得る。エンドソームエスケープを促進するのに用いられ得る他の部分は、Dominska et al., Journal of Cell Science, 123(8):1183-1189, 2010に記載されている。例示的なエンドソームエスケープ部分が、実施例1の表3に示される。

【0234】

送達ドメイン

本発明は、補助部分として、例えば、送達ドメイン補助部分として、本明細書に開示されるヌクレオチド構築物に結合され得る1つまたは複数の送達ドメイン部分を提供する。送達ドメインは、任意の機構によって、細胞への本発明のポリヌクレオチドの輸送を誘導する部分である。典型的に、本発明のヌクレオチド構築物は、マクロピノサイトーシス、食作用、またはエンドサイトーシス（例えば、クラスリン媒介性エンドサイトーシス、カベオラ媒介性エンドサイトーシス、および脂質ラフト依存性エンドサイトーシス）によって内在化される（例えば、Chem. Soc. Rev., 2011, 40, 233-245を参照）。送達ドメインは、ペプチドまたはポリペプチド（例えば、ペプチド形質導入ドメイン）、炭水化物（ヒアルロン酸）、および本明細書に記載される正荷電ポリマー（ポリ（エチレンイミン））を含み得る。

【0235】

ペプチド形質導入ドメイン

細胞送達は、TAT（配列番号1）またはArg₈（配列番号2）（Snyder and Dowdy, 2005, Expert Opin. Drug Deliv. 2, 43-51）などのカチオン性ペプチド形質導入ドメイン（PTD；細胞透過性ペプチド（CPP）とも呼ばれる）への、「カーゴ（cargo）」生物剤（この場合、ポリヌクレオチド）の高分子融合によって行うことができる。PTDは、本明細書に記載されるポリヌクレオチドを含む多種多様な高分子カーゴを送達するのに使用され得る（Schwarze et al., 1999, Science 285, 1569-1572；Eguchi et al., 2001, J. Biol. Chem. 276, 26204-26210；およびKoppelhus et al., 2002, Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 12, 51-63）。カチオン性PTDは、マクロピノサイトーシス、すなわち、全ての細胞が行う流体相取込みの特殊化形態によって細胞に侵入する。

【0236】

モデル小胞体に関する生物物理学的研究は、カーゴが、マクロピノソーム小胞体から細胞質へと脱出し、したがって、pH低下が必要であることを示唆している（Magzoub et al., 2005, Biochemistry 44, 14890-1489

7)。PTDのカチオン電荷は、分子が細胞膜を通過するのに不可欠である。当然ながら、アニオン性siRNA（約40の負電荷）とのカチオン性PTD（6～8の正電荷）の共役は、電荷中和およびPTDの不活性化を引き起こし、siRNAが細胞に侵入しなくなる（Turner et al., Blood Cells Mol. Dis., 38（1）：1～7, 2007）。しかしながら、本明細書に記載されるヌクレオチド構築物（例えば、アニオン性RNAまたはDNA）とのカチオン性PTDの化学的共役では、ヌクレオチド構築物が、細胞によって取り込まれることがまだ可能であり、したがって、本明細書に開示される新規かつ非自明のヌクレオチド構築物では、他の類似の方法で見られる電荷中和の有害な影響がない。さらに、これらのPTDの切断により、細胞内で、ポリヌクレオチドを、標的細胞に不可逆的に送達させることができる。

10

【0237】

真核細胞の原形質膜を効率的に通過することができるいくつかのタンパク質の発見が、ペプチド形質導入ドメインが由来するタンパク質のクラスの同定につながった。これらのタンパク質のうちで最良の特性評価をされるのは、ショウジョウバエ（Drosophila）ホメオタンパク質であるアンテナペディア転写タンパク質（AntHD）（Joliot et al., New Biol. 3：1121～34, 1991；Joliot et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88：1864～8, 1991；Le Roux et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90：9120～4, 1993）、単純ヘルペスウイルス構造タンパク質VP22（Elliot and O'Hare, Cell 88：223～33, 1997）、HIV-1転写活性化因子TATタンパク質（Green and Loewenstein, Cell 55：1179～1188, 1988；Frankel and Pabo, Cell 55：1189～1193, 1988）、およびより最近ではプリオンタンパク質のカチオン性N末端ドメインである。例示的なPTD配列は、表1に示される。本発明は、補助部分として、本明細書に開示されるヌクレオチド構築物に共役されるべき、表1に列挙されるPTDまたは当該技術分野において公知の他のPTDの1つまたは複数をさらに提供する（例えば、Joliot et al., Nature Cell Biology, 6（3）：189～196, 2004を参照）。共役のための手法は、細胞内酵素の作用によって切断され得る官能基を含む二官能性リンカーの使用を含む。

20

30

【0238】

【表1】

表1

PTD	配列	配列番号
TAT	RKKRRQRRR	配列番号1
ペネトラチン	RQIKIWFAQNRRMKWKK	配列番号3
ブフォリンII	TRSSRAGLQFPVGRVHRLLRK	配列番号4
トランスポーター	GWTLNSAGYLLGKINKALAAALAKKIL	配列番号5
MAP（モデル 両親媒性 ペプチド）	KLALKLALKALKAAALKLA	配列番号6
K-FGF	AAVALLPAVLLALLAP	配列番号7
Ku70	VPMLK - PMLKE	配列番号8
プリオン	MANLGWLLALFVTMTDVLCKKRPKP	配列番号9
pVEC	LLILRRRIRKQAHASK	配列番号10
Pep-1	KETWWETWWTEWSQPKKKRKV	配列番号11
SynB1	RGGRLSYRRRFSTSTGR	配列番号12
Pep-7 （ファージディスプレイ）	SDLWEMMMVSLACQY	配列番号13
HN-1 （ファージディスプレイ）	TSPLNIHNGQKL	配列番号14

40

【0239】

本明細書に記載されるヌクレオチド構築物のいずれかに共役され得るTATペプチドを含む例示的な補助部分が、表2に示される。

50

【0240】

【表2】

表2

配列 (N'からC')
PEG-(PTD)
GG-(PTD)-PEG-(PTD)
PEG-(PTD)-PEG-(PTD)
GG-(PTD)-PEG-PEG-PEG-(PTD)
PEG-(PTD)-PEG-PEG-PEG-(PTD)
GG-(PTD)-PEG-(PTD)-PEG-(PTD)
GG-(PTD)-PEG-PEG-PEG-(PTD)-PEG-PEG-PEG-(PTD)
PEG = 6つの繰り返し単位を有するポリ(エチレングリコール)リンカー

10

【0241】

特定の実施形態において、表2に記載される補助部分は、N'末端にZ'に対する共有結合を含み、ここで、Z'が、アルデヒドに対するポリペプチドR^Zの6-ヒドラジノニコチン酸(HyNic)またはアミノ基の共役の残基である。

【0242】

さらなる例示的なカチオン性PTD(CPP)配列が、表3に示される。

【0243】

したがって、本発明のヌクレオチド構築物に共役され得るPTDとしては、限定はされないが、AntHD、TAT、VP22、カチオン性プリオンタンパク質ドメイン、およびそれらの機能性断片が挙げられる。これらのペプチドが、細胞膜を通過することができるだけでなく、酵素β-ガラクトシダーゼなどの他のペプチドまたはポリペプチドの結合も、これらの複合体の細胞の取込みを刺激するのに十分である。このようなキメラタンパク質は、細胞質および核内に生物学的に活性な形態で存在する。このプロセスの特性評価は、これらの融合ポリペプチドの取込みが迅速であり、受容体とは無関係に、数分以内に起こることが多いことを示した。さらに、これらのタンパク質の形質導入は、細胞型に影響されないものと思われ、これらのタンパク質は、明らかな毒性なしに培養物中の約100%の細胞を効率的に形質導入することができる(Nagahara et al., Nat. Med. 4:1449-52, 1998)。完全長タンパク質に加えて、ペプチド形質導入ドメインを用いて、DNA(Abu-Amer, 前掲)、アンチセンスポリヌクレオチド(Astriab-Fisher et al., Pharm. Res, 19:744-54, 2002)、小分子(Polyakov et al., Bioconj. Chem. 11:762-71, 2000)およびさらには無機40nmの鉄粒子(Dodd et al., J. Immunol. Methods 256:89-105, 2001; Wunderbaldinger et al., Bioconj. Chem. 13:264-8, 2002; Lewin et al., Nat. Biotechnol. 18:410-4, 2000; Josephson et al., Bioconj., Chem. 10:186-91, 1999)の細胞内取込みを誘導するのにも成功しており、このことは、このプロセスにおいて粒度のかんりの順応性があることを示唆している。

20

30

40

【0244】

したがって、特定の実施形態において、本発明は、構築物の標的細胞内への標的化取込みおよび／または放出を促進するために、TATおよびpoly-ArgなどのPTDの使用を、本明細書に開示されるヌクレオチド構築物と組み合わせる方法および組成物を提供する。したがって、本明細書に開示されるヌクレオチド構築物は、補助部分として連結される治療または診断薬を、補助部分として連結される1つまたは複数のPTDをさらに含むヌクレオチド構築物によって特定の細胞内に送達されるように標的化することができる方法を提供する。

【0245】

本発明のヌクレオチド構築物は、それ自体が治療または診断利益を提供するsiRNA

50

または他の阻害性核酸配列であり得る。しかしながら、場合によっては、治療薬としてさらなる補助部分を結合するかまたは取込みを促進することが望ましいことがある。PTDの場合、PTDは、さらなる電荷修飾部分として働いて、ヌクレオチド構築物上の電荷を中和するか、または典型的に、わずかな正味カチオン電荷をヌクレオチド構築物に与えることによって、ヌクレオチド構築物の取込みを促進する。ヌクレオチド構築物が、限定はされないが、標的化部分、生物学的に活性な分子、治療薬、小分子（例えば、細胞傷害剤）などの他の補助部分を含み得ることがさらに理解されよう。このような場合、このような補助部分を有するヌクレオチド構築物が、補助部分のサイズおよび電荷に応じて、中性荷電またはカチオン性荷電であり得る。補助部分がアニオン性荷電である場合、カチオン性荷電ペプチド（例えば、PTD）の添加は、電荷をさらに中和するかまたは構築物の正味カチオン電荷を向上させることができる。

10

【0246】

一般に、本明細書に開示されるヌクレオチド構築物に連結される送達ドメインは、標的細胞への本明細書に開示される核酸構築物（nucleic construct）の細胞内送達に役立つほぼ全ての合成または天然アミノ酸配列であり得る。例えば、トランスフェクションは、本発明のヌクレオチド構築物の共役部分に共有結合される、HIV TATタンパク質またはその断片などのペプチド形質導入ドメインの使用によって、本発明にしたがって行うことができる。あるいは、ペプチド形質導入ドメインは、アンテナペディアホメオドメインまたはHSV VP22配列、プリオンタンパク質のN末端断片またはそれらの好適な形質導入断片（当該技術分野において公知のものなど）を含み得る。

20

【0247】

PTDのタイプおよびサイズは、所望のトランスフェクションの程度を含む複数のパラメータによって誘導される。典型的に、PTDは、少なくとも約20%、25%、50%、75%、80%または90%、95%、98%および最大で約100%までの細胞をトランスフェクトすることができる。トランスフェクトした細胞のパーセンテージとして典型的に表されるトランスフェクション効率は、いくつかの従来の方法によって決定され得る。

【0248】

PTDは、標的細胞への少なくともピコモル量の本明細書に開示されるヌクレオチド構築物に有利な細胞への侵入および脱出速度（それぞれ k_1 および k_2 と呼ばれることがある）を示す。PTDおよび任意のカーゴの侵入および脱出速度は、検出可能に標識された融合分子を用いて、標準的な速度分析によって、容易に決定されるか、または少なくとも概算され得る。典型的に、侵入速度対脱出速度の比率は、約5～約100、最大で約1000までの範囲であろう。

30

【0249】

一実施形態において、本発明の方法および組成物に有用なPTDは、実質的な α 螺旋性の特徴とするポリペプチドを含む。PTDが実質的な α 螺旋性を示すとき、トランスフェクションが最適化されることが発見されている。別の実施形態において、PTDは、ペプチドまたはポリペプチドの少なくとも1つの面に沿って実質的にアラインメントされる塩基性アミノ酸残基を含有する配列を含む。本発明に有用なPTDドメインは、天然ペプチドもしくはポリペプチドまたは合成ペプチドもしくはポリペプチドであり得る。

40

【0250】

別の実施形態において、PTDは、螺旋シリンダ（helical cylinder）を下るアルギニン（Arg）残基を有する強力な α 螺旋構造を含むアミノ酸配列を含む。

【0251】

さらに別の実施形態において、PTDドメインは、以下の一般式： $B_{P1}-X_{P1}-X_{P2}-X_{P3}-B_{P2}-X_{P4}-X_{P5}-B_{P3}$ によって表されるポリペプチドを含み、式中、 B_{P1} 、 B_{P2} 、および B_{P3} がそれぞれ、独立して、同じかまたは異なる塩基性アミノ酸であり； X_{P1} 、 X_{P2} 、 X_{P3} 、 X_{P4} 、および X_{P5} がそれぞれ、独立して

50

、同じかまたは異なる α 螺旋促進アミノ酸である。

【0252】

別の実施形態において、PTDドメインは、以下の一般式： $B_{P1} - X_{P1} - X_{P2} - B_{P2} - B_{P3} - X_{P3} - X_{P4} - B_{P4}$ によって表され、式中、 B_{P1} 、 B_{P2} 、 B_{P3} 、および B_{P4} がそれぞれ、独立して、同じかまたは異なる塩基性アミノ酸であり； X_{P1} 、 X_{P2} 、 X_{P3} 、および X_{P4} がそれぞれ、独立して、同じかまたは異なる α 螺旋促進アミノ酸である。

【0253】

さらに、PTDドメインは、塩基性残基、例えば、リジン (Lys) またはアルギニン (Arg) を含み、ドメインに「ねじれ (kink)」を導入するのに十分な少なくとも 1 つのプロリン (Pro) 残基をさらに含み得る。このようなドメインの例としては、プリオンの形質導入ドメインが挙げられる。例えば、このようなポリペプチドは、KKRPKPG (配列番号 15) を含有する。

【0254】

一実施形態において、ドメインは、以下の配列： $X_P - X_P - R - X_P - (P/X_P) - (B_P/X_P) - B_P - (P/X_P) - X_P - B_P - (B_P/X_P)$ によって表されるポリペプチドであり、式中、 X が、アラニンなどの任意の α 螺旋促進残基であり； P/X_P が、プロリンまたは既に定義される X_P のいずれかであり； B_P が、塩基性アミノ酸残基、例えば、アルギニン (Arg) またはリジン (Lys) であり； R が、アルギニン (Arg) であり、 B_P/X_P が、上に定義される B_P または X_P のいずれかである。

【0255】

別の実施形態において、PTDは、カチオン性であり、7～10個のアミノ酸からなり、式 $KX_{P1}RX_{P2}X_{P1}$ で表され、式中、 X_{P1} が R であり、または K および X_{P2} が任意のアミノ酸である。このようなポリペプチドの一例は、RKKRRRQRRR (配列番号 1) を含む。別の例において、PTDは、5～15個のアミノ酸にわたって5～10個のアルギニン (および/またはリジン) 残基を有するカチオン性ペプチド配列である。

【0256】

本開示に係るさらなる送達ドメインは、少なくともアミノ酸 49～56 の TAT (配列番号 1) からほぼ完全長 TAT 配列 (例えば、配列番号 16 を参照) までを含む TAT 断片を含む。TAT 断片は、断片の α 螺旋性を増大するのに十分な 1 つまたは複数のアミノ酸の変化を含み得る。場合によっては、導入されるアミノ酸の変化は、認識される α 螺旋促進アミノ酸を付加することを含む。あるいは、アミノ酸の変化は、 α 螺旋形成または安定性を妨害する TAT 断片から 1 つまたは複数のアミノ酸を除去することを含む。より具体的な実施形態において、TAT 断片は、 α 螺旋促進アミノ酸による少なくとも 1 つのアミノ酸置換を含む。典型的に、TAT 断片は、標準的なペプチド合成技術によって作製されるが、場合によっては、組み換え DNA 手法が使用されてもよい。一実施形態において、TAT 断片中の少なくとも 2 つの塩基性アミノ酸残基が、該当する TAT 断片の少なくとも 1 つの面に沿って実質的にアラインメントされるように置換が選択される。より具体的な実施形態において、TAT 49～56 配列 (配列番号 1) 中の少なくとも 2 つの塩基性アミノ酸残基が、該当する配列の少なくとも 1 つの面に沿って実質的にアラインメントされるように置換が選択される。

【0257】

本発明の組成物および方法に使用され得るさらなる形質導入タンパク質 (PTD) は、配列中の少なくとも 2 つの塩基性アミノ酸が、TAT 断片の少なくとも 1 つの面に沿って実質的にアラインメントされるように、TAT 49～56 配列が修飾された TAT 断片を含む。例示的な TAT 断片は、TAT の少なくともアミノ酸 49～56 に少なくとも 1 つの特定されたアミノ酸置換を含み、この置換は、セグメントの少なくとも 1 つの面、典型的に、TAT 49～56 配列に沿って、49～56 配列の塩基性アミノ酸残基をアラインメントする。

【0258】

10

20

30

40

50

キメラPTDドメインも含まれる。このようなキメラPTDは、少なくとも2つの異なる形質導入タンパク質の一部を含む。例えば、キメラPTDは、例えば、一方がHIV-1（配列番号16）由来し、他方はHIV-2（配列番号17）に由来するか、または1つがプリオンタンパク質（配列番号18）に由来し、1つがHIVに由来する2つの異なるTAT断片を融合することによって形成され得る。

【0259】

PTDは、ヌクレオチド間架橋基または3'もしくは5'末端において、ホスホロアミデートまたはホスホトリエステルリンカーを用いて、本発明のヌクレオチド構築物に、補助部分として連結され得る。例えば、3-炭素リンカーとともに3'-アミノ基を含有するsiRNA構築物が、siRNA構築物をPTDに連結するのに用いられ得る。siRNA構築物は、ヘテロ二官能性クロスリンカーを介してPTDに共役され得る。

10

【0260】

PTDは、生物可逆的基を介して、ヌクレオチド構築物に、補助部分として結合され得、それによって、生物可逆的基は、例えば、細胞内酵素（例えば、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ、チオレドキシン、またはチオエステラーゼ）によって細胞内で切断され得、それによって、ポリヌクレオチドを放出する。

【0261】

例えば、PTDが5'および3'末端の間で共役されることに加えて、PTDは、遊離チオール基を介して、5'および／または3'末端において、本明細書に開示されるヌクレオチド構築物を含有するポリヌクレオチド（例えば、RNAまたはDNA）に直接共役され得る。例えば、PTDは、ジスルフィド結合によって、ポリヌクレオチドに連結され得る。この手法は、任意のポリヌクレオチド長さに適用することができ、細胞内へのポリヌクレオチド（例えば、siRNA）の送達を可能にする。ポリヌクレオチドは、例えば、1つまたは複数の送達ドメインおよび／または塩基性基を含有する保護基も含み得る。細胞内に入ると、ポリヌクレオチドは、加水分解または他の酵素活性（例えば、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ、チオレドキシン、またはチオエステラーゼ活性）によって、細胞内条件、例えば、還元環境に基づいて、非保護ポリヌクレオチドに戻る。

20

【0262】

【表3】

表3

30

化合物 #	配列 番号	構造	C 末端	MW 計算値	MW 実測値
P01	19	HyNic GGRK'RK'RK'RK'RK'RK'RK'R	CONH ₂	2412	2413
P02	20	HyNic GGRK'RK'RK'RK'RK'RK'RK'RK'RK'RK'RK'R	CONH ₂	3548	3547
P03	21	HyNic K'R GGRK'RK'RK'RK'RK'RK'RK'RK'RK'RK'RK'RK'RK'R	CONH ₂	4665	4668
P04	22	HyNic GGESDSELEIKRYKNVAVSRKSRKFKQLLQHYREVAA AKSENDRLRLLLKQSS	CONH ₂	6557	6563
P05	23	HyNic GGSRRHHRSKAKRSRHH	CONH ₂	2312	2311
P06	24	HyNic GGAYDLRRERQSLRRERQSR	CONH ₂	3134	3132
P07	25	HyNic GGMAPQRDTVGGRTTPPSWGPAAQLRNSSA	CONH ₂	3344	3342
P08	26	HyNic GGMAPQRDTVGGRTTPPSWGPAAQLRNSSA	CONH ₂	3328	3327
P09	27	HyNic GGFCIGRL	CONH ₂	997	997

【0263】

10

20

30

40

50

化合物P01、P02、P03、P04、P05、P06、P07、P08、P09、P10、P11、P12、P13、P14、P15、P16、P19、

P27, P28, P29, P31, P32, P33, P34, P35, およびP36は、エンドソーム溶解性ペプチドを含み、化合物

化合物P 42は、KDEL受容体標的部分を含む。

他の化合物は、表中に示されるとおりである。

【0265】

本発明の構築物および方法に使用され得るペプチドリンカーは、典型的に最大で約20または30個のアミノ酸、一般的に、最大で約10または15個のアミノ酸、さらにより多くの場合、約1~5個のアミノ酸を含む。リンカー配列は、一般に、融合分子を単一の固定の配座に保持しないように柔軟である。リンカー配列は、例えば、PTDドメインを核酸から隔てるのに使用され得る。例えば、ペプチドリンカー配列は、例えば、分子の柔軟性を与えるために、ペプチド形質導入ドメインと核酸ドメインとの間に配置され得る。リンカー部分の長さは、例えば、PTDドメイン融合構築物を含むペプチドまたはポリペプチドの生物学的活性を最適化するように選択され、過度の実験なしに経験的に決定され得る。リンカー部分の例は、-Gly-Gly-、GGGGS（配列番号106）、（GGGGS）_N、GKSSGSGSESKS（配列番号107）、GSTSGSGKSSSEGKSG（配列番号108）、GSTSGSGKSSSEGSGSTKG（配列番号109）、GSTSGSGKPGSGEGSTKG（配列番号110）、またはEGKSSGSGSESKSEF（配列番号111）である。ペプチドまたはポリペプチド連結部分が、例えば、Huston et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. 85:5879, 1988; Whitlow et al., Protein Engineering 6:989, 1993; および Newton et al., Biochemistry 35:545, 1996に記載されている。他の好適なペプチドまたはポリペプチドリンカーは、参照により本明細書に援用される、米国特許第4,751,180号明細書および同第4,935,233号明細書に記載されているものである。

【0266】

医薬組成物

本発明のヌクレオチド構築物の送達は、当業者に公知の様々な方法を用いて、細胞を構築物と接触させることによって行うことができる。特定の実施形態において、本発明のヌクレオチド構築物は、本明細書の他の箇所により詳細に説明されるように、様々な担体、分散剤などとともに製剤化される。

【0267】

本発明に係る医薬組成物は、担体、賦形剤、および添加剤または補助剤を用いて、被験体への投与に好適な形態に、本明細書に開示されるヌクレオチド構築物を含めるように調製され得る。よく使用される担体または補助剤としては、炭酸マグネシウム、二酸化チタン、ラクトース、マンニトールおよび他の糖、タルク、乳タンパク質、ゼラチン、デンプン、ビタミン、セルロースおよびその誘導体、動物油および植物油、ポリエチレングリコールならびに滅菌水、アルコール、グリセロール、および多価アルコールなどの溶媒が挙げられる。静脈内ビヒクルとしては、流体および栄養補充剤が挙げられる。防腐剤としては、抗菌剤、酸化防止剤、キレート剤、および不活性ガスが挙げられる。他の薬学的に許容できる担体としては、例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Ed., Gennaro, Ed., Lippencott Williams & Wilkins (2005)、および2013年に公開されたThe United States Pharmacopoeia: The National Formulary (USP 36 NF31)に記載されているように、塩、防腐剤、緩衝液などを含む、水溶液、非毒性賦形剤が挙げられる。医薬組成物の様々な成分のpHおよび正確な濃度は、当該技術分野において日常的な技術にしたがって調整される。Goodman and Gilman's, The Pharmacological Basis for Therapeuticsを参照されたい。

【0268】

本発明に係る医薬組成物は、局所または全身に投与され得る。治療有効量は、被験体の感染の程度、個体の年齢、性別および体重などの要因に応じて変動する。投薬計画は、最適な治療反応をもたらすように調整され得る。例えば、数回の分割用量を、毎日投与することができ、または治療状況の必要性に示されるように、用量を比例的に減少させること

ができる。

【0269】

医薬組成物は、注入（例えば、皮下、静脈内、眼窩内など）、経口投与、点眼、吸入、経皮適用、局所適用、または直腸投与などによる好都合な方法で投与され得る。投与経路に応じて、医薬組成物は、酵素、酸、および医薬組成物を不活性化し得る他の天然条件の作用から、医薬組成物を保護する材料で被覆され得る。医薬組成物は、非経口的または腹腔内に投与することもできる。分散液は、グリセロール、液体ポリエチレングリコール、およびそれらの混合物、ならびに油中で調製することもできる。貯蔵および使用の通常の下で、これらの調製物は、微生物の増殖を防止するための防腐剤を含有してもよい。

【0270】

注射用途に好適な医薬組成物としては、滅菌水溶液（水溶性である場合）または滅菌注射液もしくは分散液の即時調製のための分散液および滅菌粉末が挙げられる。組成物は、典型的に、滅菌であり、注射器が容易に通過できる程度まで流体である。典型的に、組成物は、製造および貯蔵の条件下で安定であり、細菌および真菌などの微生物の汚染作用から保護される。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど）、それらの好適な混合物、および植物油を含有する溶媒または分散媒であり得る。適切な流動性が、例えば、レシチンなどのコーティングの使用によって、分散液の場合には必要な粒度の維持によって、および界面活性剤の使用によって維持することができる。微生物の作用の防止は、様々な抗菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサルなどによって行うことができる。多くの場合、等張剤、例えば、糖、マンニトール、ソルビトールなどの多価アルコール、または塩化ナトリウムが、組成物に使用される。吸収を遅延させる薬剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを組成物に含めることによって、注射用組成物の長時間の吸収をもたらすことができる。

【0271】

滅菌注射液は、必要量の医薬組成物を、必要に応じて、上に列挙される成分の1つまたは組合せを含む適切な溶媒中に組み込んだ後、滅菌ろ過することによって調製され得る。一般に、分散液は、塩基性分散媒および上に列挙される成分からの必要な他の成分を含有する滅菌ビヒクル中に、医薬組成物を組み込むことによって調製される。

【0272】

医薬組成物は、例えば、不活性希釈剤または吸収可能な食用担体とともに、経口投与され得る。医薬組成物および他の成分を、硬質または軟質ゼラチンカプセル中に封入し、錠剤に圧縮し、または被験体の食事に直接組み込むこともできる。経口治療薬投与の場合、医薬組成物は、賦形剤とともに組み込まれ、摂取可能な錠剤、バッカル錠、トローチ、カプセル剤、エリキシル剤、懸濁剤、シロップ、ウェハースなどの形態で使用され得る。このような組成物および調製物は、少なくとも1重量%の活性化化合物を含有すべきである。組成物および調製物のパーセンテージは、当然ながら、変動してもよく、好都合には、単位の約5重量%～約80重量%であり得る。錠剤、トローチ、丸薬、カプセル剤などは、以下のものも含有し得る：トラガカントガム、アカシア、トウモロコシデンプン、もしくはゼラチンなどの結合剤；リン酸二カルシウムなどの賦形剤；トウモロコシデンプン、ジャガイモデンプン、アルギン酸などの崩壊剤；ステアリン酸マグネシウムなどの潤滑剤；およびスクロース、ラクトースまたはサッカリンなどの甘味料、またはペパーミント、冬緑油、もしくはサクランボ香味料などの香料。投与単位剤形がカプセル剤である場合、それは、上記のタイプの材料に加えて、液体担体を含有し得る。様々な他の材料が、コーティングとして存在してもよく、または投与単位の物理形態を他の形で改変するために存在してもよい。例えば、錠剤、丸薬、またはカプセル剤は、シェラック、糖、またはその両方を用いて被覆され得る。シロップまたはエリキシル剤は、薬剤、甘味料としてのスクロース、防腐剤としてのメチルおよびプロピルパラベン、染料、およびサクランボまたはオレンジ香料などの香料を含有し得る。当然ながら、任意の投与単位剤形を調製するのに使

用される任意の材料は、薬学的に純粋であり、用いられる量で実質的に非毒性であるべきである。さらに、医薬組成物は、徐放性調製物および製剤に組み込まれ得る。

【0273】

したがって、薬学的に許容できる担体は、溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤などを含むことが意図される。薬学的に活性な物質のためのこのような媒体および薬剤の使用は、当該技術分野において周知である。任意の従来の媒体または薬剤が、医薬組成物と不適合性でない限り、治療用組成物および治療方法におけるそれらの使用が考えられる。補助活性化合物を、組成物に組み込むこともできる。

【0274】

投与しやすさおよび投与量の均一性のために、投与単位剤形中で非経口組成物を製剤化することが特に有利である。本明細書において使用される際の投与単位剤形は、治療される被験体のための単一用量として適した物理的に個別の単位を指し；所定の量の医薬組成物を含有する各単位が、必要な医薬担体とともに所望の治療効果をもたらすように計算される。本発明の投与単位剤形の仕様は、医薬組成物の特徴および達成される特定の治療効果に関連する。主な医薬組成物は、許容できる投与単位中で、好適な薬学的に許容できる担体とともに有効量での好都合かつ有効な投与のために配合される。補助活性成分を含有する組成物の場合、投与量は、成分の通常の用量および投与方法を参考にして決定される。

【0275】

局所製剤の場合、基剤組成物は、米国食品医薬品局（U. S. Food & Drug Administration）（FDA）によって一般に安全とみなされるもの（Generally Regarded as Safe）（GRAS）などの任意の溶媒系とともに調製され得る。GRAS溶媒系としては、局所用途についてFDAによって承認された送達ビヒクルとして、多くの短鎖炭化水素（ブタン、プロパン、n-ブタン、またはそれらの混合物など）が挙げられる。局所用組成物は、任意の皮膚科学的に許容できる担体を用いて製剤化され得る。例示的な担体としては、アルミナ、粘土、微結晶性セルロース、シリカ、もしくはタルクなどの固体担体；および／またはアルコール、グリコール、もしくは水-アルコール／グリコールブレンドなどの液体担体が挙げられる。化合物はまた、化合物が皮膚に入ることを可能にするリポソーム製剤中で投与されてもよい。このようなりポソーム製剤は、米国特許第5,169,637号明細書；同第5,000,958号明細書；同第5,049,388号明細書；同第4,975,282号明細書；同第5,194,266号明細書；同第5,023,087号明細書；同第5,688,525号明細書；同第5,874,104号明細書；同第5,409,704号明細書；同第5,552,155号明細書；同第5,356,633号明細書；同第5,032,582号明細書；同第4,994,213；およびPCT公開番号国際公開第96/40061号パンフレットに記載されている。他の適切なビヒクルの例は、米国特許第4,877,805号明細書、米国特許第4,980,378号明細書、米国特許第5,082,866号明細書、米国特許第6,118,020号明細書および欧州特許出願公開第0586106A1号明細書に記載されている。本発明の好適なビヒクルは、鉱油、石油、ポリデセン、ステアリン酸、ミリスチン酸イソプロピル、ステアリン酸ポリオキシシル40、ステアリルアルコール、または植物油も含み得る。

【0276】

局所用組成物は、任意の有用な形態で提供され得る。例えば、本発明の組成物は、組成物が使用され得る皮膚または他の組織への適用に使用される、溶液、エマルジョン（マイクロエマルジョンを含む）、懸濁液、クリーム、フォーム、ローション、ゲル、粉末、パーム、または他の典型的な固体、半固体、もしくは液体組成物として製剤化されてもよい。このような組成物は、着色料、香料、増粘剤、抗菌剤、溶媒、界面活性剤、洗剤、ゲル化剤、酸化防止剤、充填剤、染料、粘度調節剤、防腐剤、保湿剤、軟化剤（例えば、天然または合成油、炭化水素油、ワックス、またはシリコーン）、水和剤、キレート剤、粘滑

剤、可溶化賦形剤、補助剤、分散剤、皮膚浸透促進剤、可塑剤、防腐剤、安定剤、抗乳化剤、湿潤剤、日焼け止め剤（*sunscreen*）、乳化剤、保湿剤、収斂剤、防臭剤などの、このような製品に典型的に使用される他の成分を含有してもよく、任意選択的に、麻酔薬、痒み止め活性剤、植物抽出物、調整剤、暗色化もしくは明色化剤、光沢剤、保湿剤、マイカ、ミネラル、ポリフェノール、シリコンまたはその誘導体、日焼け止め剤（*sunblock*）、ビタミン、および植物薬を含む。

【0277】

一部の製剤において、組成物は、点眼のために製剤化される。例えば、点眼用の医薬製剤は、水、緩衝液、生理食塩水、グリシン、ヒアルロン酸、マンニトールなどの生理学的に許容できる眼科用担体媒体と混合された、例えば、最大で99重量%の量で、本明細書に記載されるポリヌクレオチド構築物を含み得る。眼への送達の場合、本明細書に記載されるポリヌクレオチド構築物が、眼科的に許容できる防腐剤、共溶媒、界面活性剤、増粘剤、浸透促進剤、緩衝液、塩化ナトリウム、または水性、滅菌点眼懸濁液もしくは溶液を形成するための水と組み合わせられ得る。点眼液製剤は、ポリヌクレオチド構築物を、生理学的に許容できる等張水性緩衝液に溶解させることによって調製され得る。さらに、点眼液は、阻害剤を溶解させるのを助ける眼科的に許容できる界面活性剤を含み得る。ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、メチルセルロース、ポリビニルピロリドンなどの粘度上昇剤（*Viscosity building agent*）が、化合物の保持を高めるために、本発明の組成物に加えられてもよい。

【0278】

局所用組成物は、例えば、1日1～4回、または専門の臨床医の通常の判断にしたがって、毎日、毎週、隔週、毎月、もしくはより長い間隔などの長期の送達スケジュールで、眼の表面に送達することができる。製剤のpHは、約pH4～9、または約pH4.5～pH7.4の範囲であり得る。

【0279】

本発明のヌクレオチド構築物の場合、好適な薬学的に許容できる塩としては、（i）ナトリウム、カリウム、アンモニウム、マグネシウム、カルシウム、スペルミンおよびスペルミジンなどのポリアミンなどのカチオンにより形成される塩；（ii）無機酸、例えば、塩酸、臭化水素酸、硫酸、リン酸、硝酸などにより形成される酸付加塩；（iii）例えば、酢酸、シュウ酸、酒石酸、コハク酸、マレイン酸、フマル酸、グルコン酸、クエン酸、リンゴ酸、アスコルビン酸、安息香酸、タンニン酸、パルミチン酸、アルギン酸、ポリグルタミン酸、ナフタレンスルホン酸、メタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、ナフタレンジスルホン酸、ポリガラクトuron酸などの有機酸により形成される塩；ならびに（iv）塩素、臭素、およびヨウ素などの元素アニオンから形成される塩が挙げられる。

【0280】

本明細書に記載されるヌクレオチド構築物は、標的細胞への送達に担体の使用を必要としない場合もあるが、担体の使用は、ある実施形態において有利であり得る。したがって、標的細胞への送達のために、本発明のヌクレオチド構築物は、担体に非共有結合して、複合体を形成することができる。担体は、送達後の生体内分布を改変し、取込みを促進し、ポリヌクレオチドの半減期もしくは安定性を増大する（例えば、ヌクレアーゼ耐性を改善する）、および／または特定の細胞もしくは組織タイプへの標的化を増大するのに使用され得る。

【0281】

例示的な担体としては、縮合剤（例えば、イオンまたは静電相互作用により核酸を求引または核酸に結合することができる物質）；融合誘導剤（例えば、細胞膜に融合するかおよび／または細胞膜を介して輸送されることが可能な物質）；特定の細胞もしくは組織タイプを標的にするタンパク質（例えば、サイトロトロピン、メラノトロピン、レクチン、糖タンパク質、界面活性剤タンパク質A、または任意の他のタンパク質）；脂質；リポ多糖；脂質ミセルまたはリポソーム（例えば、ホスホチジルコリン、脂肪酸、糖脂質、セラミ

ド、グリセリド、コレステロール、またはそれらの任意の組合せなどのリン脂質から形成される) ; ナノ粒子 (例えば、シリカ、脂質、炭水化物、または他の薬学的に許容できるポリマーナノ粒子) ; カチオン性ポリマーおよびアニオン性薬剤から形成されるポリプレックス (例えば、CRO) (ここで、例示的なカチオン性ポリマーは、ポリアミン (例えば、ポリリジン、ポリアルギニン、ポリアミドアミン、およびポリエチレンジイミン) を含む) ; コレステロール ; デンドリマー (例えば、ポリアミドアミン (PAMAM) デンドリマー) ; 血清タンパク質 (例えば、ヒト血清アルブミン (HSA) または低比重リポタンパク (LDL)) ; 炭水化物 (例えば、デキストラン、キチン、キトサン、イヌリン、シクロデキストリン、またはヒアルロン酸) ; 脂質 ; 合成ポリマー、(例えば、ポリリジン (PLL)、ポリエチレンジイミン、ポリ-L-アスパラギン酸、ポリ-L-グルタミン酸、スチレン-無水マレイン酸コポリマー、ポリ (L-ラクチド-コグリコール) コポリマー、ジビニルエーテル-無水マレイン酸コポリマー、N-(2-ヒドロキシプロピル) メタクリルアミドコポリマー (HMPA)、ポリエチレングリコール (PEG)、ポリビニルアルコール (PVA)、ポリウレタン、ポリ (2-エチルアクリル酸)、N-イソプロピルアクリルアミドポリマー、擬ペプチド-ポリアミン、ペプチド模倣薬ポリアミン、またはポリアミン) ; カチオン性部分 (例えば、カチオン性脂質、カチオン性ポルフィリン、ポリアミンの第四級塩、または α 螺旋ペプチド) ; 多価糖 (例えば、多価ラクトース、多価ガラクトース、N-アセチル-ガラクトサミン、N-アセチル-グルコサミン、多価マンノース、または多価フコース) ; ビタミン (例えば、ビタミンA、ビタミンE、ビタミンK、ビタミンB、葉酸、ビタミンB12、リボフラビン、ビオチン、またはピリドキサル) ; 補因子 ; または細胞の細胞骨格を破壊して、取込みを増加させるための薬剤 (例えば、タキソール、ビンクリスチン、ビンブラスチン、サイトカラシン、ノコダゾール、ジャスプラキノリド、ラトランクリンA、ファロイジン、スウィンホリドA、インダノシン、またはミオセルビン) が挙げられる。

10

20

【0282】

本明細書に記載される他の治療剤が、本発明のヌクレオチド構築物と組み合わせて、本発明の医薬組成物に含まれてもよい。

【0283】

ヌクレオチド構築物の細胞内活性

本発明は、本明細書に開示されるヌクレオチド構築物 (例えば、RNA、DNA、修飾塩基を含む核酸、他のアニオン性核酸など) を送達するための組成物および方法を提供する。したがって、本発明は、遺伝子またはタンパク質発現に調節効果を与える非コードヌクレオチド構築物の送達に有用な方法および組成物を提供する。

30

【0284】

本発明のポリヌクレオチド構築物は、一本鎖または二本鎖であり得る。二本鎖である場合、一方または両方の鎖が、1つまたは複数の生物可逆的基を含み得る。ポリヌクレオチドが、siRNAとして作用する場合、パッセンジャー鎖は、ヌクレオチド間架橋基、例えば、C₁~₆アルキルホスホトリエステルに不可逆的に結合される基を含み得る。典型的に、このような基は、3'末端からの第1または第2のヌクレオチドの後に位置する。不可逆的基は、パッセンジャー鎖がガイド鎖として作用するのを防止し、それによって、起こり得るオフターゲット効果を防止または低減する。

40

【0285】

RNA干渉 (RNAi) は、メッセンジャーRNA (mRNA) が、抑制される標的遺伝子のものと同一であるかまたは酷似したヌクレオチド配列を含有する二本鎖RNA (dsRNA) に由来する低分子干渉RNA (siRNA) によって分解されるプロセスである。このプロセスは、転写後、翻訳前操作によって標的遺伝子によってコードされるタンパク質の産生を防止する。したがって、優性疾患遺伝子または他の標的遺伝子のサイレンシングを行うことができる。

【0286】

インビボRNAiは、dsRNAが、ダイサー (Dicer) と呼ばれる酵素、dsR

50

NAエンドリボヌクレアーゼによって、短鎖干渉RNA (siRNA)へと切断され (Bernstein et al., 2001; Hamilton & Baulcomb, 1999, Science 286:950; Meister and Tuschl, 2004, Nature 431, 343-9)、それによって、元の単一のdsRNAから複数の分子を生成するプロセスによって発生する。siRNAは、多量体RNAiサイレンシング複合体 (RISC)に取り込まれて、触媒活性化およびmRNA標的特異性の両方が得られる (Hannon and Rossi, Nature 431, 371-378, 2004; Novina and Sharp, Nature 430, 161-164, 2004)。RISCへのsiRNAローディングの間、アンチセンスまたはガイド鎖は、siRNAから分離され、アルゴノート-2 (Ago2)、すなわち、RISC触媒サブユニット内にドッキングされたままになる (Leuschner et al., EMBO Rep. 7, 314-320, 2006)。小胞体 (ER)、ゴルジ体、ER-ゴルジ中間コンパートメント (ERGIC)などのいくつかの細胞コンパートメント、P体、および初期エンドソームには、Ago2が豊富である。核から細胞質へと輸送されたmRNAは、リボソーム到着前に活性化RISCを通過するものと考えられ、それによって、遺伝子発現の、指向性の、転写後、翻訳前調節が可能になる。理論上、あらゆる細胞mRNAは、選択的RNAi応答の誘導によって調節することができる。

【0287】

21~23bpのsiRNAが、哺乳類細胞におけるRNAi応答を効率的に誘導する能力は、現在ではありふれたものである (Sontheimer, Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 6, 127-138, 2005)。siRNAのIC₅₀は、10~100pMの範囲であり、IC₅₀値が1~10nMの範囲である最良の薬剤を大幅に下回る。その結果、その優れた選択性のため、RNAiは、細胞表現型の指向性操作、遺伝子経路のマッピング、治療標的の発見および確認のための基礎となり、かなりの治療可能性を有する。

【0288】

RNAiの態様は、以下のものを含む。(1)一本鎖アンチセンスRNAではなくdsRNAが、干渉剤である；(2)このプロセスは、非常に特異的であり、著しく強力である (細胞当たり数個のdsRNA分子のみが、有効な干渉に必要とされる)；(3)干渉活性 (およびおそらくdsRNA)は、導入部位から離れて除去された細胞および組織内に干渉を引き起こすことができる。しかしながら、dsRNAの有効な送達 is 困難である。例えば、13,860ダルトンの分子量を有する21bpのdsRNAは、(1)サイズおよび(2)RNAの極度の負 (酸性)電荷のために、細胞膜を通過して細胞質に入ることができない。本発明によって提供される方法および組成物は、電荷中和および向上した取込みによって、細胞内へのdsRNAなどのヌクレオチド構築物の送達を可能にする。

【0289】

標的遺伝子のヌクレオチド配列に相補的なsiRNA配列を含むdsRNAが、いくつかの方法において調製され得る。siRNA配列を同定するための方法および技術は、当該技術分野において公知である。siRNAヌクレオチド配列は、国立バイオテクノロジー情報センター (National Center for Biotechnology Information) ウェブサイト (World Wide Web at ncbi.nlm.nih.govから入手可能)からの受託番号またはGI番号を記入した後、siRNA Selection Program, Whitehead Institute for Biomedical Research, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, Mass. ([http://\[//\]jura.wi.mit.edu/bioc/siRNAext/](http://[//]jura.wi.mit.edu/bioc/siRNAext/)から現在入手可能；ハイパーリンクを除去するために括弧を追加したことに留意されたい)から取得することができる。あるいは、適切なsiRNA配列を含むdsRNAは、Miyagishi and Taira (2003)の手法を用いて確認するこ

とができる。市販のRNAi設計アルゴリズムも存在する (<http://rnaidesigner.invitrogen.com/rnaiexpress/>)。注文用のRNAの調製物が市販されている。

【0290】

本発明のヌクレオチド構築物は、mRNAの切断を誘導するように、miRNAとしても作用し得る。あるいは、本発明のヌクレオチド構築物は、Rnaseによる切断を誘導するかまたは翻訳を立体的に遮断するために、mRNAに結合するアンチセンス剤として作用し得る。

【0291】

本発明のヌクレオチド構築物を細胞内に輸送することができる例示的な方法が、本明細書に記載される。

【0292】

治療方法

様々な疾患および障害が、本発明のヌクレオチド構築物を用いて治療され得る。例えば、腫瘍細胞の増殖が、抗腫瘍siRNAの送達後に、阻害され、抑制され、または破壊され得る。例えば、抗腫瘍siRNAは、血管新生を促進するポリペプチドをコードする遺伝子に標的化されるsiRNAであり得る。腫瘍増殖に関連する様々な血管新生タンパク質が、当該技術分野において公知である。したがって、本明細書に記載されるヌクレオチド構築物は、抗増殖性疾患（例えば、癌）、ウイルス感染、および遺伝病などの疾患の治療に使用され得る。本発明のポリヌクレオチドを用いて治療され得る他の疾患は、加齢性黄斑変性症などの眼疾患（例えば、米国特許第7,879,813号明細書および米国特許出願公開第2009/0012030号明細書に記載されているように）および乾癬などの局所疾患である。

【0293】

有効量を含む組成物は、予防的または治療的処置のために投与され得る。予防的用途では、組成物は、臨床的に決定された素因または癌もしくは本明細書に記載される任意の疾患への高い罹患性を有する被験体に投与され得る。本発明の組成物は、臨床的疾患の発症を遅延、軽減、または予防するのに十分な量で、被験体（例えば、ヒト）に投与され得る。治療用途では、組成物は、その病態の症状およびその合併症を治療するか、少なくとも部分的に停止させるのに十分な量で、疾患（例えば、白血病または骨髓異形成症候群などの癌）に既に罹患している被験体（例えば、ヒト）に投与される。

【0294】

この用途に有効な量は、疾患または病態の重症度および被験体の体重および全身状態に応じて決まるが、一般に、被験体毎の用量当たりの薬剤の当量の約0.05μg～約1000μg（例えば、0.5～1000μg）の範囲である。初回投与および追加投与のための好適な計画は、初回投与に続いて、後の投与による1時間または数時間毎、毎日、毎週、または毎月の間隔で反復される用量が典型的である。本発明の組成物中に存在する薬剤の総有効量は、単回用量として、ボラスとしてもしくは比較的短期間にわたる注入によって哺乳動物に投与することができ、または分割治療プロトコルを用いて投与することができ、分割治療プロトコルでは、多数回用量が、より長期間にわたって（例えば、4～6時間毎、8～12時間毎、14～16時間毎、18～24時間毎、2～4日毎、1～2週間毎、および月1回の用量）投与される。あるいは、血液中の治療的に有効な濃度を維持するのに十分な連続的静脈内注射が考えられる。

【0295】

本発明の組成物中に存在し、哺乳動物（例えば、ヒト）に適用される本開示の方法に使用される1つまたは複数の薬剤の治療有効量は、哺乳動物の年齢、体重、および病態の個体差を考慮して、当業者によって決定され得る。有効量を含む本発明の組成物の単回または複数回投与は、治療医師によって選択される用量レベルおよびパターンで行うことができる。用量および投与スケジュールは、被験体の疾患または病態の重症度に基づいて決定および調整することができ、これは、臨床医によって一般的に実施される方法または本明

細書に記載される方法にしたがって治療過程全体にわたってモニターされ得る。

【0296】

本発明の1つまたは複数のヌクレオチド構築物は、従来の治療方法もしくは療法 of のいずれかと組み合わせて使用されてもよく、または従来の治療方法もしくは療法と別個に使用されてもよい。

【0297】

本発明の1つまたは複数のヌクレオチド構築物が、他の薬剤との併用療法において投与されるとき、それらは、個体に連続してまたは同時に投与され得る。あるいは、本発明に係る医薬組成物は、本発明のヌクレオチド構築物と、本明細書に記載される薬学的に許容できる賦形剤、および当該技術分野において公知の別の治療薬または予防薬との組合せを含有し得る。

【0298】

以下の実施例は、本発明を例示することが意図される。実施例は、本発明を限定することとは決して意図されない。

【実施例】

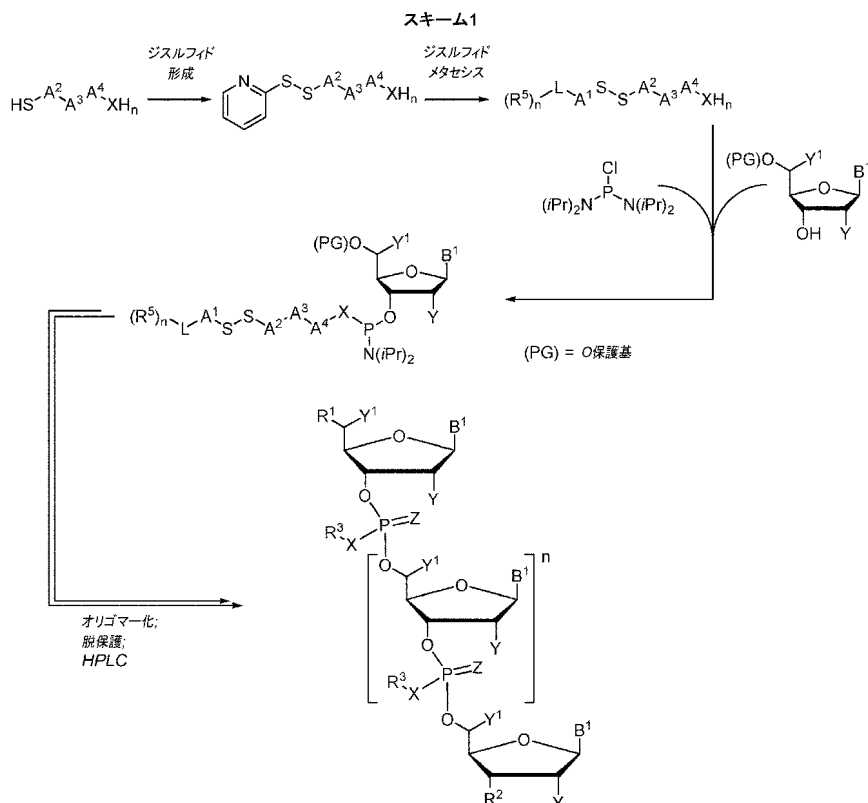
【0299】

実施例1. 本発明のヌクレオチドおよびポリヌクレオチドの合成および精製

一般的合成手順

本発明のポリヌクレオチド構築物は、本明細書に記載される一般的小よび特定の方法およびスキームにしたがって調製され得る。例えば、チオールを含有する出発材料は、2, 2'-ジピリジルジスルフィドとの反応を経て、対応するピリジルジスルフィド化合物（例えば、スキーム1を参照）を生じ、次に、それを、ヌクレオシドホスホロジアミダイトとの反応に供して、本発明のヌクレオチド構築物（例えば、スキーム1を参照）を生成した。次に、これらのヌクレオチド構築物を、標準的なオリゴヌクレオチド合成プロトコルを使用して、ポリヌクレオチド構築物を形成した。次に、これらのポリヌクレオチド構築物を脱保護し、HPLCを用いて精製した。

【化25】



【0300】

本発明のヌクレオチドの具体的な合成

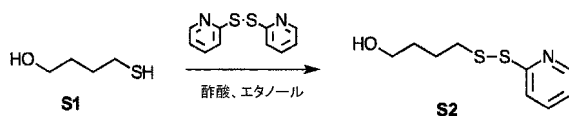
本発明のヌクレオチドおよびその前駆体の例示的な合成が、後述される。

【0301】

前駆体

化合物 S 2

【化 2 6】

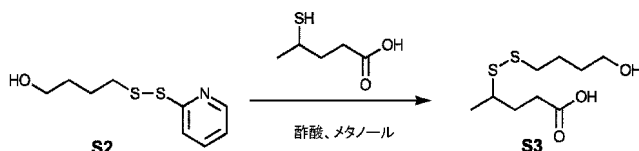


400 mL のエタノール中の 4-メカプトール-ブタノール (10.0 g、94 mmol) およびジチオピリジン (25.0 g、113 mmol) の溶液に、7.0 mL の酢酸を加えた。反応混合物を室温で 1 時間攪拌してから、減圧下で濃縮した。500 mL の酢酸エチルを粗生成物に加え、溶液を、1 N の NaOH 水溶液 (200 mL) および塩水 (200 mL) で連続して洗浄し、次に、無水 Na₂SO₄ 上で乾燥させた。溶媒を減圧下で蒸発させ、酢酸エチル/ヘキサン溶媒系 (Combi Flash Rf Instrument で 0~40% の勾配) を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって、粗混合物を精製したところ、12.8 g (64%) の生成物 S2 が無色油として得られた。¹H NMR (500 MHz) : δ 8.45 (d, J 4.5 Hz、1 H)、7.70 (d, J 8.0 Hz、1 H)、7.62 (m, 1 H)、7.06 (m, 1 H)、3.65 (t, J 6.0 Hz、2 H)、2.83 (t, J 7.0 Hz、2 H)、1.80 (m, 2 H)、1.70 (br s, 1 H)、1.65 (m, 2 H)。

【0302】

化合物 S 3

【化 2 7】

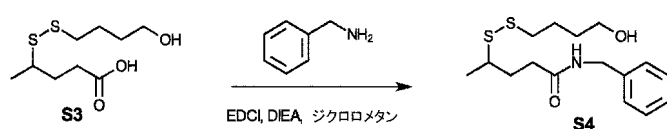


30 mL のメタノール中の S2 (1.3 g、6.0 mmol) および 4-スルファニルペンタン酸 (0.67 g、5.0 mmol) の溶液に、30 μL の酢酸を加えた。反応混合物を室温で 16 時間攪拌してから、減圧下で凝縮させた。酢酸エチル/ヘキサン/2% の酢酸溶媒系 (Combi Flash Rf Instrument で 0~70% の勾配) を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって、粗混合物を精製したところ、1.13 g (95%) の生成物 S3 が無色油として得られた。¹H NMR (500 MHz) : δ 4.95 (br s, 1 H)、3.68 (t, J 6.0 Hz、2 H)、2.88 (m, 1 H)、2.71 (t, J 7.0 Hz、2 H)、2.50 (m, 2 H)、1.98 (m, 1 H)、1.18 (m, 1 H)、1.75 (m, 2 H)、1.65 (m, 2 H)、1.32 (d, J 7.0 Hz、3 H)。

【0303】

化合物 S 4

【化 2 8】



25.0 mL のジクロロメタン中の S3 (1.13 g、5.0 mmol)、ベンジルアミン (0.84 mL、7.7 mmol) および 3.6 mL の N,N-ジイソプロピルエチルアミン (DIEA) の溶液に、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カル

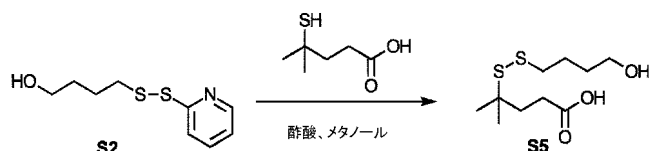
ボジイミド (EDCI、1.5 g、7.7 mmol) を加えた。反応混合物を室温で 2 時間攪拌してから、減圧下で濃縮した。酢酸エチル／ヘキサン溶媒系 (Combi Flash Rf Instrument で 0～100% の勾配) を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって、粗混合物を精製したところ、1.17 g (70%) の生成物 S4 が無色油として得られた。¹H NMR (500 MHz) : δ 7.22–7.31 (m, 5H)、6.55 (br s, 1H)、4.35 (d, J = 5.5 Hz, 2H)、4.20 (br s, 1H)、3.55 (m, 2H)、2.80 (m, 1H)、2.60 (t, J = 7.5 Hz, 2H)、2.25 (t, J = 7.5 Hz, 2H)、1.85 (m, 1H)、1.75 (m, 1H)、1.65 (m, 2H)、1.55 (m, 2H)、1.25 (d, J = 6.5 Hz, 3H)。

10

【0304】

化合物 S5

【化29】



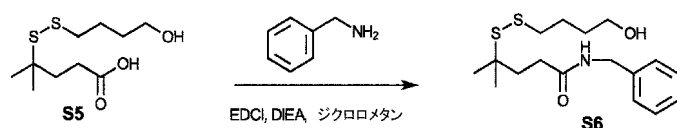
45.0 mL のメタノール中の S2 (1.82 g、8.4 mmol) および 4-スルファニル-4-メチルペンタン酸 (1.04 g、7.0 mmol) の溶液に、35 μ L の酢酸を加えた。反応混合物を室温で 16 時間攪拌してから、減圧下で濃縮した。酢酸エチル／ヘキサン／2% の酢酸溶媒系 (Combi Flash Rf Instrument で 0～70% の勾配) を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって、粗混合物を精製したところ、0.82 g (50%) の生成物 S5 が無色油として得られた。¹H NMR (500 MHz) : δ 7.25 (br s, 1H)、3.63 (t, J = 6.0 Hz, 2H)、2.69 (m, 2H)、2.40 (m, 2H)、1.83 (m, 2H)、1.70 (m, 2H)、1.62 (m, 2H)、1.25 (s, 6H)。

20

【0305】

化合物 S6

【化30】



30

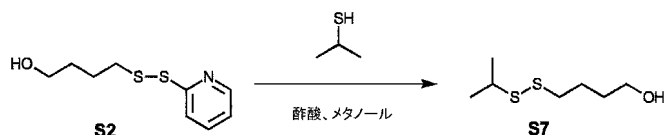
20.0 mL のジクロロメタン中の S5 (0.82 g、3.25 mmol)、ベンジルアミン (0.53 mL、4.88 mmol) および 2.3 mL の N,N-ジイソプロピルエチルアミン (DIEA) の溶液に、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド (EDCI、0.94 g、4.88 mmol) を加えた。反応混合物を室温で 2 時間攪拌してから、減圧下で濃縮した。酢酸エチル／ヘキサン溶媒系 (Combi Flash Rf Instrument で 0～100% の勾配) を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって、粗混合物を精製したところ、0.80 g (73%) の生成物 S6 が無色油として得られた。¹H NMR (500 MHz) : δ 7.22–7.40 (m, 5H)、6.30 (br s, 1H)、4.37 (d, J = 6.0 Hz, 2H)、3.60 (m, 2H)、2.80 (m, 1H)、2.68 (m, 2H)、2.25 (m, 2H)、1.85 (m, 2H)、1.75 (m, 1H)、1.65 (m, 2H)、1.55 (m, 2H)、1.25 (s, 6H)。

40

【0306】

化合物 S7

【化 3 1】



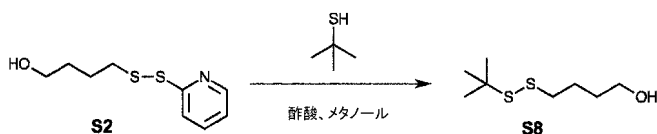
20. 0 mL のメタノール中の S 2 (1. 0 g、4. 6 mmol) および 2-プロパンチオール (0. 52 mL、5. 5 mmol) の溶液に、15 μ L の酢酸を加えた。反応混合物を室温で 16 時間攪拌してから、減圧下で濃縮した。粗混合物を 100 mL の酢酸エチルで希釈し、1 N の NaOH 水溶液 (200 mL) および塩水 (200 mL) で連続して洗浄し、次に、無水 Na₂SO₄ 上で乾燥させた。溶媒を減圧下で蒸発させ、酢酸エチル／ヘキサン溶媒系 (Combi Flash Rf Instrument で 0～50 % の勾配) を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって、粗混合物を精製したところ、0. 40 g (40 %) の生成物 S 7 が無色油として得られた。¹H NMR (500 MHz) : δ 3. 63 (t, J 6. 5 Hz、2 H)、2. 89 (m, 1 H)、2. 70 (t, J 7. 0 Hz、2 H)、1. 80 (s, 1 H)、1. 75 (m, 2 H)、1. 65 (m, 1 H)、1. 27 (d, J 7. 0 Hz、6 H) .

10

【0307】

化合物 S 8

【化 3 2】



20

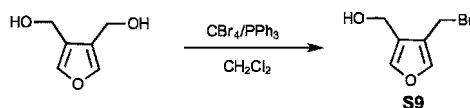
100 mL のメタノール中の S 2 (6. 0 g、27. 7 mmol) および 2-メチル-2-プロパンチオール (2. 5 g、27. 7 mmol) の溶液に、100 μ L の酢酸を加えた。反応混合物を室温で 16 時間攪拌してから、減圧下で濃縮した。粗混合物を 400 mL の酢酸エチルで希釈し、1 N の NaOH 水溶液 (200 mL) および塩水 (200 mL) で連続して洗浄し、次に、無水 Na₂SO₄ 上で乾燥させた。溶媒を減圧下で蒸発させ、酢酸エチル／ヘキサン溶媒系 (Combi Flash Rf Instrument で 0～50 % の勾配) を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって、粗混合物を精製したところ、3. 0 g (60 %) の生成物 S 8 が無色油として得られた。¹H NMR (500 MHz) : δ 3. 65 (m, 2 H)、2. 75 (t, J 7. 5 Hz、2 H)、1. 75 (m, 2 H)、1. 65 (m, 2 H)、1. 30 (s, 9 H) .

30

【0308】

化合物 S 9

【化 3 3】



40

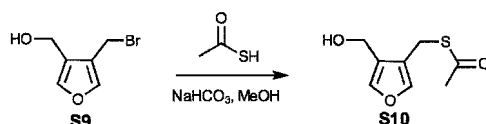
25. 0 mL のジクロロメタン中の 3, 4-ジスヒドロキシメチルフラン (1. 0 g、7. 8 mmol) およびトリフェニルホスフィン (2. 3 g、8. 6 mmol) の溶液に、四臭化炭素 (2. 85 g、8. 6 mmol) を加えた。反応混合物を室温で 16 時間攪拌してから、減圧下で濃縮した。酢酸エチル／ヘキサン溶媒系 (Combi Flash Rf Instrument で 0～35 % の勾配) を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって、粗混合物を精製したところ、1. 09 g (74 %) の生成物 S 9 が無色油として得られ、それを、次の反応のために、メタノールに素早く溶解させた。¹H NMR (500 MHz) : δ 7. 50 (s, 1 H)、7. 40 (s, 1 H)、4. 65 (s, 2 H)、4. 46 (s, 2 H) .

【0309】

50

化合物 S 1 0

【化 3 4】



10. 0 mL のメタノール中の S 9 (1. 09 g、5. 7 mmol) およびチオ酢酸 (0. 52 g、6. 8 mmol) の溶液に、NaHCO₃ (0. 58 g、6. 8 mmol) を少しずつ加えた。反応混合物を室温で2時間攪拌してから、1 N の HCl 溶液を用いて pH 7 になるまで中和し、揮発性物質を減圧下で蒸発させた。残渣を 200 mL の酢酸エチルで希釈し、飽和 NaHCO₃ 溶液 (50 mL) および塩水 (50 mL) で連続して洗浄し、次に、無水 Na₂SO₄ 上で乾燥させた。溶媒を減圧下で蒸発させ、酢酸エチル／ヘキサン溶媒系 (Combi Flash Rf Instrument で 0～30% の勾配) を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって、粗混合物を精製したところ、0. 80 g (75%) の生成物 S 10 が無色油として得られた。¹H NMR (500 MHz) : δ 7. 37 (s, 1H)、7. 35 (s, 1H)、4. 53 (d, J 5. 5 Hz、2H)、4. 00 (s, 2H)、2. 34 (s, 3H)、1. 88 (t, J 5. 5 Hz、1H)。

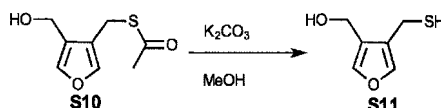
10

【0 3 1 0】

化合物 S 1 1

20

【化 3 5】



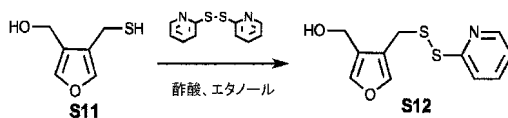
15. 0 mL のメタノール中の S 10 (0. 60 g、3. 2 mmol) の溶液に、K₂CO₃ (0. 53 g、3. 86 mmol) を、アルゴン雰囲気下で少しずつ加えた。反応混合物を室温で30分間攪拌してから、1 N の HCl 溶液を用いて pH 7 になるまで中和し、揮発性物質を減圧下で蒸発させた。残渣を 100 mL の酢酸エチルで希釈し、飽和 NaHCO₃ 溶液 (30 mL) および塩水 (30 mL) で連続して洗浄し、次に、無水 Na₂SO₄ 上で乾燥させた。溶媒を減圧下で蒸発させ、粗混合物を次の反応に直接使用した。

30

【0 3 1 1】

化合物 S 1 2

【化 3 6】



12. 0 mL のエタノール中の粗生成物 S 1 1 (0. 46 g、3. 2 mmol) およびジチオピリジン (0. 85 g、3. 8 mmol) の溶液に、200 μL の酢酸を加えた。反応混合物を室温で45分間攪拌してから、減圧下で濃縮した。酢酸エチル／ヘキサン溶媒系 (Combi Flash Rf Instrument で 0～30% の勾配) を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって、粗混合物を精製したところ、0. 40 g (50% の収率) の生成物 S 1 2 が無色油として得られた。¹H NMR (500 MHz) : δ 8. 46 (d, J 5. 0 Hz、1H)、7. 56 (m, 1H)、7. 40 (d, J 8. 0 Hz、1H)、7. 32 (s, 2H)、7. 09 (m, 1H)、4. 65 (s, 2H)、3. 97 (s, 2H)、1. 60 (br s, 1H)。

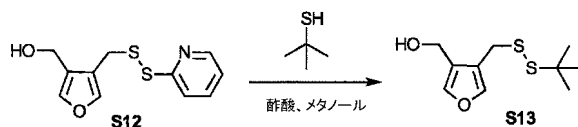
40

【0 3 1 2】

化合物 S 1 3

50

【化 3 7】



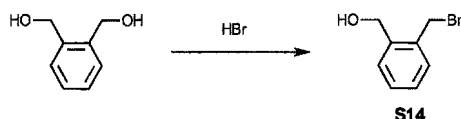
20.0 mL のメタノール中の S12 (0.39 g、1.5 mmol) および tert-ブチルメルカプタン (0.21 mL、1.8 mmol) の溶液に、50 μ L の酢酸を加えた。反応混合物を室温で 40 時間攪拌してから、減圧下で濃縮した。酢酸エチル／ヘキサン溶媒系 (Combi Flash Rf Instrument で 0～50% の勾配) を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって、粗混合物を精製したところ、0.33 g (95%) の生成物 S13 が無色油として得られた。¹H NMR (500 MHz) : δ 7.40 (s, 1H)、7.37 (s, 1H)、4.60 (s, 2H)、3.82 (s, 2H)、1.84 (br s, 1H)、1.34 (s, 9H)。

10

【0313】

化合物 S14

【化 3 8】



20

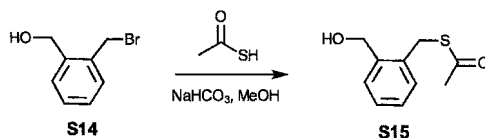
48% の臭化水素酸 (15.0 mL) の溶液に、1,2-ベンゼンジメタノール (4.0 g、29.0 mmol) を加え、反応混合物を室温で 2 時間攪拌した。1 N の NaOH 水溶液を反応混合物に加えて、溶液を pH 7 になるまで中和した。得られた混合物を酢酸エチル (200 mL) で希釈し、飽和 NaHCO₃ 溶液 (20 mL) および塩水 (20 mL) によって連続して洗浄し、次に、無水 Na₂SO₄ 上で乾燥させた。溶媒を減圧下で蒸発させ、酢酸エチル／ヘキサン溶媒系 (Combi Flash Rf Instrument で 0～30% の勾配) を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって、粗混合物を精製したところ、2.6 g (45%) の生成物 S14 が白色の固体として得られた。¹H NMR (500 MHz) : δ 7.30–7.45 (m, 4H)、4.85 (s, 2H)、4.64 (s, 2H)、1.81 (br s, 1H)。

30

【0314】

化合物 S15

【化 3 9】



10.0 mL のメタノール中の S14 (1.0 g、5.0 mmol) およびチオ酢酸 (0.46 g、6.0 mmol) の溶液に、NaHCO₃ (0.50 g、6.0 mmol) を少しずつ加えた。反応混合物を室温で 2 時間攪拌してから、1 N の HCl 溶液を用いて pH 7 になるまで中和し、揮発性物質を減圧下で蒸発させた。残渣を 200 mL の酢酸エチルで希釈し、飽和 NaHCO₃ 溶液 (50 mL) および塩水 (50 mL) によって連続して洗浄し、無水 Na₂SO₄ 上で乾燥させた。溶媒を減圧下で蒸発させ、酢酸エチル／ヘキサン溶媒系 (Combi Flash Rf Instrument で 0～30% の勾配) を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって、粗混合物を精製したところ、0.97 g (99%) の生成物 S15 が無色油として得られた。¹H NMR (500 MHz) : δ 7.40 (m, 2H)、7.25 (m, 2H)、4.73 (d, J = 5.5 Hz, 2H)、4.24 (s, 2H)、2.34 (s, 3H)、2.05 (t, J = 5.5 Hz, 1H)。

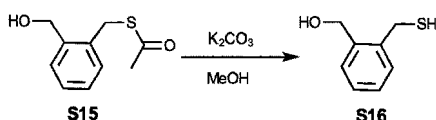
40

【0315】

50

化合物 S 1 6

【化 4 0】

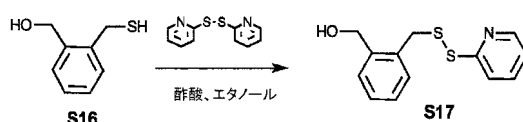


20. 0 mL のメタノール中の S 1 5 (0. 7 5 g、3. 8 m m o l) の溶液に、K₂CO₃ (0. 6 4 g、4. 6 m m o l) を、アルゴン雰囲気下で少しずつ加えた。反応混合物を室温で 3 0 分間攪拌してから、1 N の HCl 溶液を用いて p H 7 になるまで中和し、揮発性物質を減圧下で蒸発させた。残渣を 1 0 0 mL の酢酸エチルで希釈し、飽和 NaHCO₃ 溶液 (3 0 mL) および塩水 (3 0 mL) によって連続して洗浄し、無水 Na₂SO₄ 上で乾燥させた。溶媒を減圧下で蒸発させ、粗生成物を次の反応に直接使用した。

【0 3 1 6】

化合物 S 1 7

【化 4 1】

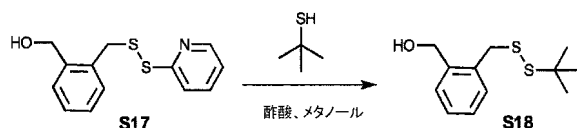


1 5. 0 mL のエタノール中の粗生成物 S 1 6 (0. 5 2 g、3. 4 m m o l) およびジチオピリジン (0. 8 9 m g、4. 0 5 m m o l) の溶液に、0. 3 0 mL の酢酸を加えた。反応混合物を室温で 3 0 分間攪拌してから、減圧下で濃縮した。酢酸エチル／ヘキサン溶媒系 (Combi Flash Rf Instrument で 0 ~ 3 0 % の勾配) を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって、粗混合物を精製したところ、0. 5 2 g (5 0 %) の生成物 S 1 7 が無色油として得られた。¹H NMR (5 0 0 M H z) : δ 8. 4 2 (d, J 5. 0 H z、1 H)、7. 2 5 – 7. 5 1 (m, 7 H)、4. 8 3 (s, 2 H)、4. 1 9 (s, 2 H)、3. 8 5 (br s, 1 H) .

【0 3 1 7】

化合物 S 1 8

【化 4 2】

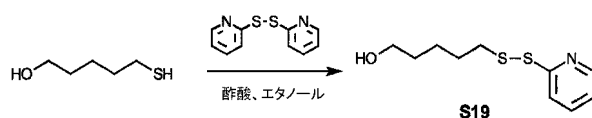


2 0. 0 mL のメタノール中の S 1 7 (0. 4 2 g、1. 6 m m o l) および t e r t -ブチルメルカプタン (0. 2 1 mL、1. 9 m m o l) の溶液に、5 0 μ L の酢酸を加えた。反応混合物を室温で 4 8 時間攪拌してから、減圧下で濃縮した。酢酸エチル／ヘキサン溶媒系 (Combi Flash Rf Instrument で 0 ~ 5 0 % の勾配) を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって、粗混合物を精製したところ、0. 3 2 g (9 4 % の収率) の生成物 S 1 8 が無色油として得られた。¹H NMR (5 0 0 M H z) : δ 7. 4 0 (m, 1 H)、7. 2 6 – 7. 3 0 (m, 3 H)、4. 8 0 (d, 2 H、J 4. 0 H z)、4. 0 6 (s, 2 H)、1. 9 5 (br s, 1 H)、1. 3 5 (s, 9 H) .

【0 3 1 8】

化合物 S 1 9

【化 4 3】



10

20

30

40

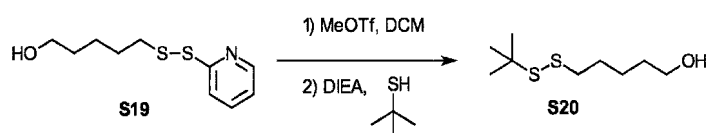
50

25.0 mLのエタノール中の5-メルカプトブタノール(0.85 g、7.1 mmol)およびジチオピリジン(1.87 g、8.5 mmol)の溶液に、0.2 mLの酢酸を加えた。反応混合物を室温で1時間攪拌してから、減圧下で凝縮させた。50.0 mLの酢酸エチルを粗生成物に加え、溶液を、1 NのNaOH水溶液(50 mL)および塩水(30 mL)によって連続して洗浄し、次に、無水Na₂SO₄上で乾燥させた。溶媒を減圧下で蒸発させ、酢酸エチル/ヘキサン溶媒系(Combi Flash Rf Instrumentで0~40%の勾配)を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって、粗混合物を精製したところ、1.21 g(75%)の生成物S19が無色油として得られた。¹H NMR(500 MHz): δ 8.45(d, J 5.0 Hz, 1H)、7.71(d, J 8.0 Hz, 1H)、7.63(m, 1H)、7.07(m, 1H)、3.62(t, J 6.5 Hz, 2H)、2.81(t, J 7.5 Hz, 2H)、1.73(m, 2H)、1.56(m, 2H)、1.48(m, 2H).

【0319】

化合物S20

【化44】

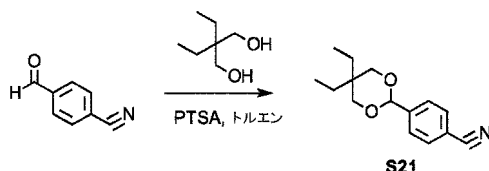


20.0 mLのジクロロメタン中のS19(1.2 g、5.3 mmol)の溶液に、メチルトリフルオロメタンスルホネート(0.87 g、5.3 mmol)を加えた。反応混合物を室温で15分間攪拌した後、2-メチル-2-プロパンチオール(1.2 mL、10.6 mmol)およびジイソプロピルエチルアミン(DIEA)(2.7 mL、15.9 mmol)を加えた。反応混合物をさらに1時間攪拌してから、減圧下で濃縮した。酢酸エチル/ヘキサン溶媒系(Combi Flash Rf Instrumentで0~30%の勾配)を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって、粗混合物を精製したところ、0.67 g(61%)の生成物S20が無色油として得られた。¹H NMR(500 MHz): δ 3.65(t, J 6.5 Hz, 2H)、2.70(t, J 7.0 Hz, 2H)、1.67(m, 2H)、1.57(m, 2H)、1.45(m, 2H)、1.32(s, 9H).

【0320】

化合物S21

【化45】



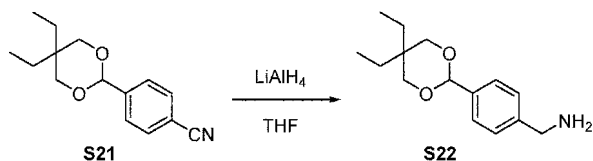
250 mLのトルエン中の4-シアノベンズアルデヒド(5.0 g、38.1 mmol)、2,2-ジエチル-1,3-プロパンジオール(5.5 g、41.9 mmol)およびp-トルエンスルホン酸一水和物(0.21 g、1.14 mmol)の懸濁液を、16時間にわたってディーン・スターク装置を用いて還流させた。反応混合物を室温に冷まし、揮発性物質を減圧下で除去した。粗混合物を300 mLの酢酸エチルで希釈し、飽和NaHCO₃溶液(30 mL)および塩水(30 mL)によって連続して洗浄し、無水Na₂SO₄上で乾燥させた。溶媒を減圧下で蒸発させ、酢酸エチル/ヘキサン溶媒系(Combi Flash Rf Instrumentで0~20%の勾配)を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって、粗混合物を精製したところ、8.7 g(94%)の生成物S21が白色の固体として得られた。¹H NMR(500 MHz): δ 7.66(d, J 6.5 Hz, 2H)、7.61(d, J 8.5 Hz, 2H)、5.4(s, 1H)、3.97(d, J 11.5 Hz, 2H)、3.61(d, J 12.0 Hz, 2H).

z、2 H)、1.79 (q, J 7.5 Hz、2 H)、1.15 (q, J 7.5 Hz、2 H)、0.89 (t, J 7.5 Hz m、3 H)、0.82 (t, J 7.5 Hz m、3 H)。

【0321】

化合物 S 2 2

【化 4 6】



10

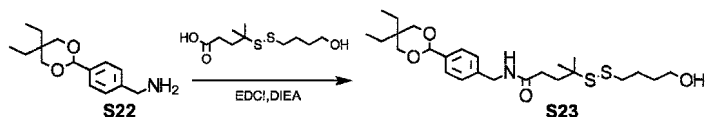
THF 中の水素化アルミニウムリチウム (0.94 g、24.6 mmol) の懸濁液を 0℃ に冷却し、それに、アルゴン雰囲気下で、25.0 mL の THF 中の S 2 1 (2.0 g、8.2 mmol) の溶液を滴下して加えた。反応混合物を室温に温め、3 時間にわたってさらに攪拌した。懸濁液を氷浴によって 0℃ に冷却し、飽和 Na₂SO₄ 溶液でクエンチし、Cellite (登録商標) のパッドに通してろ過した。ろ液を減圧下で濃縮した。粗混合物を 100 mL の酢酸エチルで希釈し、飽和 NaHCO₃ 溶液 (20 mL) および塩水 (20 mL) で連続して洗浄し、無水 Na₂SO₄ 上で乾燥させた。溶媒を減圧下で蒸発させたところ、粗中間体 S 2 2 が無色油として得られ、それをさらに精製せずに次の反応に使用した。

20

【0322】

化合物 S 2 3

【化 4 7】



25.0 mL のジクロロメタン中の S 5 (2.8 g、11.0 mmol)、EDCI (2.5 g、13.0 mmol) および DIEA (7.6 mL、44.0 mmol) の溶液に、10.0 mL のジクロロメタン中の S 2 2 (2.84 g、11.0 mmol) の溶液を加えた。反応混合物を室温で 16 時間攪拌してから、減圧下で濃縮した。酢酸エチル／ヘキサン溶媒系 (Combi Flash Rf Instrument で 0～40% の勾配) を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって、粗混合物を精製したところ、2.5 g (47%) の生成物 S 2 3 が無色油として得られた。¹H NMR (500 MHz) : δ 7.45 (d, J 8.0 Hz、2 H)、7.26 (d, J 8.0 Hz、2 H)、5.85 (br s、1 H)、5.37 (s、1 H)、5.29 (s、2 H)、4.41 (d, J 5.5 Hz、2 H)、3.93 (d, J 11.5 Hz、2 H)、3.60 (m、4 H)、2.69 (t, J 7.5 Hz、2 H)、2.29 (m、2 H)、1.93 (m、2 H)、1.80 (q, J 7.5 Hz、2 H)、1.75 (m、2 H)、1.60 (m、2 H)、1.28 (s、6 H)、1.13 (q, J 7.5 Hz、2 H)、0.89 (t, J 7.5 Hz、3 H)、0.81 (t, J 7.5 Hz、3 H)。

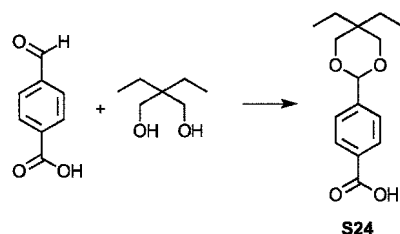
30

40

【0323】

化合物 S 2 4

【化 4 8】



トルエン（250 mL）中の 4-ホルミル安息香酸（15.01 g、100 mmol）および 2,2-ジエチル-1,3-プロパンジオール（14.54 g、110 mmol）の懸濁液に、p-トルエンスルホン酸一水和物（0.57 g、3.0 mmol）を加えた。混合物を、ディーン・スターク装置を用いて一晩還流させた。反応混合物を室温に冷ましたところ、大量の沈殿物が形成された。固体をろ過し、100 mL の酢酸エチルとともに加熱し、冷却して、沈殿物を収集し、それを高真空下で乾燥させたところ、20 g の表題化合物 S24 が得られた。ろ液を水および塩水で洗浄し、無水 Na_2SO_4 上で乾燥させ、蒸発させたところ、白色の固体が得られ、それを酢酸エチルから再結晶化させたところ、さらに 1.5 g の S24（合計 21.5 g、81%）が得られた。 ^1H NMR（500 MHz、 CDCl_3 ）： δ 8.12（2H, d, J 8.5 Hz）、7.61（2H, d, J 8.5 Hz）、5.45（1H, s）、3.98（2H, d, J 11.5 Hz）、3.62（2H, d, J 11.5 Hz）、1.83（2H, q, J 7.5 Hz）、1.16（2H, q, J 7.5 Hz）、0.90（3H, t, J 7.5 Hz）、0.83（3H, t, J 7.5 Hz）。

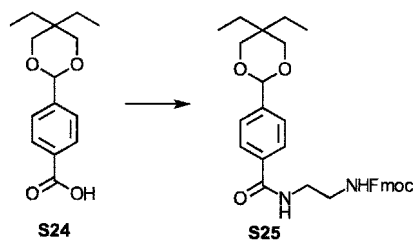
10

20

【0324】

化合物 S25

【化 4 9】



30

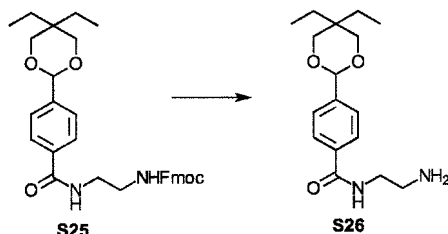
ジメチルホルムアミド（15.0 mL）中の S24（1.32 g、5.0 mmol）およびモノ-Fmocエチレンジアミン HCl 塩（1.75 g、5.5 mmol）の溶液に、HATU（2.28 g、6.0 mmol）および N,N-ジイソプロピルエチルアミン（4.35 mL、25.0 mmol）を加えた。得られた混合物を 30 分間攪拌し、揮発性物質を高真空下で除去したところ、褐色の固体が得られた。固体を酢酸エチルで 3 回洗浄したところ、1.95 g（74%）の純粋な化合物 S25 が白色の固体として得られた。 ^1H NMR（500 MHz、 CDCl_3 ）： δ 7.78（2H, d, J 8.0 Hz）、7.74（2H, d, J 7.5 Hz）、7.55（2H, d, J 7.5 Hz）、7.53（2H, d, J 8.0 Hz）、7.37（2H, t, J 7.5 Hz）、7.26（2H, t, J 7.5 Hz）、7.07（1H, br s）、5.47（1H, br s）、5.38（1H, s）、4.40（2H, d, J 6.5 Hz）、4.16（1H, t, J 6.5 Hz）、3.95（2H, d, J 11.5 Hz）、3.58（2H, d, J 11.5 Hz）、3.55–3.50（2H, m）、3.43–3.35（2H, m）、1.81（2H, q, J 7.5 Hz）、1.14（2H, q, J 7.5 Hz）、0.89（3H, t, J 7.5 Hz）、0.82（3H, t, J 7.5 Hz）。

40

【0325】

化合物 S26

【化 5 0】

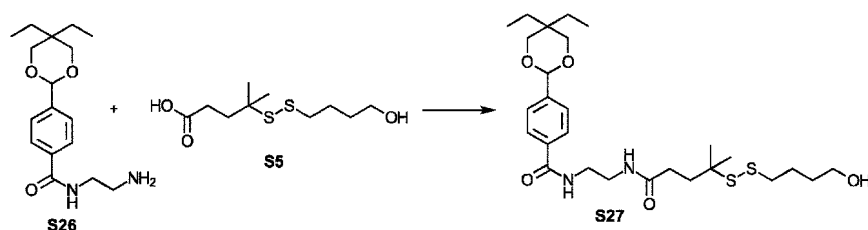


ジメチルホルムアミド（15 mL）中の化合物 S 2 5（1.95 g、3.68 mmol）の溶液に、3 mL のピペリジンを加え、混合物を 30 分間攪拌した。混合物をヘキサン（20 mL × 2）で洗浄し、ジメチルホルムアミド層を高真空下で蒸発させたところ、粗化合物 S 2 6 が得られ、それをさらに精製せずに次の反応に使用した。

【0 3 2 6】

化合物 S 2 7

【化 5 1】

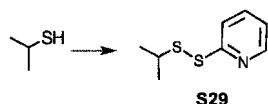


ジメチルホルムアミド（10 mL）中の化合物 S 2 6 および S 5（0.87 g、3.45 mmol）の混合物に、HATU（1.68 g、4.4 mmol）および N, N-ジイソプロピルエチルアミン（1.2 mL、6.9 mmol）を加えた。混合物を 1 時間攪拌し、揮発性物質を高真空下で除去したところ、褐色の固体が得られた。固体を酢酸エチルで数回洗浄し、高真空下で乾燥させたところ、0.95 g（51%）の表題化合物 S 2 7 が白色の固体として得られた。¹H NMR（500 MHz、CDCl₃）：δ 7.81（2H, d, J 8.5 Hz）、7.57（2H, d, J 8.5 Hz）、7.19（1H, br s）、6.42（1H, br s）、5.42（1H, s）、3.96（2H, d, J 11.0 Hz）、3.64–3.55（6H, m）、3.53–3.47（2H, m）、2.66（2H, t, J 7.5 Hz）、2.31–2.26（2H, m）、2.05（1H, br s）、1.90–1.85（2H, m）、1.82（2H, q, J 7.5 Hz）、1.75–1.66（2H, m）、1.63–1.55（2H, m）、1.25（6H, s）、1.15（2H, q, J 7.5 Hz）、0.89（3H, t, J 7.5 Hz）、0.82（3H, t, J 7.5 Hz）。

【0 3 2 7】

化合物 S 2 9

【化 5 2】



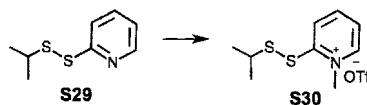
エタノール（300 mL）中のイソプロピルチオール（7.6 g、100 mmol）の溶液に、ジチオジピリジン（24.2 g、110 mmol）および酢酸（7.0 mL）を加えた。混合物を一晩攪拌し、次に、蒸発させたところ、残渣が得られ、それを 200 mL の酢酸エチルに溶解させた。溶液を 1 N の NaOH（50 mL × 3）および塩水で洗浄した。有機層を無水 Na₂SO₄ 上で乾燥させ、ろ過し、蒸発させたところ、残渣が得られ、それを、ISCO companion（酢酸エチル／ヘキサン＝5%～20%）におけるフラッシュシリカゲルカラム精製にかけたところ、14.4 g（77%）の表題化

化合物 S 2 9 が無色油として得られた。 ^1H NMR (500 MHz、 CDCl_3) : δ 8.44 (1H, d, J 5.0 Hz)、7.75 (1H, d, J 8.0 Hz)、7.63 (1H, td, J 8.0、1.5 Hz)、7.06 (1H, m)、3.13 (1H, m)、1.33 (6H, d, J 7.0 Hz)。

【0328】

化合物 S 3 0

【化53】



10

ジクロロメタン (5.0 mL) 中の化合物 S 2 9 (1.86 g、10.0 mmol) の溶液に、MeOTf (1.64 g、10.0 mmol) を加えた。混合物を15分間攪拌し、ヘキサン (10 mL $\times$ 2) で洗浄した。ジクロロメタン層を蒸発させたところ、粗塩が黄色の油 (S 3 0) として得られ、それを次の反応に直接使用した。

【0329】

化合物 S 3 1

【化54】



20

ジクロロメタン中の4-メルカプト-4-メチルブタン-1-オール (0.36 g、3.0 mmol) の溶液に、粗生成物 S 3 0 (1.26 g、3.6 mmol) および N, N-ジイソプロピルエチルアミン (1.0 mL) を加えた。混合物を10分間攪拌し、揮発性物質を減圧下で除去したところ、残渣が得られ、それを、ISCO companion 機器 (酢酸エチル/ヘキサン = 5% ~ 40%) におけるフラッシュシリカゲルカラム精製にかけたところ、0.50 g (85%) の表題化合物 S 3 1 が無色油として得られた。

^1H NMR (500 MHz、 CDCl_3) : δ 3.67 (2H, t, J 6.5 Hz)、2.96 (1H, J 6.5 Hz)、2.83 (1H, m)、1.77-1.67 (3H, m)、1.63-1.55 (1H, m)、1.32 (3H, d, J 6.5 Hz)、1.30 (6H, d, J 6.5 Hz)。

30

【0330】

化合物 S 3 2

【化55】



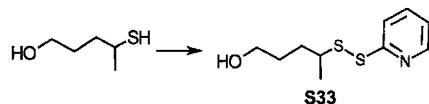
ジクロロメタン中の4-メルカプト-4-メチルペンタン-1-オール (0.19 g、1.39 mmol) の溶液に、粗生成物 S 3 0 (0.58 g、1.66 mmol) および N, N-ジイソプロピルエチルアミン (1.0 mL) を加えた。混合物を10分間攪拌し、揮発性物質を減圧下で除去したところ、残渣が得られ、それを、ISCO companion (酢酸エチル/ヘキサン = 5% ~ 40%) におけるフラッシュシリカゲルカラム精製にかけたところ、0.26 g (89%) の表題化合物 S 3 2 が無色油として得られた。 ^1H NMR (500 MHz、 CDCl_3) : δ 3.66 (2H, t, J 5.5 Hz)、2.94 (1H, J 6.5 Hz)、1.72-1.60 (4H, m)、1.29 (6H, s)、1.29 (6H, d, J 6.5 Hz)。

40

【0331】

化合物 S 3 3

【化 5 6】



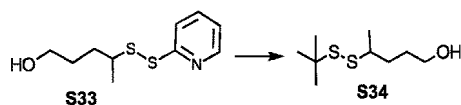
メタノール（5.0 mL）中の 4-メルカプト-4-メチルブタン-1-オール（0.18 g、1.5 mmol）の溶液に、ジチオジピリジン（0.35 g、1.6 mmol）および酢酸（30 μ L）を加えた。混合物を 30 分間攪拌し、次に、蒸発させたところ、残渣が得られ、それを、ISCO companion（酢酸エチル／ヘキサン＝15%～70%）におけるフラッシュシリカゲルカラム精製にかけたところ、0.27 g（78%）の表題化合物 S33 が無色油として得られた。¹H NMR（500 MHz、CDCl₃）： δ 8.84（1H, d, J 5.0 Hz）、7.73（1H, d, J 8.0 Hz）、7.63（1H, td, J 8.0、1.5 Hz）、7.07（1H, m）、3.64（2H, t, J 6.5 Hz）、2.99（1H, m）、1.82–1.60（4H, m）、1.34（3H, d, J 7.0 Hz）。

10

【0332】

化合物 S34

【化 5 7】



20

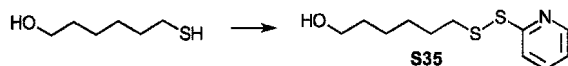
ジクロロメタン（5.0 mL）中の化合物 S33（0.27 g、1.15 mmol）の溶液に、MeOTf（0.19 g、1.15 mmol）を加えた。混合物を 15 分間攪拌し、次に、2-メチル-2-プロパンチオール（0.21 g、2.3 mmol）および N,N-ジイソプロピルエチルアミン（1.0 mL）を加えた。得られた混合物をさらに 30 分間攪拌した。揮発性物質の蒸発により、残渣が得られ、それを、ISCO companion（酢酸エチル／ヘキサン＝5%～40%）におけるフラッシュシリカゲルカラム精製にかけたところ、0.19 g（79%）の表題化合物 S34 が無色油として得られた。¹H NMR（500 MHz、CDCl₃）： δ 3.67（2H, t, J 6.5 Hz）、2.84（1H, m）、1.75–1.65（3H, m）、1.62–1.55（1H, m）、1.32（9H, s）、1.31（3H, d, J 7.0 Hz）。

30

【0333】

化合物 S35

【化 5 8】



メタノール（50.0 mL）中の 6-メルカプト-1-ヘキサノール（2.68 g、20.0 mmol）の溶液に、ジチオジピリジン（6.6 g、30.0 mmol）および酢酸（1.0 mL）を加えた。混合物を 30 分間攪拌し、次に、蒸発させたところ、残渣が得られ、それを、ISCO companion（酢酸エチル／ヘキサン＝15%～70%）におけるフラッシュシリカゲルカラム精製にかけたところ、4.37 g（90%）の表題化合物 S35 が無色油として得られた。¹H NMR（500 MHz、CDCl₃）： δ 8.46（1H, d, J 4.5 Hz）、7.72（1H, d, J 8.0 Hz）、7.64（1H, td, J 8.0、1.5 Hz）、7.07（1H, m）、3.63（2H, t, J 6.5 Hz）、2.80（2H, t, J 7.0 Hz）、1.72（2H, p, J 7.5 Hz）、1.60–1.53（2H, m）、1.47–1.40（2H, m）、1.39–1.34（2H, m）。

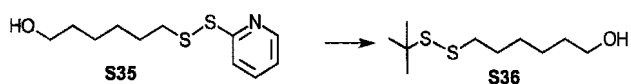
40

【0334】

50

化合物 S 3 6

【化 5 9】



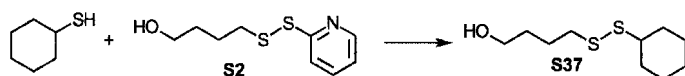
ジクロロメタン（15.0 mL）中の化合物 S 3 5（1.0 g、4.1 mmol）の溶液に、MeOTf（0.67 g、4.1 mmol）を加えた。混合物を15分間攪拌し、次に、2-メチル-2-プロパンチオール（0.9 mL、8.2 mmol）およびN, N-ジイソプロピルエチルアミン（2.0 mL）を加えた。得られた混合物をさらに30分間攪拌した。揮発性物質の蒸発により、残渣が得られ、それを、ISCO companion（酢酸エチル／ヘキサン＝5%～60%）におけるフラッシュシリカゲルカラム精製にかけたところ、0.61 g（67%）の表題化合物 S 3 6が無色油として得られた。

^1H NMR（500 MHz、 CDCl_3 ）： δ 3.65（2H, t, J 6.5 Hz）、2.70（2H, t, J 7.0 Hz）、1.70–1.64（2H, m）、1.62–1.55（2H, m）、1.45–1.35（4H, m）、1.33（9H, s）。

【0335】

化合物 S 3 7

【化 6 0】

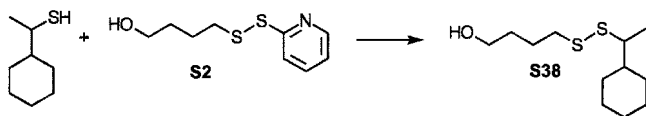


ジクロロメタン（10.0 mL）中の化合物 S 2（0.43 g、2.0 mmol）の溶液に、MeOTf（0.33 g、2.0 mmol）を加えた。混合物を15分間攪拌し、次に、シクロヘキサントール（0.23 g、2.0 mmol）およびN, N-ジイソプロピルエチルアミン（1.0 mL）を加えた。得られた混合物をさらに30分間攪拌した。揮発性物質の蒸発により、残渣が得られ、それを、ISCO companion（酢酸エチル／ヘキサン＝5%～60%）におけるフラッシュシリカゲルカラム精製にかけたところ、0.36 g（81%）の表題化合物 S 3 7が無色油として得られた。 ^1H NMR（500 MHz、 CDCl_3 ）： δ 3.67（2H, t, J 6.5 Hz）、2.74–2.68（1H, m）、2.71（1H, t, J 7.0 Hz）、2.05–2.00（2H, m）、1.81–1.74（4H, m）、1.71–1.65（2H, m）、1.65–1.58（1H, m）、1.40–1.20（6H, m）。

【0336】

化合物 S 3 8

【化 6 1】



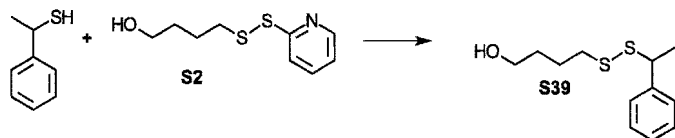
ジクロロメタン（12.0 mL）中の化合物 S 2（0.65 g、3.0 mmol）の溶液に、MeOTf（0.49 g、3.0 mmol）を加えた。混合物を15分間攪拌し、次に、1-シクロヘキシルエタン-1-チオール（0.42 g、3.6 mmol）およびN, N-ジイソプロピルエチルアミン（1.0 mL）を加えた。得られた混合物をさらに30分間攪拌した。揮発性物質の蒸発により、残渣が得られ、それを、ISCO companion（酢酸エチル／ヘキサン＝5%～60%）におけるフラッシュシリカゲルカラム精製にかけたところ、0.58 g（78%）の表題化合物 S 3 8が無色油として得られた。 ^1H NMR（500 MHz、 CDCl_3 ）： δ 3.68（2H, t, J 6.5 Hz）、2.75–2.65（1H, m）、2.70（2H, t, J 7.0 Hz）、1.82–1.72（6H, m）、1.70–1.63（3H, m）、1.58–1.52（1H, m）、1.28（3H, d, J 7.0 Hz）、1.30–1.05（5H, m）。

)

【0337】

化合物 S 3 9

【化 6 2】



メタノール（5.0 mL）中の化合物 S 2（0.43 g、2.0 mmol）の溶液に、ベンジルエタン-1-チオール（0.28 g、2.0 mmol）および酢酸（30 μ L）を加えた。得られた混合物を一晩攪拌した。揮発性物質の蒸発により、残渣が得られ、それを、ISCO companion（酢酸エチル／ヘキサン＝5%～60%）におけるフラッシュシリカゲルカラム精製にかけたところ、0.24 g（50%）の表題化合物 S 3 9 が無色油として得られた。¹H NMR（500 MHz、CDCl₃）： δ 7.38–7.30（4H, m）、7.27–7.23（1H, m）、3.59（2H, t, J 6.5 Hz）、2.30（2H, t, J 7.0 Hz）、1.67（3H, d, J 7.0 Hz）、1.62–1.51（4H, m）。

【0338】

化合物 S 4 0

【化 6 3】

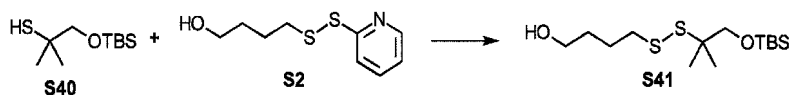


ジクロロメタン（15.0 mL）中の 2-メルカプト-2-メチルプロパン-1-オール（0.50 g、4.7 mmol）の溶液に、0℃で TBDMSCl（0.75 g、4.9 mmol）およびイミダゾール（0.48 g、7.1 mmol）を加え、30 分間攪拌したところ、大量の白色の沈殿物が形成された。白色の固体をろ去し、10 mL のジクロロメタンで洗浄した。ろ液を蒸発させたところ、残渣が得られ、それを、ISCO companion（酢酸エチル／ヘキサン＝0%～30%）におけるフラッシュシリカゲルカラム精製にかけたところ、0.66 g（64%）の表題化合物 S 4 0 が無色油として得られた。¹H NMR（500 MHz、CDCl₃）： δ 3.47（2H, s）、1.32（6H, s）、0.92（9H, s）、0.07（6H, s）。

【0339】

化合物 S 4 1

【化 6 4】



ジクロロメタン（12.0 mL）中の化合物 S 2（0.78 g、3.6 mmol）の溶液に、MeOTf（0.59 g、3.6 mmol）を加えた。混合物を 15 分間攪拌し、次に、S 4 0（0.66 g、3.0 mmol）および N, N-ジイソプロピルエチルアミン（1.0 mL）を加えた。得られた混合物をさらに 30 分間攪拌した。揮発性物質の蒸発により、残渣が得られ、それを、ISCO companion（酢酸エチル／ヘキサン＝5%～60%）におけるフラッシュシリカゲルカラム精製にかけたところ、0.80 g（82%）の表題化合物 S 4 1 が無色油として得られた。¹H NMR（500 MHz、CDCl₃）： δ 3.58（2H, t, J 6.5 Hz）、3.41（2H, s）、2.62（2H, t, J 7.0 Hz）、1.70–1.63（2H, m）、1.62–1.55（2H, m）、1.17（6H, s）、0.81（9H, s）、0.03（6H, s）。

【0340】

化合物 S 4 2

【化 6 5】



EtOH (30.0 mL) 中のチアナフテン-2-ボロン酸 (3.09 g、17.0 mmol) の溶液に、過酸化水素 (30%、5.6 mL) を滴下して加えた。一晚攪拌した後、反応混合物を減圧下で注意深く濃縮し、水 (100 mL) で希釈し、酢酸エチル (70 mL × 3) で抽出した。組み合わされた有機層を、無水硫酸ナトリウム上で乾燥させ、減圧下で濃縮したところ、残渣が得られ、それを、ISCO companion (酢酸エチル/ヘキサン = 0% ~ 20%) におけるフラッシュシリカゲルカラム精製にかけたところ、2.17 g (85%) の表題化合物 S42 が無色油として得られた。¹H NMR (500 MHz、CDCl₃) : δ 7.34 (1 H, dd, J 8.0 Hz)、7.31–7.28 (2 H, m)、7.22 (1 H, td, J 8.0、1.0 Hz)、3.98 (2 H, s)。

【 0 3 4 1 】

化合物 S 4 3

【化 6 6】



THF (40.0 mL) 中の LiAlH₄ (1.1 g、28.8 mmol) の溶液に、THF 中の化合物 S42 (2.16 g、14.4 mmol) の溶液を加えた。混合物を一晩攪拌し、反応混合物を、0℃に冷却しながら注意深く水 (20 mL) でクエンチした後、50 mL の 1 N の HCl を加えた。相を分離し、水層を酢酸エチル (2×50 mL) で抽出した。組み合わされた有機層を塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウム上で乾燥させ、減圧下で濃縮したところ、残渣が得られ、それを、ISCO companion (酢酸エチル／ヘキサン＝10％～50％) におけるフラッシュシリカゲルカラム精製にかけたところ、0.69 g (31％) の表題化合物 S43 が無色油として得られた。¹H NMR (500 MHz、CDCl₃) : δ 7.31 (1H, dd, J 7.5、1.5 Hz)、7.20 (1H, dd, J 7.5、1.5 Hz)、7.16–7.08 (2H, m)、3.91 (2H, t, J 6.5 Hz)、3.41 (1H, s)、2.98 (1H, J 6.5 Hz)。

【 0 3 4 2 】

化合物 S 4 4

【化 6 7】



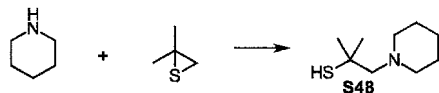
ジクロロメタン（5.0 mL）中の化合物 S 4 3（0.23 g、1.5 mmol）の溶液に、ジスルフィドピリジニウム塩 S 3 0（0.70 g、2.0 mmol）および N，N－ジイソプロピルエチルアミン（1.0 mL）を加えた。混合物を10分間攪拌し、揮発性物質を減圧下で除去したところ、残渣が得られ、それを、ISCO company（酢酸エチル／ヘキサン＝5％～50％）におけるフラッシュシリカゲルカラム精製にかけたところ、0.29 g（85％）の表題化合物 S 4 4 が無色油として得られた。¹H NMR（500 MHz、CDCl₃）：δ 7.79（1H，d，J 8.0 Hz）、7.27－7.23（1H，m）、7.21－7.18（2H，m）、3.91（2H，t，J 6.5 Hz）、3.10（2H，t，J 6.5 Hz）、3.07－3.03（1

H, m)、1.30 (6H, d, J 7.0 Hz) .

【0343】

化合物 S48

【化68】

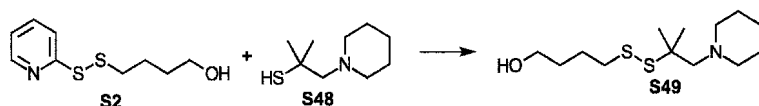


イソブチレンスルフィド (0.88 g、10.0 mmol) と、ピペリジン (0.84 mL、8.5 mmol) との混合物を 80℃ に加熱し、4 時間攪拌した。揮発性物質の蒸発により、粗生成物 S48 が得られ、それを精製せずに次の工程に直接使用した。

【0344】

化合物 S49

【化69】

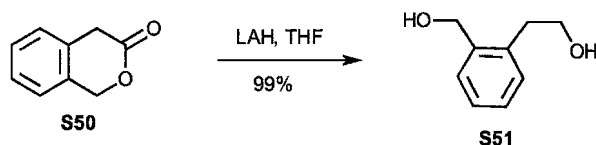


ジクロロメタン (12.0 mL) 中の化合物 S2 (0.65 g、3.0 mmol) の溶液に、MeOTf (0.49 g、3.0 mmol) を加えた。混合物を 15 分間攪拌し、次に、粗生成物 S48 (0.49 g、3.0 mmol) およびジイソプロピルエチルアミン (1.0 mL) を加えた。得られた混合物をさらに 30 分間攪拌した。揮発性物質の蒸発により、残渣が得られ、それを、ISCO companion (酢酸エチル/ヘキサン = 5% ~ 60%) におけるフラッシュシリカゲルカラム精製にかけたところ、0.50 g (2 工程で 52%) の表題化合物 S49 が無色油として得られた。¹H NMR (500 MHz、CDCl₃) : δ 3.69 (2H, m)、2.72 (2H, t, J 7.0 Hz)、2.49 (4H, m)、2.37 (2H, s)、1.80–1.70 (2H, m)、1.70–1.62 (2H, m)、1.55–1.47 (4H, m)、1.40–1.34 (2H, m)、1.27 (6H, s) .

【0345】

化合物 S56

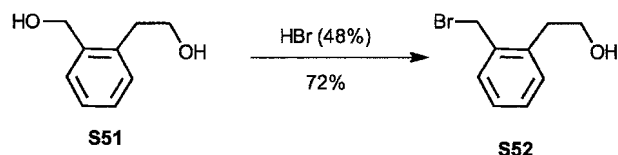
【化70】



THF 中の水素化アルミニウムリチウム (1.03 g、27.0 mmol) の懸濁液を 0℃ に冷却し、これに、アルゴン雰囲気下で、25 mL の THF 中の 3-イソクロマノン S50 (2.0 g、13.5 mmol) の溶液を滴下して加えた。反応混合物を室温に温め、3 時間にわたってさらに攪拌した。懸濁液を、氷浴によって再度 0℃ に冷却し、飽和 Na₂SO₄ 溶液でクエンチし、Celite (登録商標) のパッドに通してろ過した。ろ液を減圧下で濃縮した。粗混合物を 100 mL の酢酸エチルで希釈し、飽和 NaHCO₃ 溶液 (20.0 mL) および塩水 (20.0 mL) で連続して洗浄し、無水 Na₂SO₄ 上で乾燥させた。溶媒を減圧下で蒸発させたところ、中間体 S51 が無色油 (2.01 g、99% の収率) として得られ、それをさらに精製せずに次の工程に直接使用した。¹H NMR (500 MHz) : δ 7.34–7.22 (m, 4H)、4.65 (s, 2H)、3.89 (t, J 6.0 Hz、2H)、2.96 (t, J 6.0 Hz、2H)

【0346】

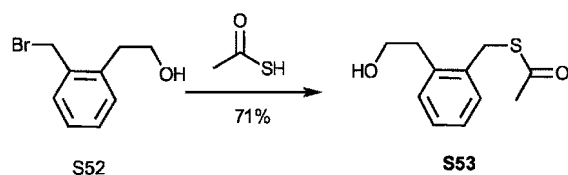
【化 7 1】



中間体 S 5 1 (4 . 0 g 、 2 6 . 5 m m o l) に、 4 8 % の臭化水素酸の溶液 (2 0 . 0 m L) を滴下して加えた。反応混合物を室温で 3 時間攪拌してから、氷水に注いだ。得られた混合物をエチルエーテル (2 0 0 m L) で抽出し、飽和 NaHCO_3 溶液 (2 0 . 0 m L) および塩水 (2 0 . 0 m L) で連続して洗浄し、無水 Na_2SO_4 上で乾燥させた。溶媒を減圧下で蒸発させたところ、中間体 S 5 2 が淡黄色の油 (4 . 2 g 、 7 2 % の収率) として得られ、それをさらに精製せずに次の工程に直接使用した。 ^1H NMR (5 0 0 M H z) : δ 7 . 3 7 - 7 . 1 5 (m , 4 H) 、 4 . 5 9 (s , 2 H) 、 3 . 9 4 (t , J 6 . 5 H z , 2 H) 、 3 . 0 3 (t , J 6 . 5 H z , 2 H)

【 0 3 4 7 】

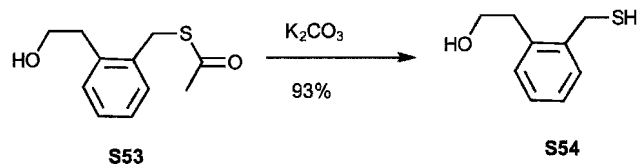
【化 7 2】



5 0 . 0 m L のメタノール中の S 5 2 (5 . 5 g 、 2 5 . 6 m m o l) およびチオ酢酸 (2 . 2 4 g 、 3 0 . 7 m m o l) の溶液に、 NaHCO_3 (2 . 5 8 g 、 3 0 . 7 m m o l) を少しずつ加えた。反応混合物を室温で 2 時間攪拌してから、1 N の HCl 溶液を用いて pH 7 になるまで中和し、揮発性物質を減圧下で蒸発させた。残渣を 3 0 0 m L の酢酸エチルで希釈し、塩水 (5 0 . 0 m L) で洗浄し、無水 Na_2SO_4 上で乾燥させた。溶媒を減圧下で蒸発させ、酢酸エチル／ヘキサン溶媒系 (C o m b i F l a s h R f I n s t r u m e n t で 0 ~ 3 0 % の勾配) を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって、粗混合物を精製したところ、生成物 S 5 3 が淡黄色の油 (3 . 8 g 、 7 1 % の収率) として得られた。 ^1H NMR (5 0 0 M H z) : δ 7 . 3 0 - 7 . 1 8 (m , 4 H) 、 4 . 2 0 (s , 2 H) 、 3 . 8 7 (t , J 7 . 0 H z , 2 H) 、 2 . 9 2 (t , J 7 . 0 H z , 2 H) 、 2 . 3 4 (s , 3 H)

【 0 3 4 8 】

【化 7 3】



5 0 m L のメタノール中の S 5 3 (3 . 8 g 、 1 8 . 1 m m o l) の溶液に、 K_2CO_3 (3 . 0 g 、 2 1 . 7 m m o l) を、アルゴン雰囲気下で少しずつ加えた。反応混合物を室温で 3 0 分間攪拌してから、1 N の HCl 溶液を用いて pH 7 になるまで中和し、揮発性物質を減圧下で蒸発させた。残渣を 2 0 0 m L の酢酸エチルで希釈し、塩水 (5 0 . 0 m L) で洗浄し、無水 Na_2SO_4 上で乾燥させた。溶媒を減圧下で蒸発させたところ、粗生成物 S 5 4 が淡黄色の油 (2 . 8 g 、 9 3 % の収率) として得られ、それをさらに精製せずに次の工程反応に直接使用した。

【 0 3 4 9 】

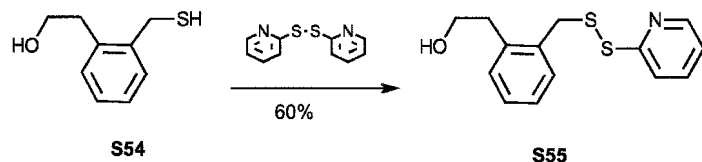
10

20

30

40

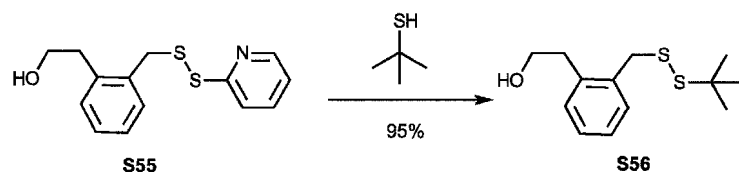
【化 7 4】



50.0 mL のエタノール中の粗生成物 S 5 4 (2.8 g、16.7 mmol) およびジチオピリジン (4.4 g、20.0 mmol) の溶液に、1.0 mL の酢酸を加えた。反応混合物を室温で 3 時間攪拌してから、減圧下で濃縮した。酢酸エチル／ヘキサン溶媒系 (Combi Flash Rf Instrument で 0～50% の勾配) を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって、粗混合物を精製したところ、生成物 S 5 5 が無色油 (2.5 g、60% の収率) として得られた。¹H NMR (500 MHz) : δ 8.43 (d, J 4.5 Hz、1H)、7.58–7.55 (m, 2H)、7.26–7.07 (m, 5H)、4.14 (s, 2H)、3.96 (t, J 6.5 Hz、2H)、3.04 (t, J 6.5 Hz、2H)

【0350】

【化 7 5】

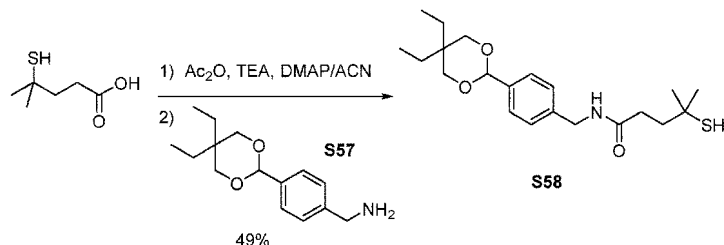


25 mL のメタノール中の S 5 5 (1.14 g、4.1 mmol) および tert-ブチルメルカプタン (560 μL、4.9 mmol) の溶液に、100 μL の酢酸を加えた。反応混合物を室温で 48 時間攪拌してから、減圧下で濃縮した。酢酸エチル／ヘキサン溶媒系 (Combi Flash Rf Instrument で 0～50% の勾配) を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって、粗混合物を精製したところ、生成物 S 5 6 が無色油として得られた (0.90 g、97% の収率、0.14 g の S 5 5 を回収した)。¹H NMR (500 MHz) : δ 7.29–7.20 (m, 4H)、4.03 (s, 2H)、3.92 (t, J 6.5 Hz、2H)、3.01 (t, J 6.5 Hz、2H)、1.36 (s, 9H)

【0351】

化合物 S 5 8

【化 7 6】



アルゴン雰囲気下で、30.0 mL のアセトニトリル中の 4-スルファニル-4-メチルペンタン酸 (5.0 g、33.7 mmol) および無水酢酸 (3.5 mL、37.1 mmol) の溶液に、トリエチルアミン (9.4 mL、67.4 mmol) および触媒量の DMAP を加えた。反応混合物を室温で 30 分間攪拌し、その時点で、15.0 mL のアセトニトリル中の中間体 S 5 7 (12.6 g、50.55 mmol) を加えた。反応混合物を室温で一晩攪拌してから、減圧下で濃縮した。酢酸エチル／ヘキサン溶媒系 (Combi Flash Rf Instrument で 0～50% の勾配) を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって、粗混合物を精製したところ、生成物 S 5 8 が淡黄

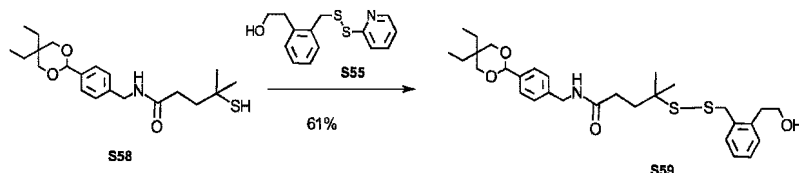
色の油（6.2 g、49%の収率）として得られた。 ^1H NMR（500 MHz）： δ 7.32（d, J 8.5 Hz、2H）、7.26（d, J 8.5 Hz、2H）、5.7（br s, 1H）、5.37（s, 1H）、4.41（d, J 5.5 Hz、2H）、3.94（d, J 11.5 Hz、2H）、3.58（d, J 11.5 Hz、2H）、2.37（m, 2H）、1.93（m, 2H）、1.81（q, J 7.5 Hz、2H）、1.38（s, 6H）、1.13（q, J 8.0 Hz、2H）、0.89（t, J 7.5 Hz、3H）、0.81（t, J 8.0 Hz、3H）、1.83（m, 2H）、1.70（m, 2H）、1.62（m, 2H）、1.25（s, 6H）

【0352】

化合物 S 5 9

10

【化 7 7】



10.0 mL のメタノール中の S 5 5（0.50 g、1.8 mmol）および S 5 8（0.68 g、1.8 mmol）の溶液に、100 μ L の酢酸を加えた。反応混合物を室温で16時間攪拌してから、減圧下で濃縮した。酢酸エチル／ヘキサン溶媒系（Combi Flash Rf Instrument で0～50%の勾配）を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって、粗混合物を精製したところ、生成物 S 5 9 が淡黄色の油（0.60 g、61%の収率）として得られた。 $\text{C}_{30}\text{H}_{43}\text{NO}_4\text{S}_2$ についての ESI MS 計算値 545、実測値 $[\text{M}+\text{H}]^+ 546$ 。 ^1H NMR（500 MHz）： δ 7.44（d, J 8.0 Hz、2H）、7.30–7.18（m, 6H）、5.78（br s, 1H）、5.36（s, 1H）、4.41（d, J 5.5 Hz、2H）、4.07（s, 2H）、3.93（d, J 11.5 Hz、2H）、3.81（br s, 2H）、3.58（d, J 11.5 Hz、2H）、3.02（t, J 7.5 Hz、2H）、2.86（br s, 1H）、2.34（m, 2H）、2.05（m, 2H）、1.81（q, J 7.5 Hz、2H）、1.30（s, 6H）、1.13（q, J 8.0 Hz、2H）、0.89（t, J 8.0 Hz、3H）、0.81（t, J 7.5 Hz、3H）

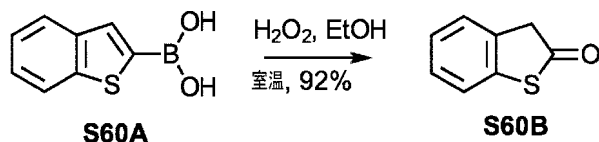
20

30

【0353】

化合物 S 6 0

【化 7 8】



40

EtOH（120 mL）中の化合物 S 6 0 A（30.0 g、168.5 mmol）の溶液に、30%の過酸化水素（50 mL）を、45分間にわたって滴下して加えた（注意：発熱）。反応混合物が、白色の沈殿物を含んで濁った。TLCが3時間で反応の完了を示し、その時点で、反応混合物を水（300 mL）で希釈し、ジクロロメタン（200 mL $\times$ 3）で注意深く抽出した。組み合わされた有機層を、無水硫酸ナトリウム上で乾燥させ、減圧下で濃縮したところ、粗生成物が得られた。ISCO companion（酢酸エチル／ヘキサン、15カラム体積にわたって0～20%）を用いたフラッシュシリカゲルカラム（220 g）によって、これを精製したところ、23.5 g（92%）の化合物 S 6 0 B が淡黄色の油として得られ、それを、室温で静置すると固体になった。 ^1H NMR（500 MHz、 CDCl_3 ）： δ 7.34（1H, dd, J 8.0 Hz）、7.

50

3.1-7.28 (2H, m)、7.22 (1H, td, J 8.0、1.0 Hz)、3.98 (2H, s)

【0354】

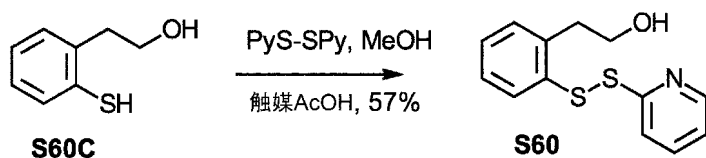
【化79】



ジエチルエーテル (200 mL) 中の LiAlH_4 (7.4 g、200.0 mmol) の氷冷溶液に、1 時間にわたってジエチルエーテル中の化合物 S60B (15.0 g、100.0 mmol) の溶液を滴下して加えた (注意：ガス発生および発熱)。反応混合物を室温に到達させ、攪拌を一晩続けた。TLC が反応の完了を示し、その時点で、ガス発生が停止し、かつ白色の沈殿物の形成が停止するまで、硫酸ナトリウム水溶液の添加によって、反応混合物を注意深くクエンチした。この混合物に、100 mL の 10% の H_2SO_4 を注意深く加え、層を分離した。水層を、 3×75 mL エーテルで抽出し、組み合わされた有機層を、水、塩水で洗浄し、硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濃縮したところ、化合物 S60C (14.6 g、95%) が無色油として得られ、それをさらに精製せずに次の反応に使用した。 ^1H NMR (500 MHz、 CDCl_3) : δ 7.31 (1H, dd, J 7.5、1.5 Hz)、7.20 (1H, dd, J 7.5、1.5 Hz)、7.16-7.08 (2H, m)、3.91 (2H, t, J 6.5 Hz)、3.41 (1H, s)、2.98 (1H, J 6.5 Hz)

【0355】

【化80】

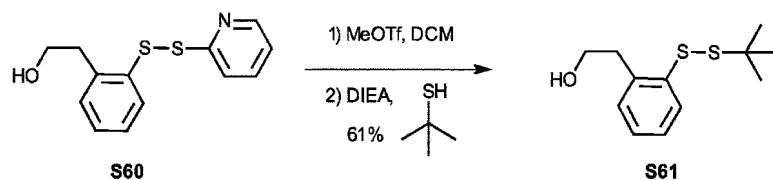


室温でメタノール (200 mL) 中のジチオジピリジン (52.0 g、236.3 mmol) および酢酸 (3.0 mL) の溶液に、メタノール (50 mL) 中の化合物 S60C (14.6 g、94.5 mmol) の溶液を加え、一晩攪拌した。揮発性物質を除去し、残渣に 100 mL のジエチルエーテルを加えた。分離された固体をろ過し、ジエチルエーテル (3×50 mL) で洗浄した。組み合わされたエーテル洗浄物を濃縮したところ、粗生成物が得られ、それを、ISCO companion (酢酸エチル/ヘキサン、0~50%) を用いたフラッシュシリカゲルカラム精製にかけたところ、14.1 g (57%) の化合物 S60 が得られた。 ^1H NMR (500 MHz、 CDCl_3) : δ 8.48 (1H, d, J 5.0 Hz)、7.65-7.60 (3H, m)、7.25-7.18 (3H, m)、7.13-7.10 (1H, m)、3.96 (2H, t, J 6.5 Hz)、3.17 (1H, t, J 6.5 Hz)

【0356】

化合物 S61

【化81】



30.0 mL のジクロロメタン中の化合物 S60 (4.5 g、17.0 mmol) の溶液に、MeOTf を室温で滴下して加えた。反応混合物を 10 分間攪拌してから、ter

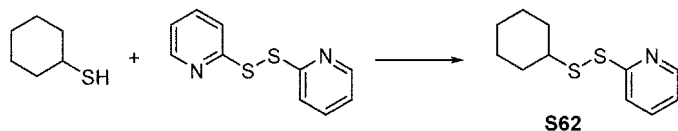
ｵｰﾌﾞﾁﾙﾐｴﾙｶﾌﾟﾀﾝ (1.9 mL、17.0 mmol) および DIEA (6.0 mL、34.0 mmol) を加えた。反応混合物を室温でさらに30分間攪拌してから、減圧下で濃縮した。酢酸エチル／ヘキサン溶媒系 (Combi Flash Rf Instrumentで0～30%の勾配) を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって、粗混合物を精製したところ、生成物 S61 が無色油 (2.5 g、61%の収率) として得られた。¹H NMR (500 MHz) : δ 7.84 (d, J 5.0 Hz、1H)、7.25–7.13 (m, 3H)、3.92 (t, J 7.0 Hz、2H)、3.12 (t, J 7.0 Hz、2H)、1.30 (s, 9H)

【0357】

化合物 S62

10

【化82】



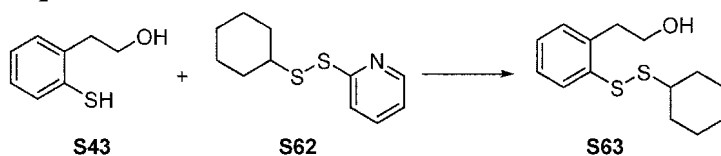
上に報告される AcOH 活性剤を用いて、化合物 S55 について記載される手順にしたがって、化合物 S62 を調製した。¹H NMR (500 MHz、CDCl₃) : δ 8.45 (1H, s)、7.78 (1H, d, J 8.0 Hz)、7.64 (1H, t, J 8.0 Hz)、7.09–7.04 (1H, m)、2.90–2.80 (1H, m)、2.06–1.98 (2H, m)、1.80–1.73 (2H, m)、1.63–1.56 (1H, m)、1.45–1.35 (2H, m)、1.33–1.18 (3H, m)

20

【0358】

化合物 S63

【化83】



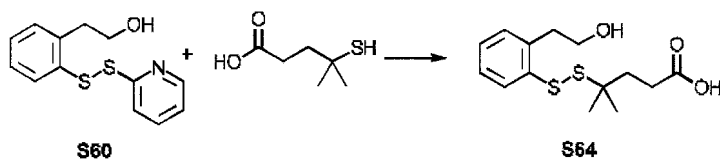
上に報告される MeOTf 活性剤を用いて、化合物 S41 について記載される手順にしたがって、化合物 S63 を調製した。¹H NMR (500 MHz、CDCl₃) : δ 7.80 (1H, d, J = 8.0 Hz)、7.30–7.23 (1H, m)、7.21–7.17 (2H, m)、3.90 (2H, t, J 6.5 Hz)、3.09 (2H, t, J 6.5 Hz)、2.82–2.70 (1H, m)、2.06–1.98 (2H, m)、1.80–1.72 (2H, m)、1.63–1.55 (1H, m)、1.41–1.18 (5H, m)

30

【0359】

化合物 S64

【化84】



40

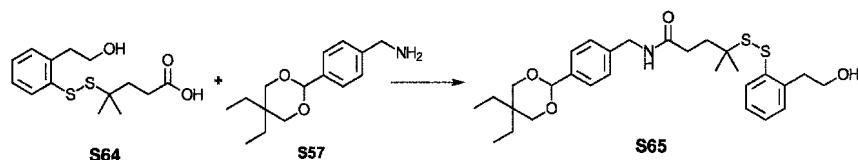
上に報告される MeOTf 活性剤を用いて、化合物 S41 について記載される手順にしたがって、化合物 S64 を調製した。¹H NMR (500 MHz、CDCl₃) : δ 7.81 (1H, d, J 8.0 Hz)、7.26–7.21 (1H, m)、7.19–7.13 (2H, m)、3.93 (2H, t, J 6.5 Hz)、3.13 (2H, t, J 6.5 Hz)、2.38–2.34 (2H, m)、1.90–1.86 (2H, m)、1.27 (1H, s)

50

【0360】

化合物 S 6 5

【化 8 5】

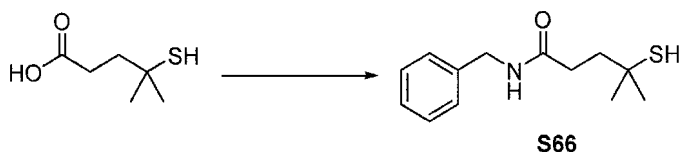


DMF (12 mL) 中の、化合物 S 5 7 (1.13 g、4.54 mmol) と、S 6 4 (1.24 g、4.13 mmol) との混合物に、HCTU (2.56 g、6.20 mmol) および N, N-ジイソプロピルエチルアミン (1.76 mL、10.3 mmol) を加えた。混合物を1時間攪拌し、揮発性物質を高真空下で除去したところ、残渣が得られ、それを、ISCO companion (酢酸エチル／ヘキサン、10～70%) におけるフラッシュシリカゲルカラム精製にかけたところ、1.28 g (58%) の表題化合物 S 6 5 が無色油として得られた。¹H NMR (500 MHz、CDCl₃) : δ 7.81 (1H, d, J 8.0 Hz)、7.47 (2H, d, J 8.0 Hz)、7.21–7.10 (3H, m)、7.07 (1H, t, J 7.5 Hz)、7.01 (1H, d, J 7.5 Hz)、5.40 (1H, s)、4.92 (1H, s, br)、4.24 (2H, d, J 5.5 Hz)、3.96 (2H, d, J 11.5 Hz)、3.73 (2H, t, J 6.5 Hz)、3.61 (2H, d, J 11.5 Hz)、2.97 (2H, t, J 6.5 Hz)、2.10–2.02 (2H, m)、1.84 (2H, q, J 7.5 Hz)、1.81–1.76 (2H, m)、1.29 (6H, s)、1.15 (2H, q, J 7.5 Hz)、0.90 (3H, t, J 7.5 Hz)、0.82 (3H, t, J 7.5 Hz)

【0361】

化合物 S 6 6

【化 8 6】

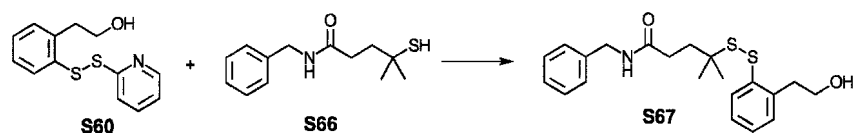


アセトニトリル (10.0 mL) 中の、2-メチル-2-メルカプトペンタン酸 (0.74 g、5.0 mmol) と、無水酢酸 (0.52 mL、5.5 mmol) との混合物に、トリエチルアミン (1.39 mL、10.0 mmol) および DMAP (5 mg) を加えた。混合物を1時間攪拌し、次に、ベンジルアミン (1.37 mL、12.5 mmol) を混合物に加え、攪拌を一晩続けた。揮発性物質を減圧下で除去したところ、残渣が得られ、それを、ISCO companion (酢酸エチル／ヘキサン、10～70%) におけるフラッシュシリカゲルカラム精製にかけたところ、0.70 g (59%) の表題化合物 S 6 6 が無色油として得られた。¹H NMR (500 MHz、CDCl₃) : δ 7.36–7.32 (2H, m)、7.30–7.26 (3H, m)、5.73 (1H, s)、4.45 (2H, d, J 6.0 Hz)、2.43–2.38 (2H, m)、1.98–1.94 (2H, m)、1.39 (6H, s)

【0362】

化合物 S 6 7

【化 8 7】



10

20

30

40

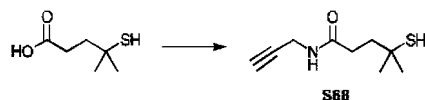
50

上に報告されるMeOTf活性剤を用いて、化合物S41について記載される手順にしたがって、化合物S67を調製した。¹H NMR (500 MHz、CDCl₃) : δ 7.81 (1H, d, J 8.0 Hz)、7.37–7.26 (3H, m)、7.21–7.15 (3H, m)、7.08–7.02 (2H, m)、5.14 (1H, s, br)、4.28 (2H, d, J 5.5 Hz)、3.89 (2H, t, J 6.5 Hz)、3.08 (2H, t, J 6.5 Hz)、2.12–2.05 (2H, m)、1.87–1.82 (2H, m)、1.29 (6H, s)

【0363】

化合物S68

【化88】

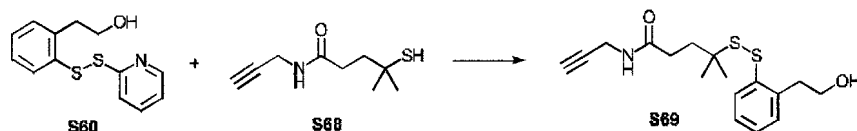


アセトニトリル (10.0 mL) 中の、2-メチル-2-メルカプトペンタン酸 (0.74 g、5.0 mmol) と、無水酢酸 (0.52 mL、5.5 mmol) との混合物に、トリエチルアミン (1.39 mL、10.0 mmol) およびDMA P (5 mg) を加えた。混合物を1時間攪拌し、次に、プロパルギルアミン (0.69 g、12.5 mmol) を混合物に加え、攪拌を一晩続けた。揮発性物質を減圧下で除去したところ、残渣が得られ、それを、ISCO companion (酢酸エチル/ヘキサン、5~55%) におけるフラッシュシリカゲルカラム精製にかけたところ、0.72 g (59%) の表題化合物S68が白色の固体として得られた。¹H NMR (500 MHz、CDCl₃) : δ 5.66 (1H, s)、4.06 (2H, dd, J 5.0、2.5 Hz)、2.41–2.37 (2H, m)、2.23 (1H, t, J 2.5 Hz)、1.95–1.91 (2H, m)、1.39 (6H, s)

【0364】

化合物S69

【化89】



上に報告されるMeOTf活性剤を用いて、化合物S41について記載される手順にしたがって、化合物S69を調製した。¹H NMR (500 MHz、CDCl₃) : δ 7.83 (1H, d, J 8.0 Hz)、7.30–7.16 (3H, m)、5.05 (1H, s)、3.95 (2H, t, J 6.5 Hz)、3.88 (2H, dd, J 5.5、2.5 Hz)、3.15 (2H, t, J 6.5 Hz)、2.23 (1H, t, J 2.5 Hz)、2.10–2.04 (2H, m)、1.83–1.79 (2H, m)、1.28 (6H, s)

【0365】

化合物S72

【化90】



ジクロロメタン (25.0 mL) 中の2-メルカプト-2-メチルブタン-1-オール (1.2 g、10 mmol) の溶液に、0℃で、TBDMSCl (1.58 g、10.5 mmol) およびイミダゾール (1.02 g、15 mmol) を加えた。得られた混合物を30分間攪拌したところ、大量の白色の沈殿物が形成された。白色の固体をろ過し、30.0 mLのジクロロメタンで洗浄した。ろ液を蒸発させたところ、残渣が得られ、それを、ISCO companion (酢酸エチル/ヘキサン0~30%) におけるフラッ

10

20

30

40

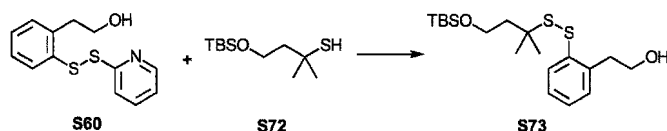
50

シュシリカゲルカラム精製にかけたところ、1.63 g (71%) の表題化合物 S72 が無色油として得られた。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.83 (1H, d, J 8.0 Hz)、7.30–7.16 (3H, m)、5.05 (1H, s)、3.95 (2H, t, J 6.5 Hz)、3.88 (2H, dd, J 5.5、2.5 Hz)、3.15 (2H, t, J 6.5 Hz)、2.23 (1H, t, J 2.5 Hz)、2.10–2.04 (2H, m)、1.83–1.79 (2H, m)、1.28 (6H, s)

【0366】

化合物 S73

【化91】

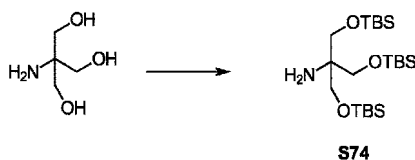


上に報告される MeOTf 活性剤を用いて、化合物 S41 について記載される手順にしたがって、化合物 S73 を調製した。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.83 (1H, d, J 8.0 Hz)、7.30–7.12 (3H, m)、3.91 (2H, t, J 6.5 Hz)、3.68 (2H, t, J 7.0 Hz)、3.12 (2H, t, J 6.5 Hz)、1.83 (1H, t, J 6.5 Hz)、1.28 (6H, s)、0.87 (9H, s)、0.03 (6H, s)

【0367】

化合物 S74

【化92】

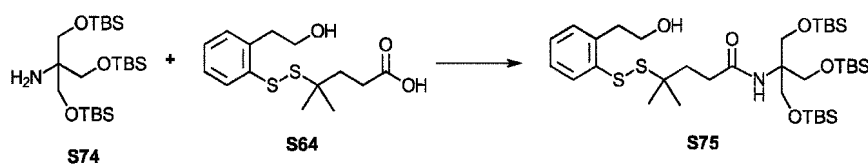


DMF (5.0 mL) 中の TBDMSCl (6.7 g、44.6 mmol) およびイミダゾール (6.3 g、92.9 mmol) の溶液に、トリス(ヒドロキシメチル)メチルアミン (1.5 g、12.4 mmol) を加え、1時間攪拌した。混合物を水 (15.0 mL) で希釈し、ジクロロメタン (3×15.0 mL) で抽出した。組み合わせられた有機層を無水硫酸ナトリウム上で乾燥させ、ろ液を減圧下で蒸発させたところ、残渣が得られ、それを、ISCO companion (酢酸エチル/ヘキサン、0~20%) におけるフラッシュシリカゲルカラム精製にかけたところ、4.0 g (70%) の S74 が無色油として得られた。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 3.48 (6H, s)、0.89 (27H, s)、0.04 (18H, s)

【0368】

化合物 S75

【化93】



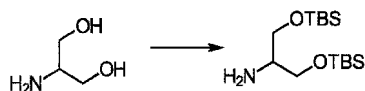
DMF (10.0 mL) 中の、化合物 S64 (0.6 g、2.0 mmol) と、S74 (1.16 g、2.5 mmol) との混合物に、HATU (1.14 g、3.0 mmol) および N,N-ジイソプロピルエチルアミン (0.85 mL、5 mmol) を加えた。混合物を1時間攪拌し、その時点で、揮発性物質を高真空下で除去したところ、残渣が得られ、それを、ISCO companion (酢酸エチル/ヘキサン、10~40%)

におけるフラッシュシリカゲルカラム精製にかけたところ、0.60 g (40%) の化合物 S75 が無色油として得られた。¹H NMR (500 MHz、CDCl₃) : δ 7.81 (1H, d, J 8.0 Hz)、7.26–7.12 (3H, m)、5.45 (1H, s)、3.92 (2H, t, J 6.5 Hz)、3.80 (6H, s)、3.11 (2H, t, J 6.5 Hz)、2.14–2.10 (2H, m)、1.90–1.86 (2H, m)、1.23 (6H, s)、0.90 (27H, s)、0.04 (18H, s)

【0369】

化合物 S76

【化94】



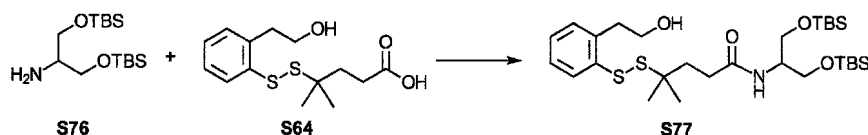
S76

ジクロロメタン (50.0 mL) 中の TBDMSCl (7.2 g、48 mmol)、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (5.0 mL、29 mmol) および DMAP (50 mg) の溶液に、2-アミノ-1,3-プロパンジオール (2.0 g、22 mmol) を加え、混合物を一晩攪拌した。揮発性物質を高真空下で除去したところ、残渣が得られ、それを、ISCO companion (酢酸エチル/ヘキサン、2%のトリエチルアミンを含む50~100%) におけるフラッシュシリカゲルカラム精製にかけたところ、1.2 g (17%) の化合物 S76 は無色油として得られた。¹H NMR (500 MHz、CDCl₃) : δ 3.70 (2H, dd, J 10.0、5.5 Hz)、3.63 (2H, dd, J 10.0、5.5 Hz)、3.04 (1H, m)、0.90 (18H, s)、0.07 (12H, s)

【0370】

化合物 S77

【化95】



S76

S64

S77

DMF (10.0 mL) 中の、化合物 S64 (0.77 g、2.56 mmol) と、S76 (0.82 g、2.56 mmol) との混合物に、HATU (1.17 g、3.07 mmol) および N, N-ジイソプロピルエチルアミン (0.87 mL、5.12 mmol) を加えた。混合物を1時間攪拌し、揮発性物質を高真空下で除去したところ、残渣が得られ、それを、ISCO companion (酢酸エチル/ヘキサン、10%~40%) におけるフラッシュシリカゲルカラム精製にかけたところ、0.52 g (34%) の表題化合物 S77 が無色油として得られた。¹H NMR (500 MHz、CDCl₃) : δ 7.81 (1H, d, J 7.5 Hz)、7.26–7.12 (3H, m)、5.59 (1H, d, J 8.5 Hz)、3.94 (2H, t, J 6.5 Hz)、3.92–3.82 (1H, m)、3.68 (2H, dd, J 13.5、4.5 Hz)、3.50 (2H, dd, J 9.5、6.5 Hz)、3.12 (2H, t, J 6.5 Hz)、2.16–2.10 (2H, m)、1.92–1.84 (2H, m)、1.26 (6H, s)、0.90 (18H, s)、0.07 (12H, s)

【0371】

化合物 S78

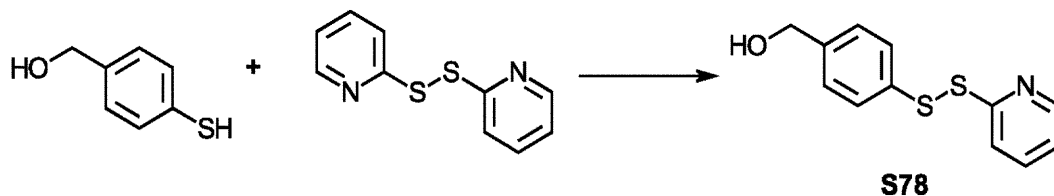
10

20

30

40

【化 9 6】

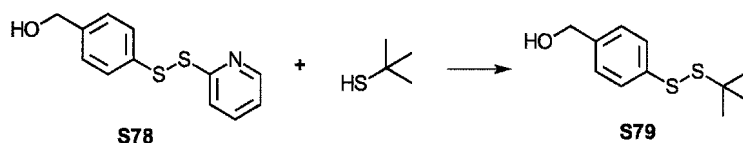


上に報告される AcOH 活性剤を用いて、化合物 S55 について記載される手順にしたがって、化合物 S78 を調製した。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 8.47 (1H, d, J 4.5 Hz)、7.70–7.60 (2H, m)、7.52 (2H, d, J 8.5 Hz)、7.31 (2H, d, J 8.5 Hz)、7.10 (1H, t, J 6.0 Hz)、4.67 (2H, s)

【0372】

化合物 S79

【化 9 7】

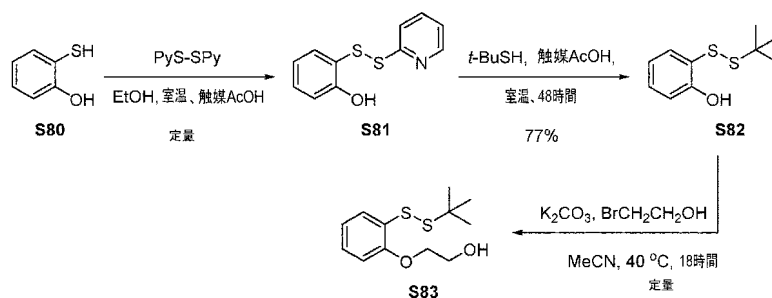


上に報告される MeOTf 活性剤を用いて、化合物 S41 について記載される手順にしたがって、化合物 S79 を調製した。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.55 (2H, d, J 8.0 Hz)、7.29 (2H, d, J 8.0 Hz)、4.67 (2H, s)、1.31 (9H, s)

【0373】

化合物 S83

【化 9 8】

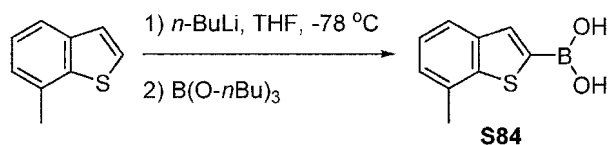


上記のスキームに概説される手順にしたがって、化合物 S83 を調製した。

【0374】

化合物 S84

【化 9 9】



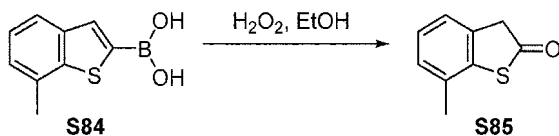
7-メチルベンゾ [b] チオフェン (0.74 g、5 mmol) を、アルゴン下でエーテルに溶解させ、溶液を 0 ° に冷却した。0 ~ 5 ° C の温度に維持しながら、n-ブチルリチウム (2.0 ml の、ヘキサン中 2.5 M、5 mmol) を加えた。混合物を 0 ° で 10 分間、次に、室温で 45 分間攪拌した。次に、混合物を 0 ° に冷却し、ホウ酸トリブチル (1.47 ml、5.5 mmol) を滴下して加えた。0 ° で 1 時間攪拌した後、混合物を室温に温め、一晩静置させ、その時点で、反応物を 1 M の塩酸でクエンチした。水相

をエーテルで抽出し、エーテル層を水酸化ナトリウム水溶液（1 M）で抽出した。塩基性の水層を、濃塩酸を用いて pH 2 になるまで酸性化し、エーテル（2 × 50 mL）で抽出した。組み合わせられた有機層を無水 Na₂SO₄ 上で乾燥させた。溶媒を減圧下で蒸発させたところ、粗生成物 S84（0.80 g）が白色の固体として得られた。

【0375】

化合物 S85

【化100】



10

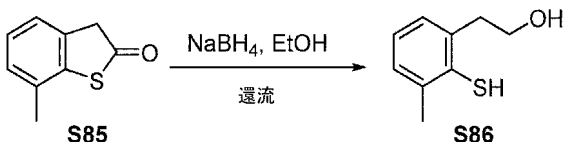
EtOH（10.0 mL）中の粗生成物 S84（0.80 g、4.2 mmol）の溶液に、過酸化水素（30%、1.4 mL）を滴下して加えた。一晚攪拌した後、反応混合物を減圧下で注意深く濃縮し、水（30 mL）で希釈し、酢酸エチル（20 mL × 3）で抽出した。組み合わせられた有機層を、無水硫酸ナトリウム上で乾燥させ、減圧下で濃縮したところ、残渣が得られ、それを、ISCO companion（酢酸エチル／ヘキサン、0～20%）におけるフラッシュシリカゲルカラム精製にかけたところ、0.51 g（74%）の化合物 S85 が無色油として得られた。¹H NMR（500 MHz、CDCl₃）：δ 7.13（3H, s）、4.00（2H, s）、2.31（3H, s）

20

【0376】

化合物 S86

【化101】



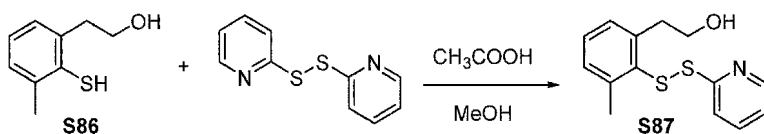
EtOH（5 mL）中の S85（0.51 g、3.1 mmol）の溶液に、NaBH₄（0.59 g、15.5 mmol）を一度に加え、混合物を15分間還流させ、室温に冷ました。揮発性物質を蒸発させたところ、白色のスラリーが得られ、それを水に溶解させ、1 M の HCl を用いて pH 2 になるまで酸性化した。混合物をジクロロメタン（3 × 20 mL）で抽出し、組み合わせられた有機層を塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウム上で乾燥させ、減圧下で濃縮したところ、粗化合物 S86 が無色油として得られた。¹H NMR（500 MHz、CDCl₃）：δ 7.11–7.04（3H, m）、3.92（2H, t, J 6.5 Hz）、3.30（1H, s）、3.05（2H, t, J 6.5 Hz）、2.39（3H, s）

30

【0377】

化合物 S87

【化102】



40

MeOH（10 mL）中のジチオジピリジン（1.7 g、7.8 mmol）および酢酸（0.03 mL）の溶液に、MeOH（5 mL）中の粗生成物 S86 を加えた。反応混合物を30分間攪拌し、蒸発させたところ、黄色の残渣が得られ、それを、ISCO companion（酢酸エチル／ヘキサン、0～40%）におけるフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィーによる精製にかけたところ、0.38 g（44%）の化合物 S87 が無色油として得られた。¹H NMR（500 MHz、CDCl₃）：δ 8.49（1H, d, J 5.0 Hz）、7.64–7.58（2H, m）、7.19（1H, t,

50

J 7.0 Hz)、7.13 (2H, t, J 6.5 Hz)、3.83 (2H, t, J 7.0 Hz)、3.26 (2H, t, J 6.5 Hz)、2.55 (3H, s)

【0378】

化合物 S88

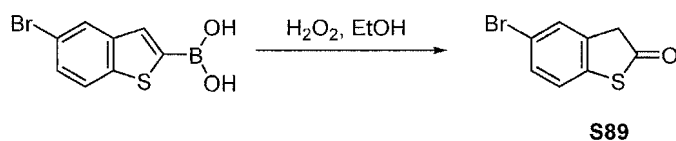
10.0 mL のジクロロメタン中の化合物 S87 (0.57 g、2.0 mmol) の溶液に、室温で、MeOTf (0.36 g、2.0 mmol) を加えた。反応混合物を 10 分間攪拌し、その時点で、tert-ブチルメルカプタン (0.23 mL、2.2 mmol) およびジイソプロピルエチルアミン (0.5 mL) を加えた。反応混合物を室温でさらに 30 分間攪拌してから、減圧下で濃縮した。ISCO companion (酢酸エチル／ヘキサン、0～50%) におけるフラッシュシリカゲルカラム精製を用いて、粗混合物を精製したところ、化合物 S88 が無色油 (0.46 g、87%) として得られた。

¹H NMR (500 MHz): δ 7.17 (1H, t, J 7.0 Hz)、7.11 (m, 2H)、3.89 (2H, t, J 7.0 Hz)、3.34 (2H, t, J 7.0 Hz)、2.64 (3H, s)、1.27 (s, 9H)

【0379】

化合物 S89

【化103】

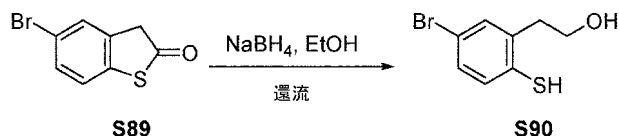


EtOH (12.0 mL) 中の 5-ブロモベンゾ [b] チオフェン-2-ボロン酸 (1.0 g、3.90 mmol) の溶液に、過酸化水素 (30%、1.5 mL) を滴下して加えた。一晩攪拌した後、反応混合物を減圧下で注意深く濃縮し、水 (30 mL) で希釈し、酢酸エチル (20 mL × 3) で抽出した。組み合わされた有機層を、無水硫酸ナトリウム上で乾燥させ、減圧下で濃縮したところ、残渣が得られ、それを、ISCO companion (酢酸エチル／ヘキサン、0～20%) におけるフラッシュシリカゲルカラム精製にかけたところ、0.64 g (72%) の化合物 S89 が無色油として得られた。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.44 (1H, s)、7.43 (1H, d, J 8.0 Hz)、7.21 (1H, d, J 8.0 Hz)、3.96 (2H, s)

【0380】

化合物 S90

【化104】



EtOH (10 mL) 中の S89 (0.64 g、2.8 mmol) の還流溶液に、NaBH₄ (0.53 g、13.9 mmol) を一度に加えた。反応混合物をさらに 15 分間還流させ、室温に冷まし、揮発性物質を蒸発させたところ、白色のスラリーが得られ、それを水に溶解させ、溶液を、1 M の HCl を用いて pH 2 になるまで酸性化した。水層をジクロロメタン (3 × 20 mL) で抽出し、組み合わされた有機層を塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウム上で乾燥させ、減圧下で濃縮したところ、粗化合物 S90 が白色の固体として得られた。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.37 (1H, s)、7.23 (1H, d, J 8.0 Hz)、7.18 (1H, d, J 8.0 Hz)、3.90 (2H, t, J 6.5 Hz)、3.42 (1H, s)、2.94 (2H, t, J 6.5 Hz)

【0381】

化合物 S91

10

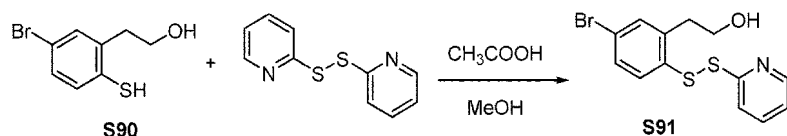
20

30

40

50

【化105】



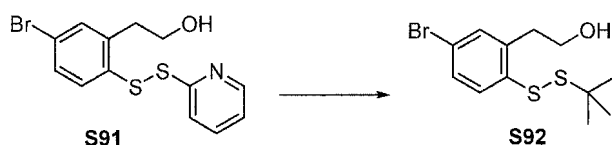
MeOH (10 mL) 中のジチオジピリジン (1.84 g、8.34 mmol) および酢酸 (0.03 mL) の溶液に、MeOH (5 mL) 中の粗生成物 S90 を加え、混合物を 30 分間攪拌し、次に、蒸発させたところ、黄色の残渣が得られ、これを、ISCO companion (酢酸エチル／ヘキサン、0～40%) におけるフラッシュシリカゲルカラム精製にかけたところ、0.50 g (2 工程で 53%) の化合物 S91 が無色油として得られた。¹H NMR (500 MHz、CDCl₃) : δ 8.47 (1H, d, J 5.0 Hz)、7.64–7.58 (3H, m)、7.31–7.26 (2H, m)、7.13 (1H, m)、3.95 (2H, t, J 6.5 Hz)、3.12 (2H, t, J 6.5 Hz)

10

【0382】

化合物 S92

【化106】



20

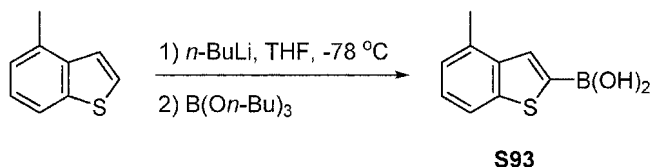
10.0 mL のジクロロメタン中の化合物 S91 (0.50 g、1.47 mmol) の溶液に、室温で、MeOTf (0.24 g、1.47 mmol) を加えた。反応混合物を 10 分間攪拌し、その時点で、tert-ブチルメルカプタン (0.18 mL、1.62 mmol) および N,N-ジイソプロピルエチルアミン (0.5 mL) を加えた。反応混合物を室温でさらに 30 分間攪拌し、減圧下で濃縮した。ISCO companion (酢酸エチル／ヘキサン溶媒、0～50%) におけるフラッシュシリカゲルカラム精製を用いて、粗混合物を精製したところ、化合物 S92 が無色油 (0.37 g、78%) として得られた。¹H NMR (500 MHz) : δ 7.72 (2H, d, J 8.5 Hz)、7.34 (2H, m)、3.91 (2H, t, J 7.0 Hz)、3.07 (2H, t, J 7.0 Hz)、1.29 (s, 9H)

30

【0383】

化合物 S93

【化107】



40

4-メチルベンゾチオフェン (1.0 g、6.75 mmol) を、アルゴン下でエーテルに溶解させ、溶液を 0 °C に冷却した。0～5 °C の温度を維持しながら、n-ブチルリチウム (2.7 mL の、ヘキサン中 2.5 M、6.75 mmol) を加えた。混合物を、0 °C で 10 分間、次に、室温で 45 分間攪拌し、再度 0 °C に冷却し、ホウ酸トリブチル (1.99 mL、7.43 mmol) を滴下して加えた。反応混合物を 0 °C で 1 時間攪拌し、次に、室温に温め、一晩静置させた後、1 M の塩酸でクエンチした。水相をエーテル (2 × 30 mL) で抽出し、組み合わせられた有機層を水酸化ナトリウム水溶液 (1 M) で洗浄した。水性塩基性層を、濃塩酸を用いて pH 2 になるまで酸性化し、エーテル (2 × 30 mL) で抽出した。組み合わせられた有機層を無水 Na₂SO₄ 上で乾燥させた。溶媒を減圧下で蒸発させたところ、粗生成物 S93 (1.05 g、81%) が白色の固体として得

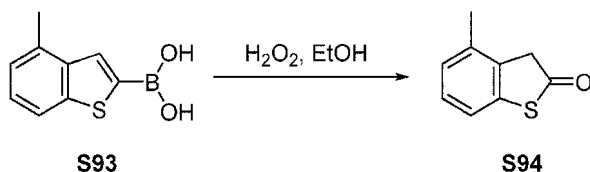
50

られ、それをさらに精製せずに次の工程に直接使用した。 ^1H NMR (500 MHz、 CD_3OD): δ 7.93 (1H, s)、7.70 (1H, d, J 8.0 Hz)、7.25 (1H, t, J 7.0 Hz)、7.13 (1H, d, J 7.0 Hz)、7.04 (1H, d, J 7.0 Hz)、2.62 (3H, s)

【0384】

化合物 S94

【化108】



10

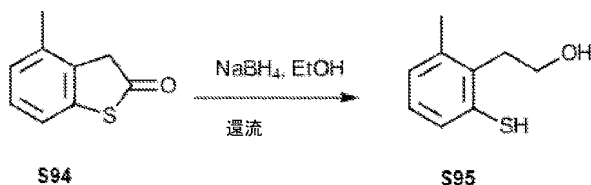
EtOH (10.0 mL) 中の粗生成物 S93 (1.05 g、5.5 mmol) の溶液に過酸化水素 (30%、1.0 mL) を滴下して加えた。一晚攪拌した後、反応混合物を減圧下で注意深く濃縮し、水 (30 mL) で希釈し、酢酸エチル (3 × 20 mL) で抽出した。組み合わされた有機層を無水硫酸ナトリウム上で乾燥させ、減圧下で濃縮したところ、残渣が得られ、それを、ISCO companion (酢酸エチル/ヘキサン = 5 ~ 15%) におけるフラッシュシリカゲルカラム精製にかけたところ、0.80 g (89%) の表題化合物 S94 が無色油として得られた。 ^1H NMR (500 MHz、 CDCl_3): δ 7.23–7.17 (2H, m)、7.04 (1H, d, J 7.0 Hz)、3.85 (2H, s)、2.28 (3H, s).

20

【0385】

化合物 S95

【化109】



30

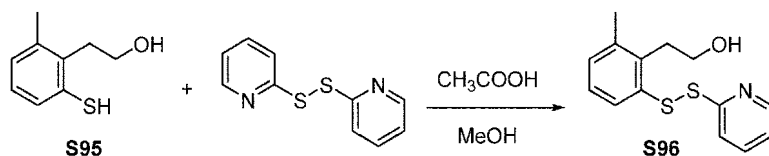
EtOH (25 mL) 中の S94 (0.69 g、4.2 mmol) の還流溶液に、 NaBH_4 (0.79 g、21 mmol) を一度に加えた。混合物をさらに15分間還流させ、次に、室温に冷ました。混合物を蒸発させたところ、白色のスラリーが得られ、それを水に溶解させた。混合物を、1 M の HCl を用いて pH 2 になるまで酸性化した。混合物をジクロロメタン (3 × 20 mL) で抽出した。組み合わされた有機層を塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウム上で乾燥させ、減圧下で濃縮したところ、残渣が得られ、それを、ISCO companion (酢酸エチル/ヘキサン = 0 ~ 40%) におけるフラッシュシリカゲルカラム精製にかけたところ、0.67 g (95%) の表題化合物 S95 が無色油として得られた。 ^1H NMR (500 MHz、 CDCl_3): δ 7.16 (1H, m)、7.00–6.96 (2H, m)、3.86 (2H, t, J 7.0 Hz)、3.44 (1H, s)、3.06 (2H, t, J 7.0 Hz)、2.35 (3H, s)

40

【0386】

化合物 S96

【化110】



MeOH (60 mL) 中のジチオジピリジン (2.64 g、12.0 mmol) および

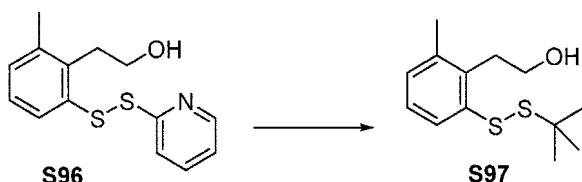
50

酢酸（0.1 mL）の溶液に、MeOH（5 mL）中のS95（0.66 g、3.94 mmol）の溶液を加えた。混合物を30分間攪拌し、蒸発させたところ、黄色の残渣が得られ、それを、ISCO companion（酢酸エチル／ヘキサン＝0～40％）におけるフラッシュシリカゲルカラム精製にかけたところ、1.09 g（100％）の表題化合物S96が無色油として得られた。¹H NMR（500 MHz、CDCl₃）：δ 8.49（1H, d, J 4.5 Hz）、7.64–7.58（2H, m）、7.50（1H, dd, J 7.0、2.5 Hz）、7.11（1H, m）、7.08–7.02（2H, m）、3.91（2H, t, J 7.0 Hz）、3.25（2H, t, J 7.0 Hz）、2.38（3H, s）

【0387】

化合物S97

【化111】

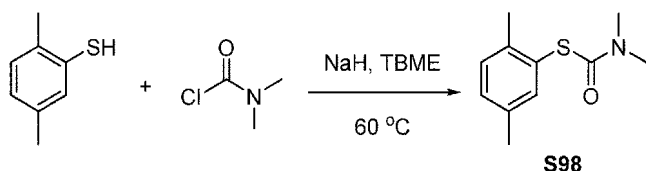


10.0 mLのジクロロメタン中の化合物S96（0.69 g、2.5 mmol）の溶液に、室温で、MeOTf（0.41 g、2.5 mmol）を加えた。反応混合物を10分間攪拌し、その時点で、tert-ブチルメルカプタン（0.34 mL、3.0 mmol）およびジイソプロピルエチルアミン（0.5 mL）を加え、攪拌を室温でさらに30分間続けた。得られた混合物を減圧下で濃縮した。ISCO companion（酢酸エチル／ヘキサン溶媒＝0～40％）におけるフラッシュシリカゲルカラム精製を用いて、粗混合物を精製したところ、化合物S97が無色油（0.45 g、70％）として得られた。¹H NMR（500 MHz）：δ 7.71（1H, d, J 8.0 Hz）、7.12（1H, t, J 8.0 Hz）、7.01（1H, d, J 8.0 Hz）、3.86（2H, t, J 7.0 Hz）、3.21（2H, t, J 7.0 Hz）、2.37（3H, s）、1.30（s, 9H）

【0388】

化合物S98

【化112】



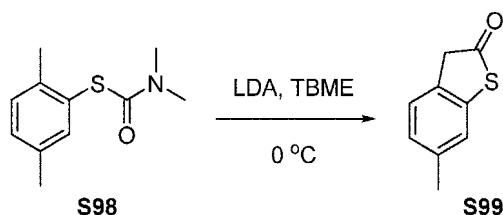
水素化ナトリウム（油中60％）（1.80 g、45.0 mmol）およびtert-ブチルメチルエーテル（15 mL）を、0℃で、アルゴン雰囲気下で丸底フラスコに加えた。混合物に、tert-ブチルメチルエーテル（15 mL）中の2,5-ジメチルベンゼンチオール（4.07 mL、30.0 mmol）の溶液を滴下して加えた後、tert-ブチルメチルエーテル（10 mL）中のジメチルカルバモイルクロリド（3.03 mL、33.0 mmol）の溶液を加えた。反応混合物を60℃に加熱し、1.5時間攪拌し、出発材料の消失を確認した。混合物を氷浴中で冷却し、1 Mの塩酸（20 mL）を用いて中和した。水層をエーテル（2×30 mL）で抽出し、有機層を組み合わせ、1 Mの水酸化ナトリウム水溶液、水、および塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウム上で乾燥させた後、ろ液を蒸発させたところ、残渣が得られ、それを、ISCO companion（酢酸エチル／ヘキサン＝5～50％）におけるフラッシュシリカゲルカラム精製にかけたところ、表題化合物S98が無色油（5.15 g、82％）として得られた。¹H NMR（500 MHz、CDCl₃）：δ 7.30（1H, s）、7.18（1H, d, J 8.0 Hz）

z)、7.11 (1H, d, J 8.0 Hz)、3.15–3.00 (6H, br s)、2.36 (3H, s)、2.30 (3H, s)

【0389】

化合物 S99

【化113】



10

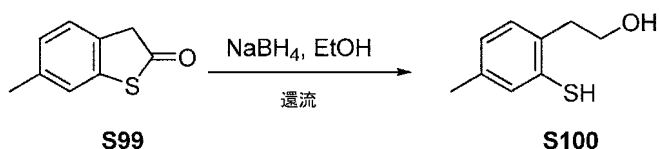
t-ブチルメチルエーテル (35 mL) 中の LDA (12.5 mL、THF 中 2 M、25 mmol) の溶液に、0 °C で、t-ブチルメチルエーテル (8 mL) 中のジメチル-チオカルバミン酸 S-(2,3-ジメチルフェニル) エステル (S98、2.09 g、10 mmol) の溶液を滴下して加え、得られた混合物を 0 °C で 30 分間攪拌した。反応混合物を、6 mL の酢酸、続いて 2 mL の 37 % の HCl 水溶液および水の添加によってクエンチし、温度をほぼ室温まで上昇させ、相を分離した。水層を酢酸エチル (2 × 50 mL) で抽出し、有機層を組み合わせて、塩水で洗浄した。有機層を硫酸マグネシウム上で乾燥させた後、ろ液を減圧下で濃縮したところ、残渣が得られ、それを、ISCO companion (酢酸エチル/ヘキサン = 5 ~ 25 %) におけるフラッシュシリカゲルカラム精製にかけたところ、表題化合物 S99 が白色の固体 (0.98 g、60 %) として得られた。¹H NMR (500 MHz、CDCl₃) : δ 7.16 (2H, s)、7.01 (1H, d, J 8.0 Hz)、3.92 (2H, s)、2.36 (3H, s)

20

【0390】

化合物 S100

【化114】



30

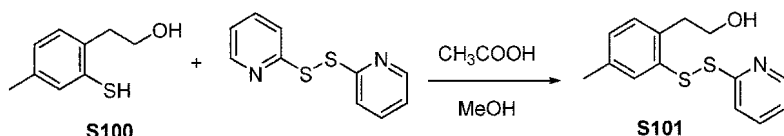
EtOH (30 mL) 中の S99 (0.98 g、6.0 mmol) の還流溶液に、NaBH₄ (1.13 g、30 mmol) を一度に加えた。混合物をさらに 15 分間還流させ、室温に冷ました。混合物を蒸発させたところ、白色のスラリーが得られ、それを水に溶解させ、1 M の HCl を用いて pH 2 になるまで酸性化した。混合物をジクロロメタン (3 × 20 mL) で抽出した。組み合わされた有機層を塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウム上で乾燥させ、減圧下で濃縮したところ、粗表題化合物 S100 が無色油として得られた。¹H NMR (500 MHz、CDCl₃) : δ 7.14 (1H, s)、7.08 (1H, d, J 8.0 Hz)、6.94 (1H, d, J 8.0 Hz)、3.88 (2H, t, J 6.5 Hz)、3.36 (1H, s)、2.94 (2H, t, J 6.5 Hz)、2.28 (3H, s)

40

【0391】

化合物 S101

【化115】



MeOH (70 mL) 中のジチオジピリジン (4.0 g、18 mmol) および酢酸 (

50

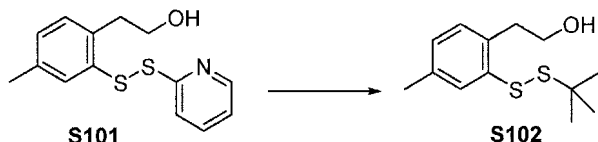
0.1 mL) の溶液に、MeOH (10 mL) 中の化合物 S100 を加えた。反応混合物を 30 分間攪拌し、蒸発させたところ、黄色の残渣が得られ、それを、ISCO companion (酢酸エチル/ヘキサン=0~40%) におけるフラッシュシリカゲルカラム精製にかけたところ、1.55 g (2 工程で 93%) の表題化合物 S101 が無色油として得られた。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 8.49 (1H, d, J 4.5 Hz)、7.65–7.61 (2H, m)、7.45 (1H, s)、7.13–7.11 (2H, m)、7.01 (1H, d, J 8.0 Hz)、3.92 (2H, t, J 6.5 Hz)、3.13 (2H, t, J 6.5 Hz)、2.25 (3H, s)

【0392】

化合物 S102

10

【化116】



10.0 mL のジクロロメタン中の化合物 S101 (0.69 g、2.5 mmol) の溶液に、室温で、MeOTf (0.41 g、2.5 mmol) を加えた。反応混合物を 10 分間攪拌し、その時点で、tert-ブチルメルカプタン (0.34 mL、3.0 mmol) および N,N-ジイソプロピルエチルアミン (0.5 mL) を加え、攪拌を室温でさらに 30 分間続けた。得られた混合物を減圧下で濃縮した。ISCO companion (酢酸エチル/ヘキサン溶媒=0~40%) におけるフラッシュシリカゲルカラム精製を用いて、粗混合物を精製したところ、化合物 S102 が無色油 (0.49 g、77%) として得られた。¹H NMR (500 MHz): δ 7.64 (1H, s)、7.06 (1H, d, J 8.0 Hz)、6.95 (1H, d, J 8.0 Hz)、3.89 (2H, t, J 7.0 Hz)、3.08 (2H, t, J 7.0 Hz)、2.36 (3H, s)、1.30 (s, 9H).

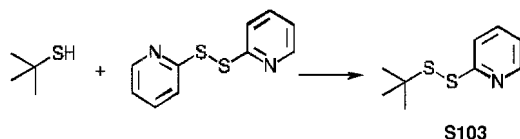
20

【0393】

化合物 S103

30

【化117】



エタノール (150 mL) 中の tert-ブチルメルカプタン (4.5 g、50 mmol) の溶液に、ジチオジピリジン (12.1 g、55.0 mmol) および酢酸 (3.5 mL) を加えた。混合物を一晩攪拌し、蒸発させたところ、残渣が得られ、次に、それを 100 mL の酢酸エチルに溶解させた。溶液を 1 N の NaOH (50 mL × 3) および塩水で洗浄した。有機層を無水 Na₂SO₄ 上で乾燥させ、ろ過し、蒸発させたところ、残渣が得られ、それを、ISCO companion (酢酸エチル/ヘキサン、5~20%) におけるフラッシュシリカゲルカラム精製にかけたところ、7.3 g (73%) の表題化合物 S103 が無色油として得られた。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 8.44 (1H, d, J 5.0 Hz)、7.75 (1H, d, J 8.0 Hz)、7.63 (1H, td, J 8.0、1.5 Hz)、7.06 (1H, m)、1.33 (9H, s)

40

【0394】

化合物 S104

【化 1 1 8】



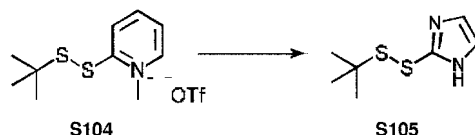
ヘキサン（30 mL）中の S 1 0 3（1.81 g、9.0 mmol）の溶液に、MeOTf（1.48 g、9.0 mmol）を加えた。混合物を15分間攪拌し、得られた沈殿物をろ過し、ヘキサン（10 mL×3）で洗浄した。単離された白色の固体を減圧下で乾燥させたところ、粗生成物 S 1 0 4 が得られ、それをさらに精製せずに次の反応に使用した。

10

【0 3 9 5】

化合物 S 1 0 5

【化 1 1 9】



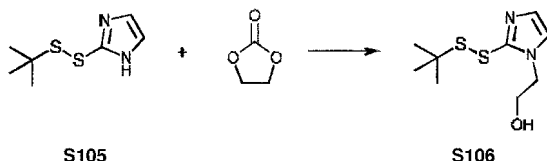
DMF（5 mL）中の S 1 0 4（9.0 mmol）の溶液に、2-メルカプトイミダゾール（0.90 g、9.0 mmol）を加えて、黄色の混合物を形成した。混合物を30分間攪拌し、その時点で、ジイソプロピルエチルアミン（1 mL）および水（4 mL）を加えた。水（20 mL）を加えると、沈殿物が形成され、それをろ過し、水、続いてヘキサンで洗浄し、減圧下で乾燥させたところ、1.13 g（2工程で67%）の S 1 0 5 が白色の固体として得られた。¹H NMR（500 MHz、CDCl₃）：δ 7.11（1H, s）、1.33（9H, s）

20

【0 3 9 6】

化合物 S 1 0 6

【化 1 2 0】



30

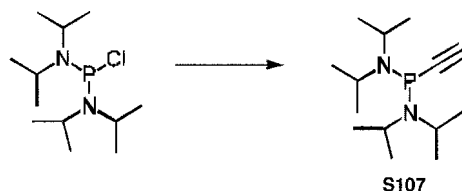
0℃で、アルゴン下でTHF（5 mL）中のNaH（0.38 g、6.0 mmol、9.4 mmol）の懸濁液に、THF（2 mL）中の S 1 0 5（0.89 g、4.7 mmol）を加えた。得られた混合物を室温に温め、1時間攪拌した。反応混合物を0℃に冷却し、THF（3 mL）中の炭酸エチレン（0.50 g、5.6 mmol）の溶液を加え、得られた混合物を室温に温め、一晩攪拌した。飽和NH₄Cl水溶液を加えて、反応物をクエンチし、得られた混合物を酢酸エチル（20 mL×3）で抽出した。組み合わされた有機層を塩水で洗浄し、無水Na₂SO₄上で乾燥させ、ろ過し、蒸発させたところ、残渣が得られ、それを、ISCO companion（酢酸エチル／ジクロロメタン、10～100%）を用いたフラッシュシリカゲルカラムによって精製したところ、0.39 g（35%）の化合物 S 1 0 6 が白色の固体として得られた。¹H NMR（500 MHz、CDCl₃）：δ 7.16（1H, d, J 1.0 Hz）、7.06（1H, d, J 1.0 Hz）、4.28（1H, t, J 5.0 Hz）、4.00（1H, t, J 5.0 Hz）、1.36（9H, s）

40

【0 3 9 7】

化合物 S 1 0 7

【化 1 2 1】

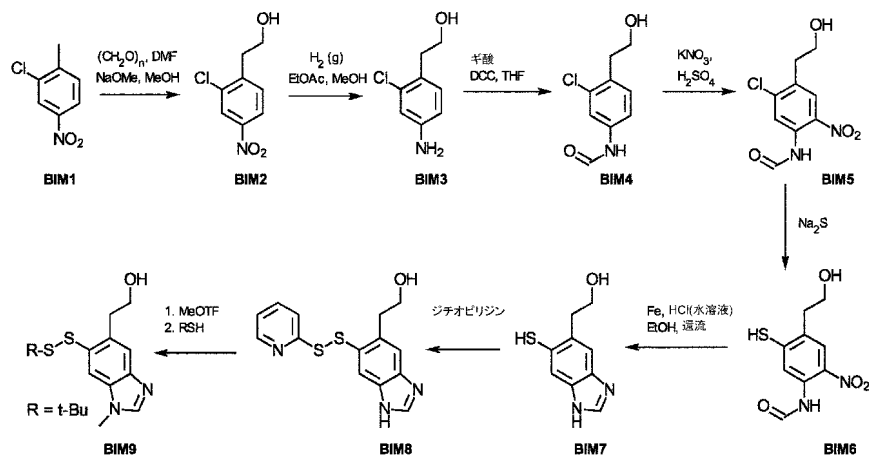


窒素下で、磁気攪拌子および隔壁を備えた、フレイムドライされた 500 mL のシュレンクフラスコに、ビス (N, N-ジイソプロピルアミノ) クロロホスフィン (2.66 g、10 mmol)、無水ジエチルエーテル (200 mL) を加え、混合物を 0 °C に冷却した。この溶液に、エチニルマグネシウムブロミド (THF 中 0.5 M、11 mmol) を、15 分間の期間にわたってシリンジを介して滴下して加え、反応混合物を 0 °C で 1 時間攪拌させた。混合物を室温に到達させ、窒素下でろ過し、溶液をロータリーエバポレータにおいて濃縮した。得られた粘性の油を無水ヘキサンで 3 回抽出し、その間に、油は固体に変化した。次に、この固体を最小体積の無水アセトニトリルに溶解させ、得られた溶液を無水ヘキサンで 2 回抽出した。ヘキサン画分を組み合わせ、減圧下で濃縮したところ、半透明の白色の油 S107 (2.3 g、90%) が得られ、それをさらに精製せずに使用した。

【0398】

ジスルフィド結合に連結されたベンズイミダゾールの調製

【化 1 2 2】



N-メチル 1-ヒドロキシエチル 2-メルカプト 4, 5-ベンズイミダゾールリンカー (BIM9) の調製:

市販の 2-クロロ-4-ニトロトルエン (BIM1) を、塩基性条件下でパラホルムアルデヒドとともにホモロゲート (homologate) させて、フェネチルアルコール (BIM2) を得ることができる。他の塩基としては、限定はされないが、NaOEt、KOtBu、DIEA、TEA、DBU、および無機塩基が挙げられる。4-ニトロ基の水素化およびホルミル化により、BIM4 が得られる。BIM4 から BIM5 へのニトロ化の後、Na₂S による処理によってチオール基を導入して、メルカプタン (BIM6) を得ることができる。加熱しながらの還元鉄触媒による 5-ニトロの還元により、同時に、2-メルカプトベンズイミダゾール (BIM7) が得られる。チオピリジン (BIM8) への転化後、MeOTf による活性化および t-ブチルメルカプタン (R = HS-tBu) による処理により、(BIM9) を得ることができる。

【0399】

ジスルフィド結合に連結された PEG 鎖の調製

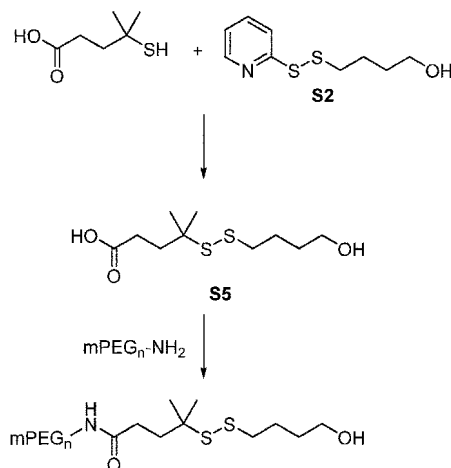
10

20

30

40

【化 1 2 3】



10

ジスルフィド PEG 側鎖の合成の一般的な手順：室温で、無水ジメチルホルムアミド（5.0 mL）中のカルボン酸 S5（1.98 mmol）および mPEG_n-NH₂（1.98 mmol）の溶液に、HATU（2.97 mmol）および N, N-ジイソプロピルエチルアミン（2.97 mmol）をこの順で連続して加え、得られた混合物を 2 時間攪拌した。TLC が反応の完了を示した。ジメチルホルムアミドを減圧下で除去し、残渣を CH₂Cl₂（10.0 mL）に溶解させた。混合物を塩水（10 mL × 2）で洗浄し、有機層を無水 Na₂SO₄ 上で乾燥させ、蒸発させたところ、粗化合物が得られた。ISCO companion（メタノール／塩化メチレン、0～10%）を用いたシリカゲルカラム精製により、化合物が高粘度のシロップとして得られた。

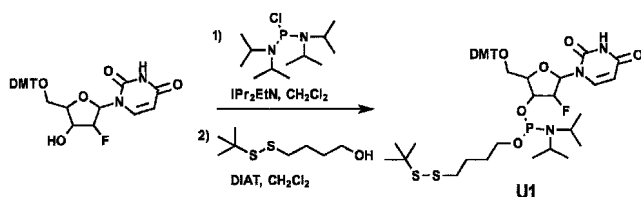
20

【0400】

ホスホラミダイトおよび他のモノマー

化合物 U1

【化 1 2 4】



30

25.0 mL の乾燥ジクロロメタン中の 5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2'-F-ウリジン（3.9 g、5.6 mmol）および N, N-ジイソプロピルエチルアミン（1.1 mL、6.16 mmol）の -78 °C に冷却した溶液に、アルゴン雰囲気下で、5.0 mL のジクロロメタン中のビス-(N, N-ジイソプロピルアミノ)-クロロホスフィン（1.64 g、6.16 mmol）の溶液を滴下して加えた。攪拌を 1 時間維持しながら、反応混合物を室温に温めた。5.0 mL の乾燥ジクロロメタン中の S8（1.0 g、5.6 mmol）の溶液を滴下して加え、10 分間攪拌してから、5.0 mL のジクロロメタン中のジイソプロピルアンモニウムテトラゾリド（DIAT）（1.0 g、5.88 mmol）の懸濁液を少しずつ加えた。反応混合物を室温で 16 時間さらに攪拌した。粗混合物を 200 mL のジクロロメタンで希釈し、飽和 NaHCO₃ 溶液（50 mL）および塩水（50 mL）で連続して洗浄し、次に、無水 Na₂SO₄ 上で乾燥させた。溶媒を減圧下で蒸発させ、酢酸エチル／ヘキサン溶媒系（Combi Flash Rf Instrument で 0～30% の勾配）を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって、粗混合物を精製したところ、2.32 g（48%）の生成物 U1（ジアステレオマー混合物）が白色の粉末として得られた。C₄₄H₅₉FN₃O₈PS₂ についての ESI MS 計算値 872.05、実測値 871.0 [M-H]⁺。31P NMR（202 MHz、CDCl₃）：δ 150.7（d, J = 7.5 Hz）、150

40

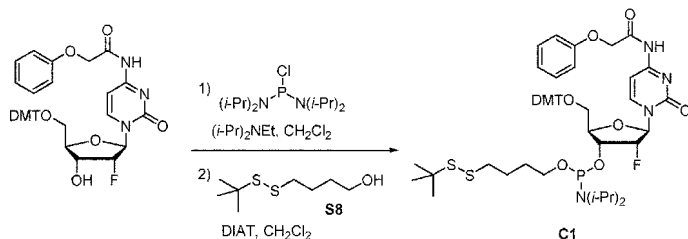
50

. 0 (d, J 9.3 Hz).

【0401】

化合物 C1

【化125】



10

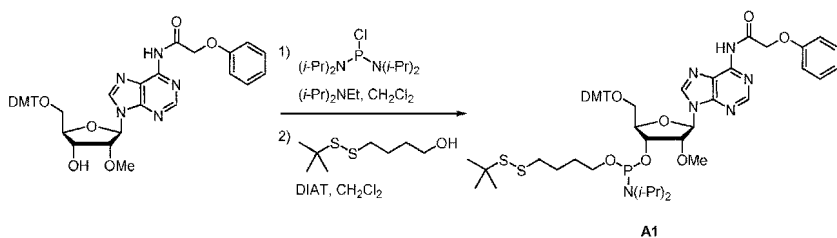
25. 0 mL の乾燥ジクロロメタン中の 5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2'-F-シチジン (n-PAC) (3.8 g、5.6 mmol) および N,N-ジイソプロピルエチルアミン (1.1 mL、6.16 mmol) の -78 °C に冷却した溶液に、アルゴン雰囲気下で、5.0 mL のジクロロメタン中のビス-(N,N-ジイソプロピルアミノ)-クロロホスフィン (1.64 g、6.16 mmol) の溶液を滴下して加えた。攪拌を維持しながら (1 時間)、反応混合物を室温に温めた。5.0 mL の乾燥ジクロロメタン中の S8 (1.0 g、5.6 mmol) の溶液を滴下して加え、10 分間攪拌してから、5.0 mL のジクロロメタン中のジイソプロピルアンモニウムテトラゾリド (1.0 g、5.88 mmol) の懸濁液を少しずつ加えた。反応混合物を室温で 16 時間さらに攪拌した。粗混合物を 200 mL のジクロロメタンで希釈し、飽和 NaHCO₃ 溶液 (50 mL) および塩水 (50 mL) で連続して洗浄し、次に、無水 Na₂SO₄ 上で乾燥させた。溶媒を減圧下で蒸発させ、酢酸エチル/ヘキサン溶媒系 (Combi Flash Rf Instrument で 0~30% の勾配) を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって、粗混合物を精製したところ、1.43 g (26%) の生成物 C1 (ジアステレオマー混合物) が白色の粉末として得られた。C₅₂H₆₆FN₄O₉PS₂ についての ESI MS 計算値 1005.2、実測値 1004.0 [M-H]⁺。³¹P NMR (202 MHz、CDCl₃) : δ 150.6 (d, J 6.5 Hz)、150.0 (d, J 5.5 Hz)。

20

【0402】

化合物 A1

【化126】



A1

40

25. 0 mL の乾燥ジクロロメタン中の 5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2'-O-メチル-アデノシン (n-PAC) (4.02 g、5.6 mmol) および N,N-ジイソプロピルエチルアミン (1.1 mL、6.16 mmol) の -78 °C に冷却した溶液に、アルゴン雰囲気下で、5.0 mL のジクロロメタン中のビス-(N,N-ジイソプロピルアミノ)-クロロホスフィン (1.64 g、6.16 mmol) の溶液を滴下して加えた。攪拌を維持しながら (1 時間)、反応混合物を室温に温めた。5.0 mL の乾燥ジクロロメタン中の S8 (1.0 g、5.6 mmol) の溶液を滴下して加え、反応混合物を 10 分間攪拌してから、5.0 mL のジクロロメタン中のジイソプロピルアンモニウムテトラゾリド (1.0 g、5.88 mmol) の懸濁液を少しずつ加えた。反応混合物を室温で 16 時間さらに攪拌した。粗混合物を 200 mL のジクロロメタンで希釈し、飽和 NaHCO₃ 溶液 (50 mL) および塩水 (50 mL) で連続して洗浄し、次に

50

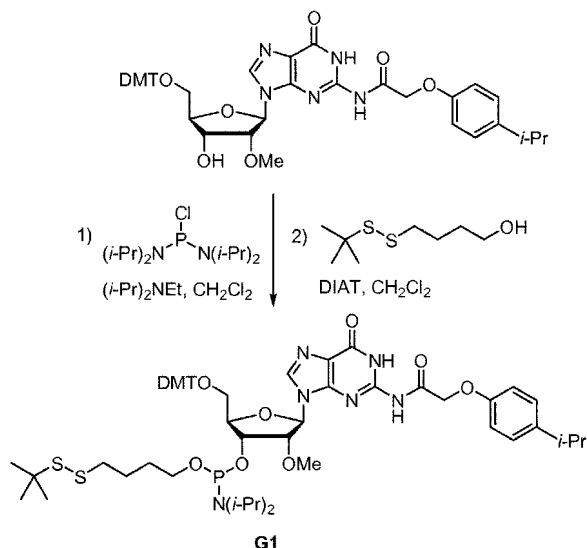
、無水 Na_2SO_4 上で乾燥させた。溶媒を減圧下で蒸発させ、酢酸エチル／ヘキサン溶媒系（Combi Flash Rf Instrumentで0～30%の勾配）を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって、粗混合物を精製したところ、1.99g（35%）の生成物A1（ジアステレオマー混合物）が白色の粉末として得られた。 $\text{C}_{54}\text{H}_{69}\text{N}_6\text{O}_9\text{PS}_2$ についてのESI MS 計算値1041.26、実測値1040.4 $[\text{M}-\text{H}]^+$ 。 ^{31}P NMR（202 MHz、 CDCl_3 ）： δ 150.4、149.5.

【0403】

化合物 G 1

【化127】

10



20

20.0 mLの乾燥ジクロロメタン中の5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2'-O-メチルグアノシン（*n*-イソプロピル-PAC）（3.2 g、4.1 mmol）およびN,N-ジイソプロピルエチルアミン（0.78 mL、4.5 mmol）の-78℃に冷却した溶液に、アルゴン雰囲気下で、5.0 mLのジクロロメタン中のビス（N,N-ジイソプロピルアミノ）クロロホスフィン（1.2 g、4.5 mmol）の溶液を滴下して加えた。攪拌を維持しながら（1時間）、反応混合物を室温に温めた。5.0 mLの乾燥ジクロロメタン中のS8（0.74 g、4.1 mmol）の溶液を滴下して加え、得られた混合物を10分間攪拌し、その時点で、5.0 mLのジクロロメタン中のジイソプロピルアンモニウムテトラゾリド（0.74 g、4.3 mmol）の懸濁液を少しずつ加えた。反応混合物を室温で16時間さらに攪拌した。粗混合物を100 mLのジクロロメタンで希釈し、飽和 NaHCO_3 溶液（25 mL）および塩水（25 mL）によって連続して洗浄し、無水 Na_2SO_4 上で乾燥させた。溶媒を減圧下で蒸発させ、酢酸エチル／ヘキサン溶媒系（Combi Flash Rf Instrumentで0～100%の勾配）を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって、粗混合物を精製したところ、0.60 g（13%）の生成物G1（ジアステレオマー混合物）が白色の粉末として得られた。 $\text{C}_{57}\text{H}_{75}\text{N}_6\text{O}_{10}\text{PS}_2$ についてのESI MS 計算値1099.34、実測値1098.2 $[\text{M}]^+$ 。 ^{31}P NMR（202 MHz、 CDCl_3 ）： δ 150.5、149.9.

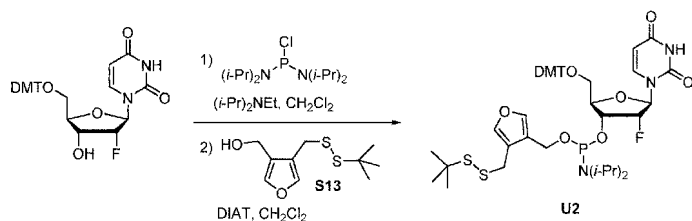
30

40

【0404】

化合物 U 2

【化 1 2 8】

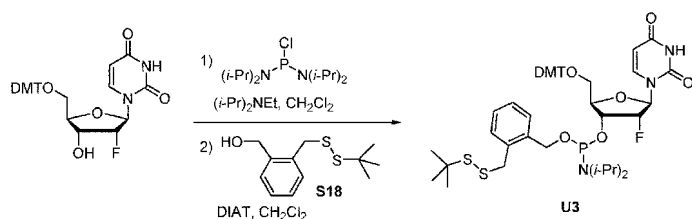


10. 0 mL の乾燥ジクロロメタン中の 5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2'-F-ウリジン (0.36 g、0.65 mmol) および N,N-ジイソプロピルエチルアミン (0.13 mL、0.72 mmol) の -78 °C に冷却した溶液に、アルゴン雰囲気下で、3.0 mL のジクロロメタン中のビス-(N,N-ジイソプロピルアミノ)クロロホスフィン (0.19 g、0.72 mmol) の溶液を滴下して加えた。攪拌を維持しながら (1 時間)、反応混合物を室温に温めた。3.0 mL の乾燥ジクロロメタン中の S13 (0.15 g、0.65 mmol) の溶液を滴下して加え、得られた混合物を 10 分間攪拌し、その時点で、3.0 mL のジクロロメタン中のジイソプロピルアンモニウムテトラゾリド (0.11 g、0.65 mmol) の懸濁液を少しずつ加えた。反応混合物を室温で 16 時間さらに攪拌した。粗混合物を 50 mL のジクロロメタンで希釈し、飽和 NaHCO₃ 溶液 (20 mL) および塩水 (20 mL) で連続して洗浄し、無水 Na₂SO₄ 上で乾燥させた。溶媒を減圧下で蒸発させ、酢酸エチル/ヘキサン溶媒系 (Combi Flash Rf Instrument で 0~50 % の勾配) を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって、粗混合物を精製したところ、0.12 g (20 %) の生成物 U2 (ジアステレオマー混合物) が白色の粉末として得られた。C₄₆H₅₇FN₃O₉PS₂ についての ESI MS 計算値 910.0、実測値 909 [M-H]⁺。³¹P NMR (202 MHz、CDCl₃) δ 151.3 (d, J 8.5 Hz)、151.2 (d, J 10.5 Hz)。

【0405】

化合物 U 3

【化 1 2 9】



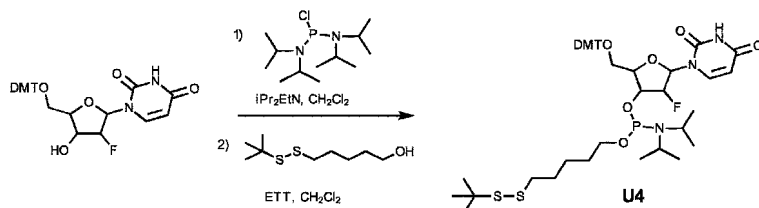
15. 0 mL の乾燥ジクロロメタン中の 5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2'-F-ウリジン (0.73 g、1.32 mmol) および N,N-ジイソプロピルエチルアミン (0.25 mL、1.45 mmol) の -78 °C に冷却した溶液に、アルゴン雰囲気下で、5.0 mL のジクロロメタン中のビス-(N,N-ジイソプロピルアミノ)クロロホスフィン (0.39 g、1.45 mmol) の溶液を滴下して加えた。攪拌を維持しながら (1 時間)、反応混合物を室温に温めた。5.0 mL の乾燥ジクロロメタン中の S18 (0.32 g、1.32 mmol) の溶液を滴下して加え、得られた混合物を 10 分間攪拌し、その時点で、アセトニトリル中のエチルチオテトラゾールの溶液 (0.25 M、3.2 mL、0.80 mmol) を少しずつ加えた。反応混合物を室温で 3 時間さらに攪拌した。粗混合物を 100 mL のジクロロメタンで希釈し、飽和 NaHCO₃ 溶液 (40 mL) および塩水 (40 mL) で連続して洗浄し、無水 Na₂SO₄ 上で乾燥させた。溶媒を減圧下で蒸発させ、酢酸エチル/ヘキサン溶媒系 (Combi Flash Rf Instrument で 0~50 % の勾配) を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって、粗混合物を精製したところ、0.17 g (20 %) の生成物 U3 (

ジアステレオマー混合物) が白色の粉末として得られた。C₄₈H₅₉FN₃O₈PS₂ についての ESI MS 計算値 920.0、実測値 943.0 [M+Na]⁺。 ³¹P NMR (202 MHz、CDCl₃) : δ 156.3 (d, J 7.3 Hz)、155.6 (d, J 11.3 Hz)。

【0406】

化合物 U4

【化130】



10

20.0 mL の乾燥ジクロロメタン中の 5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2'-F-ウリジン (1.77 g、3.2 mmol) および N,N-ジイソプロピルエチルアミン (0.62 mL、3.54 mmol) の -78 °C に冷却した溶液に、アルゴン雰囲気下で、5.0 mL のジクロロメタン中のビス-(N,N-ジイソプロピルアミノ)-クロロホスフィン (0.94 g、3.54 mmol) の溶液を滴下して加えた。攪拌を維持しながら (1 時間)、反応混合物を室温に温めた。5.0 mL の乾燥ジクロロメタン中の S20 (0.67 g、3.22 mmol) の溶液を滴下して加え、得られた混合物を 10 分間攪拌し、その時点で、アセトニトリル中のエチルチオテトラゾールの溶液 (0.25 M、7.7 mL、1.93 mmol) を少しずつ加えた。反応混合物を室温で 3 時間さらに攪拌した。粗混合物を 100 mL のジクロロメタンで希釈し、飽和 NaHCO₃ 溶液 (30 mL) および塩水 (30 mL) で連続して洗浄し、無水 Na₂SO₄ 上で乾燥させた。溶媒を減圧下で蒸発させ、酢酸エチル/ヘキサン溶媒系 (Combi Flash

20

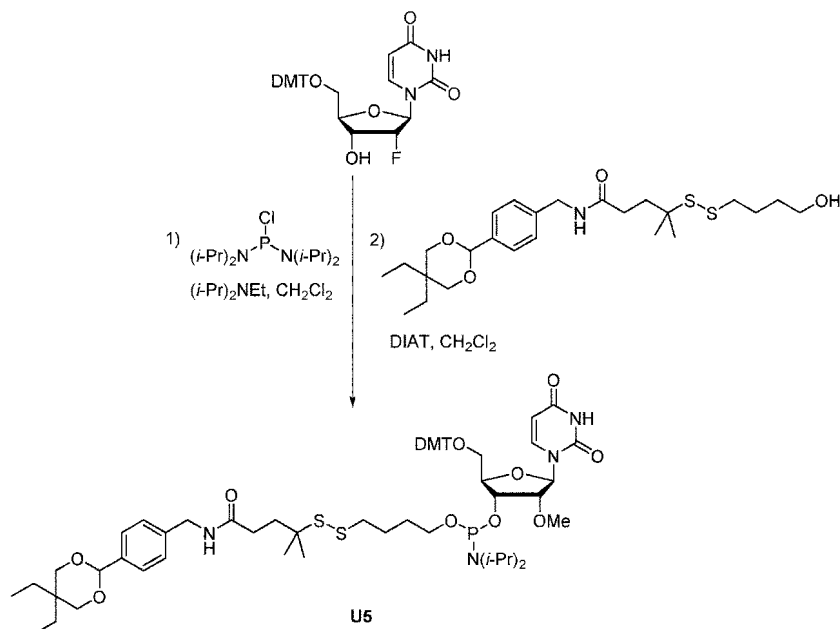
Rf Instrument で 0~30% の勾配) を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって、粗混合物を精製したところ、1.48 g (52%) の生成物 U4 (ジアステレオマー混合物) が白色の粉末として得られた。C₄₅H₆₁FN₃O₈PS₂ についての ESI MS 計算値 886.08、実測値 884.8 [M-H]⁺。 ³¹P NMR (202 MHz、CDCl₃) δ 150.6 (d, J 6.8 Hz)、149.9 (d, J 9.1 Hz)。

30

【0407】

化合物 U5

【化 1 3 1】



10

10. 0 mL の乾燥ジクロロメタン中の 5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2'-F-ウリジン (0.66 g、1.2 mmol) および N,N-ジイソプロピルエチルアミン (0.23 mL、1.32 mmol) の -78 °C に冷却した溶液に、アルゴン雰囲気下で、3.0 mL のジクロロメタン中のビス-(N,N-ジイソプロピルアミノ)-クロロホスフィン (0.35 g、1.32 mmol) の溶液を滴下して加えた。攪拌を維持しながら (1 時間)、反応混合物を室温に温めた。3.0 mL の乾燥ジクロロメタン中の S23 (0.58 g、1.2 mmol) の溶液を滴下して加え、得られた混合物を 10 分間攪拌し、その時点で、アセトニトリル中のエチルチオテトラゾールの溶液 (0.25 M、2.9 mL、0.72 mmol) を少しずつ加えた。反応混合物を室温で 3 時間さらに攪拌した。粗混合物を 50 mL のジクロロメタンで希釈し、飽和 NaHCO₃ 溶液 (20 mL) および塩水 (20 mL) によって連続して洗浄し、無水 Na₂SO₄ 上で乾燥させた。溶媒を減圧下で蒸発させ、酢酸エチル/ヘキサン溶媒系 (Combi Flash Rf Instrument で 0~40 % の勾配) を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって、粗混合物を精製したところ、0.35 g (27 %) の生成物 U5 (ジアステレオマー混合物) が白色の粉末として得られた。C₆₁H₈₂FN₄O₁₁P₂S₂ についての ESI-MS 計算値 1161.42、実測値 1162 [M+H]⁺。 ³¹P-NMR (202 MHz、CDCl₃) δ 154.87 (d, J = 7.3 Hz)、154.53 (d, J = 9.0 Hz)。

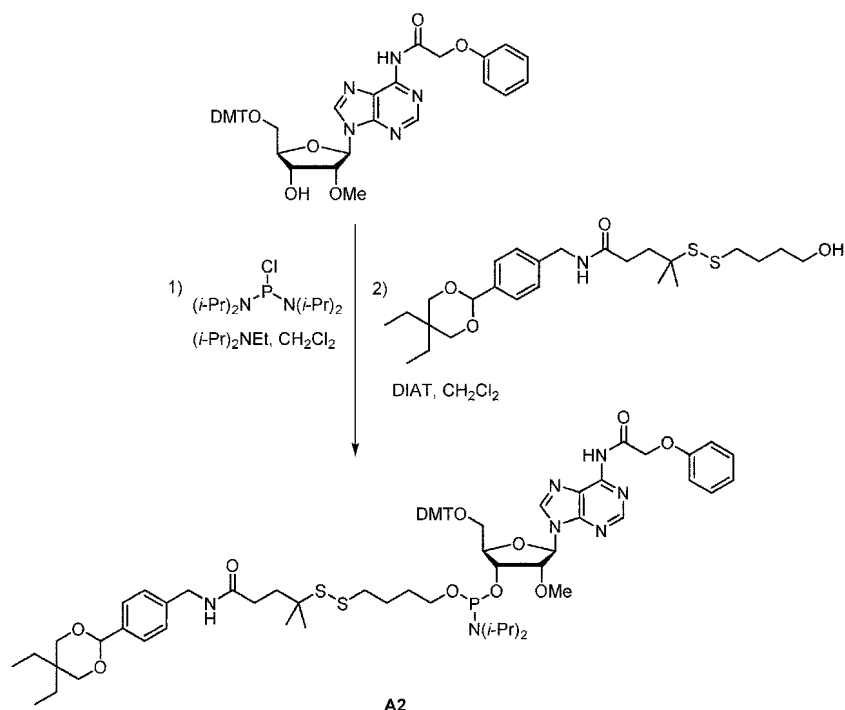
20

30

【0408】

化合物 A2

【化 1 3 2】



10

20

30

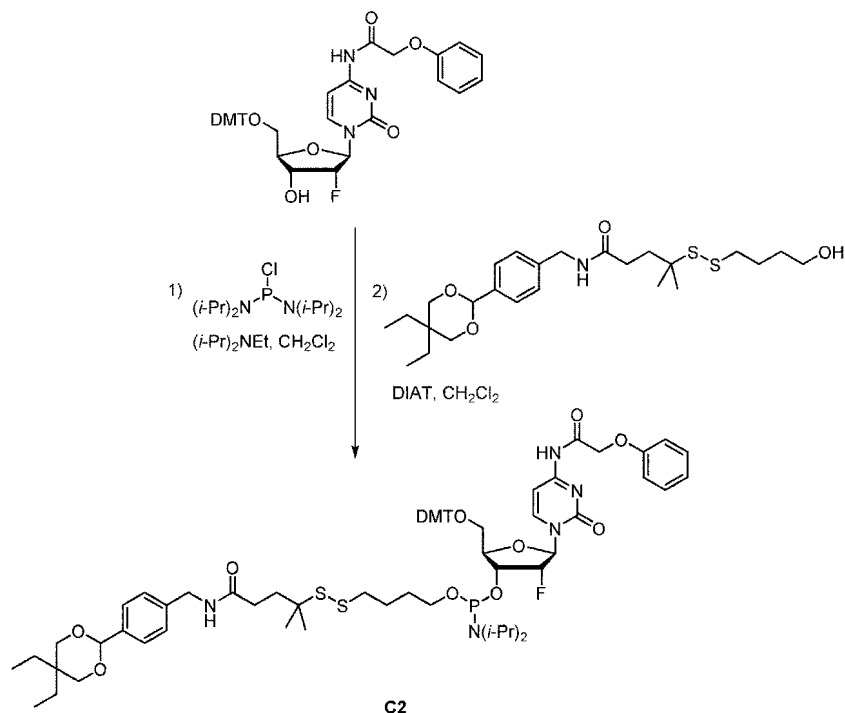
15. 0 mL の乾燥ジクロロメタン中の 5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2'-O-メチルアデノシン (n-PAC) (1.48 g、2.1 mmol) および N,N-ジイソプロピルエチルアミン (0.4 mL、2.28 mmol) の -78 °C に冷却した溶液に、アルゴン雰囲気下で、5.0 mL のジクロロメタン中のビス-(N,N-ジイソプロピルアミノ)クロロホスフィン (0.61 g、2.28 mmol) の溶液を滴下して加えた。攪拌を維持しながら (1 時間)、反応混合物を室温に温めた。5.0 mL の乾燥ジクロロメタン中の S23 (1.0 g、2.1 mmol) の溶液を滴下して加え、得られた混合物を 10 分間攪拌し、その時点で、5.0 mL のジクロロメタン中のジイソプロピルアンモニウムテトラゾリド (0.35 g、2.1 mmol) の懸濁液を少しずつ加えた。反応混合物を室温で 16 時間さらに攪拌した。粗混合物を 75.0 mL のジクロロメタンで希釈し、飽和 NaHCO₃ 溶液 (25 mL) および塩水 (25 mL) によって連続して洗浄し、無水 Na₂SO₄ 上で乾燥させた。溶媒を減圧下で蒸発させ、酢酸エチル/ヘキサン溶媒系 (Combi Flash Rf Instrument で 0~60 % の勾配) を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって、粗混合物を精製したところ、1.01 g (37 %) の生成物 A2 (ジアステレオマー混合物) が白色の粉末として得られた。C₇₁H₉₂N₇O₁₂PS₂ についての ESI MS 計算値 1330.63、実測値 1331.3 [M+H]⁺。 ³¹P NMR (202 MHz、CDCl₃) δ 154.93 & 154.29.

【0409】

化合物 C2

40

【化 1 3 3】



10

20

30

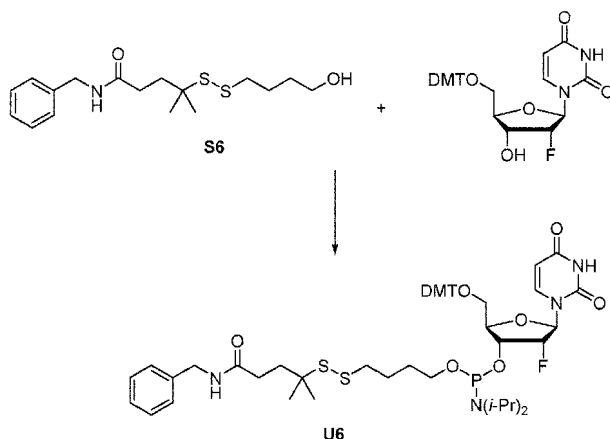
15. 0 mL の乾燥ジクロロメタン中の 5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2'-F-シチジン (n-PAC) (1.4 g、2.1 mmol) および N,N-ジイソプロピルエチルアミン (0.4 mL、2.28 mmol) の -78 °C に冷却した溶液に、アルゴン雰囲気下で、5.0 mL のジクロロメタン中のビス-(N,N-ジイソプロピルアミノ)-クロロホスフィン (0.61 g、2.28 mmol) の溶液を滴下して加えた。攪拌を維持しながら (1 時間)、反応混合物を室温に温めた。5.0 mL の乾燥ジクロロメタン中の S23 (1.0 g、2.1 mmol) の溶液を滴下して加え、得られた混合物を 10 分間攪拌し、その時点で、5.0 mL のジクロロメタン中のジイソプロピルアンモニウムテトラゾリド (0.35 g、2.1 mmol) の懸濁液を少しずつ加えた。反応混合物を室温で 16 時間さらに攪拌した。粗混合物を 75 mL のジクロロメタンで希釈し、飽和 NaHCO₃ 溶液 (25 mL) および塩水 (25 mL) によって連続して洗浄し、無水 Na₂SO₄ 上で乾燥させた。溶媒を減圧下で蒸発させ、酢酸エチル/ヘキサン溶媒系 (Combi Flash Rf Instrument で 0~50% の勾配) を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって、粗混合物を精製したところ、0.75 g (29%) の生成物 C2 (ジアステレオマー混合物) が白色の粉末として得られた。C₆₉H₈₉FN₅O₁₂PS₂ についての ESI MS 計算値 1294.57、実測値 1295.2 [M+H]⁺。 ³¹P NMR (202 MHz、CDCl₃) δ 154.77 (d, J = 5.6 Hz)、154.69 (d, J = 7.7 Hz)。

【0410】

化合物 U 6

40

【化 1 3 4】



10

20

30

40

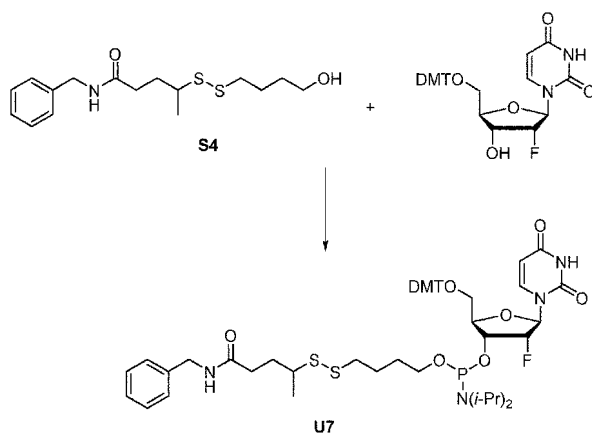
50

乾燥 CH_2Cl_2 (1.0 mL) 中のビス- (N, N-ジイソプロピルアミノ) クロロホスフィン (0.28 g、1.05 mmol) の溶液を、 -78°C で、乾燥 CH_2Cl_2 (5 mL) 中の 5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2'-F-ウリジン (0.55 g、1.0 mmol) および N, N-ジイソプロピルエチルアミン (0.18 mL、1.05 mmol) の溶液に滴下して加えた。反応混合物を室温に温め、1.5 時間攪拌した。1.0 mL の乾燥 CH_2Cl_2 中の S6 (0.34 g、1.0 mmol) の溶液を加え、得られた混合物を 10 分間攪拌した。次に、8.0 mL の乾燥 CH_2Cl_2 中のジイソプロピルアンモニウムテトラゾリド (0.17 g、1.0 mmol) の溶液を反応混合物に少しずつ加え、得られた混合物を一晩攪拌した。次に、混合物を CH_2Cl_2 (20 mL) で希釈し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (20 mL) および塩水 (20 mL) で洗浄した。混合物を無水硫酸ナトリウム上で乾燥させた。揮発性物質を減圧下で蒸発させたところ、残渣が得られ、それを、ISCO companion (5% のメタノールを含む酢酸エチル) / ヘキサン = 20% ~ 55% におけるフラッシュシリカゲルカラム精製にかけたところ、0.50 g (49%) の化合物 U6 が無色の発泡体として得られた。 $\text{C}_{53}\text{H}_{68}\text{FN}_4\text{O}_9\text{PS}_2$ についての ESI MS 計算値 1018.4、実測値 1018.1 (M^+)。 ^3P NMR (202 MHz、 CDCl_3) : δ 150.15 (d, J 6.9 Hz)、149.65 (d, J 8.7 Hz)。

【0 4 1 1】

化合物 U 7

【化 1 3 5】



乾燥 CH_2Cl_2 (1.0 mL) 中のビス- (N, N-ジイソプロピルアミノ) -クロロホスフィン (0.28 g、1.05 mmol) の溶液を、 -78°C で、乾燥 CH_2Cl_2 (5.0 mL) 中の 5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2'-F-ウリジン (0.55 g、1.0 mmol) および N, N-ジイソプロピルエチルアミン (0.1

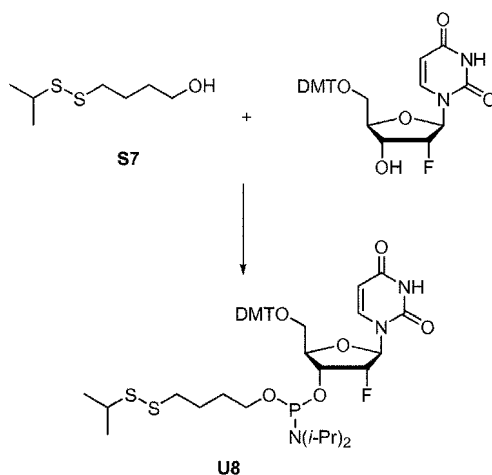
8 mL、1.05 mmol) の溶液に滴下して加えた。反応混合物を室温に温め、1.5 時間攪拌した。1.0 mL の乾燥 CH_2Cl_2 中の S4 (0.33 g、1.0 mmol) の溶液を加え、得られた混合物を 10 分間攪拌した。次に、8.0 mL の乾燥 CH_2Cl_2 中のジイソプロピルアンモニウムテトラゾリド (0.18 g、1.05 mmol) の溶液を反応混合物に少しずつ加え、得られた混合物を一晩攪拌した。混合物を CH_2Cl_2 (20 mL) で希釈し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (20 mL) および塩水 (20 mL) で洗浄した。混合物を無水硫酸ナトリウム上で乾燥させ、揮発性物質を減圧下で除去したところ、残渣が得られ、それを、ISCO companion (5% のメタノールを含む酢酸エチル) / ヘキサン = 20% ~ 55%) におけるフラッシュシリカゲルカラム精製にかけたところ、0.15 g (15% の収率) の化合物 U7 が無色の発泡体として得られた。C₅₂H₆₆FN₄O₉PS₂ についての ESI MS 計算値 1004.4、実測値 1004.0 (M⁺)。³¹P NMR (202 MHz、CDCl₃) : δ 50.16 (d, J 7.9 Hz)、149.65 (d, J 10.7 Hz)。

10

【0412】

化合物 U8

【化136】



20

乾燥 CH_2Cl_2 (1.0 mL) 中のビス-(N, N-ジイソプロピルアミノ)-クロロホスフィン (0.28 g、1.05 mmol) の溶液を、-78 °C で、乾燥 CH_2Cl_2 (5.0 mL) 中の 5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2'-F-ウリジン (0.55 g、1.0 mmol) および N, N-ジイソプロピルエチルアミン (0.18 mL、1.05 mmol) の溶液に滴下して加えた。反応混合物を室温に温め、1.5 時間攪拌した。1.0 mL の乾燥 CH_2Cl_2 中の S7 (0.18 g、1.0 mmol) の溶液を加え、得られた混合物を 10 分間攪拌した。次に、8.0 mL の乾燥 CH_2Cl_2 中のジイソプロピルアンモニウムテトラゾリド (0.18 g、1.05 mmol) の溶液を反応混合物に少しずつ加え、得られた混合物を一晩攪拌した。混合物を CH_2Cl_2 (20 mL) で希釈し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (20 mL) および塩水 (20 mL) で洗浄した。混合物を無水硫酸ナトリウム上で乾燥させ、減圧下で濃縮したところ、残渣が得られ、それを、ISCO companion (5% のメタノールを含む酢酸エチル) / ヘキサン = 10% ~ 55%) におけるフラッシュシリカゲルカラム精製にかけたところ、0.30 g (35%) の表題化合物 U8 が無色の発泡体として得られた。C₄₃H₅₇FN₃O₈PS₂ についての ESI MS 計算値 857.3、実測値 856.9 (M⁺)。³¹P NMR (202 MHz、CDCl₃) : δ 150.76 (d, J 7.7 Hz)、150.03 (d, J 9.3 Hz)。

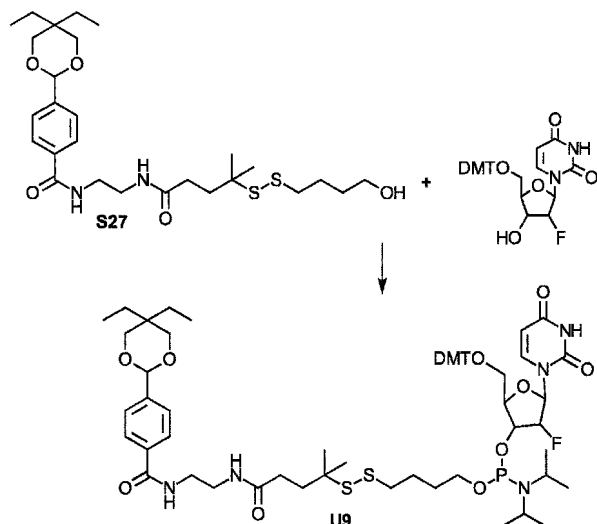
30

40

【0413】

化合物 U9

【化 1 3 7】



10

20

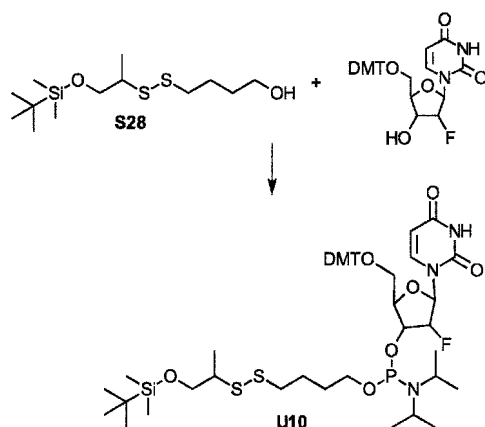
30

乾燥 CH_2Cl_2 (1.0 mL) 中のビス- (N, N-ジイソプロピルアミノ) -クロロホスフィン (0.28 g、1.05 mmol) の溶液を、 -78°C で、乾燥 CH_2Cl_2 (5.0 mL) 中の 5'-O-(4, 4'-ジメトキシトリチル)-2'-F-ウリジン (0.55 g、1.0 mmol) および N, N-ジイソプロピルエチルアミン (0.18 mL、1.05 mmol) の溶液に滴下して加えた。反応混合物を室温に温め、1.5 時間攪拌した。20.0 mL の乾燥 CH_2Cl_2 中の S27 (0.54 g、1.0 mmol) の溶液を加え、得られた混合物を 10 分間攪拌した。次に、8.0 mL の乾燥 CH_2Cl_2 中のジイソプロピルアンモニウムテトラゾリド (0.18 g、1.05 mmol) の溶液を反応混合物に少しずつ加え、得られた混合物を一晩攪拌した。反応混合物を CH_2Cl_2 (20 mL) で希釈し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (20 mL) および塩水 (20 mL) で洗浄した。混合物を無水硫酸ナトリウム上で乾燥させ、ろ液を減圧下で蒸発させたところ、残渣が得られ、それを、ISCO companion 機器 (アセトニトリル/ジクロロメタン = 30% ~ 90%) におけるフラッシュシリカゲルカラム精製にかけたところ、0.68 g (56%) の表題化合物 U9 が無色の発泡体として得られた。 $\text{C}_{63}\text{H}_{85}\text{FN}_5\text{O}_{12}\text{PS}_2$ についての ESI MS 計算値 1217.5、実測値 1217.2 (M^+)。 ^{31}P NMR (202 MHz、 CDCl_3) : δ 150.18 (d, J 5.7 Hz)、148.40 (d, J 11.1 Hz)。

【0414】

化合物 U10

【化 1 3 8】



40

50

乾燥 CH_2Cl_2 (1.0 mL) 中のビス- (N, N-ジイソプロピルアミノ) -クロロホスフィン (0.16 g、0.61 mmol) の溶液を、 -78°C で、乾燥 CH_2Cl_2

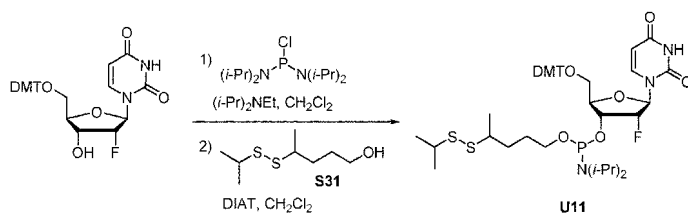
$_2$ (5 mL) 中の 5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2'-F-ウリジン (0.32 g、0.58 mmol) および N,N-ジイソプロピルエチルアミン (0.11 mL、0.61 mmol) の溶液に滴下して加えた。反応混合物を室温に温め、1.5 時間攪拌した。1.0 mL の乾燥 CH_2Cl_2 中の S28 (0.18 g、0.58 mmol) の溶液を加え、得られた混合物を 10 分間攪拌した。次に、8.0 mL の乾燥 CH_2Cl_2 中のジイソプロピルアンモニウムテトラゾリド (0.10 g、0.61 mmol) の溶液を反応混合物に少しずつ加え、得られた混合物を一晩攪拌した。反応混合物を CH_2Cl_2 (20 mL) で希釈し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (20 mL) および塩水 (20 mL) で洗浄した。混合物を無水硫酸ナトリウム上で乾燥させ、揮発性物質を減圧下で蒸発させたところ、残渣が得られ、それを、ISCO companion 機器 (5% のメタノールを含む酢酸エチル) / ヘキサン = 10% ~ 55%) におけるフラッシュシリカゲルカラム精製にかけたところ、0.15 g (26%) の表題化合物 U10 が無色の発泡体として得られた。C₄₉H₇₁FN₃O₉PS₂Si についての ESI MS 計算値 987.4、実測値 987.0 (M⁺)。³¹P NMR (202 MHz、CDCl₃): δ 150.88 (s)、150.08 (d, J 9.3 Hz)。

10

【0415】

化合物 U11

【化139】



20

乾燥 CH_2Cl_2 (1.0 mL) 中のビス-(N,N-ジイソプロピルアミノ)-クロロホスフィン (0.28 g、1.05 mmol) の溶液を、-78 °C で、乾燥 CH_2Cl_2 (5.0 mL) 中の 5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2'-F-ウリジン (0.55 g、1.0 mmol) および N,N-ジイソプロピルエチルアミン (0.18 mL、1.05 mmol) の溶液に滴下して加えた。反応混合物を室温に温め、1.5 時間攪拌した。1.0 mL の乾燥 CH_2Cl_2 中の S31 (0.18 g、1.0 mmol) の溶液を加え、得られた混合物を 10 分間攪拌した。次に、8.0 mL の乾燥 CH_2Cl_2 中のジイソプロピルアンモニウムテトラゾリド (0.18 g、1.05 mmol) の溶液を反応混合物に少しずつ加え、得られた混合物を一晩攪拌した。反応混合物を CH_2Cl_2 (20 mL) で希釈し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (20 mL) および塩水 (20 mL) で洗浄した。混合物を無水硫酸ナトリウム上で乾燥させ、減圧下で濃縮したところ、残渣が得られ、それを、ISCO companion (5% のメタノールを含む酢酸エチル) / ヘキサン = 10% ~ 55%) におけるフラッシュシリカゲルカラム精製にかけたところ、0.38 g (44%) の表題化合物 U11 が無色の発泡体として得られた。C₄₄H₅₉FN₃O₈PS₂ についての ESI MS 計算値 871.3、実測値 870.8 (M⁺)。³¹P NMR (202 MHz、CDCl₃): δ 150.84 (d, J 7.6 Hz)、150.73 (d, J 7.6 Hz)、150.06 (d, J 9.1 Hz)、150.02 (d, J 9.1 Hz)。

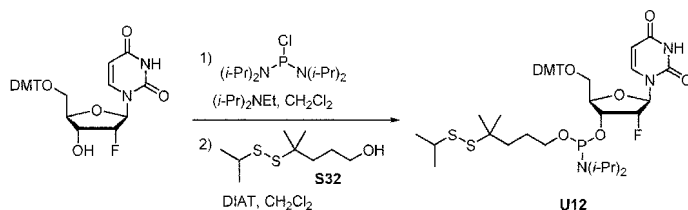
30

40

【0416】

化合物 U12

【化 1 4 0】

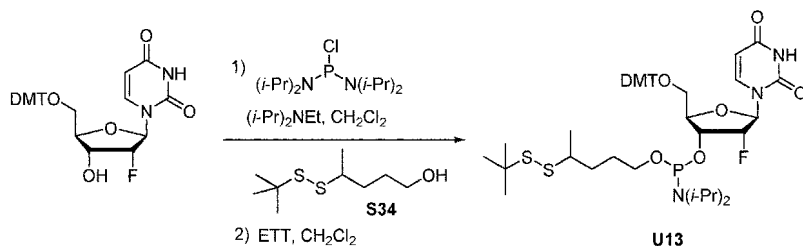


乾燥 CH_2Cl_2 (1.0 mL) 中のビスー (N, N-ジイソプロピルアミノ) - クロ
ロホスフィン (0.28 g、1.05 mmol) の溶液を、 -78°C で、乾燥 CH_2Cl_2
(5.0 mL) 中の S32 (0.18 g、1.0 mmol) および N, N-ジイソプロ
ピルエチルアミン (0.18 mL、1.05 mmol) の溶液に滴下して加えた。反応混
合物を室温に温め、1.5 時間攪拌した。1.0 mL の乾燥 CH_2Cl_2 中の 5'-O-
(4, 4'-ジメトキシトリチル) - 2'-F-ウリジン (0.55 g、1.0 mmol)
の溶液を加え、得られた混合物を 10 分間攪拌した。次に、2-エチルチオテトラゾールの溶液 (2.4 mL、アセトニトリル中 0.25 M、0.6 mmol) を反応混合物に
少しずつ加え、得られた混合物を一晩攪拌した。反応混合物を CH_2Cl_2 (20 mL)
で希釈し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (20 mL) および塩水 (20 mL) で洗浄し
た。混合物を無水硫酸ナトリウム上で乾燥させ、ろ液を減圧下で蒸発させたところ、残渣
が得られ、それを、ISCO companion (酢酸エチル/ヘキサン = 10% ~ 5
5%) におけるフラッシュシリカゲルカラム精製にかけたところ、0.47 g (53%)
の表題化合物 U12 が無色の発泡体として得られた。 $\text{C}_{45}\text{H}_{61}\text{FN}_3\text{O}_8\text{PS}_2$ につ
いての ESI MS 計算値 885.4、実測値 884.7 (M-1)。 ^3P NMR
(202 MHz、 CDCl_3) : δ 150.88 (d, J 7.7 Hz)、150.03
(d, J 9.5 Hz)。

【0 4 1 7】

化合物 U 1 3

【化 1 4 1】



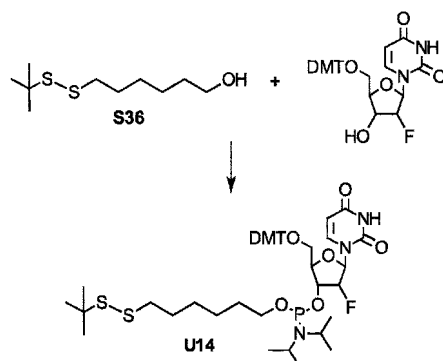
乾燥 CH_2Cl_2 (1.0 mL) 中のビスー (N, N-ジイソプロピルアミノ) - クロ
ロホスフィン (0.26 g、0.97 mmol) の溶液を、 -78°C で、乾燥 CH_2Cl_2
(5.0 mL) 中の S34 (0.19 g、0.92 mmol) および N, N-ジイソプロ
ピルエチルアミン (0.17 mL、0.97 mmol) の溶液に滴下して加えた。反応
混合物を室温に温め、1.5 時間攪拌した。1.0 mL の乾燥 CH_2Cl_2 中の 5'-O-
(4, 4'-ジメトキシトリチル) - 2'-F-ウリジン (0.50 g、0.92 mmol)
の溶液を加え、得られた混合物を 10 分間攪拌した。次に、2-エチルチオテトラゾールの溶液 (ETT) (2.6 mL、アセトニトリル中 0.25 M、0.65 mmol)
を反応混合物に少しずつ加え、得られた混合物を一晩攪拌した。混合物を CH_2Cl_2
(20 mL) で希釈し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (20 mL) および塩水 (20 mL)
で洗浄した。混合物を無水硫酸ナトリウム上で乾燥させ、ろ液を減圧下で蒸発させた
ところ、残渣が得られ、それを、ISCO companion (酢酸エチル/ヘキサン
= 10% ~ 55%) におけるフラッシュシリカゲルカラム精製にかけたところ、0.29
g (36%) の表題化合物 U13 が無色の発泡体として得られた。 $\text{C}_{45}\text{H}_{61}\text{FN}_3\text{O}_8\text{PS}_2$ につ
いての ESI MS 計算値 885.4、実測値 885.2 (M⁺)。 ^3P NMR
(202 MHz、 CDCl_3) : δ 150.91 (d, J 7.7 Hz)、1

50.76 (d, J 7.7 Hz)、150.07 (d, J 9.1 Hz)、150.02 (d, J 9.5 Hz)。

【0418】

化合物U14

【化142】



10

乾燥 CH_2Cl_2 (1.0 mL) 中のビス-(N, N-ジイソプロピルアミノ)-クロロホスフィン (0.28 g、1.05 mmol) の溶液を、 -78°C で、乾燥 CH_2Cl_2 (5.0 mL) 中の 5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2'-F-ウリジン (0.55 g、1.0 mmol) および N, N-ジイソプロピルエチルアミン (0.18 mL、1.05 mmol) の溶液に滴下して加えた。反応混合物を室温に温め、1.5 時間攪拌した。1.0 mL の乾燥 CH_2Cl_2 中の S36 (0.22 g、1.0 mmol) の溶液を加え、得られた混合物を 10 分間攪拌した。次に、8.0 mL の乾燥 CH_2Cl_2 中のジイソプロピルアンモニウムテトラゾリド (0.18 g、1.05 mmol) の溶液を反応混合物に少しずつ加え、得られた混合物を一晩攪拌した。反応混合物を CH_2Cl_2 (20 mL) で希釈し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (20 mL) および塩水 (20 mL) で洗浄した。混合物を無水硫酸ナトリウム上で乾燥させ、ろ液を減圧下で濃縮したところ、残渣が得られ、それを、ISCO companion (5% のメタノールを含む酢酸エチル) / ヘキサン = 10% ~ 55% におけるフラッシュシリカゲルカラム精製にかけたところ、0.37 g (41%) の表題化合物 U14 が無色の発泡体として得られた。 $\text{C}_{46}\text{H}_{63}\text{FN}_3\text{O}_8\text{PS}_2$ についての ESI MS 計算値 899.4、実測値 900.7 (M+1)。 ^{31}P NMR (202 MHz、 CDCl_3) : δ 155.32 (d, J 7.7 Hz)、154.72 (d, J 9.3 Hz)。

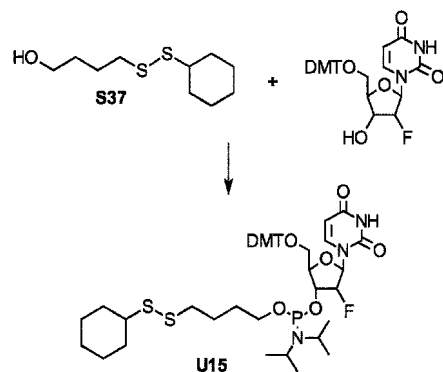
20

30

【0419】

化合物U15

【化143】



40

乾燥 CH_2Cl_2 (1.0 mL) 中のビス-(N, N-ジイソプロピルアミノ)-クロロホスフィン (0.28 g、1.05 mmol) の溶液を、 -78°C で、乾燥 CH_2Cl_2 (5.0 mL) 中の 5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2'-F-ウリジン (0.55 g、1.0 mmol) および N, N-ジイソプロピルエチルアミン (0.18 mL、1.05 mmol) の溶液に滴下して加えた。反応混合物を室温に温め、1.5

50

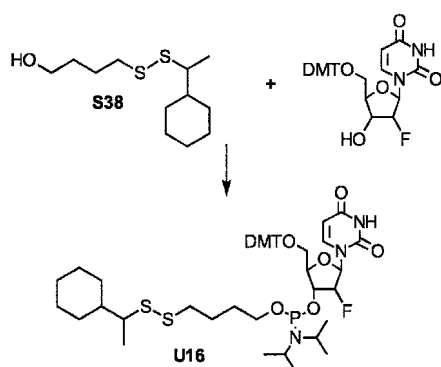
時間攪拌した。1.0 mLの乾燥 CH_2Cl_2 中のS37 (0.22 g、1.0 mmol)の溶液を加え、得られた混合物を10分間攪拌した。次に、8.0 mLの乾燥 CH_2Cl_2 中のジイソプロピルアンモニウムテトラゾリド (0.18 g、1.05 mmol)の溶液を反応混合物に少しずつ加え、得られた混合物を一晩攪拌した。反応混合物を CH_2Cl_2 (20 mL)で希釈し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (20 mL) および塩水 (20 mL)で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウム上で乾燥させ、ろ液を減圧下で濃縮したところ、残渣が得られ、それを、ISCO companion (5%のメタノールを含む酢酸エチル) /ヘキサン=10%~55%)におけるフラッシュシリカゲルカラム精製にかけたところ、0.34 g (38%)の表題化合物U15が無色の発泡体として得られた。 $\text{C}_{46}\text{H}_{61}\text{FN}_3\text{O}_8\text{PS}_2$ についてのESI MS 計算値897.4、実測値896.7 (M-1)。 ^3P NMR (202 MHz、 CDCl_3) : δ 150.73 (d, J 7.7 Hz)、150.01 (d, J 9.5 Hz)。

10

【0420】

化合物U16

【化144】



20

乾燥 CH_2Cl_2 (1.0 mL)中のビス-(N,N-ジイソプロピルアミノ)-クロロホスフィン (0.28 g、1.05 mmol)の溶液を、 -78°C で、乾燥 CH_2Cl_2 (5.0 mL)中の5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2'-F-ウリジン (0.55 g、1.0 mmol) およびN,N-ジイソプロピルエチルアミン (0.18 mL、1.05 mmol)の溶液に滴下して加えた。反応混合物を室温に温め、1.5時間攪拌した。1.0 mLの乾燥 CH_2Cl_2 中のS38 (0.25 g、1.0 mmol)の溶液を加え、10分間攪拌した。次に、8.0 mLの乾燥 CH_2Cl_2 中のジイソプロピルアンモニウムテトラゾリド (0.18 g、1.05 mmol)の溶液を反応混合物に少しずつ加え、得られた混合物を一晩攪拌した。混合物を CH_2Cl_2 (20 mL)で希釈し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (20 mL) および塩水 (20 mL)で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウム上で乾燥させ、ろ液を減圧下で濃縮したところ、残渣が得られ、それを、ISCO companion (5%のメタノールを含む酢酸エチル/ヘキサン=10%~55%)におけるフラッシュシリカゲルカラム精製にかけたところ、0.38 g (41%)の表題化合物U16が無色の発泡体として得られた。 $\text{C}_{48}\text{H}_{65}\text{FN}_3\text{O}_8\text{PS}_2$ についてのESI MS 計算値925.4、実測値926.5 (M+1)。 ^3P NMR (202 MHz、 CDCl_3) : δ 150.78 (d, J 6.9 Hz)、150.02 (d, J 9.5 Hz)。

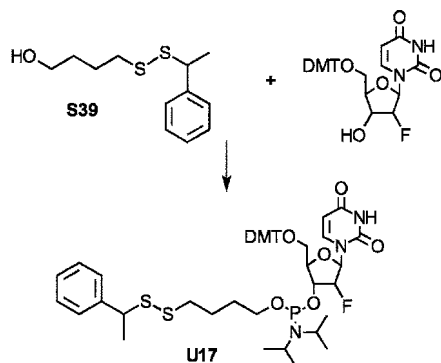
30

40

【0421】

化合物U17

【化 1 4 5】



10

乾燥 CH_2Cl_2 (1.0 mL) 中のビス- (N, N-ジイソプロピルアミノ) -クロロホスフィン (0.28 g, 1.05 mmol) の溶液を、 -78°C で、乾燥 CH_2Cl_2 (5.0 mL) 中の 5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2'-F-ウリジン (0.55 g, 1.0 mmol) および N, N-ジイソプロピルエチルアミン (0.18 mL, 1.05 mmol) の溶液に滴下して加えた。反応混合物を室温に温め、1.5 時間攪拌した。1.0 mL の乾燥 CH_2Cl_2 中の S39 (0.24 g, 1.0 mmol) の溶液を加え、10 分間攪拌した。次に、8.0 mL の乾燥 CH_2Cl_2 中のジイソプロピルアンモニウムテトラゾリド (0.18 g, 1.05 mmol) の溶液を反応混合物に少しずつ加え、得られた混合物を一晩攪拌した。混合物を CH_2Cl_2 (20 mL) で希釈し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (20 mL) および塩水 (20 mL) で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウム上で乾燥させ、ろ液を減圧下で濃縮したところ、残渣が得られ、それを、ISCO companion (5% のメタノールを含む酢酸エチル/ヘキサン = 10% ~ 55%) におけるフラッシュシリカゲルカラム精製にかけたところ、0.24 g (26%) の表題化合物 U17 が無色の発泡体として得られた。 $\text{C}_{48}\text{H}_{59}\text{FN}_3\text{O}_8\text{PS}_2$ についての ESI MS 計算値 919.3、実測値 920.7 (M+1)。 ^{31}P NMR (202 MHz, CDCl_3) : δ 155.41 (d, J 7.1 Hz)、154.73 (d, J 8.9 Hz)。

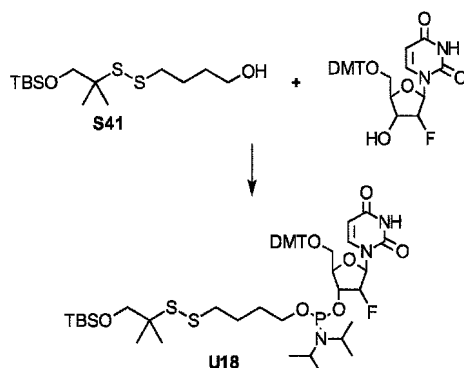
20

【0 4 2 2】

化合物 U18

30

【化 1 4 6】



40

乾燥 CH_2Cl_2 (1.0 mL) 中のビス- (N, N-ジイソプロピルアミノ) -クロロホスフィン (0.28 g, 1.05 mmol) の溶液を、 -78°C で、乾燥 CH_2Cl_2 (5.0 mL) 中の 5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2'-F-ウリジン (0.55 g, 1.0 mmol) および N, N-ジイソプロピルエチルアミン (0.18 mL, 1.05 mmol) の溶液に滴下して加えた。反応混合物を室温に温め、1.5 時間攪拌した。1.0 mL の乾燥 CH_2Cl_2 中の S41 (0.32 g, 1.0 mmol) の溶液を加え、得られた混合物を 10 分間攪拌した。次に、8.0 mL の乾燥 CH_2Cl_2 中のジイソプロピルアンモニウムテトラゾリド (0.18 g, 1.05 mmol) の溶液を反応混合物に少しずつ加え、得られた混合物を一晩攪拌した。反応混合物を CH_2

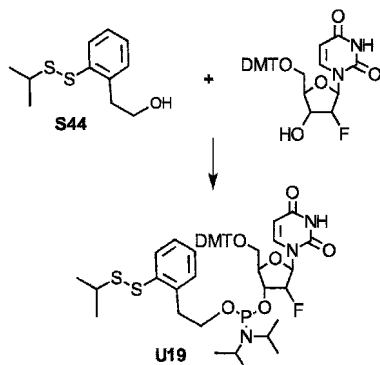
50

CH_2Cl_2 (20 mL) で希釈し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (20 mL) および塩水 (20 mL) で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウム上で乾燥させ、ろ液を減圧下で濃縮したところ、残渣が得られ、それを、ISCO companion (5% のメタノールを含む酢酸エチル) / ヘキサン = 10% ~ 55% におけるフラッシュシリカゲルカラム精製にかけたところ、0.25 g (25%) の表題化合物 U18 が無色の発泡体として得られた。 $\text{C}_{50}\text{H}_{73}\text{FN}_3\text{O}_9\text{PS}_2\text{Si}$ についての ESI MS 計算値 1001.4、実測値 1003.1 (M+2)。 ^3P NMR (202 MHz、 CDCl_3) : δ 155.67 (d, J 7.7 Hz)、154.81 (d, J 9.7 Hz)。

【0423】

化合物 U19

【化147】



乾燥 CH_2Cl_2 (1.0 mL) 中のビス-(N, N-ジイソプロピルアミノ)-クロロホスフィン (0.28 g、1.05 mmol) の溶液を、 -78°C で、乾燥 CH_2Cl_2 (5.0 mL) 中の 5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2'-F-ウリジン (0.55 g、1.0 mmol) および N, N-ジイソプロピルエチルアミン (0.18 mL、1.05 mmol) の溶液に滴下して加えた。反応混合物を室温に温め、1.5 時間攪拌した。1.0 mL の乾燥 CH_2Cl_2 中の S44 (0.23 g、1.0 mmol) の溶液を加え、得られた混合物を 10 分間攪拌した。次に、8.0 mL の乾燥 CH_2Cl_2 中のジイソプロピルアンモニウムテトラゾリド (0.18 g、1.05 mmol) の溶液を反応混合物に少しずつ加え、得られた混合物を一晩攪拌した。混合物を CH_2Cl_2 (20 mL) で希釈し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (20 mL) および塩水 (20 mL) で洗浄した。混合物を無水硫酸ナトリウム上で乾燥させ、ろ液を減圧下で濃縮したところ、残渣が得られ、それを、ISCO companion (5% のメタノールを含む酢酸エチル) / ヘキサン = 10% ~ 55% におけるフラッシュシリカゲルカラム精製にかけたところ、0.24 g (27%) の表題化合物 U19 が無色の発泡体として得られた。 $\text{C}_{47}\text{H}_{57}\text{FN}_3\text{O}_8\text{PS}_2$ についての ESI MS 計算値 905.3、実測値 907.0 (M+2)。 ^3P NMR (202 MHz、 CDCl_3) : δ 154.74 (d, J 8.9 Hz)、154.53 (d, J 7.7 Hz)。

【0424】

化合物 U20

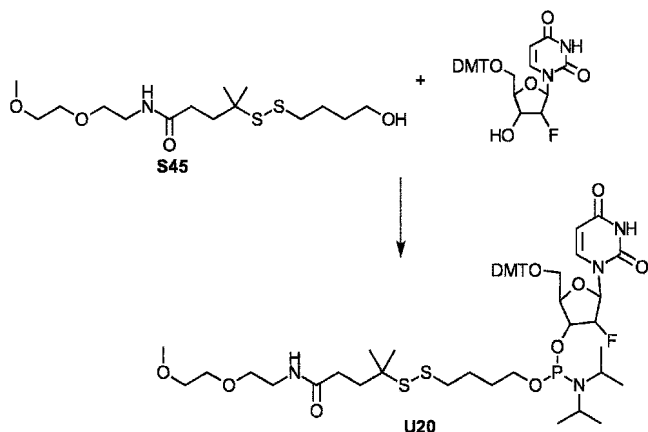
10

20

30

40

【化 1 4 8】



10

乾燥 CH_2Cl_2 (2.0 mL) 中のビスー (N, N-ジイソプロピルアミノ) -クロロホスフィン (0.57 g、2.14 mmol) の溶液を、 -78°C で、乾燥 CH_2Cl_2 (10.0 mL) 中の 5'-O-(4, 4'-ジメトキシトリチル)-2'-F-ウリジン (1.11 g、2.0 mmol) および N, N-ジイソプロピルエチルアミン (0.37 mL、2.14 mmol) の溶液に滴下して加えた。反応混合物を室温に温め、1.5 時間攪拌した。5.0 mL の乾燥 CH_2Cl_2 中の S45 (0.72 g、2.0 mmol) の溶液を加え、得られた混合物を 10 分間攪拌した。次に、8.0 mL の乾燥 CH_2Cl_2 中のジイソプロピルアンモニウムテトラゾリド (0.37 g、2.14 mmol) の溶液を反応混合物に少しずつ加え、得られた混合物を一晩攪拌した。混合物を CH_2Cl_2 (20 mL) で希釈し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (20 mL) および塩水 (20 mL) で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウム上で乾燥させ、ろ液を減圧下で濃縮したところ、残渣が得られ、それを、ISCO companion (EtOAc/ヘキサン、2.5% の MeOH を含有する) におけるフラッシュシリカゲルカラム精製にかけたところ、0.45 g (23%) の表題化合物 U20 が無色油として得られた。 ^3P NMR (202 MHz、 CDCl_3) : δ 150.13 (d, J 6.5 Hz)、149.13 (d, J 9.1 Hz)

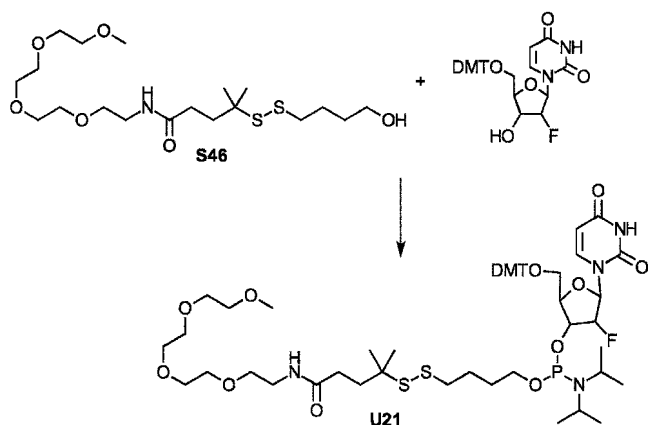
20

【0 4 2 5】

30

化合物 U21

【化 1 4 9】



40

乾燥 CH_2Cl_2 (1.0 mL) 中のビスー (N, N-ジイソプロピルアミノ) -クロロホスフィン (0.28 g、1.05 mmol) の溶液を、 -78°C で、乾燥 CH_2Cl_2 (5.0 mL) 中の 5'-O-(4, 4'-ジメトキシトリチル)-2'-F-ウリジン (0.55 g、1.0 mmol) および N, N-ジイソプロピルエチルアミン (0.18 mL、1.05 mmol) の溶液に滴下して加えた。反応混合物を室温に温め、1.5 時間攪拌した。1.0 mL の乾燥 CH_2Cl_2 中の S46 (0.44 g、1.0 mmol)

50

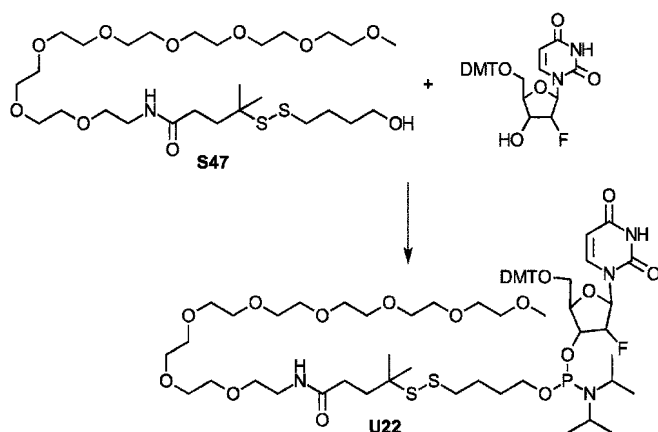
の溶液を加え、得られた混合物を10分間攪拌した。次に、8.0 mLの乾燥 CH_2Cl_2 中のジイソプロピルアンモニウムテトラゾリド(0.18 g、1.05 mmol)の溶液を反応混合物に少しずつ加え、得られた混合物を一晩攪拌した。混合物を CH_2Cl_2 (20 mL)で希釈し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液(20 mL)および塩水(20 mL)で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウム上で乾燥させ、ろ液を減圧下で濃縮したところ、残渣が得られ、それを、ISCO companion(メタノール/ジクロロメタン=1%~8%)におけるフラッシュシリカゲルカラム精製にかけたところ、0.30 g(27%)の表題化合物U21が無色油として得られた。 $\text{C}_{55}\text{H}_{80}\text{FN}_4\text{O}_{13}\text{P}_2\text{S}_2$ についてのESI MS 計算値1118.5、実測値1118.3(M^+)。 ^3P NMR(202 MHz、 CDCl_3): δ 150.15(d, J 6.5 Hz)、149.23(d, J 9.1 Hz)。

10

【0426】

化合物U22

【化150】



20

乾燥 CH_2Cl_2 (1.0 mL)中のビス-(N,N-ジイソプロピルアミノ)-クロロホスフィン(0.38 g、1.41 mmol)の溶液を、-78℃で、乾燥 CH_2Cl_2 (5.0 mL)中の5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2'-F-ウリジン(0.74 g、1.34 mmol)およびN,N-ジイソプロピルエチルアミン(0.25 mL、1.41 mmol)の溶液に滴下して加えた。反応混合物を室温に温め、1.5時間攪拌した。1.0 mLの乾燥 CH_2Cl_2 中のS47(0.75 g、1.22 mmol)の溶液を加え、得られた混合物を10分間攪拌した。次に、10 mLの乾燥 CH_2Cl_2 中のジイソプロピルアンモニウムテトラゾリド(0.24 g、1.41 mmol)の溶液を反応混合物に少しずつ加え、得られた混合物を一晩攪拌した。混合物を CH_2Cl_2 (20 mL)で希釈し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液(20 mL)および塩水(20 mL)で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウム上で乾燥させ、ろ液を減圧下で濃縮したところ、残渣が得られ、それを、ISCO companion(メタノール/ジクロロメタン=1%~8%)におけるフラッシュシリカゲルカラム精製にかけたところ、0.56 g(32%)の表題化合物U22が無色油として得られた。 $\text{C}_{63}\text{H}_{96}\text{FN}_4\text{O}_{17}\text{P}_2\text{S}_2$ についてのESI MS 計算値1294.6、実測値1294.4(M^+)。 ^3P NMR(202 MHz、 CDCl_3): δ 150.15(d, J 7.1 Hz)、149.21(d, J 9.5 Hz)。

30

40

【0427】

化合物U23

10



30

化合物 U 2 4

40

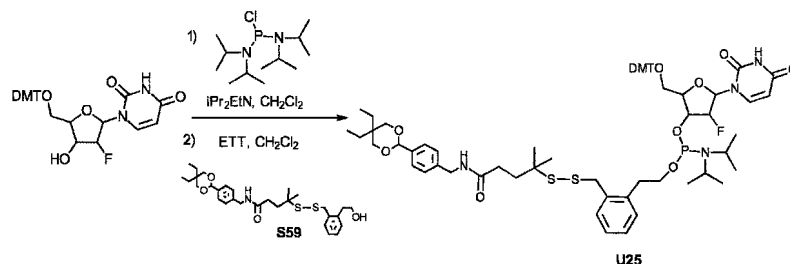


手順 1 / プロトコル 1 : 20.0 mL の乾燥ジクロロメタン中の 5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2'-F-ウリジン (1.93 g、3.52 mmol) および N,N-ジイソプロピルエチルアミン (680 μ L、3.87 mmol) の冷却溶液 (-78 $^{\circ}$ C) に、アルゴン雰囲気下で、10.0 mL のジクロロメタン中のビス-(N,N-ジイソプロピルアミノ)-クロロホスフィン (1.03 g、3.87 mmol) の溶液を

滴下して加えた。攪拌を維持しながら（１時間）、反応混合物を室温に温めた。この混合物に、５．０ｍＬの乾燥ジクロロメタン中のＳ５６（０．９０ｇ、３．５２ｍｍｏｌ）の溶液を滴下して加え、得られた混合物を１０分間攪拌し、その時点で、５．０ｍＬのジクロロメタン中のジイソプロピルアンモニウムテトラゾリド（０．６６ｇ、３．８７ｍｍｏｌ）の懸濁液を少しずつ加えた。反応混合物を室温で１６時間さらに攪拌した。反応混合物を２００ｍＬのジクロロメタンで希釈し、飽和ＮａＨＣＯ_３溶液（４０．０ｍＬ）および塩水（４０．０ｍＬ）によって連続して洗浄し、次に、無水Ｎａ_２ＳＯ_４上で乾燥させた。溶媒を減圧下で蒸発させ、酢酸エチル／ヘキサン溶媒系（Ｃｏｍｂｉ　Ｆｌａｓｈ　Ｒｆ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔで０～３０％の勾配）を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって、粗混合物を精製したところ、生成物Ｕ２４が白色の粉末（１．１ｇ、３３％の収率）として得られた。Ｃ_４_９Ｈ_６_１ＦＮ_３Ｏ_８ＰＳ_２についてのＥＳＩ　ＭＳ　計算値９３４．１、実測値９３４．９〔Ｍ＋Ｈ〕⁺。^３１Ｐ　ＮＭＲ（２０２ＭＨｚ、ＣＤＣｌ_３）δ１５５．３（ｄ、Ｊ　８．７Ｈｚ）、１５４．７（ｄ、Ｊ　８．９Ｈｚ）【０４２９】

化合物Ｕ２５

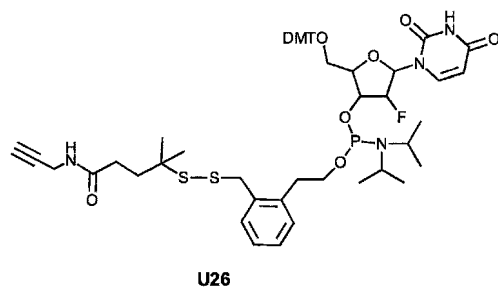
【化１５３】



手順２／プロトコル２：１０．０ｍＬの乾燥ジクロロメタン中の５’－Ｏ－（４，４’－ジメトキシトリチル）－２’－Ｆ－ウリジン（０．６０ｇ、１．１ｍｍｏｌ）およびＮ，Ｎ－ジイソプロピルエチルアミン（２１１μＬ、１．２１ｍｍｏｌ）の冷却溶液（－７８℃）に、アルゴン雰囲気下で、５．０ｍＬのジクロロメタン中のビス－（Ｎ，Ｎ－ジイソプロピルアミノ）－クロロホスフィン（０．３２ｇ、１．２１ｍｍｏｌ）の溶液を滴下して加えた。攪拌を維持しながら（１時間）、反応混合物を室温に温めた。５．０ｍＬの乾燥ジクロロメタン中のＳ５９（０．６０ｇ、１．１ｍｍｏｌ）の溶液を滴下して加え、得られた混合物を１０分間攪拌し、その時点で、アセトニトリル中のエチルチオテトラゾール（ＥＴＴ）の溶液（０．２５Ｍ、２．６ｍＬ、０．６６ｍｍｏｌ）を少しずつ加えた。反応混合物を室温で３時間さらに攪拌した。粗混合物を５０．０ｍＬのジクロロメタンで希釈し、飽和ＮａＨＣＯ_３溶液（２５．０ｍＬ）および塩水（２５．０ｍＬ）によって連続して洗浄し、無水Ｎａ_２ＳＯ_４上で乾燥させた。溶媒を減圧下で蒸発させ、酢酸エチル／ヘキサン溶媒系（Ｃｏｍｂｉ　Ｆｌａｓｈ　Ｒｆ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔで０～５０％の勾配）を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって、粗混合物を精製したところ、生成物Ｕ２５が白色の粉末（０．７７ｇ、５８％の収率）として得られた。Ｃ_６_６Ｈ_８_４ＦＮ_４Ｏ_１_１ＰＳ_２についてのＥＳＩ　ＭＳ　計算値１２２３．５、実測値〔Ｍ＋Ｈ〕⁺１２２４．２。^３１Ｐ　ＮＭＲ（２０２ＭＨｚ、ＣＤＣｌ_３）δ１５４．８（ｄ、Ｊ　７．０Ｈｚ）、１５４．６（ｄ、Ｊ　９．５Ｈｚ）【０４３０】

化合物Ｕ２６

【化 1 5 4】



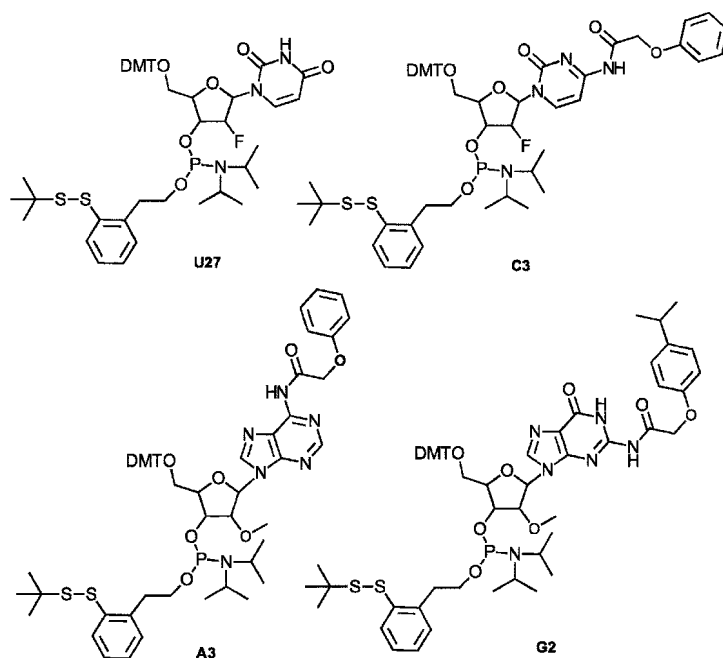
手順 2 を用いて、アルキルジスルフィド（化合物 S 5 9 について記載される手順にしたがって、化合物 S 6 8 および S 5 5 から調製された）および 5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2'-F-ウリジンから化合物 U 2 6 を調製した。

10

【0 4 3 1】

化合物 U 2 7、C 3、A 3、および G 2

【化 1 5 5】



20

30

プロトコル 1（化合物 U 2 4 を参照）にしたがって、化合物 S 6 1 から化合物 U 2 7 を 41% の収率で調製した。C₄₈H₅₉FN₃O₈PS₂ についての ESI MS 計算値 920.1、実測値 920.9 [M+H]⁺。³¹P NMR (202 MHz、CDCl₃) δ 154.7 (d, J 8.9 Hz)、154.5 (d, J 7.7 Hz)

プロトコル 1（化合物 U 2 4 を参照）にしたがって、化合物 C 3 を 59% の収率で調製した。C₅₆H₆₆FN₄O₉PS₂ についての ESI MS 計算値 1053.2、実測値 1051.5 [M-H]⁺。³¹P NMR (202 MHz、CDCl₃) δ 154.6 (d, J 5.45 Hz)、154.4 (d, J 8.3 Hz)

40

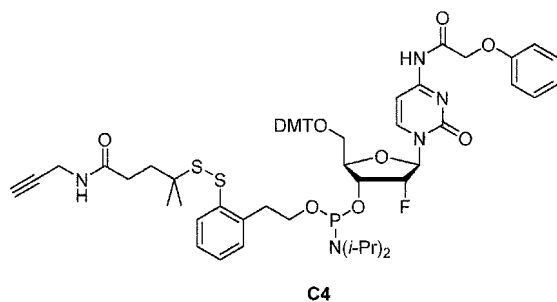
プロトコル 1（化合物 U 2 4 を参照）にしたがって、化合物 A 3 を 39% の収率で調製した。C₅₈H₆₉FN₆O₉PS₂ についての ESI MS 計算値 1089.3、実測値 1090.2 [M+H]⁺。³¹P NMR (202 MHz、CDCl₃) δ 154.8 (s)、154.6 (s)

本明細書に記載される方法にしたがって、例えば、化合物 S 6 1 から化合物 G 2 を調製することができる。

【0 4 3 2】

化合物 C 4

【化 1 5 6】



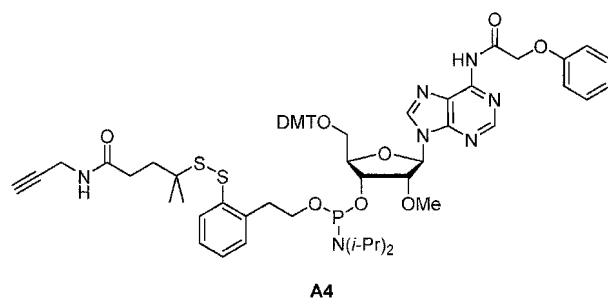
10

手順 2 (化合物 U 2 5 を参照) にしたがって、化合物 C 4 を 2 2 % の収率で調製した。
 $C_{61}H_{71}FN_5O_{10}PS_2$ についての ESI MS 計算値 1148.3、実測値 1147.0 $[M-H]^+$ 。 ^31P NMR (202 MHz、 $CDCl_3$) δ 154.7 (d, J 5.05 Hz)、154.1 (d, J 10.7 Hz)

【0 4 3 3】

化合物 A 4

【化 1 5 7】



20

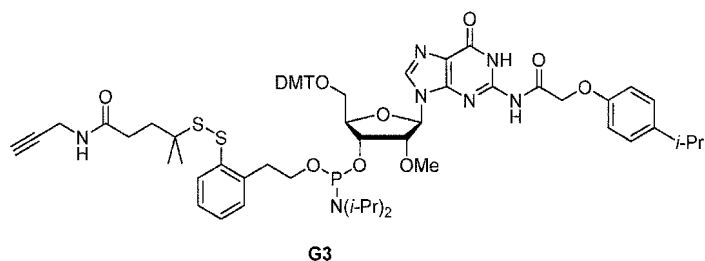
手順 2 (化合物 U 2 5 を参照) にしたがって、化合物 A 4 を 1 8 % の収率で調製した。
 $C_{63}H_{74}N_7O_{10}PS_2$ についての ESI MS 計算値 1184.4、実測値 1183.2 $[M-H]^+$ 。 ^31P NMR (202 MHz、 $CDCl_3$) δ 154.7 (s)、154.1 (s)

【0 4 3 4】

30

化合物 G 3

【化 1 5 8】



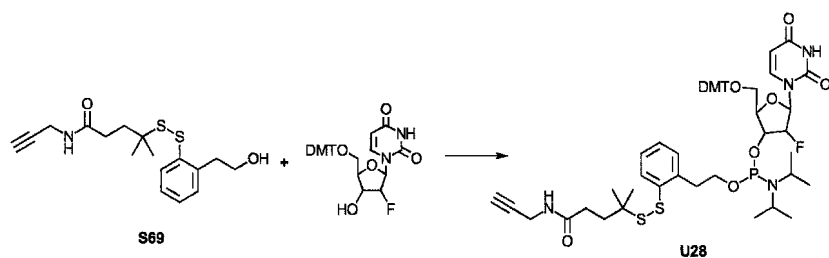
40

手順 2 (化合物 U 2 5 を参照) にしたがって、化合物 G 3 を調製した。

【0 4 3 5】

化合物 U 2 8

【化 1 5 9】

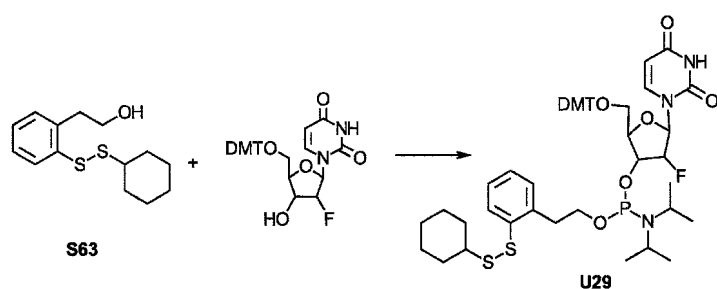


手順 1 (化合物 U 2 4 を参照) にしたがって、化合物 U 2 8 を調製した。C₅₃H₆₄FN₄O₉PS₂ についての ESI MS 計算値 1015.2、実測値 1016.2 (M+1)。³¹P NMR (202 MHz、CDCl₃) : δ 154.79 (d, J 7.5 Hz)、154.38 (d, J 10.5 Hz)

【0 4 3 6】

化合物 U 2 9

【化 1 6 0】

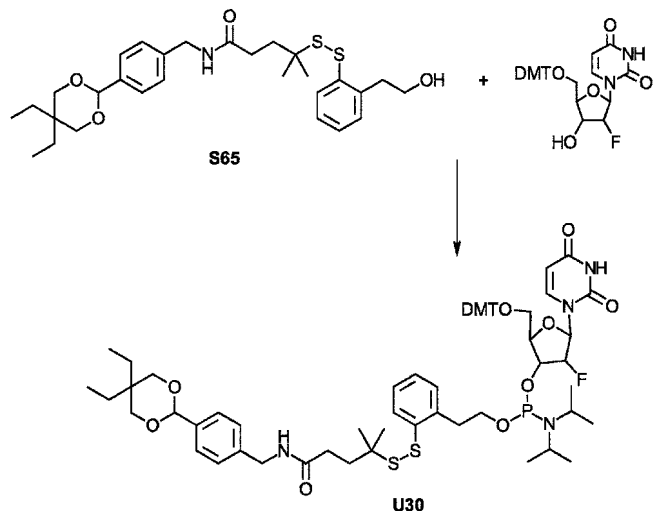


手順 1 (化合物 U 2 4 を参照) にしたがって、化合物 U 2 9 を調製した。C₅₀H₆₁FN₃O₈PS₂ についての ESI MS 計算値 946.1、実測値 947.6 (M+1)。³¹P NMR (202 MHz、CDCl₃) : δ 154.74 (d, J 7.7 Hz)、154.50 (d, J 7.7 Hz)

【0 4 3 7】

化合物 U 3 0

【化 1 6 1】



手順 2 (化合物 U 2 5 を参照) にしたがって、化合物 U 3 0 を調製した。C₆₅H₈₂FN₄O₁₁PS₂ についての ESI MS 計算値 1209.5、実測値 1210.6 (M+1)。³¹P NMR (202 MHz、CDCl₃) : δ 154.74 (d, J 6.7 Hz)、154.34 (d, J 10.3 Hz)

【0 4 3 8】

化合物 C 5、A 5、および G 4

10

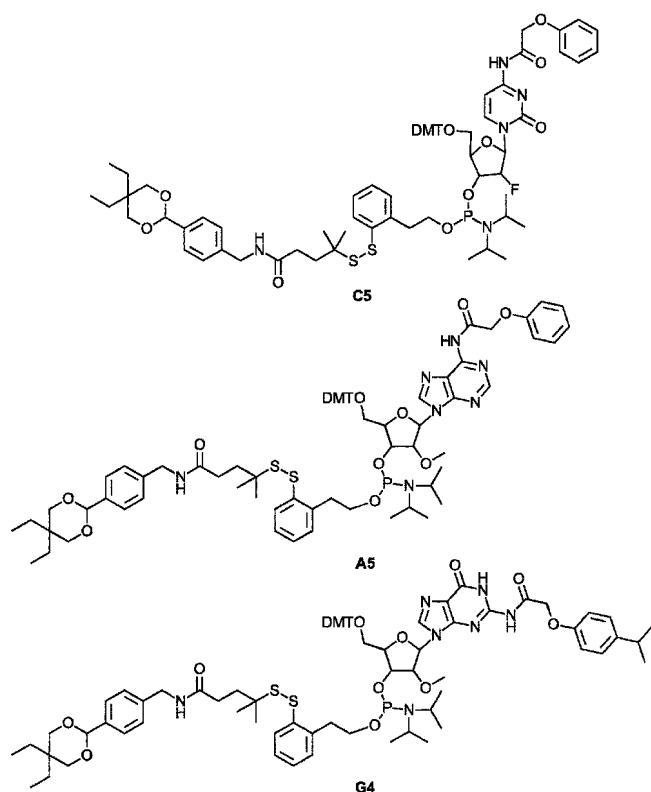
20

30

40

50

【化 1 6 2】



10

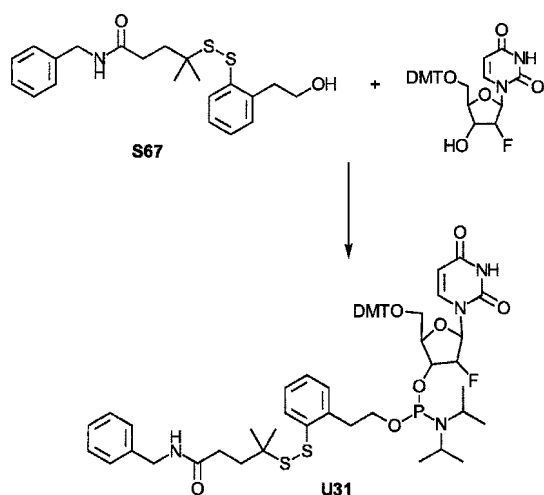
20

手順 2（化合物 U 2 5 を参照）にしたがって、化合物 C 5、A 5、および G 4 を調製した。

【 0 4 3 9】

化合物 U 3 1

【化 1 6 3】



30

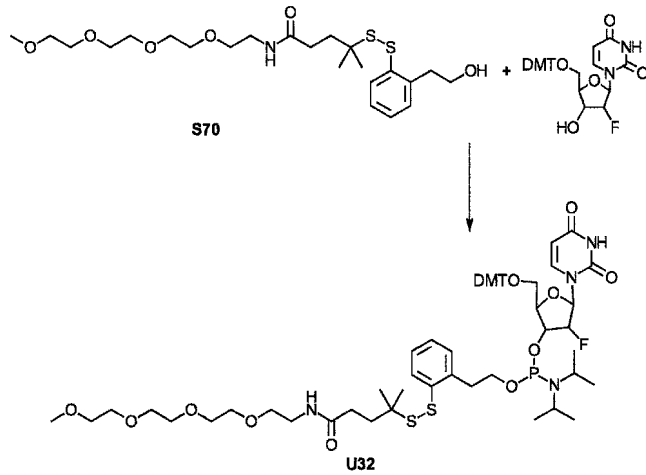
40

手順 1（化合物 U 2 4 を参照）にしたがって、化合物 U 3 1 を調製した。 $C_{57}H_{68}FN_4O_9PS_2$ についての ESI MS 計算値 1067.3、実測値 1065.6 (M-1)。 ^{31}P NMR (202 MHz, $CDCl_3$): δ 154.76 (d, J 7.4 Hz)、154.49 (d, J 10.1 Hz)

【 0 4 4 0】

化合物 U 3 2

【化 1 6 4】



10

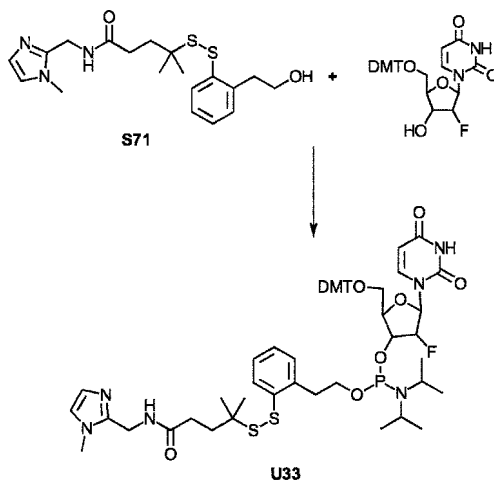
手順 1 (化合物 U 2 4 を参照) にしたがって、化合物 U 3 2 を調製した。C₅₉H₈₀FN₄O₁₃PS₂ についての ESI MS 計算値 1167.4、実測値 1166.5 (M-1)。³¹P NMR (202 MHz、CDCl₃) : δ 154.71 (d, J 7.3 Hz)、154.00 (d, J 10.9 Hz)

【0 4 4 1】

化合物 U 3 3

20

【化 1 6 5】



30

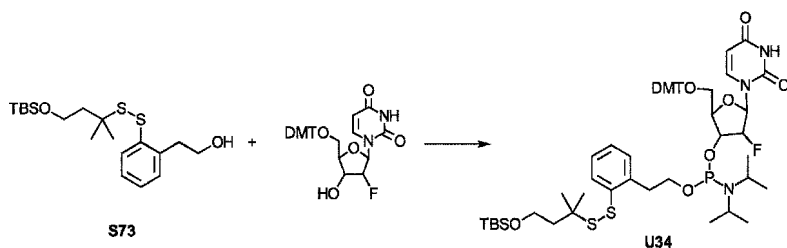
手順 1 (化合物 U 2 4 を参照) にしたがって、化合物 U 3 3 を調製した。C₅₅H₆₈FN₆O₉PS₂ についての ESI MS 計算値 1071.3、実測値 1072.1 (M+1)。³¹P NMR (202 MHz、CDCl₃) : δ 155.09 (s)、152.98 (d, J 14.9 Hz)

【0 4 4 2】

40

化合物 U 3 4

【化 1 6 6】



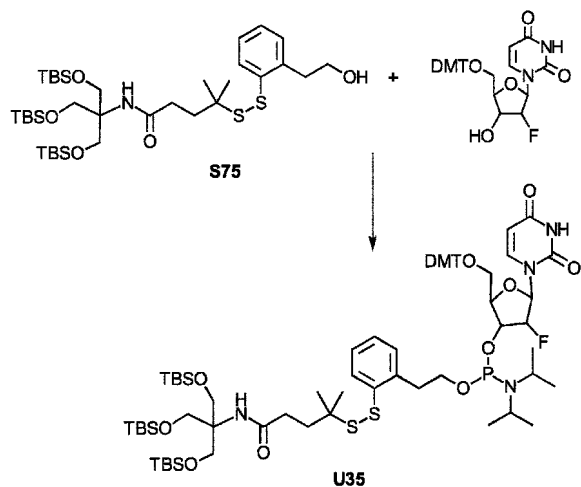
50

手順 1 (化合物 U 2 4 を参照) にしたがって、化合物 U 3 4 を調製した。C₅₅H₇₅FN₃O₉PS₂Si₁ についての ESI MS 計算値 1064.4、実測値 1065.1 (M+1)。³¹P NMR (202 MHz、CDCl₃) : δ 154.81 (d, J 8.9 Hz)、154.56 (d, J 7.9 Hz)

【0443】

化合物 U 3 5

【化 1 6 7】



10

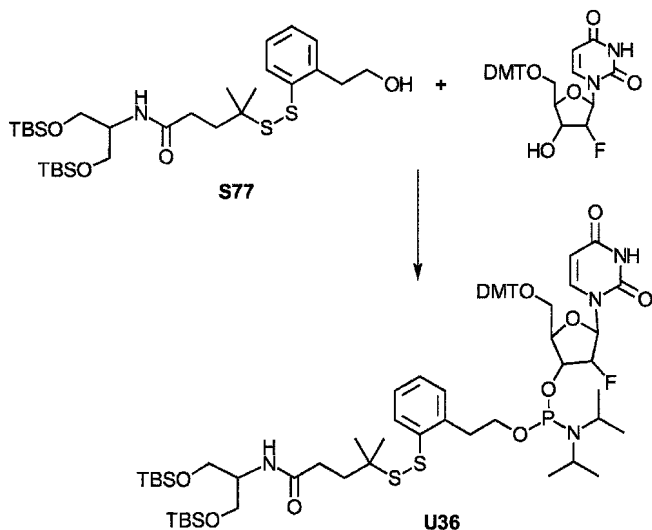
20

手順 1 (化合物 U 2 4 を参照) にしたがって、化合物 U 3 5 を調製した。³¹P NMR (202 MHz、CDCl₃) : δ 154.62 (d, J 7.3 Hz)、154.50 (d, J 9.2 Hz)

【0444】

化合物 U 3 6

【化 1 6 8】



30

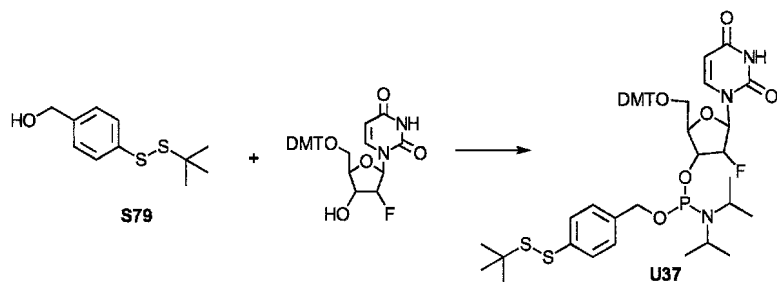
40

手順 1 (化合物 U 2 4 を参照) にしたがって、化合物 U 3 6 を調製した。C₆₅H₉₆FN₄O₁₁PS₂Si₂ についての ESI MS 計算値 1279.8、実測値 1278.5 (M-1)。³¹P NMR (202 MHz、CDCl₃) : δ 154.72 (d, J 7.1 Hz)、154.60 (d, J 9.1 Hz)

【0445】

化合物 U 3 7

【化 1 6 9】



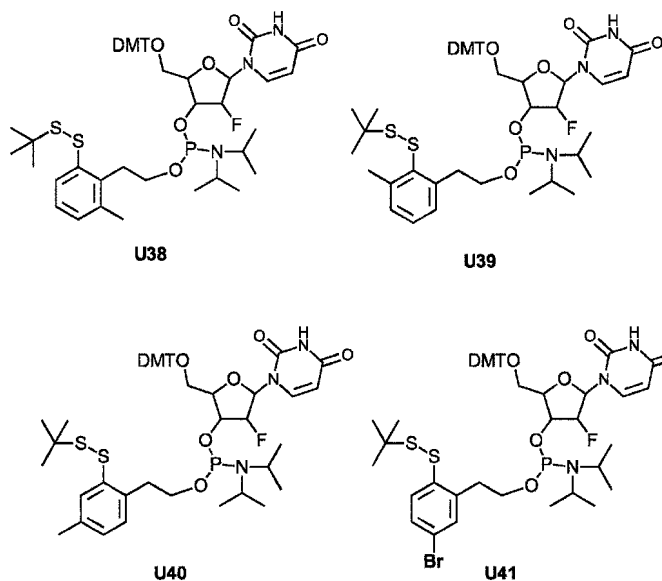
手順 1 (化合物 U 2 4 を参照) にしたがって、化合物 U 3 7 を調製した。C₄₇H₅₇FN₃O₈PS₂ についての ESI MS 計算値 906.1、実測値 906.7 (M+1)。³¹P NMR (202 MHz、CDCl₃) : δ 156.35 (d, J 8.5 Hz)、155.98 (d, J 8.7 Hz)

10

【0 4 4 6】

化合物 U 3 8、U 3 9、U 4 0、および U 4 1

【化 1 7 0】



20

30

手順 1 (化合物 U 2 4 を参照) にしたがって、化合物 U 3 8、U 3 9、U 4 0 および U 4 1 を調製した。

U 3 8 : C₄₉H₆₁FN₃O₈PS₂ についての ESI MS 計算値 934.1、実測値 933.1 (M-1)。³¹P NMR (202 MHz、CDCl₃) : δ 154.74 (d, J 7.7 Hz)、154.70 (d, J 7.9 Hz)

U 3 9 : C₄₉H₆₁FN₃O₈PS₂ についての ESI MS 計算値 934.1、実測値 844.8 (M-t-BuS)。³¹P NMR (202 MHz、CDCl₃) : δ 154.81 (d, J 8.7 Hz)、154.58 (d, J 8.3 Hz)

40

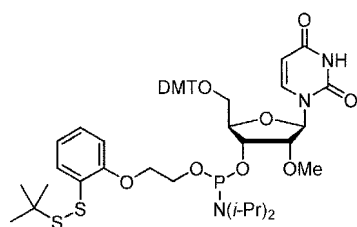
U 4 0 : C₄₉H₆₁FN₃O₈PS₂ についての ESI MS 計算値 934.1、実測値 933.5 (M-1)。³¹P NMR (202 MHz、CDCl₃) : δ 154.64 (d, J 8.3 Hz)、154.53 (d, J 7.9 Hz)

U 4 1 : C₄₈H₅₈BrFN₃O₈PS₂ についての ESI MS 計算値 999.0、実測値 999.9 (M+1)。³¹P NMR (202 MHz、CDCl₃) : δ 155.47 (d, J 7.7 Hz)、154.74 (d, J 8.7 Hz)

【0 4 4 7】

化合物 U 4 2

【化 1 7 1】



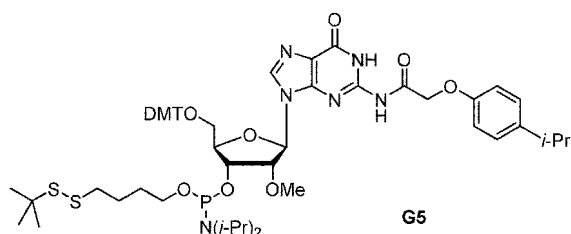
U42

手順 1（化合物 U 2 4 を参照）にしたがって、化合物 S 8 3 から化合物 U 4 2 を調製した。

【 0 4 4 8】

化合物 G 5

【化 1 7 2】



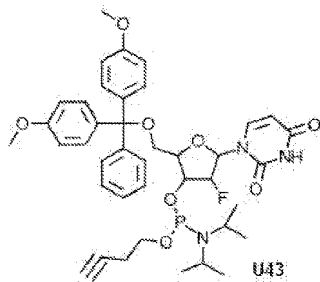
G5

化合物 G 5 を明細書に記載されるように調製した。C₅₇H₇₅N₆O₁₀PS₂ についての ESI MS 計算値 1099.34、実測値 [M-H]⁺ 1098.2。³¹P NMR (202 MHz、CDCl₃) δ 150.48 (s)、149.87 (s)

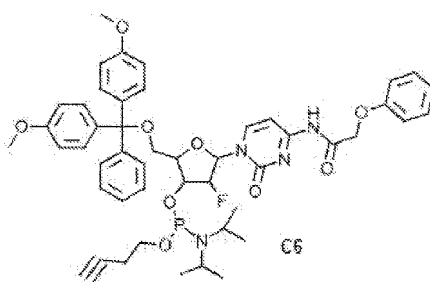
【 0 4 4 9】

化合物 U 4 3、A 6、G 6、および C 6

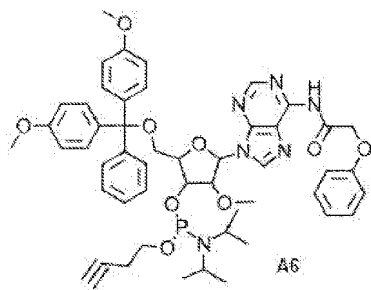
【化 1 7 3】



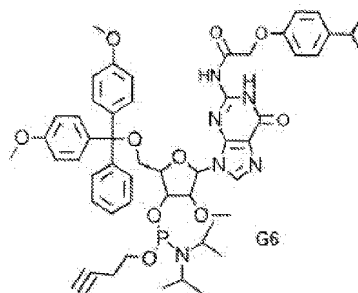
U43



G6



A6



G6

3-ブチン-1-オール、ビス-(N,N-ジイソプロピルアミノ)-クロロホスフィン、および対応する保護ヌクレオシドから、当該技術分野において公知の方法にしたがって、化合物 U 4 3、A 6、G 6、および C 6 を調製した。

【 0 4 5 0】

化合物 A 7

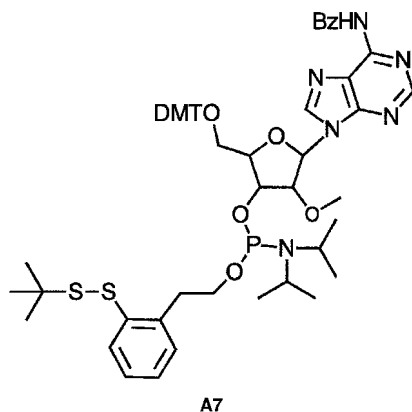
10

20

30

40

【化 1 7 4】



10

100.0 mL の乾燥ジクロロメタン中の 5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2'-O-メチルアデノシン (n-Bz) (14.24 g、20.7 mmol) および N,N-ジイソプロピルエチルアミン (4.0 mL、22.7 mmol) の -78 °C に冷却した溶液に、アルゴン雰囲気下で、20.0 mL のジクロロメタン中のビス-(N,N-ジイソプロピルアミノ)-クロロホスフィン (6.07 g、22.7 mmol) の溶液を滴下して加えた。攪拌を維持しながら (1 時間)、反応混合物を室温に温めた。15.0 mL の乾燥ジクロロメタン中の S61 (5.0 g、20.7 mmol) の溶液を加え、得られた混合物を 10 分間攪拌し、その時点で、ETT の 0.25 M のアセトニトリル溶液 (50.0 mL、12.42 mmol) を滴下して加えた。反応混合物を室温で 16 時間さらに攪拌した。粗混合物を 200 mL のジクロロメタンで希釈し、飽和 NaHCO₃ 溶液 (50 mL) および塩水 (50 mL) で連続して洗浄し、無水 Na₂SO₄ 上で乾燥させた。溶媒を減圧下で蒸発させ、酢酸エチル/ヘキサン溶媒系 (Combi Flash Rf Instrument で 0~30% の勾配) を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって、粗混合物を精製したところ、8.7 g (40%) の生成物 A7 (ジアステレオマー混合物) が白色の粉末として得られた。C₅₇H₆₇N₆O₈PS₂ についての ESI MS 計算値 1059.28、実測値 1057.9 [M-H]⁺。³¹P NMR (202 MHz、CDCl₃) : δ 154.8、154.0。

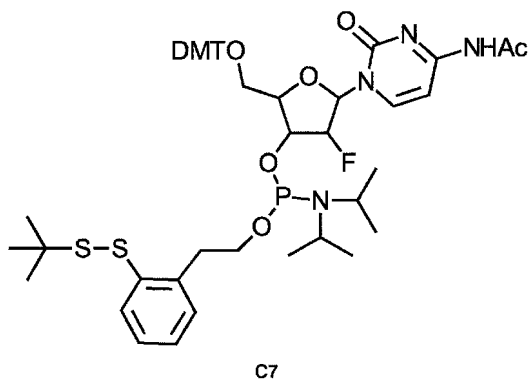
20

30

【0451】

化合物 C7

【化 1 7 5】



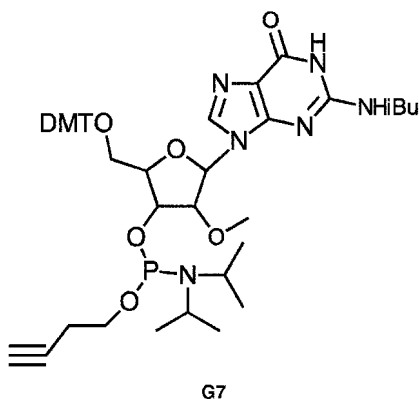
40

本明細書に報告されるプロトコル (例えば、A7 について記載されるプロトコル) を用いて、化合物 C7 を調製することができる。

【0452】

化合物 G7

【化 1 7 6】



10

15. 0 mL の乾燥ジクロロメタン中のブター 3-イン-1-オール (0.52 g、7.46 mmol) および N, N-ジイソプロピルエチルアミン (1.35 mL、7.78 mmol) の -78 °C に冷却した溶液に、アルゴン雰囲気下で、5.0 mL のジクロロメタン中のビス-(N, N-ジイソプロピルアミノ)-クロロホスフィン (2.07 g、7.78 mmol) の溶液を滴下して加えた。攪拌を維持しながら (1 時間)、反応混合物を室温に温めた。この溶液を、5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2'-O-メチル-グアノシン (iBu) (2.5 g、3.73 mmol) およびジイソプロピルアンモニウムテトラゾリド (1.28 g、7.46 mmol) のジクロロメタン (15 mL) 懸濁液に滴下して加え、室温で 16 時間攪拌した。反応混合物を 15 mL のジクロロメタンで希釈し、飽和 NaHCO₃ 溶液 (10 mL) および塩水 (10 mL) で連続して洗浄し、次に、無水 Na₂SO₄ 上で乾燥させた。溶媒を減圧下で蒸発させ、酢酸エチル/ヘキサン溶媒系 (Combi Flash Rf Instrument で 0~60% の勾配) を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって、粗混合物を精製したところ、2.1 g (65%) の生成物 G7 (ジアステレオマー混合物) が白色の粉末として得られた。C₄₆H₅₇N₆O₉P についての ESI MS 計算値 868.95、実測値 868.0 [M-H]⁺; ³¹P NMR (202 MHz、CDCl₃): δ 155.4、154.5.

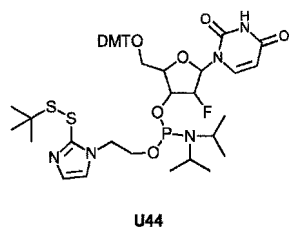
20

【0 4 5 3】

30

化合物 U 4 4

【化 1 7 7】



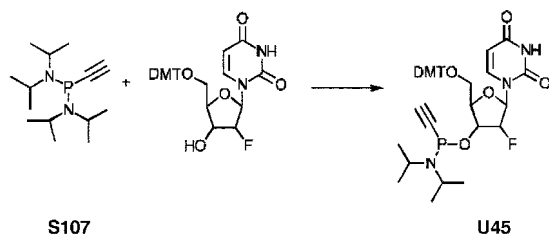
化合物 U 2 4 について記載される手順にしたがって、U 4 4 を調製した。C₄₅H₅₇FN₅O₈PS₂ についての ESI MS ; 計算値 910.1、実測値 910.7 (M+1); ³¹P NMR (202 MHz、CDCl₃): δ 151.70 (d, J 8.1 Hz)、150.90 (d, J 9.5 Hz)

40

【0 4 5 4】

化合物 U 4 5

【化 1 7 8】

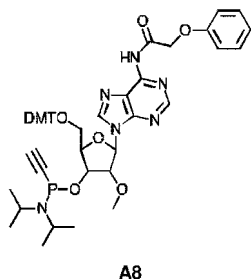


20 mL の乾燥ジクロロメタン中の S 1 0 7 (1.28 g、5.0 mmol) の溶液に、アルゴン雰囲気下で、10 mL のジクロロメタン中の 5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2'-F-ウリジン (2.74 g、5.0 mmol) および 1H-テトラゾール (13.3 mL、0.45 M、6.0 mmol) の溶液をゆっくりと加え、1時間攪拌した。トリエチルアミン (50 μ L) をゆっくりと加えて、反応混合物を中和し、揮発性物質を減圧下で蒸発させ、酢酸エチル／ヘキサン溶媒系 (Combi Flash Rf Instrument で 20～70% の勾配) を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって、粗混合物を精製したところ、U 4 5 が白色の粉末 (2.63 g、75%) として得られた。C₃₈H₄₇FN₃O₇P についての ESI MS; 計算値 703.7、実測値 702.8 (M-1); ³¹P NMR (202 MHz、CDCl₃): δ 109.65 (d, J 5.1 Hz)、106.24 (d, J 10.9 Hz)。

【0 4 5 5】

化合物 A 8

【化 1 7 9】

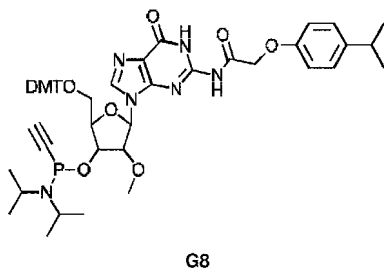


U 4 5 について記載されるのと同じプロトコルを用いて、A 8 を調製した。C₄₈H₅₃N₆O₈P についての ESI MS; 計算値 872.9、実測値 873.7 (M+1); ³¹P NMR (202 MHz、CDCl₃): δ 106.37 (s)、105.97 (s)。

【0 4 5 6】

化合物 G 8

【化 1 8 0】

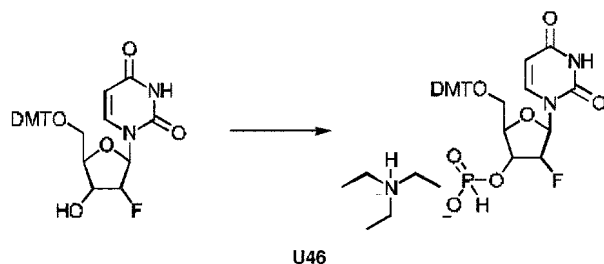


U 4 5 について記載されるのと同じプロトコルを用いて、G 8 を調製した。C₅₁H₅₉N₆O₉P についての ESI MS; 計算値 931.0、実測値 930.0 (M-1); ³¹P NMR (202 MHz、CDCl₃): δ 106.57 (s)、105.27 (s)。

【0 4 5 7】

化合物 U 4 6

【化 1 8 1】



10

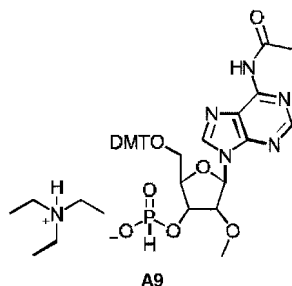
亜リン酸（1.64 g、20.0 mmol）を、無水ピリジン（5 mL）と 3 回同時蒸発させ、次に、加熱しながら 10 mL の無水ピリジンに溶解させた。この混合物に、5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2'-F-ウリジン（1.10 g、2.0 mmol）を加え、10 分間攪拌し、0℃に冷却し、次に、塩化ピバロイル（1.23 mL、10.0 mmol）をゆっくりと加えた。混合物を室温に温め、一晚攪拌した。反応物を、重炭酸トリエチルアンモニウム緩衝液（5 mL、1 M）でクエンチした後、酢酸エチル（30 mL）で希釈した。酢酸エチル（3×20 mL）での抽出後、組み合わされた有機層を重炭酸トリエチルアンモニウム緩衝液（5 mL、0.5 M）で洗浄し、無水硫酸ナトリウム上で乾燥させた。揮発性物質を減圧下で除去したところ、残渣が得られ、それを、ISCO companion（10%のメタノール/ジクロロメタン、1%のトリエチルアミンを含む）におけるフラッシュシリカゲルカラム精製にかけたところ、0.96 g（67%）の U 4 6 が白色の固体として得られた。³¹P NMR（202 MHz、CDCl₃）：δ 9.08（s）。

20

【0 4 5 8】

化合物 A 9

【化 1 8 2】



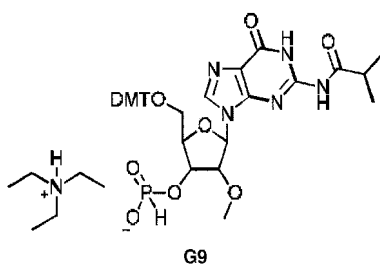
30

化合物 U 4 6 について記載されるプロトコルを用いて、A 9 を調製した。³¹P NMR（202 MHz、CDCl₃）：δ 4.33（s）、3.51（s）。

【0 4 5 9】

化合物 G 9

【化 1 8 3】



40

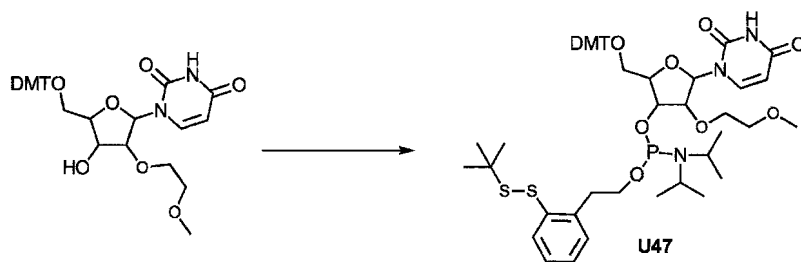
化合物 U 4 6 について記載されるプロトコルを用いて、G 9 を調製した。³¹P NMR（202 MHz、CDCl₃）：δ 3.89（s）、3.25（s）。

【0 4 6 0】

50

化合物 U 4 7

【化 1 8 4】



10

アルゴン下で、30 mL の乾燥ジクロロメタン中の 5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2'-MOE-ウリジン (2.0 g、3.3 mmol) および N,N-ジイソプロピルエチルアミン (0.63 mL、3.6 mmol) の冷却溶液 (-78 °C) に、10 mL のジクロロメタン中のビス-(N,N-ジイソプロピルアミノ)-クロロホスフィン (0.96 g、3.6 mmol) の溶液を滴下して加えた。攪拌を維持しながら (1 時間)、反応混合物を室温に温めた。この混合物に、5 mL の乾燥ジクロロメタン中の化合物 S 6 1 (0.80 g、3.3 mmol) の溶液を滴下して加え、10 分間攪拌してから、5 mL のジクロロメタン中のジイソプロピルアンモニウムテトラゾリド (DIAT、0.56 g、3.3 mmol) の懸濁液を少しずつ加えた。反応混合物を室温で 16 時間さらに攪拌し、200 mL のジクロロメタンで希釈し、飽和 NaHCO₃ 溶液 (40 mL) および塩水 (40 mL) によって連続して洗浄し、次に、無水 Na₂SO₄ 上で乾燥させた。溶媒を減圧下で蒸発させ、酢酸エチル/ヘキサン溶媒系 (Combi Flash

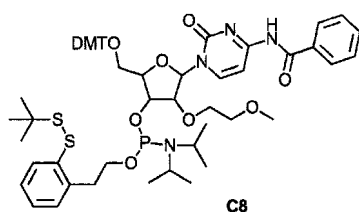
20

Rf Instrument で 0~70% の勾配) を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって、粗混合物を精製したところ、1.28 g の生成物 U 4 7 が白色の粉末 (ジアステレオマー混合物として 40% の収率) として得られた。C₅₁H₆₆N₃O₁₀PS₂ についての ESI MS; 計算値 976.2、実測値 [M-H]⁺ 975.2; ³¹P NMR (202 MHz、CDCl₃): δ 148.9 (s)、148.6 (s)。

【0 4 6 1】

化合物 C 8

【化 1 8 5】



30

上述される手順を用いて、化合物 C 8 を調製した (ジアステレオマー混合物として 22% の収率)。C₅₈H₇₁N₄O₁₀PS₂ についての ESI MS; 計算値 1079.3、実測値 [M-H]⁺ 1078.6; ³¹P NMR (202 MHz、CDCl₃): δ 149.0 (s)、147.8 (s)。

40

【0 4 6 2】

化合物 G 1 0

10

化合物 A 1 0

COC1OCCOCCO1CNC(=O)CC(C)CSC2=CC=CC=C2COP(=O)(OC(C)C)OC(C)C3OC(COC4=NC5=NC6=CC=CC=C6N5C(=O)N7C=CC=CC=C7)O3

A10

20

化合物 U 4 8

U48

30

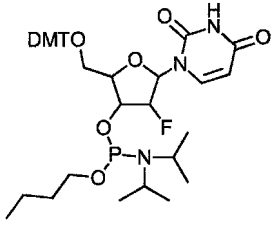
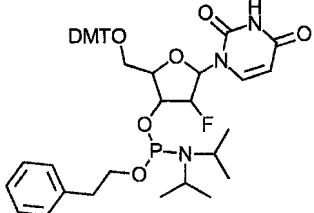
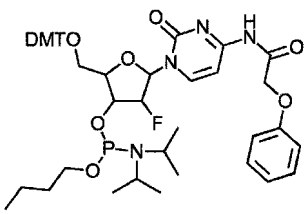
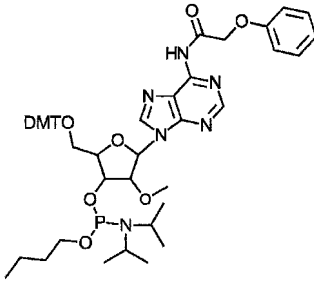
40

本明細書に記載される標準的な合成手順を用いて、表4に示されるホスホラミダイトモノマーを合成した。

【 0 4 6 6 】

【表 6】

表4

化合物 #	構造	31P NMR (ppm単位の δ)	収率 (%)
U49		154.98 (d, J 8.08 Hz) 154.74 (d, J 8.08 Hz)	54
U50		154.84 (d, J 12.12 Hz) 154.50 (d, J 8.08 Hz)	53
C9		154.80 (d, J 8.08 Hz) 154.71 (d, J 6.06 Hz)	51
A11		154.79 (s) 154.01 (s)	34

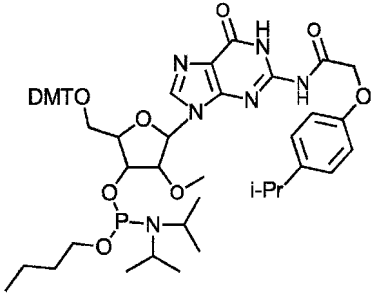
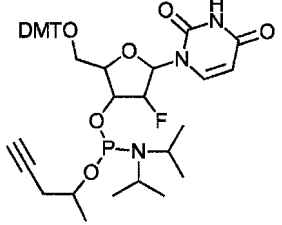
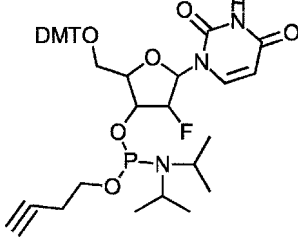
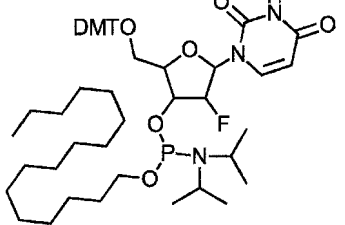
10

20

30

【 0 4 6 7 】

【表 7】

化合物 #	構造	³¹ P NMR (ppm単位のδ)	収率 (%)
G11		154.91 (s) 154.36 (s)	55
U51		154.6 (d, <i>J</i> 6.6 Hz) 154.5 (d, <i>J</i> 8.5 Hz) 154.2 (d, <i>J</i> 9.3 Hz) 152.8 (d, <i>J</i> 10.1 Hz)	60
U43		155.27 (d, <i>J</i> 6.06 Hz) 155.05 (d, <i>J</i> 8.08 Hz)	50
U52		155.17 (d, <i>J</i> 8.08 Hz) 154.67 (d, <i>J</i> 10.1 Hz)	48

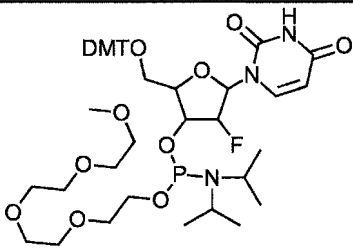
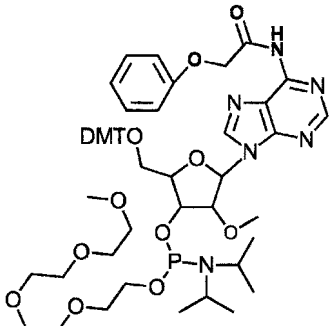
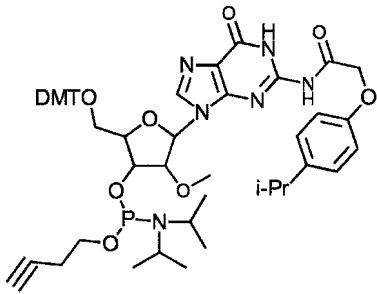
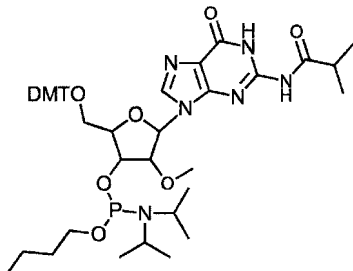
10

20

30

【 0 4 6 8 】

【表 8】

化合物 #	構造	³¹ P NMR (ppm単位δ)	収率 (%)
U53		155.83 (d, <i>J</i> 6.06 Hz) 155.34 (d, <i>J</i> 10.1 Hz)	55
A12		155.85 (s) 155.09 (s)	25
G6		155.29 (s) 154.85 (s)	29
G12		154.94 (s) 154.05 (s)	18

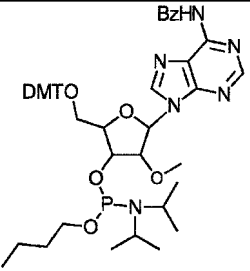
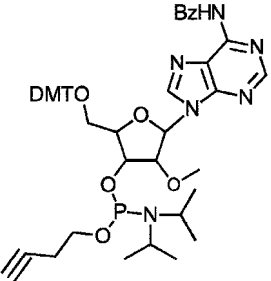
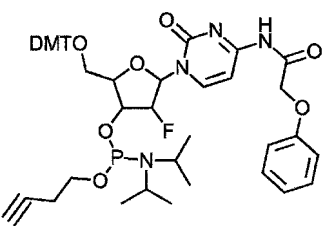
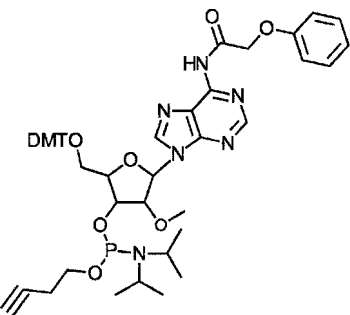
10

20

30

【 0 4 6 9 】

【表 9】

化合物 #	構造	31P NMR (ppm単位 δ)	収率 (%)
A13		154.81 (s) 153.99 (s)	55
A14		150.24 (s) 149.63 (s)	39
C6		155.18 (d, J 6.06 Hz) 154.79 (d, J 8.08 Hz)	55
A6		155.20 (s) 154.60 (s)	56

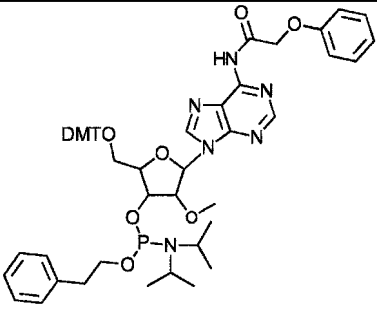
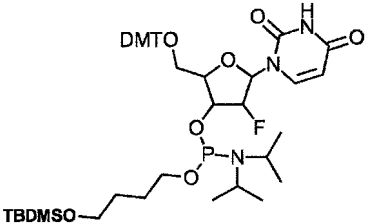
10

20

30

【 0 4 7 0 】

【表 10】

化合物 #	構造	31P NMR (ppm単位のδ)	収率 (%)
A15		155.4(s) 154.0 (s)	80
U54		155.4 (d, J 7.9Hz) 154.7 (d, J 9.7Hz)	54

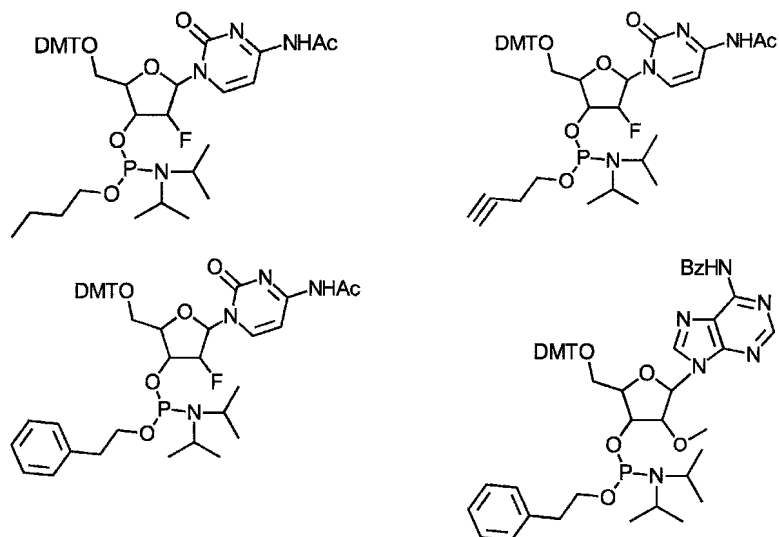
10

【0471】

本明細書に記載される合成方法は、本発明のポリヌクレオチドの調製に使用され得る他のホスホラミダイトモノマーを調製するのに使用され得る。例えば以下のとおりである。

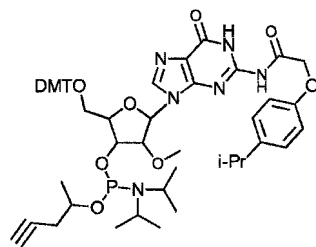
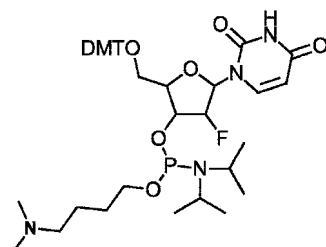
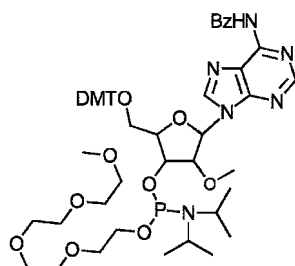
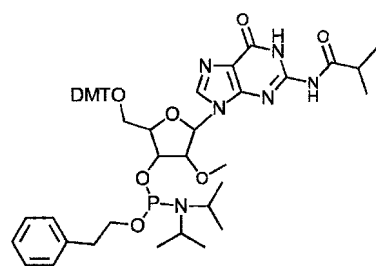
20

【化189】

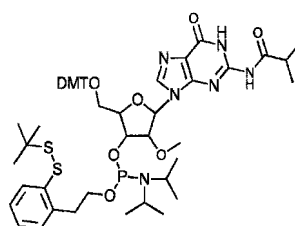
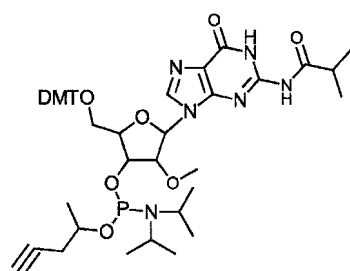


30

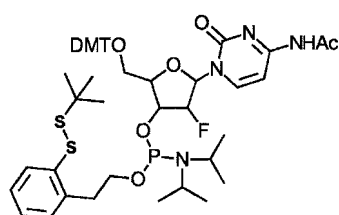
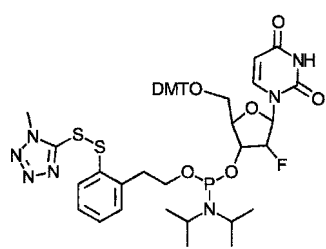
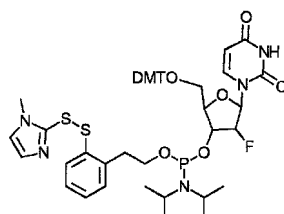
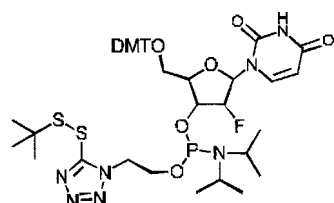
【化 190】



10

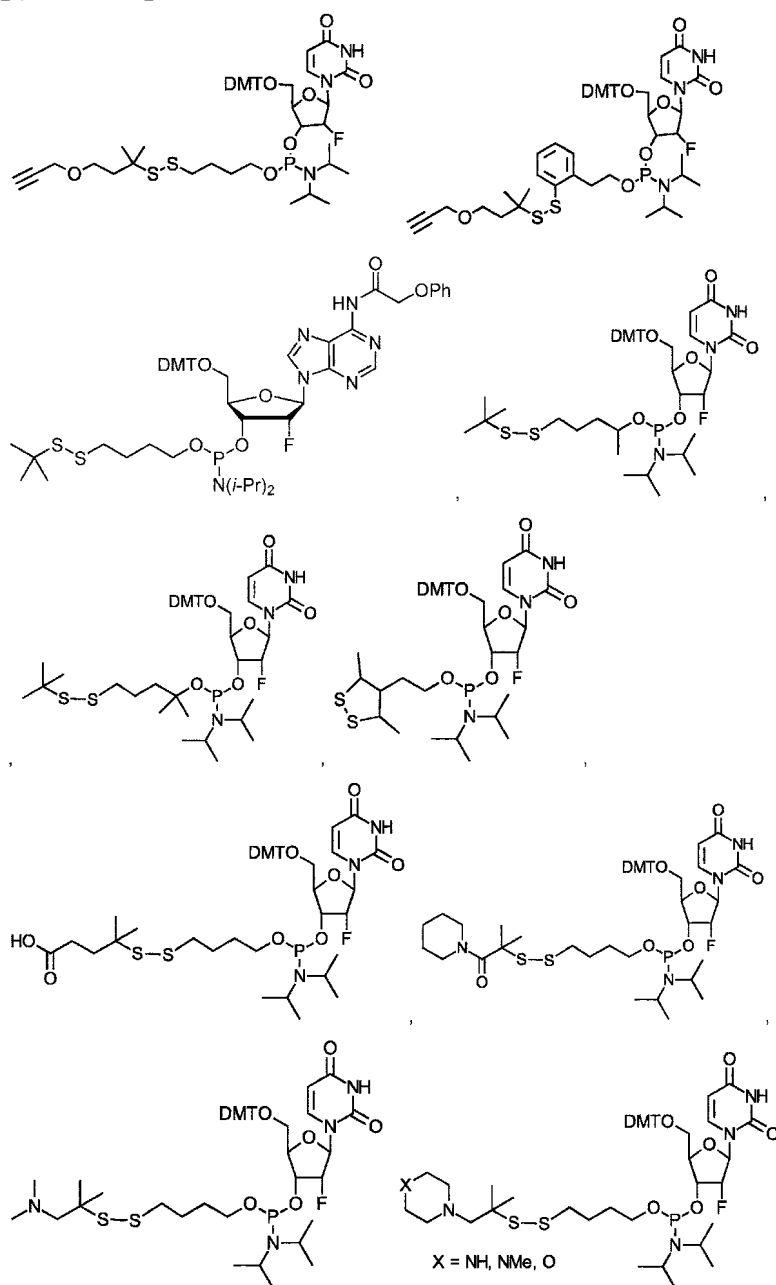


20

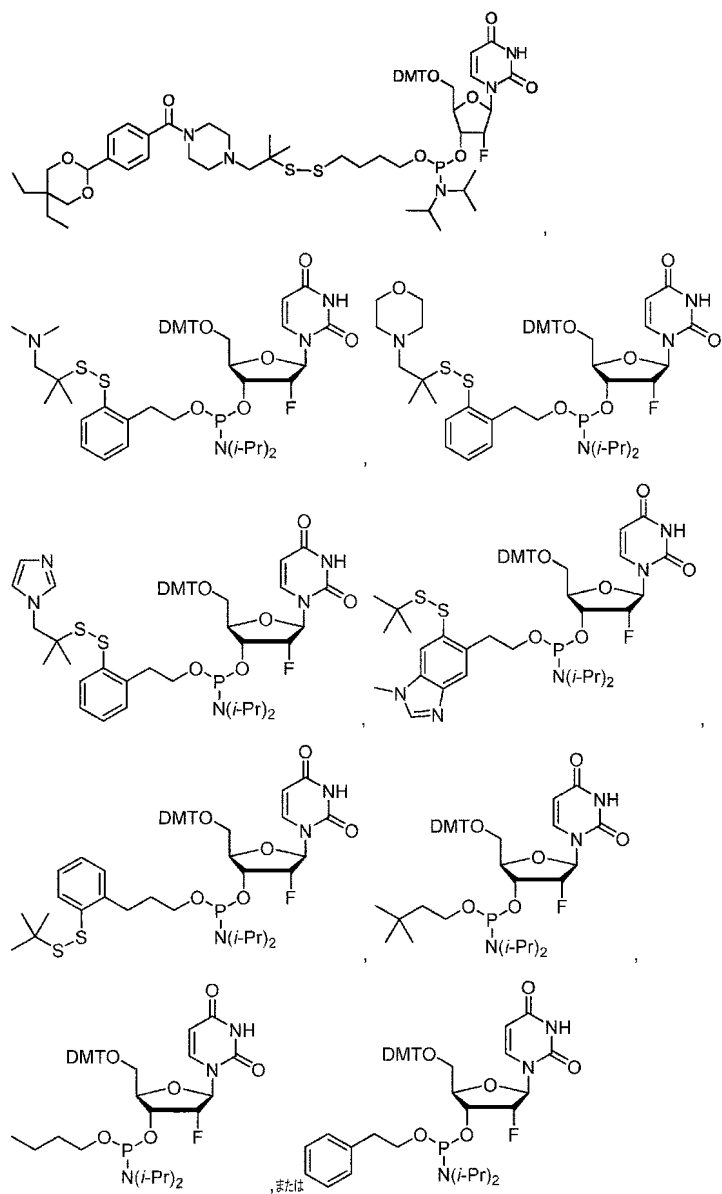


30

【化 1 9 1】



【化 1 9 2】



10

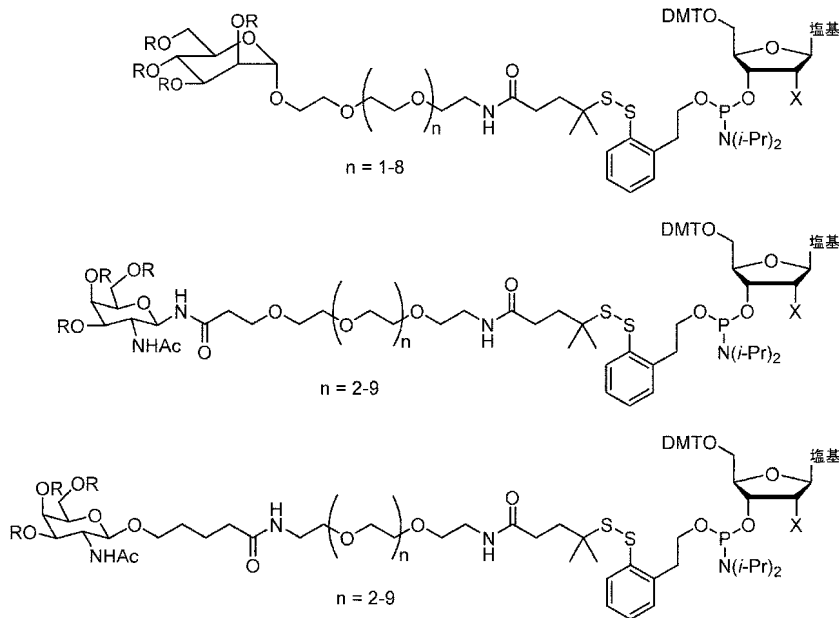
20

30

【0 4 7 2】

さらに、マンノース、GalNAcなどの標的化リガンドを有する以下のホスホラミダイトモノマーが、M21に記載される手順を用いて合成され得る。同様の手法が、他の小分子／ペプチド標的化リガンド、例えば葉酸塩、PSMA、CPPなどのために用いられ得る。

【化 1 9 3】



10

上記のスキーム中、Xが、F、OMe、2-メトキシエチル(MOE)などであり得；塩基が、U、C、A、Gであり得；Rが、Ac、tert-ブチルジメチルシリル(TBDM S)、アリルなどであり得る。

20

【0473】

細胞透過性ペプチド(タンパク質形質導入ドメイン)の合成

ペプチド合成：

合成：リンク(Rink)アミドポリスチレン樹脂(0.080g、0.61mmol/g)を反応容器に加え、7分間にわたってジメチルホルムアミド(5体積)中で、毎回窒素バブリングしながら3回膨潤させ、次に排液した。以下のサイクルを用いて、かつ標準的なFmoc化学を用いて、ペプチドのアセンブリを行った：

- ・ジメチルホルムアミド(DMF)中20%のピペリジンを用いたFmoc脱保護、3×4分；
- ・樹脂をDMFで洗浄、6×1分；
- ・カップリングには、5当量の保護アミノ酸、15当量のN-メチルモルホリン(NMM)、および5当量のHCTUを使用した。カップリング溶液を加えた後、反応を2×20分進行させた；
- ・カップリングの完了時に、樹脂をDMFで6×1分洗浄した；
- ・最終的なアセンブリ工程では、5当量のFmoc-6-ヒドラジノニコチン酸；DMF中の5当量のHATUおよび15当量のNMMを加え、Kaiser(ニンヒドリン)試験によって確認されるように、反応が完了するまで(約1時間)混合することによって、N末端キャップした。Fmocを、DMF中20%のピペリジンによって3×4分除去した；
- ・完成した樹脂結合ペプチドを、DMFで3回、ジクロロメタン(DCM)で3回洗浄し、次に、減圧下で乾燥させた。

30

40

【0474】

切断：2時間攪拌しながら、以下の溶液：トリフルオロ酢酸/ジチオスレイトール/水/アセトン/トリイソプロピルシラン(10ml、90/3/2/3/2)を用いて、ペプチドを、樹脂から切断/脱保護した。樹脂を、シリンジフィルターであるミディアムフリット(medium frit)に通してろ過し、非希釈トリフルオロ酢酸(TFA)で2回洗浄した。ろ液を組み合わせて、蒸発により体積を半分に減少させた。TFA溶液を攪拌し、4体積の氷冷エーテルのゆっくりとした添加によって、粗ペプチドを沈殿させた。沈殿した粗ペプチドをろ過によって収集した。

50

【0475】

精製：Phenomenex Luna C₁₈ (100×4.6mm 5μ) カラムを用いて、20分間にわたって、15～75%のB (A=0.1%のトリフルオロ酢酸/水；B=0.1%のトリフルオロ酢酸/アセトニトリル)を用いたLC/MSによって、粗材料を分析した。

【0476】

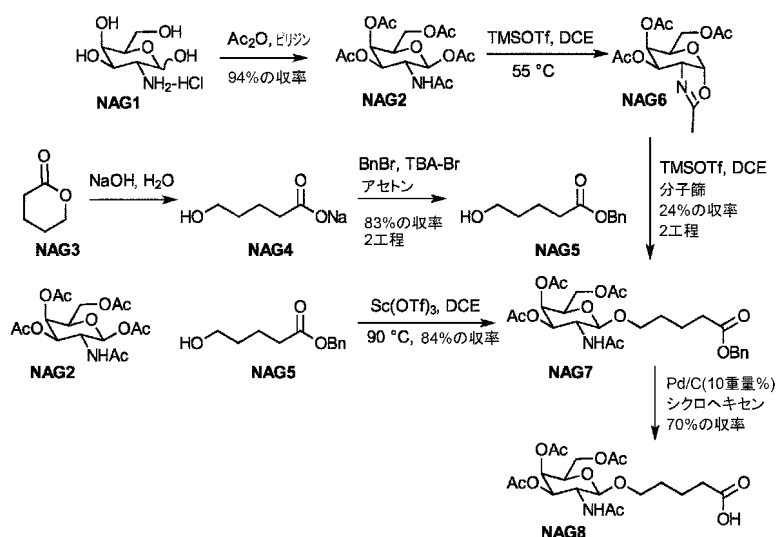
合成された細胞透過性ペプチド、エンドソーム溶解ペプチド、および特定の標的化部分の一覧が、表3に示される。

【0477】

標的化リガンドの合成

Ga1Nac (NAG) リガンド合成：

【化194】



五酢酸D-ガラクトサミン (NAG2) の調製。D-ガラクトサミン (25.0g、116mmol) を、無水ピリジン (250mL) 中で懸濁させ、不活性雰囲気下で0℃に冷却した。無水酢酸 (120mL、1160mmol) を、2時間かけて加えた。一晩攪拌した後、反応混合物を減圧下で濃縮した。メタノールを加えると、白色の固体が沈殿し、それをろ過によって収集したところ、所望の生成物 (42.1g、93%の収率) が得られた。¹H NMR (CDCl₃、500 MHz) : δ 5.69 (d, 1H, J 9.0 Hz)、5.40 (m, 1H)、5.37 (d, 1H, J 3.0 Hz)、5.08 (dd, 1H, J 3.0 Hz、11 Hz)、4.44 (dt, 1H, J 9.5 Hz、11 Hz)、4.17 (dd, 1H, J 7.0 Hz、11.5 Hz)、4.11 (d, 1H, J 7.0 Hz、11.5 Hz)、4.01 (t, 1H, J 7.0 Hz)、2.17 (s, 3H)、2.13 (s, 3H)、2.05 (s, 3H)、2.02 (s, 3H)、1.94 (s, 3H)、1.57 (s, 3H)。

【0478】

5-ヒドロキシペンタン酸ベンジル (NAG5) の調製。水 (100mL) 中のδ-バレロラクトン (10.0g、100mmol) およびNaOH (4.00g、100mmol) の溶液を70℃で一晩攪拌した。反応混合物を室温に冷まし、減圧下で濃縮したところ、白色の固体NAG4が得られた。この固体を、アセトン (100mL) 中で懸濁させ、臭化ベンジル (20.5g、120mmol) および臭化テトラブチルアンモニウム (1.61g、0.50mmol) とともに一晩還流させた。アセトンを減圧下で除去したところ、油状の残渣が得られ、それをEtOAcに溶解させ、飽和NaHCO₃ (水溶液) および塩水で洗浄した。有機層をNa₂SO₄上で乾燥させ、減圧下で濃縮したところ、NAG5が油状の生成物 (17.1g、82%の収率) として得られた。¹H NMR (CDCl₃、500 MHz) : δ 7.35 (m, 5H)、3.64 (q, 2H、

J 6 Hz、11.5 Hz)、2.41 (t, 2H、J 7.5 Hz)、1.75 (m, 2H)、1.60 (m, 2H)、1.44 (t, 1H、J 6 Hz)。

【0479】

ベンジルオキシカルボニルブチル2-デオキシ2-N-アセチル-3,4,6-トリ-O-アセチル-β-D-ガラクトピラノシド (NAG7) の調製-方法A。不活性雰囲気下で、TMSOTf (8.56 g、38.4 mmol) を、周囲温度で、DCE (100 mL) 中のNAG2 (10.0 g、25.6 mmol) の溶液に加えた。混合物を55℃で2時間攪拌し、熱から取り外し、一晩攪拌した。反応混合物を氷冷飽和NaHCO₃ (水溶液) に注ぎ、CH₂Cl₂ で抽出した。有機層をNa₂SO₄ 上で乾燥させ、減圧下で濃縮したところ、シロップNAG6 が得られた。DCE (60 mL) 中の溶液NAG6 に、アルコールNAG5 (8.00 g、38.4 mmol) および分子篩を仕込んだ。混合物を不活性雰囲気下に置き、TMSOTf (2.85 g、12.8 mmol) で処理し、室温で一晩攪拌した。混合物を氷冷飽和NaHCO₃ (水溶液) に注ぎ、CH₂Cl₂ で抽出した。有機層をNa₂SO₄ 上で乾燥させ、減圧下で濃縮したところ、シロップが得られた。この粗材料を、SiO₂ ゲルクロマトグラフィーによって精製したところ、グリコシドNAG7 (3.3 g、24%の収率) が得られた。¹H NMR (CDCl₃、500 MHz) : δ 7.35 (m, 5H)、5.98 (d, 1H、J 7.0 Hz)、5.57 (m, 1H)、5.34 (d, 1H、J 3.0 Hz)、5.25 (dd, 1H、J 3.0 Hz、11 Hz)、5.10 (s, 2H)、4.63 (d, 1H、J 8.5 Hz)、4.11 (m, 2H)、3.95 (m, 1H)、3.88 (m, 2H)、3.49 (m, 1H)、2.37 (m, 2H)、2.13 (s, 3H)、2.03 (s, 3H)、1.99 (s, 3H)、1.90 (s, 3H)、1.70 (m, 2H)、1.61 (m, 2H)。

10

20

【0480】

ベンジルオキシカルボニルブチル2-デオキシ2-N-アセチル-3,4,6-トリ-O-アセチル-β-D-ガラクトピラノシド (NAG7) の調製-方法B。DCE (50 mL) 中のNAG2 (5.00 g、12.8 mmol) およびアルコールNAG5 (5.33 g、25.6 mmol) の溶液に、Sc(OTf)₃ (0.44 g、0.90 mmol) を一度に加えた。混合物を不活性雰囲気下に置き、3時間還流させた。冷却後、混合物をCH₂Cl₂ で希釈し、飽和NaHCO₃ (水溶液) で洗浄し、MgSO₄ 上で乾燥させ、減圧下で濃縮した。SiO₂ ゲルクロマトグラフィーによる精製により、グリコシドNAG7 (5.53 g、80%の収率) が得られた。

30

【0481】

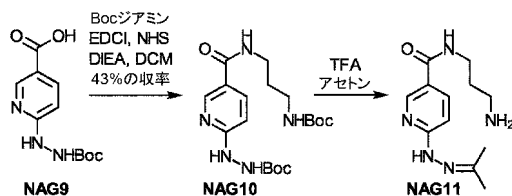
カルボキシブチル2-デオキシ2-N-アセチル-3,4,6-トリ-O-アセチル-β-D-ガラクトピラノシド (NAG8) の調製。EtOH (25 mL) 中のグリコシドNAG7 (1.50 g、2.41 mmol) の溶液を真空の付加およびアルゴンでのバックフィルによって脱気した。パラジウム触媒 (活性炭に担持されて10重量%、0.50 g) を一度に加え、混合物を真空の付加およびアルゴンでのバックフィルによって脱気した。この異種混合物に、シクロヘキセン (25 mL) を加え、6時間還流させた。冷却後、触媒をろ過によって除去し、母液を減圧下で濃縮した。粗生成物をSiO₂ ゲルクロマトグラフィーによって精製したところ、白色の発泡体NAG8 (0.76 g、70%の収率) が得られた。¹H NMR (CDCl₃、500 MHz) : δ 5.72 (d, 1H、J 8.5 Hz)、5.35 (d, 1H、J 3.5 Hz)、5.26 (dd, 1H、J 3.5 Hz、11.5 Hz)、4.67 (d, 1H、J 8.5 Hz)、4.17 (dd, 1H、J 6.5 Hz、11.5 Hz)、4.12 (dd, 1H、6.5 Hz、11.5 Hz)、4.00 (dt, 1H、J 8.5 Hz、11.5 Hz)、3.92 (m, 2H)、3.53 (m, 1H)、2.39 (m, 2H)、2.15 (s, 3H)、2.05 (s, 3H)、2.01 (s, 3H)、1.97 (s, 3H)、1.71 (m, 2H)、1.65 (m, 2H)。

40

【0482】

50

【化 1 9 5】

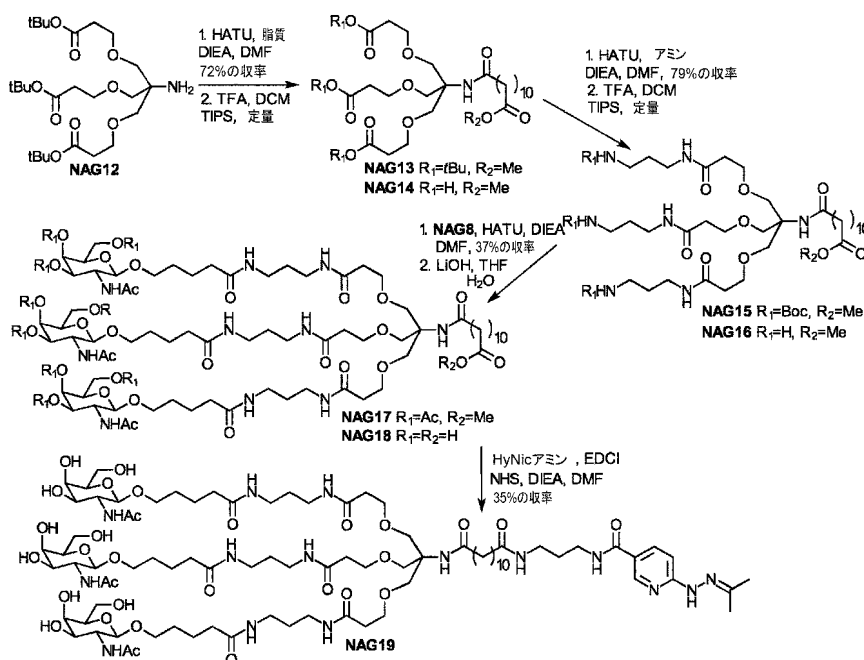


アミノプロピル 6-ヒドラジノニコタミドアセトンヒドラゾン (NAG11) の調製。
 DCM (20 mL) 中の Boc-6-ヒドラジノニコチン酸 (520 mg、2.1 mmol) を、EDCI (440 mg、2.3 mmol)、N-ヒドロキシスクシンイミド (NHS; 260 mg、2.3 mmol)、Boc-ジアミン (650 mg、2.6 mmol)、および DIEA (1.1 mL、6.2 mmol) で 3 時間処理した。反応混合物を減圧下で濃縮し、シリカゲルクロマトグラフィーによって精製したところ、NAG10 (364 mg、43% の収率) が得られた。¹H NMR (CDCl₃、500 MHz) : δ 8.55 (br, 1H)、7.93 (d, 2H、J 7.5 Hz)、7.45 (br, 1H)、7.12 (br, 1H)、6.62 (d, 1H、J 8.5 Hz)、5.17 (br, 1H)、3.42 (m, 2H)、3.13 (m, 2H)、1.65 (m, 2H)、1.41 (s, 18H)。HyNic アセトンヒドラゾンが、1 時間にわたる TFA (9 mL) およびアセトン (1 mL) での NAG10 (160 mg、0.4 mmol) の処理によって形成された。反応混合物を減圧下で濃縮し、高真空下に置いたところ、NAG11 が得られた。

【0483】

三価 GalNAc-HyNic の合成

【化 1 9 6】



トリス- (カルボキシエトキシメチル) -メチルアミドドデカンジオエトメチルエステル (NAG14) の調製。DMF (2 mL) 中の HATU (122 mg、0.50 mmol) および DIEA (218 μL、1.25 mmol) で活性化されたドデカン二酸メチルエステル (211 mg、0.42 mmol) の溶液に、トリスリンカー NAG12 を加えた。1 時間後、反応混合物を減圧下で濃縮し、SiO₂ ゲルクロマトグラフィーによって精製したところ、NAG13 (214 mg、70% の収率) が得られた。MALDI-TOF 質量計算値 C₃₈H₆₉NO₁₂ : 731.48、実測値 : 755.10 [M + Na]。トリス-ブチルエステル NAG13 を、TFA : TIPS : DCM (9 : 0

． 25 : 1) 混液 (10. 25 mL) で 4 時間加水分解し、減圧下で濃縮したところ、トリス酸 NAG 14 が得られた。MALDI-TOF 質量計算値 $C_{26}H_{45}NO_{12}$: 563. 29、実測値 : 565. 33 [M+H] 。

【0484】

トリス- (アミノプロピド-エトキシメチル) -メチルアミド-ドデカンジオエトメチルエステル (NAG 16) の調製。DMF (4 mL) 中の HATU (557 mg、1. 35 mmol) および DIEA (470 μ L、2. 70 mmol) で活性化されたトリス酸 NAG 14 (230 mg、0. 41 mmol) の溶液に、モノ Boc 1, 3-ジアミノプロパン (250 mg、1. 44 mmol) を加えた。1 時間後、反応物を減圧下で濃縮し、SiO₂ ゲルクロマトグラフィーによって精製したところ、NAG 15 (335 mg、79% の収率) が得られた。MALDI-TOF 質量計算値 $C_{50}H_{93}N_7O_{15}$: 1031. 67、実測値 : 1056. 40 [M+Na]。トリス Boc リンカー NAG 15 を、TFA : TIPS : DCM (9 : 0. 25 : 1) 混液 (10. 25 mL) で 1 時間処理し、減圧下で濃縮したところ、トリアミン NAG 16 が得られた。MALDI-TOF 質量計算値 $C_{35}H_{69}N_7O_9$: 731. 51、実測値 : 733. 18 [M+H] 。

10

【0485】

トリス-GalNAc (NAG 18) の調製：単糖 NAG 8 (192 mg、0. 43 mmol) を、DMF (2 mL) 中の HATU (163 mg、0. 43 mmol) および DIEA (150 μ L、0. 86 mmol) で処理した。30 分後、DMF (1 mL) 中の NAG 16 (80 mg、0. 11 mmol) の溶液を加え、混合物を 1 時間攪拌した。粗混合物を、SiO₂ ゲルクロマトグラフィーによって精製したところ、NAG 17 (82 mg、37% の収率) が得られた。質量計算値 $C_{92}H_{150}N_{10}O_{39}$: 2019. 00、実測値 : 2041. 85 [M+Na]。ペルアセチル化 (peracetylated) 三量体 GalNAc (82 mg、0. 04 mmol) を、THF : H₂O (3 : 1) 溶液 (8 mL) 中の LiOH $\cdot$ H₂O (34 mg、0. 81 mmol) での処理により加水分解したところ、NAG 18 が得られた。MALDI-TOF 質量計算値 $C_{73}H_{130}N_{10}O_{30}$: 1626. 89、実測値 : 1634. 52 [M+Li] 。

20

【0486】

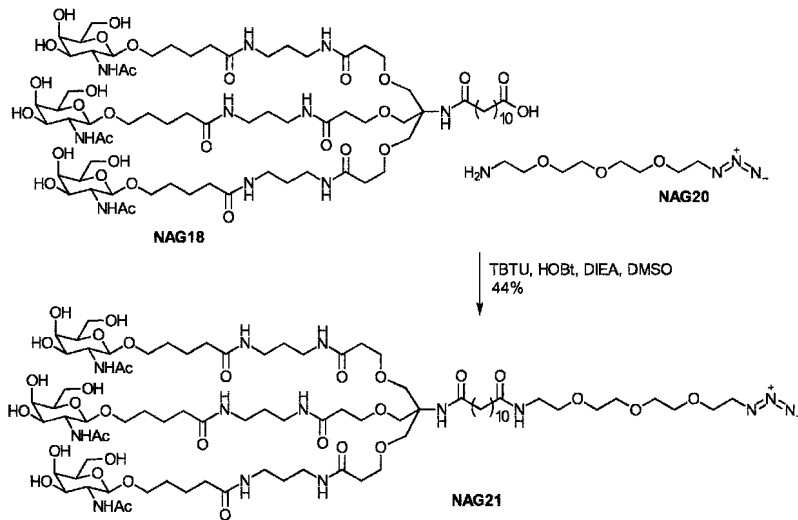
HyNic 三量体 GalNAc (NAG 19) の調製。DMF (1 mL) 中の GalNAc 三量体 NAG 18 (32 mg、0. 02 mmol) および HyNic アミン NAG 11 (20. 0 mg、0. 08 mmol) の溶液を、EDCI (16. 2 mg、0. 08 mmol)、NH₄S (2. 5 mg、0. 02 mmol)、および DIEA (28 μ L、0. 16 mmol) で処理し、4 時間攪拌した。減圧下で濃縮後、粗生成物を DMSO に溶解させ、RP-HPLC によって精製したところ、NAG 19 (12. 6 mg、35% の収率) が得られた。MALDI-TOF 質量計算値 $C_{85}H_{147}N_{15}O_{30}$: 1858. 04、実測値 : 1859. 83 [M+H] 。

30

【0487】

三価 GalNAc アジドの合成

【化 1 9 7】



10

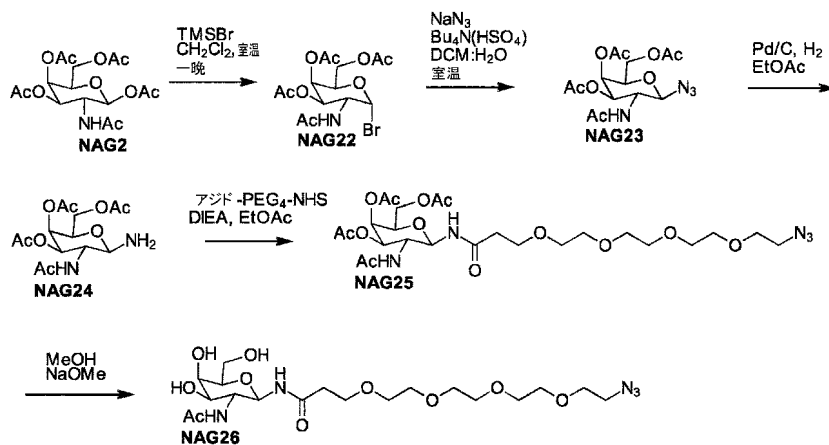
アジド-PEG₃-三量体GalNAc (NAG21) の調製。GalNAc 三量体カルボン酸NAG18 (60 mg、0.03 mmol)、アジド-PEG₃-アミンNAG20 (45.6 mg、0.21 mmol)、TBTU (23.8 mg、0.07 mmol)、HOBT (11.5 mg、0.03 mmol)、およびDIEA (34 μ L) を、DMSO (0.5 mL) に溶解させ、2 時間攪拌した。塩基を減圧下で除去し、粗生成物をRP-HPLCによって精製したところ、NAG21 (24 mg、44%) が得られた。AP-ESI+ 質量計算値 C₈₁H₁₄₆N₁₄O₃₂: 1827.02、実測値: 914.8 [M+2H]²⁺

20

【0488】

GalNAc アジドの合成

【化 1 9 8】



30

1-ブロモ2-デオキシ-2-アセトアミド3,4,6-トリ-O-アセチル- β -D-ガラクトピラノシド (NAG22) の調製。アルゴンバルーン下で、氷浴中0℃で、DCM (90 mL) 中の五酢酸D-ガラクトサミン (NAG2、10.0 g、1当量、25.8 mmol) 懸濁液に、プロモトリメチルシラン (4.1 mL、1.2当量、31 mmol) を、攪拌しながら滴下して加えた。氷浴を10分後に除去し、反応物を室温で一晩攪拌させた。反応の進行を、75%のヘキサン:酢酸エチル中でのTLC (Hanesian染色) によって確認した。反応混合物を減圧下で濃縮し、シクロヘキサン (3 $\times$ 50 mL) と共沸混合し、高真空下で一晩乾燥させ、得られた生成物をそのまま使用した。

40

【0489】

1-アジド2-デオキシ-2-アセトアミド3,4,6-トリ-O-アセチル- β -D-ガラクトピラノシド (NAG23) の調製。NAG22 (10.6 g、1.0当量、25.8 mmol) を、DCM (100 mL) に溶解させた。この溶液に、水 (100 mL

50

）中のアジ化ナトリウム（4.86 g、2.9当量、74.8 mmol）およびテトラブチルアンモニウム硫酸水素塩（8.32 g、0.95当量、24.5 mmol）を加えた。反応混合物を、1時間激しく攪拌した。反応の進行を、75%のヘキサン：酢酸エチル中でのTLC（Hanesians染色）によって確認した。反応混合物をDCM（2×50 mL）で抽出した。有機層を無水MgSO₄上で乾燥させ、減圧下で濃縮した。次に、この材料を、シリカゲルフラッシュクロマトグラフィー（3：1ヘキサン：酢酸エチル）によって精製した。単離された材料の¹H NMRは、公開された構造と一致していた。M+H=373.0

【0490】

1-アミノ2-アセトアミド1, 2-ジデオキシ3, 4, 6-トリ-O-アセチル-β-D-ガラクトピラノース（NAG24）の調製。酢酸エチル（25 mL）に溶解されたNAG23（0.26 g、1当量、0.7 mmol）に、パラジウム炭素（約26 mg）を加えた。次に、水素バルーンおよび真空ラインを挿入した。反応混合物を3回排気し、各排気の後、水素でバージした。反応混合物を室温で1時間攪拌した。1時間後、LC/MSにより、生成物の形成が確認された。反応混合物を、Celite（登録商標）の床上でろ過し、それを3×10 mLのEtOAcで洗浄した。組み合わされたる液を減圧下で濃縮し、さらに精製せずに次の工程に使用した。M+H=346.6

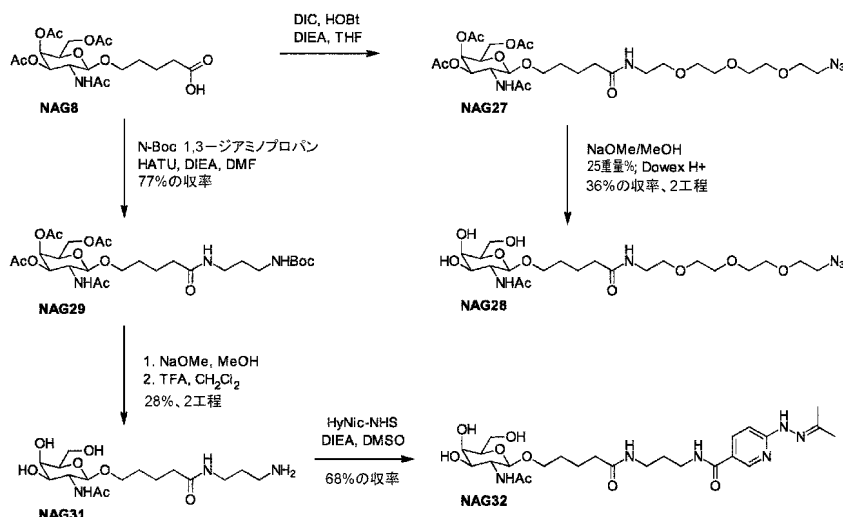
【0491】

1-アミノ（15'-アジド-テトラエチレングリコールプロパノイル）2-アセトアミド1, 2-ジデオキシ-β-D-ガラクトピラノシド（NAG26）の調製。酢酸エチル（45 mL）およびDIEA（0.24 mL、2当量、1.4 mmol）に溶解されたNAG24（0.24 g、1当量、0.7 mmol）に、酢酸エチル（5 mL）中のアジド-PEG₄-NHS（0.41 g、1.5当量、1.05 mmol）を、アルゴン雰囲気下で攪拌しながら、滴下して加えた。反応物を室温で一晩攪拌させた。反応の完了をLC/MSによって確認した。M+H=619.5。酢酸エチルを減圧下で除去し、得られた材料をさらに精製せずに次の工程に使用した。MeOH（10 mL）に溶解されたNAG25（0.43 g、1当量、0.7 mmol）に、100 μLの、メタノール中25%のナトリウムメトキシド溶液を加えた。反応混合物を、アルゴン雰囲気下で、室温で1時間攪拌した。1時間後、LC/MSにより、出発材料のみが示され、その時点で、500 μLの、メタノール中25%のナトリウムメトキシド溶液を加えた。1時間後、LC/MSにより、生成物の形成および出発材料の消失が示された。Dowex樹脂を、溶液のpHが約7に達するまで加えた。樹脂をろ過によって除去し、溶媒を減圧下で除去し、残渣を逆相HPLCによって精製した。M+H=493.7。

【0492】

一価GalNAc HyNicの合成

【化 1 9 9】



10

〔5-（2-〔2-〔2-（2-アジドエトキシ）エトキシ〕エトキシ〕エチルアミノ）-5-オキソペンタノイル〕2-デオキシ2-N-アセチル-3, 4, 6-トリ-O-アセチル-β-D-ガラクトピラノシド（NAG27）の調製。THF（8 mL）中のNAG8（1.00 g、2.24 mmol）の溶液に、DIC（0.56 g、4.48 mmol）およびHOBT（0.25 g、2.17 mmol）を加えた。1時間後、白色の沈殿物が形成され、反応混合物を0℃に冷却した。THF（2 mL）中のアジド-PEG3-アミン（0.63 g、2.91 mmol）の溶液を加え、反応物をさらに1時間攪拌した。RP-HPLCMSにより、NAG27の形成が示された。ESI MS+ 質量計算値C₂₇H₄₅N₅O₁₃：647.7、実測値：647.8 [M+H]。沈殿物をろ過によって除去し、反応混合物を減圧下で濃縮したところ、高粘度のシロップが得られた。

20

【0493】

〔5-（2-〔2-〔2-（2-アジドエトキシ）エトキシ〕エトキシ〕エチルアミノ）-5-オキソペンタノイル〕2-デオキシ2-N-アセチル-β-D-ガラクトピラノシド（NAG28）の調製。粗NAG27を無水メタノール（10 mL）に溶解させ、MeOH（25重量%、250 μL）中のNaOMeで処理した。反応混合物を室温で一晩攪拌した。RP-HPLCMSにより、NAG27の消費およびNAG28の形成が示された。ESI MS+ 質量計算値C₂₁H₃₁N₅O₁₀：521.6、実測値：522.3 [M+H]。Dowex H+樹脂を加えて、塩基を中和し、次に、樹脂をろ過によって除去し、溶液を減圧下で濃縮した。粗生成物NAG28をRP-HPLCによって精製したところ、0.42 g（2工程で36%の収率）が得られた。

30

【0494】

〔〔3-（tert-ブトキシカルボニルアミノ）プロピルアミノ〕〕-5-オキソペンタノイル〕2-デオキシ2-N-アセチル-3, 4, 6-トリ-O-アセチル-β-D-ガラクトピラノシド（NAG29）の調製。DMF（3 mL）中のNAG8（0.29 g、0.65 mmol）を、HATU（0.25 g、0.65 mmol）およびDIEA（0.34 mL、1.95 mmol）で活性化した。10分後、モノ-Boc保護1, 3-ジアミノプロパン（0.13 g、0.72 mmol）を加え、得られた混合物を2時間攪拌した。混合物を減圧下で濃縮し、SiO₂クロマトグラフィーによって精製したところ、NAG29（0.30 g、77%の収率）が得られた。ESI MS+ 質量計算値C₂₇H₄₅N₃O₁₂：603.7、実測値：626.8 [M+Na]。

40

【0495】

〔〔3-（アミノ）プロピルアミノ〕〕-5-オキソペンタノイル〕2-デオキシ2-N-アセチル-β-D-ガラクトピラノシド（NAG31）の調製。無水メタノール中の

50

NAG29 (0.30 g、0.50 mmol) の溶液を、MeOH (25 重量%、50 μ L) 中の NaOMe で処理した。20 分後、TLC により、NAG29 の完全な消費が示された。Dowex strong H+樹脂を加えて、反応混合物を酸性化し、次に、それを30分間攪拌した。樹脂をろ過によって除去し、MeOH 中1%のTEAおよび1MのNaOH (水溶液) で洗浄した。ろ液を1MのHCl (水溶液) で中和し、減圧下で濃縮したところ、NAG31 (0.052 g、28%の収率) が得られた。ESI MS + 質量計算値 $C_{16}H_{31}N_3O_7$: 377.4、実測値 : 377.6 [M+H]。

【0496】

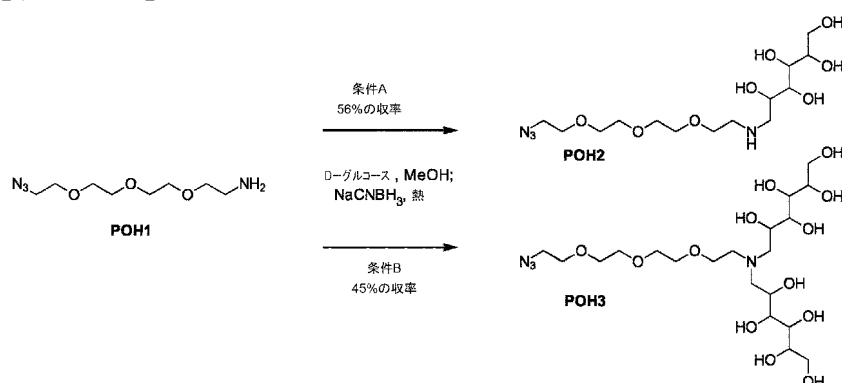
({ 3 - [6 - (イソプロピリデンヒドラジノ) - ニコチノイルアミノ] プロピルアミノ } - 5 - オキソペンタノイル) 2 - デオキシ 2 - N - アセチル - β - D - ガラクトピラノシド (NAG32) の調製。MSO (1 mL) 中の溶液 NAG31 (0.009 g、22 μ mol) を、HyNics スルホ-NHS (0.007 g、18 μ mol) および DIEA (9.4 μ L、54 μ mol) で1時間処理し、RP-HPLC によって精製したところ、NAG32 TFA 塩 (0.010 g、68%の収率) が得られた。ESI MS + 質量計算値 $C_{25}H_{40}N_6O_8$: 552.6、実測値 : 554.0 [M+H]。

【0497】

グルシトール補助部分の合成：

ジ-グルシトールアジド補助部分の合成

【化200】



2 - { 2 - [2 - (2 - アジドエトキシ) エトキシ] エトキシ } エチルアミノ D - グルシトール (POH2) の調製。メタノール (2 mL) 中の D - グルコース (0.093 g、0.52 mmol) およびアミノ-Peg3-アジド (0.11 g、0.52 mmol) の反応溶液を、室温で3時間攪拌した。1 mL のメタノール中の $NaBH_3CN$ (0.033 g、0.52 mmol) を反応混合物に加えた後、1滴の酢酸を加えた。反応混合物を室温で16時間攪拌し、その時点で、混合物を減圧下で濃縮し、分取HPLC によって精製したところ、0.11 g の生成物 POH2 が油 (56%の収率) として得られた。 $C_{14}H_{30}N_4O_8$ についての ESI MS 計算値 382.4、実測値 [M+H]⁺ 383.0。

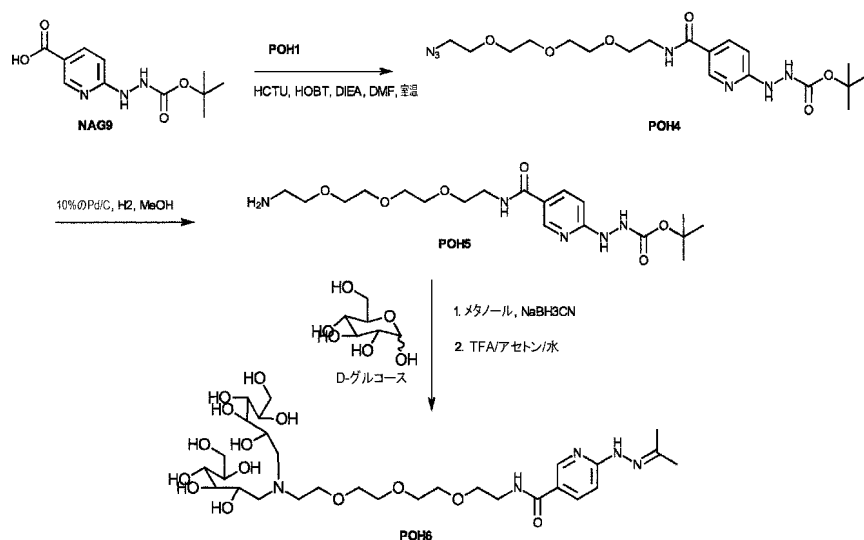
【0498】

2 - { 2 - [2 - (2 - アジドエトキシ) エトキシ] エトキシ } エチルアミノ 1, 1 - ビス (D - グルシトール) (POH3) の調製。メタノール (3 mL) 中の D - グルコース (0.19 g、1.04 mmol) およびアミノ-Peg3-アジド (0.11 g、0.52 mmol) の反応溶液を室温で3時間攪拌した。1 mL のメタノール中の $NaBH_3CN$ (0.065 g、1.04 mmol) を反応混合物に加えた後、1滴の酢酸を加えた。反応混合物を室温で16時間攪拌し、その時点で、混合物を減圧下で濃縮し、分取HPLC によって精製したところ、0.13 g の生成物 POH3 が油 (45%の収率) として得られた。 $C_{20}H_{42}N_4O_{13}$ についての ESI MS 計算値 546.6、実測値 [M+H]⁺ 547.0。

【0499】

ジーグルシトール H y N i c 補助部分の合成

【化 2 0 1】



10

20

30

40

50

(2- {2- [2- (2-アジドエトキシ) エトキシ] エトキシ} エチルアミノ) {6- [(tert-ブチル)-2-カルボキシヒドラジノ]-3-ピリジル} ホルムアルデヒド (POH4) の調製。DMF (5 mL) 中の 6-Boc-ヒドラジノニコチン酸 (NAG9、0.25 g、1.0 mmol)、アミノ-Peg3-アジド (POH1、0.22 g、1.0 mmol)、HCTU (0.83 g、2.0 mmol) および HOBT・H₂O (0.31 g、2.0 mmol) の溶液に、DIPEA (0.70 mL、2.0 mmol) を室温に加えた。反応混合物を 16 時間攪拌し、その時点で、混合物を減圧下で濃縮した。粗混合物を 30 mL のジクロロメタンで希釈し、飽和 NaHCO₃ 溶液 (10 mL) および塩水 (10 mL) によって連続して洗浄し、無水 Na₂SO₄ 上で乾燥させた。溶媒を減圧下で蒸発させ、(酢酸エチル、5% のメタノール) / ヘキサン溶媒系 (Combi Flash Rf Instrument で 0~100% の勾配) を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって、粗混合物を精製したところ、0.098 g の中間体 POH4 が無色油 (22% の収率) として得られた。C₁₉H₃₇N₇O₆ についての ESI MS 計算値 453.5、実測値 [M+H]⁺ 454.0。

【0500】

(2- {2- [2- (2-アミノエトキシ) エトキシ] エトキシ} エチルアミノ) {6- [(tert-ブチル)-2-カルボキシヒドラジノ]-3-ピリジル} ホルムアルデヒド (POH5) の調製。4 mL のメタノール中の化合物 POH4 (0.098 g、0.22 mmol) および触媒量の Pd/炭素 (10% w/w) を、室温で 1 時間にわたって水素雰囲気曝した。反応混合物をろ過し、ろ液を減圧下で濃縮したところ、0.090 g の POH5 が油 (98% の収率) として得られ、それをさらに精製せずに次の反応に使用した。C₁₉H₃₃N₅O₆ についての ESI MS 計算値 427.5、実測値 [M+H]⁺ 428.0。

【0501】

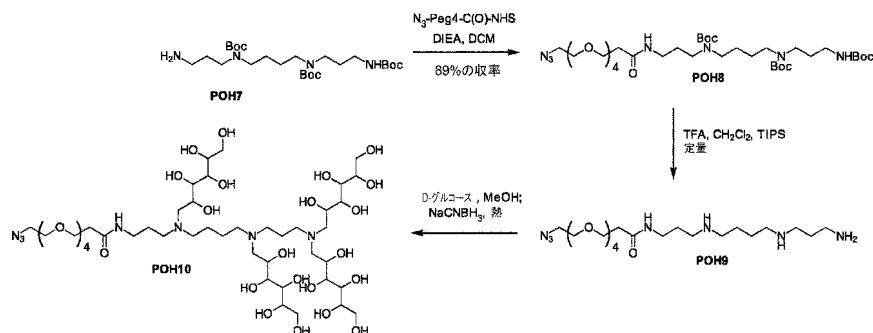
{2- [2- (2- {2- [ビス(2, 3, 4, 5, 6-ペンタヒドロキシヘキシル) アミノ] エトキシ} エトキシ) エトキシ] エチルアミノ} [6- (イソプロピリデンヒドラジノ)-3-ピリジル] ホルムアルデヒド (POH6) の調製。5 mL のメタノール中の D-グルコース (0.16 g、0.86 mmol) および化合物 POH5 (0.09 g、0.22 mmol) の溶液を室温で 3 時間攪拌した。1 mL のメタノール中の NaBH₃CN (0.054 g、0.86 mmol) を反応混合物に加えた後、1 滴の酢酸を加え、反応混合物を室温で 16 時間攪拌した。この懸濁液に、さらなる分量の D-グルコース (0.16 g、0.86 mmol) を加え、混合物を 3 時間攪拌し、その時点で、1 mL のメタノール中の NaBH₃CN (0.054 g、0.86 mmol) を加えた後、1 滴

の酢酸を加えた。反応混合物を室温で16時間さらに攪拌した。分取HPLCによる精製後、得られた生成物を、トリフルオロ酢酸／アセトン（90：10、v／v）で15分間処理してから、その時点で、生成物を分取HPLCによって精製した。HPLC画分の凍結乾燥により、3.0mgの生成物POH6が油（2%の収率）として得られた。 $C_{29}H_{53}N_5O_{14}$ についてのESI MS 計算値695.7、実測値 $[M+H]^+$ 696.0。

【0502】

テトラグルシトールアジド補助部分の合成

【化202】



10

3- {N-tert-ブトキシカルボニル [4- ({3- [3- (2- {2- [2- (2-アジドエトキシ) エトキシ] エトキシ} エトキシ) プロピオニルアミノ] プロピル} -N-tert-ブトキシカルボニルアミノ) ブチル] アミノ} プロピルアミノ 2, 2-ジメチルプロピオネート (POH8) の調製。DCM (3 mL) 中のPOH7 (0.18 g、0.36 mmol) の溶液を、NHSアジド-PEG₄カルボキシレート (0.13 g、0.33 mmol) およびDIEA (0.12 mL、0.66 mmol) で処理した。混合物を室温で1時間攪拌し、生成物の形成をRP-LCMSによって確認した。反応物を減圧下で濃縮し、SiO₂クロマトグラフィーによって精製したところ、POH8 (0.23 g、89%の収率) が得られた。ESI MS+ 質量計算値 $C_{36}H_{69}N_7O_{11}$: 775.5、実測値 : 776.0 $[M+H]^+$ 。

20

【0503】

1- {3- [4- (3-アミノプロピルアミノ) ブチルアミノ] プロピルアミノ} -3- (2- {2- [2- (2-アジドエトキシ) エトキシ] エトキシ} エトキシ) -1-プロパノン (POH9) の調製。CH₂Cl₂ (2 mL) 中のトリ-*Boc* POH8 (0.23 g、0.29 mmol) を、TFA (10 mL) およびTIPS (0.10 mL) で1時間処理し、減圧下で濃縮すると、POH9が定量的収率で得られた。POH9をさらに精製せずに次の工程に使用した。ESI MS+ 質量計算値 $C_{21}H_{45}N_7O_5$: 475.4、実測値 : 476.0 $[M+H]^+$ 。

30

【0504】

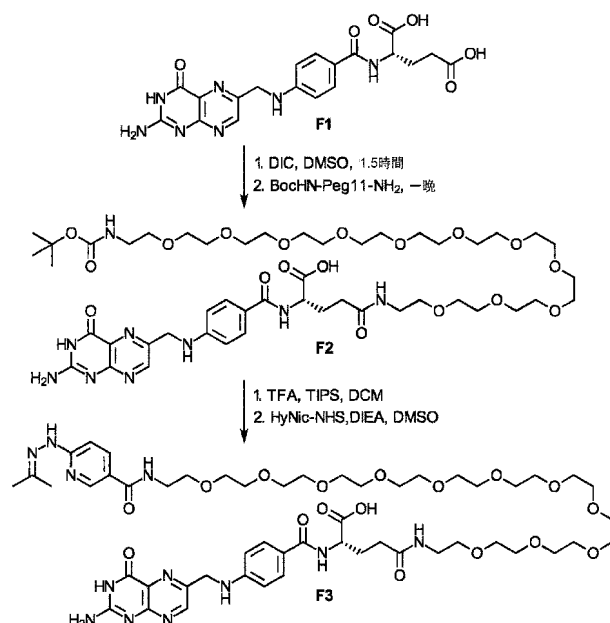
1- {3- [4- (3-アミノプロピルアミノ) ブチルアミノ] プロピルアミノ} -3- (2- {2- [2- (2-アジドエトキシ) エトキシ] エトキシ} エトキシ) -1-プロパノン (POH10) の調製。MeOH (10 mL) 中の、トリ-アミンPOH9 (0.29 mmol) と、D-グルコース (1.46 g、8.11 mmol) と、NaCNBH₃ (0.15 g、2.34 mmol) との混合物を、4時間にわたって50℃に加熱した。D-グルコースの3および4付加物の混合物が観察された。所望の付加物POH10 (0.016 g) を、RP-HPLCを用いて単離した。ESI MS+ 質量計算値 $C_{45}H_{93}N_7O_{25}$: 1132.3、実測値 : 1132.6 $[M+H]^+$ 。

40

【0505】

葉酸塩リガンドの合成：

【化 2 0 3】



10

N-Boc-Peg₁₁ 葉酸塩 (F2) の調製。DMSO (4 mL) 中の葉酸 (225 mg、0.51 mmol) の溶液に、ジイソプロピルカルボジイミド (80 μ L、0.51 mmol) を加えた。1.5 時間攪拌した後、DMSO (1 mL) 中の Boc-Peg₁₁-ジアミン (220 mg、0.34 mmol) の溶液を加え、反応物を一晩攪拌した。水 (35 mL) を加えると、沈殿物が形成され、それをろ過によって収集し、RP-HPLCによって精製したところ、F2 (364 mg、67% の収率) が得られた。MALDI-TOF 質量計算値 C₄₈H₇₇N₉O₁₈: 1067.54、実測値: 1069.89 [M+H]。

20

【0506】

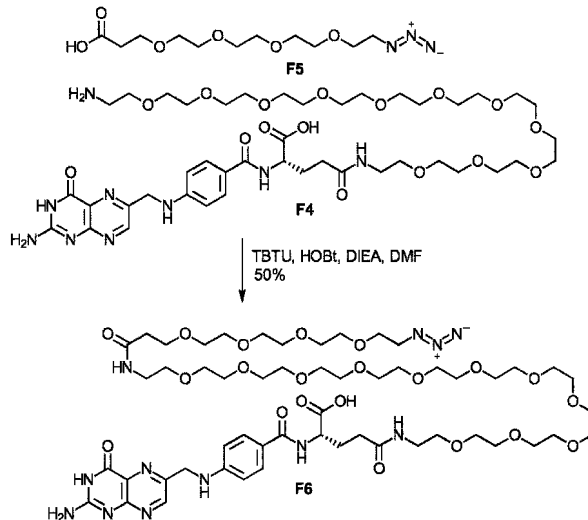
葉酸塩-peg₁₁-HyNic アセトンヒドラゾン (F3) の調製。モノBocF2 (210 mg、0.2 mmol) を、TFA (9 mL) およびアセトン (1 mL) で1.5 時間処理し、得られた混合物を減圧下で濃縮し、残渣を高真空下で乾燥させた。MALDI-TOF 質量計算値 C₄₃H₆₉N₉O₁₆: 967.48、実測値: 969.86 [M+H]。黄色がかった粗生成物固体をDMSO (200 μ L) に溶解させ、HyNic-NHS エステル (10.0 mg、0.03 mmol) およびDIEA (40 μ L、0.23 mmol) の溶液で1.5 時間処理した。粗生成物をRP-HPLCによって精製したところ、F3 (1.2 mg、3.5% の収率) が得られた。MALDI-TOF 質量計算値 C₅₂H₇₈N₁₂O₁₇: 1142.56、実測値: 1144.03 [M+H]。

30

【0507】

一価葉酸塩アジドの合成

【化 2 0 4】



10

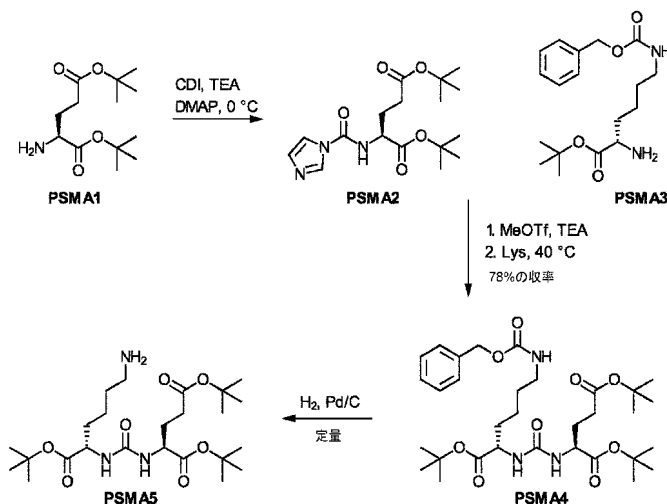
アジド- Peg_4 -アミド- Peg_{11} 葉酸塩 (F6) の調製。DMSO (1.0 mL) 中のアミノ- Peg_{11} 葉酸塩 F4 (115 mg、0.12 mmol) を、DMSO (1.0 mL) 中の TBTU (42 mg、0.13 mmol)、HOBT (20 mg、0.13 mmol)、および DIEA (63 μL 、0.36 mmol) で活性化されたアジド- Peg_4 酸 (38 mg、0.13 mmol) の溶液に加えた。2 時間後、塩基を減圧下で除去し、粗生成物を RP-HPLC によって精製したところ、F6 (75 mg、50%) が得られた。AP-ESI+ 質量計算値 $\text{C}_{54}\text{H}_{88}\text{N}_{12}\text{O}_{21}$: 1240.61、実測値: 1241.7 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 、621.5 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$

20

【0508】

PSMA リガンドの合成

【化 2 0 5】



30

40

Cbz-Lys ウレイド Glu トリス- α -ブチルエステル (PSMA4) の調製。CH₂Cl₂ (10.0 mL) 中のグルタミン酸ジ- α -ブチルエステル (1.06 g、3.58 mmol)、DMAP (27 mg)、および TEA (1.25 mL、8.95 mmol) の氷冷溶液に、CDI (638 mg、3.94 mmol) を一度に加えた。30 分後、反応物を氷浴から取り出し、一晩攪拌した。反応物を CH₂Cl₂ で希釈し、飽和 NaHCO₃ (水溶液)、水、および塩水で洗浄した。Na₂SO₄ 上で乾燥させた後、有機層を減圧下で濃縮し、高真空下で乾燥させたところ、PSMA2 が得られた。DCE (10 mL) 中の PSMA2 の溶液を 0 °C に冷却し、MeOTf (0.59 g、3.

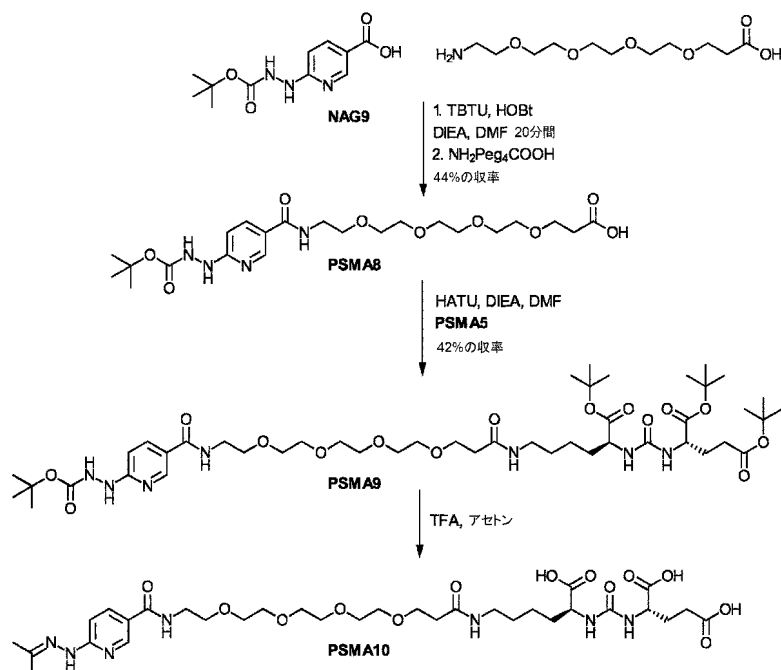
50

ESI⁺ 質量計算値 $C_{23}H_{40}N_6O_{12}$: 592.27、実測値 : 593.3 [M+H]⁺

【0512】

一価PSMA HyNic (PSMA10) の合成

【化207】



N-Boc-4-ヒドロジノニコチンアミドPeg₄酸 (PSMA8) の調製。N-Boc-4-ヒドロジノニコチン酸NAG9 (137mg、0.54mmol) を、DMF中のTBUTU (124mg、0.49mmol)、HOBT (83mg、0.54mmol)、およびDIEA (128μL、0.74mmol) で20分間処理した。活性化エステルに、アミノ-Peg₄-酸 (130mg、0.49mmol) の溶液を加え、混合物を2時間攪拌した。反応物を減圧下で濃縮し、SiO₂ゲルクロマトグラフィーによって精製したところ、PSMA8 (107mg、44%) が得られた。AP-ESI⁺ 質量計算値 $C_{22}H_{36}N_4O_9$: 500.25、実測値 : 501.3 [M+H]⁺

【0513】

N-Boc-4-ヒドロジノニコチンアミドPeg₄-ε-アミドlys-α-ウレイドーgluトリートーブチルエステル (PSMA9) の調製。PSMA8 (107mg、0.21mmol) を、1時間にわたってDMF中のアミンPSMA5 (104mg、0.21mmol) の存在下で、HATU (81mg、0.21mmol) およびDIEA (93μL、0.53mmol) で処理した。次に、反応混合物を減圧下で濃縮し、SiO₂ゲルクロマトグラフィーによって精製したところ、PSMA9 (85mg、42%) が得られた。AP-ESI⁺ 質量計算値 $C_{46}H_{79}N_7O_{15}$: 969.46、実測値 : 760.6 [M+H]⁺

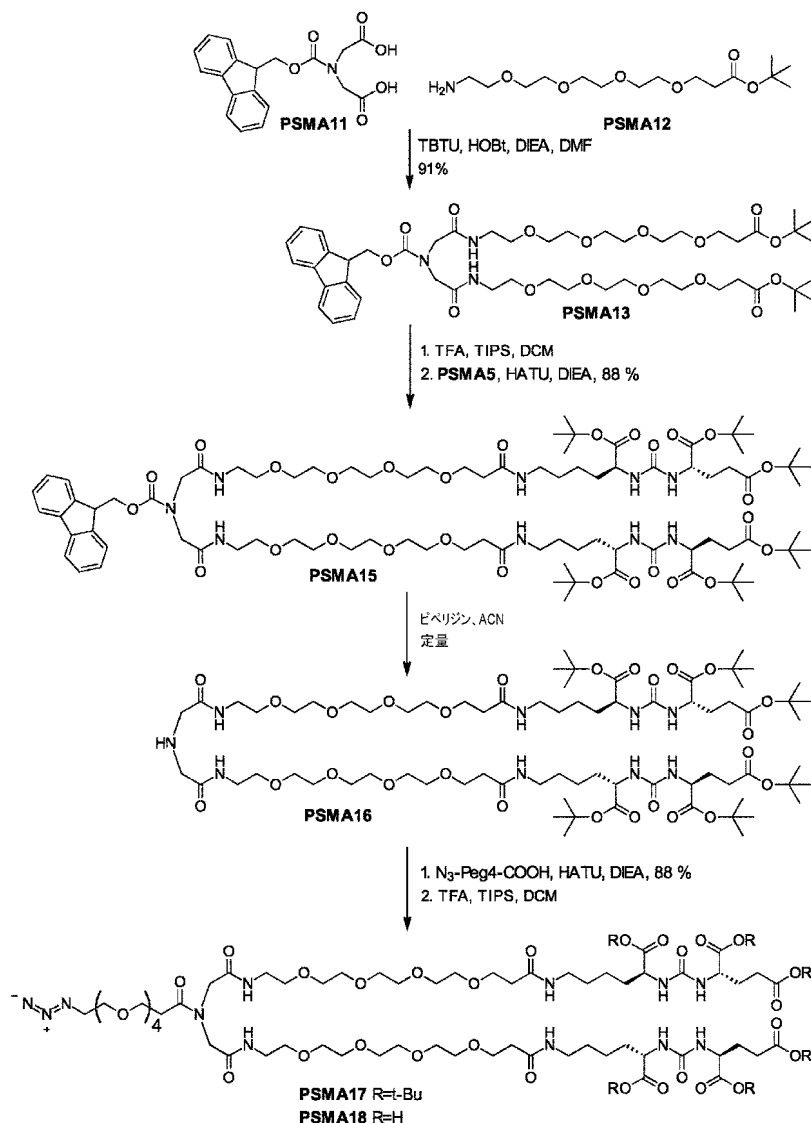
【0514】

ジメチル4-ヒドロジノニコチンアミドPeg₄-ε-アミドlys-α-ウレイドーglu (PSMA10) の調製。トリス-ε-ブチルエステルPSMA9 (85mg、0.09mmol) を、TFA : アセトン (10mL、97.5 : 2.5, v/v) の溶液で30分間処理した。RP-HPLCMSにより、所望の生成物への完全な転化が示された。反応混合物を減圧下で濃縮し、RP-HPLCによって精製したところ、PSMA10 (55mg、84%) が得られた。AP-ESI⁺ 質量計算値 $C_{32}H_{51}N_7O_{13}$: 741.35、実測値 : 742.4 [M+H]⁺

【0515】

二価PSMAアジド (PSMA18) の合成

【化 208】



10

20

30

N-Fmoc-bis-imino-(acetamido-Peg₄-t-butyl ester) (PSMA13) の調製。N-Fmoc-imino-diacetic acid、PSMA11、(107 mg、0.30 mmol) を、2 時間にわたって DMF 中の PSMA12 (212 mg、0.66 mmol)、TBTU (193 mg、0.60 mmol)、HOBT (92 mg、0.60 mmol)、および DIEA (209 μ L、1.20 mmol) で処理した。反応物を減圧下で濃縮し、SiO₂ ゲルクロマトグラフィーによって精製したところ、PSMA13 (250 mg、91%) が得られた。AP-ESI+ 質量計算値 C₄₉H₇₅N₃O₁₆: 961.51、実測値: 962.6 [M+H]⁺、984.6 [M+Na]⁺

【0516】

N-Fmoc-bis-imino-(acetamido-Peg₄- ϵ -amido-lysine- α -ureidyl-glycyl-t-butyl ester) (PSMA15) の調製。DCM (1 mL) 中のジ-t-butyl ester PSMA13 (250 mg、0.26 mmol) を、TFA (10 mL) および TIPS (111 μ L、0.54 mmol) で処理した。30 分後、反応物を減圧下で濃縮したところ、シロップが得られ、それをヘキサンで洗浄したところ、二酸 PSMA14 が高粘度のシロップとして得られた。PSMA14 を、1 時間にわたって DMF 中の HATU (198 mg、0.54 mmol)、PSMA5 (292 mg、0.57 mmol)、および DIEA (362 μ L、2.08 mmol) で処理した。反応混合物を減圧下で濃縮し、SiO₂ ゲルクロマトグラフィーによって精製したところ、PSMA15 (408 mg、88%) が得られた。PSMA14: AP-ESI+ 質量計

40

50

算値 $C_{41}H_{59}N_3O_{16}$: 849.39、実測値 : 850.5 $[M+H]^+$ 、872.5 $[M+Na]^+$ 。P S M A 15 : A P - E S I + 質量計算値 $C_{89}H_{145}N_9O_{28}$: 1788.02、実測値 : 895.3 $[M+2H]^{2+}$ 、917.2 $[M+2Na]^{2+}$

【0517】

ビス-イミノ- (アセトアミド-Peg₄-ε-アミドlys-α-ウレイド-glutro-*t*-ブチルエステル) (P S M A 16) の調製。アセトニトリル (10 mL) 中の N-Fmoc P M S A 15 (408 mg、0.22 mmol) を、ピペリジンで30分間処理した。反応混合物を減圧下で濃縮し、PhMe (3×10 mL) と共沸混合し、ヘキサン (3×20 mL) で洗浄し、高真空下で乾燥させたところ、P S M A 16 が得られた。A P - E S I + 質量計算値 $C_{74}H_{135}N_9O_{26}$: 1565.95、実測値 : 895.3 $[M+2H]^{2+}$ 、917.2 $[M+2Na]^{2+}$

10

【0518】

アジド-Peg₄-イミド-ビス- (アセトアミド-Peg₄-ε-アミドlys-α-ウレイド-glutro-*t*-ブチルエステル) (P S M A 17) の調製。アミン P M S A 16 (172 mg、0.11 mmol) を、DMF (2 mL) 中の H A T U (52 mg、0.14 mmol) および D I E A (116 μL、0.66 mmol) で活性化された N₃-Peg₄-COOH (40 mg、0.14 mmol) に加えた。1時間後、反応混合物を減圧下で濃縮し、S i O₂ ゲルクロマトグラフィーによって精製したところ、P S M A 17 (194 mg、91%) が得られた。A P - E S I + 質量計算値 $C_{85}H_{154}N_{12}O_{31}$: 1839.08、実測値 : 895.3 $[M+2H]^{2+}$ 、917.2 $[M+2Na]^{2+}$

20

【0519】

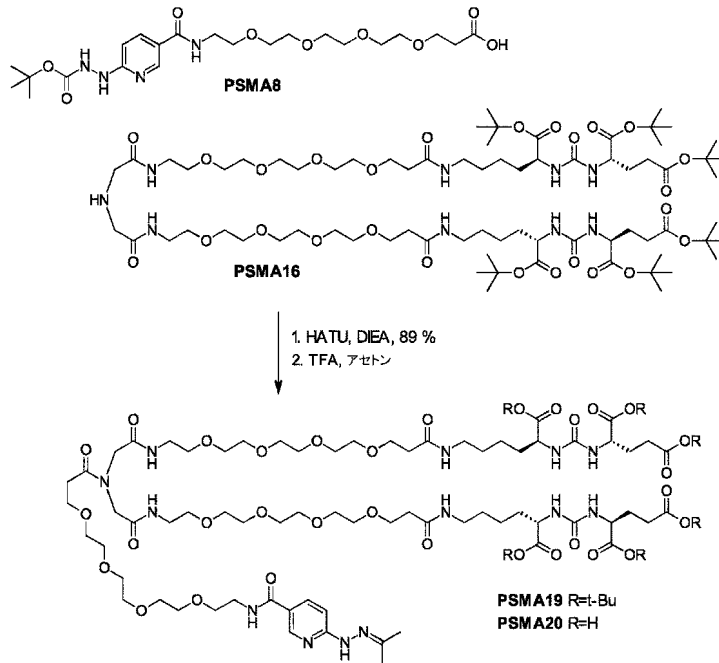
アジド-Peg₄-イミド-ビス- (アセトアミド-Peg₄-ε-アミドlys-α-ウレイド-glutro-*t*-ブチルエステル) (P S M A 18) の調製。ヘキサ-*t*-ブチルエステル P S M A 17 (194 mg、0.10 mmol) を、T F A : アセトン (10 mL、97.5 : 2.5、v/v) の溶液で30分間処理した。R P - H P L C M S により、所望の生成物への完全な転化が示された。反応混合物を減圧下で濃縮し、R P - H P L C によって精製したところ、P S M A 18 (69.4 mg、44%) が得られた。A P - E S I + 質量計算値 $C_{61}H_{106}N_{12}O_{31}$: 1502.70、実測値 : 752.5 $[M+2H]^{2+}$

30

【0520】

二価 P S M A HyN i c (P S M A 20) の合成

【化 209】



10

N-Boc 4-ヒドラジノ-ニコチンアミド Peg₄-イミド-ビス- (アセトアミド- Peg₄-ε-アミド lys-α-ウレイド- glu トリ- t-ブチルエステル) (PSMA19) の調製。アミン PSMA16 (172 mg、0.11 mmol) を、DMF (2 mL) 中の HATU (46 mg、0.12 mmol) および DIEA (116 μL、0.66 mmol) で活性化された PSMA8 (61 mg、0.12 mmol) に加えた。1 時間後、反応混合物を減圧下で濃縮し、SiO₂ ゲルクロマトグラフィーによって精製したところ、PSMA19 (201 mg、89%) が得られた。AP-E SI + 質量計算値 C₉₆H₁₆₉N₁₃O₃₄: 2048.19、実測値: 1025.3 [M+2H]²⁺、684.0 [M+3H]³⁺

20

【0521】

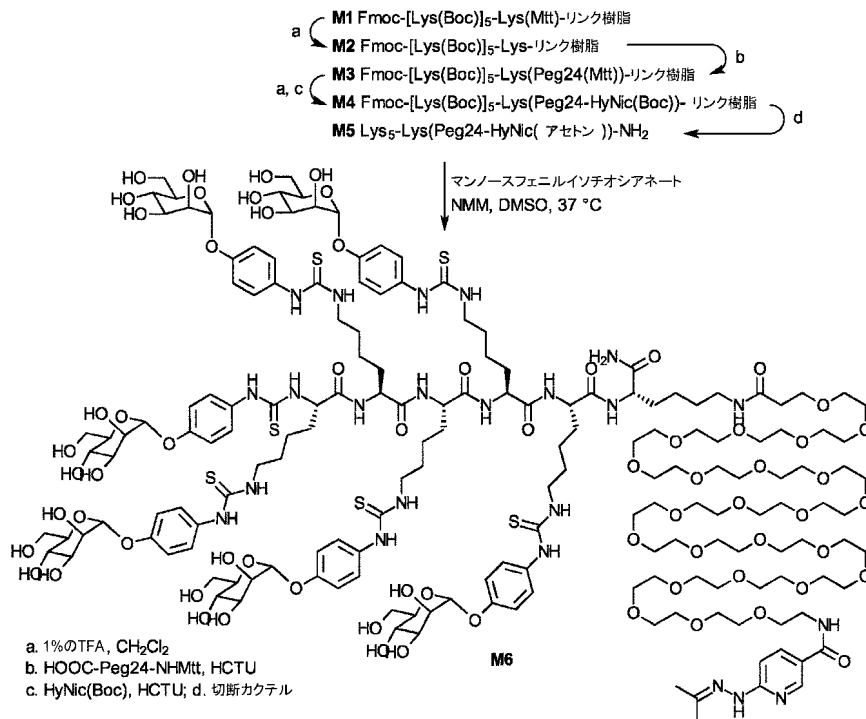
ジメチル 4-ヒドラゾノ-ニコチンアミド- Peg₄-イミド-ビス- (アセトアミド- Peg₄-ε-アミド lys-α-ウレイド- glu) (PSMA20) の調製。ヘキサ- t-ブチルエステル PSMA19 (201 mg、0.10 mmol) を、TFA: アセトン (10 mL、9:1、v/v) の溶液で 60 分間処理した。RP-HPLCMS により、所望の生成物への完全な転化が示された。反応混合物を減圧下で濃縮し、RP-HPLC によって精製したところ、PSMA20 (69.4 mg、44%) が得られた。AP-E SI + 質量計算値 C₇₀H₁₁₇N₁₃O₃₂: 1651.79、実測値: 827.1 [M+2H]²⁺

30

【0522】

マンノースリガンドの合成:

【化 2 1 0】



10

20

30

Lys₆-Peg₂₄-HyNic (M5) の調製。HCTUカップリンおよび20%のピペリジン脱保護による、リンク (Link) アミド樹脂 (0.61 mmol/g) における標準的なFmoc化学を用いて、ペプチド骨格を合成した。簡潔には、25 μmolスケールの自動合成装置でペプチドM1を調製した。Lys (Mtt) の脱保護の後、Peg₂₄ アミノ (Mtt) 酸をカップリングして、M3を得た。Mtt基およびの除去およびそれに続くBocHyNicのカップリングにより、M4が得られた。トリフルオロ酢酸：トリイソプロピルシラン：水：アセトン：ジチオスレイトール (90：2：2：3：3) を用いた樹脂からのペプチドの放出およびRP-HPLCによる精製により、M5 (7.0 mg) が得られた。AP-ESI+ 質量計算値 C₉₆H₁₈₅N₁₇O₃₂：2088.33、実測値：1046 m/z、698 m/z、524 m/z。

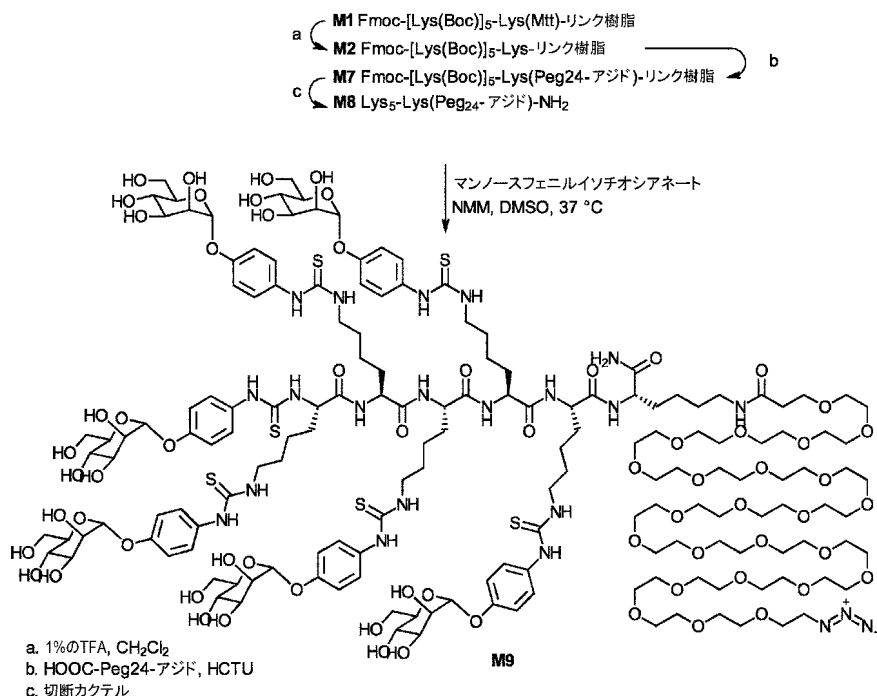
【0523】

Man₆-Lys₆-Peg₂₄-HyNic (M6) の調製。DMSO (1 mL) 中のペプチド骨格M5 (7.0 mg) を、マンノースイソチオシアネート (8.0 mg) およびN-メチルモルホリン (NMM; 200 μL) で処理した。反応物を37 °Cで4時間攪拌し、RP-HPLCによって精製したところ、M6 (1.2 mg) が得られた。MALDI-TOF 質量計算値 C₁₇₄H₂₇₅N₂₃O₆₈S₆：3966.70、実測値：3987.39 [M+Na]。

【0524】

六価マンノースアジド (M9) の合成

【化 2 1 1】



10

20

Lys₆-Peg₂₄-アジド (M8) の調製。HCTUカップリングおよび20%のピペリジン脱保護による、リンク (Link) アミド樹脂 (0.61 mmol/g) における標準的なFmoc化学を用いて、ペプチド骨格を合成した。簡潔には、100 μmolスケールの自動合成装置でペプチドM1を調製した。Lys (Mtt) の脱保護の後、アジド-Peg₂₄酸をカップリングして、M7を得た。混液TFA:TIPS:H₂O (92.5:2.5:5) を用いた樹脂からのペプチドの放出により、M8 (167.0 mg) が得られた。MALDI TOF 質量計算値 C₈₇H₁₇₄N₁₆O₃₁: 1940.4、実測値: 1941.1

【0525】

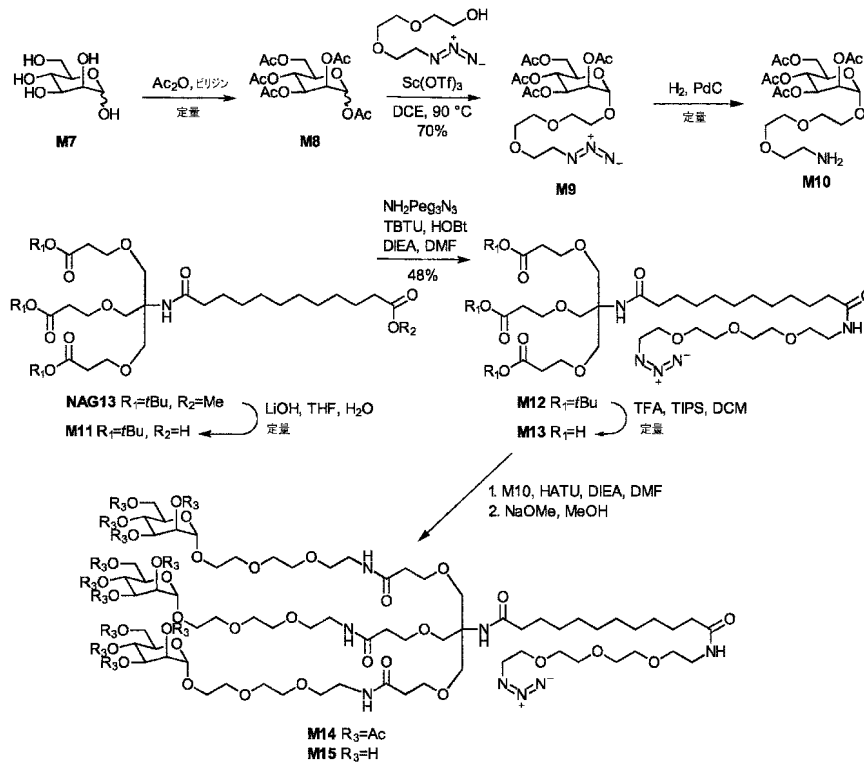
Man₆-Lys₆-Peg₂₄-アジド (M9) の調製。DMSO (2 mL) 中のペプチド骨格M4 (167.0 mg) を、マンノースイソチオシアネートおよびNMM (500 μL) で処理した。反応混合物を37 °Cで攪拌し、所望の生成物への完全な転化が達成されるまでMALDI TOFによってモニターした (合計58 mgのマンノースイソチオシアネートを加えた)。最終生成物をRP-HPLCによって精製したところ、M9 (22 mg) が得られた。MALDI-TOF 質量計算値 C₁₆₅H₂₆₄N₂₂O₆₇S₆: 3820.37、実測値: 3843.79 [M+Na]。

30

【0526】

三価マンノースアジド (M15) の合成

【化 2 1 2】



10

20

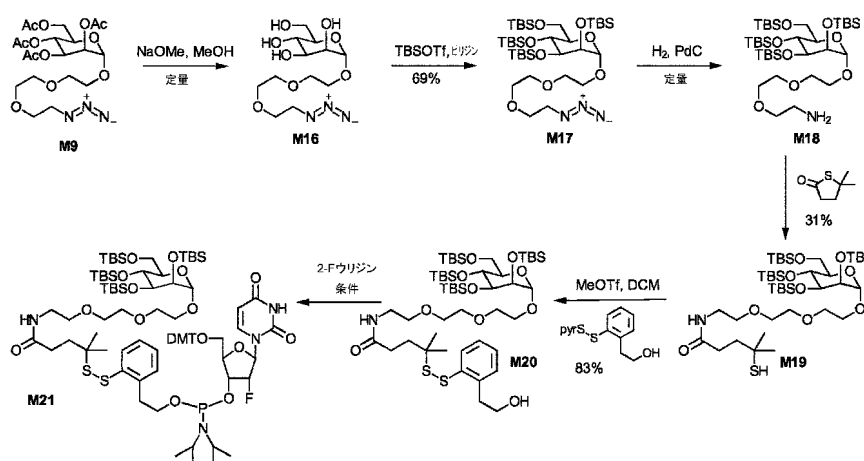
アジドトリーマンノース (M15) の調製：D-マンノースを、一晚、ピリジン中の Ac_2O によってペルアセチル化した。回転蒸発による濃縮、続いて PhMe との共沸により、五酢酸塩 (M8) が定量的収率で得られた。市販のアジド- Peg_2 アルコールの存在下における $\text{Sc}(\text{OTf})_3$ による M8 の活性化により、アジド- Peg_2 マンノシド (M9) が得られ、それを、定量的にアミン (M10) へと水素化した。一方、トリスリンカーのメチルエステル (NAG13) を、酸 (M11) へと選択的に加水分解した。TBTU 活性化による市販のアジド- Peg_3 アミンと M11 とのカップリングにより、アジドトリスリンカー (M12) が得られた。TFA によるトリメチルエステル M12 の処理により、トリ酸 M13 が得られた。M10 と M13 とのカップリングを、HATU によって媒介し、粗混合物を全体的に脱アセチル化したところ、アジドトリーマンノース (M15) が得られた。

30

【0527】

一価マンノースホスホラミダイト (M21) の合成

【化 2 1 3】



40

マンノースジスルフィド 2-フルオロウリジンホスホラミダイト (M21) の調製：標

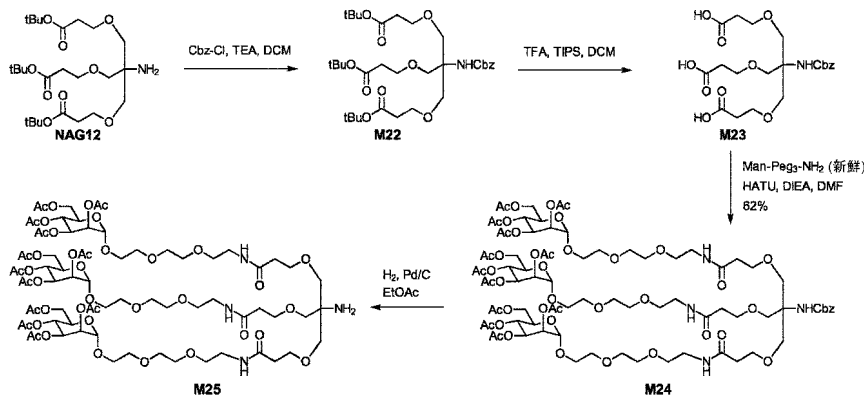
50

準的な保護／脱保護化学によって、M 9 の酢酸塩を、脱アセチル化中間体 M 1 6 を経て、
 t-ブチルシリル (TBS) M 1 7 に転化した。水素化によるアジド M 1 7 のアミン M 1
 8 への還元により、ヒンダードチオラクトンによる N-アシル化が促進されて、チオール
 M 1 9 が得られた。ジスルフィド M 2 0 が、アリールメルカプト-チオピリジンの添加に
 よってはっきりと形成され、MeOTf で予め活性化した。ホスホラミダイト M 2 1 は、
 ビス (ジイソプロピルアミノ) クロロホスフィンによる 2-フルオロウリジンの処理、続
 いて糖ジスルフィド M 2 0 の添加によって、標準的な 2 工程ワンポット法で形成されるも
 のであった。

【0528】

六価マンノースアジド (M 3 0) の合成

【化214】



N-カルボベンジルオキシトリス- (t-ブトキシカルボエトキシメチル) -メチルア
 ミド (M 2 2) の調製：氷浴中で冷却された CH_2Cl_2 (12 mL) 中の NAG 1 2 (3.55 g、7.02 mmol) の溶液に、Cbz-Cl (PhMe 中 35%、7.3 mL) および TEA (3.9 mL) を加えた。反応混合物を室温に温め、一晚攪拌した。混
 合物を CH_2Cl_2 で希釈し、飽和 NaHCO_3 (水溶液) で洗浄し、 Na_2SO_4 上で
 乾燥させ、減圧下で濃縮した。粗生成物を SiO_2 クロマトグラフィーによって精製した
 ところ、M 2 2 (0.98 g、22% の収率) が得られた。AP-ESI+ 質量計算値

$\text{C}_{33}\text{H}_{53}\text{NO}_{11}$: 639.4、実測値 : 662.4 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

【0529】

N-カルボベンジルオキシトリス- ((2, 3, 4, 6-テトラ-O-アセチル-1-O- α -D-マンノピラノシル) -Peg₃-アミドエトキシメチル) -メチルアミド (M 2 4) の調製： CH_2Cl_2 (5 mL) 中のトリス-t-ブチルエステル M 2 2 (0.97 g、1.51 mmol) および TIPS (0.93 mL、4.55 mmol) を、TFA (20 mL) で 5 時間処理した。混合物を減圧下で濃縮し、油状の残渣をヘキサンで
 洗浄し、高真空下で乾燥させたところ、M 2 3 が得られた。AP-ESI+ 質量計算値

$\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{NO}_{11}$: 471.2、実測値 : 493.9 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

【0530】

DMF (5 mL) 中の粗生成物 M 2 3 を、氷浴中で冷却し、HATU (0.62 g、1.63) および DIEA (0.65 mL、3.71 mmol) で処理した。20 分間攪拌
 した後、DMF (5 mL) 中の M 1 0 (0.89 g、1.86 mmol) の溶液を加え、
 混合物を室温に温め、3 時間攪拌した。溶媒を減圧下で除去し、粗生成物を EtOAc に
 溶解させ、飽和 NaHCO_3 (水溶液) で洗浄し、 Na_2SO_4 上で乾燥させ、減圧下で
 濃縮した。 SiO_2 クロマトグラフィーによる精製により、M 2 4 (0.49 g、62%
 の収率) が得られた。MALDI-TOF 質量計算値 $\text{C}_{81}\text{H}_{122}\text{N}_4\text{O}_{44}$: 1854.74、実測値 : 1850.14

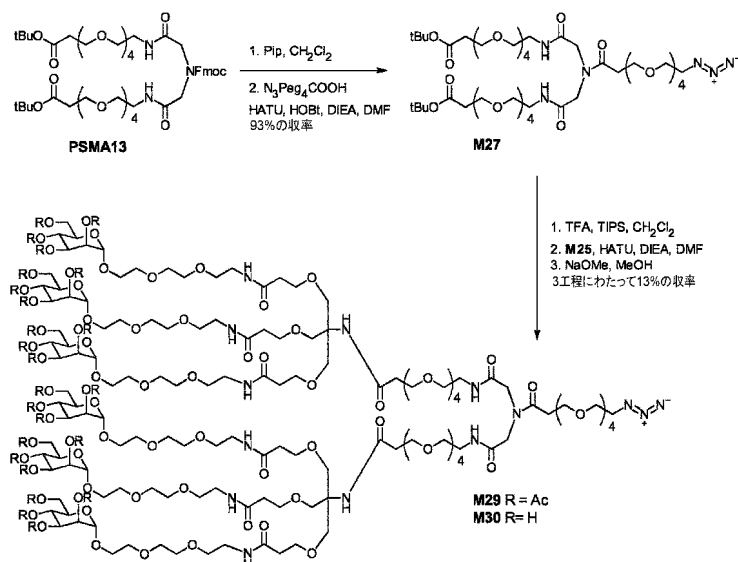
【0531】

トリス- ((2, 3, 4, 6-テトラ-O-アセチル-1-O- α -D-マンノピラノ
 シル) -Peg₃-アミドエトキシメチル) -メチルアミン (M 2 5) の調製：M 2 4 (

0.49 g、0.26 mmol) の溶液を、HOAc (0.2 mL) を含む EtOAc (50 mL) に溶解させ、真空の付加および Ar (g) でのバックフィルによって脱気した。活性炭に担持された Pd (0.16 g) を加え、混合物を排気し、次に、H₂ (g) で 3 回パージした。反応混合物を 2 日間攪拌し、触媒をろ過によって除去し、母液を減圧下で濃縮したところ、M25 が得られた。AP-E SI + 質量計算値 C₇₃H₁₁₆N₄O₄₂: 1720.7、実測値: 1723.42

【0532】

【化215】



10

20

アジド-Peg₄-イミド-ビス-(アセトアミド-Peg₄-tert-ブチルエステル) (M27) の調製: CH₂Cl₂ 中の N-Fmoc PSMA13 (0.72 g、0.75 mmol) を、ピペリジン (0.75 mL) で 1 時間処理した。HPLCMS により、M26 への完全な転化が示された。AP-E SI + 質量計算値 C₃₄H₆₅N₃O₁₄: 739.4、実測値: 740.5 [M+H]⁺。

【0533】

混合物を減圧下で濃縮し、PhMe と共沸混合した。粗生成物 M26 を、1 時間にわたって DMF (5 mL) 中のアジド-Peg₄ 酸 (0.44 g、1.51 mmol)、HATU (0.57 g、1.51 mmol)、および DIEA (0.52 mL) の溶液と反応させた。溶媒を減圧下で除去した後、粗生成物を EtOAc に溶解させ、飽和 NaHCO₃ (水溶液) で洗浄し、Na₂SO₄ 上で乾燥させ、減圧下で濃縮した。SiO₂ クロマトグラフィーによる精製により、M27 (0.71 g、93% の収率、2 工程) が得られた。AP-E SI + 質量計算値 C₄₅H₈₄N₆O₁₉: 1012.6、実測値: 1013.6 [M+H]⁺。

【0534】

アジド-Peg₄-イミド-ビス-(三量体マンノース) (M30) の調製: イミドリンカー-M27 (0.69 g、0.68 mmol) を、TIPS (0.28 mL、1.36 mmol) および TFA (10 mL) で処理したところ、トリ酸 M28 が得られた; AP-E SI + 質量計算値 C₃₇H₆₈N₆O₁₉: 900.5、実測値: 900.9 [M+H]⁺、922.9 [M+Na]⁺。揮発性物質を減圧下で除去し、M28 を高真空下で乾燥させた。二酸 M28 (82.0 mg、0.09 mmol) を、0 °C で、DMF (2 mL) 中の HATU (75 mg、0.2 mmol) および DIEA (0.28 mL) で活性化した。30 分後、DMF (2 mL) 中の M25 (0.26 mmol) の溶液を加え、混合物を室温に温め、2 時間攪拌した。RP-HPLCMS により、M29 への完全な転化が示された; 質量計算値 C₁₈₃H₂₉₆N₁₄O₁₀₁: 4305.84。MALDI-TOF 実測値: 4303.36 AP-E SI + 実測値: 1436.1 [M+3H]³⁺、1077.3 [M+4H]⁴⁺。反応物を CH₂Cl₂ で希釈し、飽和 N

30

40

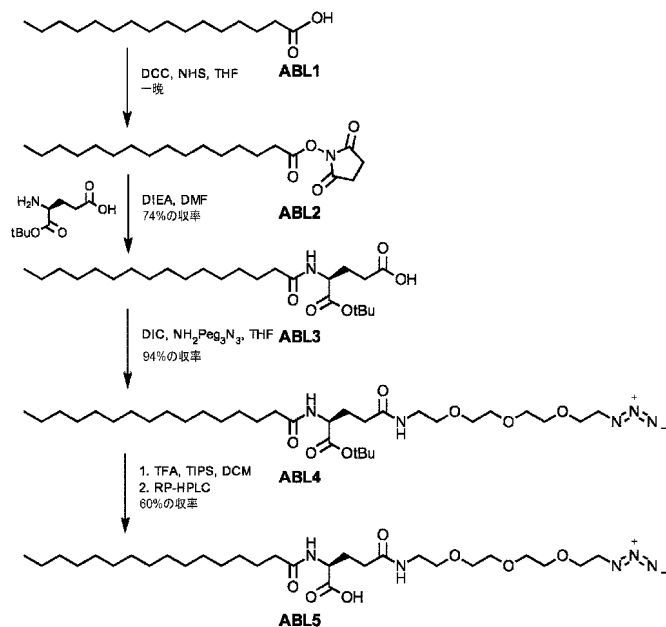
50

a H C O₃ (水溶液) で洗浄し、N a₂ S O₄ 上で乾燥させ、減圧下で濃縮した。粗生成物 M 2 9 (5 3 8 m g) を、M e O H (2 0 m L) に溶解させ、N a O M e (M e O H 中 2 5 重量%、0. 5 m L) で 1 時間処理した。R P - H P L C M S により、M 3 0 への完全な転化が示された。反応物を、D o w e x H + 樹脂の添加による中和によってクエンチした。粗材料を H P L C によって精製したところ、M 3 0 (3 8. 1 m g、3 工程で 1 3 % の収率) が得られた。質量計算値 C₁₃₅H₂₄₈N₁₄O₇₇: 3297. 59、M A L D I - T O F 実測値: 3318. 61 [M+N a]⁺ A P - E S I + 実測値: 1100. 0 [M+3 H]³⁺、825. 3 [M+4 H]⁴⁺。

【0535】

A B L リガンド (A B L) の合成

【化216】



N - パルミトイル L - グルタミン酸 α - t - ブトキシエステル (A B L 3) の調製: T H F (1 0 m L) 中のパルミチン酸 A B L 1 (1. 0 g、3. 8 m m o l) を、N - ヒドロキシスクシンイミド (0. 9 g、7. 6 m m o l) およびジイソプロピルカルボジイミド (1. 2 m L、7. 6 m m o l) で一晩処理したところ、エステル (A B L 2) が得られた。沈殿物をろ過によって除去し、揮発性物質を減圧下で蒸発させた。得られた残渣を D M F (6 m L) に溶解させ、グルタミン酸 t - ブチルエステル (0. 7 g、3. 4 m m o l) および D I E A (1. 8 m L、1 0 m m o l) で処理した。2 時間後、反応混合物を水で希釈し、所望の生成物を E t₂ O で抽出した。エーテル層を N a₂ S O₄ 上で乾燥させ、減圧下で濃縮し、粗生成物の塊を S i O₂ クロマトグラフィーによって精製したところ、オフホワイトの固体 A B L 3 (1. 2 g、7 4 % の収率) が得られた。A P - E S I + 質量計算値 C₂₅H₄₇N O₅: 441. 3、実測値: 464. 0 [M+N a]⁺

【0536】

N - パルミトイル δ - (アミド P e g₃ アジド) L - グルタミン酸 α - t - ブトキシエステル (A B L 4) の調製: T H F (1 0 m L) 中の A B L 3 (1. 2 4 g、2. 8 m m o l) の溶液に、11 - アジド - P e g₃ アミン (0. 9 2 g、4. 2 m m o l) およびジイソプロピルカルボジイミド (0. 8 7 m L、5. 6 m m o l) を加えた。一晩攪拌した後、沈殿物をろ過によって除去し、母液を減圧下で濃縮し、粗生成物の塊を S i O₂ クロマトグラフィーによって精製したところ、オフホワイトの固体 A B L 4 (1. 7 g、9 4 % の収率) が得られた。A P - E S I + 質量計算値 C₃₃H₆₃N₅O₇: 641. 5、実測値: 642. 4 [M+H]⁺

【0537】

10

20

30

40

50

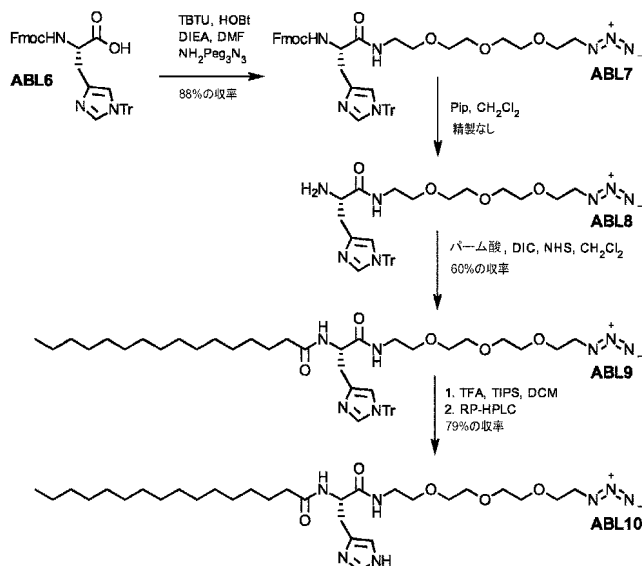
N-パルミトイルδ-(アミドPeg₃アジド)L-グルタミン酸(ABL5)の調製：DCM(2mL)中のt-ブチルエステルABL4(1.71g、2.66mmol)およびTIPS(0.54mL、2.66mmol)の溶液を、TFA(10mL)で処理した。1.5時間後、混合物を減圧下で濃縮した。油状の粗生成物をヘキサンで洗浄し、減圧下で乾燥させ、RP-HPLCによって精製したところ、ABL5(930mg、60%の収率)が得られた。

AP-E SI + 質量計算値 C₂₉H₅₅N₅O₇ : 585.4、実測値 : 586.0 [M+H]⁺

【0538】

【化217】

10



20

N-α-FmocN-イミダジールトリチルα-(アミドPeg₃アジド)L-ヒスチジン(ABL7)の調製：DMF(5mL)中のN-α-FmocN-イミダゾリルトリチルL-ヒスチジン(1.00g、1.61mmol)を、20分間にわたってTBUTU(0.57g、1.77mmol)、HOBT(0.27g、1.77mmol)、およびDIEA(0.84mL、4.84mmol)で活性化した。DMF(1.0mL)中の11-アジド-Peg₃アミン(0.35g、1.61mmol)の溶液を加え、混合物を3時間攪拌した。反応混合物をH₂Oで希釈し、Et₂Oで抽出した。エーテル層をNa₂SO₄上で乾燥させ、減圧下で濃縮し、粗生成物の塊をSiO₂クロマトグラフィーによって精製したところ、淡黄色の固体ABL7(1.17g、88%の収率)が得られた。AP-E SI + 質量計算値 C₄₈H₄₉N₇O₆ : 819.4、実測値 : 819.8 [M+H]⁺

30

【0539】

N-α-パルミトイルN-イミダゾリルトリチルα-(アミドPeg₃アジド)L-ヒスチジン(ABL9)の調製：CH₂Cl₂(5mL)中のN-Fmoc ABL7(1.17g、1.42mmol)を、ピペリジン(0.56mL)で処理し、1時間攪拌したところ、許容できる純度のABL8が得られた；AP-E SI + 質量計算値 C₃₃H₃₉N₇O₄ : 597.3、実測値 : 597.9 [M+H]⁺。混合物を減圧下で濃縮し、残渣をヘキサンで洗浄した。粗生成物ABL8をCH₂Cl₂(5mL)に溶解させ、パルミチン酸(0.73g、2.84mmol)、ジイソプロピルカルボジイミド(0.36g、2.84mmol)、およびNHS(0.43g、2.84mmol)で処理した。沈殿物をろ過によって除去し、粗生成物をSiO₂クロマトグラフィーによって精製したところ、オフホワイトの固体ABL9(0.71g、60%の収率)が得られた。AP-E SI + 質量計算値 C₄₉H₆₉N₇O₅ : 835.5、実測値 : 835.9 [M+H]⁺

40

50

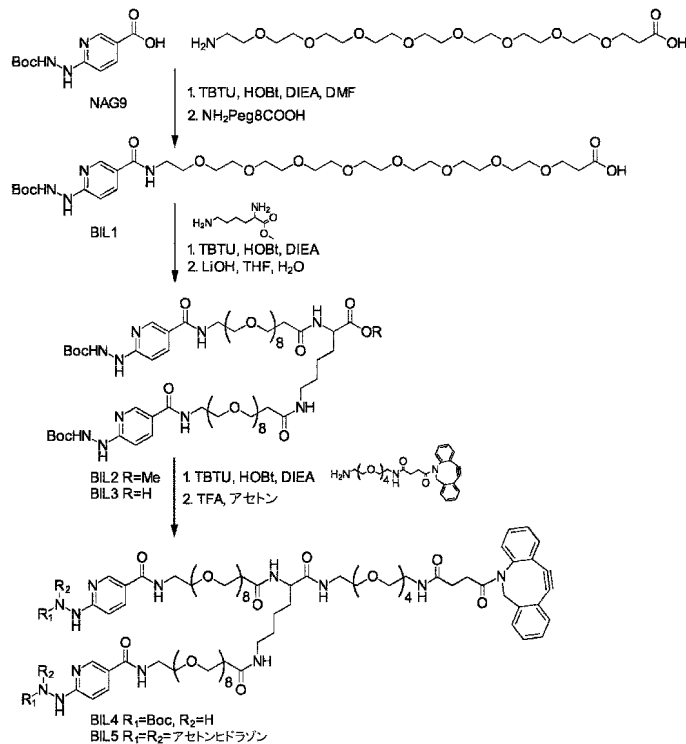
【0540】

N- α -パルミトイル α -(アミドPeg₃アジド)L-ヒスチジン(ABL10)の調製: DCM(2 mL)中のN-イミダゾリルトリチルABL9(0.71 g、0.85 mmol)およびTIPS(0.17 mL、0.85 mmol)の溶液を、TFA(10 mL)で処理した。1.5時間後、混合物を減圧下で濃縮した。油状の粗生成物をヘキサンで洗浄し、減圧下で乾燥させ、RP-HPLCによって精製したところ、ABL10(394 mg、79%の収率)が得られた。AP-ESI+ 質量計算値 C₃₀H₅₅N₇O₅: 593.4、実測値: 594.3 [M+H]⁺

【0541】

オリゴヌクレオチド架橋補助部分の合成:

【化218】



3-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{6-[(tert-ブチル)-2-カルボキシヒドラジノ]-ニコチノイルアミノ}エトキシ)エトキシ]エトキシ}エトキシ)エトキシ]エトキシ}エトキシ)エトキシ]プロピオン酸(BIL1)の調製。N-Boc4-ヒドラジノニコチン酸、NAG9、(0.38 g、1.50 mmol)を、DMF(10 mL)中のTBTU(0.48 g、1.50 mmol)、HOBT(0.23 g、1.50 mmol)、およびDIEA(0.39 g、3.00 mg)で活性化した。20分後、Peg₈アミノ酸(0.44 g、1.00 mmol)の溶液を加え、反応物を室温で1時間攪拌した。反応混合物を減圧下で濃縮し、DCM中5%のMeOHを用いたSiO₂クロマトグラフィーによって精製したところ、BIL1(0.39 g、58%の収率)が得られた。ESI MS+ 質量計算値 C₃₀H₇₂N₄O₁₃: 676.4、実測値: 677.0 [M+H]⁺。

【0542】

メチル(2S)-2,6-ビス{3-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{6-[(tert-ブチル)-2-カルボキシヒドラジノ]-ニコチノイルアミノ}エトキシ)エトキシ]エトキシ}エトキシ)エトキシ]エトキシ}エトキシ)エトキシ]プロピオニルアミノ}ヘキサノエート(BIL2)の調製。BIL1(0.39 g、0.57 mmol)を、DMF(5 mL)中のTBTU(0.19 g、0.58 mmol)、HOBT(0.089 g、0.58 mmol)、およびDIEA(0.23 mL、1.

30 mmol) で活性化した。15 分後、Lys メチルエステル塩酸塩を、さらなる DIEA (0.23 mL) とともに加えた。反応物を超音波で分解して、Lys メチルエステルを完全に溶解させた。一晚攪拌した後、反応物を減圧下で濃縮し、SiO₂ クロマトグラフィー (CH₂Cl₂ 中 5~15% の MeOH) によって精製したところ、BIL2 (0.38 g、93% の収率) が得られた。ESI MS+ 質量計算値 C₆₇H₁₁₆N₁₀O₂₆: 1476.8、実測値: 1477.0 [M+H]⁺。

【0543】

(2S)-2,6-ビス{3-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{6-[(tert-ブチル)-2-カルボキシヒドラジノ]-ニコチノイルアミノ}エトキシ)エトキシ]エトキシ}エトキシ)エトキシ]エトキシ}エトキシ]プロピオニルアミノ}ヘキサン酸 (BIL3) の調製。THF (30 mL) 中の BIL2 (0.37 g、0.26 mmol) を、水 (2 mL) および MeOH (2 mL) 中の LiOH・H₂O (0.032 g、0.75 mmol) による処理によってけん化した。反応物を室温で 1 時間攪拌し、その後、HPLCMS により、完全な転化が示された。混合物を、Dowex H+ 樹脂で中和し、ろ液を減圧下で濃縮したところ、BIL3 (0.25 g、66% の収率) が得られた。この材料は、次の反応のために十分に純粋であった。ESI MS+ 質量計算値 C₆₆H₁₁₄N₁₀O₂₆: 1462.8、実測値: 732.0 [M+H]³⁺ m/3 z。

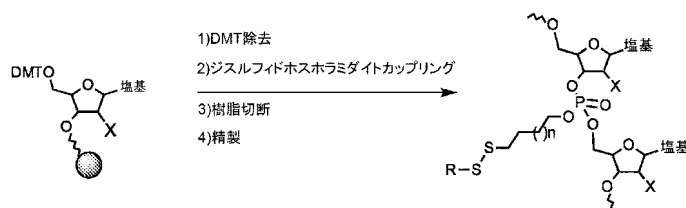
【0544】

(2S)-1-[3-(2-{2-[2-(3-{2-アザトリシクロ[10.4.0.0^{4,9}]ヘキサデカ-1(16),4,6,8,12,14-ヘキサエン-10-イン-2-イル}-3-オキソプロポキシ)エトキシ]エトキシ}エトキシ)プロピルアミノ]-2,6-ビス[3-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[6-(イソプロピリデンヒドラジノ)-ニコチノイルアミノ]エトキシ}エトキシ)エトキシ]エトキシ}エトキシ)エトキシ]-エトキシ}エトキシ)プロピオニルアミノ]-1-ヘキサノン (BIL5) の調製。DMF (3 mL) 中の BIL3 (0.14 g、0.09 mmol) を、DBCO-peg₄ アミン (0.049 g、0.09 mmol) の存在下で、TBTU (0.033 g、0.10 mmol)、HOBT (0.016 g、0.10 mmol)、および DIEA (65 μL、0.38 mmol) で処理した。混合物を室温で 1 時間攪拌し、減圧下で濃縮し、SiO₂ クロマトグラフィー (CH₂Cl₂ 中 5% の MeOH) によって精製したところ、BIL4 (0.051 g、28% の収率) が得られた。ESI MS+ 質量計算値 C₉₅H₁₄₉N₁₃O₃₁: 1968.0、実測値: 884.7 [M+2H-2Boc]²⁺。BIL4 (0.051 g) を、TFA (9 mL) および無水アセトン (1 mL) で 30 分間処理した。反応混合物を減圧下で濃縮し、高速 RP-HPLC 勾配によって精製したところ、BIL5・2×TFA 塩 (0.050 g、85% の収率) が得られた。MALDI-TOF MS+ 質量計算値 C₉₁H₁₄₁N₁₃O₂₇: 1849.16、実測値: 1850.14 [M+H]⁺。

【0545】

ジスルフィドホスホトリエステルオリゴヌクレオチド合成:

【化219】



実験の詳細:

合成された全てのオリゴヌクレオチド配列を、血清安定性を向上させ、オフターゲット効果を最小限に抑えるために、2'-F および 2'-OMe 修飾で 2'-リボース糖位置において修飾した。自動オリゴヌクレオチド合成 (1 μmol スケール) を、以下の試薬

／溶媒を用いて行った：

酸化剤－THF／ピリジン／H₂O中0.02MのI₂（サイクル毎に60秒の酸化）

、
デブロック（Deblock）－3%のトリクロロ酢酸（サイクル毎に2×40秒のデブロック）、

Cap Mix A－THF／ピリジン／Pac₂O（サイクル毎に60秒のキャッピング）、および

Cap Mix B－THF中16%のメチルイミダゾール（サイクル毎に60秒のキャッピング）。

【0546】

10

標準的なオリゴヌクレオチド合成条件に対する例外は、以下のとおりであった：

－より軽度の脱保護のためのQ－リンカー（ヒドロキノン－O，O’－二酢酸リンカーアーム）を有するCPG支持体を使用し；

－全てのジスルフィドホスホラミダイトを、合成前に、100%の無水アセトニトリル中の100mMに再懸濁させ；

－ホスホラミダイト活性化を、2.5倍モル過剰の5－ベンジルチオ－1－H－テトラゾール（BTT）を用いて行った。活性化ホスホラミダイトを、挿入毎に2×3分のカップリング工程でカップリングした。

【0547】

20

ジスルフィドホスホトリエステルオリゴヌクレオチド脱保護および精製プロトコル：

・自動オリゴヌクレオチド合成の後、ジスルフィドホスホトリエステルオリゴヌクレオチドを切断し、室温で4時間にわたって、1mlの、メタノール中10%のジイソプロピルアミン（10%のDIA／MeOH）中で脱保護した。4時間の脱保護の後、オリゴ試料を、遠心蒸発によって乾燥させた。

・標準的な保護基（ベンゾイル（Bz）、アセチル（Ac）、およびイソブチル（iBu）など）を有するホスホラミダイトモノマーを用いたオリゴヌクレオチド合成において、得られたジスルフィドホスホトリエステルオリゴヌクレオチドを切断し、室温で2時間にわたって1.0mLのAMA（1：1の比率の36%のアンモニア水溶液およびメタノール中40%のメチルアミン）中で脱保護した後、遠心蒸発を行った。

・粗オリゴペレットを、100μlの50%のアセトニトリル中で再懸濁させ、短時間で65℃に加熱し、十分にボルテックスした。合計100μlの粗オリゴ試料を、以下の緩衝液／勾配を用いたRP－HPLCに注入した：

30

－緩衝液A＝水中50mMのTEAA；

－緩衝液B＝90%のアセトニトリル；および

－流量＝1ml／分；

○勾配：

・0～2分（100%の緩衝液A／0%の緩衝液B）、

・2～42分（0%～60%の緩衝液B）、および

・42～55分（60%～100%の緩衝液B）。

・ドミナントRP－HPLCピークにわたって、0.5mlの画分を収集し、所望の質40
量の存在を確認するためにMALDI－TOF質量分析法によって分析した。適正な質量を含む精製画分を凍結し、凍結乾燥させた。乾燥させたら、画分を再懸濁させ、対応する画分と組み合わせて、凍結し、凍結乾燥させて最終生成物を得た。

【0548】

さらなる脱保護を必要とするジスルフィド挿入物を、上述されるように、最初に単離した後、必要な二次脱保護工程を行った（以下を参照）：

アルデヒド－ジスルフィドホスホトリエステル二次脱保護：

RP－HPLC精製オリゴ生成物を、100μlの80%のギ酸中で再懸濁させた。アルデヒド修飾毎に室温で約1時間にわたって反応を進行させた。反応を、MALDI－TOF質量分析法によってモニターして、完全な脱保護を確認した。脱保護が完了したら、50

試料を凍結し、乾燥するまで凍結乾燥させた。次に、凍結乾燥された試料を、1 ml の 20 % のアセトニトリル中で再懸濁させ、ゲルろ過して、最終オリゴ生成物を単離した。

【0549】

ヒドロキシルージスルフィドホスホトリエステル二次脱保護：

R P-H P L C 精製オリゴ生成物を、219 μ l の無水 DMSO 中で再懸濁させ、短時間で 65 $^{\circ}$ C に加熱し、十分にボルテックスした。DMSO 溶液に、31 μ l の 6.1 M のトリエチルアミン三フッ化水素酸塩 (TEA $\cdot$ 3HF) を加えて、0.75 M の最終濃度を得た。TBDMS 保護されたヒドロキシル修飾毎に室温で約 1 時間にわたって反応を進行させた。反応を、MALDI-TOF 質量分析法によってモニターして、完全な脱保護を確認した。脱保護が完了したら、35 μ l の 3 M の酢酸ナトリウム、続いて 1 ml のブタノールを加えた。試料を十分にボルテックスし、2 時間にわたって -80 $^{\circ}$ C に置いた。2 時間後、試料を遠心分離して、オリゴヌクレオチドをペレット化した。ブタノール層を除去し、オリゴペレットを、1 ml の 20 % のアセトニトリル中で再懸濁させた。試料をゲルろ過して、最終オリゴ生成物を単離した。

10

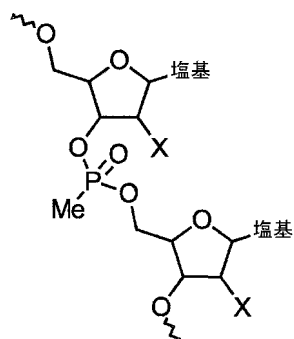
【0550】

ホスホン酸メチル含有オリゴヌクレオチド合成：

市販の p-メチルホスホンアミダイト (phosphonamidite) を用いて、本明細書に記載される標準的なオリゴ合成プロトコルを用いて、ホスホン酸メチルオリゴヌクレオチドを合成した。

【化220】

20



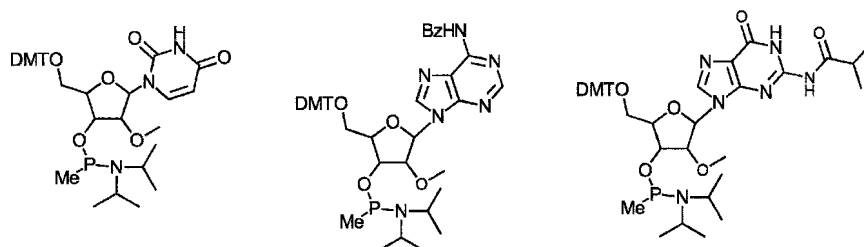
X=F, OMe など
塩基 = U, C, A, G

30

【0551】

例えば、以下の市販の P-メチルホスホンアミダイトモノマーを、合成に使用した。

【化221】



40

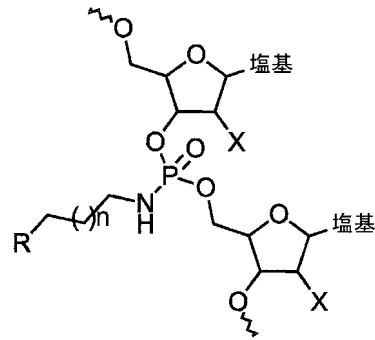
【0552】

ホスホロアミデート含有オリゴヌクレオチド合成：

以下の一般式のホスホロアミデートオリゴヌクレオチドを、対応するホスファイト (H-ホスホネート) およびアミンから合成した。

【0553】

【化 2 2 2】



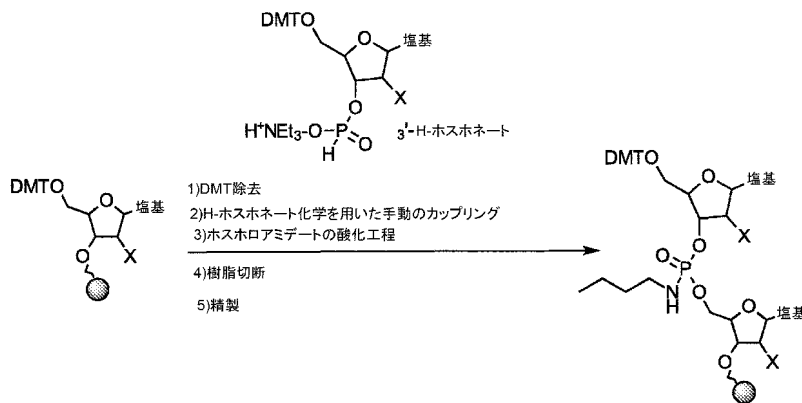
X=F, OMeなど
塩基 = U, C, A, G

R = NMe₂, NH₂, OH, COOH

10

【化 2 2 3】

一般的なスキーム:



20

【0 5 5 4】

実験の詳細:

全ての調製されるオリゴヌクレオチドは、血清安定性を向上させ、オフターゲット効果を最小限に抑えるために、2'-Fまたは2'-OMe修飾リボースを含む。自動オリゴヌクレオチド合成 (1 μmol スケール) を、以下の工程を用いて行った:

脱保護 - 3% のトリクロロ酢酸 (サイクル毎に 2 × 40 秒のデブロック)

カップリング - 無水アセトニトリル: ピリジン (1:1) 中の 1:1 の塩化ピバロイル (0.5 M) および 3'-H-ホスホネート (0.1 M) で 2 回

酸化工程 - 4.5:4.5:1 の CCl₄/ピリジン/n-ブチルアミン (手動で、サイクル毎に 2 × 120 秒)

Cap Mix A - THF/ピリジン/Pac₂O (サイクル毎に 60 秒のキャッピング)

Cap Mix B - THF 中 16% のメチルイミダゾール (サイクル毎に 60 秒のキャッピング)。

【0 5 5 5】

標準的なオリゴヌクレオチド合成条件に対する例外は、以下のとおりであった:

- より軽度の脱保護のための Q-リンカー (ヒドロキノン-O, O'-二酢酸リンカーアーム) を有する CPG 支持体を使用した;

- 保護された 3'-H-ホスホネートを、合成前に、1:1 の無水アセトニトリルおよびピリジン中の 100 mM に再懸濁させ;

- 塩化ピバロイルを溶解させて、合成前に、1:1 の無水アセトニトリルおよびピリジン中の 500 mM の溶液を得て、

30

40

50

ーカップリング工程を手動で行い、保護された 3' -H-ホスホネートの活性化を、5.0 倍モル過剰の塩化ピバロイルを用いて行った。カップリング工程を、挿入毎に 2 × 5 分のカップリング工程で行った。

ーホスホロアミデート結合が、2 × 2 分のサイクルで、90 : 90 : 20 μL の無水 CCl₄ : ピリジン : n-ブチルアミンを用いて酸化工程によって得られた。

【0556】

ジスルフィドホスホトリエステルオリゴヌクレオチド脱保護および精製プロトコル：

・自動オリゴヌクレオチド合成の後、ジスルフィドホスホトリエステルオリゴヌクレオチドを切断し、室温で 4 時間にわたって、1 ml の、メタノール中 10 % のジイソプロピルアミン（10 % の DI A / Me OH）中で脱保護した。4 時間の脱保護の後、オリゴ試料を、遠心蒸発によって乾燥させた。

・標準的な保護基（A-Bz、C-Ac および G-iBu（イソブチレート）など）を有するホスホラミダイトおよび 3' -H-ホスホネートモノマーを用いたオリゴ合成において、ホスホロアミデートオリゴヌクレオチドを切断し、室温で 2 時間にわたって 1.0 mL の AMA（1 : 1 の比率の 36 % のアンモニア水溶液およびメタノール中 40 % のメチルアミン）中で脱保護した後、遠心蒸発を行った。

・粗オリゴペレットを、100 μl の 50 % のアセトニトリル中で再懸濁させ、短時間で 65 °C に加熱し、十分にボルテックスした。合計 100 の全ての粗オリゴ試料を、以下の緩衝液 / 勾配を用いた RP-HPLC に注入した：

ー緩衝液 A = 水中 50 mM の TEAA

ー緩衝液 B = 90 % のアセトニトリル

ー流量 = 1 ml / 分

○勾配：

・0 ~ 2 分（100 % の緩衝液 A / 0 % の緩衝液 B）

・2 ~ 42 分（0 % ~ 60 % の緩衝液 B）

・42 ~ 55 分（60 % ~ 100 % の緩衝液 B）

・ドミナント RP-HPLC ピークにわたって、0.5 ml の画分を収集し、所望の質量の存在を確認するために MALDI-TOF 質量分析法によって分析した。適正な質量を含む精製画分を凍結し、凍結乾燥させた。乾燥させたら、画分を再懸濁させ、対応する画分と組み合わせて、凍結し、凍結乾燥させて最終生成物を得た。

【0557】

縮合反応によるジスルフィドホスホトリエステルオリゴヌクレオチド共役—一般的なプロトコル（共役の一般的なスキーム 1 ~ 3 を参照）：

・ジスルフィドホスホトリエステル二本鎖を、所望のパッセンジャーおよびガイド鎖オリゴの等モル混合によって作製した。50 mM の最終濃度になるまで塩化ナトリウムを加えた後、試料を 5 分間にわたって 65 °C に加熱し、室温に冷却させて、アニーリングを完了させた。

・アルデヒド修飾ジスルフィドホスホトリエステルオリゴの場合、siRNA 二本鎖を、1 × 共役緩衝液中に希釈してから、所望の HyNic 共役部分を加えた。

共役緩衝液：10 mM の HEPES（pH 5.5）、20 mM のアニリン、50 mM の NaCl、50 % のアセトニトリル

・上記の反応物を混合してから、2 倍モル過剰の HyNic 共役成分を混合物に加えた。反応を室温で 1 時間進行させた。

・1 時間後、共役 siRNA オリゴヌクレオチドを、ゲルろ過、HPLC 精製または遠心スピントロのいずれかによって単離して、細胞処理前の最終生成物を得た。

【0558】

クリック反応によるジスルフィドホスホトリエステルオリゴヌクレオチド共役—一般的なプロトコル（共役の一般的なスキーム 4 ~ 9 を参照）：

銅-THTA 複合体調製：

硫酸銅五水和物（CuSO₄ · 5H₂O）の 5 mM の水溶液およびトリス（3-ヒドロ

10

20

30

40

50

キシプロピルトリアゾリルメチル) アミン (THPTA) の 10 mM の水溶液を、1 : 1 (v/v) (1 : 2 モル比) で混合し、室温で 1 時間静置させた。この複合体は、ヒュスゲン環状付加を触媒するのに使用され得る (例えば、一般的な共役スキーム 4 および 5 を参照)。

【0559】

クリック反応 (100 nM スケール)

1. 7 mL のエッペンドルフチューブ中の 710 μ L の水および 100 μ L の tert-ブタノール (最終体積の 10%) の溶液に、60 μ L の銅-THPTA 複合体、続いて、50 μ L の 2 mM の、オリゴの溶液、60 μ L の 20 mM のアスコルビン酸ナトリウム水溶液および 20 μ L の 10 mM の、GalNAc-アジドの溶液を加えた。十分に混合した後、溶液を室温で 1 時間静置させた。反応の完了をゲル分析によって確認した。

10

【0560】

反応混合物を、5 ~ 10 倍モル過剰の SiliaMetS (登録商標) TAAcONa (樹脂結合 EDTA ナトリウム塩) を含有するスクリュウキャップバイアルに加える。混合物を 1 時間攪拌する。次に、この混合物を、illustra (商標) Nap (商標) -10 column Sephadex (商標) に通して溶離する。次に、溶液を、一晚、凍結し、凍結乾燥させた。

【0561】

金属フリーのクリック反応

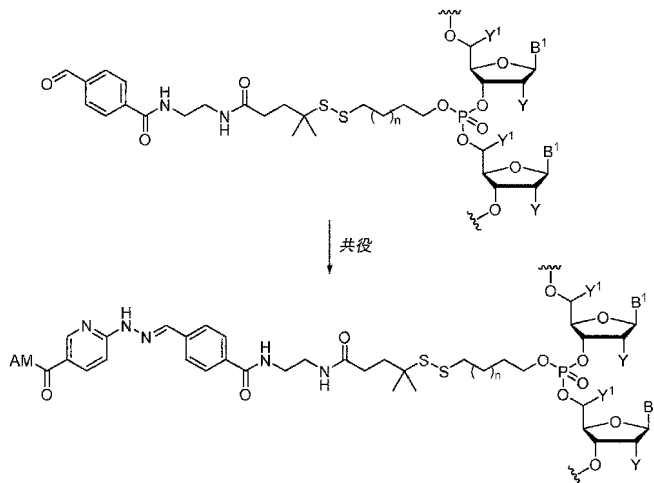
また、[3+2] 環状付加を、銅を使用せずに、当該技術分野において公知の方法を用いて、DBCO 部分を用いて行った (例えば、Jewett and Bertozzi, Chem. Soc. Rev., 39:1272-1279, 2010 を参照)。

20

【0562】

【化224】

一般的な共役スキーム1:



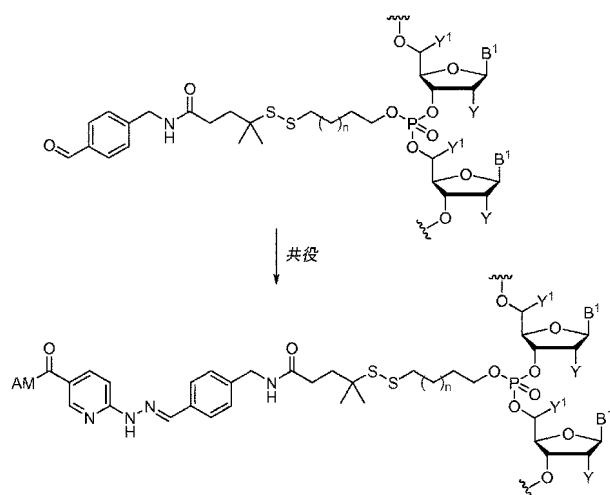
30

AM=(R⁴)-L-基またはその一部などの、補助部分を含有する基
(例えば、CPP、GalNAc、マンノース、葉酸塩、PSMA、PEGなどを含有する基)
n=0-3

40

【化 2 2 5】

一般的な共役スキーム2:

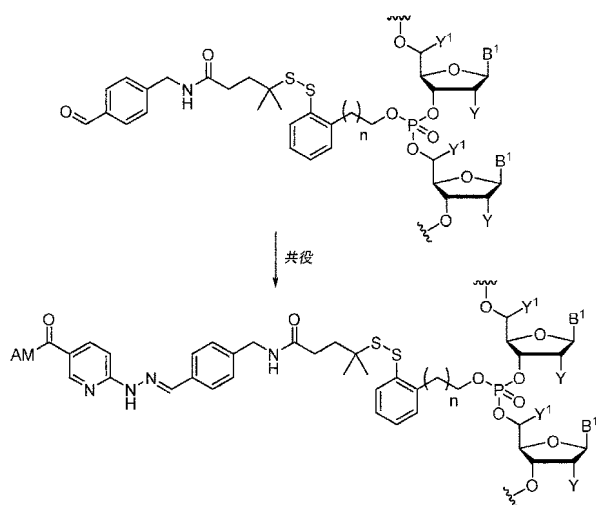


AM=(R⁴)-L-基またはその一部などの、補助部分を含有する基
 (例えば、CPP、GalNAc、マンノース、葉酸塩、PSMA、PEGなどを含有する基)
 n = 0-3

10

【化 2 2 6】

一般的な共役スキーム3:



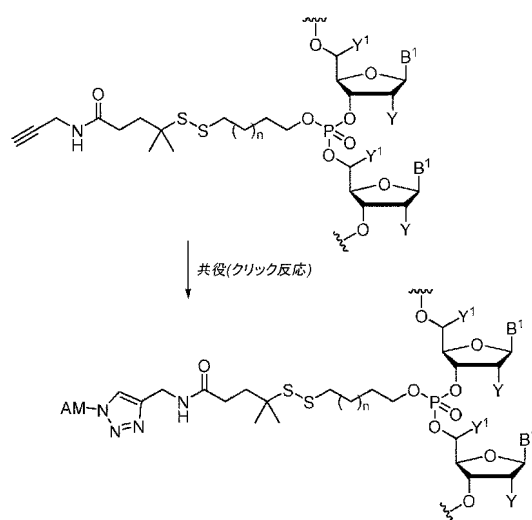
AM=(R⁴)-L-基またはその一部などの、補助部分を含有する基
 (例えば、CPP、GalNAc、マンノース、葉酸塩、PSMA、PEGなどを含有する基)
 n = 0-3

20

30

【化 2 2 7】

一般的な共役スキーム4:

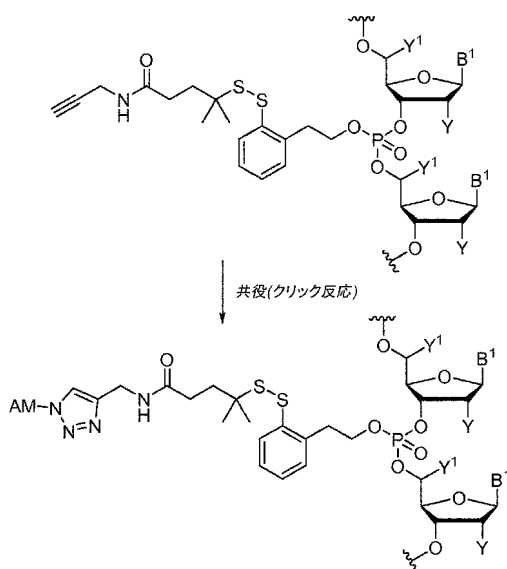


AM=(R⁴)-L-基またはその一部などの、補助部分を含有する基
(例えば、CPP、GalNAc、マンノース、葉酸塩、PSMA、PEGなどを含有する基)
n = 0-3

10

【化 2 2 8】

一般的な共役スキーム5:

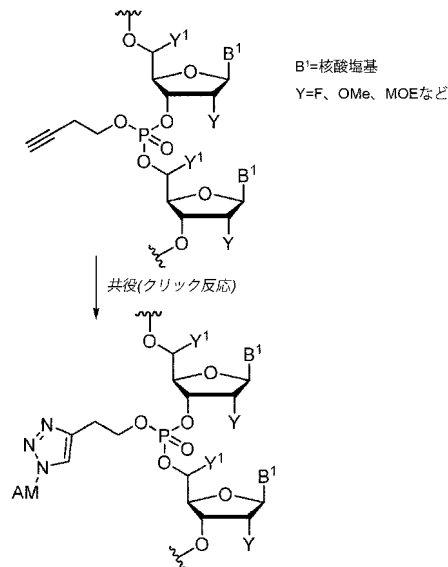


AM=(R⁴)-L-基またはその一部などの、補助部分を含有する基
(例えば、CPP、GalNAc、マンノース、葉酸塩、PSMA、PEGなどを含有する基)

30

【化 2 2 9】

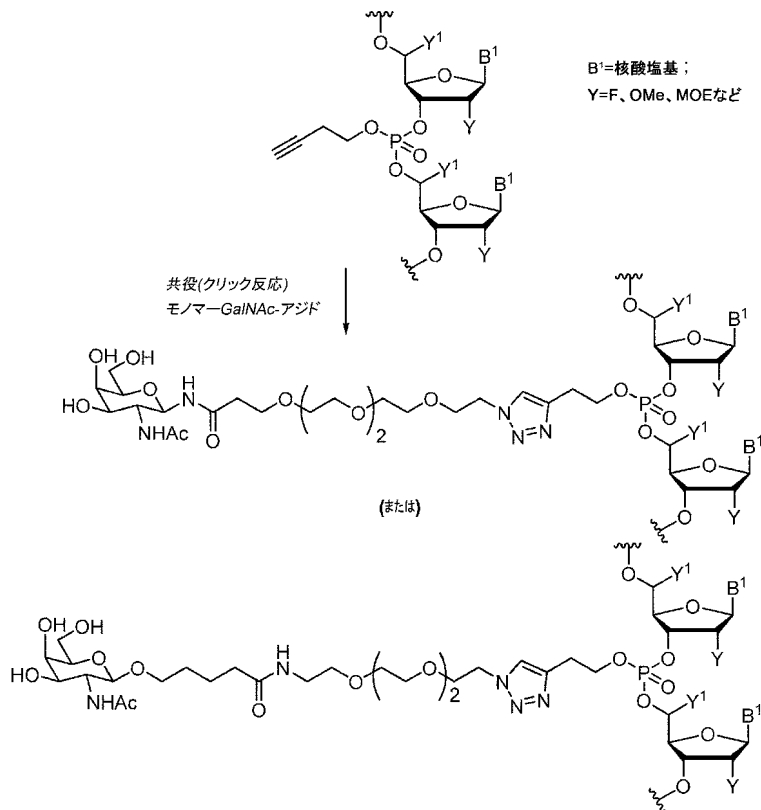
一般的な共役スキーム6:



AM=生物不可逆的基の一部としての補助部分を含有する基
 (例えば、CPP、GalNAc、マンノース、葉酸塩、PSMA、PEGなどを含有する基)

【化 2 3 0】

一般的な共役スキーム7:



10

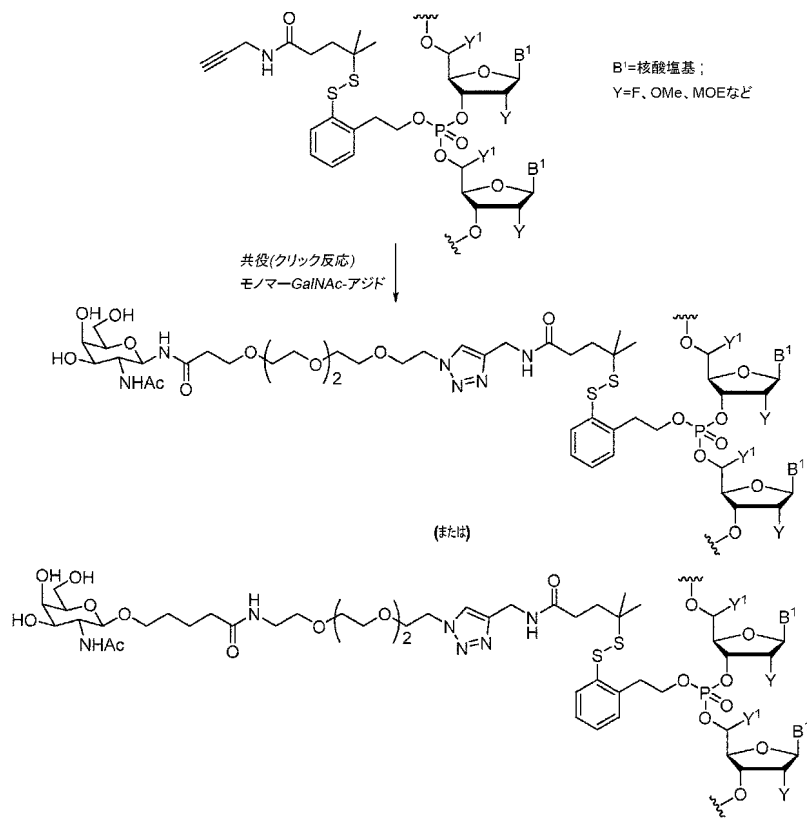
20

30

40

【化 2 3 1】

一般的な共役スキーム8:

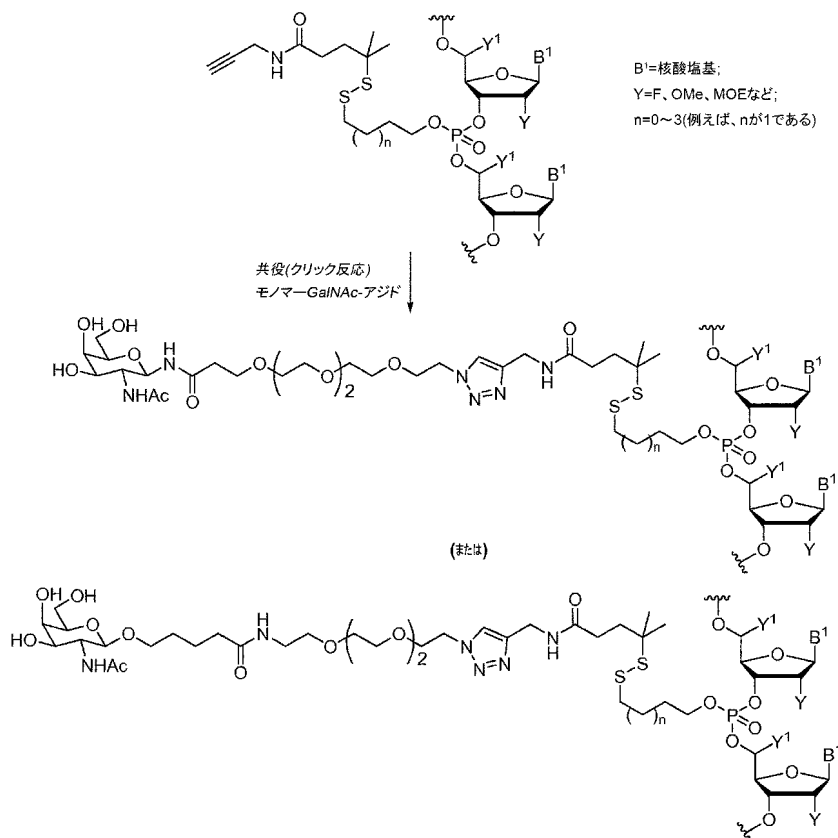


10

20

【化 2 3 2】

一般的な共役スキーム9:



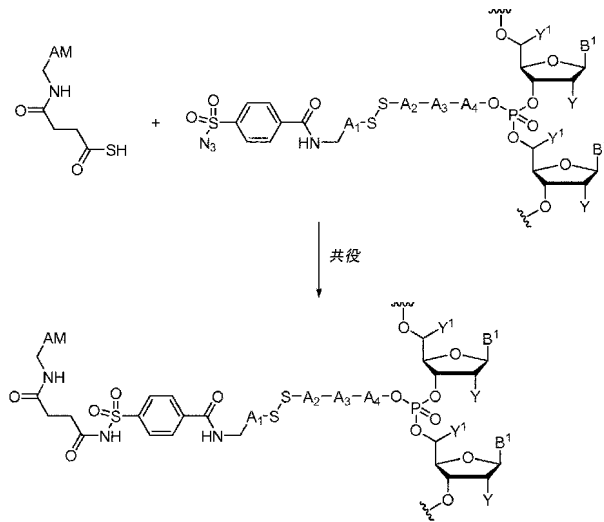
30

40

【化 2 3 3】

一般的な共役スキーム10:

(A)

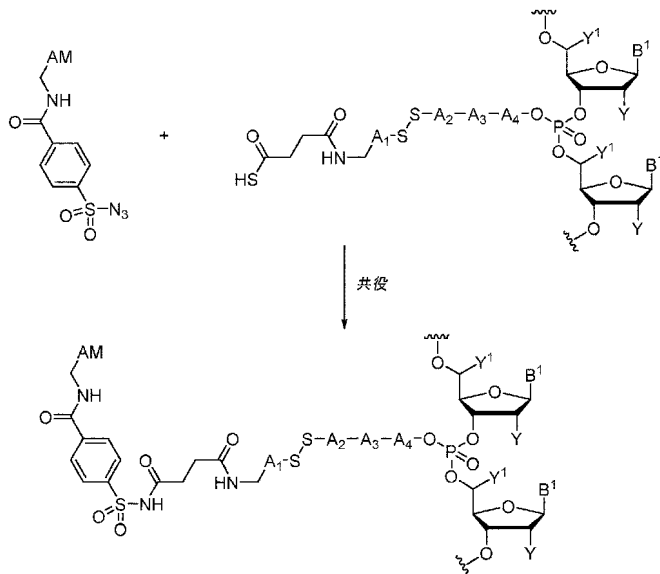


AM=(R⁴)₂-L-基またはその一部などの、補助部分を含有する基
(例えば、CPP、GalNAc、マンノース、葉酸塩、PSMA、PEGなどを含有する基)

または

【化 2 3 4】

(B)



AM=(R⁴)₂-L-基またはその一部などの、補助部分を含有する基
(例えば、CPP、GalNAc、マンノース、葉酸塩、PSMA、PEGなどを含有する基)

【0 5 6 3】

本明細書に記載される共役スキームは、生物不可逆的基にも適用可能であり、生物不可逆的基がジスルフィドを含まない点で、生物可逆的基を示す共役スキームと異なる。

【0 5 6 4】

本発明のポリヌクレオチドの特定の合成

本発明のポリヌクレオチドを、本明細書に記載される方法にしたがって調製した。例示的なポリヌクレオチドは、図1A中の配列または図1B中の配列(配列番号112および113)を有するsiRNA構築物である。配列番号113の例示的なRP-HPLCトレースが、図2に示される。配列番号113の配列を有するオリゴヌクレオチドを含有する粗反応混合物の質量スペクトルが、図3に示される。配列番号113の配列を有する精製オリゴヌクレオチドの質量スペクトルが、図4に示される。

【0565】

本発明の他のポリヌクレオチドを、本明細書に記載される方法にしたがって調製した。例えば、図5Aは、配列番号112を有するssRNAを示し、単一ADS共役ssRNAは、「ADS共役」の構造を有する1つの5'末端ADS共役部位を含有し、三重ADS共役ssRNAは、それぞれが「ADS共役」の構造を有する3つのADS共役部位を含有する。図5B～5Dは、ADS共役構造のZに含まれる共役標的化部分を含む1つまたは3つのヌクレオチドを有する本発明のポリヌクレオチドのいくつかのゲル分析を示す。

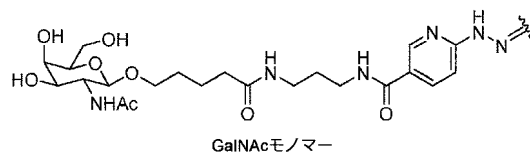
【0566】

標的化部分を含む1つまたは3つの基を有するパッセンジャー鎖を含有する調製siRNA分子の一般的構造が、図6Aおよび6Bに示される。図6A中のガイド鎖は、5'末端Cy3部分を有する。本発明の2つの例示的なポリヌクレオチドは、図7Aに示される1つまたは3つの葉酸塩-PEG₁₁-HyNic基を含有する。(葉酸塩)₁-siRNN-Cy3は、5'末端Gのヌクレオチド間架橋基に共役された1つの葉酸塩-PEG₁₁-HyNic基を含有する配列5'-GCUACAUCUGGAGACAUAUt(小文字tは、チミジンである；配列番号112)を有するポリヌクレオチド構築物である。(葉酸塩)₃-siRNN-Cy3は、5'-GCUの3つのヌクレオチド間架橋基に共役された3つの葉酸塩-PEG₁₁-HyNic基を含有する配列5'-GCUACAUCUGGAGACAUAUtを有するポリヌクレオチド構築物である。本発明の2つの例示的なポリヌクレオチドは、図7Bに示される1つまたは3つの(GalNAc)₃-HyNic基を含有する。(GalNAc)₃-siRNN-Cy3は、5'末端Gのヌクレオチド間架橋基に共役された1つの(GalNAc)₃-HyNic基を含有する配列5'-GCUACAUCUGGAGACAUAUtを有するポリヌクレオチド構築物である。(GalNAc)₉-siRNN-Cy3は、5'-GCUの3つのヌクレオチド間架橋基に共役された3つの(GalNAc)₃-HyNic基を含有する配列5'-GCUACAUCUGGAGACAUAUTを有するポリヌクレオチド構築物である。本発明の2つの例示的なポリヌクレオチドは、図8に示される1つまたは3つのMan₆-Lys₆-PEG₂₄-HyNic基を含有する。(マンノース)₆-siRNN-Cy3は、5'末端Gのヌクレオチド間架橋基に共役された1つのMan₆-Lys₆-PEG₂₄-HyNic基を含有する配列5'-GCUACAUCUGGAGACAUAUTを有するポリヌクレオチド構築物である。(マンノース)₁₈-siRNN-Cy3は、5'末端生物可逆的基および5'-GCU内の2つのヌクレオチド間生物可逆的基(生物可逆的基のそれぞれが、3つのヌクレオチド間基に共役されたMan₆-Lys₆-PEG₂₄-HyNic基を含む)を含有する配列5'-GCUACAUCUGGAGACAUAUTを有するポリヌクレオチド構築物である。

【0567】

本発明の他の調製ポリヌクレオチドは、生物不可逆的または生物可逆的基の一部として1～10個(例えば、1～4つ)のヌクレオチド間基に共役された1～3つのGalNAcモノマー(以下を参照)を含有する。

【化235】



【0568】

例示的なsiRNAトリエステルおよびコンジュゲートの一覧が、表5～9ならびに図10、11、および20Aに示される。

【0569】

表5

化合物名	リガンド	標的	種	番号	配列(5'-3')	共有プロトタイプリガー
SB-0068	P20	GAPDH	P	P3271	UCUACAUGUCCAGUAUGAUC	アルデヒド-ジスルフィド(4-炭素)
			G	G3273	UCAUACUGGAACAUGUAGAUC	アルデヒド-ジスルフィド(4-炭素)
SB-0069	P21	GAPDH	P	P3271	UCUACAUGUCCAGUAUGAUC	アルデヒド-ジスルフィド(4-炭素)
			G	G3273	UCAUACUGGAACAUGUAGAUC	アルデヒド-ジスルフィド(4-炭素)
SB-0070	P36	GAPDH	P	P3271	UCUACAUGUCCAGUAUGAUC	アルデヒド-ジスルフィド(4-炭素)
			G	G3273	UCAUACUGGAACAUGUAGAUC	アルデヒド-ジスルフィド(4-炭素)
SB-0071	M6	GAPDH	P	P3270	UCUACAUGUCCAGUAUGAUC	アルデヒド-ジスルフィド(4-炭素)
			G	G3102	UCAUACUGGAACAUGUAGAUC	アルデヒド-ジスルフィド(4-炭素)
SB-0072	M6	GAPDH	P	P3271	UCUACAUGUCCAGUAUGAUC	アルデヒド-ジスルフィド(4-炭素)
			G	G3102	UCAUACUGGAACAUGUAGAUC	アルデヒド-ジスルフィド(4-炭素)
SB-0073	NAG19	ApoB	P	P3276	UUGGUAUUCAGUGUGAUGAUC	sヒドラン
			G	G3258	UCAUACAUGGAUACCAUC	
SB-0074	NAG19	ApoB	P	P3277	UUGGUAUUCAGUGUGAUGAUC	アルデヒド-ジスルフィド(オルト)
			G	G3258	UCAUACAUGGAUACCAUC	アルデヒド-ジスルフィド(オルト)
SB-0075	NAG19	ApoB	P	P3279	UUGGUAUUCAGUGUGAUGAUC	アルデヒド-ジスルフィド(オルト)
			G	G3282	UCAUACAUGGAUACCAUC	アルデヒド-ジスルフィド(4-炭素)
SB-0076	F3	GAPDH	P	P3270	UCUACAUGUCCAGUAUGAUC	アルデヒド-ジスルフィド(4-炭素)
			G	G3272	UCAUACUGGAACAUGUAGAUC	アルデヒド-ジスルフィド(4-炭素)
SB-0077	F3	GAPDH	P	P3270	UCUACAUGUCCAGUAUGAUC	アルデヒド-ジスルフィド(4-炭素)
			G	G3102	UCAUACUGGAACAUGUAGAUC	アルデヒド-ジスルフィド(4-炭素)
SB-0078	P17	GAPDH	P	P3101	UCUACAUGUCCAGUAUGAUC	アルデヒド-ジスルフィド(4-炭素)
			G	G3272	UCAUACUGGAACAUGUAGAUC	アルデヒド-ジスルフィド(4-炭素)
SB-0080	P33	GAPDH	P	P3270	UCUACAUGUCCAGUAUGAUC	アルデヒド-ジスルフィド(4-炭素)
			G	G3272	UCAUACUGGAACAUGUAGAUC	アルデヒド-ジスルフィド(4-炭素)
SB-0081	NAG21	ApoB	P	P3287	Hex-UCUACAUGGAUACCAUC	5'クリック
			G	G3282	UUGGUAUUCAGUGUGAUGAUC	
SB-0082	F3	GAPDH	P	P3270	UCUACAUGUCCAGUAUGAUC	アルデヒド-ジスルフィド(4-炭素)
			G	G3272	UCAUACUGGAACAUGUAGAUC	アルデヒド-ジスルフィド(4-炭素)
SB-0083	F3	GAPDH	P	P3270	UCUACAUGUCCAGUAUGAUC	アルデヒド-ジスルフィド(4-炭素)
			G	G3272	UCAUACUGGAACAUGUAGAUC	アルデヒド-ジスルフィド(4-炭素)
SB-0085	NAG21	ApoB	P	P3297	Hex-UCUACAUGGAUACCAUC	5'クリック
			G	G3258	UUGGUAUUCAGUGUGAUGAUC	

【表 1 2】

SB-0088	P34	GAPDH	P	P3270	UCUACAGUUCACAGUAGUt	アルデヒド-ジスルフィド(+酸素)
			G	G3102	UCAUACUGGAACACUGUGAGUt	
SB-0089	P34	GAPDH	P	P3270	UCUACAGUUCACAGUAGUt	アルデヒド-ジスルフィド(+酸素)
	P34		G	G3272	UCAUACUGGAACACUGUGAGUt	アルデヒド-ジスルフィド(+酸素)
SB-0090	F3	GAPDH	P	P3270	UCUACAGUUCACAGUAGUt	アルデヒド-ジスルフィド(+酸素)
	P34		G	G3272	UCAUACUGGAACACUGUGAGUt	アルデヒド-ジスルフィド(+酸素)
SB-0094	NAG21	ApoB	P	P3290	Hex-UCAUCACACUGAAUACCAUt	s'クリック
			G	G3292	UUGGUAUUCACUGUGUAGUt	
SB-0095	NAG21	NTC	P	P3291	Hex-AGUACUGUCUACGUAACGGUt	s'クリック
			G	G3293	CCGUUUGUAAGCAGURCUUt	
SB-0096	NAG19	ApoB	P	P3294	UCAUCACACUGAAUACCAUt	アルデヒド-ジスルフィド(オルト)
			G	G3292	UUGGUAUUCAGUGUGAGUt	
SB-0097	NAG21	ApoB	P	P3295	UCAUCACACUGAAUACCAUt	アルケン-ジスルフィド(オルト)
			G	G3292	UUGGUAUUCAGUGUGAGUt	
SB-0098	NAG19	ApoB	P	P3296	Ald-UCAUCACACUGAAUACCAUt	s'ヒドラン
			G	G3292	UUGGUAUUCAGUGUGAGUt	
SB-0099	PSMA10	Luc	P	P3182	GCUCACUUCUGGAGACAUUt	アルデヒド-ジスルフィド(+酸素)
			G	G3247	Cy3-UAUGUCUCCAGAAUGUGUt	
SB-0100	PSMA20	Luc	P	P3182	GCUCACUUCUGGAGACAUUt	アルデヒド-ジスルフィド(+酸素)
			G	G3247	Cy3-UAUGUCUCCAGAAUGUGUt	
SB-0101	NAG21	ApoB	P	P3298	Hex-UCACACACUGAAUACCAUt	s'クリック
			G	G3299	UUGGUAUUCAGUGUGAGUt	
SB-0102	NAG21	ApoB	P	P3307	UCAUCACACUGAAUACCAUt	アルケン-ジスルフィド(オルト)
			G	G3292	UUGGUAUUCAGUGUGAGUt	
SB-0103	NAG21	ApoB	P	P3308	UCAUCACACUGAAUACCAUt	アルケン-ジスルフィド(オルト)
			G	G3292	UUGGUAUUCAGUGUGAGUt	
SB-0104	NAG21	ApoB	P	P3309	UCAUCACACUGAAUACCAUt	アルケン-ジスルフィド(オルト)
			G	G3292	UUGGUAUUCAGUGUGAGUt	
SB-0105	F6	ApoB	P	P3290	Hex-UCAUCACACUGAAUACCAUt	s'クリック
			G	G3310	IR700-UUGGUAUUCAGUGUGAGUt	
SB-0106	NAG21	ApoB	P	P3312	UCAUCACACUGAAUACCAUt	アルケン-ジスルフィド(オルト)
			G	G3314	UUGGCAUUCAGUGUGAGUt	
SB-0107	NAG21	ApoB	P	P3313	UCAUCACACUGAAUACCAUt	アルケン-ジスルフィド(オルト)
			G	G3292	UUGGCAUUCAGUGUGAGUt	

【 0 5 7 1 】

10

20

30

【表 1 3】

SB-0108	NAG21	ApoB	P	P318	Hex-UCAG ⁺ ACACUGAGUACCAAU ⁺	S'クリック
			G	G319	UUGGUAUUCAGUGUGAUGAU ⁺	
SB-0109	NAG21	ApoB	P	P320	Hex-U ⁺ CAUCACACUGAUAUACCAAU ⁺	S'クリック
			G	G306	U ⁺ UGGUAUUCAGUGUGAUGAU ⁺	
SB-0110	NAG21	ApoB	P	P3295	U ⁺ CAUCACACUGAUAUACCAAU ⁺	アルキン-ジスルフィド(オルト)
			G	G3315	UUGGUAUUCAGUGUGAUGAU ⁺	
SB-0111	NAG21	ApoB	P	P3295	U ⁺ CAUCACACUGAUAUACCAAU ⁺	アルキン-ジスルフィド(オルト)
	P34		G	G3303	UUGGUAUUCAGUGUGAUGAU ⁺	アルデヒド-ジスルフィド(オルト)
SB-0112	NAG21	ApoB	P	P3295	U ⁺ CAUCACACUGAUAUACCAAU ⁺	アルキン-ジスルフィド(オルト)
	P32		G	G3303	UUGGUAUUCAGUGUGAUGAU ⁺	アルデヒド-ジスルフィド(オルト)
SB-0113	NAG21	ApoB	P	P3295	U ⁺ CAUCACACUGAUAUACCAAU ⁺	アルキン-ジスルフィド(オルト)
	P17		G	G3303	UUGGUAUUCAGUGUGAUGAU ⁺	アルデヒド-ジスルフィド(オルト)
SB-0114	NAG21	ApoB	P	P3295	U ⁺ CAUCACACUGAUAUACCAAU ⁺	アルキン-ジスルフィド(オルト)
	P18		G	G3303	UUGGUAUUCAGUGUGAUGAU ⁺	アルデヒド-ジスルフィド(オルト)
SB-0115	NAG21	ApoB	P	P3295	U ⁺ CAUCACACUGAUAUACCAAU ⁺	アルキン-ジスルフィド(オルト)
	P33		G	G3303	UUGGUAUUCAGUGUGAUGAU ⁺	アルデヒド-ジスルフィド(オルト)
SB-0116	NAG21	ApoB	P	P3295	U ⁺ CAUCACACUGAUAUACCAAU ⁺	アルキン-ジスルフィド(オルト)
	P35		G	G3303	UUGGUAUUCAGUGUGAUGAU ⁺	アルデヒド-ジスルフィド(オルト)
SB-0117	NAG21	ApoB	P	P3295	U ⁺ CAUCACACUGAUAUACCAAU ⁺	アルキン-ジスルフィド(オルト)
	P05		G	G3303	UUGGUAUUCAGUGUGAUGAU ⁺	アルデヒド-ジスルフィド(オルト)
SB-0118	NAG21	ApoB	P	P3295	U ⁺ CAUCACACUGAUAUACCAAU ⁺	アルキン-ジスルフィド(オルト)
	P04		G	G3303	UUGGUAUUCAGUGUGAUGAU ⁺	アルデヒド-ジスルフィド(オルト)
SB-0119	NAG21	ApoB	P	P3295	U ⁺ CAUCACACUGAUAUACCAAU ⁺	アルキン-ジスルフィド(オルト)
	P20		G	G3303	UUGGUAUUCAGUGUGAUGAU ⁺	アルデヒド-ジスルフィド(オルト)
SB-0120	NAG21	Factor VII	P	P3316	AGGAUCAUCUGAUGUUAU ⁺	アルキン-ジスルフィド(オルト)
			G	G3317	U ⁺ AAGACUUGAUGAUCCU ⁺	S'クリック
SB-0121	NAG21	ApoB	P	P3363	Hex-U ⁺ CAUCACACUGAUAUACCAAU ⁺	
			G	G3366	UUGGUAUUCAGUGUGAUGAU ⁺	
SB-0122	NAG21	ApoB	P	P3359	Hex-U ⁺ CAUCACACUGAUAUACCAAU ⁺	S'クリック
			G	G3360	UUGGUAUUCAGUGUGAUGAU ⁺	
SB-0123	NAG21	ApoB	P	P3361	U ⁺ CAUCACACUGAUAUACCAAU ⁺	アルキン-ジスルフィド(オルト)
			G	G3362	UUGGUAUUCAGUGUGAUGAU ⁺	
SB-0124	M9	GAPDH	P	P	U ⁺ CAUCAGUUCACAGUGAUGAU ⁺	アルキン-ジスルフィド(オルト)
			G	G	U ⁺ CAUCAGUACACAGUGAUGAU ⁺	
SB-0130	NAG21	ApoB	P	P3373	U ⁺ CAUCACACUGAUAUACCAAU ⁺	アルキン-ジスルフィド(オルト)
			G	G3372	UUGGUAUUCAGUGUGAUGAU ⁺	

【0 5 7 2】

10

20

30

【表 1 4】

SB-0132	M9	ApoB	P	UCAUCACACUGAUAUACCAAUt UGGUAUUCAGUGUGAUGAUt	アルキン-ジスルフトオリト
SB-0133	NAG21	ApoB	P	P3295 UCAUCACACUGAUAUACCAAUt	アルキン-ジスルフトオリト
SB-0134	NAG21	ApoB	G	G3378 UGGUAUUCAGUGUGAUGAUt	アルキン-ジスルフトオリト
SB-0135	NAG21	ApoB	P	P3376 UCAUCACACUGAUAUACCAAUt	アルキン-ジスルフトオリト
SB-0136	NAG21	ApoB	G	G3378 UGGUAUUCAGUGUGAUGAUt	アルキン-ジスルフトオリト
SB-0137	NAG21	ApoB	P	P3376 UCAUCACACUGAUAUACCAAUt	アルキン-ジスルフトオリト
SB-0138	M9	GAPDH	G	G3380 UCAUCACACUGAUAUACCAAUt	アルキン-ジスルフトオリト
SB-0139	M9	GAPDH	P	P3382 Hex-UscUAUCAGUUCACGUAUGAUt	5'ウイング
SB-0140	NAG21	ApoB	P	P3384 Hex-UscUAUCAGUUCACGUAUGAUt	5'ウイング
SB-0141	P45	ApoB	G	G3365 UCAUCACACUGAUAUACCAAUt	5'ウイング
SB-0142	NAG21	ApoB	P	P3354 Hex-UscUAUCAGUUCACGUAUGAUt	アルキン-ジスルフトオリト
SB-0143	P45	ApoB	G	G3457 UCAUCACACUGAUAUACCAAUt	アルキン-ジスルフトオリト
SB-0144	NAG21	ApoB	P	P3307 UCAUCACACUGAUAUACCAAUt	アルキン-ジスルフトオリト
SB-0145	NAG21	ApoB	G	G3372 UCAUCACACUGAUAUACCAAUt	アルキン-ジスルフトオリト
SB-0146	NAG21	ApoB	P	P3376 UCAUCACACUGAUAUACCAAUt	アルキン-ジスルフトオリト
SB-0147	NAG21	ApoB	G	G3381 UCAUCACACUGAUAUACCAAUt	アルキン-ジスルフトオリト
SB-0148	NAG21	ApoB	P	P3364 UCAUCACACUGAUAUACCAAUt	アルキン-ジスルフトオリト
SB-0149	NAG21	ApoB	G	G3365 UCAUCACACUGAUAUACCAAUt	アルキン-ジスルフトオリト
SB-0150	NAG21	ApoB	P	P3458 Hex-UscUAUCAGUUCACGUAUGAUt	5'ウイング
SB-0151	NAG21	ApoB	G	G3459 UCAUCACACUGAUAUACCAAUt	5'ウイング
SB-0152	NAG21	ApoB	P	P3460 UCAUCACACUGAUAUACCAAUt	5'ウイング
SB-0153	NAG21	ApoB	G	G3461 UCAUCACACUGAUAUACCAAUt	5'ウイング
SB-0154	NAG21	ApoB	P	P3452 Hex-UscUAUCAGUUCACGUAUGAUt	5'ウイング
SB-0155	NAG21	ApoB	G	G3453 UCAUCACACUGAUAUACCAAUt	5'ウイング
SB-0156	NAG21	ApoB	P	P3462 UCAUCACACUGAUAUACCAAUt	5'ウイング
SB-0157	NAG21	ApoB	G	G3463 UCAUCACACUGAUAUACCAAUt	5'ウイング
SB-0158	NAG21	ApoB	P	P3307 UCAUCACACUGAUAUACCAAUt	アルキン-ジスルフトオリト
SB-0159	NAG21	ApoB	G	G3372 UCAUCACACUGAUAUACCAAUt	アルキン-ジスルフトオリト
SB-0160	NAG21	ApoB	P	P3307 UCAUCACACUGAUAUACCAAUt	アルキン-ジスルフトオリト
SB-0161	NAG21	ApoB	G	G3372 UCAUCACACUGAUAUACCAAUt	アルキン-ジスルフトオリト
SB-0162	NAG21	ApoB	P	P3307 UCAUCACACUGAUAUACCAAUt	アルキン-ジスルフトオリト
SB-0163	NAG21	ApoB	G	G3372 UCAUCACACUGAUAUACCAAUt	アルキン-ジスルフトオリト

【 0 5 7 3 】

10

20

30

【表 15】

SB-0164	P50	ApoB	P	P3307	U CAUCACUGAAUACCAAut	アルキン-ジスルフィド(オルト)
	NAG21		G	G3372	UUGGUAUUCAGUGUGAUAU	アルキン-ジスルフィド(オルト)
SB-0222	NAG21	ApoB	P	P3522	U CAUCACUGAAUACCAAut	アルキン-ジスルフィド(オルト)
			G	G3292	UUGGUAUUCAGUGUGAUAU	
SB-0223	NAG21	ApoB	P	P3523	U CAUCACUGAAUACCAAut	アルキン-ジスルフィド(オルト)
			G	G3292	UUGGUAUUCAGUGUGAUAU	
SB-0224	NAG21	ApoB	P	P3524	U CAUCACUGAAUACCAAut	アルキン-ジスルフィド(オルト)
			G	G3292	UUGGUAUUCAGUGUGAUAU	
SB-0225	NAG21	ApoB	P	P3295	U CAUCACUGAAUACCAAut	アルキン-ジスルフィド(オルト)
	NAG21		G	G3525	UUGGUAUUCAGUGUGAUAU	アルキン-ジスルフィド(オルト)
SB-0226	NAG21	ApoB	P	P3523	U CAUCACUGAAUACCAAut	アルキン-ジスルフィド(オルト)
	NAG21		G	G3525	UUGGUAUUCAGUGUGAUAU	アルキン-ジスルフィド(オルト)
SB-0227	M30	GAPDH	P	P3364	U CAUCACUGAAUACCAAut	アルキン-ジスルフィド(オルト)
			G	G3365	U CAUCACUGAAUACCAAut	
SB-0228	M30	GAPDH	P	P3527	U CAUCACUGAAUACCAAut	アルキン-ジスルフィド(オルト)
			G	G3365	U CAUCACUGAAUACCAAut	
SB-0229	M30	GAPDH	P	P3528	U CAUCACUGAAUACCAAut	アルキン-ジスルフィド(オルト)
			G	G3365	U CAUCACUGAAUACCAAut	
SB-0230	M30	GAPDH	P	P3529	U CAUCACUGAAUACCAAut	アルキン-ジスルフィド(オルト)
			G	G3365	U CAUCACUGAAUACCAAut	
SB-0231	M30	GAPDH	P	P3530	U CAUCACUGAAUACCAAut	アルキン-ジスルフィド(オルト)
			G	G3365	U CAUCACUGAAUACCAAut	
SB-0232	M30	GAPDH	P	P3528	U CAUCACUGAAUACCAAut	アルキン-ジスルフィド(オルト)
			G	G3365	U CAUCACUGAAUACCAAut	
SB-0233	PSMA10	GAPDH	P	P3526	U CAUCACUGAAUACCAAut	アルキン-ジスルフィド(オルト)
			G	G3365	U CAUCACUGAAUACCAAut	
SB-0234	P51	ApoB	P	P3307	U CAUCACUGAAUACCAAut	アルキン-ジスルフィド(オルト)
	NAG21		G	G3372	UUGGUAUUCAGUGUGAUAU	アルキン-ジスルフィド(オルト)
SB-0235	P52	ApoB	P	P3307	U CAUCACUGAAUACCAAut	アルキン-ジスルフィド(オルト)
	NAG21		G	G3372	UUGGUAUUCAGUGUGAUAU	アルキン-ジスルフィド(オルト)
SB-0236	P49	ApoB	P	P3307	U CAUCACUGAAUACCAAut	アルキン-ジスルフィド(オルト)
	NAG21		G	G3372	UUGGUAUUCAGUGUGAUAU	アルキン-ジスルフィド(オルト)
SB-0237	P37	ApoB	P	P3307	U CAUCACUGAAUACCAAut	アルキン-ジスルフィド(オルト)

10

20

30

【0574】

【表 16】

SB-0238	P38 NAG21	ApoB	P	P3307	UGUACACUGAAUACCAAUt	アルキン-ジスルフィドオリト
SB-0239	P39 NAG21	ApoB	G	G3372	UGGUUAUUCAGUGUGAUt	アルキン-ジスルフィドオリト
SB-0240	P47 NAG21	ApoB	P	P3307	UGUACACUGAAUACCAAUt	アルキン-ジスルフィドオリト
SB-0241	P46 NAG21	ApoB	G	G3372	UGGUUAUUCAGUGUGAUt	アルキン-ジスルフィドオリト
SB-0242	M15 NAG21	ApoB	P	P3307	UGUACACUGAAUACCAAUt	アルキン-ジスルフィドオリト
SB-0248	M15	GAPDH	G	G3365	UGGUUAUUCAGUGUGAUt	アルキン-ジスルフィドオリト
SB-0249	M15	GAPDH	P	P3327	UGUACACUGAAUACCAAUt	アルキン-ジスルフィドオリト
SB-0250	M15	GAPDH	G	G3365	UGGUUAUUCAGUGUGAUt	アルキン-ジスルフィドオリト
SB-0251	M15	GAPDH	P	P3327	UGUACACUGAAUACCAAUt	アルキン-ジスルフィドオリト
SB-0252	M15	GAPDH	G	G3365	UGGUUAUUCAGUGUGAUt	アルキン-ジスルフィドオリト
SB-0253	PSMA20	GAPDH	P	P3526	UGUACACUGAAUACCAAUt	アルキン-ジスルフィドオリト
SB-0259	P45 NAG21	ApoB	G	G3365	UGGUUAUUCAGUGUGAUt	アルキン-ジスルフィドオリト
SB-0260	P45 NAG21	ApoB	P	P3551	UGUACACUGAAUACCAAUt	アルキン-ジスルフィドオリト
SB-0285	NAG21	ApoB	G	G3372	UGGUUAUUCAGUGUGAUt	アルキン-ジスルフィドオリト
SB-0286	NAG21	ApoB	P	P3554	Hex-U (m1) UGGUUAUUCAGUGUGAUt	スクレリック
			G	G3554	Hex-U (m2) UGGUUAUUCAGUGUGAUt	スクレリック
			P	P3555	Hex-U (m1) UGGUUAUUCAGUGUGAUt	
			G	G3556	Hex-U (m2) UGGUUAUUCAGUGUGAUt	

10

20

30

【0575】

本発明の混合 siRNA コンジュゲートが、表 6 に示される。

【0576】

表6

化合物#	リガンド	標的	種	類	配列(5'-3')	共役-プロドラッグリンカー
SB-0097	NAG21	ApoB	P	P3295	UCAUCACACUGAUAUACCAAU t	アルキン-ジスルフィド(オルト)
			G	G3292	UUGGUUAUUCACUGUGUGAU t	該当なし
SB-0111	NAG21	ApoB	P	P3295	UCAUCACACUGAUAUACCAAU t	アルキン-ジスルフィド(オルト)
	P34		G	G3303	UUGGUUAUUCACUGUGUGAU t	アルデヒド-ジスルフィド(オルト)
SB-0112	NAG21	ApoB	P	P3295	UCAUCACACUGAUAUACCAAU t	アルキン-ジスルフィド(オルト)
	P32		G	G3303	UUGGUUAUUCACUGUGUGAU t	アルデヒド-ジスルフィド(オルト)
SB-0113	NAG21	ApoB	P	P3295	UCAUCACACUGAUAUACCAAU t	アルキン-ジスルフィド(オルト)
	P17		G	G3303	UUGGUUAUUCACUGUGUGAU t	アルデヒド-ジスルフィド(オルト)
SB-0114	NAG21	ApoB	P	P3295	UCAUCACACUGAUAUACCAAU t	アルキン-ジスルフィド(オルト)
	P18		G	G3303	UUGGUUAUUCACUGUGUGAU t	アルデヒド-ジスルフィド(オルト)
SB-0115	NAG21	ApoB	P	P3295	UCAUCACACUGAUAUACCAAU t	アルキン-ジスルフィド(オルト)
	P33		G	G3303	UUGGUUAUUCACUGUGUGAU t	アルデヒド-ジスルフィド(オルト)
SB-0116	NAG21	ApoB	P	P3295	UCAUCACACUGAUAUACCAAU t	アルキン-ジスルフィド(オルト)
	P35		G	G3303	UUGGUUAUUCACUGUGUGAU t	アルデヒド-ジスルフィド(オルト)
SB-0117	NAG21	ApoB	P	P3295	UCAUCACACUGAUAUACCAAU t	アルキン-ジスルフィド(オルト)
	P05		G	G3303	UUGGUUAUUCACUGUGUGAU t	アルデヒド-ジスルフィド(オルト)
SB-0118	NAG21	ApoB	P	P3295	UCAUCACACUGAUAUACCAAU t	アルキン-ジスルフィド(オルト)
	P04		G	G3303	UUGGUUAUUCACUGUGUGAU t	アルデヒド-ジスルフィド(オルト)
SB-0119	NAG21	ApoB	P	P3295	UCAUCACACUGAUAUACCAAU t	アルキン-ジスルフィド(オルト)
	P20		G	G3303	UUGGUUAUUCACUGUGUGAU t	アルデヒド-ジスルフィド(オルト)

表5および6について、大文字 = 2'OMe-プリン、2Tピリミジン、小文字 = デオキシ、小文字大文字 = 3,3-ジメチルブチル (DMB)、太字 = iPHDS (オルト)

(2'OMe-プリン、2Tピリミジン)、斜体 = tBuDS (2'OMe-プリン、2Tピリミジン)、小文字斜体 = tBuDS-Ph (オルト) (2'OMe-プリン、2Tピリミジン)

太字斜体 = tBuDS-Ph (オルト) ホスホロチオエート (2'OMe-プリン、2Tピリミジン)、下線 = 共役プロドラッグ位置、s = ホスホロチオエート、

i=NMI-DS-Ph; p=PEG4-DS-Ph; m=tBuDS-Ph(Me); b=tBuDS-Ph(Br); ml=tBuDS-(ml)Me-Ph; m2=tBuDS-(m2)Me-Ph; Ald = s'-ベンズアルデヒド; Hex = s'-ヘキシニル、

IR = 赤外線イメージング色素、C₃が、シアニンC₃色素であり、DSが、ジスルフィドを意味し、この表の題意では、Phが、フェニルを意味する。

【表 19】

表7 化合物#	リガンド	標的	種	鎖#	配列 (5'-3')	プロパルキル
SB-0277	NAG21	ApoB	P	P3371	<u>U</u> pCaUCaCaCUGaaUaCCaaU	プロパルキル
			G	G3540	U <u>J</u> ggUauUUCagUgUgaU	プロパルキル
SB-0278	NAG21	ApoB	P	P3371	<u>U</u> pCaUCaCaCUGaaUaCCaaU	プロパルキル
			G	G3541	U <u>J</u> ggUauUUCagUgUgaU	プロパルキル
SB-0279	NAG21	ApoB	P	P3371	<u>U</u> pCaUCaCaCUGaaUaCCaaU	プロパルキル
			G	G3542	U <u>J</u> ggUbaUUCagUgUgaU	プロパルキル
SB-0280	NAG21	ApoB	P	P3371	<u>U</u> pCaUCaCaCUGaaUaCCaaU	プロパルキル
			G	G3543	U <u>J</u> ggUauUUCagUgUgaU	プロパルキル
SB-0281	NAG21	ApoB	P	P3371	<u>U</u> pCaUCaCaCUGaaUaCCaaU	プロパルキル
			G	G3544	U <u>J</u> ggUbaUUCagUgUgaU	プロパルキル
SB-0282	NAG21	ApoB	P	P3371	<u>U</u> pCaUCaCaCUGaaUaCCaaU	プロパルキル
			G	G3545	U <u>J</u> ggUPaUUCagUgUgaU	プロパルキル
SB-0283	NAG21	ApoB	P	P3371	<u>U</u> pCaUCaCaCUGaaUaCCaaU	プロパルキル
			G	G3546	U <u>J</u> ggUauUUCagUgUgaU	プロパルキル
SB-0284	NAG21	ApoB	P	P3371	<u>U</u> pCaUCaCaCUGaaUaCCaaU	プロパルキル
			G	G3547	U <u>J</u> ggUPaUUCagUgUgaU	プロパルキル
SB-0289	NAG21	ApoB	P	P3557	<u>U</u> pCaUCaCaCUGaaUaCCaaU	プロパルキル
			G	G3558	U <u>J</u> ggUauUUCagUgUgaU	プロパルキル
SB-0290	NAG21	ApoB	P	P3557	<u>U</u> pCaUCaCaCUGaaUaCCaaU	プロパルキル
			G	G3559	U <u>J</u> ggUauUUCagUgUgaU	プロパルキル
SB-0291	NAG21	ApoB	P	P3560	<u>U</u> pCbaUCaCaCUGaaUaCCaaU	プロパルキル
			G	G3558	U <u>J</u> ggUauUUCagUgUgaU	プロパルキル
SB-0292	NAG21	ApoB	P	P3557	<u>U</u> pCaUCaCaCUGaaUaCCaaU	プロパルキル
			G	G3561	U <u>J</u> pggUauUUCagUgUgaU	プロパルキル
SB-0293	NAG21	ApoB	P	P3560	<u>U</u> pCbaUCaCaCUGaaUaCCaaU	プロパルキル
			G	G3561	U <u>J</u> pggUauUUCagUgUgaU	プロパルキル
SB-0294	NAG21	ApoB	P	P3560	<u>U</u> pCbaUCaCaCUGaaUaCCaaU	プロパルキル
			G	G3562	U <u>J</u> pggUauUUCagUgUgaU	プロパルキル
SB-0295	NAG21	AT3	P	P3563	<u>g</u> pgUbaUaCaCCAUuAcUcCaa	プロパルキル
			G	G3564	U <u>J</u> bgAaGuAaAuggUgUuAcCag	プロパルキル
SB-0296	NAG21	AT3	P	P3563	<u>g</u> pgUbaUaCaCCAUuAcUcCaa	プロパルキル
			G	G3508	U <u>J</u> gAaGuAaAuggUgUuAcCag	プロパルキル
SB-0297	NAG21	AT3	P	P3507	<u>g</u> pgUbaUaCaCCAUuAcUcCaa	プロパルキル
			G	G3564	U <u>J</u> bgAaGuAaAuggUgUuAcCag	プロパルキル
SB-0298	NAG21	ApoB	P	P3565	<u>U</u> pcAuCaCuGaUaAcCaU	プロパルキル
			G	G3566	U <u>J</u> gGuAuUcAgUgUgaU	プロパルキル
SB-0299	NAG21	ApoB	P	P3567	<u>U</u> pcAuCaCuGaUaAcCaU	プロパルキル
			G	G3568	U <u>J</u> gGuAuUcAgUgUgaU	プロパルキル
SB-0300	NAG21	ApoB	P	P3569	<u>U</u> pgUcAuCaCACuGaUaAcCaA	プロパルキル

【0579】

10

20

30

【表 20】

表7 化合物#	リガンド	標的	種	鎖#	配列 (5'-3')	
SB-0310	M9	Luc	G	G3570	UUgGuAUcAGugUgAUgCaCaQu	プロバールキル
			P	3571	gpCUaCaUUCUggaCaUaUt	
SB-0311	None	Luc	G	3572	UaUgUCUCCagaaUgUagCUt	なし
			P	3571	gpCUaCaUUCUggaCaUaUt	
SB-0312	None	Luc	P	3572	UaUgUCUCCagaaUgUagCUt	なし
			P	3024	gCUaCaUUCUggaCaUaUt	
SB-0313	None	GAPDH	P	3025	UaUgUCUCCagaaUgUagCUt	なし
			P	P3101	UCUaCaUgUUCcagUaUgaUt	
SB-0314	NAG21	ApoB	G	G3102	UCaUaCUggaCaUgUgaUt	
			P	P3574	UpCaUCaCaCUgaaUaCCaaUpt	プロバールキル
SB-0315	NAG21	ApoB	G	G3575	UUgguUaUUCagUgUgaUpt	
			P	P3574	UpCaUCaCaCUgaaUaCCaaUpt	プロバールキル
SB-0316	NAG21	ApoB	G	G3576	UPUgguUaUUCagUgUgaUpt	
			P	P3574	UpCaUCaCaCUgaaUaCCaaUpt	プロバールキル
SB-0317	NAG21	ApoB	G	G3577	UUgguUaUUCagUgUgaUpt	
			P	P3371	UpCaUCaCaCUgaaUaCCaaU	プロバールキル
SB-0318	NAG21	ApoB	G	G3578	UUgguUaUUCagUgUgaU	
			P	P3371	UpCaUCaCaCUgaaUaCCaaU	プロバールキル
SB-0319	NAG21	AT3	G	G3579	UUgguUaUUCagUgUgaU	
			P	P3507	UUgguUaUUCagUgUgaU	プロバールキル
SB-0320	NAG21	AT3	G	G3580	gBgUuAaCaCCAUuAcUuCaag	
			P	P3507	UUgguUaUUCagUgUgaU	プロバールキル
SB-0321	NAG21	AT3	G	G3581	gBgUuAaCaCCAUuAcUuCaag	
			P	P3582	UUgguUaUUCagUgUgaU	プロバールキル
SB-0322	NAG21	AT3	G	G3583	UUgguUaUUCagUgUgaU	
			P	P3582	UUgguUaUUCagUgUgaU	プロバールキル
SB-0323	NAG21	AT3	G	G3584	UUgguUaUUCagUgUgaU	
			P	P3582	UUgguUaUUCagUgUgaU	プロバールキル
SB-0324	M9	GAPDH	P	G3585	UUgguUaUUCagUgUgaU	
			G	P3586	UpCUaCaUgUUCcagUaUgaUt	プロバールキル
SB-0325	M9	GAPDH	P	G3365	UCaUaCUggaCaUgUgaUt	
			P	P3587	UpCUaCaUgUUCcagUaUgaUt	プロバールキル
SB-0326	M9	GAPDH	G	G3589	UpCUaCaUgUUCcagUaUgaUt	
			P	P3588	UpCUaCaUgUUCcagUaUgaUt	プロバールキル
SB-0327	None	GAPDH	G	G3590	UpCUaCaUgUUCcagUaUgaUt	
			P	P3586	UpCUaCaUgUUCcagUaUgaUt	なし
SB-0328	None	GAPDH	G	G3365	UCaUaCUggaCaUgUgaUt	
			P	P3587	UpCUaCaUgUUCcagUaUgaUt	なし
			G	G3589	UpCUaCaUgUUCcagUaUgaUt	

【 0 5 8 0 】

10

20

30

【表 2 1】

表7 化合物#	リガンド	標的	種	鎖#	配列 (5'-3')	なし
SB-0329	None	GAPDH	P	P3588	UpCaUaCaUgUUCaGuaUgaUpt	なし
SB-0330	None	AT3	P	G3590	UpCaUaUggaCaUgUgaUpt	なし
SB-0332	NAG21	AT3	G	P3507	gpgUuAaCaCCAUuAcUuUcAa	プロバヒルギル
SB-0333	NAG21	AT3	P	G3508	UgAaGuAaAuggUgUuAaCcag	プロバヒルギル
SB-0334	NAG21	AT3	G	P3582	gpgUuAaCaCCAUuAcUuUcAa	プロバヒルギル
SB-0335	NAG21	AT3	P	G3508	UgAaGuAaAuggUgUuAaCcag	プロバヒルギル
SB-0336	NAG21	AT3	G	P3591	gpgUuAaCaCCAUuAcUuUcAa	プロバヒルギル
SB-0337	NAG21	AT3	P	G3508	UgAaGuAaAuggUgUuAaCcag	プロバヒルギル
SB-0338	ABL5	AT3	P	P3592	gpgUuAaCaCCAUuAcUuUcAa	プロバヒルギル
SB-0339	NAG21	AT3	G	G3508	UgAaGuAaAuggUgUuAaCcag	プロバヒルギル
SB-0340	NAG21	AT3	P	P3593	gpgUuAaCaCCAUuAcUuUcAa	プロバヒルギル
SB-0341	NAG21	AT3	G	G3508	UgAaGuAaAuggUgUuAaCcag	プロバヒルギル
SB-0342	NAG21	AT3	P	P3594	gpgUuAaCaCCAUuAcUuUcAa	プロバヒルギル
SB-0343	NAG21	AT3	G	G3508	UgAaGuAaAuggUgUuAaCcag	プロバヒルギル
SB-0344	NAG21	AT3	P	P3595	gpgUuAaCaCCAUuAcUuUcAa	プロバヒルギル
SB-0345	NAG21	AT3	G	G3508	UgAaGuAaAuggUgUuAaCcag	プロバヒルギル
SB-0346	NAG21	AT3	P	P3507	gpgUuAaCaCCAUuAcUuUcAa	プロバヒルギル
SB-0347	SP1L	AT3	G	G3603	UgAaGuAaAuggUgUuAaCcU	メチル-プロバヒルギル
SB-0348	NAG21	AT3	P	P3604	gpgUuAaCaCCAUuAcUuUcAa	プロバヒルギル
SB-0349	NAG21	AT3	G	G3603	UgAaGuAaAuggUgUuAaCcU	プロバヒルギル
			P	P3605	UgAaGuAaAuggUgUuAaCcU	プロバヒルギル
			G	G3606	UgAaGuAaAuggUgUuAaCc	プロバヒルギル
			P	P3607	UgAaGuAaAuggUgUuAaCc	プロバヒルギル
			G	G3608	UgAaGuAaAuggUgUuAaCc	プロバヒルギル
			P	P3598	UgAaGuAaAuggUgUuAaCc	プロバヒルギル
			G	G3508	UgAaGuAaAuggUgUuAaCc	プロバヒルギル
			P	P3599	UgAaGuAaAuggUgUuAaCc	プロバヒルギル
			G	G3508	UgAaGuAaAuggUgUuAaCc	プロバヒルギル
			P	P3595	UgAaGuAaAuggUgUuAaCc	プロバヒルギル
			G	G3596	UgAaGuAaAuggUgUuAaCc	プロバヒルギル
			P	P3507	UgAaGuAaAuggUgUuAaCc	プロバヒルギル
			G	G3615	UgAaGuAaAuggUgUuAaCc	プロバヒルギル
			P	P3507	UgAaGuAaAuggUgUuAaCc	プロバヒルギル

【0 5 8 1】

10

20

30

【表 2 2】

表7 化合物#	リガンド	標的	類	薬#	配列 (5' - 3')
SB-0351	PEG24	GAPDH	G	G3616	Ph-UplUaAGuAaAuggUgUuAaCcappg <u>U</u> pC <u>U</u> paCaUgUuCCcagUaUggaU <u>U</u> pt
SB-0353	PEG4	GAPDH	P	P3620	UCaUaCUGgaaCaUgUagU <u>U</u> t
SB-0354	PEG24	GAPDH	P	P3619	<u>U</u> pC <u>U</u> aCaUgUuCCcagUaUaUg <u>U</u> pt
SB-0355	PEG4	GAPDH	P	P3619	UCaUaCUGgaaCaUgUagU <u>U</u> t
SB-0356	NAG28	GAPDH	P	P36364	<u>U</u> pC <u>U</u> paCaUgUuCCcagUaUggaU <u>U</u> pt
SB-0357	NAG28	GAPDH	P	P36365	UCaUaCUGgaaCaUgUagU <u>U</u> t
SB-0358	NAG28	GAPDH	P	P36365	<u>U</u> pC <u>U</u> aCaUgUuCCcagUaUaUg <u>U</u> pt
SB-0359	NAG28	GAPDH	P	P36365	UCaUaCUGgaaCaUgUagU <u>U</u> t
SB-0360	NAG28	GAPDH	P	P36365	<u>U</u> pC <u>U</u> aCaUgUuCCcagUaUaUg <u>U</u> pt
SB-0366	NAG21	AT3	G	G3615	UCaUaCUGgaaCaUgUagU <u>U</u> t
SB-0367	NAG21	AT3	P	P3612	<u>U</u> pC <u>U</u> aCaUgUuCCcagUaUaUg <u>U</u> pt
SB-0368	NAG21	AT3	P	P3613	UCaUaCUGgaaCaUgUagU <u>U</u> t
SB-0369	NAG21	AT3	P	P3615	<u>U</u> pC <u>U</u> aCaUgUuCCcagUaUaUg <u>U</u> pt
SB-0370	None	AT3	P	P3627	UCaUaCUGgaaCaUgUagU <u>U</u> t
SB-0371	PEG4	AT3	G	G3630	<u>U</u> pC <u>U</u> aCaUgUuCCcagUaUaUg <u>U</u> pt
SB-0372	NAG21	AT3	P	P3627	UCaUaCUGgaaCaUgUagU <u>U</u> t
SB-0373	PEG12	AT3	G	G3630	<u>U</u> pC <u>U</u> aCaUgUuCCcagUaUaUg <u>U</u> pt
SB-0374	NAG21	AT3	P	P3627	UCaUaCUGgaaCaUgUagU <u>U</u> t
SB-0375	None	AT3	P	P3628	<u>U</u> pC <u>U</u> aCaUgUuCCcagUaUaUg <u>U</u> pt
	NAG21	AT3	G	G3630	UCaUaCUGgaaCaUgUagU <u>U</u> t

10

20

30

【 0 5 8 2 】

【表 2 3】

表7 化合物#	リガンド	標的	質	質#	配列 (5'-3')
SB-0376	PEG4	AT3	P	P3628	<u>gggUpuAaCaCCAUUUAcUpuCapa</u>
	NAG21		G	G3630	<u>UgAaGuAaAuggUgUuAaCaapg</u>
SB-0377	PEG8	AT3	P	P3628	<u>gggUpuAaCaCCAUUUAcUpuCapa</u>
	PEG21		G	G3630	<u>UgAaGuAaAuggUgUuAaCaapg</u>
SB-0378	PEG12	AT3	P	P3628	<u>gggUpuAaCaCCAUUUAcUpuCapa</u>
	NAG21		G	G3630	<u>UgAaGuAaAuggUgUuAaCaapg</u>
SB-0379	PEG24	AT3	P	P3628	<u>gggUpuAaCaCCAUUUAcUpuCapa</u>
	NAG21		G	G3630	<u>UgAaGuAaAuggUgUuAaCaapg</u>
SB-0381	NAG21	AT3	P	P3609	<u>gBCC-gbgUuAaCaCCAUUUAcUuCa</u>
			G	G3508	<u>UgAaGuAaAuggUgUuAaCaag</u>
SB-0382	NAG21	AT3	P	P3610	<u>Hex-gbgUuAaCaCCAUUUAcUuCa</u>
			G	G3508	<u>UgAaGuAaAuggUgUuAaCaag</u>
SB-0383		GAPDH	P	P3619	<u>UgCUaCaUgUUCcCagUaUgaUpt</u>
			G	G3625	<u>UgCUaCaUgUUCcCagUaUgaUpt</u>
SB-0384	PEG4	GAPDH	P	P3619	<u>UgCUaCaUgUUCcCagUaUgaUpt</u>
			G	G3625	<u>UgCUaCaUgUUCcCagUaUgaUpt</u>
SB-0385	PEG8	GAPDH	P	P3619	<u>UgCUaCaUgUUCcCagUaUgaUpt</u>
			G	G3625	<u>UgCUaCaUgUUCcCagUaUgaUpt</u>
SB-0386	PEG12	GAPDH	P	P3619	<u>UgCUaCaUgUUCcCagUaUgaUpt</u>
			G	G3625	<u>UgCUaCaUgUUCcCagUaUgaUpt</u>
SB-0387	PEG24	GAPDH	P	P3619	<u>UgCUaCaUgUUCcCagUaUgaUpt</u>
			G	G3625	<u>UgCUaCaUgUUCcCagUaUgaUpt</u>
SB-0388	M9	GAPDH	P	P3619	<u>UgCUaCaUgUUCcCagUaUgaUpt</u>
			G	G3625	<u>UgCUaCaUgUUCcCagUaUgaUpt</u>
SB-0389	PEG4	GAPDH	P	P3619	<u>UgCUaCaUgUUCcCagUaUgaUpt</u>
	M9		G	G3625	<u>UgCUaCaUgUUCcCagUaUgaUpt</u>
SB-0390	PEG8	GAPDH	P	P3619	<u>UgCUaCaUgUUCcCagUaUgaUpt</u>
	M9		G	G3625	<u>UgCUaCaUgUUCcCagUaUgaUpt</u>
SB-0391	PEG12	GAPDH	P	P3619	<u>UgCUaCaUgUUCcCagUaUgaUpt</u>
	M9		G	G3625	<u>UgCUaCaUgUUCcCagUaUgaUpt</u>
SB-0392	PEG24	GAPDH	P	P3619	<u>UgCUaCaUgUUCcCagUaUgaUpt</u>
	M9		G	G3625	<u>UgCUaCaUgUUCcCagUaUgaUpt</u>
SB-0393		GAPDH	P	P3620	<u>UgCUaCaUgUUCcCagUaUgaUpt</u>
			G	G3625	<u>UgCUaCaUgUUCcCagUaUgaUpt</u>
SB-0394	PEG4	GAPDH	P	P3620	<u>UgCUaCaUgUUCcCagUaUgaUpt</u>
			G	G3625	<u>UgCUaCaUgUUCcCagUaUgaUpt</u>
SB-0395	PEG8	GAPDH	P	P3620	<u>UgCUaCaUgUUCcCagUaUgaUpt</u>
			G	G3625	<u>UgCUaCaUgUUCcCagUaUgaUpt</u>
SB-0396	PEG12	GAPDH	P	P3620	<u>UgCUaCaUgUUCcCagUaUgaUpt</u>

【 0 5 8 3 】

10

20

30

【表 2 4】

表7 化合物#	リガンド	標的	質	鍵#	配列 (5'-3')	
SB-0397	PEG24	GAPDH	P	G3625	<u>U</u> CaUaCUggaaCaUgUagaUpt	プロバールキル
SB-0398		GAPDH	G	P3620	<u>U</u> CaUaCUggaaCaUgUagaUpt	AIKNS-PH
SB-0399	M9	GAPDH	P	G3625	<u>U</u> CaUaCUggaaCaUgUagaUpt	プロバールキル
SB-0400	PEG8	GAPDH	P	P3620	<u>U</u> CaUaCUggaaCaUgUagaUpt	AIKNS-PH
SB-0401	PEG12	GAPDH	P	G3625	<u>U</u> CaUaCUggaaCaUgUagaUpt	プロバールキル
SB-0402	PEG24	GAPDH	P	P3620	<u>U</u> CaUaCUggaaCaUgUagaUpt	AIKNS-PH
SB-0403	M9	GAPDH	P	G3625	<u>U</u> CaUaCUggaaCaUgUagaUpt	プロバールキル
SB-0404	PEG4	GAPDH	P	P3621	<u>U</u> CaUaCUggaaCaUgUagaUpt	プロバールキル
SB-0405	PEG8	GAPDH	P	G3625	<u>U</u> CaUaCUggaaCaUgUagaUpt	プロバールキル
SB-0406	PEG12	GAPDH	P	P3621	<u>U</u> CaUaCUggaaCaUgUagaUpt	プロバールキル
SB-0407	PEG24	GAPDH	P	G3625	<u>U</u> CaUaCUggaaCaUgUagaUpt	プロバールキル
SB-0408	M30	GAPDH	P	P3621	<u>U</u> CaUaCUggaaCaUgUagaUpt	プロバールキル
SB-0409	PEG4	GAPDH	P	G3625	<u>U</u> CaUaCUggaaCaUgUagaUpt	AIKNS-PH
SB-0410	PEG8	GAPDH	P	P3621	<u>U</u> CaUaCUggaaCaUgUagaUpt	AIKNS-PH
SB-0411	PEG12	GAPDH	P	G3625	<u>U</u> CaUaCUggaaCaUgUagaUpt	プロバールキル
SB-0412	PEG24	GAPDH	P	P3621	<u>U</u> CaUaCUggaaCaUgUagaUpt	AIKNS-PH
SB-0432	M30	Luc	P	G3625	<u>U</u> CaUaCUggaaCaUgUagaUpt	AIKNS-PH
SB-0433	PEG24	Luc	P	P3645	<u>U</u> CaUaCUggaaCaUgUagaUpt	AIKNS-PH
SB-0434	PEG24	Luc	P	G3639	<u>U</u> CaUaCUggaaCaUgUagaUpt	AIKNS-PH

【 0 5 8 4 】

10

20

30

【表 2 5】

表7 化合物#	リガンド	標的	類	鎖#	配列 (5'-3')	
SB-0435	F6	Luc	P	P3645	gqCUaCaUUCUggagaCaUaUt	プロパルギル
SB-0436	PEG24		G	G3639	IR-UaUgUUCUCCagaaUgUagCUt	AIKDS-Ph
SB-0437	F6	Luc	P	P3571	gqCUaCaUUCUggagaCaUaUt	プロパルギル
SB-0438	PEG24		G	G3573	IR-UaUgUUCUCCagaaUgUagCUt	プロパルギル
SB-0439	NAG21	Luc	P	P3571	gqCUaCaUUCUggagaCaUaUt	AIKDS-Ph
SB-0440	M6	Luc	G	G3639	IR-UaUgUUCUCCagaaUgUagCUt	プロパルギル
SB-0441	NAG21	Luc	P	P3571	gqCUaCaUUCUggagaCaUaUt	プロパルギル
SB-0442		Luc	P	G3573	IR-UaUgUUCUCCagaaUgUagCUt	プロパルギル
SB-0443		Luc	P	P3571	gqCUaCaUUCUggagaCaUaUt	プロパルギル
SB-0444		Luc	P	G3573	IR-UaUgUUCUCCagaaUgUagCUt	プロパルギル
SB-0445	NAG21	AT3	G	P3571	gqCUaCaUUCUggagaCaUaUt	プロパルギル
SB-0446	NAG21	AT3	P	G3573	IR-UaUgUUCUCCagaaUgUagCUt	プロパルギル
SB-0447	NAG21	AT3	G	G3508	DBCO-gpgUuAaCaCCAUuUaCUaCaa	DBCO
SB-0448	NAG21	AT3	P	P3674	UuAaGuAaAuggUgUuAaCcag	
SB-0449	NAG21	AT3	G	G3507	gpgUuAaCaCCAUuUaCUaCaa	AIKDS-Ph
SB-0450	NAG21	AT3	P	G3646	UuAaGuAaAuggUgUuAaCcag	プロパルギル
SB-0451	NAG21	AT3	G	P3507	gqCUaCaUUCUggagaCaUaUt	
SB-0452	NAG21	AT3	P	G3681	UuAaGuAaAuggUgUuAaCcag	
SB-0453	NAG21	AT3	G	P3507	gpgUuAaCaCCAUuUaCUaCaa	AIKDS-Ph
SB-0454	NAG21	AT3	P	G3682	UuAaGuAaAuggUgUuAaCcag	プロパルギル
SB-0455	NAG21	AT3	G	P3507	gpgUuAaCaCCAUuUaCUaCaa	
SB-0456	NAG21	AT3	P	G3686	UuAaGuAaAuggUgUuAaCcag	AIKDS-Ph
SB-0457	NAG21	AT3	G	P3507	gpgUuAaCaCCAUuUaCUaCaa	プロパルギル
SB-0458	NAG21	AT3	P	G3682	UuAaGuAaAuggUgUuAaCcag	
SB-0459	NAG21	AT3	G	P3507	gpgUuAaCaCCAUuUaCUaCaa	プロパルギル
SB-0460	NAG21	AT3	P	G3728	UuAaGuAaAuggUgUuAaCcag	
SB-0461	NAG21	AT3	G	P3507	gpgUuAaCaCCAUuUaCUaCaa	プロパルギル
SB-0462	NAG21	AT3	P	G3729	UuAaGuAaAuggUgUuAaCcag	
SB-0463	NAG21	AT3	G	P3507	gpgUuAaCaCCAUuUaCUaCaa	プロパルギル
SB-0464	NAG21	AT3	P	G3730	UuAaGuAaAuggUgUuAaCcag	プロパルギル
SB-0465	NAG21	AT3	G	P3507	gpgUuAaCaCCAUuUaCUaCaa	プロパルギル
SB-0466	NAG21	AT3	P	G3731	UuAaGuAaAuggUgUuAaCcag	プロパルギル
SB-0467	NAG21	AT3	G	P3507	gpgUuAaCaCCAUuUaCUaCaa	プロパルギル
SB-0468	NAG21	AT3	P	G3732	UuAaGuAaAuggUgUuAaCcag	プロパルギル
SB-0469	NAG21	AT3	G	P3507	gpgUuAaCaCCAUuUaCUaCaa	プロパルギル
SB-0470	NAG21	AT3	P	G3733	UuAaGuAaAuggUgUuAaCcag	プロパルギル
SB-0471	NAG21	AT3	G	P3507	gpgUuAaCaCCAUuUaCUaCaa	プロパルギル
SB-0472	NAG21	AT3	P	G3734	UuAaGuAaAuggUgUuAaCcag	プロパルギル
SB-0473	NAG21	AT3	G	P3746	gpgUuAaCaCCAUuUaCUaCaa	プロパルギル
SB-0474	NAG21	AT3	P	G3508	UuAaGuAaAuggUgUuAaCcag	AIKDS-Ph
SB-0475	NAG21	AT3	G			プロパルギル, AIKDS-Ph

【 0 5 8 5】

10

20

30

【表 2 6】

表7 化合物#	リガンド	標的	類	鎖#	配列 (5'-3')	AlkDS-Ph
SB-0517	NAG28	AT3	P	P3747	gpgUuAaCaCCAUUUAcUuUcAa	AlkDS-Ph
SB-0518	NAG28	AT3	G	G3508	UUgAaGuAaAuggUgUuAaCcag	AlkDS-Ph
SB-0519	M30	SIRPa	P	P3748	gpgUuAaCaCCAUuAAGUUcAa	AlkDS-Ph
SB-0520	M30	SIRPa	G	G3508	UUgAaGuAaAuggUgUuAaCcag	AlkDS-Ph
SB-0522	NAG21	AT3	P	P3742	gpgGaGaAuAcGUUcCuCgAaU	AlkDS-Ph
SB-0523	NAG21	AT3	G	G3743	aUUCgAgGaacGuAUUcUcUgbc	AlkDS-Ph
SB-0524	NAG21	AT3	P	P3744	gpgAaAuAcGUUcCuCgAaUUA	AlkDS-Ph
SB-0525	NAG21	AT3	G	G3745	aUUCgAgGaAcGuAUUcUcU	AlkDS-Ph
SB-0526	NAG21	AT3	P	P3749	gpgsUuAaCaCCAUuAaUcUcAa	AlkDS-Ph
SB-0527	NAG21	AT3	G	G3508	UUgAaGuAaAuggUgUuAaCcag	AlkDS-Ph
SB-0528	NAG21	AT3	P	P3750	gpgUuAaCaCCAUuAaUcUcAa	AlkDS-Ph
SB-0529	NAG21	AT3	G	G3508	UUgAaGuAaAuggUgUuAaCcag	AlkDS-Ph
SB-0530	NAG21	AT3	P	P3751	gpgUuAaCaCCAUuAaUcUcAa	AlkDS-Ph
SB-0531	NAG21	AT3	G	G3508	UUgAaGuAaAuggUgUuAaCcag	AlkDS-Ph
SB-0532	NAG21	AT3	P	P3752	gpgUuAaCaCCAUuAaUcUcAa	AlkDS-Ph
SB-0533	NAG21	AT3	G	G3508	UUgAaGuAaAuggUgUuAaCcag	AlkDS-Ph
SB-0535	NAG21	AT3	P	P3753	gpgUuAaCaCCAUuAaUcUcAa	AlkDS-Ph
SB-0538	NAG21	AT3	G	G3508	UUgAaGuAaAuggUgUuAaCcag	AlkDS-Ph
SB-0539	NAG21	AT3	P	P3754	gpgUuAaCaCCAUuAaUcUcAa	AlkDS-Ph
SB-0560	NAG21	AT3	G	G3508	UUgAaGuAaAuggUgUuAaCcag	AlkDS-Ph
SB-0560	NAG21	AT3	P	P3755	gpgUuAaCaCCAUuAaUcUcAa	AlkDS-Ph
SB-0560	NAG21	AT3	G	G3755	UsUsgAaGuAaAuggUgUuAaCcag	AlkDS-Ph
SB-0560	NAG21	AT3	P	P3507	gpgUuAaCaCCAUuAaUcUcAa	AlkDS-Ph
SB-0560	NAG21	AT3	G	G3756	UUsgAaGuAaAuggUgUuAaCcag	AlkDS-Ph
SB-0560	NAG21	AT3	P	P3507	gpgUuAaCaCCAUuAaUcUcAa	AlkDS-Ph
SB-0560	NAG21	AT3	G	G3757	UUsgAaGuAaAuggUgUuAaCcag	AlkDS-Ph
SB-0560	NAG21	AT3	P	P3507	gpgUuAaCaCCAUuAaUcUcAa	AlkDS-Ph
SB-0560	NAG21	AT3	G	G3758	UUsgAaGuAaAuggUgUuAaCcag	AlkDS-Ph
SB-0560	NAG21	AT3	P	P3507	gpgUuAaCaCCAUuAaUcUcAa	AlkDS-Ph
SB-0560	NAG21	AT3	G	G3759	UUsgAaGuAaAuggUgUuAaCcag	AlkDS-Ph
SB-0560	NAG21	AT3	P	P3507	gpgUuAaCaCCAUuAaUcUcAa	AlkDS-Ph
SB-0560	NAG21	AT3	G	G3760	UUsgAaGuAaAuggUgUuAaCcag	AlkDS-Ph
SB-0560	NAG21	AT3	P	P3882	gpgUuAaCaCCAUuAaUcUcAa-PEG6-gpgUuAaCaCCAUuAaUcUcAa	AlkDS-Ph
SB-0560	NAG21	AT3	G	G3508	(UUgAaGuAaAuggUgUuAaCcag)/2	AlkDS-Ph
SB-0560	NAG21	AT3	P	P3777	DBCO-gmgUuAaCaCCAUuAaUcUcCama	DBCO
SB-0560	NAG21	AT3	G	G3778	UUgAaGuAaAuggUgUuAaCcama	DBCO
SB-0560	NAG21	AT3	P	P3777	DBCO-gmgUuAaCaCCAUuAaUcUcCama	AlkDS-Ph
SB-0560	NAG21	AT3	G	G3779	UmUgAaGuAaAuggUgUuAaCcama	AlkDS-Ph
SB-0560	NAG21	AT3	P	P3780	gpgUuAaCaCCAUuAaUcUcCama	AlkDS-Ph

【 0 5 8 6 】

10

20

30

【表 27】

表7 化合物#	リガンド	標的	鎖	鎖#	配列 (5'-3')
SB-0561	NAG21	AT3	G	G3781	UsUgAaGuAaAuggUgUuAaCcag
			P	P3782	gpgsgsUuAaCaCCAUuUAcUuCsasa
SB-0588	NAG21	AT3	G	G3783	UsUgAaGuAaAuggUgUuAaCcscag
			P	P3784	<u>DBCO</u> -gsgsUuAaCaCCAUuUAcUuCsasa
SB-0589	NAG21	AT3	G	G3785	UsUgAaGuAaAuggUgUuAaCcscag
			P	P3786	<u>DBCO</u> -gsgUuAaCaCCAUuUAcUuCasa
SB-0590	NAG28	AT3	G	G3787	UsUgAaGuAaAuggUgUuAaCcscag
			P	P3794	gbgUuAaCaCCAUuUAcUu <u>UpCpapa</u>
SB-0591	NAG28	AT3	G	G3508	UgAaGuAaAuggUgUuAaCcag
			P	P3795	gbgUuAaCaCCAUuA <u>ACpUUpCapa</u>
SB-0592	NAG28	AT3	G	G3508	UgAaGuAaAuggUgUuAaCcag
			P	P3796	gbgUuAaCaCCAUuUAcUu <u>Cpapa</u>
SB-0593	NAG28	AT3	G	G3646	UgAaGuAaAuggUgUuAaCcag
			P	P3797	gbgUuAaCaCCAUuUAcUu <u>UpCapa</u>
SB-0594	NAG28	AT3	G	G3646	UgAaGuAaAuggUgUuAaCcag
			P	P3507	<u>gpg</u> UuAaCaCCAUuUAcUuCaa
SB-0595	NAG21	AT3	G	G3799	UgAaGuAaAuggUgUuAaCCag
			P	P3798	gbgUuAaCaCCAUuUAcUuCaa
SB-0596	NAG28	AT3	G	G3799	UgAaGuAaAuggUgUuAaCCag
			P	P3507	<u>gpg</u> UuAaCaCCAUuUAcUuCaa
SB-0597	NAG28	AT3	G	G3800	UgAaGuAaAuggUgUuAaCCag
			P	P3798	gbgUuAaCaCCAUuUAcUuCaa
SB-0598	NAG28	AT3	G	G3800	UgAaGuAaAuggUgUuAaCCag
			P	P3507	<u>gpg</u> UuAaCaCCAUuUAcUuCaa
SB-0599	NAG28	AT3	G	G3801	UgAaGuAaAuggUgUuAaCCag
			P	P3507	<u>gpg</u> UuAaCaCCAUuUAcUuCaa
SB-0599	NAG28	AT3	G	G3802	UgAaGuAaAuggUgUuAaCCag
			P	P3507	<u>gpg</u> UuAaCaCCAUuUAcUuCaa
SB-0600	NAG28	AT3	G	G3802	UgAaGuAaAuggUgUuAaCCag
			P	P3507	<u>gpg</u> UuAaCaCCAUuUAcUuCaa
SB-0601	NAG21	AT3	G	G3671	(<u>gpg</u> UuAaCaCCAUuUAcUuCaa)2
			P	P3507	(<u>UgUg</u> UuAaGuAaAuggUgUuAaCcag)2
SB-0602	NAG21	AT3	G	G3671	gsgsUuAaCaCCAUuUAcUuCasas-Alk
			P	P3805	usUgAaGuAaAuggUgUuAaCcscag
SB-0603	NAG21	AT3	G	G3504	gbgUuAaCaCCAUuUAcUuCaA-Alk
			P	P3806	UgAaGuAaAuggUgUuAaCcag
SB-0604	NAG21	AT3	G	G3508	gbgUuAaCaCCAUuUAcUuCaA-Alk
			P	P3807	UgAaGuAaAuggUgUuAaCcag
			G	G3508	UgAaGuAaAuggUgUuAaCcag
			P	P3808	gbgUuAaCaCCAUuUAcUuCaA-Alk
			G	G3508	UgAaGuAaAuggUgUuAaCcag

【表 2 9】

表7 化合物#	リガンド	標的	鎖	鎖#	配列 (5' - 3')	
SB-0639	NAG21	AT3	G	G3818	UUgAaGuAaAuggUgUuAaCca gb	プロパルギル
			P	P3833	gpg UuAaCaCCAUuUuAaCaa-S-S-g bg UuAaCaCCAUuUuAaCaa	プロパルギル
SB-0640	NAG21	AT3	G	G3508	(UUgAaGuAaAuggUgUuAaCca g)2	プロパルギル
SB-0641	NAG28	AT3	P	P3834	gpg UuAaCaCCAUuUuAaCaa-S-S-g g UuAaCaCCAUuUuAaCaa	プロパルギル
SB-0642	NAG28	AT3	G	G3508	(UUgAaGuAaAuggUgUuAaCca g)2	プロパルギル
SB-0643	NAG28	AT3	P	P3814	gpgp UgUuAaCaCCAUuUuAaCaa	プロパルギル
SB-0644	NAG28	AT3	G	G3508	UUgAaGuAaAuggUgUuAaCca g	プロパルギル
SB-0645	NAG28	AT3	P	P3815	gpg UuAaCaCCAUuUuAaCaa	プロパルギル
SB-0665	NAG21	AT3	G	G3508	UUgAaGuAaAuggUgUuAaCca g	プロパルギル
SB-0666	NAG21	AT3	P	P3816	gpg UuAaCaCCAUuUuAaCaa	プロパルギル
SB-0667	NAG21	AT3	G	G3508	UUgAaGuAaAuggUgUuAaCca g	プロパルギル
SB-0672	NAG21	AT3	P	P3840	gpg UuAaCaCCAUuUuAaCaa	プロパルギル
SB-0673	NAG21	AT3	G	G3842	UUgAaGuAaAuggUgUuAaCca g	プロパルギル
SB-0674	NAG21	AT3	P	P3841	gpg UuAaCaCCAUuUuAaCaa	プロパルギル
SB-0675	NAG21	AT3	G	G3843	UUgAaGuAaAuggUgUuAaCca g	プロパルギル
SB-0676	NAG21	AT3	P	P3836	gpg UuAaCaCCAUuUuAaCaa	プロパルギル
SB-0677	NAG21	AT3	G	G3838	UUgAaGuAaAuggUgUuAaCca g	プロパルギル
SB-0678	NAG21	AT3	P	P3507	gpg UuAaCaCCAUuUuAaCaa	プロパルギル
SB-0706	NAG21	AT3	G	G3838	UUgAaGuAaAuggUgUuAaCca g	プロパルギル
SB-0707	NAG21	AT3	P	P3836	gpg UuAaCaCCAUuUuAaCaa	プロパルギル
SB-0720	NAG21	AT3	G	G3508	UUgAaGuAaAuggUgUuAaCca g	プロパルギル
SB-0721	NAG21	AT3	P	P3837	gpg UuAaCaCCAUuUuAaCaa	プロパルギル
SB-0722	NAG21	AT3	G	G3839	UUgAaGuAaAuggUgUuAaCca g	プロパルギル
			P	P3507	gpg UuAaCaCCAUuUuAaCaa	プロパルギル
			G	G3839	UUgAaGuAaAuggUgUuAaCca g	プロパルギル
			P	P3837	gpg UuAaCaCCAUuUuAaCaa	プロパルギル
			G	G3508	UUgAaGuAaAuggUgUuAaCca g	プロパルギル
			P	P3507	gpg UuAaCaCCAUuUuAaCaa	プロパルギル
			G	G3846	UUgAaGuAaAuggUgUuAaCca g	プロパルギル
			P	P3872	gpg UuAaCaCCAUuUuAaCaa	プロパルギル
			G	G3873	UUgAaGuAaAuggUgUuAaCca g	プロパルギル
			P	P3872	gpg UuAaCaCCAUuUuAaCaa	プロパルギル
			G	G3874	UUgAaGuAaAuggUgUuAaCca g	プロパルギル
			P	P3507	gpg UuAaCaCCAUuUuAaCaa	プロパルギル
			G	G3646	UUgAaGuAaAuggUgUuAaCca g	プロパルギル
			P	P3507	gpg UuAaCaCCAUuUuAaCaa	プロパルギル
			G	G3801	UUgAaGuAaAuggUgUuAaCca g	プロパルギル
			P	P3507	gpg UuAaCaCCAUuUuAaCaa	プロパルギル
			G	G3802	UUgAaGuAaAuggUgUuAaCca g	プロパルギル

10

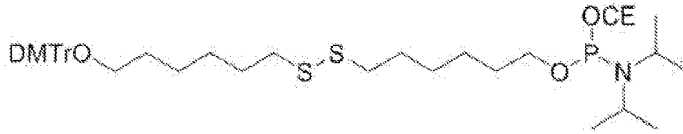
20

30

【 0 5 8 9 】

ジャー鎖は、互いに直接共有結合されない。SB-0639およびSB-0640は、第1のパスセンジャー鎖の3'末端を、第2のパスセンジャー鎖の5'末端に連結するC6ジスルフィドスペーサを含む。第1のパスセンジャーは、第1のガイド鎖にハイブリダイズされ、第2のパスセンジャー鎖は、第2のガイド鎖にハイブリダイズされる。2つのガイド鎖は、互いに直接共有結合されない。C6ジスルフィドスペーサを、以下のホスホラミダイトから形成した。

【化237】



10

【0592】

【表31】

表8

ApoB ss 配列	二本鎖SB #	ss SB #	90~95%超の純度 での収率 (%)
パスセンジャー鎖 (5' - 3')			
<u>U</u> CAUCACACUGAAUACCA <u>AU</u> T	SB-0165	P3373	対照
<u>U</u> CAUCACACUGAAUACCA <u>AU</u> T	SB-0166	P3371	44.7
<u>U</u> CAUCACACUGAAUACCA <u>AU</u> T	SB-0167	P3464	3.2
<u>U</u> CAUCACACUGAAUACCA <u>AU</u> T	SB-0168	P3465	68.6
<u>U</u> CAUCACACUGAAUACCA <u>AU</u> T	SB-0169	P3466	52
<u>U</u> CAUCACACUGAAUACCA <u>AU</u> T	SB-0170	P3467	27.8
<u>U</u> CAUCACACUGAAUACCA <u>AU</u> T	SB-0171	P3468	56.2
<u>U</u> CAUCACACUGAAUACCA <u>AU</u> T	SB-0172	P3469	13.3
<u>U</u> CAUCACACUGAAUACCA <u>AU</u> T	SB-0173	P3470	55.1
<u>U</u> CAUCACACUGAAUACCA <u>AU</u> T	SB-0174	P3471	30.6
<u>U</u> CAUCACACUGAAUACCA <u>AU</u> T	SB-0175	P3472	56.0
<u>U</u> CAUCACACUGAAUACCA <u>AU</u> T	SB-0176	P3473	24.0
<u>U</u> CAUCACACUGAAUACCA <u>AU</u> T	SB-0177	P3474	52.7
<u>U</u> CAUCACACUGAAUACCA <u>AU</u> T	SB-0178	P3475	44.6

20

30

【0593】

【表 3 2】

ApoB ss 配列	二本鎖SB #	ss SB #	90～95%超の純度 での収率 (%)
<u>U</u> CAUCACACUGAAU <u>ACCAA</u> <u>U</u> T	SB-0179	P3476	51.4
<u>U</u> CAUCACACUGAAU <u>ACCAA</u> <u>U</u> T	SB-0180	P3477	45.6
<u>U</u> CAUCACACUGAAU <u>ACCAA</u> <u>U</u> T	SB-0181	P3478	44.4
<u>U</u> CAUCACACUGAAU <u>ACCAA</u> <u>U</u> T	SB-0182	P3479	45.6
<u>U</u> CAUCACACUGAAU <u>ACCAA</u> <u>U</u> T	SB-0183	P3480	35.2
<u>U</u> CAUCACACUGAAU <u>ACCAA</u> <u>U</u> T	SB-0184	P3481	41.4
<u>U</u> CAUCACACUGAAU <u>ACCAA</u> <u>U</u> T	SB-0185	P3482	51.5
ガイド鎖(3' - 5')			
T <u>U</u> AGUAGUGUGACUUAUGGU <u>U</u>	SB-0165	G3292	対照
T <u>U</u> AGUAGUGUGACUUAUGGU <u>U</u>	SB-0186	G3483	61.0
T <u>U</u> AGUAGUGUGACUUAUGGU <u>U</u>	SB-0187	G3484	56.7
T <u>U</u> AGUAGUGUGACUUAUGGU <u>U</u>	SB-0188	G3485	24.0
T <u>U</u> AGUAGUGUGACUUAUGGU <u>U</u>	SB-0189	G3486	54.1
T <u>U</u> AGUAGUGUGACUUAUGGU <u>U</u>	SB-0190	G3487	35.5
T <u>U</u> AGUAGUGUGACUUAUGGU <u>U</u>	SB-0191	G3488	49.6
T <u>U</u> AGUAGUGUGACUUAUGGU <u>U</u>	SB-0192	G3489	44.6
T <u>U</u> AGUAGUGUGACUUAUGGU <u>U</u>	SB-0193	G3490	46.7
T <u>U</u> AGUAGUGUGACUUAUGGU <u>U</u>	SB-0194	G3491	56.4
T <u>U</u> AGUAGUGUGACUUAUGGU <u>U</u>	SB-0195	G3492	52.0
T <u>U</u> AGUAGUGUGACUUAUGGU <u>U</u>	SB-0196	G3493	49.1
T <u>U</u> AGUAGUGUGACUUAUGGU <u>U</u>	SB-0197	G3494	45.5
T <u>U</u> AGUAGUGUGACUUAUGGU <u>U</u>	SB-0198	G3495	54.3
T <u>U</u> AGUAGUGUGACUUAUGGU <u>U</u>	SB-0199	G3496	49.0
T <u>U</u> AGUAGUGUGACUUAUGGU <u>U</u>	SB-0200	G3497	55.5
T <u>U</u> AGUAGUGUGACUUAUGGU <u>U</u>	SB-0201	G3498	47.1
T <u>U</u> AGUAGUGUGACUUAUGGU <u>U</u>	SB-0202	G3499	52.8
T <u>U</u> AGUAGUGUGACUUAUGGU <u>U</u>	SB-0203	G3500	42.3
T <u>U</u> AGUAGUGUGACUUAUGGU <u>U</u>	SB-0204	G3501	60.0
T <u>U</u> AGUAGUGUGACUUAUGGU <u>U</u>	SB-0205	G3502	53.0

表8において、太字が、3'リン酸に結合されたo-(1-ブチルジチオ)フェネチル基を有するヌクレオチドを示し、
 上線が、3'リン酸に結合されたプロパルギル基を有するヌクレオチドを示す。
 パッセンジャー鎖およびガイド鎖のワトソン・クリックアライメントを有する二本鎖を、本明細書に記載される
 標準的な条件下で鎖をアニーリングすることによって調製した。
 表8に示される鎖から産生される二本鎖は、表9に列挙される。

【0594】

10

20

30

【表 3 3】

表9			
化合物#	構造	化合物#	構造
SB-0165	<u>U</u> CAUCACACUGAAUACCAA <u>U</u> t t <u>U</u> AGUAGUGGACUU <u>U</u> AGGU <u>U</u>	SB-0176	<u>U</u> CAUCACACUGAAUACCAA <u>U</u> t t <u>U</u> AGUAGUGGACUU <u>U</u> AGGU <u>U</u>
SB-0166	<u>U</u> CAUCACACUGAAUACCAA <u>U</u> t t <u>U</u> AGUAGUGGACUU <u>U</u> AGGU <u>U</u>	SB-0177	<u>U</u> CAUCACACUGAAUACCAA <u>U</u> t t <u>U</u> AGUAGUGGACUU <u>U</u> AGGU <u>U</u>
SB-0167	<u>U</u> CAUCACACUGAAUACCAA <u>U</u> t t <u>U</u> AGUAGUGGACUU <u>U</u> AGGU <u>U</u>	SB-0178	<u>U</u> CAUCACACUGAAUACCAA <u>U</u> t t <u>U</u> AGUAGUGGACUU <u>U</u> AGGU <u>U</u>
SB-0168	<u>U</u> CAUCACACUGAAUACCAA <u>U</u> t t <u>U</u> AGUAGUGGACUU <u>U</u> AGGU <u>U</u>	SB-0179	<u>U</u> CAUCACACUGAAUACCAA <u>U</u> t t <u>U</u> AGUAGUGGACUU <u>U</u> AGGU <u>U</u>
SB-0169	<u>U</u> CAUCACACUGAAUACCAA <u>U</u> t t <u>U</u> AGUAGUGGACUU <u>U</u> AGGU <u>U</u>	SB-0180	<u>U</u> CAUCACACUGAAUACCAA <u>U</u> t t <u>U</u> AGUAGUGGACUU <u>U</u> AGGU <u>U</u>
SB-0170	<u>U</u> CAUCACACUGAAUACCAA <u>U</u> t t <u>U</u> AGUAGUGGACUU <u>U</u> AGGU <u>U</u>	SB-0181	<u>U</u> CAUCACACUGAAUACCAA <u>U</u> t t <u>U</u> AGUAGUGGACUU <u>U</u> AGGU <u>U</u>
SB-0171	<u>U</u> CAUCACACUGAAUACCAA <u>U</u> t t <u>U</u> AGUAGUGGACUU <u>U</u> AGGU <u>U</u>	SB-0182	<u>U</u> CAUCACACUGAAUACCAA <u>U</u> t t <u>U</u> AGUAGUGGACUU <u>U</u> AGGU <u>U</u>
SB-0172	<u>U</u> CAUCACACUGAAUACCAA <u>U</u> t t <u>U</u> AGUAGUGGACUU <u>U</u> AGGU <u>U</u>	SB-0183	<u>U</u> CAUCACACUGAAUACCAA <u>U</u> t t <u>U</u> AGUAGUGGACUU <u>U</u> AGGU <u>U</u>
SB-0173	<u>U</u> CAUCACACUGAAUACCAA <u>U</u> t t <u>U</u> AGUAGUGGACUU <u>U</u> AGGU <u>U</u>	SB-0184	<u>U</u> CAUCACACUGAAUACCAA <u>U</u> t t <u>U</u> AGUAGUGGACUU <u>U</u> AGGU <u>U</u>
SB-0174	<u>U</u> CAUCACACUGAAUACCAA <u>U</u> t t <u>U</u> AGUAGUGGACUU <u>U</u> AGGU <u>U</u>	SB-0185	<u>U</u> CAUCACACUGAAUACCAA <u>U</u> t t <u>U</u> AGUAGUGGACUU <u>U</u> AGGU <u>U</u>
SB-0175	<u>U</u> CAUCACACUGAAUACCAA <u>U</u> t t <u>U</u> AGUAGUGGACUU <u>U</u> AGGU <u>U</u>	SB-0196	<u>U</u> CAUCACACUGAAUACCAA <u>U</u> t t <u>U</u> AGUAGUGGACUU <u>U</u> AGGU <u>U</u>
SB-0186	<u>U</u> CAUCACACUGAAUACCAA <u>U</u> t t <u>U</u> AGUAGUGGACUU <u>U</u> AGGU <u>U</u>	SB-0197	<u>U</u> CAUCACACUGAAUACCAA <u>U</u> t t <u>U</u> AGUAGUGGACUU <u>U</u> AGGU <u>U</u>
SB-0187	<u>U</u> CAUCACACUGAAUACCAA <u>U</u> t t <u>U</u> AGUAGUGGACUU <u>U</u> AGGU <u>U</u>	SB-0198	<u>U</u> CAUCACACUGAAUACCAA <u>U</u> t t <u>U</u> AGUAGUGGACUU <u>U</u> AGGU <u>U</u>
SB-0188	<u>U</u> CAUCACACUGAAUACCAA <u>U</u> t t <u>U</u> AGUAGUGGACUU <u>U</u> AGGU <u>U</u>	SB-0199	<u>U</u> CAUCACACUGAAUACCAA <u>U</u> t t <u>U</u> AGUAGUGGACUU <u>U</u> AGGU <u>U</u>
SB-0189	<u>U</u> CAUCACACUGAAUACCAA <u>U</u> t t <u>U</u> AGUAGUGGACUU <u>U</u> AGGU <u>U</u>	SB-0200	<u>U</u> CAUCACACUGAAUACCAA <u>U</u> t t <u>U</u> AGUAGUGGACUU <u>U</u> AGGU <u>U</u>
SB-0190	<u>U</u> CAUCACACUGAAUACCAA <u>U</u> t t <u>U</u> AGUAGUGGACUU <u>U</u> AGGU <u>U</u>	SB-0201	<u>U</u> CAUCACACUGAAUACCAA <u>U</u> t t <u>U</u> AGUAGUGGACUU <u>U</u> AGGU <u>U</u>
SB-191	<u>U</u> CAUCACACUGAAUACCAA <u>U</u> t t <u>U</u> AGUAGUGGACUU <u>U</u> AGGU <u>U</u>	SB-0202	<u>U</u> CAUCACACUGAAUACCAA <u>U</u> t t <u>U</u> AGUAGUGGACUU <u>U</u> AGGU <u>U</u>
SB-0192	<u>U</u> CAUCACACUGAAUACCAA <u>U</u> t t <u>U</u> AGUAGUGGACUU <u>U</u> AGGU <u>U</u>	SB-0203	<u>U</u> CAUCACACUGAAUACCAA <u>U</u> t t <u>U</u> AGUAGUGGACUU <u>U</u> AGGU <u>U</u>
SB-0193	<u>U</u> CAUCACACUGAAUACCAA <u>U</u> t t <u>U</u> AGUAGUGGACUU <u>U</u> AGGU <u>U</u>	SB-0204	<u>U</u> CAUCACACUGAAUACCAA <u>U</u> t t <u>U</u> AGUAGUGGACUU <u>U</u> AGGU <u>U</u>
SB-0194	<u>U</u> CAUCACACUGAAUACCAA <u>U</u> t t <u>U</u> AGUAGUGGACUU <u>U</u> AGGU <u>U</u>		

10

20

30

【0 5 9 5】

【表 3 4】

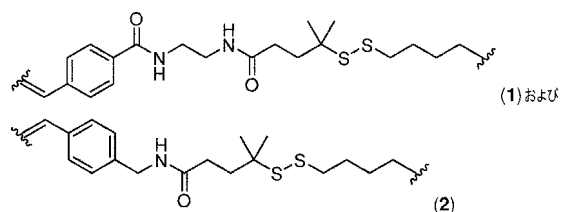
化合物#	構造	化合物#	構造
SB-0195	<u>U</u> CAUCACACUGAAUACCAA <u>U</u> t t <u>U</u> AGUAGUGGACUU <u>U</u> AGGU <u>U</u>	SB-0205	<u>U</u> CAUCACACUGAAUACCAA <u>U</u> t t <u>U</u> AGUAGUGGACUU <u>U</u> AGGU <u>U</u>

40

【0 5 9 6】

本明細書に開示される基のいずれも、以下の非限定的な例示的な基の1つを介してヌクレオチド間架橋リン酸塩または末端リン酸塩に連結され得る。

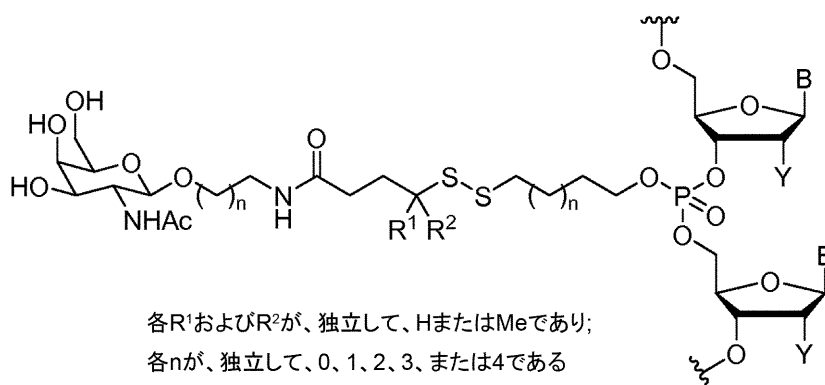
【化 2 3 8】



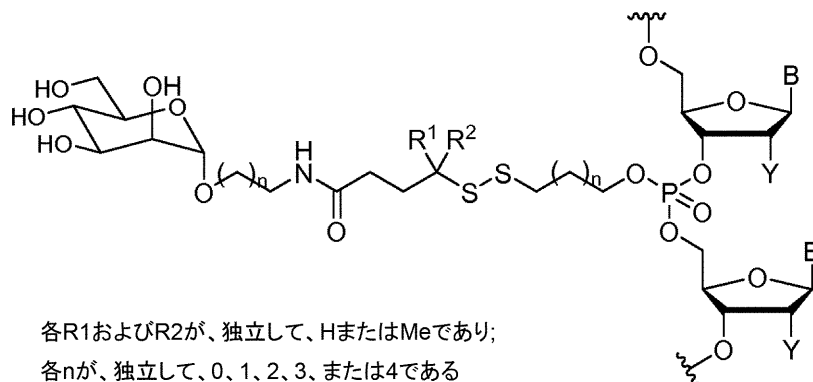
【 0 5 9 7 】

本発明の他のポリヌクレオチドは、本明細書に記載される方法にしたがって調製され得る。このようなポリヌクレオチドは、以下のとおりであり得る。

【化 2 3 9】



(GalNAc-ジスルフィド1)または

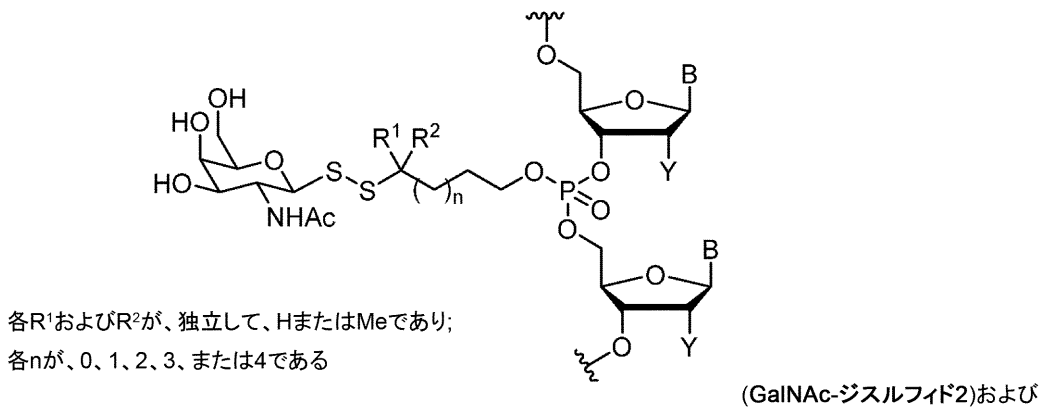


(マンノシル-ジスルフィド1)

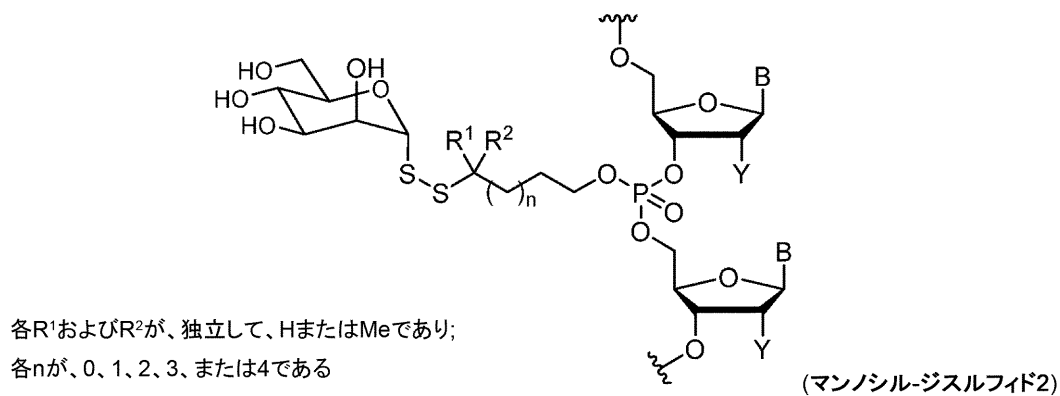
【 0 5 9 8 】

ジスルフィド結合に直接結合された補助部分を含有するポリヌクレオチドも調製されてもよく；例示的なポリヌクレオチドが、以下に示される。

【化 2 4 0】



10



20

【0 5 9 9】

実施例 2. インビトロ活性アッセイ
ルシフェラーゼの発現の抑制

ルシフェラーゼ遺伝子 (GL3) を標的にするポリヌクレオチドを合成し、生物可逆的基 (ジスルフィドホスホジエステルまたはジスルフィドホスホトリエステル) を有するポリヌクレオチド構築物を作製するのに使用した。

【0 6 0 0】

これらのジスルフィドホスホトリエステルのインビトロ活性を評価するために、ルシフェラーゼ (GL3) を安定的に発現するヒト卵巣 SKOV-3 細胞を用いた。10% のウシ胎仔血清 (FBS)、100 μg/ml のストレプトマイシン、および 100 U/ml のペニシリンが補充されたマッコイ (McCoy's) 5A 培地 (Life Technologies) 中で細胞を成長させた。細胞 (1 × 10⁴ 個/ウェル) を、96 ウェルマイクロタイタープレート中で平板培養し、5% の CO₂ 下で、37 °C で一晩インキュベートした。

30

【0 6 0 1】

対照：ルシフェラーゼ遺伝子または非標的対照遺伝子を標的にする対照 siRNA を、製造業者の推奨事項にしたがって、リポフェクタミン RNAiMax (Life Technologies) を用いて、示される濃度 (典型的に、0.01 ~ 30 nM) で細胞にトランスフェクトした。

40

【0 6 0 2】

本発明のポリヌクレオチド構築物：ポリヌクレオチド構築物を細胞に加え、2 時間インキュベートし、その後、4% の FBS を含有する等体積の OptiMEM (Life Technologies) を加え、細胞を 24 ~ 48 時間インキュベートした。次に、細胞を溶解させ、ルシフェリン (Britelite (商標)、Perkin Elmer) の添加後、細胞内ルシフェラーゼ活性を測定し、Victor 2 (商標) ルミノメータ (Perkin Elmer) を用いて発光シグナルを捕捉した。Cell Titer Fluor (商標) アッセイキット (Promega) を用いて細胞毒性を評価し、ルシフ

50

ェラーゼ遺伝子のノックダウンを、細胞毒性について補正し、ビヒクル対照で処理したウエルのパーセントとして表した。Graph Pad Prism Softwareを用いて、ルシフェラーゼノックダウンEC₅₀値を得た。

【0603】

本発明のハイブリダイズポリヌクレオチド（配列番号112および113）についてのこのアッセイの結果が、表10に示される（構造については、図1Aを差参照）。表10において、R⁴が、2-（ベンジルアミノカルボニル）エチルである。

【0604】

【表35】

表10

エントリー	R	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	n	EC50 ^(a) (nM)		EC50 ^(b) (nM)	
							24	48	24	48
							時間	時間	時間	時間
1	Me	H	Me	H	H	1	0.76	0.33	0.42	0.18
2	Me	H	CH ₂ OH	H	H	1	ND	ND	0.13	0.07
3	Me	H	R ⁴	H	H	1	ND	ND	0.68	0.34
4	Me	H	Me	Me	H	1	1.6	0.58	ND	ND
5	Me	H	Me	Me	Me	1	1.0	0.40	ND	ND
6	Me	Me	Me	H	H	1	1.0	0.34	0.38	0.15
7 ^(c)	Me	Me	Me	H	H	2	NA	ND	ND	ND
8 ^(c)	Me	Me	Me	H	H	3	NA	ND	ND	ND
9	Me	Me	R ⁴	H	H	1	ND	ND	0.49	0.20
DMB ^(d)	-	-	-	-	-	-	ND	ND	-	-

^(a) siRNA二本鎖を形成するためのアニーリングを、室温で行った。

^(b) siRNA二本鎖を形成するためのアニーリングを、65℃で行った。

^(c) siRNA二本鎖を形成するためのアニーリングを、室温で行った後、一晚凍結した。

^(d) 陰性対照: ジスルフィドを含有する基が3,3-ジメチルブチル (DMB)で置換されることを除いて同じ配列を含有するsiRNA; DMBは、リン酸塩に(生理学的条件下で)不可逆的に連結される。ND = 不検出。NA = 非活性。

【0605】

本発明のハイブリダイズポリヌクレオチドのEC₅₀（48時間の時点）（構造については、図1Bを参照）は、1.1nMであると測定された。

【0606】

表11は、本発明の他のハイブリダイズポリヌクレオチドについてのデータを示し（構造については、図1Aを参照）、ここで、特定のウリジン（矢印で示される）が、表11に示される構造を有するヌクレオチド間3'-ホスホトリエステルを有する。生物可逆的および生物不可逆的基を含むsiRNAについてのインビトロトランスフェクションデータが、図12に示される。

【0607】

SKOV-3-Luc細胞におけるトランスフェクションデータ：

【0608】

10

20

30

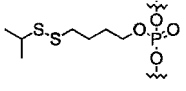
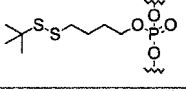
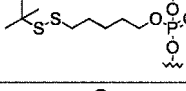
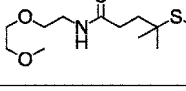
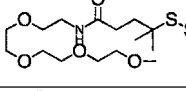
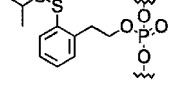
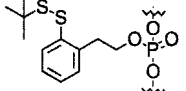
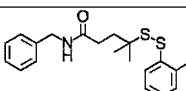
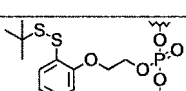
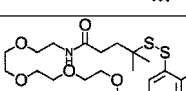
40

【表 3 6】

表11

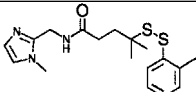
配列番号 112: GCUACAUCUGGAGACAUAt

配列番号 113: tUCGAUGUAAGACCUCUGUAU

化合物	EC50 (nM)	
	24時間	48時間
対照siRNA	0.01	0.01
	0.43	0.11
	0.66	0.13
	>10	>10
	0.43	-
	0.78	0.19
	0.15	0.06
	0.73	0.13
	0.16	0.06
	1.8	0.70
	1.01	0.42

【0609】

【表 3 7】

化合物	EC50 (nM)	
	24時間	48時間
対照siRNA	0.01	0.01
	0.82	0.22

【0610】

マウス初代肝細胞単離およびインビトロ実験：

標準的な2工程コラゲナーゼかん流技術 (Li et al. Methods Mol Biol., 633:185-196; 2010; その開示内容は、全体が参照により本明細書に援用される) を用いて、初代マウス肝細胞を単離した。簡潔には、6~10週

10

20

30

40

50

齢の雌 C 5 7 / B 1 6 マウスを、ケタミン (8 0 ~ 1 0 0 m g / k g) / キシラジン (5 ~ 1 0 m g / k g) の混合物の腹腔内注射によって麻酔した。次に、腹腔を露出させ、22 G ニードルを用いて内臓大動脈に挿管した。肝静脈を切断し、0.5 mM の E T D A を含有するリン酸緩衝生理食塩水 (P B S) の溶液を用いて、5 ~ 1 0 分間にわたって肝臓を直ちにかん流させた。この溶液を、さらに5 ~ 1 0 分間にわたって、ダルベッコ改変イーグル培地 (D M E M , G i b c o) 中のコラゲナーゼ (1 0 0 I U / m l) の溶液に直ちに交換した。かん流の終了時に、肝臓を取り出し、肝細胞を、4 °C の 1 0 % のウシ胎仔血清を含有する D M E M 中に収集した。次に、細胞を、7 0 μ m の滅菌フィルタに通してろ過し、同じ溶液中で3回洗浄し、トリパンブルー (T r y p a n B l u e) 染色を用いて、細胞生存率を評価した。次に、0.1 % のラット尾コラーゲンまたは2 % のマトリゲルで被覆された96ウェルプレートに細胞を播種し、5 % の C O ₂ インキュベータ中で、37 °C で3 ~ 4 時間インキュベートした。次に、試験化合物を細胞に加え、5 % の C O ₂ インキュベータ中で、37 °C でインキュベートした。インキュベーション期間の終了時に、細胞を溶解し、m R N A を単離し、標的遺伝子の発現を q P C R によって測定し、標準的なプロトコルを用いて、ハウスキーピング遺伝子に対して正規化した。結果が、図 1 3 A および 1 3 B にグラフ化され、表 1 2 に示される。

【 0 6 1 1 】

【表 3 8 】

表 12

初代マウス肝細胞における活性			
化合物#	ApoB IC ₅₀ (nM)	GAPDH IC ₅₀ (nM)	ATIII IC ₅₀ (nM)
SB0129	0.1		
SB0130	2		
SB0134	1		
SB0141	6		
SB0142	2.5		
SB0146		0.2	
SB0147		1	
SB0148		0.05	
SB0150	172		
SB0154	0.1		
SB0155	0.2		
SB0156	0.5		
SB0157	0.2		
SB0162	1		
SB0163	2.5		
SB0164	1.5		
SB0234	0.5		

【 0 6 1 2 】

10

20

30

【表 3 9】

化合物#	初代マウス肝細胞における活性		
	ApoB IC ₅₀ (nM)	GAPDH IC ₅₀ (nM)	ATIII IC ₅₀ (nM)
SB0235	0.6		
SB0236	3.2		
SB0243	0.3		
SB0244	1.4		
SB0245	5.8		
SB0246	5.6		
SB0206			0.006
SB0211			0.2
SB0254			1.1
SB0255			0.3
SB0256			0.01
SB0257			0.007
SB0258			0.006
SB0296			0.1
SB0319			1
SB0320			0.85
SB0321			0.006
SB0322			0.09
SB0323			1.3
SB0332			0.005
SB0333			0.06
SB0334			0.004
SB0335			0.03
SB0336			0.04
SB0345			1.1
SB0346			0.08
SB0381			0.45
SB0516			4.7
SB0517			1
SB0518			0.64
SB0535			1.5
SB0538			0.16
SB0539			12.4
SB0590			0.17
SB0591			0.14
SB0592			0.23
SB0593			0.16
SB0594			0.12
SB0595			0.45

10

20

30

【 0 6 1 3 】

【表 40】

化合物#	初代マウス肝細胞における活性		
	ApoB IC ₅₀ (nM)	GAPDH IC ₅₀ (nM)	ATIII IC ₅₀ (nM)
SB0596			0.32
SB0597			0.17
SB0598			0.21
SB0599			0.07
SB0600			1.2
SB0609			2.3
SB0610			0.28
SB0614			0.4
SB0616			0.33
SB0617			0.24
SB0619			0.4
SB0620			0.28
SB0621			0.23
SB0622			0.18
SB0639			3.5
SB0640			1.6
SB0641			0.11
SB0642			0.1
SB0643			0.27
SB0665			1.72
SB0666			0.1
SB0672			3.2
SB0673			2.2
SB0674			0.56
SB0675			1.4
SB0676			0.14
SB0677			0.22
SB0678			0.05
SB0708			>100
SB0709			>100
SB0721			0.29
SB0722			0.3
SB0723			0.38
SB0724			0.36

10

20

【0614】

30

実施例 3. 細胞結合実験

ジスルフィドホスホトリエステルオリゴヌクレオチド-Cy3細胞結合の一般的なプロトコル：ジスルフィド生物可逆的基を含有する本発明のポリヌクレオチド構築物を、10 mMの最終濃度で、G²'M^od-Cy3（ガイド鎖）にアニーリングした。

【0615】

細胞処理設定：48ウェルプレートにおいてウェル当たり40,000個の細胞を平板培養し；細胞を一晩接着させた。次に、細胞を、500μlのPBSで1回洗浄し、次に、150μlの処理剤を加えた（注記：遊離葉酸試料の場合、処理前の1時間にわたって2.3mMの葉酸を含有する培地で細胞を処理した）。細胞を4時間処理し；4時間後、細胞をPBSで1回洗浄し、トリプシン処理し、siRNA-Cy3細胞結合についてフ

40

【0616】

これらの実験の結果が、図14A、14B、15A、15B、16A、および16Bに示される。図14Aは、KB細胞に結合する（葉酸塩）₃-siRNN-Cy3コンジュゲートについての用量曲線を示す。図14Bは、（葉酸塩）₃-siRNN-Cy3および（葉酸塩）₁-siRNN-Cy3コンジュゲートについての解離定数（K_d）を決定するグラフを示す。図15Aは、HepG2細胞に結合する（GalNAc）₉-siRNN-Cy3コンジュゲートについての用量曲線を示す。図15Bは、（GalNAc）₉-siRNN-Cy3および（GalNAc）₃-siRNN-Cy3コンジュゲートについての解離定数（K_d）を決定するグラフを示す。図16Aは、初代腹腔マクロファ

50

ージに結合する（マンノース）₁₈-siRNA-Cy3コンジュゲートについての用量曲線を示す。図16Bは、（マンノース）₁₈-siRNA-Cy3および（マンノース）₆-siRNA-Cy3コンジュゲートについての解離定数（ K_d ）を決定するグラフを示す。

【0617】

実施例4．インビボ活性アッセイ

雄NFκB-RE-Lucマウス（Taconic）を用いて、ルシフェラーゼジスルフィドホスホトリエステル分子のインビボ活性を試験した。これらのマウスは、肝臓を含む全身にわたってルシフェラーゼ遺伝子（GL3）を発現し、ルシフェラーゼ活性は、TNFαなどのNFκB活性化因子によって誘導可能である。試験物質（ルシフェラーゼジスルフィドホスホトリエステル、野生型ルシフェラーゼsiRNA配列、および非標的対照siRNA配列）を、製造業者の推奨事項にしたがって、InvivoFectamine 2.0 Reagent（Life Technologies）と複合体化し、滅菌インスリン用シリンジを用いて、尾静脈に注射した（約200μL、7mg/kg体重）（n=1~2匹のマウス/処置）。2匹のさらなるマウスに、同体積のビヒクルを注射し、偽処置対照として用いた。注射の24時間後、マウスTNFα（0.03μg/g）の腹腔内注射をマウスに行って、肝臓ルシフェラーゼ活性を誘導した。TNFα注射から4時間後、マウスに、D-ルシフェリン（150mg/kg）を腹腔内注射し、D-ルシフェリン注射の約10分後、IVIS Lumina全身撮像装置（Perkin Elmer）を用いて、肝臓ルシフェラーゼ活性を測定した。siRNA投与から3、6、および8日後にマウスを再度撮像して、上述されるように肝臓ルシフェラーゼ活性を評価した。このアッセイの結果が、図17に示される。

【0618】

インビボ実験：

試験化合物を、皮下または静脈内（側方尾静脈）注射（200μL；3匹のマウス/処置）のいずれかによって雌C57BL/6マウスに投与した。注射後の適切な時点で、マウスを殺処分し、血液試料を心穿刺によって採取した。約50~100mgの肝臓試料片を採取した直後に、液体窒素で凍結した。標準的なプロトコルを用いて、全mRNAを肝臓ホモジネートから単離し、標的遺伝子の発現をqPCRによって定量し、標準的なプロトコルを用いて、ハウスキーピング遺伝子に対して正規化した。

【0619】

結果が、図18A、18B、19A、19B、および20Bに示される（図20B中のデータを生成するのに使用されるsiRNA構造については、図20Aを参照）。

【0620】

マウス肝細胞の単離および培養のための例示的な手順については、Liet al., Methods Mol. Biol., 633:185-196; 2010（その開示内容は、全体が参照により本明細書に援用される）を参照されたい。

【0621】

薬理学：

【0622】

10

20

30

40

【表 4 1】

表 13

残留 ApoB mRNA(%)*

化合物#	皮下投与量 (mg/kg)	% SEM	静脈内投与量 (mg/kg)	% SEM
	平均		平均	
SB-0081	48.7 (30)	3.8		
SB-0085	114 (30)	8.6		
SB-0094	27.7 (30)	0.8	32.5 (20)	4.6
SB-0094	63.2 (10)	2.2		
SB-0095	91.8 (30)	7		
SB-0096	25.0 (30)	4.1		
SB-0097	22.3 (30)	4.3	44.8 (20)	2.8
SB-0097	49.5 (10)	1.3		
SB-0098	17.3 (30)	2.6		
SB-0102	73.5 (15)	3.9		
SB-0106	84.1 (10)	6		
SB-0107	68.2 (10)	3.8	53.3 (30)	3.2
SB-0108	78.5 (10)	9.5		
SB-0109	97.8 (12.5)	12.5	91.2 (20)	11.9
SB-0121	75.5 (10)	1.5		
SB-0122	92.3 (20)	6.5		
SB-0123	58.6 (20)	8.2		
SB-0129	24.7 (7)	5.4		
SB-0130			56.5 (4.3)	6
SB-0141			42.8 (4.3)	7.8
SB-0162			40.3 (10)	1.5
SB-0222	36.5 (10)	9.3		
SB-0223	38 (10)	1.6		
SB-0224	36.4 (10)	5.2		
SB-0225	39.9 (10)	1		
SB-0226	34.6 (10)	2.2		
SB-0234			40.9 (10)	3
SB-0235			45.4 (10)	3.3
SB-0236			45.0 (10)	5.5
SB-0243	39.1 (7)	3.2		
SB-0244	36.7 (7)	0.8		
SB-0245	54.4 (7)	2.9		
SB-0246	48.8 (7)	2.4		

* 遺伝子発現を、投与の48~72時間後に測定した。

10

20

30

【0 6 2 3】

【表 4 2】

表 14
残留 AT3 血漿活性*

化合物#	血漿活性		用量 (mg/kg、皮下)
	平均	SEM	
SB-0206	35.3	2.7	0.5
SB-0255	93.2	9.5	2
SB-0256	71.2	3.3	0.75
SB-0257	54.7	4.6	0.75
SB-0258	94.2	4.5	0.75
SB-0295	16.3	6	2
SB-0296	19.6	2	1
SB-0297	19.1	1.1	2
SB-0319	68.6	7.7	1
SB-0320	68.7	2.3	1
SB-0321	30.2	1.7	1
SB-0322	40.7	5.9	1
SB-0323	80.8	3.6	1
SB-0332	41.4	5.3	1
SB-0333	23.3	2.5	1
SB-0334	23	0.9	1
SB-0335	55.6	7.1	1
SB-0336	55	2.9	1
SB-0337	54.5	3.6	1
SB-0338	70.3	2	1
SB-0339	53.7	4.2	1
SB-0340	32.2	5.4	1
SB-0345	24.1	2	1
SB-0347	62.5	7.2	1
SB-0348	20.3	1.6	1
SB-0349	29.7	0.9	1

10

20

30

【0 6 2 4】

【表 4 3】

化合物#	血漿活性		用量 (mg/kg、皮下)
	平均	SEM	
SB-0366	20.2	3.9	1
SB-0367	20.3	5.1	1
SB-0368	38.9	3.3	1
SB-0369	34.8	2.5	1
SB-0370	21.3	1.2	1
SB-0371	22.9	5.2	1
SB-0372	8.7	0.8	1
SB-0373	11.7	2.8	1
SB-0374	8.3	0.8	1
SB-0375	10.2	1.8	1
SB-0376	30.7	2.9	1
SB-0377	22.5	7.4	1
SB-0378	25.6	1.4	1
SB-0379	30.9	1.3	1
SB-0381	34.9	2.7	1
SB-0382	43.9	7.5	1
SB-0459	36.3	2	0.5
SB-0460	48.5	6.3	0.5
SB-0461	45	0.9	0.5
SB-0462	54.2	1.3	0.5
SB-0463	51	3.4	0.5
SB-0464	53.5	3.2	0.5
SB-0481	96.2	5.9	0.5
SB-0482	111.5	2.7	0.5
SB-0483	103.2	8	0.5
SB-0484	114.5	5.1	0.5
SB-0506	40.2	4.1	0.5
SB-0507	56.6	8	0.5
SB-0508	51.9	3.4	0.5
SB-0509	47.3	1.8	0.5
SB-0510	46.8	1.3	0.5
SB-0511	48.2	2.3	0.5
SB-0512	53	1.5	0.5
SB-0516	47.8	3.8	0.5
SB-0517	48.8	2.2	0.5
SB-0518	57.1	4.5	0.5
SB-0522	47.7	1.5	0.5
SB-0523	38.6	1.6	0.5
SB-0524	48.2	9.2	0.5
SB-0525	39.4	3.6	0.5

10

20

30

【 0 6 2 5 】

【表 4 4】

化合物#	血漿活性		用量 (mg/kg、皮下)
	平均	SEM	
SB-0526	38.4	3.5	0.5
SB-0527	40.5	3.1	0.5
SB-0528	82	2.5	0.5
SB-0529	47.3	4.7	0.5
SB-0530	41.9	6.4	0.5
SB-0531	46.6	4.1	0.5
SB-0532	43.7	3.5	0.5
SB-0533	46.7	4.3	0.5
SB-0535	103.3	2	0.5
SB-0538	52.2	5.5	0.6
SB-0539	95.4	3.8	0.6
SB-0560	50.2	4.6	0.5
SB-0561	76.5	3	0.5
SB-0588	78.5	2.1	0.5
SB-0589	88	1.3	0.5
SB-0590	48.4	4.5	0.5
SB-0591	37.4	2.7	0.5
SB-0592	44.9	1.7	0.5
SB-0593	51	0.6	0.5
SB-0594	39.3	0.8	0.5
SB-0595	44.6	2.7	0.5
SB-0596	22.2	0.4	0.5
SB-0597	41.1	3.7	0.5
SB-0598	71.5	1.1	0.5
SB-0599	47.3	4.8	0.5
SB-0600	76	1.5	0.5
SB-0609	89.2	6.3	0.5
SB-0610	96.3	0.9	0.5
SB-0614	54	5.8	0.5
SB-0616	56.7	6.8	0.5
SB-0617	54.6	4	0.5
SB-0618	67.8	2.5	0.5
SB-0619	38.4	2.9	0.5
SB-0620	44.4	0.7	0.5
SB-0621	40.8	3.3	0.5
SB-0622	42.1	5.5	0.5
SB-0627	79.6	5.2	0.5
SB-0639	89.2	3.3	0.4
SB-0640	89.5	2.4	0.4
SB-0641	32.6	3.7	0.5
SB-0642	42	1.5	0.5
SB-0643	65.2	2.3	0.5

10

20

30

【 0 6 2 6 】

【表 4 5】

化合物#	血漿活性		用量 (mg/kg、皮下)
	平均	SEM	
SB-0665	52.7	6.8	0.5
SB-0666	41.2	2	0.5
SB-0672	95.8	7.7	0.5
SB-0673	99.5	1.4	0.5
SB-0674	97.2	5.9	0.5
SB-0675	98.5	5.8	0.5
SB-0676	95.6	3.3	0.5
SB-0677	93.5	5.5	0.5
SB-0678	86.4	2.5	0.5
SB-0706	96.3	8.2	0.5
SB-0707	56	12	0.5
SB-0720	56.2	5.7	0.5
SB-0721	60.1	4.5	0.5
SB-0722	50	3.8	0.5
SB-0723	72.5	3.3	0.5
SB-0724	59.9	5.3	0.5
SB-0730	97	5.5	0.5
SB-0731	99.7	3.3	0.5
SB-0732	110.5	3	0.5
SB-0733	101.5	3.9	0.5
SB-0734	103.3	4.9	0.5

* AT3活性を、投与の7~10日後に測定した。

10

20

【0627】

G A P D H－マンノースコンジュゲートが、用量依存的なインビボ活性を実証する

プロトコル1：雌C57BL/6マウスに、3%のチオグリコレート（2.5mL）の腹腔内（IP）注射を施した。チオグリコレート注射（3回投与）の6時間、24時間、および48時間後、IP注射によって試験化合物（10mg/kg）を投与した。腹腔マクロファージを、腹腔を氷冷PBSで洗浄することによって24時間後に採取した。細胞をPBSで2回洗浄し、10%のウシ胎児血清を含有するRPMI中で再懸濁させ、3時間にわたって96ウェルプレート中で平板培養して、マクロファージ接着を可能にした。次に、細胞を洗浄し、溶解させ、標準的な方法を用いて、全mRNAを抽出した。GAPDH遺伝子の発現を、RTqPCRによって定量し、ハウスキーピング遺伝子に対して正規化した。結果が、図21Aに示される。

30

【0628】

プロトコル2：雌C57BL/6マウスに、3%のチオグリコレート（2.5mL）の腹腔内（IP）注射を施した。チオグリコレート注射（2回投与）の6時間および24時間後、IP注射によって試験化合物を投与した。腹腔マクロファージを、腹腔を氷冷PBSで洗浄することによって24時間後に採取した。細胞をPBSで2回洗浄し、10%のウシ胎児血清を含有するRPMI中で再懸濁させ、5%のCO₂雰囲気下で、37℃で3時間にわたって96ウェルプレート中で平板培養して、マクロファージ接着を可能にした。次に、細胞を洗浄して、非マクロファージ細胞を除去し、溶解させ、標準的な方法を用いて、全mRNAを抽出した。GAPDH遺伝子の発現を、RTqPCRによって定量し、ハウスキーピング遺伝子に対して正規化した。結果が、図21Bに示される。

40

【0629】

プロトコル3：雌C57BL/6マウスに、3%のチオグリコレート（2.5mL）の腹腔内（IP）注射を施した。チオグリコレート注射（単回投与）の24時間後、IP注射によって試験化合物を投与した。腹腔マクロファージを、腹腔を氷冷PBSで洗浄することによって2時間後に採取した。細胞をPBSで2回洗浄し、10%のウシ胎児血清を含有するRPMI中で再懸濁させ、5%のCO₂雰囲気下で、37℃で3時間にわたって96ウェルプレート中で平板培養して、マクロファージ接着を可能にした。非マクロファージ細胞をPBSによって洗い落とし、マクロファージを、5%のCO₂雰囲気下で、37℃で48時間にわたって、10%のウシ胎児血清を含有するRPMI中でインキュベート

50

した。次に、細胞を溶解させ、GAPDH遺伝子発現を、RTqPCRによって定量し、ハウスキーピング遺伝子に対して正規化した。結果が、図22に示される。

【0630】

実施例5：マウス初代骨髄前駆細胞単離およびマクロファージを用いたインビトロ実験：

プロトコル1：マウス初代骨髄前駆細胞を、公開されたプロトコルにしたがって、雌C57BL/6マウスの大腿骨および脛骨から単離した。細胞を4℃のPBSで直ちに洗浄し、10%のウシ胎仔血清および20ng/mlの組み換えマウスM-CSFを含有するRPMI中で、 2×10^6 個の細胞/mlで懸濁させた。細胞を96ウェルプレートに播種し、5%のCO₂雰囲気下で、37℃で7日間インキュベートして、マクロファージへの分化を可能にした。細胞を24時間毎に洗浄して、潜在的な非マクロファージ細胞汚染を除去した。細胞を、マンノース受容体発現に基づいて7日目に使用した。経時的なマンノース受容体発現が、図23Aにグラフ化される。表5および7からの試験化合物を、無血清OptiMEM中で希釈し、48時間にわたって細胞とともにインキュベートした。次に、細胞を溶解させ、全mRNAを抽出し、GAPDH遺伝子の発現を、RTqPCRを用いて定量し、ハウスキーピング遺伝子に対して正規化した。結果が、図23Bに示される。

10

【0631】

プロトコル2：マウス初代骨髄前駆細胞を、公開されたプロトコルにしたがって、雌C57BL/6マウスの大腿骨および脛骨から単離した。細胞を4℃のPBSで直ちに洗浄し、10%のウシ胎仔血清および20ng/mlの組み換えマウスCSFを含有するRPMI中で、 2×10^6 個の細胞/mlで懸濁させた。細胞を96ウェルプレートに播種し、5%のCO₂雰囲気下で、37℃で3日間インキュベートして、マクロファージへの分化を可能にした。4日目、組み換えマウスIL-4 (20ng/ml)を加え、細胞を、5%のCO₂雰囲気下で、37℃でさらに48時間インキュベートした。試験化合物をOptiMEM中で希釈し、48時間にわたって細胞とともにインキュベートした。次に、細胞を溶解させ、全mRNAを抽出し、GAPDH遺伝子の発現を、RTqPCRによって定量し、ハウスキーピング遺伝子に対して正規化した。結果が、図24Aに示される。

20

【0632】

プロトコル3：マウス初代骨髄前駆細胞を、公開されたプロトコルにしたがって、b-アクチン-1 lucマウス (FVB/NTac-Tg-Actb-luc-46Xen, Taconic) の大腿骨および脛骨から単離した。細胞を4℃のPBSで直ちに洗浄し、10%のウシ胎仔血清および20ng/mlの組み換えマウスCSFを含有するRPMI中で、 2×10^6 個の細胞/mlで懸濁させた。細胞を96ウェルプレートに播種し、5%のCO₂雰囲気下で、37℃で3日間インキュベートして、マクロファージへの分化を可能にした。4日目、組み換えマウスIL-4 (20ng/ml)を加え、細胞を、5%のCO₂雰囲気下で、37℃でさらに48時間インキュベートした。試験化合物をOptiMEM中で希釈し、48時間にわたって細胞とともにインキュベートした。ルシフェラーゼ活性を、Brite-lite (商標) (Perkin Elmer) の添加によって評価した。結果が、図24Bに示される。

30

【0633】

実施例6：マウス血清安定性

オリゴヌクレオチド (一本鎖および二本鎖) を含有するトリエステル血清安定性の評価を、後述されるように行った。

40

【0634】

プロトコル：20μLの250μMのdsRNAストックを作製し；それぞれから4μLを取り出し、16μLの新鮮なマウス血清中に入れ；20μLの試料をPCRプレートに入れ、37℃で、サーモサイクラーにおいて加熱し；2μLを指示される時点で取り出し、18μLのホルムアミドローディングバッファーに加え、ゲル分析前に凍結し；ゲル電気泳動 (15%の変性ゲル；臭化エチジウム染色) による分析のためにウェル当たり2μLを充填した。結果が、図25に示される。

50

【0635】

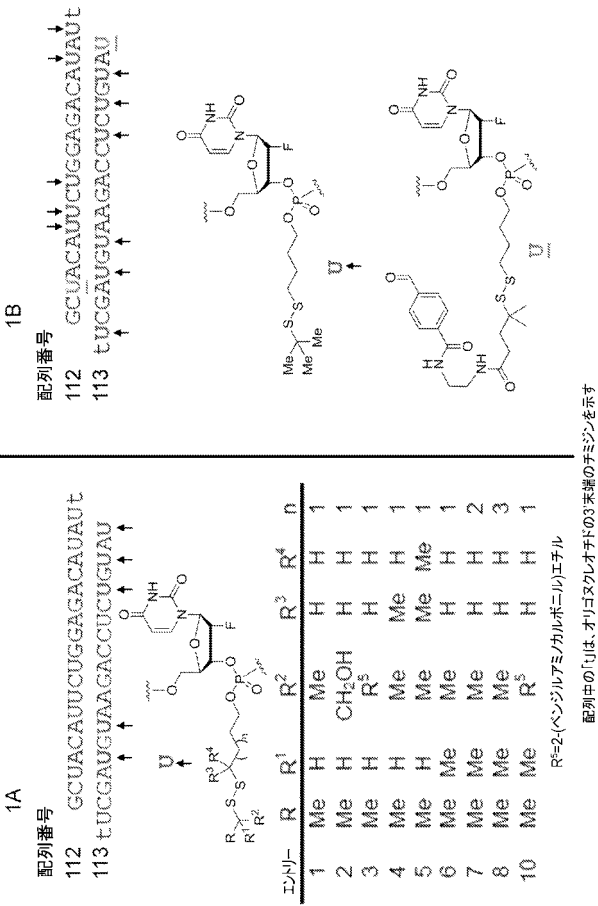
他の実施形態

記載される本発明および本発明の使用方法の様々な変更および変形が、本発明の範囲および趣旨を逸脱せずに、当業者に明らかであろう。本発明は、具体的な実施形態に関連して説明されているが、権利請求される本発明が、このような具体的な実施形態に過度に限定されるべきではないことを理解されたい。実際に、当業者に明らかな、本発明を実施するための記載される形態の様々な変更は、本発明の範囲内であることが意図される。

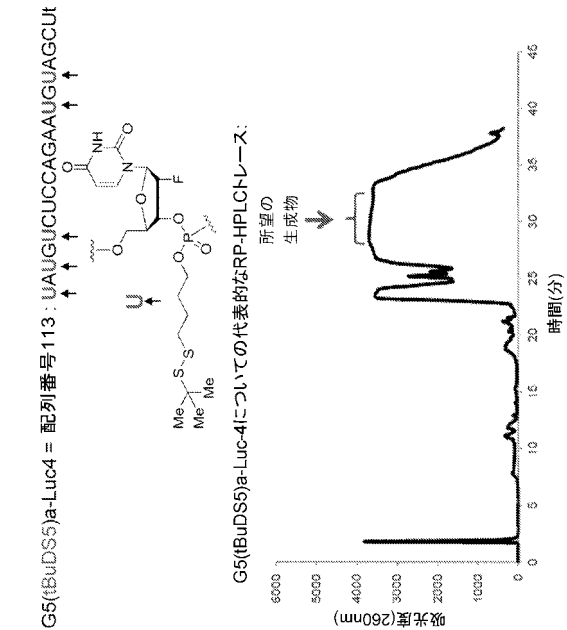
【0636】

他の実施形態が、特許請求の範囲に記載されている。

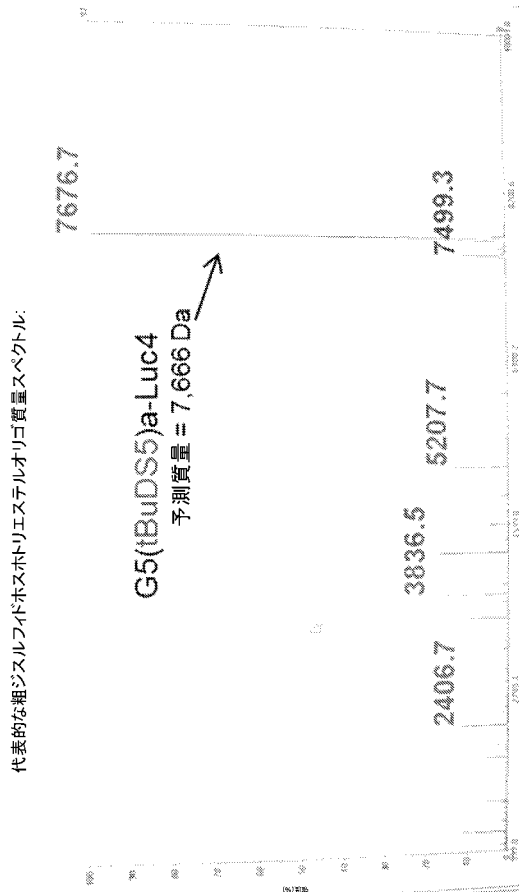
【図1】



【図2】



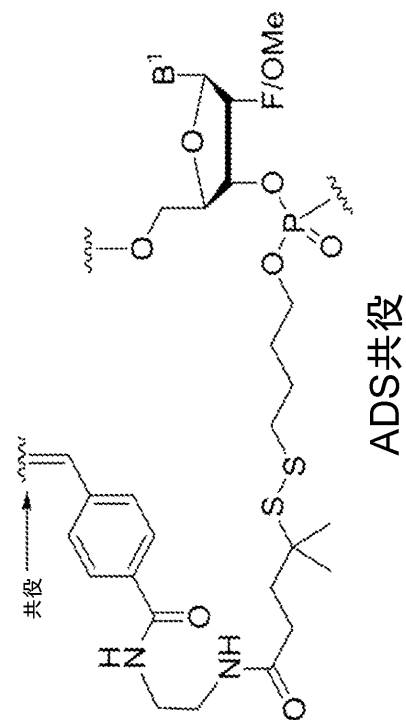
【图 3】



【図 6 B】

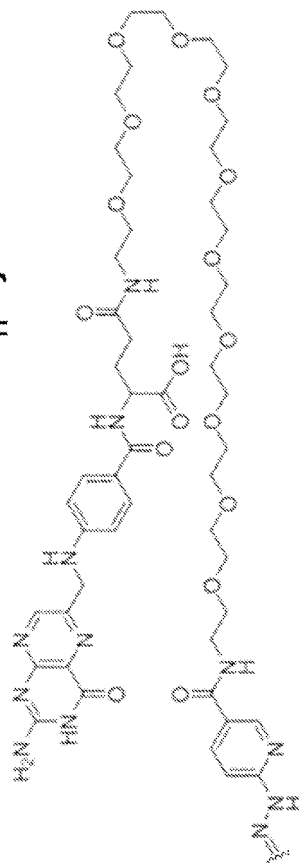
6

B



【図 7 A】

7

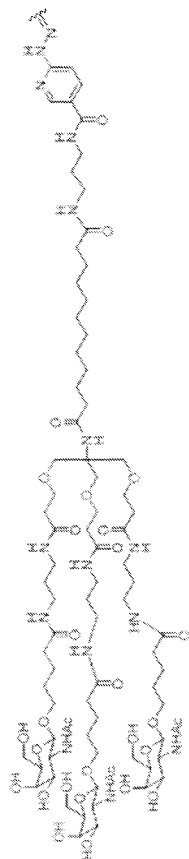
葉酸塩-PEG₁₁-HyNic

【図 7 B】

7

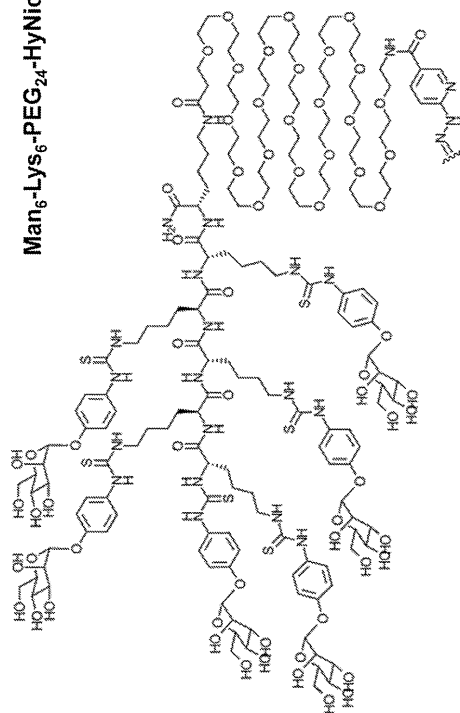
(GalNAc)₃-HyNic

B

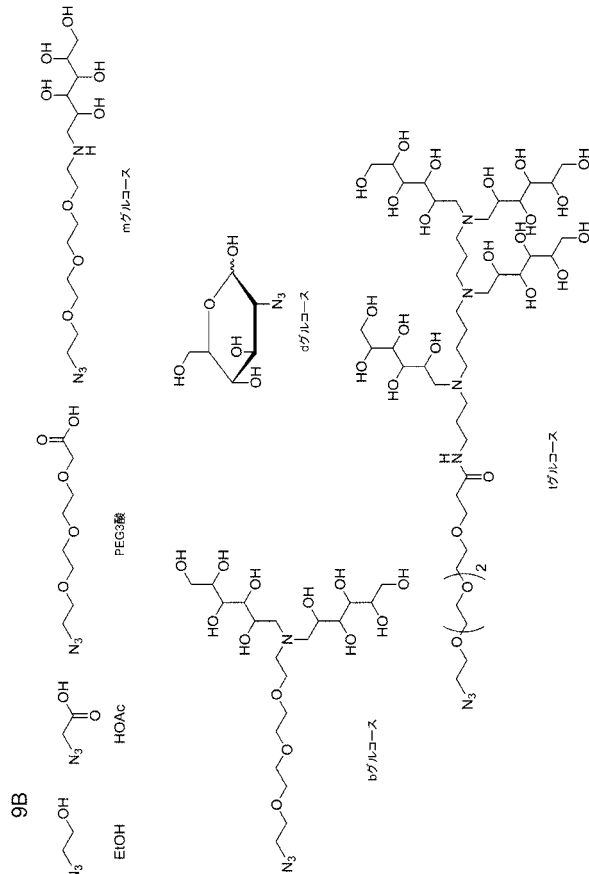


【図 8 A】

8

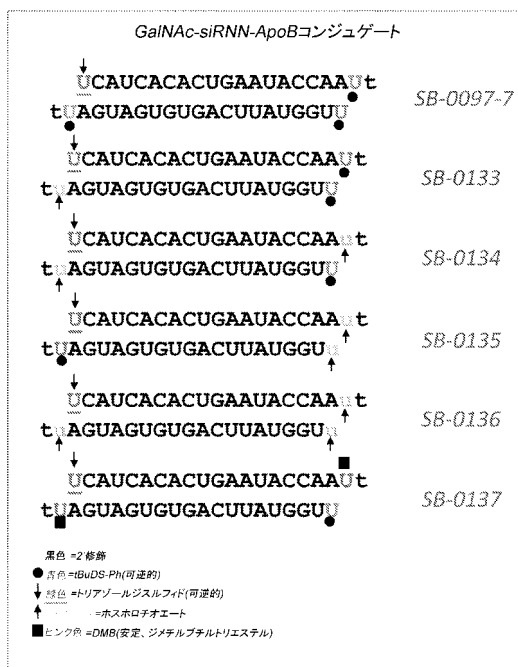
Man₆-Lys₆-PEG₂₄-HyNic

【 図 9 B 】



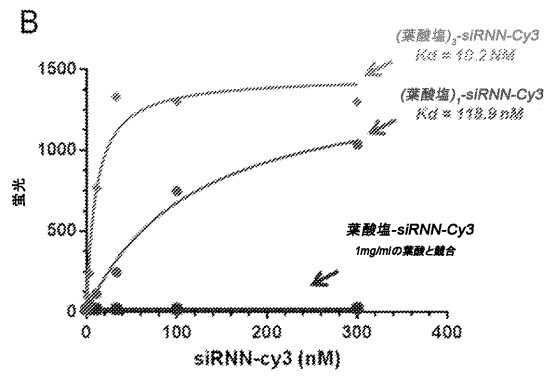
【図 1 1】

11



【図 1 4 B】

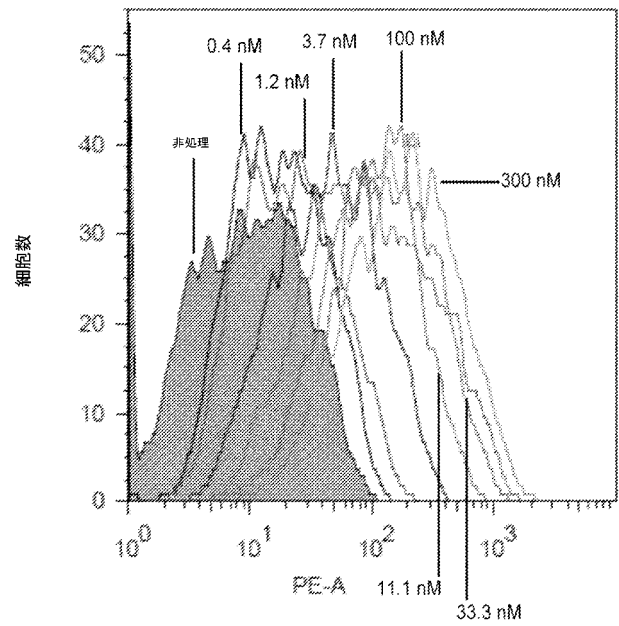
14



【図 1 5 A】

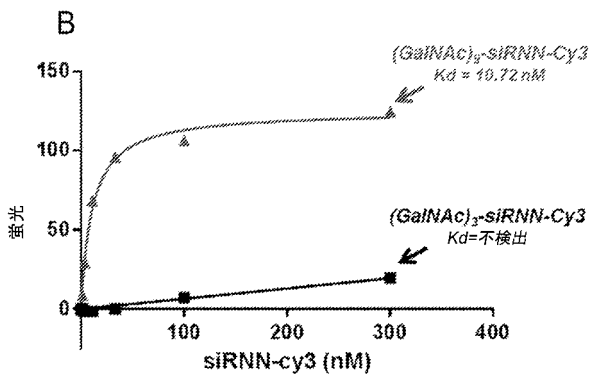
15

A



【図 1 5 B】

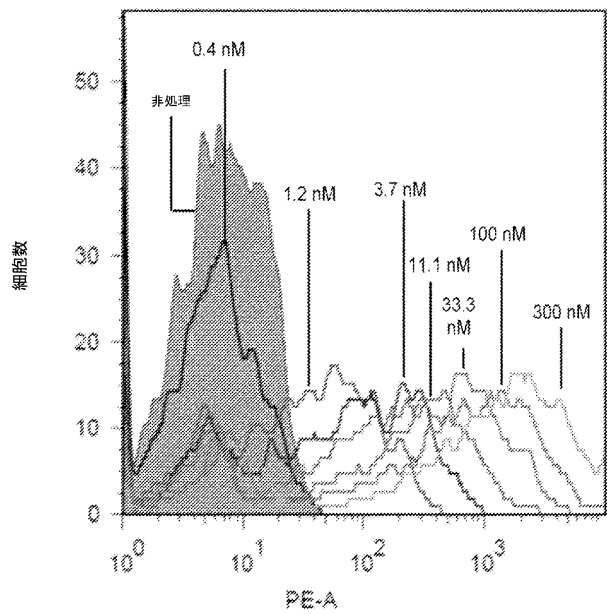
15



【図 1 6 A】

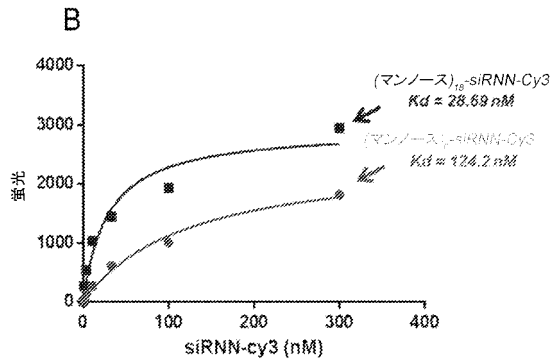
16

A



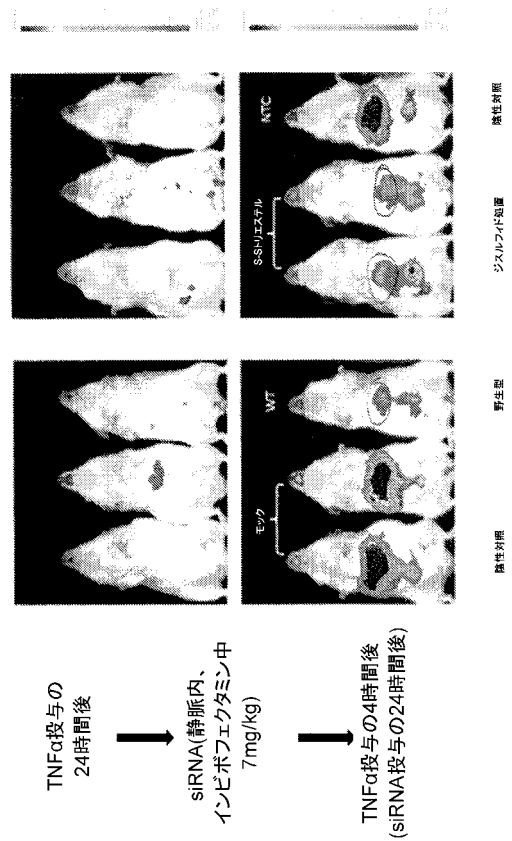
【図 16 B】

16



【図 17】

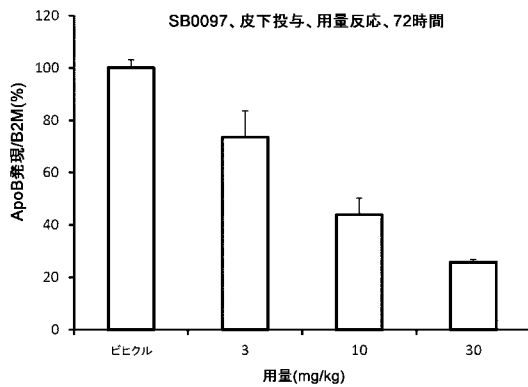
NFκB-RE-Lucマウス



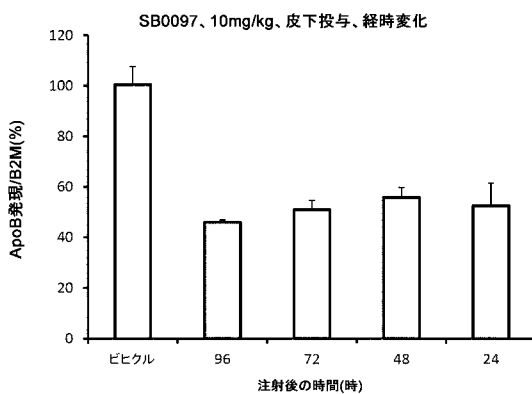
17

【図 18 A - 18 B】

18A

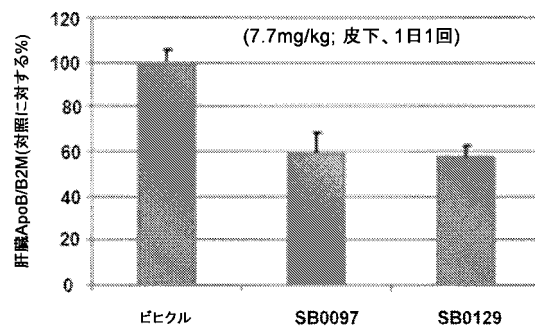


18B

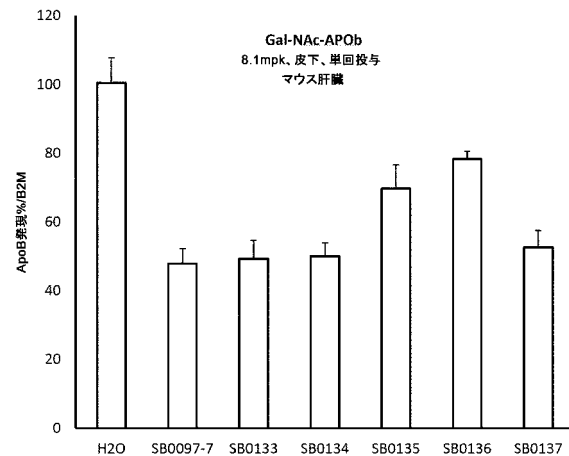


【図 19 A - 19 B】

19A

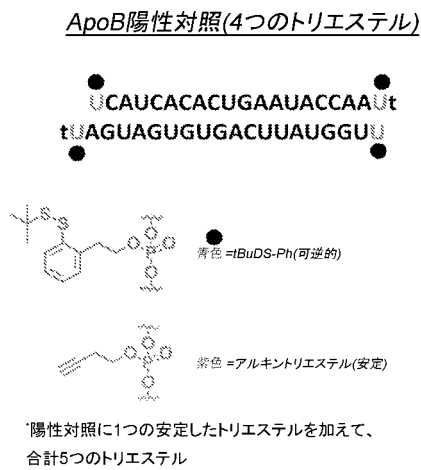


19B



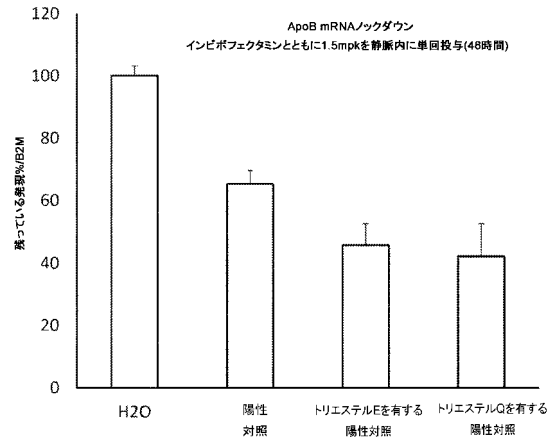
【図 20 A】

20A



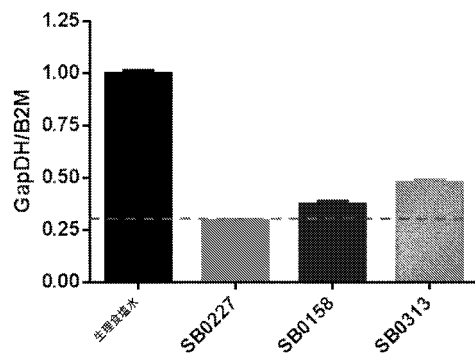
【図 20 B】

20B

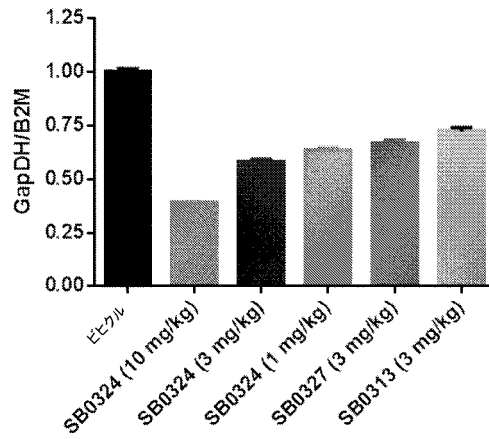


【図 21 A - 21 B】

21A

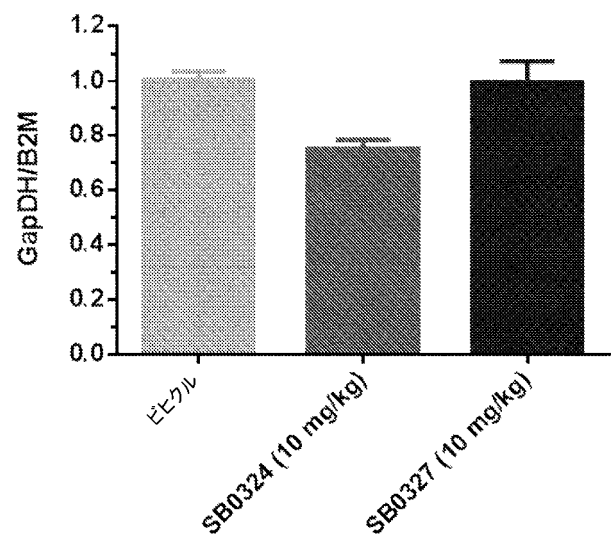


21B



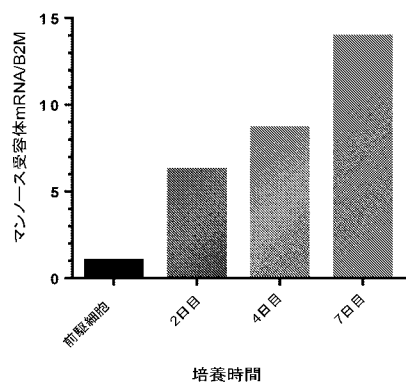
【図 22】

22

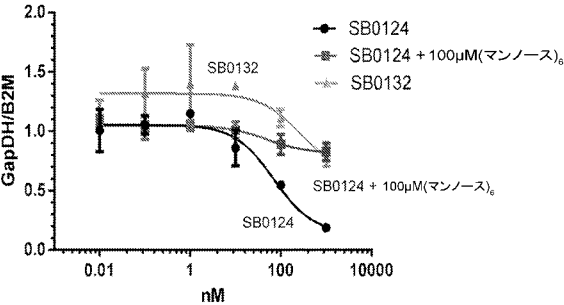


【図 2 3 A - 2 3 B】

23A

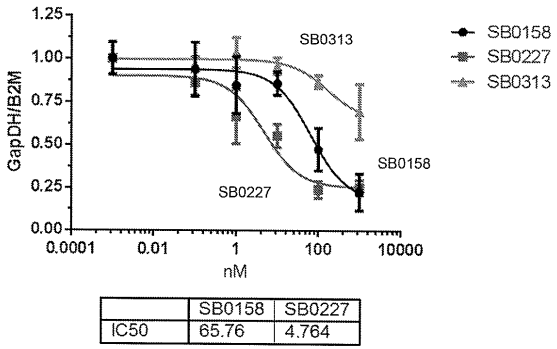


23B

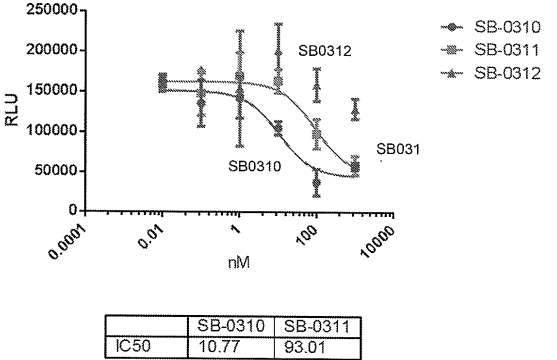


【図 2 4 A - 2 4 B】

24A

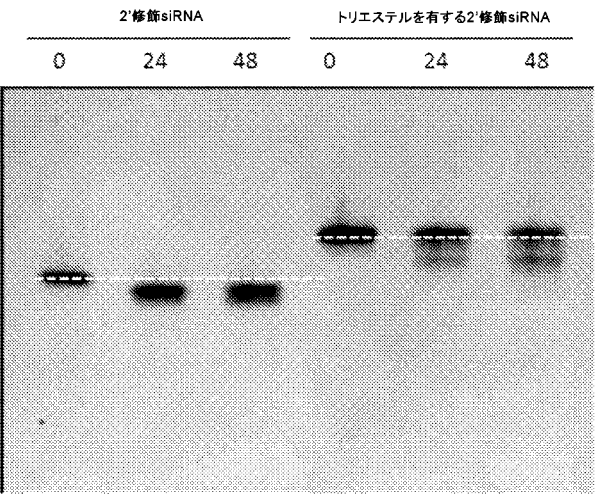


24B



【図 2 5】

25



【配列表】

2017522046000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US15/34749									
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C12N 15/11; C07H 21/00; C12P 19/34 (2015.01) CPC - C12N 15/11; C07H 21/00, 21/02 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) IPC(8): C12N 15/11; C07H 21/00; C12P 19/34 (2015.01) CPC: C12N 15/11, 15/113; C07H 21/00, 21/02; USPC: 435/91.1, 89, 85, 84, 72, 41 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatSeer (US, EP, WO, JP, DE, GB, CN, FR, KR, ES, AU, IN, CA, INPADOC Data); Google; Google Scholar; PubMed; Dialog ProQuest; 'passenger strand,' 'sense strand,' 'guide strand,' 'antisense strand,' 'non-bioreversible group'											
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>US 2012/0040459 A1 (KHVOROVA, A et al.) February 16, 2012; paragraphs [0009], [0011], [0082], [0269]</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>WO 2014/031575 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) February 27, 2014; paragraphs [0007], [0018], [00131], [00236]; Claim 89</td> <td>3</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	US 2012/0040459 A1 (KHVOROVA, A et al.) February 16, 2012; paragraphs [0009], [0011], [0082], [0269]	1	X	WO 2014/031575 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) February 27, 2014; paragraphs [0007], [0018], [00131], [00236]; Claim 89	3
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.									
X	US 2012/0040459 A1 (KHVOROVA, A et al.) February 16, 2012; paragraphs [0009], [0011], [0082], [0269]	1									
X	WO 2014/031575 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) February 27, 2014; paragraphs [0007], [0018], [00131], [00236]; Claim 89	3									
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.											
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family											
Date of the actual completion of the international search 18 November 2015 (18.11.2015)		Date of mailing of the international search report 18 DEC 2015									
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Shane Thomas PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774									

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US15/34749

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 6-111
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

Please See Supplemental Page

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

Please See Supplemental Page

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/US15/34749

-----Continuation of Box No. III - Observations where unity of invention is lacking:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Groups I+: Claims 1-5 and a guide strand comprising a first nucleoside followed by a phosphate substituted by a C3-C6 alkyl are directed toward a hybridized polynucleotide construct comprising a passenger strand and a guide strand loadable into a RISC complex.

The hybridized polynucleotide construct will be searched to the extent that the guide strand comprises a non-bioreversible internucleoside group following the first nucleoside in the strand, wherein the non-bioreversible group encompasses a phosphate substituted with a C3-6 alkyl. It is believed that Claims 1 and 3 (in-part) encompass this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass a phosphate substituted with a C3-C6 alkyl. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected guide and/or passenger strand(s) with fully specified structure(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An Exemplary Election would be: a passenger strand encompassing a structure comprising a 5' H-S-S=C-C-B group, where B is a terminal phosphorous group and a phosphorothioate internucleoside group following the first nucleoside in the strand.

Groups I+ share the technical features including: a hybridized polynucleotide construct comprising a passenger strand, a guide strand loadable into a RISC complex, and (i) a 3'-terminal or an internucleotide non-bioreversible group in said guide strand; or (ii) a 5'-terminal, a 3'-terminal, or an internucleotide non-bioreversible group in said passenger strand, and a 5'-terminal, a 3'-terminal, or an internucleotide disulfide bioreversible group in said guide strand or said passenger strand; and a hybridized polynucleotide construct comprising a passenger strand and a guide strand loadable into a RISC complex, wherein each of said passenger strand and said guide strand has the structure according to the following formula: 5'-D-(Nuc-E)_n-Nuc-F, or a salt thereof, wherein each n is independently an integer from 10 to 150, each Nuc is independently a nucleoside; and D of said guide strand is hydroxyl, phosphate, or a disulfide bioreversible group; D of said passenger strand is H, hydroxyl, optionally substituted C1-6 alkoxy, a protected hydroxyl group, phosphate, diphosphate, triphosphate, tetraphosphate, pentaphosphate, a 5' cap, phosphothiol, an optionally substituted C1-6 alkyl, an amino containing group, a biotin containing group, a digoxigenin containing group, a cholesterol containing group, a dye containing group, a quencher containing group, a polypeptide, a carbohydrate, a neutral organic polymer, a positively charged polymer, a therapeutic agent, a targeting moiety, an endosomal escape moiety, a non-bioreversible group, or a disulfide bioreversible group; each E is independently phosphate, phosphorothioate, a non-bioreversible group, or a disulfide bioreversible group; each F is independently H, hydroxyl, optionally substituted C1-6 alkoxy, a protected hydroxyl group, a monophosphate, a diphosphate, a triphosphate, a tetraphosphate, a pentaphosphate, phosphothiol, an optionally substituted C1-6 alkyl, an amino containing group, a biotin containing group, a digoxigenin containing group, a cholesterol containing group, a dye containing group, a quencher containing group, a polypeptide, a carbohydrate, a neutral organic polymer, a positively charged polymer, a therapeutic agent, a targeting moiety, an endosomal escape moiety, a non-bioreversible group, or a disulfide bioreversible group; wherein at least one of said disulfide bioreversible groups comprises -S-S-(Link A)-B, wherein Link A is independently a divalent or a trivalent linker comprising sp³-hybridized carbon atom bonded to B and a carbon atom bonded to -S-S-, wherein, when Link A is a trivalent linker, the third valency of Link A combines with -S-S- to form optionally substituted C3-9 heterocyclylene; and B is independently a 5'-terminal phosphorus (V) group, a 3'-terminal phosphorus (V) group, or an internucleotide phosphorus (V) group; wherein said hybridized polynucleotide construct comprises at least one non-bioreversible group in said guide strand, or said hybridized polynucleotide construct comprises -S-S-(Link A)-B and at least one non-bioreversible group.

However, these shared technical features are previously disclosed by US 2012/0040459 A1 to Khvorova, et al. (hereinafter 'Khvorova').

Khvorova discloses a hybridized polynucleotide construct (an RNAi construct with double-stranded regions (a hybridized polynucleotide construct); abstract) comprising a passenger strand (paragraph [0009]), a guide strand (paragraph [0009]) loadable into a RISC complex (compatible with RISC loading; paragraph [0082]), and (i) an internucleotide non-bioreversible group (a phosphorothioate or other non-hydrolyzable modified phosphate group (and (i) an internucleotide non-bioreversible group); paragraphs [0011], [0269]) in said guide strand (paragraph [0011]); and a hybridized polynucleotide construct (an RNAi construct with double-stranded regions (a hybridized polynucleotide construct); abstract) comprising a passenger strand (paragraph [0009]), a guide strand (paragraph [0009]) loadable into a RISC complex (compatible with RISC loading; paragraph [0082]), wherein each of said passenger strand and said guide strand has the structure according to the following formula: 5'-D-(Nuc-E)_n-Nuc-F, or a salt thereof (wherein each of the guide and passenger strands have at least 8-12 nucleotides in length, a 5' phosphate, internucleotide non-hydrolyzable phosphate or phosphonate groups, and a 3' blocking group (wherein each of said passenger strand and said guide strand has the structure according to the following formula: 5'-D-(Nuc-E)_n-Nuc-F, or a salt thereof); paragraphs [0009], [0011], [0050], [0269], [0271], [0272]), wherein each n is independently an integer from 10 to 150 (wherein n is from 10-20; paragraph [0012]), each Nuc is independently a nucleoside (paragraph [0009]); and D of said guide strand is phosphate (the guide strand may be 5'-phosphorylated (D of said guide strand is phosphate); paragraphs [0009], [0050]); D of said passenger strand is phosphate (the strands may be 5'-phosphorylated (D of said passenger strand is phosphate); paragraph [0050]); each E is independently phosphorothioate (the guide and passenger strands include phosphorothioate modifications (each E is independently phosphorothioate); paragraph [0013]); each F is independently hydroxyl (the guide strand may be unmodified at the 3' end (each F is independently hydroxyl); paragraph [0197]), or a non-bioreversible group (the strands may be 3' capped; paragraphs [0271], [0272]); wherein said hybridized polynucleotide construct comprises at least one non-bioreversible group in said guide strand (wherein the guide strand comprises a phosphorothioate or other non-hydrolyzable modified phosphate group (wherein said hybridized polynucleotide construct comprises at least one non-bioreversible group in said guide strand); paragraphs [0011], [0269]).

Since none of the special technical features of the Groups I+ inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by the Khvorova reference, unity of invention is lacking.

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72)発明者 ブラッドショー, コート, ダブリュ.

アメリカ合衆国 9 2 1 3 0 カリフォルニア州, サンディエゴ, パーブル セージ 7 9 8 0

(72)発明者 サカムリ, スクマー

アメリカ合衆国 9 2 1 3 0 カリフォルニア州, サンディエゴ, ローレルクレスト ドライブ
1 1 2 7 1

(72)発明者 エルテプ, ラクスマン

アメリカ合衆国 9 2 0 1 1 カリフォルニア州, カールズバッド, アパートメントナンバーイー
, メラレウカ アベニュー 9 6 0

(72)発明者 ラム, ソン

アメリカ合衆国 9 2 1 2 9 カリフォルニア州, サンディエゴ, デル ディアブロ ストリート
1 1 3 3 4

(72)発明者 リウ, ディングオ

アメリカ合衆国 9 2 1 3 1 カリフォルニア州, サンディエゴ, ミロ サークル 1 1 7 3 6

(72)発明者 ミード, ブライアン

アメリカ合衆国 9 2 1 0 9 カリフォルニア州, サンディエゴ, ベリル ストリート 9 6 7

(72)発明者 イアコノ, ギウセッペ, デッロ

アメリカ合衆国 9 2 0 5 7 カリフォルニア州, オーシャンサイド, ベネティア ウェイ 4 3
5

(72)発明者 ストック, ジョセフ

アメリカ合衆国 9 2 1 1 7 カリフォルニア州, サンディエゴ, オトミ アベニュー 4 7 0 4

(72)発明者 リウ, ビン

アメリカ合衆国 9 2 1 3 0 カリフォルニア州, サンディエゴ, マーガレット クリーク ウェ
イ 1 3 5 7 1

Fターム(参考) 4C084 AA13 NA13 ZC02